

Aus dem
Universitätsklinikum Münster
Gerhard-Domagk-Institut für Pathologie
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Werner Böcker

**Prognostische Relevanz
in Bezug auf die Expression von LOXL2
bei den verschiedenen Manifestationsformen
des Prostatakarzinoms**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur
Erlangung des doctor medicinae dentium
der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von
Heßling, Stefan
aus Dorsten

2007

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Volker Arolt

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. W. Böcker
2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. A. Semjonow

Tag der mündlichen Prüfung: 04.10.2007

Aus dem Gerhard-Domagk-Institut für Pathologie
des Universitätsklinikums Münster

- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. W. Böcker -
- Referent: Univ.-Prof. Dr. med. W. Böcker -
- Koreferent: Univ.-Prof. Dr. med. A. Semjonow -

Zusammenfassung

Prognostische Relevanz
in Bezug auf die Expression von LOXL2
bei den verschiedenen Manifestationsformen
des Prostatakarzinoms

Heßling, Stefan

Einleitung: Die hier vorliegende Arbeit untersucht die prognostische Relevanz der Expression des Proteins LOXL2 (lysyl oxidase-like 2) in Zusammenhang mit den verschiedenen Manifestationsformen des Prostatakarzinoms. Lysyl oxidase-like 2 gehört zu einer Superfamilie heterogener, kupferbindender bzw. -abhängiger Enzyme, deren Charakteristikum die oxidative Umsetzung primärer Amine in reaktive Aldehyde darstellt.

Das Enzym weist immunhistologisch in den epithelialen Basalzellen gesunden, nicht malignen Prostatadrüsengewebes eine starke Expression auf. Im Falle einer malignen Entartung oder intraepithelialen Neoplasie nimmt das Maß der Nachweisbarkeit rapide ab, um schließlich im Falle des Vorliegens eines Prostatakarzinoms fast nicht mehr als nachweisbar zu erscheinen.

Material und Methode: Im Rahmen dieser Studie wurden in Paraffin eingebettete Gewebe von 39 Patienten mittels quantitativer PCR-Analyse und Immunhistochemie untersucht. Von 1122 (Ausgangskollektiv 1206 vor Färbung) Patienten mit Prostatakarzinom wurden aus Gewebeproben TMAs (Tissue Microarrays) angefertigt, die zusätzlich mittels Immunhistochemie untersucht und einer statistischen Auswertung zugeführt wurden.

Ergebnisse: In vorausgehend untersuchter genomischer Analyse mittels PCR fand sich eine Deletion in 70% der Fälle, bezogen auf die untersuchten 39 Patienten. Diese Deletion ließ sich in den Geweben auch immunhistochemisch bestätigen. Es ließ sich aufzeigen, dass eine starke Expression des Proteins LOXL2 in den Basalzellen benignen Prostatagewebes vorlag. In Fällen beginnender maligner Entartung, bzw. intraepithelialer Neoplasien nimmt die Expression stark ab. In Fällen manifester Prostatakarzinome ist in 72% keine Expression nachweisbar. Zudem ließen sich signifikante Korrelationen zwischen einer schwachen LOXL2 Expression und einem niedrigen Proliferationsindex von Ki-67, sowie einer erhöhten Expression von LOXL2 und erhöhtem Gleason-Score nachweisen.

Abschließend ließ sich festhalten, dass keine signifikante Korrelation zwischen LOXL2 und dem TNM-Stadium nachweisbar war. Zudem konnte mit dem Proliferationsmarker Ki-67/MIB1 aufgezeigt werden, dass auch im Prostatakarzinom eine hohe LOXL2 Expression mit einer erhöhten Proliferationsrate assoziiert ist.

Tag der mündlichen Prüfung: 04.10.2007

Meinen Eltern gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|--------------------|---|--------------|
| Inhaltsverzeichnis | | V-VI |
| 1 | Einleitung | Seite |
| 1.1 | Die Prostata | 7 |
| 1.1.1 | Makroskopische Grundlagen | 7 |
| 1.1.2 | Mikroskopische Grundlagen | 10 |
| 1.1.3 | Allgemeine klinische Grundlagen | 12 |
| 1.2 | Prostatakarzinome | 13 |
| 1.2.1 | Definition | 13 |
| 1.2.2 | Morphologie | 14 |
| 1.2.3 | Ausbreitung des Prostatakarzinoms | 15 |
| 1.2.4 | Histologisches Grading nach Gleason | 15 |
| 1.2.5 | Histologisches Grading nach Helpap | 19 |
| 1.3 | Epidemiologie | 21 |
| 1.3.1 | Inzidenz und Prävalenz | 21 |
| 1.3.2 | EU-Vergleich | 22 |
| 1.3.3 | Trend | 23 |
| 1.3.4 | Prognose | 24 |
| 1.4 | Ätiologie | 25 |
| 1.5 | Klinik | 26 |
| 1.6 | Diagnostik | 27 |
| 1.7 | Therapie und Prognose | 30 |
| 1.7.1 | Therapie des lokalisierten Prostatakarzinoms | 30 |
| 1.7.2 | Alternative Strahlentherapiekonzepte | 35 |
| 1.7.3 | Therapie des disseminierten Prostatakarzinoms | 36 |
| 1.8 | Markerenzym (LOXL2 –“lysyl oxidase-like 2”) | 40 |
| 1.8.1 | Einordnung der Lysyloxidase | 40 |
| 1.8.2 | Proteinisoformen der Lysyloxidase | 41 |
| 1.8.3 | LOXL2 (“lysyl oxidase-like 2”) | 41 |
| 1.9 | Tissue Microarrays (TMA) | 44 |
| 1.9.1 | Entwicklung der Microarray Technik | 44 |
| 1.9.2 | Prinzip der Microarray Technik | 45 |
| 1.9.3 | Anwendungsgebiete von TMAs | 47 |
| 1.10 | Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Multiplex-PCR | 50 |
| 1.11 | Fragestellung der Arbeit | 54 |
| 2 | Material und Methoden | |
| 2.1 | Tumorkollektiv | 55 |
| 2.2 | Erstellung des Kollektivs und praktisches Vorgehen | 58 |
| 2.3 | Erstellung der Tissue Microarrays (TMA) | 61 |
| 2.4 | Färbeprotokoll (Hämatoxylin-Eosin) | 63 |
| 2.4.1 | Zusammensetzung (HE) | 64 |

| | | |
|------------|--|--------------|
| 2.4.2 | Durchführung | 64 |
| 2.4.3 | Ergebnisse der Färbung | 64 |
| 2.5 | Immunhistochemische Färbung | 65 |
| 2.6 | Immunhistochemisches Färbeprotokoll | 66 |
| 2.6.1 | Grundlagen MIB1 (Ki-67) | 67 |
| 2.6.2 | Färbeprotokoll MIB1 (Ki-67) | 67 |
| 2.7 | Vorgehensweise (speziell) in Bezug auf die gewählten Analyseverfahren und die statistische Auswertung | 69 |
| 2.7.1 | Immunhistochemie (speziell) | 69 |
| 2.7.2 | Material und Methoden unter Berücksichtigung der Analyseverfahren und statistischen Auswertung | 71 |
| 2.7.3 | Weiteres Vorgehen im Rahmen der Diagnostik- und Analyseverfahren | 72 |
| 2.8 | Lichtmikroskopische Auswertung | 73 |
| 2.9 | Integration des Follow-ups | 74 |
| | | |
| 3 | Ergebnisse | |
| | | |
| 3.1 | Analyse des Patientenkollektivs | 79 |
| 3.1.1 | Patientenkollektiv | 79 |
| 3.1.2 | Analysezeitraum | 79 |
| 3.1.3 | Durchschnittsalter | 80 |
| 3.2 | Grundlagen der histochemischen Analysen | 81 |
| 3.2.1 | Tissue Microarray | 81 |
| 3.3 | Analyse der Expression von LOXL2 in Relation zu den verschiedenen Gleason-Stadien sowie in Relation zur Expression von Ki-67 (MIB1) | 83 |
| 3.4 | Analyse der Zytobande 8p21-22 | 86 |
| 3.5 | Ergebnisse nach statistischer Analyse | 87 |
| | | |
| 4 | Diskussion | |
| | | |
| 4.1 | Validität von TMAs | 91 |
| 4.2 | Ergebnisse in Betrachtung zu den angewandeten Methoden und in Relation zu bisherigen Publikationen | 95 |
| 4.3 | Abschließende Betrachtung | 100 |
| | | |
| 5 | Literaturverzeichnis | 101 |
| | | |
| 6 | Danksagung | 121 |
| | | |
| 7 | Lebenslauf | 122 |
| | | |
| 8 | Anhang | CXXIV |

1. Einleitung

1.1 Die Prostata

1.1.1 Makroskopische Grundlagen

Bei der Prostata handelt es sich um eine exokrine Drüse, die bei einem ausgewachsenen jungen Mann etwa ein Gewicht von 30g aufweist, sowie einen sagittalen Durchmesser von ca. 2,5 cm. Seitlich des Colliculus seminalis münden ihre etwa 15-30 Ausführungsgänge in die Urethra ein. Ihren Ursprung nehmen sie nach abgeschlossener Differenzierung der Drüse unter Androgeneinfluß in etwa 30-50 Drüsenläppchen. Den Großteil der Masse des Organs bildet die so genannte Außendrüse, sie umgibt die so genannte Innendrüse. Beide Drüsenbereiche grenzen sich durch eine fibromuskuläre Zone voneinander ab. Die Basis der Prostata sitzt der Harnblase auf. Ihre Spitze ragt durch den Levatorspalt. An der posterioren Seite des Organs befindet sich die Denovillier'sche Faszie, die fest mit dem prostaticem Kapselgewebe verwachsen ist. In ihrem Zentrum befindet sich der als Pars prostatica bezeichneten Anfangsteil der Harnröhre. Die dorsale Fläche der Prostata ist abgeplattet und dem Rektum zugewandt. Von dort ausgehend ist sie tastbar. Eine derbe Kapsel, deren innere Schicht viele Muskelzellen enthält umgibt das Organ. Die äußere Schicht setzt sich aus einem gefäßreichen, lockeren Bindegewebe zusammen. Die Prostata liegt extraperitoneal. Sie ist in das Bindegewebe des Spatium subperitoneale eingebettet und durch das Ligamentum puboprostaticum mit dem Schambein verbunden. Der Apex der Prostata ist von Skelettmuskelfasern des Diaphragma urogenitale umgeben. Es lassen sich verschiedene Zonen innerhalb des Prostatagewebes differenzieren, die um die Harnröhre angeordnet sind.

Zu unterscheiden sind:

- **Zentrale Zone**, dorsokranial gelegen:

Sie umschließt die Ductus ejaculatorii und nimmt einen Anteil von ca. 25% an der gesamten Prostata ein. Sie setzt sich aus verzweigten Drüsen zusammen. Ihr Stroma ist sehr dicht und enthält eine Vielzahl glatter Muskelzellen.

- **Transitionszone** oder **präprostatiches Segment** (auch: periurethrale Mantelzone), mediolateral der Urethra gelegen:

Sie umgreift die Urethra und besteht aus Drüsen, die aus Divertikeln der Harnröhre hervorgegangen sind (Schleimhautdrüsen).

- **Periphere Zone**, umgibt die zentrale Zone:

Sie macht ca. 75% der Prostatamasse aus und besteht aus 30-50 tubuloalveolären Drüsen, die in einen Drüsenkörper mit ausgedehnten elastischen Fasernetzen und glatten Muskelzellen eingebettet sind. Das Drüsenepithel ist je nach Funktionszustand wechselnd hochprismatisch, stellenweise mehrreihig. Kommt es zum Eindicken des Prostatasekretes, so lassen sich Prostatasteine in den Drüsenlumina nachweisen.

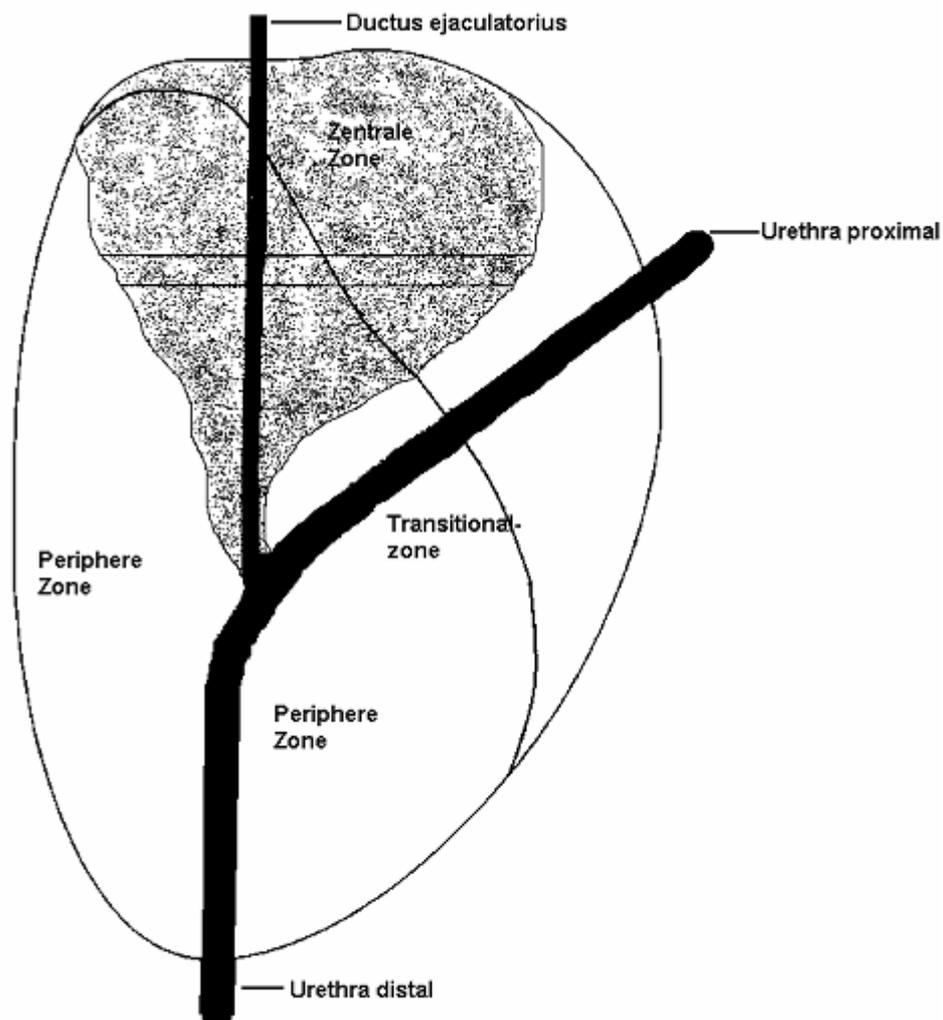


Abbildung 1: Sagittales Schema der Prostata, mit zentraler, transitionaler und peripherer Zone (Modifiziert nach McNeal)
(Remmele, W. et al., 1999)

Das Prostatasekret selbst ist reich an Enzymen (vor allem an saurer Phosphatase) und weist einen pH-Wert von 6,4 auf. Zudem lassen sich zahlreiche andere Inhaltsstoffe nachweisen, die u.a. die Bewegungsfähigkeit der Spermatozoen beeinflussen, oder das Ejakulat verflüssigen. Als Beispiel sei das Spermin erwähnt.

Die arterielle Versorgung der Prostata erfolgt durch Äste der Arteria vesicalis inferior sowie der Arteria rectalis media. Die kapilläre Durchblutung bei jungen Erwachsenen ist sehr ausgeprägt, nimmt jedoch jenseits des 45. Lebensjahres stark ab. Venös wird die Prostata durch ein periurethrales, sowie einen Kapselplexus versorgt. Der Kapselplexus ist Teil des Plexus venosus

vesicoprostaticus. Zudem bestehen zahlreiche Verbindungen zu den Venae iliacae interni.

Der lymphatische Abfluss erfolgt in erster Linie über Lymphbahnen, die zu den Lymphknoten im Bereich der Teilungsstelle der Arteria iliaca communis ziehen. Zudem bestehen Verbindungen zu den Lymphgefäßen des Rektums und den Nodi lymphatici sacrales. Die nervale Versorgung erfolgt aus dem Plexus pelvinus. Die Stromaanteile, sowie die Prostatamuskulatur werden von einem Maschenwerk cholinerg und adrenerg Nerven versorgt (Schiebler, T.H., 1999; Remmele, W. et al., 1999; Ackermann, R. et al., 1991; Bernstein, C. et al., 1992; Dhom, G. et al., 1991).

1.1.2 Mikroskopische Grundlagen

Die Drüsen der Prostata setzen sich aus einem Hauptgang und zahlreichen Verzweigungen zusammen. Sie werden durch ein mehrreihiges Zylinderepithel ausgekleidet. Zudem finden sich zahlreiche in dichter Formation liegende Basalzellen. Die Epithelien ragen papillenförmig in die Drüsenlichtungen vor. Die Ausprägungszustände des Epithels sind starken Schwankungen durch verschiedene Sekretionszustände unterworfen. So sind kleine Drüsen durch ein breites, große Drüsen durch ein flaches Epithel ausgekleidet.

- **Sekretorisches Epithel:**

Es zeichnet sich durch hochprismatische Zellen mit wabrigem Zytoplasma, kleinen Mitochondrien und apikalen Sekretgranula aus.

- **Basalzellen:**

Diese Zellart findet sich in geschlossenem oder unterbrochenem Verband. Die Zellen sind untereinander und teilweise auch mit Anteilen des sekretorischen Epithels verzahnt. Sie sind androgenunabhängig.

- **Neuroendokrine Zellen:**

Diese finden sich vereinzelt eingestreut zwischen den Drüsenepithelien. Sie sind für Chromogranin A und B, sowie neuronenspezifische Enolase positiv. Ihre größte Dichte und Anzahl weisen sie im Bereich der großen Gänge auf.

- **Prostatastroma:**

Das Stroma der Prostata besteht aus glatter Muskulatur und Bindegewebe, welches aus retikulären, kollagenen und elastischen Fasern besteht. Die Drüsenazini werden von einer dünnen Bindegewebschicht umgeben, die nur geringe Anteile an elastischen Fasern aufweist. Zudem finden sich Scheiden glatter Muskulatur. (Remmele, W. et al., 1999; Epstein, J.I. et al., 1996; Klöppel, G. et al., 1993; Murphy, W.M. et al., 1989).

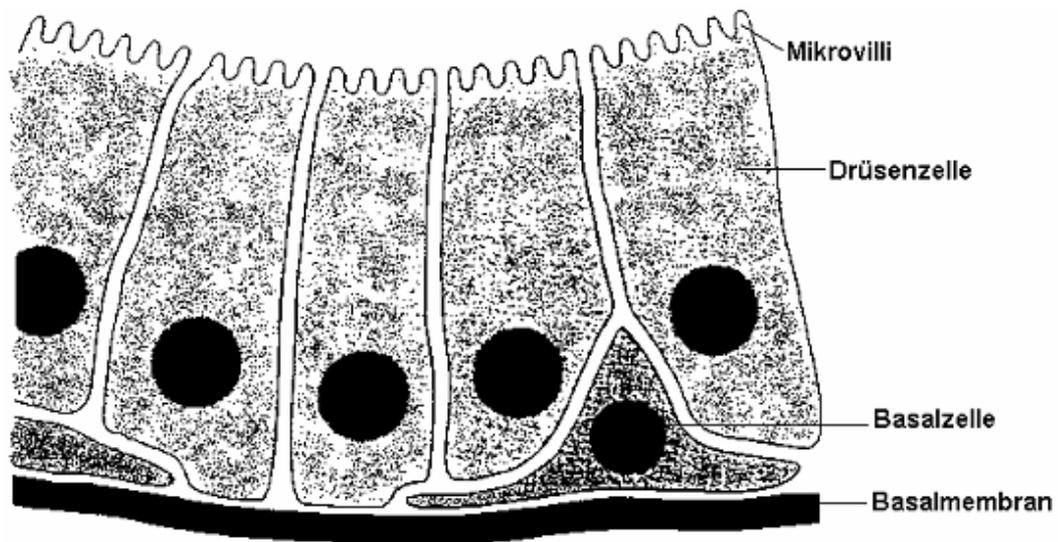


Abbildung 2: Schematischer Aufbau von Drüsenschläuchen der Prostata mit sekretorischen und Basalzellen
(Remmele, W. et al., 1999)

1.1.3 Allgemeine klinische Grundlagen

Jenseits des 40. Lebensjahres beginnen sich die periurethrale Zone, sowie die zentrale Zone zu vergrößern. Diesen Vorgang bezeichnet man als benigne Prostatahyperplasie. Auch im Bereich der Transitionszone kann sich eine Prostatahyperplasie entwickeln. Als Folge dessen kann es zu Miktionsbeschwerden kommen. Die periphere Zone weist eine 70% Prädisposition für die Karzinomentstehung auf. 20% aller Prostatakarzinome finden sich in der Transitionszone. Dabei handelt es sich häufig um hochdifferenzierte, inzidente Formen. Nur in etwa 10% der Fälle liegen Karzinome der zentralen Zone vor (Remmele, W. et al., 1999; Murphy, W.M. et al., 1989).

1.2 Prostatakarzinome

1.2.1 Definition

Der Begriff Prostatakarzinom bezeichnet das unbegrenzte und aggressive Wachstum der Prostatadrüsenzellen mit Infiltration, Zerstörung und Unterdrückung der umliegenden Gewebe und Neigung zur Metastasierung.

Das gewöhnliche Prostatakarzinom entsteht in den peripheren Prostatadrüsen, von wo es sich am Rand der Prostatakapsel, meist entlang der Blut- und Lymphgefäße ausbreitet und sekundär ins Zentrum vordringt. Diese Form wird als dorsoperipheres Karzinom bezeichnet. Die Verteilung der früh diagnostizierten Prostatakarzinome zeigt bevorzugte Bereiche: 80% aller Karzinome liegen peripher, nahe des Rektums.

Es kommt zur Infiltration der Prostatakapsel an den Nervendurchtrittsstellen. Der Gefäßnervenstrang ist als Leitstruktur der Tumordinfiltration zu sehen; dabei penetriert das Karzinom am häufigsten im Apexbereich und im Bereich der Kapselbasis. Lediglich 10% der Prostatakarzinome nehmen ihren Ursprung ausschließlich von zentral. Eine Beteiligung des drüsenfreien, ventralen Anteils der Prostata findet sich lediglich bei fortgeschrittenem Karzinomwachstum. Manifeste und inzidente Prostatakarzinome zeigen keine Unterschiede in Punkto histologische Klassifikation und Grading.

Es lassen sich klinisch folgende Formen unterscheiden:

- **Manifestes dorsoperipheres Karzinom**
Primär durch rektale Palpation diagnostizierbar.
- **Inzidentes Karzinom**
Klinisch unbekannt, histologischer oder operativer Zufallsbefund, zumeist anterozentral gelegenes Karzinom.

- **Okkultes Karzinom**
Primärer Nachweis einer Metastasierung ohne vorherigen Nachweis des Primärtumors.
- **Latentes Karzinom**
Zu Lebzeiten klinisch nicht nachweisbar, nehmen vom 40. Lebensjahr an stetig zu, Gesamthäufigkeit bei 70 jährigen über 50%, zeigen bei geringerem Lebensalter eine hochgradige Differenzierung und einen niedrigen Malignitätsgrad, dieser steigt jedoch mit höherem Lebensalter.

1.2.2 Morphologie

Die Prostatakarzinome lassen uniforme und pluriforme Muster erkennen. Danach erfolgt eine Einteilung in:

- **Gewöhnliche Prostatakarzinome mit glandulärem, kribriformen und solide-trabekulärem Muster**
Diese Karzinome zeigen sowohl einen uni- als auch pluriformen Aufbau, mit besagten Strukturunterschieden; dabei lassen sich folgende Untergruppierungen unterscheiden: Das hochdifferenzierte, hellzellige, drüsenbildende Karzinom, das wenig differenzierte, drüsenbildende Karzinom, das kribriforme Karzinom, das solide trabekuläre (hellzellige oder eosinophile), sowie das undifferenzierte Prostatakarzinom.
- **Ungewöhnliche und seltene Prostatakarzinome**
Hierzu zählen urotheliale, plattenepitheliale, muzinöse, papillär-duktales und Basalzellkarzinome, sowie die Gruppe der Karzinoide, die kleinzelligen Karzinome, Karzinome mit glandulärer und neuroendokriner Differenzierung.

- **Undifferenzierte Prostatakarzinome**

Etwa 95% der Prostatakarzinome entsprechen dem gewöhnlichen Typ; von diesen 95% zeigen etwa 47-49% einen uniformen Aufbau, wohingegen 50-56% einen pluriformen Aufbau zeigen. Bei den pluriformen Karzinomen bestimmt der strukturell niedrigste Differenzierungsgrad die Prognose und damit auch die Therapie. Dabei ist zu berücksichtigen, dass nur die Gruppe der gewöhnlichen Prostatakarzinome auf die Hormontherapie anspricht.

1.2.3 Ausbreitung des Prostatakarzinoms

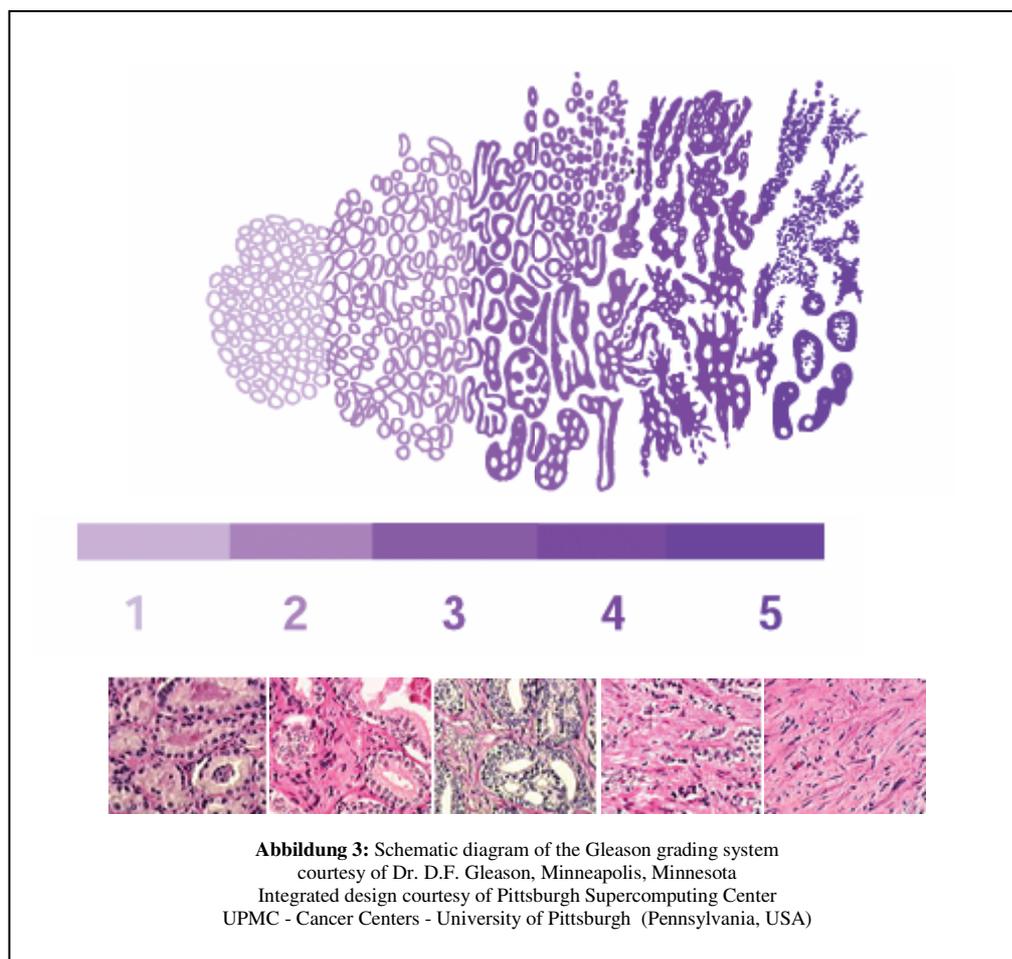
Das Prostatakarzinom kann sich kontinuierlich auf das periprostatice Gewebe, die Weichteile des kleinen Beckens, die Samenblase, die Urethra, die Harnblase und das Rektum ausbreiten. Die lymphogene Metastasierung steht in engem Zusammenhang mit dem Tumorstadium und dem Tumorgrading. Sie betrifft vor allem die obturatorischen und iliakalen Lymphknoten (30-35%). Des Weiteren lässt sich festhalten, dass die Metastasierungstendenz mit zunehmendem Malignitätsgrad sowie einem pluriformen Aufbau des Karzinoms zunimmt. Das histologische Bild der Metastasen ist in der Regel dem des Primärtumors vergleichbar. Hämatogene Metastasierung erfolgt in der Regel in das Skelettsystem, besonders in den Bereich des Beckens bzw. in den Bereich der Wirbelsäule (Remmele, W., et al., 1999; Helpap, B. et al., 1989/1993; Ackermann, R. et al., 1991; Bernstein, J. et al., 1992; Klöppel, G. et al., 1993; Petersen, R.O. et al., 1986; Wernert, N. et al., 1991).

1.2.4 Histologisches Grading nach Gleason

Seit langem bestehen Bestrebungen ein histologisches bzw. histologisch-zytologisches Grading zu entwickeln, dass als einheitliche Leitlinie für Diagnostik und Therapie und als Vergleichsparameter in der Forschung eingesetzt werden

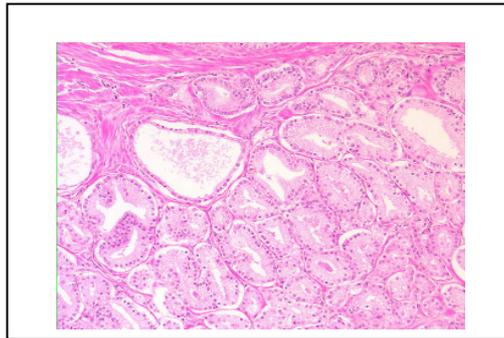
kann. Als Unterscheidungsmerkmale kamen unterschiedliche Parameter, wie z.B. der Differenzierungsgrad oder die Kernatypie in Frage.

Das dominierende Grading-System ist das histologische Grading nach Gleason. Dieses basiert auf der Analyse des Wachstumsmusters, wobei vor allem die Architektur der Drüsenstrukturen beurteilt wird. Mögliche Kernatypien fließen, im Gegensatz zu anderen Grading-Systemen, nicht in die Klassifikation ein. Das Gleason-Grading betrachtet den Grad der glandulären Differenzierung, wobei durch 1-5 Punkte graduiert wird. Da die Morphologie des Prostatakarzinoms als heterogen zu bezeichnen ist und mehrere Wachstumsmuster vereint, wird stets ein primäres („predominant pattern“) und ein sekundäres Muster beschrieben. Der niedrigste Malignitätsgrad wird mit einem Punkt bewertet ($1+1=2$), der höchste Malignitätsgrad entsprechend mit jeweils 5 ($5+5=10$). Die Malignitätsgrade weisen folgende histologische Charakteristika auf:



Gleason pattern 1:

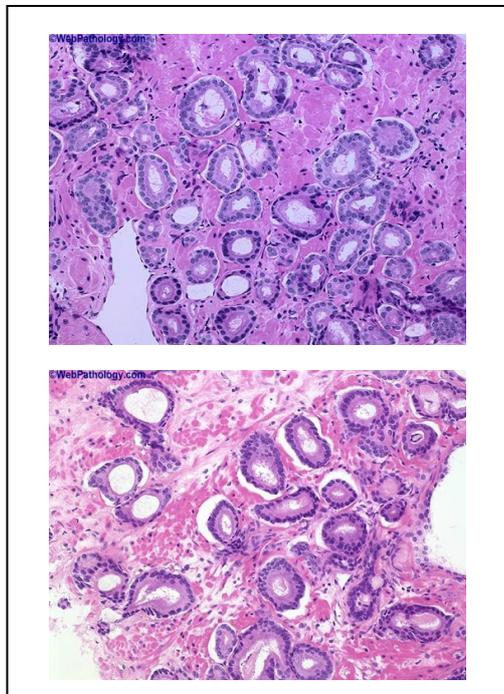
UPMC - Cancer Centers
University of Pittsburgh
(Pennsylvania, USA)



- **Abbildung 4:** Umschriebene Knoten von einheitlichen, einzelnen, enggepackten, nicht infiltrierenden und glatt begrenzten Drüsen

Gleason pattern 2:

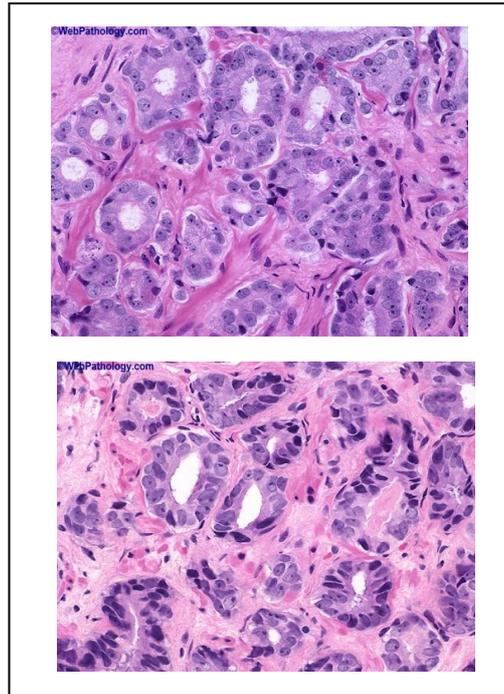
UPMC - Cancer Centers
University of Pittsburgh
(Pennsylvania, USA)



- **Abbildung 5:** Runde oder ovale Drüsen, locker angeordnet aber immer noch umschrieben, Minimalinvasion der neoplastischen Drüsen in das umgebende Stroma, reichlich blass-gefärbtes Zytoplasma

Gleason pattern 3:

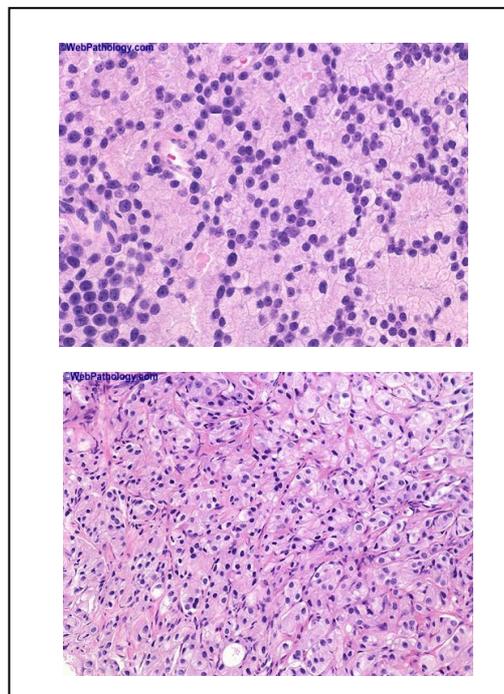
UPMC - Cancer Centers
University of Pittsburgh
(Pennsylvania, USA)



- **Abbildung 6:** Infiltration in das umgebende Prostatagewebe (oftmals zwischen angrenzende nicht-neoplastische Drüsen), erhebliche Variation in Größe und Gestalt (typischerweise kleine Drüsen), aber abgrenzbare Einheiten.

Gleason pattern 4:

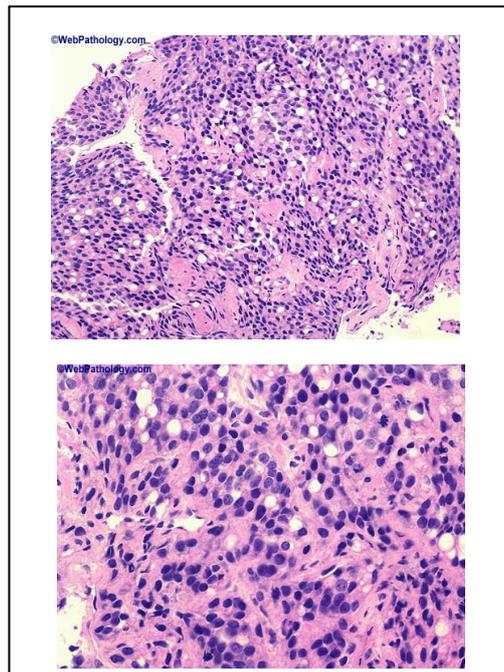
UPMC - Cancer Centers
University of Pittsburgh
(Pennsylvania, USA)



- **Abbildung 7:** Drüsen sind verschmolzen mit unregelmäßigen Grenzen, Bildung von Drüsenpaketen, die nicht mehr durch Stroma unterteilt sind

Gleason pattern 5:

UPMC - Cancer Centers
University of Pittsburgh
(Pennsylvania, USA)



- **Abbildung 8:** Aufhebung von glandulärer Differenzierung, nahezu keine Drüsenlumina zu erkennen, solide Zellnester, Stränge oder Einzelzellen, die ins Stroma invadieren

(Gleason, D. et al., 1966)

1.2.5 Histologisches Grading nach Helpap

Für die Bestimmung des histologischen Malignitätsgrades spielen die Tumorarchitektur, sowie der Grad der Kernanplasie eine entscheidende Rolle (Böcking, A. et al., 1980). Die 4 histologischen Grundmuster des Prostatakarzinoms (hochdifferenziertes, glanduläres Karzinom; wenig differenziertes, glanduläres Karzinom; kribriiformes Karzinom und solide-trabekuläres Karzinom) erhalten dabei Bewertungsziffern von 0 bis 3. Bei dieser Wertezuteilung wird nur das Areal berücksichtigt, welches den niedrigsten Differenzierungsgrad, entsprechend den höchsten Malignitätsgrad aufweist.

Es lassen sich 3 Grade der Kernatypie (geringe, mäßige und starke Kernatypie) unterscheiden. Diese werden mit den Ziffern 0 bis 2 bewertet. Geringe Kernatypie

beschreibt hierbei eine mäßige Vergrößerung und gleichförmige Ausgestaltung der Kerne. Zudem zeigen sich die Nukleolen nur gering vermehrt und vergrößert. Mitosen stellen sich extrem selten dar. Die Bewertungsziffer 1 beschreibt einen Zustand bei welchem die Kerne in regelmäßigen Verbänden angeordnet sind. Zudem finden sich vermehrt Größenunterschiede. Das nukleäre Material ist deutlich vermehrt, Die Kernfärbbarkeit ist erhöht. Die Bewertungsziffer 2 beschreibt abschließend einen Zustand bei welchem sich die genannten Parameter in deutlich stärkerer Ausprägung aufzeigen lassen. Zudem lässt sich eine Kern-Plasma-Relation nachweisen, bei der das Verhältnis deutlich zu Gunsten der Kerne verschoben ist. Die Kernformen, sowie die Kerngrößen stellen sich stark variabel dar. Die Rate der nachweisbaren Mitosen ist stark angestiegen. Eine unterschiedliche Färbbarkeit des Plasmas geht nicht in die besagte Bewertung ein. Nach Beurteilung und Vergabe der Bewertungsziffern für das histologische Muster und den Grad der Kernatypie werden die besagten Ziffern addiert. Die dabei erhaltene Summe wird in 3 Malignitätsgrad unterteilt.

- **0-1: Malignitätsgrad I**
- **2-3: Malignitätsgrad II**
- **4-5: Malignitätsgrad III**

Bei der Befundung eines Prostatakarzinoms können die einzelnen Malignitätsgrade zusätzlich mit den Summen ihrer jeweiligen Bewertungsziffern – also 0 oder 1, 2 oder 3, 4 oder 5, aber auch mit der Kennzeichnung a respektive b versehen werden, um eine nuancierte Beurteilung der Tumoren zu ermöglichen (Helpap, B. et al., 1982; Helpap, B. et al., 1983). Die zusätzliche Unterteilung der Malignitätsgrade I und II (Untergruppen a und b) beruht auf zellkinetischen Analysen (Helpap, B. et al., 1985; Helpap, B. et al., 1989).

1.3 Epidemiologie

1.3.1 Inzidenz und Prävalenz

Derzeit werden in Deutschland jährlich etwa 40.600 Prostatakarzinome diagnostiziert (ca. 4.500 Patienten unter 60 Jahren). Mit ca. 20% stellt die Prostata die häufigste Lokalisation maligner Neoplasien dar.

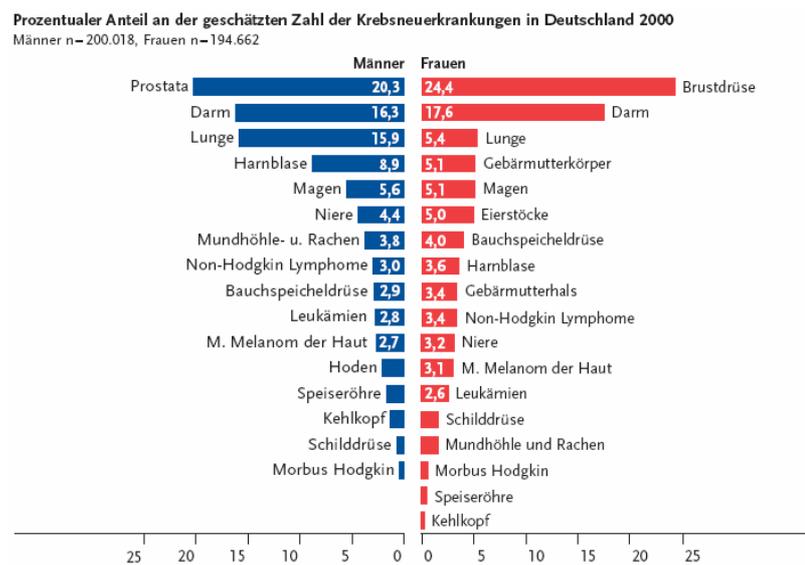


Abbildung 9: Prozentualer Anteil an der geschätzten Zahl der Krebserkrankungen in Deutschland 2000 (Krebs in Deutschland, 2004)

Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 71 Jahren. Dieser Wert liegt 5 Jahre über dem durchschnittlichen Krebserkrankungsalter. Selten treten erste Erkrankungen vor dem 50. Lebensjahr auf. Das Prostatakarzinom steht mit 10% an dritter Stelle der zum Tode führenden Krebserkrankungen.

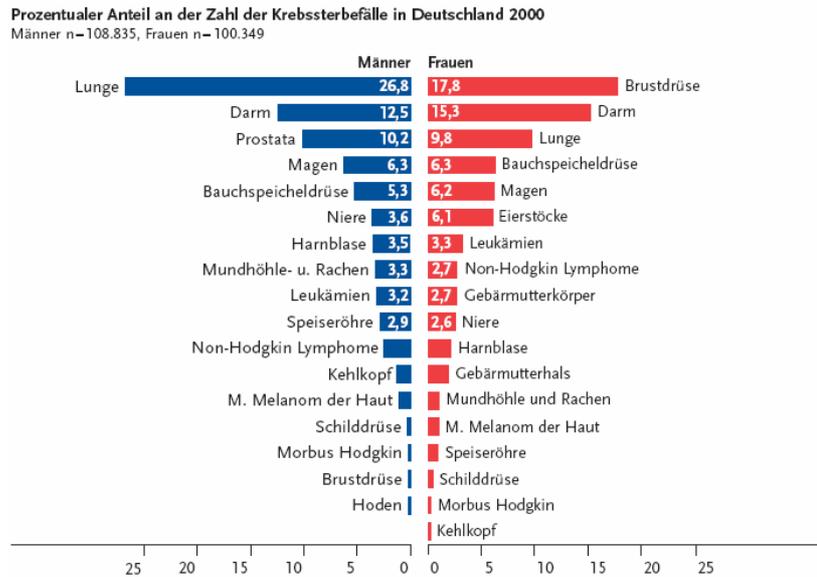


Abbildung 10: Prozentualer Anteil an der Zahl der Krebssterbefälle in Deutschland 2000 (Krebs in Deutschland, 2004)

1.3.2 EU-Vergleich

In der Europäischen Union werden jährlich 85.000 Neuerkrankungen beobachtet (12.000 Männer pro Jahr in Deutschland). Das Prostatakarzinom ist für etwa 9% aller Krebstoten verantwortlich (Jensen, O.M. et al., 1990; Black, R.J. et al., 1997). Die Erkrankungsraten Deutschlands liegen im Vergleich mit den anderen EU-Ländern im oberen Bereich. Finnland und Schweden bilden mit Abstand die Spitze der Erkrankungsraten. Die niedrigsten Erkrankungsraten finden sich in Griechenland und Spanien. Somit ist ein deutliches Nord-Süd-Gefälle erkennbar.

Altersstandardisierte Erkrankungshäufigkeit in der Europäischen Union 1998
 Erkrankungen pro 100.000
 Quelle: EUCAN 98, RKI-Schätzung für Deutschland 1998

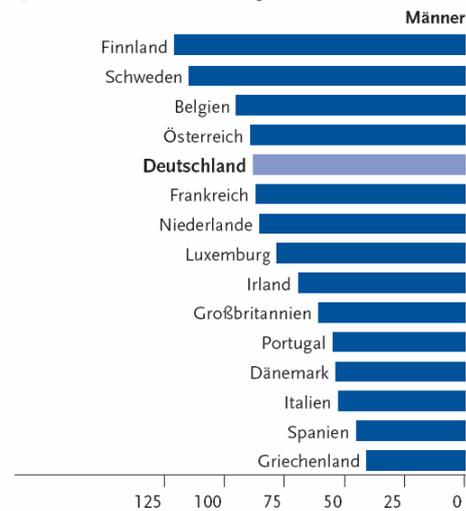


Abbildung 11: Altersstandardisierte Erkrankungshäufigkeit in der Europäischen Union 1998 (Krebs in Deutschland, 2004)

1.3.3 Trend

Bis Ende der 80er Jahre war ein gleich bleibender bis leicht zunehmender Verlauf der Neuerkrankungen in Deutschland zu beobachten, dem dann jedoch ein steiler Anstieg folgte. Der aktuellen Schätzung zufolge scheint sich dieser Anstieg in den letzten 2 bis 3 Jahren abzuwächen.

Der Anstieg der Erkrankungsraten lässt sich größtenteils auf die neuen diagnostischen Methoden zurückführen (z.B.: Bestimmung des prostataspezifischen Antigens (PSA)). Autopsie-Studien haben nachgewiesen, dass bei den 70-, insbesondere den über 80-jährigen Männern, ein großer Anteil symptomloser Prostatakarzinome unentdeckt bleibt und keinen Einfluss auf die Lebensqualität und die Lebenserwartung hatte. Diese Untersuchungen zeigen, dass die sichere diagnostische Unterscheidung zwischen behandlungsbedürftigem Karzinom und nicht oder noch nicht bestehendem Behandlungsbedarf essentiell für die Weiterentwicklung der Prostatafrüherkennung sind.

Zu Beginn der 70er Jahre wurden leicht ansteigende Sterberaten ermittelt. Seit Mitte der 90er Jahre sind die Sterberaten rückläufig.

Inzidenz und Mortalität nach Altersgruppen, Deutschland 2000
Fälle pro 100.000

| Alter in Jahren | Männer | |
|------------------|--------------|-------------|
| | Inzidenz | Mortalität |
| bis unter 45 | 0,0 | 0,0 |
| 45 bis unter 60 | 57,4 | 5,2 |
| 60 bis unter 75 | 365,9 | 61,7 |
| 75 und älter | 777,9 | 395,2 |
| Insgesamt | 101,4 | 27,7 |

Abbildung 12: Inzidenz und Mortalität nach Altersgruppen
(Deutschland 2000) - (Krebs in Deutschland, 2004)

1.3.4 Prognose

Die relative 5-Jahres-Überlebensrate liegt derzeit bei etwa 80%. Prognostisch sind die langsam voranschreitenden Verlaufsformen anders zu bewerten als die aggressiven, metastasierenden Verlaufsformen (erhöhte Prävalenz bei jüngeren Altersgruppen (unter 60 Jahren)). Bei zunehmenden Erkrankungsraten und gleichzeitig abnehmenden Sterberaten ergeben sich verbesserte Überlebenschancen. Beispielsweise lag die 5-Jahres-Überlebensrate im Saarland (Diagnosestellung Ende der 80er Jahre) lediglich bei 70%.

(Krebs in Deutschland. 4. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe. Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland. Saarbrücken, 2004)

1.4 Ätiologie

An gesicherten Erkenntnissen zur Entstehung von Prostatakarzinomen ist bekannt, dass das Wachstum eines solchen Karzinoms hormonell gesteuert wird, weshalb Prostatakarzinome bei kastrierten Männern nicht auftreten. Auch eine auftretende familiäre Häufung lässt Rückschlüsse auf eine genetische Disposition zu. So haben z.B. Brüder eines Prostatakarzinomträgers ein ungefähr zweimal so hohes Risiko, an einem Prostatakarzinom zu erkranken.

Das Auftreten von Prostatakarzinomen ist in der asiatischen Rasse nicht so verbreitet, wie es z.B. bei Amerikanern oder Westeuropäern der Fall ist. Hier wird diskutiert, ob die in Asien häufigere vegetarische Ernährung und hier insbesondere der Konsum von Sojaprodukten, über sog. Phytoöstrogene tumorprotektiv sein könnten. Dahingegen stellt ein erhöhter Konsum von tierischen Fetten ein erhöhtes Risiko dar ein Prostatakarzinom zu entwickeln. Ein ebenfalls erhöhtes Risiko stellt eine Kadmiumexposition dar. Strahleneinflüsse scheinen keinen Einfluss auf die Häufigkeit von Prostatakarzinomen zu haben. Der Konsum von Alkohol jedoch, ebenso wie eine gesteigerte Sonneneinstrahlung scheinen das Risiko an einem Prostatakarzinom zu erkranken zu verringern.

Viele Onkogene sind bis zum heutigen Zeitpunkt bereits untersucht worden und zeigen signifikante Einflüsse auf die Progression und die Entwicklung von Prostatakarzinomen, z.B. das P-53-Supressorgen, c-myc, Ki-ras, Ha-ras, c-fos und c-erbB-2. Deshalb können viele Onkogene auch als prognostische Marker verwendet werden (Alken, P. et al., 2005; Remmele, W. et al., 1999; Ackermann, R. et al., 1991; Bernstein, J. et al., 1992; Klöppel, G. et al., 1993; Petersen, R.O. et al., 1986).

1.5 Klinik

Im Frühstadium zeigt ein Prostatakarzinom in der Regel keinerlei klinische Befunde. Deutliche, klinisch nachweisbare Störungen und Ausfallerscheinungen treten erst in fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung auf.

Zu diesen gehören: Deutliche Störungen der Harnentleerung, erschwertes Wasserlassen, Schmerzen beim Wasserlassen, Blut im Urin (Hämaturie), Schmerzen bei der Ejakulation.

Hingegen deuten Schmerzen im Bereich der iliakalen und sakralen Wirbelsäulenanteile, der Nierenregion, sowie der seitlichen Beckenbereiche und Schmerzen im Bereich des Nervus ischiadicus auf eine bereits erfolgte Ausbreitung (Bereiche des Beckens, Abdomen und Skelettsystem) hin.

(<http://www.urologenportal.de/264.html>, Karin Janke, 09.08.2005)

Symptome wie Häufiges nächtliches Wasserlassen (Nykturie), Inkontinenz, generalisierte Knochenschmerzen, Schmerzen im Bereich der Abdomenregion, Anämien, Gewichtsverlust und herabgesetzter Allgemeinzustand sind häufig mit Prostatakarzinomen assoziiert.

(<http://www.meoclinic-berlin.de>, Heidari, M., Popken, G., 09.08.2005)

1.6 Diagnostik

Zur Diagnosefindung bzw. zur Bestimmung des Tumorstadiums vor einer möglicherweise notwendigen Operation finden verschiedene Untersuchungsmethoden Anwendung. Zunächst erfolgen die Aufnahme der Anamnese, sowie die Durchführung einer körperlichen Untersuchung. Primär dient dies dazu Beschwerden, Vorerkrankungen und Voroperationen zu erkennen und zu dokumentieren. Dabei ermöglicht die körperliche Untersuchung im speziellen die Beurteilung des Allgemeinzustandes, den Ausschluss weiterer Erkrankungen, sowie eine grobe Ausdehnungsbegrenzung des Tumors. Die rektale Palpation vom Enddarm aus dient hierbei als Basisuntersuchung. Diese Untersuchungsmethode ist unkompliziert, fordert aber bei festgestellten Veränderungen eine weitergehende Diagnostik. Zunehmend gewinnt die Bestimmung des PSA-Blutwertes (Prostata-spezifisches Antigen) an Bedeutung. Dabei handelt es sich um die Bestimmung der Konzentration des Prostata-spezifischen Antigens im Serum. Die PSA-Untersuchung findet routinemäßig als Blutuntersuchung statt (sowie generell bei positiver Palpation). Hierbei muss den Patienten über eine venöse Punktion Blut abgenommen werden, welches auf PSA untersucht wird. Bei dem prostataspezifischen Antigen handelt es sich um einen Tumormarker, der bei Vorhandensein eines Prostatakarzinoms erhöht ist. Im Blut von gesunden Patienten ist das PSA ebenfalls nachweisbar, jedoch in wesentlich geringeren Mengen. Der Norm-PSA-Wert liegt beim Gesunden bei unter 4ng/ml. Als verdächtig gelten Werte über 10ng/ml. Eine alleinige PSA-Wert Erhöhung ist allerdings nicht geeignet um ein Prostatakarzinom sicher zu diagnostizieren, so dass auch hier eine weiterführende Diagnostik notwendig ist. In den letzten Jahren wurde zusätzlich zum Gesamt-PSA auch das freie, nicht gebundene PSA bestimmt und der Quotient aus gesamtem zu freiem PSA berechnet.

Zusätzlich zu den erwähnten Diagnostika finden weitergehende Diagnostika Anwendung, mit deren Hilfe eine spezifischere Bestimmung und Klassifizierung des Prostatakarzinoms möglich ist. Hierzu gehören:

- **Die Stanzbiopsie**
- **Die transrektale Sonographie**
- **Die Röntgen-Thorax-Untersuchung**
- **Das Knochenszintigramm**
- **Die Computertomographie**
- **Die Cholin-PET/CT**
- **Die Leber-sonographie**
- **Die Sonographie des oberen Harntraktes**

Bei der transrektalen Sonographie wird ein Spezial-Schallkopf in Form eines Stabes, der durch den Enddarm (transrektal) eingeführt wird und die Prostata in Längs- und Querrichtung sonographiert verwendet. Ein Prostatakarzinomknoten stellt sich auf dem Ultraschallbild typischerweise als dunkles (hyporeflexives) Areal dar, wobei dies nicht als spezifische Aussage gilt, da auch gutartige Prozesse (benigne Prostatahyperplasie), Gefäße, Zysten oder Entzündungsprozesse ein vergleichbares Bild zeigen können. Stellt sich in der äußeren (peripheren) Zone ein hyporeflexives Areal dar, sollte auf jeden Fall eine biopsische Abklärung erfolgen. Zusätzlich kann mit der transrektalen Ultraschalluntersuchung das Volumen der Prostata bestimmt werden. Im Bezug auf die weiteren vorausgegangen Diagnostika muss jedoch festgehalten werden, das insbesondere im Falle der PSA-Blutwertbestimmung eine alleinige PSA-Wert Erhöhung nicht geeignet ist um ein Prostatakarzinom sicher zu diagnostizieren, so dass auch hier die weiterführende Diagnostik notwendig ist. Nach einer radikalen Prostatektomie kann ein erneut hoher PSA-Wert einen Hinweis auf ein mögliches Tumorrezidiv darstellen.

Im Bezug auf die generelle Diagnostik mittels Tumormarkern lässt sich festhalten, dass es sich hierbei um Antigene handelt, auf die Tumormarker reagieren können. Diese entstehen bei malignen Tumoren durch entartete Zellen. Sie können jedoch auch als Reaktion durch gesunde Zellen auf einen vorhandenen Tumor entstehen. Tumormarker sind hauptsächlich Eiweiße, Hormone oder auch Enzyme. Exemplarisch sei dieser Zusammenhang anhand des PSA erläutert. Dabei handelt es sich um ein Einweißkomplex mit einem Zuckeranteil. Das PSA wird von der

Prostata hergestellt und sezerniert und kann auch schon bei einer benignen Prostatahyperplasie oder bei einer Prostatentzündung erhöht sein. Im Falle des diagnostischen Vorgehens findet die frühzeitige Bestimmung des PSA-Blutwertes zunehmend Anwendung. Begründung für dieses Vorgehen ist der Umstand, dass das Verfahren der Palpation lediglich 50% der Prostatakarzinome zu diagnostizieren vermag.

Nach einer durchgeführten Palpation und einer PSA-Untersuchung mit jeweils positivem Ergebnis ist eine noch weitergehende Diagnostik indiziert. An dieser Stelle der diagnostischen Kette steht dann die Biopsie.

Bei der Biopsie handelt es sich um eine Gewebeentnahme der eventuell erkrankten Prostata. Diese Gewebeentnahme wird vom Enddarm her mit einer Nadel (sog. Nadelbiopsie) durchgeführt, so dass das entfernte Material durch einen Pathologen auf einen Tumor hingehend untersucht werden kann.

Die Sonographie stellt eine schonende Diagnostikmethode dar, die für den Patienten weitestgehend schmerzfrei ist. Bei diesem Verfahren wird eine Ultraschallsonde in den Enddarm eingeführt. Bilder der Prostatastruktur werden auf einem Bildschirm dargestellt. Dadurch hat der geübte Untersucher die Möglichkeit ein Prostatakarzinom zu diagnostizieren, bzw. eine unklare Veränderung der Prostata zu erkennen und durch weitere diagnostische Maßnahmen abzuklären. Der Vorteil der sonographischen Diagnostik besteht in der nicht vorhandenen Strahlenbelastung für den Patienten. Die Computertomographie ist als diagnostisches Hilfsmittel bei Prostatakarzinomen nicht sehr geeignet, da sie zum Staging und zum Aufspüren dieser Tumore über keine genügende Sensitivität verfügt (Eble, J.N. et al., 1990; Epstein, J.I., 1996).

Skelettszintigraphie, Röntgen-Thorax-Untersuchungen und auch die Computertomographie werden jedoch mit Erfolg eingesetzt, wenn es um die Diagnosefindung von Metastasen geht. Diese können von einem Prostatakarzinom in einem fortgeschrittenen Stadium ausgehen (http://www.netdokter.at/sex_partnerschaft/menshealth/prostata_und_harnorgane/prostatacarcinom.shtml, Niehaus, J., 15.08.2005).

1.7 Therapie und Prognose

1.7.1 Therapie des lokalisierten Prostatakarzinoms

Grundsätzlich gilt, dass das lokalisierte Prostatakarzinom (PCA) im Gegensatz zum disseminierten Prostatakarzinom einer lokalen Therapie bedarf. Als Standard-Therapieverfahren sind die radikale Prostatektomie und die Strahlentherapie anzusehen.

Das gut differenzierte T1a-Karzinom (im Rahmen einer transurethralen Prostatektomie der benignen Prostatahyperplasie (BPH) entdeckt) nimmt eine Sonderstellung ein, da es keiner definitiven Therapie bedarf und engmaschig kontrolliert werden sollte. Bei 40% der bedingt durch die Annahme des Vorliegens eines T2 Tumors durchgeführten radikalen Operationen, findet sich pathologisch ein höheres Stadium. Dies ist häufig auf den Umstand zurückzuführen, dass ein klinisches Staging aufgrund bildgebender Verfahren als unzuverlässig einzuschätzen ist und zu verfälschten Ergebnissen führt. Die Patienten sollten allerdings über mögliche Alternativtherapien zur Radikaloperation aufgeklärt werden (Strahlentherapie, Brachytherapie, watchful waiting).

- Lymphadenektomie mit pathohistologischer Diagnostik (Schnellschnitt)
Zunächst werden vor der Prostatektomie beidseitig die obturatorischen Lymphknoten entfernt. Dieser Eingriff kann auch laparoskopisch erfolgen. Ist im Schnellschnitt eine Metastasierung nachweisbar, erfolgt in der Regel keine Prostatektomie.

Zudem bestehen adjuvante Therapiekonzepte, die aus Nachbestrahlung, zytotoxischer oder endokriner Therapie bestehen können (Carter, G.E. et al., 1989; Freeman, J.A. et al., 1993; Lange, P.H. et al., 1988; Ray, G.R. et al., 1984).

Für die Nachbestrahlung konnte gezeigt werden, dass die Bildung von Lokalrezidiven deutlich gesenkt werden kann, jedoch die Überlebenszeit sich nicht verlängert (Paulson, D.F. et al., 1990).

- Radikale Prostatektomie

Die radikale Operation ist grundsätzlich nur bei gutem Gesundheitszustand und einem Lebensalter unter 70-75 Jahren sinnvoll (Catalona, W.J. et al., 1990; Corral, D.A. et al., 1994; Zincke, H. et al., 1994). Außerdem sollte es sich nach klinischer Erfahrung um einen chirurgisch heilbaren Tumor handeln. Voraussetzung sind ein negatives Knochenszintigramm und ein auf die Prostata begrenztes Karzinom. Die Höhe des PSA-Wertes korreliert mit dem Ergebnis. Ein PSA-Wert von $<20\text{ng/ml}$ kann als günstig angesehen werden.

Die typischen Indikationen für die radikale Prostatektomie sind T1- und T2-Tumore, weil bis zum Stadium pT2 N0 die tumorspezifische Überlebensrate bei 80-93% liegt. Teilweise wird der Indikationsbereich um die T3-Tumore erweitert. In diesen Fällen sind bei negativen Resektionsrändern 10-Jahres-Überlebensraten von bis zu 60 % erreicht worden.

Bei den Zugangswegen lässt sich der perineale vom häufiger angewandten retropubischen unterscheiden. Die beidseitig latero-kaudal der Prostata verlaufenden und für die Erektion wichtigen Nervenbündel, können bei letztgenannter OP-Technik entweder einseitig oder bei kleinen Tumoren sogar beidseitig geschont werden. Bei beidseitiger Schonung können postoperative Potenzraten von 75% erzielt werden. Besonders schwierig gestaltet sich die Erhaltung der autonomen Nervenstrukturen der periprostatichen Faszie, die die Erektion des Penis steuern.

Neben der vollständigen Entfernung der Prostata werden bei der radikalen Prostatektomie auch die Samenblase und Teile des Samenleiters einschließlich der Ampulla ductus deferentis entnommen.

Die perineale Prostatektomie bietet den Vorteil der guten Übersicht, jedoch gestaltet sich die Präparation der Samenblase durch das eingeschränkte Operationsfeld als schwierig. Außerdem ist die Lymphadenektomie nicht möglich.

Eine gute Übersichtlichkeit des Operationsfeldes bietet auch die laparoskopische Operationstechnik. Außerdem kann besonders

atraumatisch und präzise bei geringem Blutverlust operiert werden. Der intraperitoneale Zugangsweg ist ebenso wie die längere Operationsdauer als Nachteil anzusehen (Corral, D.A. et al., 1994; Zincke, H. et al., 1994). Durch die weiterentwickelten Operationstechniken sind 87% der zwischen 1992 und 1998 radikal prostatektomierten Patienten nach 5 Jahren biochemisch tumorfrei, während es zwischen 1982 und 1988 nur 77% waren.

Nebenwirkungen:

Die typischen Komplikationen sind vor allem der mögliche Kontinenz- und Potenzverlust. Zur leichten bzw. schweren Form der Stressinkontinenz schwanken die angegebenen Werte zwischen 4% und 50% bzw. 0% und 15% (Whitmore, W.F. Jr. et al., 1991). Ein Erhalt der Potenz ist in 50-80% der Fälle gegeben (Adolfsson, J. et al., 1992; McCullough, A.R., 2001).

In 3% treten Rektum-Verletzungen auf, in 5% ist eine Relaparatomie erforderlich, die Thromboembolierate beträgt 2-4%. Die perioperative Mortalität ist mit 1% als sehr gering zu beurteilen.

Bei Befragungen der Patienten wurde in 87 % ein guter bzw. ausgezeichneter Allgemeinzustand angegeben. Nur 3% empfanden eine ausgesprochene Verschlechterung der Lebensqualität (Miles, B.J. et al., 1999).

- **Strahlentherapie**

Nach derzeitigem Erkenntnisstand ist die Strahlentherapie, sofern es sich um lokalisierte Stadien handelt, als gleichwertige Alternative zur chirurgischen Therapie zu sehen. Die Analyse der Patienten der Cleveland Clinic Foundation zeigte keine signifikanten Unterschiede im PSA-freien Überleben (n=1682, davon 1054 Patienten nach radikaler Prostatektomie und 628 Patienten nach Bestrahlung, mittlerer Beobachtungszeitraum: 51 Monate). Längere Beobachtungszeiträume zeigen jedoch ein bis zu 10% höheres, PSA-freies Überleben nach chirurgischer Therapie (Kupelian, P.A. et al., 2002).

Vor allem bei organüberschreitendem Wachstum ist die Strahlentherapie indiziert und sollte stets vor hormontherapeutischen Maßnahmen durchgeführt werden. Eine weitere Indikation stellt die postoperative Bestrahlung nach Non-in-sano-Operationen bei erhöhtem Risiko lokaler Progression dar. Es muss jedoch bedacht werden, dass das Risiko einer Urethrastr stenose erhöht ist.

Die Strahlentherapie im Rahmen der Primärtherapie des lokalisierten Prostatakarzinoms umfasst unter kurativen Aspekten die Stadien T1-T4 N0 M0. Für das zu erreichende Therapieergebnis sind im Falle der Strahlentherapie drei Faktoren von entscheidender Bedeutung:

- 1. adäquate Dosierung**
- 2. Zielvolumenerfassung**
- 3. Normalgewebsschonung**

Mit den DEGRO- bzw. DGMP-Leitlinien sind die empfohlenen Dosisspezifikationen festgelegt (Gneveckow, U. et al., 1998).

Die gefährdeten Strukturen sind vor allem Rektum, Blase und die Hüftköpfe. Die Gesamtdosis liegt derzeit in Abhängigkeit vom jeweiligen Fall zwischen 72 und 74 Gy (fraktioniert zwischen 1,8 und 2 Gy).

- *„Low risk“-Patienten:*
(bis cT2a, Gleason-Score ≤ 6 , PSA ≤ 10 ng/ml)
Bestrahlung mit 72 Gy ausreichend
Alternativ: Brachytherapie

- *„Intermediate risk“-Patienten:*
(bis cT2a mit Gleason-Score 7-10 oder PSA 10-20 ng/ml oder T2c)
Erhöhung der Strahlendosis sinnvoll

(Kupelian, P.A. et al., 2002; Valicenti, R. et al., 2000; Pollack, A. et al., 2000; Hanks, G.E. et al., 2002). Ebenfalls scheinen die Patienten von einem Mitbestrahlen des Beckens zu profitieren, da ein nicht unerhebliches Risiko eines subklinischen pelvinen Lymphknotenbefalls besteht (Roach, M. 3rd et al., 2003; Bolla, M. et al., 2002). Ist keine Lymphknotenmetastasierung feststellbar, werden Prostata und Samenblasenbasis mit mindestens 74 Gy bestrahlt (Kestin, L. et al., 2002). Zusätzlich wird eine hormonblockierende Therapie eingesetzt, die etwa 2 Monate vor der Bestrahlung und über die Bestrahlung hinweg eingesetzt wird.

➤ *High risk-Patienten:*

(alle cT3, cT4, Gleason-Score 7-10 mit PSA 10-20ng/ml, alle PSA >20ng/ml)

Bestrahlung des Beckens mit bis zu 50,4 Gy

Bestrahlung der Prostata mit bis zu 70,4 Gy

Hinzu kommt bei diesen Patienten mit Hochrisikoprofil eine langfristige adjuvante Hormonblockade. Die randomisierte EORTC-Studie belegt die Wirkung der langfristigen Hormonblockade mit einer um etwa 30% verbesserten 8-Jahres-Überlebensrate (Bolla, M. et al., 2002; Bolla, M. et al., 1997).

Nebenwirkungen:

Bei 4% bis 5% der Patienten kommt es zu lange andauernden Nebenwirkungen durch eine mögliche Zystitis, Enteritis oder Proktitis, die sich in Blasenbeschwerden und Durchfällen äußert (Schellhammer, P.F. et al., 1986; Schmiedt, E. et al., 1984). Die Angaben zur Prävalenz schwanken zwischen 1% und 81% für die Zystitis (in 3 bis 13% der Fälle mit massiver Hämaturie), sowie zwischen 3% und 56% für die Proktitis (Middleton, R.G. et al., 1995). Es kann eine Symptombehandlung mit

Hilfe von Spasmolytika oder alpha-1-Rezeptoren-Blockern durchgeführt werden.

1.7.2 Alternative Strahlentherapiekonzepte

Brachytherapie:

Die Brachytherapie kann eine Alternative für Low risk-Patienten sein, bei denen folgende Voraussetzungen erfüllt sind:

- **bis T2c, Gleason-Score bis 7, PSA bis 10ng/ml**
- **Organvolumen (< 50ml)**
- **ausreichender Abfluss (> 15ml/s)**

Diese Voraussetzungen gelten für die (low dose rate) LDR-Brachytherapie. Die (high dose rate) HDR-Brachytherapie stellt eine Behandlungsoption bei fortgeschrittenem Tumorwachstum (bis T3a) mit Risiko der extrakapsulären Ausbreitung ohne bekannte Metastasierung dar (Partin, A.W. et al., 1997; Gneveckow, U. et al., 1998).

Der Eingriff kann mit Hilfe des transrektalen Ultraschalls und der dreidimensionalen Umsetzung am Computer geplant werden.

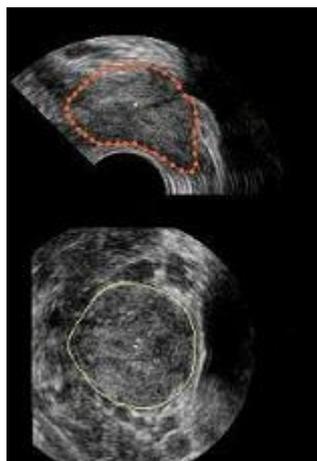


Abbildung 13: Transrektales Ultraschallbild (Univ. Ulm, Abteilung für Urologie)



Abbildung 14: 3D-Rekonstruktion (Univ. Ulm, Abteilung für Urologie)

Hyperthermie:

Bei der Hyperthermie wird ein Organ oder Körperteil auf über 42°C erhitzt. Häufig wird in der onkologischen Therapie die Hyperthermie mit der Strahlentherapie kombiniert, um die Wirkung zu verstärken. Temperaturen über 46°C führen zur direkten Abtötung der Tumorzellen (Thermoablation). Bereits im letzten Jahrhundert hatte man festgestellt, dass sich Tumore nach hochfibrhaften Infekten verkleinert haben.

1.7.3 Therapie des disseminierten Prostatakarzinoms

Die Behandlungsmöglichkeiten des disseminierten Prostatakarzinoms sind rein palliativ ausgerichtet und zielen auf eine *Androgendeprivation*. Das primäre Therapiekonzept besteht darin, mit Hilfe der Hormontherapie eine gute Lebensqualität aufrechtzuerhalten. Die Wachstumsrate des Karzinoms wird durch Testosteron stimuliert (Teilung und Proliferation der prostatichen Epithelzellen sind von Testosteron abhängig). Durch die antihormonelle bzw. androgensuppressive Therapie wird eine Remission um 80% erzielt (Culig, Z. et al., 2001). Möglicherweise kann mit einer intermittierenden Hormontherapie die Mutationsfrequenz der Androgenrezeptoren beeinflusst werden (Rambeaud, J.J. et al., 1999).

Die folgenden Verfahren stellen die verschiedenen Therapiemöglichkeiten und Varianten dar:

1. Orchiektomie:

Hierbei sinkt der Serum-Testosteronspiegel postoperativ um 95 % auf das so genannte Kastrationsniveau.

2. Östrogene:

Diethylstilbestrol blockiert über einen negativen Feedback-Mechanismus die hypophysäre Gonadotropinfreisetzung. Möglicherweise besteht ein

zusätzlicher Einfluss direkt auf die Testosteron produzierenden Leydig-Zellen (Iversen, P. et al., 1998).

3. LHRH-Analoga (luteinising hormone releasing hormone):

Die verfügbaren Präparate z.B.: Leuprorelin, Goserelin sind in ihrer chemischen Zusammensetzung ähnlich und werden in Form von Depotpräparaten eingesetzt (Garnick, M.B. et al., 1986; Kuhn, J.M. et al., 1989).

4. Antiandrogene:

Antiandrogene können die eigentliche Anbindung des Testosterons an die Epithel- bzw. Tumorzelle unterbinden. Um eine so genannte *komplette Androgenblockade* zu erzielen, können die Antiandrogene zusätzlich zur chirurgischen Kastration oder Applikation von LHRH-Analoga verabreicht werden (Eisenberger, M.A. et al. 1998).

Das allgemeine Wirkprinzip besteht in der Verdrängung des Testosterons von den zellulären Rezeptoren. Zusätzlich haben die steroidalen Formen auch eine zentrale, progesteronartige Wirkung auf die Hypophyse (Soloway, M.A. et al., 1993).

Nicht-steroidale Antiandrogene können als Monotherapie eingesetzt werden, wenn der PSA-Wert unter 100ng/ml liegt und sich das Tumoreal auf den Beckenbereich beschränkt (Kaisary, A.V. et al., 1997).

Es besteht neben der oben genannten Therapieform auch die Möglichkeit der *intermittierenden Androgenblockade* (Kelly, W.K. et al., 1998; Cullig, Z. et al., 2001).

Nebenwirkungen:

Die typischen Nebenwirkungen der antihormonellen Behandlung sind Potenz- bzw. Libidoverlust. Außerdem sind Haarverlust, schmerzhafte Gynäkomastie oder Hitzewallungen möglich (da Silva, F.C. et al., 1996;

Wei, J.T. et al., 1999; Mahler, C. et al., 1998; Strum, S.B. et al., 1997; Daniell, H.W. et al., 1997).

5. Chemotherapie:

Dieser Indikationsbereich ist stark palliativ ausgerichtet, v.a. symptomatisch bei hormonrefraktären Prostatakarzinomen. Vor allem die Kombination von Mitoxantron mit einem Kortikosteroid zeigte gute Ergebnisse in der Behandlung des hormonrefraktären Prostatakarzinoms (Tannock, I.F. et al., 1996; George, D.J. et al., 1999). Gute Ergebnisse zeigt auch die Kombination von Estramustin und Paclitaxel. Die systemischen Nebenwirkungen bleiben bei dieser Kombination gering (Smith, D. et al., 1997; Frank, S. et al., 1997; Maulard-Durdux, C. et al., 1996; Abell, F. et al., 1995; Raghavan, D. et al., 1993).

6. Schmerztherapie:

Als Behandlungsalternativen stehen bei der symptomatischen Therapie die systemische Gabe von Radioisotopen (Strontium-89, Samarium-153) zur Verfügung. Eine Kombinationstherapie mit Zytostatika ist jedoch aufgrund von Knochen Depression problematisch.

Die allgemeine Analgetikatherapie sollte in regelmäßigen Abständen durchgeführt und vor Abklingen der ersten Dosis die nächste Dosis gegeben werden. Die Dosisintensität wird nach den individuellen Bedürfnissen im Rahmen des WHO-Stufenschemas dem Patienten angepasst.

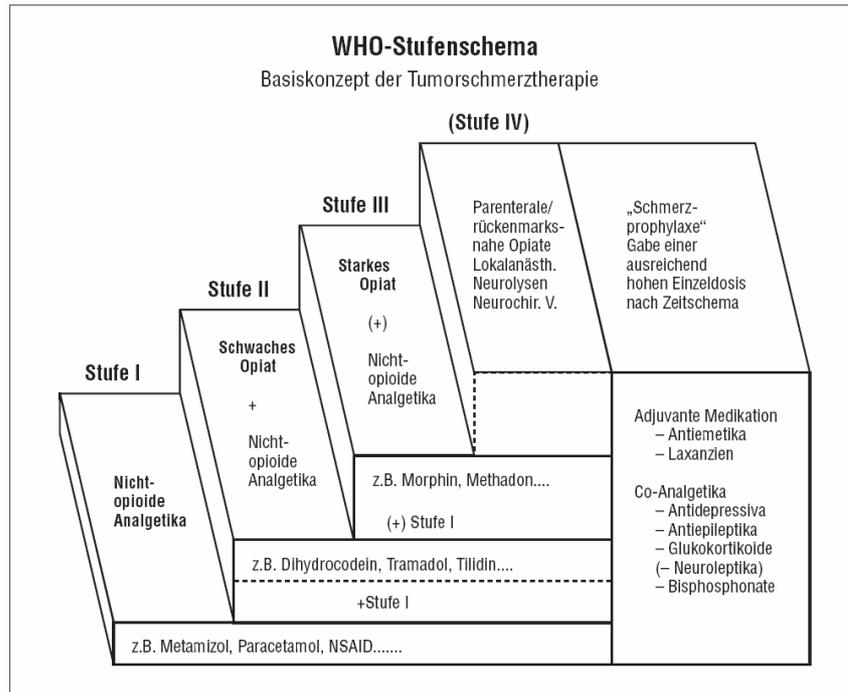


Abbildung 15: WHO (World Health Organization) -Stufentherapie der Tumorschmerzbehandlung

1.8 Markerenzym (LOXL2 –“lysyl oxidase-like 2”)

1.8.1 Einordnung der Lysyloxidase

Lysyloxidase ist der Gruppe der kupferabhängigen Aminooxidasen zuzuordnen. Die Lysyloxidase gehört zu einer heterogenen Familie von Enzymen, deren Charakteristikum die oxidative Umsetzung primärer Amine in reaktive Aldehyde ist. Lysyloxidase weist ein Gewicht von 32 kDa auf und findet sich vorwiegend in der extrazellulären Matrix. Anhand der chemischen Natur der Co-Faktoren, die im Zusammenhang mit Lysyloxidase zu betrachten sind, erfolgt eine Untergliederung der besagten Enzymfamilie in zwei primäre Untergruppen. Als Co-Faktor der Monoaminoxidase, sowie einer intrazellulären Form der Polyaminoxidase ist das Flavin-Adenin-Dinukleotid zu nennen. Eine zweite Gruppe der Aminooxidasen zeichnet sich durch das Vorliegen von Topaquinon aus. Dabei handelt es sich um die reduzierte Form einer modifizierten Tyrosin Seitenkette. Zu dieser Gruppe der Subfamilie der Aminooxidasen zählen u.a. Diaminoxidase und Lysyloxidase.

Eine wesentliche Eigenschaft der Lysyloxidase ist ihre - im Bezug zur DNA zu erwähnende - Strang verbindende Funktion, sowie die katalytische Wirkung des Enzyms auf Bestandteile der extrazellulären Matrix. Dabei sind insbesondere Elastin sowie Kollagen zu erwähnen. Im Falle von Kollagen und Elastin ließ sich eine desaminierende Wirkung des Enzyms auf Seitenketten des Lysins nachweisen. Der die Lysyloxidase codierende DNA-Abschnitt wurde dem Chromosom 5q23.3 zugeordnet (Jourdan-Le Saux, C. et al., 1999, Hein, S., et al., 2001).

Neure Studien konnten verschiedene - bis dato unbekannte - Funktionsweisen der Lysyloxidase, unter Beteiligung anderer intrazellulärer und intranukleärer Stoffgruppen nachweisen, u.a. ließ sich ihre Beteiligung an Zelldifferenzierungs-, Tumorwachstum hemmenden und Zellwachstum fördernden Prozessen nachweisen. Momentan werden all diese verschiedenen Funktionsweisen nicht einer einzelnen Form der Lysyloxidase zugeordnet, sondern verschiedenen Subgruppen bzw. Isoformen des Enzyms, deren Existenz teilweise bereits nachgewiesen wurde.

In den letzten Jahren wurden verschiedene dieser Proteinisoformen entdeckt, die engen Bezug zur Struktur der Lysyloxidase aufwiesen. Danach erwuchs die Theorie, dass Lysyloxidase als Basis einer Stoffgruppe von Abkömmlingen ihrer Struktur zu betrachten ist. Diese zur Lysyloxidase in enger Beziehung stehenden Proteine finden sich in verschiedenen Zellkompartimenten und Gewebeformen. Ihnen wird die enorme Variationsbreite an besagten Funktionsweisen zugeordnet (Jourdan-Le Saux, C. et al., 1999).

1.8.2 Proteinisoformen der Lysyloxidase

Das erste Protein, das eine enge Verbindung zur Basisstruktur der Lysyloxidase aufwies wurde als "lysyl oxidase-like" oder "LOXL" klassifiziert. Ein Vergleich der cDNA-Struktur von Lysyloxidase (LOX) und LOXL zeigte signifikante Übereinstimmungen im Bereich der terminalen Carboxyl-Ketten. Ebenso fanden sich Übereinstimmungen im Bereich der Bindungsstelle für Kupfer, dem katalytischen Zentrum, sowie der Bindungsstelle des Carbonyl Co-Faktors. Diese Übereinstimmungen ließen sich auf Ebene der DNA-Struktur anhand vielfacher Übereinstimmungen im Bereich der Exon-Größe und der Bindungen zwischen den Exon und Intron Anteilen in 5 der 7 Exons beider Substanzen nachweisen. DNA-kartographisch ist der Ursprung des LOXL-Gens dem Chromosom 15q23 zuzuordnen (Jourdan-Le Saux, C. et al., 1999).

1.8.3 LOXL2 ("lysyl oxidase-like 2")

Ein weiteres Protein das in besagtem Zusammenhang betrachtet wurde erhielt die Bezeichnung LOXL2 (lysyl oxidase-like 2).

Lysyloxidase gehört - wie gesagt - zur Gruppe der so genannten kupferabhängigen Aminooxidasen. Sie lässt sich einer heterogenen Familie von Enzymen zuordnen, welcher primär Amine als Substrat dienen. Bei der eigentlichen Umwandlung entstehen aus diesen reaktive Aldehyde. Die Enzymfamilie lässt sich in zwei Unterklassen einteilen. Die Einteilung erfolgt dabei aufgrund der chemischen Struktur der mit den Aminooxidasen in Beziehung

stehenden Co-Faktoren. Verschiedene Studien die sich mit Lysyloxidasen befassten legten den Schwerpunkt ihrer Untersuchungen auf die spezifisch vernetzende Aktivität sowie den katalytischen Mechanismus der Enzymgruppe in Bezug auf die verschiedenen Substrate in der extrazelluläre Matrix, Kollagen und Elastin. Lysyloxidase nimmt hierbei insbesondere an der post-translationalen Modifikation im Rahmen der Biogenese von Bindegewebe teil. Hierbei kommt es im Rahmen der Biogenese zu einer Desaminierung der Seitenketten von Lysin-Resten. Hierdurch wird eine Katalyse der kovalent vernetzenden Bereiche verschiedener fibrillärer Kollagen-Typen sowie die Formgestaltung über Desmosin bzw. Isodesmosin verknüpfter Elastingerüste erreicht (Jourdan-Le Saux, C. et al., 1999; Hein, S. et al., 2001; Csiszar K., et al., 2001).

Ursprung dieses Isoenzym ist das Chromosom 8p21.3. Dieser Isoform wurden dabei Funktionsweisen zugeordnet, die sich von denen der Lysyloxidase und LOXLs unterscheiden. DNA-Sequenzanalysen der Struktur von LOXL2 zeigten Übereinstimmungen im Bereich der cDNA-Struktur von 45% in Bezug zu LOX und 48% in Bezug zu LOXL auf. Mit Hilfe durchgeführter PCR-Versuche konnten 16 cDNA-Klone in den Geweben der Nieren bzw. 8 cDNA-Klone in den Geweben der Plazenta nachgewiesen werden. Aus Sequenzanalysen dieser Klone konnte die vollständige cDNA-Struktur von LOXL2 ermittelt werden. Dabei ließ sich u.a. nachweisen das LOXL2 über keine hydrophobe Signalsequenz, die für den extrazellulären Transport notwendig ist verfügt. Das Enzym verfügt über 11 Exons, dabei fanden sich in – wie bereits erwähnt – 5 Exons (6-10) Übereinstimmungen im Vergleich zu LOX und LOXL. Der Exonbereich 6-10 codiert den kupferbindenden Bereich, sowie einige katalytische Zentren. Die Übereinstimmung betrug 84% in Bezug auf die Sequenzfolge und zeigte zudem große Übereinstimmungen die Größe der Exons betreffend.

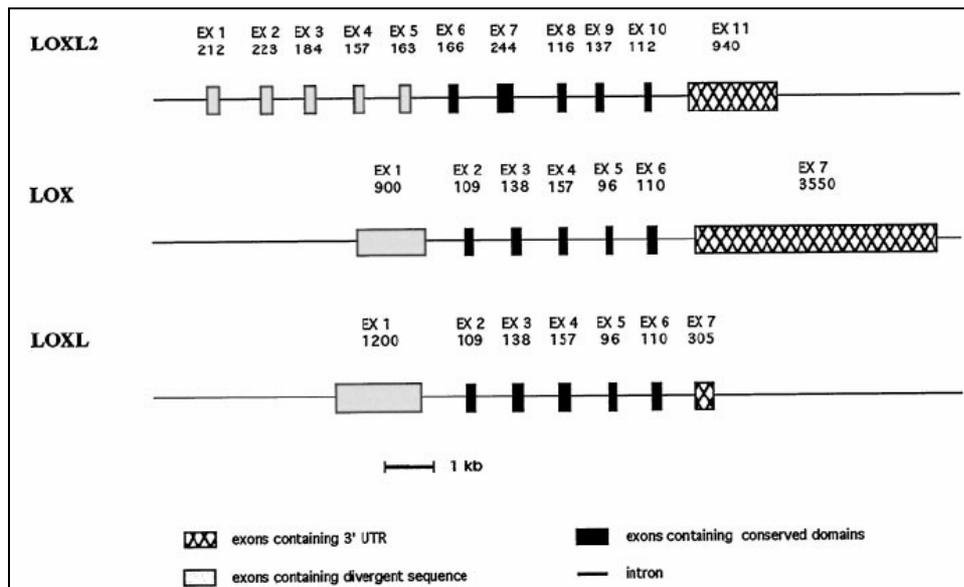


Abbildung 16: Struktur des menschlichen LOXL2 Gens. Vergleich zwischen Exons und Introns von LOXL2, LOXL und LOX (Jourdan-Le Saux, C. et al., 1999)

Bei dem Versuch die Promotorregion, oder potentielle Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor des Enzyms ausfindig zu machen ließ sich nachweisen, dass die Promotorregion über keine gewöhnliche TATA- oder CAAT-box Sequenz verfügt. Im weiteren Verlauf der Analyse ließen sich zwei Transkriptionsstartpunkte nachweisen. Der gewebespezifische Nachweis von LOXL2 mRNA zeigte besonders hohe Werte in den Geweben der Plazenta, des Uterus, der Prostata und des Pankreas. Im Vergleich dazu zeigten die Gewebe von Gehirn, Lunge, Skelettmuskulatur, Thymus und Nieren deutlich geringere Werte (Jourdan-Le Saux, C. et al., 1999).

Abschließend bleibt zu sagen, dass der Ursprung, sowie die eigentlich Funktionsweise und Bedeutung von LOXL2 bisher nicht bekannt sind. Vermutungen zielen auf eine katalytische Bedeutung des Enzyms im intra- oder extrazellulären Raum hin (Jourdan-Le Saux, C. et al., 1999).

1.9 Tissue Microarrays (TMA)

1.9.1 Entwicklung der Microarray Technik

Das Grundkonzept des Tissue Microarray (zu Deutsch ungefähr „eine Mikrosammlung von Geweben“) ist eine Weiterentwicklung der ursprünglichen Idee eines Multitumor Gewebeblockes, wie er bereits 1986 von Hector Battifora beschrieben wurde. Battifora nannte den Block noch multitissue- bzw. sausage-block. Bei diesem Verfahren wurden jedoch größere Gewebeproben als beim TMA eingebracht. Außerdem wurden sie vergleichsweise ungeordnet in einen neuen Block eingesenkt.

Durch die Entwicklung des Tissue Microarray konnte die Präzision dieses Verfahrens, bei dem eine größere Anzahl von kleinen Gewebepreparaten in einen Paraffinblock eingebracht wird, deutlich erhöht werden. Dieses gelang insbesondere durch den Einsatz eines Stanzgerätes (Beecher Instruments, Microarray Technology, Sun Prairie, Wisconsin, USA), das durch das National Institute of Health entwickelt wurde. Mit eben diesem Gerät konnten zum ersten Mal genormte zylindrische Proben mit einem festen Durchmesser kontrolliert in einen Paraffinblock eingebracht werden, so dass sich ein reproduzierbares Probenmuster ergab. Ein weiterer Vorteil dieser Technik ist, dass die Blöcke, aus denen das zu untersuchende Gewebe entnommen wird, nur geringfügig beschädigt werden. Wenn man den einzelnen Block betrachtet, so können aus diesem theoretisch 300 Proben entnommen werden, wenn der jeweilige Tumor eine Größe von 18x18 mm hat. Jede dieser Proben kann, genau so wie der Ursprungsblock, in bis zu 300 Schichten geschnitten werden. Im Idealfall wäre es also möglich, 90 000 (300 x 300) in situ Analysen eines einzigen Tumors durchzuführen (Bubendorf, L. et al., 2001).

Seit die Tissue Microarray Technik erstmalig beschrieben wurde (Kononen, J. et al., 1998), konnten zahlreiche Studien die Praktikabilität und Kostenersparnis dieses Verfahrens belegen (Moch, H. et al., 1999; Mucci, N.R. et al., 2000; Horvarth, L. et al., 2001; Moch, H. et al., 2001).

1.9.2 Prinzip der Microarray Technik

Mit einem speziell hergestellten Stanzgerät (Beecher Instruments, Microarray Technology, Sun Prairie, Wisconsin, USA) werden Gewebebiopsien aus Paraffinblöcken entnommen.



Abbildung 17: MTA-1 manual tissue arrayer (Beecher Instruments)

Eben diese Paraffinblöcke werden „donor“ (zu Deutsch: „Geber-Block“) genannt. Die Regionen, aus denen die Biopsien entnommen werden, werden vorher ihrer morphologischen Repräsentativität entsprechend, anhand von HE- (Hämatoxylin-Eosin) Schnitten ausgesucht. Die ausgestanzten Biopsien werden in einen leeren und neuen Paraffinblock, „recipient“ (zu Deutsch: „Empfänger-Block“) genannt, eingebracht. Bei dem Stanzverfahren werden zwei dünnwandige Nadeln aus rostfreiem Stahl verwendet. Mit der ersten Nadel wird aus dem Empfängerblock Paraffin entnommen.



Abbildung 18: Entnahme des Biopsiematerials aus dem Donorblock

Durch einen in der Biopsienadel angebrachten Stempel wird das Paraffin dann aus der Nadel gedrückt und verworfen. Mit der zweiten Nadel wird aus dem Geberblock eine Probe entnommen und in den vorher erstellten Hohlraum des Empfängerblockes gesetzt. Es ist darauf zu achten, dass alle Biopsiestanzen in der gleichen Höhe in den Empfängerblock eingesetzt werden. Waren die Durchmesser der Nadeln anfangs noch 3 mm, so konnten die Durchmesser der Nadeln sukzessive auf bis zu 0,6 mm reduziert werden. Biopsien dieser Größe sind ausreichend, um die morphologischen Eigenschaften des Gewebes beurteilen zu können (Hoos, A. et al., 2001).



Abbildung 19: Implantation des Biopsiematerials in den recipient

Durch eine digitale Präzisionssteuerung ist es möglich geworden, dass die Platzierung der Biopsien und die Abstände dazwischen genau kontrolliert werden können. Das so entstehende Geweberaster kann, abhängig vom Durchmesser der Biopsien, einige hundert bis eintausend Proben enthalten.

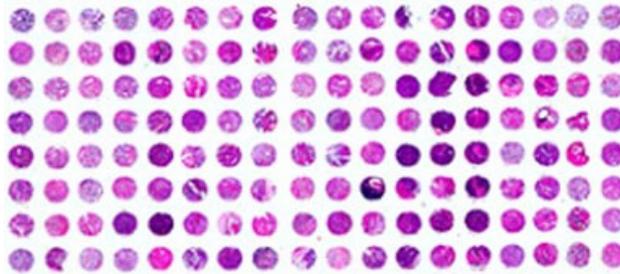


Abbildung 20: Schnittpräparat eines tissue microarray (Beecher Instruments)

Daraus können bis zu 200-300 aufeinander folgende 5 µm dünne Schnitte erzeugt werden, in Abhängigkeit von der Dicke des Blocks. Die so gewonnenen Schnitte können ganz normal gefärbt werden, z.B. mit einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Die Schnitte können aber auch auf DNA, RNA oder Proteine untersucht werden, z.B. durch die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisation (FISH), in situ Polymerase-Kettenreaktion, RNA-in-situ-Hybridisation oder Immunhistochemie (ICH). Bis zu 200 aufeinander folgende Schnitte können also mit jeweils bis zu eintausend Proben analysiert werden. Diese hat außer den verfahrenstechnischen und ökonomischen Vorteilen auch noch den Nutzen, dass alle Gewebeproben unter identischen Bedingungen behandelt werden (hohe Standardisierung) (Skacel, M. et al., 2002; Kononen, J. et al., 1998; Kallioniemi, O.P. et al., 2001; Bubendorf, L. et al., 2001). Außerdem wurde durch die Anordnung der Proben in einem Raster die Basis für eine automatisierte Konstruktion und Analyse der Arrays geschaffen (Moch, H. et al., 2001; Nocito, A. et al., 2001; Theillet, C., 1998).

1.9.3 Anwendungsgebiete von Tissue Microarrays

Mit der Sequenzierung des menschlichen Genoms stellte sich eine große Menge von Informationen von über zehntausenden von Genen und deren Strukturen

(Venter, J.C. et al., 2001; Lander, E.S. et al., 2001) der Wissenschaft zu Verfügung.

Das Problem ist heute nicht mehr die Entdeckung der Gene, sondern die Analyse ihrer Funktion. Ein wichtiger Arbeitsschritt bei der Erforschung von Zell-Genomen auf DNA- und RNA-Ebene ist der Einsatz von DNA-Microarrays (Lockhart, D.J. et al., 1996; DeRisi, J. et al., 1996; Schena, M. et al., 1995; Schena, M. et al., 1996). Damit können alle Gene, die in einer Zelle vorkommen identifiziert werden. Eine qualitative Einschätzung der Gene und ihre Bedeutung für den Zellstoffwechsel lassen sich mit diesem Verfahren jedoch nicht bewerkstelligen. Dort bietet sich ein Screening mit Hilfe von Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) und TMAs an, die für diesen Zweck optimal geeignet sind (Hofele, C. et al., 2002; Bubendorf, L. et al., 1999; Moch, H. et al., 1999).

Man kann mit den TMAs verschiedene Fragestellungen bearbeiten, die sich nach dem jeweiligen Design der TMAs richten:

- Multitumor TMAs enthalten Spots aus Tumorgewebe verschiedener Art. Mit ihnen kann man untersuchen, welche DNA, RNA oder Proteine in welcher Tumorart vorkommen (Andersen, C.L. et al., 2000; Schraml, P. et al., 1999).
- Die sog. Progression TMAs enthalten Gewebe einer Tumorart, jedoch sind dies verschiedene Stadien dieses Tumors. Somit kann man z.B. feststellen, ob ein Gen in verschiedenen Phasen der Tumorentwicklung unterschiedlich stark exprimiert wird (Bubendorf, L. et al., 1999; Bowen, C. et al., 2000; Kononen, J. et al., 1998).
- Prognostic bzw. Prognosis TMAs erhält man, wenn man die Spots eines Microarrays mit den jeweiligen Follow-up-Daten der Patienten kombiniert. So kann man herausfinden, ob ein bestimmtes Protein oder eine bestimmte DNA/RNA prognostische Relevanz besitzt (Moch, H. et al., 1999; Barlund, M. et al., 2000; Torhorst, J. et al., 2001).

- Abschließend ergeben sich hieraus die folgenden Anwendungsgebiete für TMAs in der Krebsforschung:
- Bestimmung der intra- und extrazellulären Verteilung von Molekülen.
- Verknüpfung der Informationen über ein Molekül auf DNA-, RNA- und Proteinebene.
- In vivo-Überprüfung von Hypothesen, die an Zelllinien oder in Tierversuchen erarbeitet wurden, an Gewebeproben von Patienten.
- Überprüfen von Ergebnissen, die mit einer limitierten Anzahl von Gewebeproben durch cDNA-Microarrays gewonnen wurden, an einer repräsentativen Probenanzahl im TMA.
- Erforschung eines Auftretens von mutmaßlichen Tumorgenen und deren Produkten in verschiedenen Tumorstadien.
- Herstellung einer Verbindung zwischen molekularbiologischen und pathohistologischen Patientendaten.

(Spyro, M. et al., 2001)

Überdies können TMAs auch in vielen anderen Gebieten außerhalb der Tumorforschung verwendet werden: man kann Arrays mit Geweben von Tieren oder Arrays zur Altersforschung herstellen (Kallioniemi, O.P. et al., 2001). Der Einsatz von TMAs erscheint auch in der Lehre sinnvoll zu sein, da die einzelnen Proben immer einen charakteristischen Ausschnitt des Gewebes präsentieren und man an ihnen exemplarisch gewebespezifische Details zeigen kann. Bei der Entwicklung, Testung und Verbesserung neuer Antikörper und Färbemethoden finden TMAs ein weiteres Anwendungsgebiet, insbesondere, wenn man TMAs mit normalen Gewebeproben nutzt. Außerdem sind TMAs gut geeignet, um Patientendaten von Gewebeproben zu anonymisieren (Bubendorf, L. et al., 2001).

1.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Multiplex-PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur in vitro Amplifikation von DNA-Fragmenten. Dabei lehnt sie sich an die in vivo ablaufenden Prinzipien enzymatischer DNA-Replikation während des Zellzyklus an und wurde hierfür an gängige Laborbedingungen adaptiert. Der eigentliche Amplifikationsvorgang teilt sich in drei wesentliche Reaktionsschritte. Ihr Ablauf wird allein durch Temperaturänderungen bestimmt. Während einer PCR findet eine zyklische Wiederholung dieser Reaktionsschritte statt. Die Auswahl der Reagenzien (Nukleotide, Primer, Polymerase) erlaubt die vielfache Wiederholung der Zyklen, ohne eine Änderung des Mediums oder einen Wechsel der Reagenzienkonzentrationen vornehmen zu müssen.

Das Verfahren der PCR wurde bereits im Jahr 1971 von Kleppe et al. beschrieben. Eine Weiterentwicklung des Verfahrens fand im Jahr 1985 durch Kary B. Mullis statt. Die PCR wurde im Folgenden durch die Firma Cetus etabliert. Nach der Erstveröffentlichung durch Saiki et al. 1985 entwickelte sich dieses zur selektiven in vitro Amplifikation von DNA-Sequenzen schnell zu einer der Methoden der Routinediagnostik in der Molekularbiologie. Grundlage der PCR ist die Synthese von zwei kurzen (ca. 18-23 bp), einzelsträngigen Oligonukleotiden (Primern), die zum Anfang und Ende des gewünschten DNA-Bereiches antiparallel komplementär sind. Nach erfolgter Denaturierung der doppelsträngigen DNA hybridisieren diese Oligonukleotide mit der zu amplifizierenden DNA-Sequenz und dienen einer thermostabilen DNA-Polymerase als Knüpfungspunkte zur spezifischen Synthese eines neuen Doppelstrangs aus entsprechenden Desoxyribonukleosidtriphosphaten. Das dabei entstehende PCR-Produkt dient als Matrize für die folgenden weiteren Amplifikationszyklen. Die Temperaturstabilität der verwendeten Polymerase erlaubt die zyklische Wiederholung der Reaktionsschritte, ohne dass das Enzym dabei zerstört wird. Auf diesem Wege lässt sich das zu amplifizierende DNA-Fragment exponentiell vermehren.

Reaktionsschritte einer PCR:

- Denaturierung der DNA in Einzelstränge bei 94-96°C
- Annealing der Primer (komplementäre Oligonukleotide, welche spezifisch zum initialen Abschnitt des einen Strangs bzw. zum Endabschnitt des Gegenstrangs der zu amplifizierenden DNA-Sequenz sind) bei 50-68°C
- Extension der Primer vom 3'-OH-Ende (enzymatische Reaktion durch fortlaufende Addition von dNTPs durch eine Polymerase) bei 72°C

Da im Rahmen der Analyse genetische Abweichungen in Form von Verlusten in Bezug auf den Heterozygotiegrad (LOH) untersucht wurden, wurde das Verfahren der PCR zum Verfahren der Multiplex-Mikrosatelliten-PCR erweitert. Dabei werden mehrere Primerpaare gleichzeitig eingesetzt, um in einem Reaktionsdurchlauf mehrere DNA-Fragmente amplifizieren zu können. Entscheidend für die Gestaltung einer solchen Multiplex-PCR ist die Auswahl der Primer, die annähernd eine gleiche Annealingtemperatur aufweisen müssen, andererseits alle im gleichem Maße angelagert werden sollten. Nur auf diesem Wege ist eine ausgewogene Amplifikation aller ausgewählten Sequenzen zu gewährleisten. Wichtig ist, dass es hierbei nicht zum Prozess der Primerdimerisation kommt (Edwards, M.C. et al., 1994).

Für die Auswahl der Primer, die im Rahmen dieser Arbeit berücksichtigt wurden, wurden die folgende Auswahlkriterien herangezogen. Sofern die Primer einer Funktion zugeordnet werden können, sollte dies bei der Auswahl berücksichtigt werden. Zudem sollten sie über einen möglichst hohen Heterozygotiegrad verfügen, da dies einen hohen Informationsgehalt in sich birgt. Homozygote Marker können aus diesem Grund keine Anwendung finden. Des Weiteren sollte im Bezug auf die Marker eine hohe Alterationsfrequenz bekannt sein (Große Häufigkeit an LOHs). Die verwendeten Primer dürfen während der ablaufenden PCR nicht miteinander interagieren. Dies ist Voraussetzung um eine optimale,

gleich hohe Amplifikation der zu untersuchenden Marker zu erreichen. Die Amplifikationsmuster der Marker sollten zueinander passen, um bei der weiterführenden Analyse eine Überlagerung zu vermeiden. Tendenziell sind partielle Überlagerungen stets denkbar, daher sollte in derartigen Fällen eine andere Farbstoffmarkierung verwendet werden. Des Weiteren sollte im Rahmen dieser Maßnahme nach Zielsequenzen möglichst vieler Chromosomen gesucht werden, die mit der Tumorentstehung und LOHs in Verbindung stehen. Ziel ist es dabei sie in einer Multiplex-PCR zu vereinen. Im Rahmen der weiterführenden Analysen, müssen – um störende Überlagerungen zu vermeiden – die die Zielsequenzen flankierenden Primersequenzen versetzt und zunächst einzeln, später in Kombination auf ihre Amplifikationseffizienz untersucht werden. Der Grenzwert einer noch ausreichend reproduzierbaren Amplifikation liegt bei etwa 320 bp. Der optimale Bereich für die Durchführung einer Multiplex-PCR liegt dabei bei 90 bp bis 200 bp. Dabei gilt dieser obere Grenzwert insbesondere für DNA, die aus formalinfixierten, vormalig in Paraffin eingebetteten Gewebeproben isoliert wurde. Dieser DNA-Typ enthält ein relativ hohes Maß an degradierter DNA und stellt sich kurzketzig dar. Aufgrund dieser Tatsache lässt sich im Rahmen der Multiplex-PCR nur eine begrenzte Anzahl an Zielsequenzen untersuchen.

Im Rahmen einer größeren Prostata-Ca Studie des Prostatazentrums am Universitätsklinikum Münster (Schmidt, H. et al., 2007) fanden für die vorliegende Arbeit insbesondere die Marker D8S258 (Lok.: 8p22, Heterozygotiegrad: 0,71%, LOH: 8,1-24,1%) und NEFL (Lok.: 8p21, Heterozygotiegrad: 0,83%, LOH: 16,3-35,4%) Verwendung (MacGrogan, D. et al., 1994; Takahashi, S. et al., 1995; Vocke, C.D. et al., 1996; Kagan, J. et al., 1995; Macoska, X. et al., 1996). Zudem wurden die Gene LZTS, RANBP16, SCAM-1, EGR3, TNFRSF10B, LOXL2, NKX3A, STC1 und ADRA1A auf 8p21-22 mittels Gendosis-PCR untersucht (Schmidt, H. et al., 2007).

Für das LOXL2 Gen konnte im Rahmen der angesprochenen Studie ein genetischer Verlust in 72% aller untersuchter Prostata-Cas nachgewiesen werden, was dann zur Themenstellung dieser Arbeit führte. Es sollte untersucht werden,

ob dieser festgestellte genetische Verlust tatsächlich auf Proteinebene nachweisbar ist.

1.11 Fragestellung der Arbeit

Eine Isoform des Proteins Lysyloxidase, namentlich als lysyl oxidase-like 2 (LOXL2) bezeichnet lässt sich in sehr hoher Konzentration in den gesunden Geweben der Plazenta, des Uterus, des Pankreas, sowie der Prostata nachweisen (Jourdan-Le Saux, C. et al., 1999).

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der prognostischen Relevanz von LOXL2 (lysyl oxidase-like 2), bei Verwendung als Markerenzym im Rahmen des histochemischen Nachweises der verschiedenen Manifestationsformen des Prostatakarzinoms. LOXL2 findet sich bevorzugt und in großer Menge in den epithelialen Basalzellen gesunden Prostatagewebes. Eine Verringerung der Nachweisbarkeit von LOXL2 lässt sich beim Vorliegen maligner Prozesse oder intraepithelialer Neoplasien des Prostatagewebes nachweisen.

Die laufende Studie des Prostatazentrums untersucht daher einerseits anhand der Multiplex-PCR das LOXL2 Gen an 39 Proben von Prostatakarzinompatienten und vergleicht die gewonnenen Ergebnisse mit der immunhistochemischen Expression. Ziel hierbei ist die Validisierung und Abschätzung des prognostischen Werts.

Andererseits werden 1206 Patientenfälle bei denen sich verschiedene Manifestationsformen des Prostatakarzinoms nachweisen ließen, und bei denen im Anschluss an die Diagnosestellung eine radikale Prostatektomie durchgeführt wurde, auf die Proteinexpression des Prostatatumorgewebes an LOXL2 hin untersucht.

Des Weiteren erfolgt eine Verknüpfung der Untersuchungsergebnisse in Bezug zum im Rahmen der histopathologischen Auswertung vorgenommenen Gratings, sowie zu den klinischen Verläufen der einzelnen Patienten. Ziel dieser Arbeit ist es, die prognostische Relevanz von LOXL2 als validen, verlässlichen Marker für die Diagnose eines Prostatakarzinoms zu ermitteln. Zudem werden Rückschlüsse auf die Aussagekraft des Markers in Bezug auf die zu erwartenden weiteren klinischen Verläufe der Patienten gezogen.

2. Material und Methoden

2.1 Tumorkollektiv

Grundlage der Studie war in Parafin eingebettetes Tumorgewebe von 1206 Patienten mit Prostatakarzinom, die am Prostatazentrum der Universitätsklinik Münster behandelt wurden. Das Alter der Patienten betrug im Median 69,56 Jahre. Im Rahmen der Studie wurde ein Zeitraum von 11 Jahren (1993 bis 2004) berücksichtigt. Die histopathologische Auswertung des Tumorgewebes wurde am Gerhard-Domagk-Institut für Pathologie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster durchgeführt.

Die Einschlusskriterien für Patienten, die in diese Studie aufgenommen wurden, waren:

- **Zustand nach radikaler Prostatektomie**
- **Genügend beurteilbares tumoröses Gewebematerial**
- **OP-Zeitraum zwischen 1993 und 2004**

Die Tumorbeurteilung erfolgte nach der TNM-Klassifikation des Prostatakarzinoms. Es sind folgende Beurteilungskriterien zu unterscheiden:

Beurteilung des Primärtumors (pT) an der Prostatektomie:

- T2** Tumor auf die Prostata begrenzt
- T2a** Tumor befällt die Hälfte eines Lappens oder weniger
- T2b** Tumor befällt mehr als die Hälfte eines Lappens
- T2c** Lokalisation in beiden Lappen
- T3** Tumor infiltriert durch die Prostatakapsel
- T3a** Extrakapsuläre Ausbreitung (einseitig oder beidseitig)
- T3b** Tumor infiltriert Samenblase(n)

T4 Der Tumor fixiert oder infiltriert andere Nachbarstrukturen als die Samenblasen, z.B. Blasenhal, Sphincter externus, Rektum und/oder ist an der Beckenwand fixiert.

(Wittekind, Ch., 2005)

Beurteilung der regionären Lymphknoten (pN):

NX Keine Beurteilung der regionären Lymphknoten möglich
N0 Regionäre Lymphknotenmetastasen sind nicht nachweisbar
N1 Regionäre Lymphknotenmetastase

Anmerkung: Eine Invasion in den Apex der Prostata oder in die Prostatakapsel (aber nicht darüber hinaus) wird als T2 (nicht T3) klassifiziert (Wittekind, Ch., 2005).

Beurteilung der Fernmetastasierung (pM):

MX Das Vorhandensein von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden
M0 Keine Fernmetastasen
M1 Fernmetastasen
M1a Nicht regionäre Lymphknoten
M1b Knochen
M1c Andere Lokalisation(en)

Anmerkung: Wenn Metastasen in mehr als einer Lokalisation nachweisbar sind, soll die höchste Kategorie gewählt werden (Wittekind, Ch., 2005).

Pathologische Klassifikation (pTNM):

Die pT-, pN- und pM-Kategorien entsprechen den T-, N- und M-Kategorien. Eine pT1-Kategorie existiert nicht, da die Definitionen von T1 nicht auf die pathologische Klassifikation übertragbar sind (Wittekind, Ch., 2005).

Histopathologisches Grading nach Gleason und Helpap:

Siehe Einleitung (1.2.4 und 1.2.5).

2.2 Erstellung des Kollektivs und praktisches Vorgehen

Zu Beginn erfolgte die Erstellung einer vollständigen EDV-gestützten Datenbank aller im Rahmen der Studie zu berücksichtigenden Patienten.

Ausgangssituation der zu erstellenden Datenbank war eine Liste, die die Journalnummer sowie Geburtsdaten aller Patienten bei denen eine Prostatektomie-Operation im Zeitraum von 1993 bis 2004 durchgeführt wurde, enthielt. Anhand der Journalnummern wurden zunächst die entsprechenden Patientendaten und Diagnosen mit Hilfe eines Patientenverwaltungsprogramms gesichtet. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte die Selektion des Patientenkollektivs. Die Befunde wurden dahingehend überprüft, ob bei den Patienten eine radikale Prostataektomie durchgeführt wurde.

Alle Patienten, bei denen die angesprochene Therapievariante angewandt wurde, wurden in das Patientenkollektiv dieser Studie aufgenommen. Die Befunde wurden vollständig ausgedruckt, chronologisch sortiert und archiviert.

Anhand dieser chronologisch sortierten Daten wurde eine EDV-gestützte Datenbank, die das Patientenkollektiv umfasste, erstellt. Erfasst wurden:

- **Vor- und Nachname**
- **Geburtsdatum**
- **Journalnummer**
- **TNM-Klassifikation**
- **Tumorlage**
- **Tumoranzahl**
- **Besonderheiten**
- **Helpap-Grading**
- **Gleason-Score**

Anhand der in der Datenbank erfassten Journalnummern wurden alle zugehörigen Hämatoxylin-Eosin-Schnittpräparate der jeweiligen Patienten aus dem Archiv des Gerhard-Domagk-Institutes für Pathologie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster herausgesucht.



Abbildungen 21 und 22: Schnittpräparatarchiv des Gerhard-Domagk-Institutes für Pathologie

Im Anschluß erfolgte die chronologische Sortierung und Archivierung. Die Begutachtung und lichtmikroskopische Befundung der Schnittpräparate erfolgte nach schichtspezifischer Sortierung durch OÄ Frau Dr. med. Elke Eltze, Fachärztin für Pathologie am Gerhard-Domagk-Institutes für Pathologie, Münster. Die tumorfreien Schnittpräparate wurde ins Archiv zurücksortiert; entsprechend wurden die zugehörigen Paraffin-Gewebeblöcke der zwei tumorreichsten HE-Schnittpräparate (bezogen auf jeweils einen Patienten aus dem Kollektiv) aus dem Paraffinblockarchiv herausgesucht.



Abbildungen 23 und 24: Paraffinblockarchiv des Gerhard-Domagk-Institutes für Pathologie

Es erfolgte die Begutachtung der Paraffinblöcke durch OÄ Frau Dr. med. Elke Eltze. Kriterium war der ausreichende Gehalt des Paraffinblockes an repräsentativem Gewebe für das Tissue Microarray (TMA-Verfahren). Ausgewählt wurden hierbei zwei unterschiedliche, getrennt liegende Areale des jeweilig begutachteten Tumors.

Von den ausgewählten Paraffinblöcken des Resektionspräparates wurden im Folgenden nach eventueller vorheriger Neueinbettung Schnittpräparate angefertigt.



Abbildungen 25 und 26: Anfertigung eines Schnittpräparates mit Hilfe eines Microtoms

Diese wurden Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Auf diesen neu erstellten Schnittpräparaten wurde das primäre Tumorareal durch OÄ Frau Dr. med. Elke Eltze markiert.

2.3 Erstellung der Tissue Microarrays (TMA)

Im Anschluss an die Markierung der Tumorregion erfolgte die erneute chronologische Sortierung des jeweiligen HE-Schnittpräparates in Kombination mit dem zugehörigen Paraffinblock (2 Schnittpräparate + 2 zugehörige Paraffinblöcke pro Patient). Die sortierten Schnittpräparate und Paraffinblöcke wurden nach zuvor erstellter Datenmaske sortiert und den entsprechenden Feldern in den zu erstellenden Tissue Microarrays (TMA) zugewiesen.

Die Feldbezeichnung erfolgte nach folgendem Schema:

Zielsetzung war die Anfertigung jeweils eines Primär- und Sekundärempfängerblockes, wobei der Sekundärblock eine Kopie des Primärblockes (bezogen auf das Tumorareal) darstellen sollte. Jeder Empfängerblock setzte sich gemäß der Planung aus 4 Quadranten zusammen, wobei jeder Quadrant 100 Biopsien, aufgeteilt in jeweils 10 mal 10 Feldern, enthielt. Auf Primär- und Sekundärempfängerblock entfielen somit jeweils 400 Stanzbiopsien. Jeder horizontalen Reihe wurden 5 Patienten in zwei nebeneinander liegenden Feldern - gemäß chronologischer Sortierung - zugeordnet (entspricht: 2 Stanzbiopsien aus zuvor erwähnten 2 Donorblöcken).

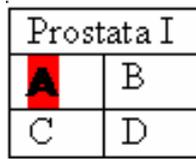
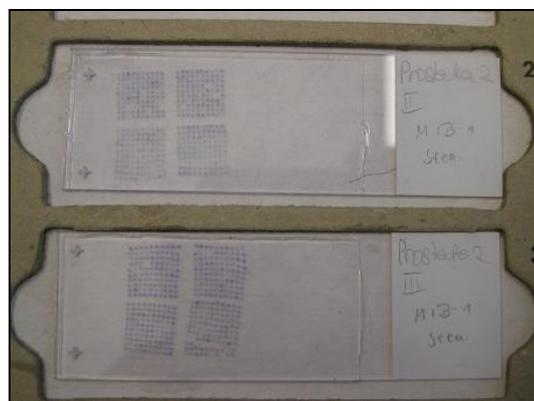


Abbildung 27:
Schematischer
Aufbau eines
Empfängerblocks
mit 4 Quadranten

| | A | B | C | D | E | F | G | H | I | J |
|----|------------------|------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| 1 | 489/93 I.13 | 489/93 I.8 | 865/93 II | 865/93 VIII | 8426/93 II VNS1 | 8426/93 II NS7 | 9098/93 I.8 | 9098/93 I.9 | 9298/93 VIII | 9298/93 IX |
| | 4 | 3 | / | 4 | 3 | 3 | 3 | 3? | 3 | 3 |
| 2 | 10057/93 V | 10057/93 III | 10237/93 IV | 10237/93 IX | 11013/93 I.3 | 11013/93 I.9 | 11427/93 XI | 11427/93 XII | 11771/93 III.10 | 11771/93 III.10 |
| | 3 | 0 | / | 4 | 3 | 3 | 4 | 4 | 2 | 3 |
| 3 | 11887/93 I.12 | 11887/93 I.5 | 12210/93 VII | 12210/93 X | 12992/93 I | 12992/93 VI | 13492/93 I.2 | 13492/93 I.2 | 14962/93 IV.4 | 14962/93 IV.9 |
| | 4 | 3 | 3 | 0? | 0 | 4 | 3 | 4 | 4 | / |
| 4 | 15728/93 I.10 | 15728/93 I.10 | 15980/93 III.12 | 15980/93 III.14 | 16385/93 IV | 16385/93 VII | 19042/93 I.12 | 19042/93 I.15 | 19694/93 X | 19694/93 V |
| | 4 | 3 | 4 | 4 | / | / | 4 | 4 | 4 | / |
| 5 | 23957/93 I.5 | 23957/93 I.7 | 27071/93 VIII | 27071/93 V | 27210/93 I.3 | 27210/93 I.3 | 28284/93 VIII | 28284/93 XV | 28287/93 II.14 | 28287/93 II.12 |
| | 4 | 3 | / | 3 | 3 | 4 | 4 | 5 | / | 4 |
| 6 | 29406/93 X | 29406/93 VIII | 30096/93 IV | 30096/93 V | 31201/93 V | 31201/93 IV | 31541/93 I.1 | 31541/93 I.3 | 33322/93 I.7 | 33322/93 I.3 |
| | 4 | 5 | 0? | 3 | 3 | 4 | 0 | 3 | 3 | 4 |
| 7 | 34661/93 II.1 | 34661/93 I.16 | 34882/93 I.16 | 34882/93 I.6 | 36535/93 IX | 36535/93 XIII | 36541/93 VIII.4 | 36541/93 VIII.6 | 38201/93 I.3 | 38201/93 I.5 |
| | 3 | 3 | 4 | 4 | 3 | 0 | 4 | / | 3? | / |
| 8 | 42158/93 II.7 | 42158/93 II.8 | 42872/93 II.6 | 42872/93 II.14 | 1308/94 I.4 | 1308/94 I.7 | 1903/94 II.11 | 1903/94 II.15 | 2306/94 XII | 2306/94 VB |
| | 0 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 | 3 | 0 |
| 9 | 3278/94 XXV | 3278/94 VI | 4068/94 I.7 | 4068/94 I.3 | 4230/94 I.6 | 4230/94 I.11 | 4464/94 I.19 | 4464/94 I.17 | 6765/94 VIII.a | 6765/94 IV.a |
| | 3 | 3 | 3 | 3 | 2 | 3 | 3 | 4 | 4 | 3 |
| 10 | 7152/94 I.3 | 7152/94 I.9 | 7865/94 I.5 | 7865/94 I.7 | 7866/94 I.3 | 7866/94 I.5 | 9346/94 XV | 9346/94 XIII | 9349/94 XII | 9349/94 IX |
| | 4 | 5 | 0? | 4 | 3 | 3 | 4 | 3 | 4 | 4 |

Abbildung 28: Detaillierte Darstellung eines
Empfängerblockquadranten

Gemäß 1206 im Rahmen der Studie untersuchten Patientenfälle wurden 2412 Stanzbiopsien aus den Donorblöcken entnommen (2 Stanzbiopsien pro Patient). Somit lagen nach Abschluß der Stanzbiopsieentnahme und Empfängerblockanfertigung 7 Primärblöcke und weitere 7 Sekundärblöcke vor (Gesamt: 4824 Stanzbiopsien, verteilt auf 14 Empfängerblöcke).



Abbildungen 29 und 30: Schnittpräparate der ausgewählten Empfängerblöcke

2.4 Färbeprotokoll (Hämatoxylin-Eosin)

Da die Schnitte nach dem Schneiden noch immer mit Paraffin durchtränkt waren, wurden die Gewebestrukturen im Anschluss gefärbt. Dazu wurde das Paraffin zunächst aus dem Gewebe ausgeschmolzen und die Reste mit einem Lösemittel herausgelöst. Im Anschluss wurde das geschnittene Gewebe über eine Alkoholreihe rehydriert und konnte dann gefärbt werden.

In der Routinehistologie wird die Hämatoxylin-Eosin-Färbung verwendet. Auf Grund der unterschiedlichen Ladung der Farbstoffe werden unterschiedliche Strukturen in der Zelle gefärbt. Der blaue Farbstoff Hämatoxylin hat dabei als basischer Farbstoff eine Affinität zu den negativ geladenen Ribonukleinsäuren (DNA und RNA) und färbt deshalb Kerne blau an. Wenn im Zytoplasma wegen einer Stoffwechselaktivierung (z.B. bei einer Regeneration) sehr viel RNA enthalten ist, ist das Zytoplasma ebenfalls basophil, d.h. vermehrt blau angefärbt. Die Proteine des Zytoplasmas und das extrazellulär gelegene Kollagen werden durch den sauren Farbstoff Eosin rot angefärbt.

Nach der Färbung wurden die Schnitte über eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert. Im Anschluss wurde der Schnitt mit einem dünnen Deckgläschen, das mit einem Tropfen eines speziellen Harzes beschichtet ist, versiegelt und konnte so mikroskopisch untersucht und befundet werden. Das Färben und Eindeckeln der Präparate erfolgt i.d.R. automatisiert.

2.4.1 Zusammensetzung (HE)

Saures Hämalaun nach Mayer: 1 g Hämatoxylin, 0,2 g Natriumjodatin, 50 g Kalialaun in 1 l aqua dest. lösen, 50 g Chloralhydrat, 1 g kristalline Zitronensäure; vor Gebrauch filtrieren, 1 % wässriges Eosin G

2.4.2 Durchführung

- 3 x 10 min. Xylol
- 5 min. 98 % Isopropanol
- 5 min. 96 % Isopropanol
- 5 min. 90 % Isopropanol
- 5 min. 80 % Isopropanol
- 5 min. 70 % Isopropanol
- 5 min. aqua dest.
- 5 min. Hämalaun nach Mayer
- Kurz in Leitungswasser spülen
- 15 min. bläuen in fließendem Leitungswasser
- 3 min. 1 % Eosin
- Kurz (ca. 10 sek.) in aqua dest. auswaschen
- 5 sek. 70 % Isopropanol
- 5 sek. 80 % Isopropanol
- 5 sek. 90 % Isopropanol
- 2 x 5 min. 100 % Isopropanol
- 3 min. Xylol
- Decken in Eukitt

2.4.3 Ergebnisse der Färbung

- Kerne, Knorpel und verkalkte Teile (BLAU)
- Erythrocyten (ORANGE)
- Bindegewebe (ROSE)
- Muskulatur (ROT)

2.5 Immunhistochemische Färbung

Von den erstellten Empfängerblockpaaren (Primär- und Sekundärblock) wurde jeweils ein Schnittpräparat angefertigt. Dieses wurde im Folgenden einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung unterzogen. Nach Auswertung der Schnittpräparate durch OÄ Frau Dr. med. E. Eltze wurde der Block eines jeden Blockpaares ausgewählt, der die höchste Tumordichte aufwies.

Aus den sieben ausgewählten Paraffinblöcken wurden nun für die immunhistologische Färbung weitere Schnitte gewonnen.



Abbildung 31: Tissue stainer (Dako)

2.6 Immunhistochemisches Färbeprotokoll

Von den zur weiteren immunhistochemischen Analyse vorgesehenen Empfängerblockpaaren wurden erneut Schnittpräparate angefertigt. Diese Schnittpräparate wurden im Folgenden mittels eines Wärmeschrankes deparaffiniert. Im Anschluß an diese Prozedur wurden die Schnittpräparate rehydriert und einem 20 minütigen Aufenthalt in einer Citrat-Pufferlösung, die einen pH-Wert von 6,0 aufwies unterzogen. Des Weiteren wurden die Präparate einer 5 minütigen Behandlung mit einem „Blocking Erasure Präparat“ (Biocarta, Hamburg, FRG), welches unspezifische Bindungsstellen innerhalb der Strukturen blockierte unterzogen. Danach erfolgte die 16 stündige Inkubation mit dem LOXL2-Antikörper (1:600), bei einer Temperatur von 4°C.

Zur eigentlichen Darstellung des Inkubationsergebnisses wurden die Präparate mit dem LSAB KIT (alkalische Phosphatase) der Firma DAKO (Hamburg, FRG) behandelt. Die Kernfärbung erfolgte mit Hämatoxylin.

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbung erfolgte nach allgemeinen Standards:

- **Score 0** - Negatives Ergebnis
- **Score 1** - Schwache cytoplasmatische Färbung des Großteils der Tumorzellen (schwach positives Färbeergebnis)
- **Score 2** - Moderate cytoplasmatische Färbung des Großteils der Tumorzellen (moderates positives Färbeergebnis)
- **Score 3** - Starke cytoplasmatische Färbung des Großteils der Tumorzellen (stark positives Färbeergebnis)

Die Bewertungsskala wurde nach folgendem Schema in positive und negative Ergebnisse untergliedert:

- **Score 0–1** = negativ
- **Score 2–3** = positiv

Als Grundlage der statistischen Analyse fand das Programm SPSS 14.0 (SPSS Inc., USA) Verwendung. Alle klinischen und pathologischen Parameter wurden zu den Ergebnissen der immunhistochemischen Färbung unter Verwendung von Kontingenztabellen und der Chi-Quadrat-Methode in Relation gesetzt. Zur Berechnung der Gesamtüberlebenszeit, sowie des krankheitsfreien Zeitintervalls wurde der Kaplan-Meier-Schätzer angewendet (Kaplan, E.L., 1958). Der Vergleich der Überlebenskurven erfolgte durch Verwendung des Log-Rank-Tests (Mantel, N., 1936). Das Vorliegen von p-values, die sich mit einem Wert $<0,05$ darstellten, galt als Grundlage für das Vorliegen einer statistischen Signifikanz.

2.6.1 Grundlagen MIB1 (Ki-67)

Als nukleäres Protein ist das Ki-67 Antigen durch seine Reaktivität mit dem monoklonalen Antikörper des Ki-67 Klon definiert. Im Rahmen der Analysen von Ki-67 konnten zwei Isoformen bestimmt werden. Eine weist ein Gewicht von 345 kDa, eine weitere ein Gewicht von 395 kDa auf. Das Ki-67-Antigen wird während aller aktiven Phasen des Zellzyklus präferentiell exprimiert, fehlt jedoch in ruhenden Zellen (Gerdes, J. et al., 1984). Während der Interphase lässt sich das Antigen ausschließlich innerhalb des Nukleus nachweisen. Während der Mitose wird der überwiegende Teil des Proteins auf die Chromosomenoberfläche umgelagert. Der Abbau des Antigens erfolgt relativ schnell, sobald die Zelle in den nicht proliferativen Zustand übergeht (Scholzen, T. et al., 2000). Während ablaufender DNA-Reparaturprozesse scheint keine Expression von Ki-67 stattzufinden (Key, G. et al., 1994).

2.6.2 Färbeprotokoll MIB1 (Ki-67)

Eine Verdünnung des monoklonalen Maus Anti-Human Ki-67 auf einen Faktor von 1:75 bzw. 1:150 ist möglich, wenn zuvor für formalinfixierte, paraffineingebettete Schnitte, wie sie in der hier durchgeführten Arbeit Verwendung fanden, folgende färbetechnischen Vorbehandlungen durchgeführt wurden:

- Hitzeinduzierte Epitopdemaskierung mit DakoCylomation Target Retrieval Solution (Code-Nr.: S 1700) – 20 Min.
- Inkubation mit dem primären Antikörper bei Raumtemperatur – 30 Min.
- Visualisierung mittels DAKO LSAB TM +/-HRP-Kit (Code-Nr.: K 0679)

Die eigentliche Auswertung erfolgte nach folgendem Schema:

- 0% (mikroskopisch)
- <5% (mikroskopisch)
- >5% (mikroskopisch)

2.7 Vorgehensweise (speziell) in Bezug auf die gewählten Analyseverfahren und die statistische Auswertung

2.7.1 Immunhistochemie (speziell)

Aus dem Kollektiv der besagten 39 Tumorpatienten und den hergestellten TMAs wurden 3-4 µm große Sektionen deparaffiniert und im Anschluss rehydriert. Nach Dampfvorbehandlung (Citratpuffer pH 6,0 für 20 Min.) erfolgte die Zugabe von "Blocking Erasure" (Biocarta, Hamburg, FRG) über einen Zeitraum von 5 Minuten. Auf diesem Wege wurde eine Blockierung unspezifischer Bindungsstellen erreicht.

Im Anschluss wurde die Inkubation mit dem LOXL2 Antikörper (Verdünnungsfaktor 1:600) für einen Zeitraum von 16 Stunden bei einer Temperatur von 4°C eingeleitet. Der Nachweis erfolgte durch Verwendung des LSAB KITS (DAKO, Hamburg).

Die Kerngegenfärbung erfolgte mit Hämatoxylin. Ein TMA, welcher 100 tumorreiche Gewebeproben der besagten Patienten beinhaltete wurde auf diese Weise angefertigt. Ziel dieser Maßnahme war die Evaluation und Begutachtung der LOXL2 Immunhistochemie unter Berücksichtigung der klinischen Daten. Die Immunhistochemie wurde an 4 µm dicken Sektionsbereichen durchgeführt. Die immunhistochemische Auswertung erfolgte nach gängigen Standards (Her2, „DAKO-Score“):

- **0 = negativ**
- **1 = schwach**
- **2 = moderat**
- **3 = stark**

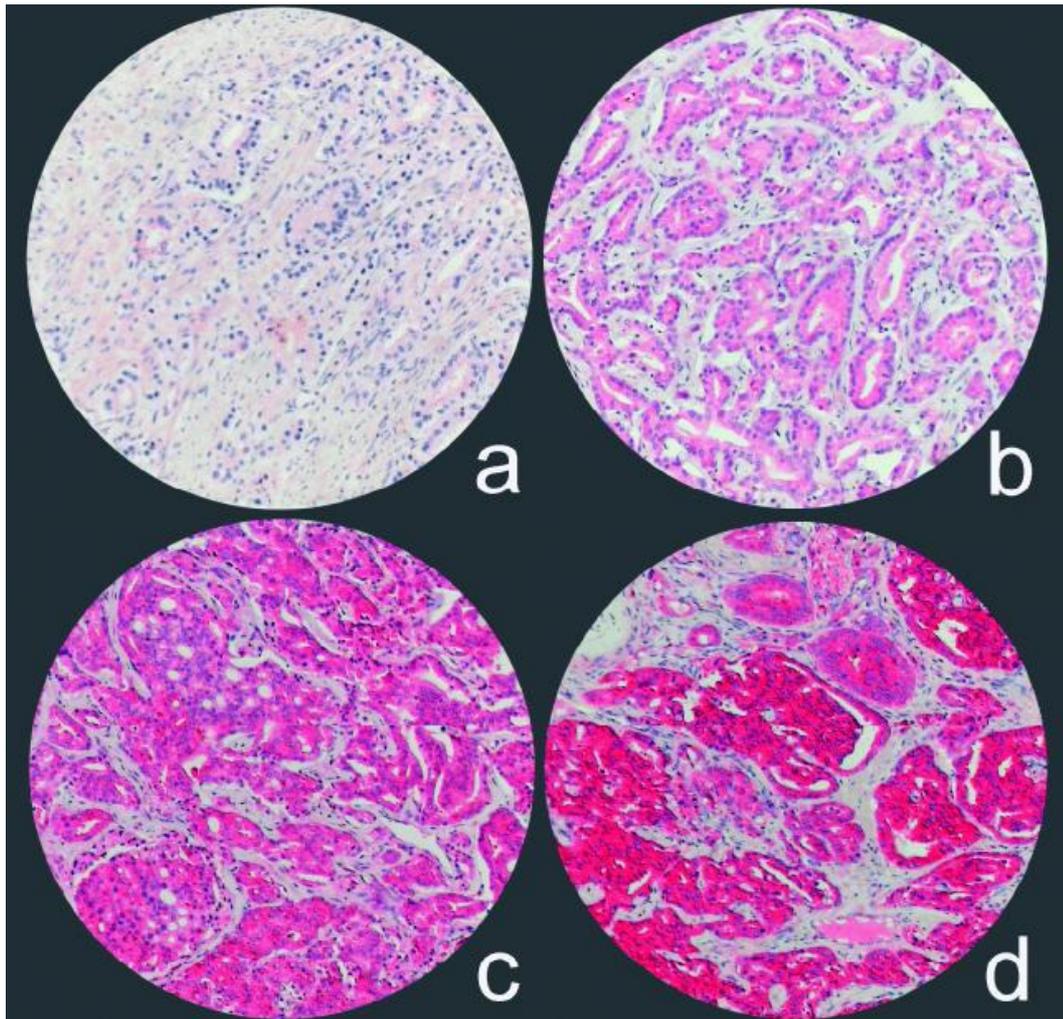


Abbildung 32: LOXL2 Immunhistochemie (10-fache Vergrößerung des TMA)

a = keine Expression

b = schwache Expression

c = moderate Expression

d = starke Expression

Die Immunhistochemie für Ki-67 (MIB1) wurde unter Verwendung des DAKO Autostainers automatisiert durchgeführt. Zuvor wurden die Proben einer Dampfbehandlung unterzogen (Multi-Gourmet-Steamer, BRAUN Typ 3216). Monoklonale Maus anti-Ki-67-Antikörper (clone MIB1, DAKO Diagnostica, Hamburg, anti-human Ki-67 Antigen, Code Nr. M7240) wurden als Primärantikörper in einem Verdünnungsverhältnis von 1:1000 verwendet.

Immunhistochemisch lässt sich zum Markerenzym LOXL2 sagen, dass es eine hohe Nachweisbarkeit im Bezug zu gesunden epithelialen Basalzellen des Prostatagewebes aufweist. Im Falle einer malignen Entartung oder intraepithelialen Neoplasie nimmt das Maß der Nachweisbarkeit rapide ab, um schließlich im Falle des Vorliegens eines Prostatakarzinoms fast nicht mehr als nachweisbar zu erscheinen.

2.7.2 Material und Methoden unter Berücksichtigung der Analyseverfahren und statistischen Auswertung

Berücksichtigung fanden im vorliegenden Analysefall 39 Patientenfälle bei denen sich ein manifestes Prostatakarzinom nachweisen ließ. Diese Patientenfälle wurden in ein PCR Analyse- und Auswertungsverfahren eingefügt. In 18 der Fällen fand sich eine Organbeteiligung (pT2a: n=2 und pT2c: n=16). In 18 Fällen lag eine Invasion der Kapselstrukturen vor (pT3a). In 2 Fällen fand sich eine Beteiligung des Samenblasenteile (pT3b) und ein einziger der Patienten wies eine Klassifikation pT4 auf. Ein Lymphknotenbefund der Klassifikation pN1 fand sich in 4 von 18 Fällen der Klassifikation pT3a und im Falle der Klassifikation pT4. In allen anderen berücksichtigten Fällen lag kein Lymphknotenbefall vor (pN0).

Es erfolgte die Isolierung von DNA und RNA um vergleichende Untersuchungen der Primärtumoren durchführen zu können. Zu diesem Zweck wurden Proben gesunden Prostatagewebes, sowie Blutproben der Patienten unter Verwendung zweier verschiedener DNA-Isolationsprotokolle gewonnen und analysiert. Aus Proben peripheren Blutes wurde die DNA mit Hilfe des „QIAamp Blood Kits“ (Qiagen, Hilden) gewonnen. Dabei wurden die Vorgehensanweisungen des Herstellers befolgt. Zur Isolierung der DNA wurden 7 µm große in Paraffin eingebettete, formalinfixierte Gewebestanzungen gesunder Gewebeanteile, sowie Gewebestanzungen tumorösen Gewebes verwendet.

2.7.3 Weiteres Vorgehen im Rahmen der Diagnostik- und Analyseverfahren

Im Rahmen des weiteren Vorgehens fanden die von Schmidt et al. (Schmidt, H. et al., 2006) etablierten Verfahren Anwendung. In diesem Zusammenhang wurde die „Microsatellite Polymerase Chain Reaction“ (PCR) zur Vervielfältigung der Probenserien angewendet. Die Auswertung der gewonnenen Resultate basierte auf Ergebnissen von Canzian et al. (Canzian, F. et al., 1996). Des Weiteren wurde das Verfahren der „Quantitativen Echtzeit PCR“ (5'-Nuklease-Assay / Multiplex-PCR) etabliert (Schmidt, H. et al., 2006). Dieses Verfahren ermöglichte das Auffinden von genetischen Verlustbereichen, sowie Veränderungen in einzelnen Chromosomenbereichen. In einem letzten Schritt wurden Resultate der etablierten „RT-Polymerase Chain Reaction“ in die Auswertung einbezogen. Hierbei erfolgte die LOXL2 mRNA Expressionsanalyse mit Hilfe eines „assay-on-demand Systems“ (Schmidt, H. et al., 2006). Die im Rahmen dieser Versuchsanordnungen gewonnenen Daten dienten als Grundlagen für die weitergehenden Analysen und fanden im Rahmen der statistischen Auswertung Verwendung (Schmidt, H. et al., 2006).

2.8 Lichtmikroskopische Auswertung

Im Anschluss an die immunhistochemischen Färbeprozeduren erfolgte die lichtmikroskopische Auswertung der behandelten Präparate gemäß dem gängigen, 3-stufigen WHO Grading System, gültig für cytoplasmatische Färbungen. Die Erstauswertung erfolgte durch den Verfasser, eine zweite Kontrollauswertung durch OÄ Dr. med. E. Eltze. Zudem wurde eine erneute Beurteilung der HE-Färbungen vorgenommen. Im Anschluss an all diese Prozeduren wurde eine erneute Überarbeitung der Patientendatenbank vorgenommen. Von den ursprünglich 1206 Patienten, konnten nach Abschluss der kritischen Auswertung sowohl der Hämatoxylin-Eosin, als auch der immunhistochemischen Färbung 1122 Patientenfälle in die Statistik aufgenommen werden. Grund hierfür war, dass sich im Falle von 21 Patienten kein Tumor in den HE-Färbungen nachweisen ließ. 63 weitere Patienten konnten nicht in der Statistik berücksichtigt werden, da die immunhistochemischen Stanzpräparate aufgrund technischer und verfahrensbedingter Mängel keine Beurteilung zuließen. Nachdem die besagten Patientenfälle aus der für die Statistik verwendeten Datenbank entfernt worden waren, blieben 1122 Patienten, deren Auswertungen zu diesem Zeitpunkt berücksichtigt werden konnten. Von diesen besagten 1122 Patienten lagen bereits bei 39 Fällen weitere, spezifischere Analyseverfahren (Multiplex-PCR, Immunhistochemie und daraus resultierende Analysen der gewonnenen Daten in Form statistischer Auswertung) vor (siehe Kapitel: „Ergebnisse“).

2.9 Integration des Follow-ups

Abschließend wurde der momentane klinische Status (Follow-up) der verbliebenen Patienten in die Datenbank integriert, um die gewünschten Berechnungen im Rahmen der statistischen Auswertung vornehmen zu können. Grundlage dieser Informationen, waren Gespräche die mit den weiterbehandelnden Ärzten der Patienten geführt wurden. Nach Abschluss der Integration des momentanen, klinischen Status der Patienten in die Datenbank und der Entfernung all jener Patientendaten, bei denen eine weitergehende Analyse aus besagten Gründen nicht möglich war, verblieben als Grundlage der statistischen Erhebung 587 Patienten, die alleinig einer Prostatektomie unterzogen wurden und bei denen bis zum Ende des Follow-ups oder bis zum PSA-Wiederanstieg (Rezidiv) weder eine Strahlentherapie noch eine Hormonentzugsbehandlung durchgeführt wurden, sowie deren aktueller klinischer Status zum Zeitpunkt der Erhebung der Statistik bekannt war. Einwilligungserklärungen der Patienten die im Rahmen dieser Studie berücksichtigt wurden lagen standardisiert seit 1993 und seit 1997 mit aktuellem Votum der Ethikkommission vor.

SPSS

Die statistische Analyse wurde mit Hilfe des Programms SPSS 14.0 (SPSS Inc., USA) durchgeführt. Dabei handelt es sich um ein modular aufgebautes Programmpaket zur statistischen Analyse von Daten. Das Basismodul ermöglicht das grundlegende Datenmanagement und umfangreiche statistische und grafische Datenanalysen mit den gängigsten statistischen Verfahren. Des Weiteren besteht die Möglichkeit für spezielle Anwendungen, etwa Conjoint- oder Zeitreihenanalyse, Zusatzmodule, die auf dem Basismodul aufsetzen zu verwenden. Die Bedienung erfolgt menügesteuert. Es fanden alle klinischen und pathologischen Parameter Verwendung.

Kaplan Meier

Der Kaplan-Meier-Schätzer wird auch als so genannter Produkt-Limit-Schätzer bezeichnet. Primär dient er zum Schätzen der Wahrscheinlichkeit, dass bei einem Versuchsobjekt ein bestimmtes Ereignis innerhalb eines Zeitintervalls nicht eintritt.

Der Kaplan Meier Schätzer ist definiert durch:

$$\hat{S}(t) = \prod_{t_{(i)} \leq t} \frac{n_i - d_i}{n_i} \quad \text{mit } \hat{S}(0) = 1 \quad \text{und}$$

d_i = Versuchsobjekte bei denen das Ereignis zum Zeitpunkt $t_{(i)}$ eingetreten ist

n_i = Versuchsobjekte zum Zeitpunkt $t_{(i)}$ unter Risiko

Varianz:

Die Varianz des Schätzer kann im Intervall $t_k \leq t \leq t_{k+1}$ mittels

$$\text{var}\{\hat{S}(t)\} \approx [\hat{S}(t)]^2 \left\{ \sum_{i=1}^k \frac{d_i}{n_i(n_i - d_i)} \right\} \text{ geschätzt werden.}$$

Konfidenzintervall:

Das Konfidenzintervall lässt sich aus der Varianz bzw. dem Standardfehler berechnen.

$$\text{s.e.}\{\hat{S}(t)\} \approx [\hat{S}(t)] \left\{ \sum_{i=1}^k \frac{d_i}{n_i(n_i - d_i)} \right\}^{\frac{1}{2}}$$

Diese Formel wird auch als Greenwood's formular bezeichnet.

Das 95% KI ist somit: $[\hat{S}(t) - 1,96 \times \text{s.e.}\{\hat{S}(t)\}; \hat{S}(t) + 1,96 \times \text{s.e.}\{\hat{S}(t)\}]$

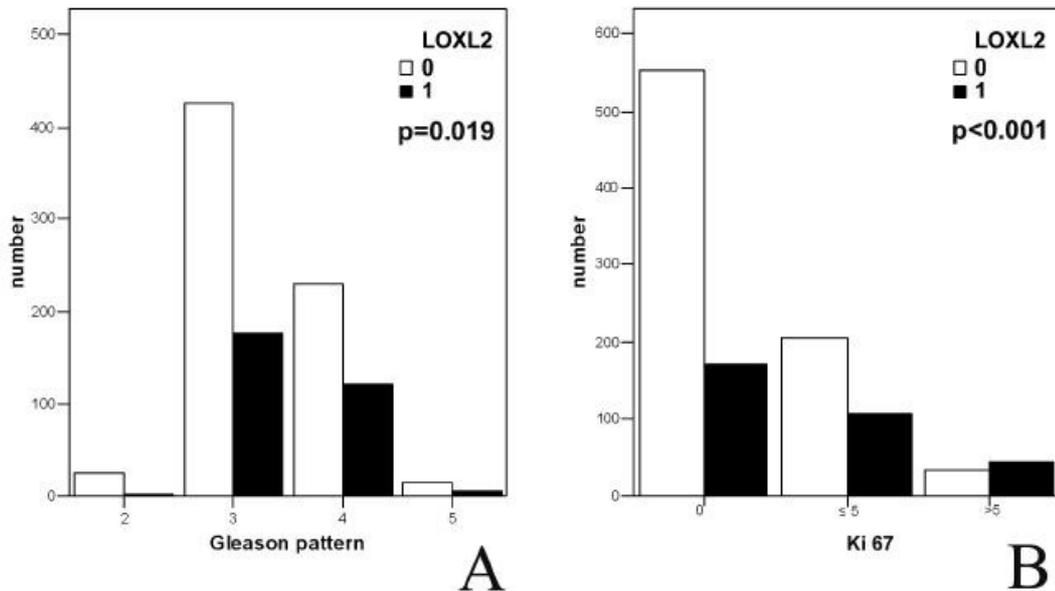


Abbildung 33 A und B: Die dargestellten Balken repräsentieren das prozentuale Verhältnis einer negativen bzw. schwachen zu einer moderaten bzw. starken Expression von LOXL2 maligner Gewebe auf dem angefertigten TMA in Beziehung zu:

A: Gleason-Score

B: Ki-67 Expression

Chi-Quadrat-Test nach Pearson

Mit dem χ^2 -Test (Chi-Quadrat-Test) untersucht man Verteilungseigenschaften einer statistischen Grundgesamtheit.

Man unterscheidet vor allem die beiden Tests:

- Verteilungstest oder Anpassungstest: Hier wird geprüft, ob vorliegende Daten einer bestimmten Verteilung entstammen.
- Unabhängigkeitstest: Hier wird geprüft, ob zwei Merkmale stochastisch unabhängig sind.

Verteilungstest:

Man betrachtet ein statistisches Merkmal x , dessen Wahrscheinlichkeiten in der Grundgesamtheit unbekannt sind. Es wird bezüglich der Wahrscheinlichkeiten von x eine, vorläufig allgemein formulierte Nullhypothese aufgestellt.

- H_0 : Das Merkmal x hat die Wahrscheinlichkeitsverteilung $F_0(x)$

Unabhängigkeitstest:

Es werden zwei statistische Merkmale x und y betrachtet, die beliebig skaliert sein können. Man interessiert sich dafür, ob die Merkmale stochastisch unabhängig sind. Es wird die Nullhypothese aufgestellt.

- H_0 : Das Merkmal x ist vom Merkmal y stochastisch unabhängig

Log-Rank-Test

Der Log-Rang-Test gehört zu den nichtparametrischen Verfahren und ist das Standardverfahren in der Überlebenszeitanalyse für Gruppenvergleiche, wie z.B. der Vergleich zweier Therapien in einer klinischen Studie. Der etwas ungewöhnliche Name Log-Rang erklärt sich daher, dass sich das Verfahren aus einem Test herleiten lässt, der auf dem Logarithmus der Ränge der Daten basiert. Der Log-Rang-Test lässt sich auch verwenden, wenn mehr als zwei Gruppen miteinander verglichen werden sollen. Hingegen werden für die gleichzeitige Untersuchung verschiedener Einflussvariablen multifaktorielle Methoden benötigt.

Der Log-Rang-Test als χ^2 -Test

Falls die Nullhypothese richtig ist, treten die Todesfälle in zufälliger Reihenfolge unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit auf. Ist eine der beiden Gruppen in ihrer Überlebenszeit der anderen überlegen, so werden die Todesfälle bei den Patienten dieser Gruppe später auftreten. Es ergibt sich dabei eine Abweichung

zwischen den Todesfällen, die tatsächlich beobachtet werden, und denen, die bei zufälliger Reihenfolge der Todesfälle erwartet werden. Diese Untersuchung des Unterschieds zwischen „beobachtet“ und „erwartet“ ist die Basisidee der meisten so genannten χ^2 -Tests. Um „beobachtet“ mit „erwartet“ vergleichen zu können, wird zunächst die Summe der beobachteten Todesfälle zu den einzelnen Zeitpunkten O1 und O2 (O für engl. „observed“) in den beiden Gruppen 1 und 2 berechnet, und anschließend in gleicher Weise die erwartete Anzahl der Ereignisse in den Gruppen 1 bzw. 2, das sind E1 bzw. E2. Zum Abschluss vergleicht man den Unterschied zwischen der beobachteten und der erwarteten Anzahl der Todesfälle gemäß der Log-Rang-Teststatistik. Diese Größe ist bei hinreichend großer Zahl der Ereignisse, d.h. Todesfälle, χ^2 -verteilt mit 1 Freiheitsgrad (Ziegler, A., 2004).

3. Ergebnisse

3.1 Analyse des Patientenkollektivs

3.1.1 Patientenkollektiv

Grundlage der durchgeführten Analysen und der daraus resultierenden Ergebnisse waren die Gewebeproben von 1122 Patienten die für die Voranalysen herangezogen wurden. Aus diesem Pool wurden nach spezifischen Auswahlkriterien 39 Gewebeproben separiert, die weiteren, spezifischeren Analysen zugeführt wurden. Diese Gewebeproben wurden zur Durchführung einer Gen-Sonden-PCR (Chromosom 8p21-22) herangezogen. Die pathohistologische Auswertung ergab, dass bei 18 der berücksichtigten 39 Patienten eine Organbeteiligung des Stadiums pT2a (n=2), sowie pT2c (n=16) vorlag. Bei 18 der berücksichtigten Patienten fand sich eine Miteinbeziehung der Organkapsel (pT3a) und bei 2 Patienten fand sich ein Einbruch des Tumorgewebes in die Strukturen der Samenblase (pT3b). Lediglich bei einem Patienten ließ sich nachweisen, dass der Tumor in weitere Nachbargewebe neben der Harnblase eingebrochen war. Dies entsprach somit dem Bewertungskriterium pT4 (UICC 2006).

Im Bezug auf die Klassifikation eines Lymphknotenbefalls des Stadiums pN1 (Regionäre Lymphknotenmetastase), ließ sich feststellen, dass dieser Befund in 4 der 18 Fälle des Stadiums pT3a, sowie im Falle des Patienten der das Stadium pT4 aufwies nachweisbar war. Alle weiteren berücksichtigten Patienten wiesen das Stadium pN0 auf.

3.1.2 Analysezeitraum

Der Beobachtungszeitraum der hier durchgeführten Arbeit betrug im Mittel 132,0 Monate (Er umfasste den Zeitraum von 1993 bis 2004).

3.1.3 Durchschnittsalter

Das Durchschnittsalter der berücksichtigten und in die Auswertung aufgenommenen Patienten lag bei 69,56 Jahren.

3.2 Grundlagen der histochemischen Analysen

3.2.1 Tissue Microarray

Als Donorblöcke wurden in Paraffin eingebettete Gewebepräparate von 1122 Patienten (Diagnosezeitraum zwischen 1993 und Juni 2004) mit nachgewiesenem, invasivem Prostatakarzinom verwendet (Abbildung 34). Die nachstehende Tabelle zeigt dabei die Verteilung der einzelnen Patientenfälle statistisch differenziert nach Tumorstadium, Lymphknotenbefall und Gleason-Score. Zudem wird in Relation zu diesen Bezugsgrößen der Prozentsatz bzw. die Anzahl positiver Testergebnisse in Bezug auf die Expression von LOXL2 dargestellt.

| | | Number(%) | Loxl pos(%) | |
|-------------|--------|--------------|-------------|--|
| | | 1122 | 322 (28.7%) | |
| Stage | pT2a-c | 471 (41.8%) | 137 (29.1%) | |
| | pT3a | 429 (38.2%) | 122 (28.4%) | |
| | 3b | 173 (15.5%) | 55 (31.8%) | |
| | pT4 | 51 (4.5%) | 8 (15.7%) | |
| | pN0 | 1041 (96.8%) | 302 (30.0%) | |
| | pN1 | 81 (7.2%) | 20 (24.7%) | |
| | | | | |
| Gleason sum | <=6 | 289 (25.9%) | 74 (25.5%) | |
| | >6 | 833 (74.1%) | 243 (29.1%) | |

Abbildung 34: LOXL2 Expression (TMA) klinisch-pathologische Charakteristiken bezogen auf die 1122 ausgewählten Patientenfälle mit nachgewiesenem, manifestem Prostatakarzinom.

Nachfolgend wurden Schnittpräparate eines jeden Donorblocks angefertigt und einer Hämatoxylin-Eosin Färbung unterzogen. Zwei zylindrische Stenzen des tumorösen Gewebes wurden nach mikroskopischer Auswertung der zuvor

angefertigten Schnittpräparate aus einem jeden Donorblock gestanzt (0,6 mm) und in einen Akzeptorblock verlagert.

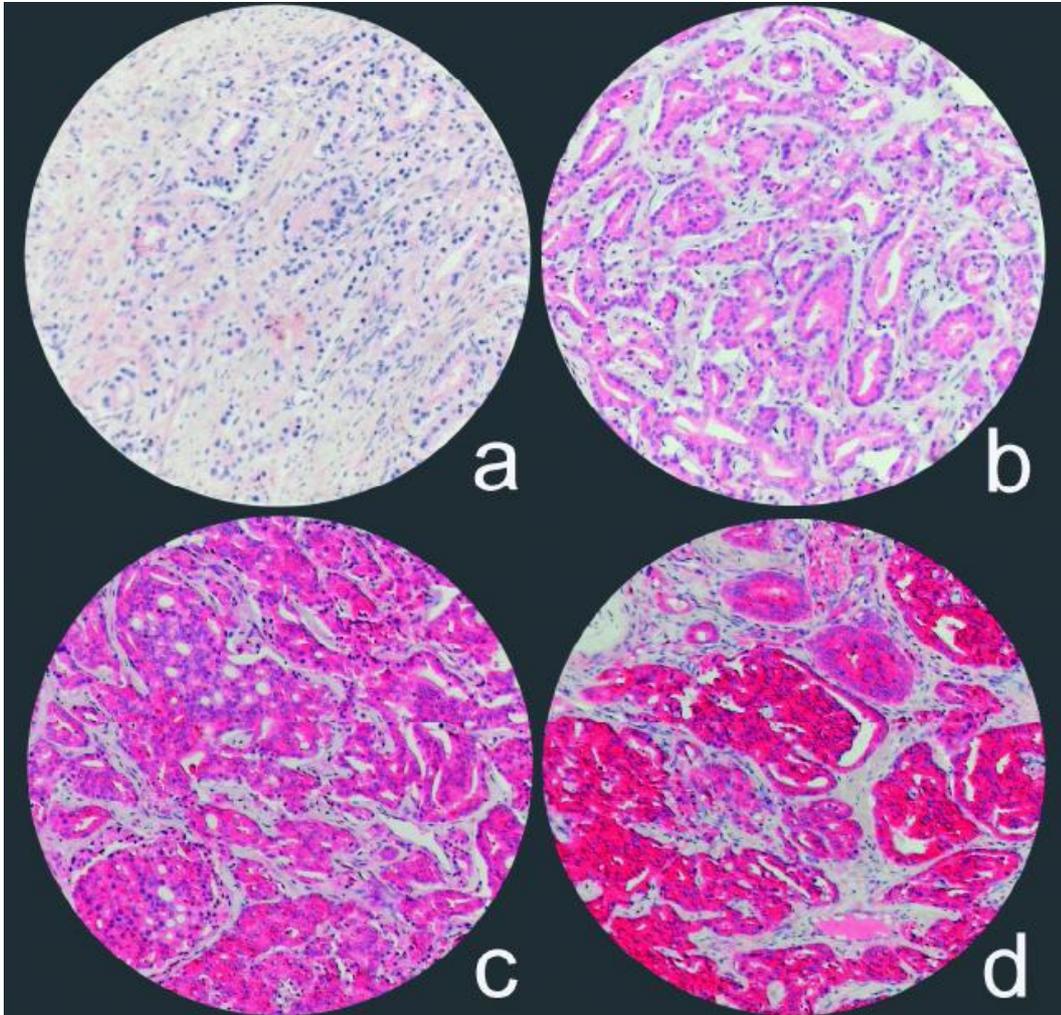


Abbildung 32: LOXL2 Immunhistochemie (10-fache Vergrößerung des TMA)

a = keine Expression

b = schwache Expression

c = moderate Expression

d = starke Expression

3.3 Analyse der Expression von LOXL2 in Relation zu den verschiedenen Gleason-Stadien sowie in Relation zur Expression von Ki-67 (MIB1)

In 28 der 39 Fälle (72%) – ausgewählt aus dem besagten Archiv von 1122 Fällen - ließ sich eine fehlende Expression von LOXL2 nachweisen. In 70% der ermittelten Fälle lag dem gewerteten Ergebnis der Analyse eine genetisch bedingte Deletion des Genbereichs zu Grunde. Ein negatives Ergebnis bei durchgeführter immunhistochemischen Untersuchung fand sich in 72% der untersuchten Fälle. Das Validisierungskollektiv wies in 50% ein negatives Ergebnis auf.

In Fällen gutartiger epithelialer Gewebeveränderung zeigte sich eine deutlich stärkere Expression von LOXL2. Bezogen auf die 1122 der ursprünglich im Rahmen der Auswertung berücksichtigten Fälle stellte sich eine derartig starke Überexpression des Markers lediglich in 27,8% dar.

In Fällen einer erhöhten LOXL2 Expression zeigte sich zudem eine hoch signifikante Korrelation zur Expression des Markers Ki-67 (MIB1) (>5%, bzw. $p < 0,001$). Zudem zeigte sich eine rückbeziehbare Korrelation in Fällen eines hohen Gleason-Score ($p = 0,019$).

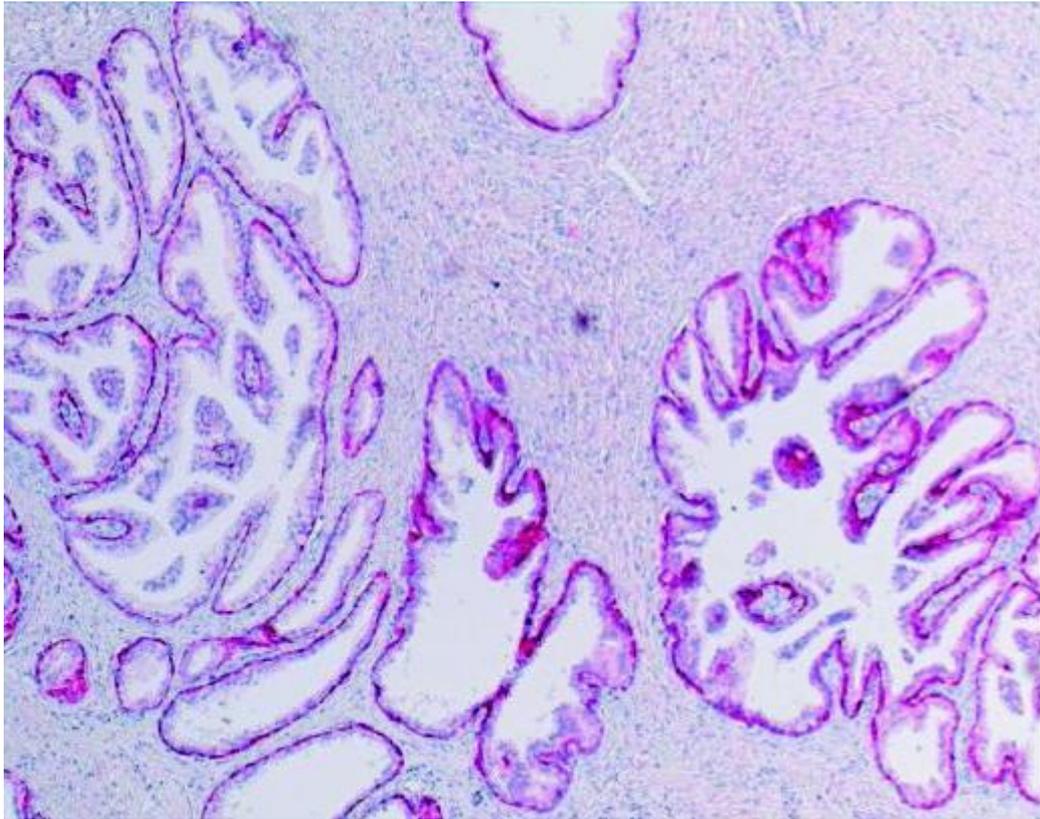


Abbildung 35: LOXL2 Immunhistochemie (5-fache Vergrößerung)

Starke Expression von LOXL2 in den Basalzellen nicht maligner, gutartiger Prostatahyperplasie.

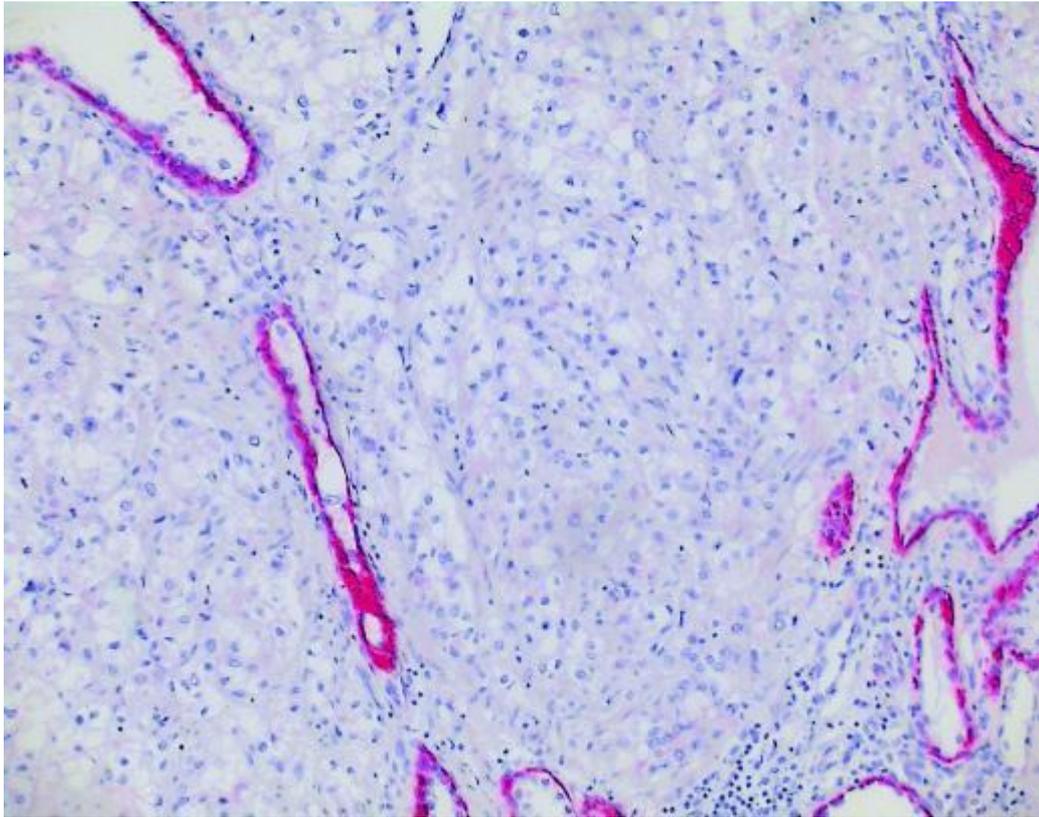


Abbildung 36: LOXL2 Immunhistochemie (10-fache Vergrößerung)

Starke Expression von LOXL2 in den Basalzellen residualer, atrophischer Prostatadrüsenanteile, in Kontrast zu vollständig negativen, umgebendem malignem Gewebe.

3.4 Analyse der Zytobande 8p21-22

Die Zytobande 8p21-22 zeigte eine außergewöhnlich hohe Frequenz von genetischen Verlusten. Aus dieser Tatsache wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass in diesem Bereich mehrere Gene lokalisiert sind, die als Tumorsuppressorgene fungieren könnten. Besonders dem Leucin zipper putative tumor suppressor (LZTS1) oder dem NK3 transcription factor (NKX3A), die verschiedene Rollen in der Karzinogenese bzw. Tumorprogression spielen wurde hierbei Bedeutung zugeordnet. (Bookstein, R. et al., 1997; Bowen C. et al., 2000; Oba, K. et al., 2001).

Eigene Mikrosatellitenanalysen auf 8p21-22 an multifokalen Prostatakarzinomen und dazu korrespondierenden zirkulierenden Tumorzellen verdeutlichten im Resultat für die Marker D8S258 mit 79% und NEFL mit 86% aller untersuchten Fälle eine hohe Alterationsfrequenz, wobei nur selten beide Marker im gleichen Tumor betroffen waren (Schmidt, H. et al., 2006).

3.5 Ergebnisse nach statistischer Analyse

Es ließ sich eine Reminiszenz zwischen den Expressionswerten und den ermittelten Werten der Immunkomplexreaktionen des Cytokeratinkomplexes 5/6 nachweisen.

Der Markerenzymkomplex zeigt eine verstärkte Expression in den epithelialen Basalzellstrukturen benigner Prostatagewebe. Keinerlei Expression besagter Komplexe fand sich jedoch in Fällen maligner Prostatagewebeprobe (Abrahams, N.A. et al., 2002).

Bezogen auf die untersuchten 39 Patientenfälle blieb in 19 der untersuchten Fälle eine Expression von LOXL2 vollständig aus (Abbildung 36), in 17 der Fälle zeigte sich eine lediglich schwache Expression und in 3 Fällen stellte sich die Expression in einem moderaten (mittleren) Bereich dar.

Die durch die beschriebenen Vorgehensweisen gewonnenen und als Grundlage genutzten Daten (Schmidt, H. et al., 2006) zeigten hervorragende Übereinstimmungen in Bezug auf die ermittelten genetischen Daten.

In malignen, tumorreichen Gewebeprobe die Deletionen aufweisen, bzw. bei denen ein solches Phänomen nachweisbar war zeigte sich lediglich eine schwache (n=10) oder keine (n=14) LOXL2 Protein Expression. Tumorreiches Gewebe bei welchem sich keinerlei Deletionsphänomen nachweisen ließ, zeigte Variabilität in Bezug auf die Expression des LOXL2 Proteins. In 5 der untersuchten Fälle fehlte jedwede Expression (negative, n=5), in 7 der untersuchten Fälle fand sich eine schwache Expression (n=7) und in 3 der berücksichtigten Fälle lag eine moderate Expression des LOXL2 Proteins vor (n=3).

Immunhistochemische Untersuchungen von TMAs der bereits angesprochenen 1122 unabhängigen Patientenfälle (Abbildung 32) bestätigten die ermittelten Daten (Abbildung 34).

Eine starke oder moderate Expression von LOXL2 ließ sich in 27,8% der untersuchten Fälle nachweisen. Des Weiteren fand sich eine signifikante Verknüpfung zwischen einer schwachen LOXL2 Expression und einer niedrigen Ki-67 (MIB1) Expression ($p < 0,001$).

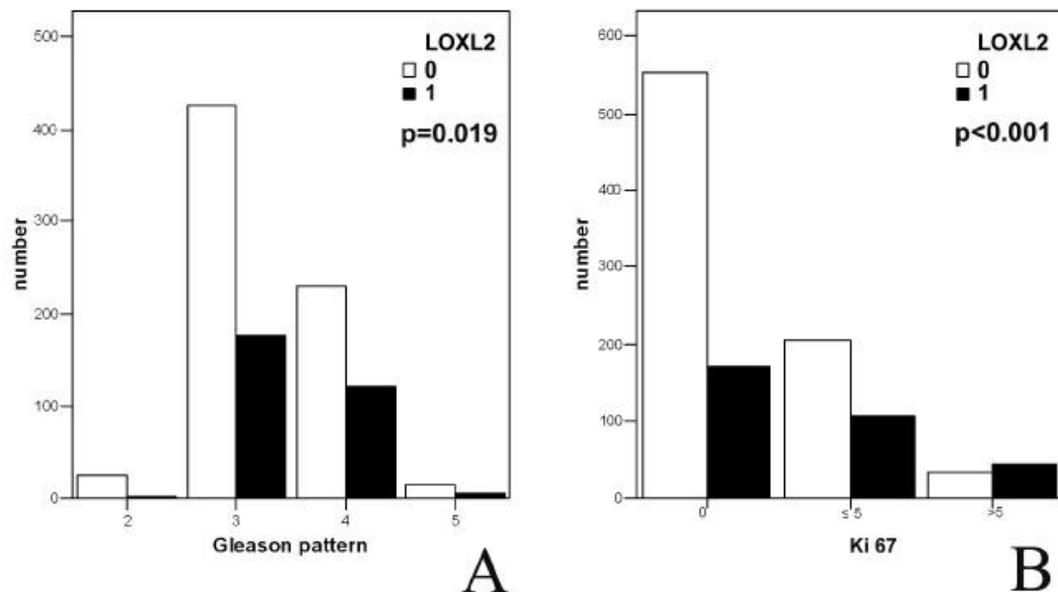


Abbildung 33 A und B: Die dargestellten Balken repräsentieren das prozentuale Verhältnis einer negativen bzw. schwachen zu einer moderaten bzw. starken Expression von LOXL2 maligner Gewebe auf dem angefertigten TMA in Beziehung zu:

A: Gleason-Score

B: Ki-67 Expression

Zudem ließ sich eine weitere signifikante Korrelation zwischen einer erhöhten Expression von LOXL2 und hohen Wertebereichen des Gleason-Score im untersuchten TMA-Spot dieser Arbeit nachweisen ($p=0,019$).

Dargestellt in Abbildung 33 B.

Im Gegensatz dazu ließen sich in Bezug auf die Ausprägung und den Wertebereich des TNM-Stadiums und die Gesamtsumme des Gleason-Score keine signifikanten Korrelationen ermitteln.

Betrachtet man zudem abschließend noch die maximalen Expressionslevel der beiden Spots eines jeden Patienten, so ergibt sich hierbei eine Gesamtexpression (Score 2-3) in 49,8% der Fälle. Ein Fehlen der LOXL2 Expression zeigt weiterhin eine relativ frühere Wahrscheinlichkeit für ein PSA-Rezidiv.

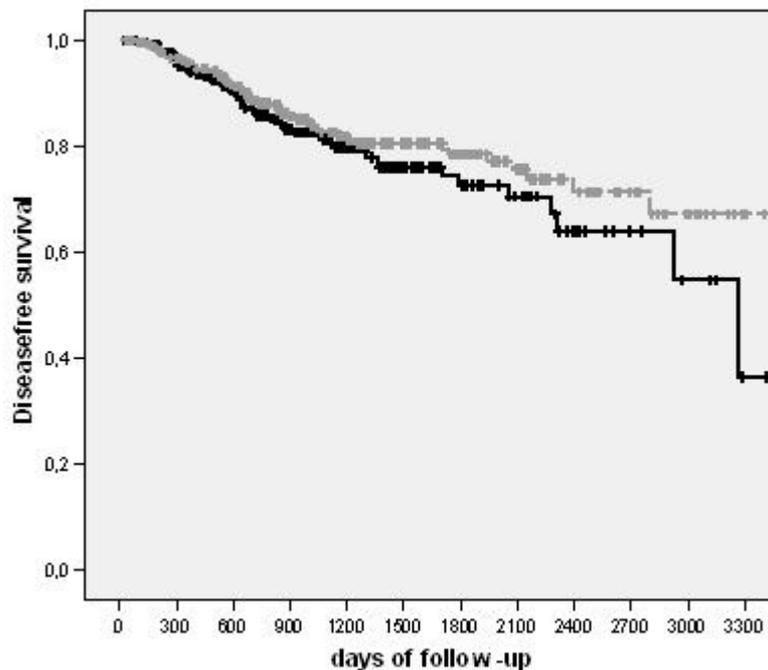


Abbildung 37: Darstellung des PSA rezidivfreien Überlebens in Relation zum ermittelten Zeitintervall. Graphische Darstellung nach Analyse mittels des Kaplan-Meier-Schätzers.

Graue Kurve: LOXL2 positiv

Schwarze Kurve: LOXL2 negativ

Mit Hilfe von SNP basierten Genchipexperimenten ließ sich somit bestätigen, dass auf 8p21-p23.2 ein „Mutations-hot-spot“ existiert (Dumur, C.I. et al., 2003; Lieberfarb, M.E. et al., 2003; Schmidt, H. et al., 2006). Viele Kandidatengene wie LZTS1 (Hawkins, G.A. et al., 2002; Ishii, H. et al., 2001) und NKX3A (Steadman, D.J. et al., 2000) wurden als relevante Gene für die Progression des Prostatakarzinoms eruiert und diskutiert (Swalwell, J.I. et al., 2002). Unter Verwendung des Verfahrens der Gendosis-PCR konnten auf 8p21-22 mehrere, genauer gesagt drei voneinander deutlich getrennte Deletionsintervalle

(Abbildung 38) nachgewiesen werden (Schmidt, H. et al., 2007), wobei gehäuft Deletionen der genannten Gene LZTS1 und NKX3A detektiert werden konnten.

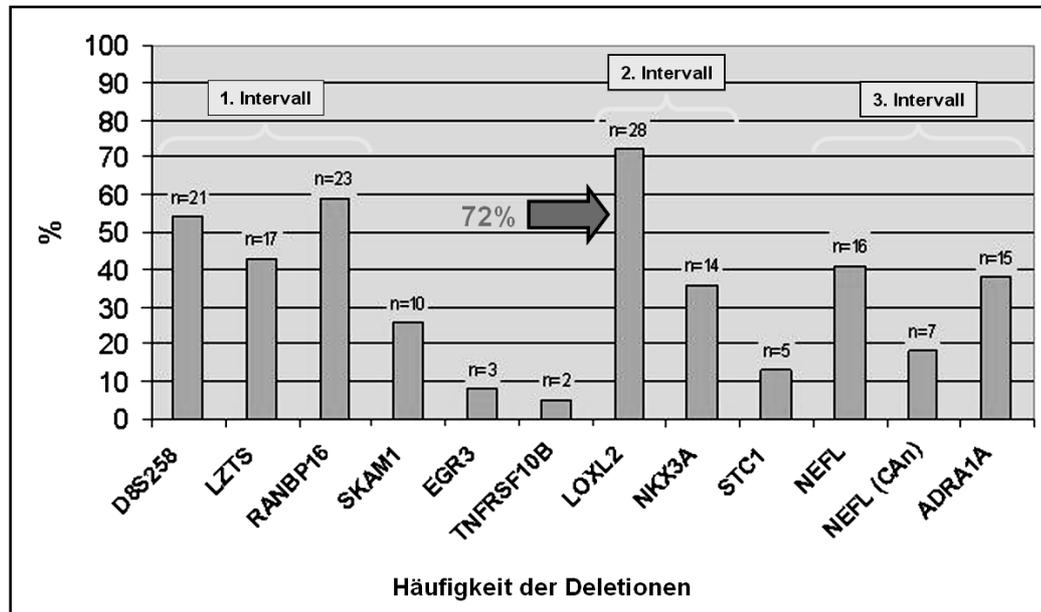


Abbildung 38: Häufigkeit von Deletionen bei 39 Patienten mit einem Prostatakarzinom auf 8p21-22 (Schmidt, H. et al., 2007)

Im zweiten Deletionsintervall wurde mit LOXL2, welches eine Deletionsrate von 72% aufwies und somit am häufigsten deletiert war, ein neues Kandidatengenes für das Prostatakarzinom nachgewiesen. Dieser genetische Verlust von LOXL2 konnte in dieser Arbeit auf Proteinebene verifiziert werden.

4. Diskussion

4.1 Validität von TMAs

Aufgrund der Tatsache, dass zahlreiche Varianten von Tumoren eine fokal unterschiedliche Morphologie aufweisen, und dem Umstand, dass ein TMA (Tissue Microarray) sich aus einzelnen, kleinen Proben zusammensetzt, die jeweils nur einen kleinen Ausschnitt des untersuchten Tumors zeigen, stellt sich unweigerlich die Frage nach der Validität des angesprochenen Verfahrens.

Unter anderem stellt sich die Frage, ob Studien, in denen dieses Verfahren Anwendung fand, die bisher auf konventionellem Wege gewonnenen Ergebnisse widerspiegeln. Ebenso steht in diesem Zusammenhang die Frage im Raum, wie klein ein Spot gewählt werden darf, ohne dass er seine Aussagekraft über das Ursprungsgewebe verliert. In zahlreichen Abhandlungen finden sich Aussagen zu diesen Fragestellungen.

So gelang es Schraml et al. in einer Multitumor Microarray Studie aufzuzeigen, dass 92% der bekannten Genveränderungen nachweisbar sind. Voraussetzung hierfür ist jedoch eine Mindestmenge an Proben die einen Wert von 25 nicht unterschreiten darf (Schraml, P. et al., 1999).

Moch et al. gelang es in einem Vergleichsverfahren von konventionellen Gewebeanalysen des Mammakarzinoms und aus gleichen Gewebeproben gewonnenen Micorarrayanalysen aufzuzeigen, dass die auf Microarraybasis gewonnenen Ergebnisse sich nicht signifikant von den auf konventionellem Wege gewonnenen Ergebnissen unterscheiden (Moch, H. et al., 2001).

Die Expressionswerte von ER (estrogene receptor), PR (progesteron receptor) (IHC), sowie die Her-2/neu Amplifikation (FISH) in Fällen manifester Mammakarzinome flossen in eine Studie von Skacel et al. ein. Dabei wurde ein Vergleich der Ergebnisse die auf konventionellem und der Ergebnisse die durch Analyse eines TMA gewonnen wurden vorgenommen. Im Anschluss an die Auswertung konnte aufgezeigt werden, dass sich die Ergebnisse bezüglich des ER-, PR-Status und der Her 2/neu-Amplifikation zu 100% deckten. Bei einem direkten Vergleich der Prozentsätze an ER- und PR-positiven Zellen wichen die

am TMA gewonnen Werte in 90% der Proben nur um 10-20% von den Werten ab, die an großen Gewebeproben gewonnen wurden (Skacel, M. et al., 2002).

In anderen Studien, die sich ebenfalls mit der Validität von Tissue Microarrays anhand Analyse von Mammakarzinomen, sowie ER, PR und HER-2 Onkoproteinen befassten, ließen sich ähnliche Ergebnisse erzielen. Die Konkordanz bewegt sich in einem Bereich zwischen 90% und 95% (Torhorst, J. et al., 2001; Gillet, J.E. et al., 2000; Camp, R.L. et al., 2000).

In einer Studie von Kononen et al. wurden die Häufigkeiten von Her-2/neu, c-myc-, Cyclin-D1- und 17q23-Amplifikationen in Fällen nachgewiesener Mammakarzinome mittels TMA untersucht. Dabei wurden den in der Literatur vergleichbare Ergebnisse nachgewiesen (Kononen, J. et al., 1998).

Hoos et al. untersuchten in einer Studie 59 Fibroblastome auf die Expression von Ki-67 und p53. Zudem war Ziel dieser Studie einen Nachweis des Proteins vorweisen zu können, welches durch das Retinoblastom-(RB)Gen codiert wird (pRB). Die Konkordanz lag für Ki-67 und p53 zwischen 96% und 98%. Voraussetzung hierfür war jedoch, dass pro Tumor drei Biopsien verwendet wurden. Für pRB wurde eine Konkordanz von 91% ermittelt (Hoos, A. et al., 2001).

In einer weiteren Studie, durchgeführt von Sallinen et al. wurde die Häufigkeit des Auftretens von p53 in einem Microarray Verfahren (TMA) mit den Daten und Ergebnissen, die bei Analyse konventionell untersuchter Gewebeproben gewonnen wurden, verglichen. In besagtem Fall konnte eine Übereinstimmung der beiden Verfahrensweisen nachgewiesen werden (Sallinen, S.L. et al., 2000).

Auch Mucci et al. die sich mit der Validität von TMAs in Bezug auf verschiedene Formen des Prostatakarzinoms befassten, konnten keine signifikanten Abweichungen bei Vergleich der Analysedaten aufzeigen, die bei Auswertung von TMAs und bei Auswertung konventioneller, großer Gewebeproben gefunden wurden (Mucci, N.R. et al., 2000).

Die Validität der Ergebnisse des TMA-Verfahrens wird durch den Durchmesser der Gewebebiopsien und das Array-Design maßgeblich beeinflusst. Insbesondere bei Erfassung heterogener Gewebe lassen sich im Allgemeinen zwei Strategien

aufzeigen, um das zu untersuchende Gewebe möglichst repräsentativ erfassen zu können.

Die erste der beiden Strategien bzw. Möglichkeiten besteht in der Vergrößerung des Biopsiedurchmessers, wodurch eine Steigerung der Repräsentativität erzielt werden kann. Die zweite Möglichkeit besteht in der Erhöhung der Anzahl der aus einer Gewebeprobe gewonnen Biopsien. Auch auf diesem Wege lässt sich die Repräsentativität steigern.

Bubendorf et al. begannen ihre Untersuchungen mit Biopsiedurchmessern von 3mm. Auf diesem Wege wurde versucht das Ziel des Erhalts der Aussagekraft trotz Analyse heterogener Gewebe zu erreichen (Bubendorf, L. et al., 2001).

Skacel et al. verglichen die Aussagekraft von TMAs bei unterschiedlichen Biopsiedurchmessern und unterschiedlicher Anzahl von Biopsien pro Gewebeprobe. Ein TMA wies dabei ein Design auf, bei welchem jeweils zwei Biopsien, deren Durchmesser 1,5 mm betrug nebeneinander lagen. Ein zweiter TMA enthielt drei Biopsien, mit einem Durchmesser von jeweils 0,6 mm. Im Rahmen der von Skacel durchgeführten Studie wurden 25 Fälle eines manifesten Mammakarzinoms auf die Expression von ER, PR sowie die Amplifikation von her-2/neu untersucht.

In Bezug auf den ersten angefertigten TMA, in welchem die Biopsien einen Durchmesser von 1,5 mm aufwiesen ließen sich von den 50 angelegten Cores alle bis auf 3 auswerten und analysieren. 2 Cores gingen während des Schneidens verloren. Ein weiterer Core ließ aufgrund fehlerhafter Stanze keine Analyse zu. Insgesamt lag der Core-Verlust bei 6%. Aufgrund der Tatsache, dass aber von jeder ursprünglich ausgewählten Gewebeprobe mindestens ein Core erhalten blieb, lag die Auswertungs- und Verwertungsquote bei 100%.

Von den 75 angelegten Cores mit einem Durchmesser von 0,6 mm gingen insgesamt 6 verloren. Dabei kam es zum Verlust von zwei Cores während des Schneidens. Vier weitere Cores gingen während des Stanzens verloren. Die Gesamt-Coreverfügbarkeit lag somit bei einem Wert von 91%. Im Falle der Cores mit einem Durchmesser von 0,6 mm ging aber letztendlich nur ein Fall vollständig verloren. In besagtem Fall waren alle drei angefertigten Cores nicht auszuwerten bzw. für weitere Analysen zu verwenden. In allen weiteren Fällen

waren stets mindestens zwei der drei angelegten Cores für Analysezwecke zu verwenden. Es ergab sich somit eine Verwertungsquote von 96%.

Die Auswertung der TMAs mit unterschiedlichen Core-Durchmessern bzw. der Vergleich der gewonnenen Analysedaten zeigten keine signifikanten Abweichungen. Es fand sich vielmehr eine 100% Übereinstimmung in Bezug auf die Expression von ER, PR und die Amplifikation von Her-2/neu. In einem weiteren Schritt wurden die gewonnenen Daten zu Ergebnissen in Relation gesetzt, die bei Analyse großer Gewebeproben gewonnen wurden. Auch hier ließen sich keine signifikanten Abweichungen aufzeigen. Abschließend konnte aus den gesammelten Daten der Schluss gezogen werden, dass ein Biopsiedurchmesser von 0,6 mm adäquat die Expression und Amplifikation der in der Untersuchung betrachteten Marker wiedergibt. Lediglich die Gefahr eines Coreverlusts ist bei einem gewählten Durchmesser von 0,6 mm größer als bei gewähltem größerem Durchmesser (Skacel, M et al., 2002).

Letztendlich zeichnet sich in allen betrachteten Literaturstellen eine Meinung dahingehend ab, dass der Einsatz von TMAs besonders gut dazu geeignet ist große Stückzahlen von Gewebeproben auf die Expression von Markern zu untersuchen. Sollten sich nach dieser Screeninguntersuchung einzelne Marker als besonders relevant herausstellen, so können diese in weiteren, konventionellen Analyseverfahren genauer und weitergehend untersucht werden (Skacel, M. et al., 2002; Kallioniemi, O.P. et al., 2001; Bubendorf, L. et al., 2001; Moch, H. et al., 2001).

4.2 Ergebnisse in Betrachtung zu den angewandeten Methoden und in Relation zu bisherigen Publikationen

Dieser Promotionsarbeit baut auf den Ergebnissen vorhergehender Untersuchungen mittels quantitativer Gendosis Polymerase-Kettenreaktion (gene dosage PCR) auf. Dieses Verfahren diene primär der genetischen Feinstkartographie, im hier vorliegenden Fall speziell unter dem Gesichtspunkt der Fragestellung nach Ermittlung bestehender Deletionen und dem Nachweis dieser über entsprechend ermittelbare Expressionswerte.

Im Rahmen der Voruntersuchungen wurde der Schwerpunkt der Analysen bzw. das primäre Interesse auf den DNA-Strangbereich zwischen den Mikrosatellitenmarkern D8S258 und NEFL gelegt. Diese sind im Subbereich p21-22 des Chromosoms 8 lokalisiert.

Bei jedem der beiden besagten Mikrosatellitenmarker, die rein cytogenetisch eine enge Lagebeziehung zueinander aufweisen, ließen sich in Gewebeproben von Patienten bei denen das Vorliegen eines Prostatakarzinoms klar nachzuweisen war, zahlreiche Deletionen nachweisen.

Veränderungen im Bereich der Chromosomenstruktur, spezifisch Deletionen im Bereich verschiedener Genloci werden eine bedeutende Rolle in Bezug auf die Karzinogenese der verschiedenen Formen des Prostatakarzinoms zugeschrieben (Dong, J.T. et al., 2001). Neben sich häufig wiederholenden Deletionen in Bereichen des langen Chromosomenarmes (10q und 17q), fand sich eine wiederholt auftretende Deletion im Bereich des kurzen Armes (p21-22) des Chromosoms 8 (Gelman, E.P. et al., 2003; MacGrogan, D. et al., 1994; Matsuyama, H. et al, 1994; Haggman, M.J. et al., 1997).

Verluste in Allelbereichen des Chromosoms 8 wird zudem Bedeutung bei der Entstehung und Progression anderer Tumorerkrankungen, z.B. verschiedenen Formen der Mamma- oder Colorektalkarzinome zugeschrieben (Fujiwara, Y. et al., 1993; Birnbaum, D. et al., 2003). Theorien besagen, dass einzelne Tumorsuppressorgene (z.B. FEZ1 – kartographisch dem Chromosom 8

zuzuordnen), sowie weitere unbekannte Gene eine entscheidende Rolle sowohl in Karzinogenese als auch in Progression des Prostatakarzinoms spielen (Bookstein, R. et al., 1997; Oba, K. et al., 2001).

Analysemethoden deren Grundlage Mikrosattelitenauswertungen des Chromosoms 8, spezifisch des Anteiles p21-22 waren (Swalwell, J.I. et al., 2002), führten zu der Schlussfolgerung das Deletionsbereiche in Fällen manifester Prostatakarzinome in den angrenzenden genetischen Bereichen auftreten.

Unter Verwendung der beschriebenen Analyseverfahren zeigte sich eine derartige Abweichung im Bereich der Marker D8S258 und NEFL (neurofilament light chain gene), lokalisiert auf dem Chromosomenanteil p21-22 des Chromosoms 8. Diese tritt jedoch relativ selten auf. Zwecks weiterer Untersuchungen der besagten Chromosomenanteile wurde eine Echtzeit PCR (polymerase chain reaction) eingeleitet (5'-nuclease-assay). Hintergrund war der Versuch des Nachweises von 10 einzelnen Markerenzymen, die auf das Vorhandensein verschiedener Nukleotid-Polymorphismen Hinweis geben sollten.

Berücksichtigt wurden hierbei die Gene: LZTS1, RANBP16, SCAM-1, EGR3, TNFRSF, LOXL2, NKX3A, STC1 und ADRA1A.

In der Literatur finden sich zahlreiche Angaben und Beschreibungen zu bzw. über die potentielle Existenz zweier oder mehrerer Tumor Suppressorgene im Bereich des kurzen, also p-Arms (p21-22) des Chromosoms 8. Vergleichende genetische Hybridisierungsanalyseverfahren ließen deutlich erkennen, dass Abweichungen auf chromosomaler Ebene im angesprochenen Bereich zu den am häufigsten auftretenden Ereignissen in Bezug auf die Progression und Entwicklung eines Prostatakarzinoms gehören (Chu, L.W. et al., 2003). Diese Abwegigkeiten ließen sich bereits in frühen Progressionsstadien der Karzinomentwicklung nachweisen (Wolter, H. et al., 2002).

Die Ergebnisse die aus den Analysedaten der durchgeführten SNP Microarray genomweiten Scan-Verfahren, in Bezug auf die Möglichkeit des Nachweises von LOH bei Fällen manifester Prostatakarzinome gewonnen werden konnten

(Lieberfarb, M.E. et al., 2003; Dumur, C.I. et al., 2003), deuteten auf einen hochgradig für Mutationen anfälligen Bereich des kurzen Armes (p21-p23.2) des Chromosoms 8 hin.

Verschiedensten Schlüsselgenen u.a. LZTS-1 (Ishii, H. et al., 1999; Hawkins, G.A. et al., 2002) oder NKX3A (Steadman, D.J. et al., 2000) wurden entscheidende Rollen in Bezug auf die Progression des Prostatakarzinoms zugesprochen (Swalwel, J.I. et al., 2002).

Bei NKX3.1 handelt es sich um ein androgen reguliertes „homeobox Gen“, das primär in den Drüsensystemen der Prostata exprimiert wird (Gelman, E.P. et al., 2003; Ornstein, D.K. et al., 2001; Gelman, E.P. et al., 2003). Es ist dazu in der Lage die transkriptionale Aktivierungsfunktion des „prostate derived Ets factors“ (PDEF) auf dem Prostata-spezifischen Antigen (PSA) zu unterbinden (Chen, H. et al., 2002). Nichts desto weniger postulierten Chen et al. (Chen, H. et al., 2002), dass der alleinige Verlust von NKX3A nicht allein einen suffizienten Hinweis darauf bedingt, dass durch diesen Verlust die Induktion eines Prostatakarzinoms begünstigt bzw. induziert wird.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ermittelt werden, dass in fast allen berücksichtigten Fällen ein simultaner Verlust von NKX3A vorlag, wenn auch eine Deletion bei LOXL2 zu verzeichnen war. LOXL2 stellte das am häufigsten von Deletionen betroffene Gen in Fällen nachgewiesener Prostatakarzinome dar (72% der Fälle).

Um die Konsequenz einer solchen Deletion des LOXL2 Gens für die Entstehung und Progression eines Prostatakarzinoms bewerten zu können, wurden immunhistochemische Untersuchungen zur Validierung der genetischen Veränderung im Vergleich mit benignen Gewebe an Gewebeproben von Patienten mit Prostatakarzinom vorgenommen. Die dabei gewonnen Analysedaten und Ergebnisse bestätigten die gewonnen genetischen Daten.

Die Expression von LOXL2 lässt sich verstärkt in den basalen Zellanteilen gutartiger Prostatagewebe verzeichnen. Im Gegensatz dazu ist die Expression des

Proteins LOXL2 in den Zellen maligner Prostatagewebe, die eine Deletion des Gens aufweisen, deutlich geringer.

Fälle nachgewiesener Prostatakarzinome, die eine Deletion aufwiesen, zeigten eine deutliche Reduktion der LOXL2 Proteinexpression. Hingegen ließ sich in Fällen ohne nachgewiesene Deletion eine solche Reduzierung der LOXL2 Expression nicht oder nur in sehr geringem Maße nachweisen.

In Zusammenfassung lässt sich sagen, dass die gewonnenen Proteinexpressionsdaten darauf hindeuten, dass weitere Regulationsmechanismen, abweichend von der angesprochenen Deletion des LOXL2 Gens vorliegen. Diese Regulationsmechanismen sind ebenso wie die besagte Deletion des LOXL2 Gens dazu befähigt eine signifikante Unterdrückung der LOXL2 Expression herbei zu führen.

Das Protein LOXL2 gehört zu einer heterogenen Familie kupferabhängiger Enzyme. Diese Enzymfamilie ist in der Lage durch katalytische Funktion eine Quervernetzung zwischen Kollagen und Elastin in der extrazellulären Matrix zu erzielen (Csiszar, K. et al., 2001; Jourdan-Le Saux, C. et al., 1999; Hein, S. et al., 2001).

Des Weiteren lassen sich hohe Konzentrationen dieser Substanzgruppe in hochgradig reproduktiven Gewebeformen nachweisen, z.B. in den Geweben der Plazenta und des Uterus. Es besteht eine nachgewiesene Beziehung zwischen erhöhten Expressionswerten des Proteins LOXL2 und einer verstärkten Metastasierungsneigung in Untersuchungen verschiedener Mammakarzinom-Zelllinien (Kirschmann, D.A. et al., 2002).

Akiri et al. (Akiri, G. et al., 2003) beschreiben eine extrem hohe Expression von LOXL2 (LOR-1) in hoch malignen Zellformen wenig bis nicht differenzierter Mammakarzinome. Diese Ergebnisse wiesen die verstärkte Expression insbesondere in Fällen eines Typ III Karzinoms nach, wohingegen Karzinome des Typs I keine verstärkte Expression von LOXL2 erkennen ließen.

Ergebnisse die aus Analysedaten squamöser Hals- und Nackenkarzinome gewonnen wurden, unterstützen die Annahme, dass LOXL2 eine entscheidende Rolle in der malignen Transformation verschiedener Gewebetypen spielt. Des

Weiteren deutet eine starke Expression von LOXL2 auf das Vorliegen eines invasiven Phänotyps hin (Rost, T. et al., 2003).

Der malignen Entartung von Prostatageweben liegt vermutlich eine wesentlich komplexere Basis zu Grunde. In besagtem Falle ließ sich bei 72% der untersuchten Fälle eine Deletion und in 49,8% eine immunhistochemische Suppression des LOXL2 Gens der untersuchten Patienten nachweisen.

Bezogen auf die maximalen Expressionslevel von LOXL2 (in dieser Studie jeweils an zwei Spots eines jeden Patienten untersucht) zeigte sich eine Gesamtexpression (Score 2-3) in 49,8% der Fälle. Die Korrelation zwischen LOXL2 und MIB1 als auch erhöhtem Gleason-Score bestätigt die Ergebnisse der Literatur, die auf eine erhöhte Metastasierungsneigung (Kirschmann, D.A. et al., 2002) oder eine schlechte Differenzierung bei Überexpression hinweisen (Akiri, G. et al., 2003). Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen zeigt sich in den Follow-up-Daten, dass eine fehlende LOXL2 Expression eine frühe Wahrscheinlichkeit für ein PSA-Rezidiv bedingt.

4.3 Abschließende Betrachtung

Immunhistochemische Untersuchungen die die Expression von LOXL2 umfassten und deren Basis TMAs, die aus Gewebeproben von 1122 Patienten, mit nachgewiesenem, manifestem Prostatakarzinom angefertigt wurden darstellten, führten zu dem Ergebnis, dass eine Übereinstimmung zwischen den gewonnenen Daten im Bezug auf das Prostatakarzinom und Daten die in Bezug auf andersartige Tumore gewonnen werden konnten, bestand. Zudem ließen sich Bezüge zwischen dem Grad der Expression von LOXL2 und dem jeweils vorliegenden Grading nach Gleason aufzeigen. Karzinome, die moderate oder starke LOXL2 Expression aufwiesen (28,2% aller untersuchten Fälle), wiesen einen signifikant höheren Wert in Bezug auf einen erhöhten Gleason-Score auf, als Karzinome mit geringer oder keiner vorhandenen Expression von LOXL2.

Zudem ließ sich ein signifikant erhöhter Wert der Expression von Ki-67 in Fällen einer LOXL2 Überexpression nachweisen. Die gewonnenen Daten führen letztendlich zu der Schlussfolgerung bzw. dem Ergebnis, dass LOXL2 nicht zwangsläufig als Tumor-Suppressor betrachtet werden sollte. Nichts desto weniger führt die Verminderung der Expression, bzw. die Herabregulation der Aktivität des LOXL2 Gens zu einer frequenzspezifisch verknüpften, malignen Transformation des Prostata-drüsengewebes. Es lässt sich somit die Hypothese aufstellen, dass der Verlust von LOXL2 zu den klinisch häufig beobachteten, langsam fortschreitenden Phänotypen des Prostatakarzinoms beiträgt. Im Gegensatz zu den angesprochenen und dargestellten Punkten deuten die gewonnenen Daten zudem darauf hin, dass Tumoren, die einen Verlust der Expression von LOXL2 in beiden voruntersuchten Tumorarealen zeigen, ein früheres PSA-Rezidiv und damit eine ungünstige Prognose vorweisen.

5 Literaturverzeichnis

1. **Abrahams NA, Ormsby AH, Brainard J** (2002) Validation of cytokeratin 5/6 as an effective substitute for keratin 903 in the differentiation of benign from malignant glands in prostate needle biopsies. *Histopathology*, 41: 35-41
2. **Ackermann R, Altwein JE, Faul P** (1991) Aktuelle Therapie des Prostatakarzinoms. *Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York Toronto*
3. **Adolfsson J, Carstensen J, Lowhagen T** (1992) Deferred treatment in clinically localised prostatic carcinoma. *Br J Urol*, 69(2): 183-7
4. **Akiri G, Sabo E, Dafni H, Vadasz Z, Kartvelishvily Y, Gan, N, Kessler O, Cohen T, Resnick M, Neeman M, Neufeld G** (2003) Lysyl oxidase-related protein-1 promotes tumor fibrosis and tumor progression in vivo. *Cancer Res*, 63: 1657-1666
5. **Alken P, Eble M, Schmoll J** (08.08.2005) http://www.dkfz-heidelberg.de/tzhdma/tr21.htm#INH_I2
6. **Barlund M, Forozan F, Kononen J, Bubendorf L, Chen Y, Bittner ML, Torhorst J, Haas P, Bucher C, Sauter G, Kallioniemi OP, Kallioniemi A** (2000) Detecting activation of ribosomal protein S6 kinase by complementary DNA and tissue microarray analysis. *J Natl Cancer Inst*, 92(15): 1252-9
7. **Bernstein J, Churg J** (1992) Urinary tract pathology. An illustrated practical guide to diagnosis. *Raven Press (New York)*

8. **Birnbaum D, Adelaide J, Popovici C, Charafe-Jauffret E, Mozziconacci MJ, Chaffanet M** (2003) Chromosome arm 8p and cancer: a fragile hypothesis. *Lancet Oncol*, 4: 639-642
9. **Bolla M, Gonzalez D, Warde P, Dubois JB, Mirimanoff RO, Storme G, Bernier J, Kuten A, Sternberg C, Gil T, Collette L, Pierart M** (1997) Improved survival in patients with locally advanced prostate cancer treated with radiotherapy and goserelin. *N Engl J Med*, 337(5): 295-300
10. **Bolla, M** (2002) Long-term results with immediate androgen suppression and external irradiation in patients with locally advanced prostate cancer (an EORTC study): a phase III randomised trial. *Lancet*, 360(9327): 103-6
11. **Bookstein R, Bova GS, MacGrogan D, Levy A, Isaacs WB** (1997) Tumoursuppressor genes in prostatic oncogenesis: a positional approach. *Br J Urol*, 79 Suppl 1: 28-36
12. **Bowen C, Bubendorf L, Voeller HJ, Slack R, Willi N, Sauter G, Gasser TC, Koivisto P, Lack EE, Kononen J, Kallioniemi OP, Gelmann EP** (2000) Loss of NKX3.1 expression in human prostate cancers correlates with tumor progression. *Cancer Res*, 60(21): 6111-5
13. **Bubendorf L, Grilli B, Sauter G, Mihatsch MJ, Gasser TC, Dalquen P** (2001) Multiprobe FISH for enhanced detection of bladder cancer in voided urine specimens and bladder washings. *Am J Clin Pathol*, 116(1): 79-86
14. **Bubendorf L, Kolmer M, Kononen J, Koivisto P, Mousses S, Chen Y, Mahlamaki E, Schraml P, Moch H, Willi N, Elkahloun AG, Pretlow TG, Gasser TC, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP** (1999) Hormone therapy failure in human prostate cancer: analysis by

complementary DNA and tissue microarrays. *J Natl Cancer Inst*, 91(20): 1758-64

- 15. Bubendorf L, Kononen J, Koivisto P, Schraml P, Moch H, Gasser TC, Willi N, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP** (1999) Survey of gene amplifications during prostate cancer progression by high-throughout fluorescence in situ hybridization on tissue microarrays. *Cancer Res*, 15, 59(4): 803-6; Erratum in: *Cancer Res*, 59(6): 1388 (1999)
- 16. Bubendorf L, Nocito A, Moch, H, Sauter G** (2001) Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughput in situ studies. *J Pathol*, 195(1): 72-9
- 17. Böcking A, Sinagowitz E** (1980) Histologic grading of prostatic carcinoma. *Pathol Res Pract*, 168(1-3): 115-25
- 18. Cabeza-Arvelaiz Y, Sepulveda JL, Lebovitz RM, Thompson TC, Chinault AC** (2001) Functional identification of LZTS1 as a candidate prostate tumor suppressor gene on human chromosome 8p22. *Oncogene*, 20: 4169-4179
- 19. Canzian F, Salovaara R, Hemminki A, Kristo P, Chadwick RB, Aaltonen LA, De la CA** (1996) Semiautomated assessment of loss of heterozygosity and replication error in tumors. *Cancer Res*, 56: 3331-3337
- 20. Carter GE, Lieskovsky G, Skinner DG** (1989) Results of local and/or systemic adjuvant therapy in the management of pathological stage C or D1 prostate cancer following radical prostatectomy. *J Urol*, 142(5): 1266-70, discussion 1270-1

- 21. Catalona WJ, Bigg SW** (1990) Nerve-sparing radical prostatectomy: evaluation of results after 250 patients. *J Urol*, 143(3): 538-43, discussion 544
- 22. Chen H, Nandi AK, Li X, Bieberich CJ** (2002) NKX-3.1 interacts with prostate-derived Ets factor and regulates the activity of the PSA promoter. *Cancer Res*, 62: 338-340
- 23. Chu LW, Troncoso P, Johnston DA, Liang JC** (2003) Genetic markers useful for distinguishing between organ-confined and locally advanced prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, 36: 303-312
- 24. Corral DA, Bahnson RR** (1994) Survival of men with clinically localized prostate cancer detected in the eighth decade of life. *J Urol*, 151(5): 1326-9
- 25. Csiszar K** (2001) Lysyl oxidases: a novel multifunctional amine oxidase family. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 70: 1-32
- 26. Culig Z, Klocker H, Bartsch G, Hobisch A** (2001) Androgen receptor mutations in carcinoma of the prostate: significance for endocrine therapy. *Am J Pharmacogenomics*, 1(4): 241-9
- 27. da Silva FC, Fossa SD, Aaronson NK, Serbouti S, Denis L, Casselman J, Whelan P, Hetherington J, Fava C, Richards B, Robinson MR** (1996) The quality of life of patients with newly diagnosed M1 prostate cancer: experience with EORTC clinical trial 30853. *Eur J Cancer*, 32A(1): 72-7
- 28. Daniell HW** (1997) Osteoporosis after orchiectomy for prostate cancer. *J Urol*, 157(2): 439-44

- 29. DeRisi J, Penland L, Brown PO, Bittner ML, Meltzer PS, Ray M, Chen Y, Su YA, Trent JM** (1996) Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nat Genet*, 14(4): 457-60
- 30. Dhom G** (1991) Prostata: Pathologie des männlichen Genitale. *Spezielle pathologische Anatomie*, Bd. 21, S.455-642
- 31. Dong JT** (2001) Chromosomal deletions and tumor suppressor genes in prostate cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 20: 173-193
- 32. Dumur CI, Dechsukhum C, Ware JL, Cofield SS, Best AM, Wilkinson DS, Garrett CT, Ferreira-Gonzalez A** (2003) Genome-wide detection of LOH in prostate cancer using human SNP microarray technology. *Genomics*, 81: 260-269
- 33. Edwards MC, Gibbs RA** (1994) Multiplex PCR: advantages, development, and applications. *PCR Methods Appl*, 3(4): 65-75
- 34. Eisenberger MA, Blumenstein BA, Crawford ED, Miller G, McLeod DG, Loehrer PJ, Wilding G, Sears K, Culkin DJ, Thompson IM Jr, Bueschen AJ, Lowe BA** (1998) Bilateral orchiectomy with or without flutamide for metastatic prostate cancer. *N Engl J Med*, 339(15): 1036-4
- 35. Epstein JI** (1992) Differential diagnosis in pathology. *Urologic disorders*
- 36. Epstein JI** (1996) Prostate biopsy interpretation. *Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia London Mexico City*
- 37. Frank S, Munz B, Werner S** (1997) The human homologue of a bovine non-selenium glutathione peroxidase is a novel keratinocyte growth factor-regulated gene. *Oncogene*, 14(8): 915-21

- 38. Freeman JA, Lieskovsky G, Cook DW** (1993) Radical retropubic prostatectomy and postoperative adjuvant radiation for pathological stage C (PcN0) prostate cancer from 1976 to 1989: intermediate findings. *J Urol*, 149(5): 1029-34
- 39. Fujiwara Y, Emi M, Ohata H, Kato Y, Nakajima T, Mori T, Nakamura Y** (1993) Evidence for the presence of two tumor suppressor genes on chromosome 8p for colorectal carcinoma. *Cancer Res*, 53: 1172-1174
- 40. Garnick MB** (1986) Leuprolide versus diethylstilbestrol for previously untreated stage D2 prostate cancer. Results of a prospectively randomized trial. *Urology*, 27(1 Suppl): 21-8
- 41. Gelmann EP, Bowen C, Bubendorf L** (2003) Expression of NKX3.1 in normal and malignant tissues. *Prostate*, 55: 111-117
- 42. Gelmann EP** (2003) Searching for the gatekeeper oncogene of prostate cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*, 46 Suppl: S11-S20
- 43. George DJ, Kantoff PW** (1999) Prognostic indicators in hormone refractory prostate cancer. *Urol Clin North Am*, 26(2): 303-10
- 44. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H** (1984) Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol*, 133(4): 1710-5
- 45. Gleason D** (1966) Classification of prostate carcinomas. *Cancer Chemother Rep*, 50: 125-128

- 46. Gneveckow U, Hodapp H, Salk J, Sauer O** (1998) DEGRO R14, DEGRO P1, DGMP (Deutsche Gesellschaft für Medizinische Physik e.v) Bericht Nr.11
- 47. Gneveckow U, Hodapp H, Salk J, Sauer O** (1998) DEGRO, DGMP (Deutsche Gesellschaft für Medizinische Physik e.v) Bericht Nr.11
- 48. Haggman MJ, Wojno KJ, Pearsall CP, Macoska JA** (1997) Allelic loss of 8p sequences in prostatic intraepithelial neoplasia and carcinoma. *Urology*, 50: 643-647
- 49. Hanks GE** (2002) Dose response in prostate cancer with 8-12 years' follow-up. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 54(2): 427-35
- 50. Hawkins GA, Mychaleckyj JC, Zheng SL, Faith DA, Kelly B, Isaacs SD, Wiley KE, Chang BL, Ewing CM, Bujnovszky P, Bleecker ER, Walsh PC, Meyers DA, Isaacs WB, Xu J** (2002) Germline sequence variants of the LZTS1 gene are associated with prostate cancer risk. *Cancer Genet Cytogenet*, 137: 1-7
- 51. Heidari M, Popken G** (09.08.2005) <http://www.meoclinic-berlin.de>
- 52. Hein S, Yamamoto SY, Okazaki K, Jourdan-LeSaux C, Csiszar K, Bryant-Greenwood GD** (2001) Lysyl oxidases: expression in the fetal membranes and placenta. *Placenta*, 22(1): 49-57
- 53. Helpap B** (1993) Atlas der Pathologie urologischer Tumoren. *Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York Toronto*
- 54. Helpap B** (1985) Morphologic and cell kinetic studies of prostate cancers. Contribution to grading. *Urol Int*, 40(1): 36-42

-
- 55. Helpap B** (1989) Pathologie der ableitenden Harnwege und der Prostata. *Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York Toront*
- 56. Helpap B, Böcking A, Dohm G, Faul P, Kastendieck H, Leistenschneider W, Müller HA** (1985) Klassifikation, histologisches und zytologisches Grading sowie Regressionsgrading des Prostatakarzinoms. *Urologe [A]*, 24: 156-159
- 57. Helpap B, Otten J** (1982) Histologic-cytologic grading of uniform and pluriform prostate cancers. *Pathologe*, 3(4): 216-22
- 58. Helpap B, Weißenbach L** (1983) Klinische und therapeutische Folgerungen aus dem Grading hochdifferenzierter Prostatakarzinome. *Urologisches Seminar*, Bern
- 59. Hofele C, Joos S, Flechtenmacher C, Bosch FX, Lichter P, Muhling J, Freier K** (2002) Opportunities and chances for tissue chip microarrays in head and neck surgery. A novel technique for the rapid evaluation of potentially novel biomarkers. *Mund Kiefer Gesichtschir*, 6(6): 394-401
- 60. Hoos A, Cordon-Cardo C** (2001) Tissue microarray profiling of cancer specimens and cell lines: opportunities and limitations. *Lab Invest*, 81(10): 1331-8
- 61. Ishii H, Baffa R, Numata SI, Murakumo Y, Rattan S, Inoue H, Mori M, Fidanza V, Alder H, Croce CM** (1999) The FEZ1 gene at chromosome 8p22 encodes a leucine-zipper protein, and its expression is altered in multiple human tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96: 3928-3933
- 62. Ishii H, Vecchione A, Murakumo Y, Baldassarre G, Numata S, Trapasso F, Alder H, Baffa R, Croce CM** (2001) FEZ1/LZTS1 gene at

8p22 suppresses cancer cell growth and regulates mitosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98: 10374-10379

- 63. Iversen PO, Sioud M** (1998) Modulation of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene expression by a tumor necrosis factor specific ribozyme in juvenile myelomonocytic leukemic cells. *Blood*, 92(11): 4263-8
- 64. Janke K** (09.08.2005) <http://www.urologenportal.de/264.html>
- 65. Jourdan-Le Saux C, Tronecker H, Bogic L, Bryant-Greenwood GD, Boyd CD, Csiszar K** (1999) The LOXL2 gene encodes a new lysyl oxidase-like protein and is expressed at high levels in reproductive tissues. *J Biol Chem*, 274(18): 12939-44
- 66. Kagan J, Stein J, Babaian RJ, Joe YS, Pisters LL, Glassman AB, von Eschenbach AC, Troncoso P** (1995) Homozygous deletions at 8p22 and 8p21 in prostate cancer implicate these regions as the sites for candidate tumor suppressor genes. *Oncogene*, 11(10): 2121-6
- 67. Kaisary AV** (1997) Antiandrogen monotherapy in the management of advanced prostate cancer. *Eur Urol*, 31 Suppl 2: 14-9
- 68. Kallioniemi OP, Wagner U, Kononen J, Sauter G** (2001) Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer. *Hum Mol Genet*, 10(7): 657-62
- 69. Kallioniemi OP** (2001) Biochip technologies in cancer research. *Ann Med*, 33(2): 142-7
- 70. Kaplan EL, MP** (1958) Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc*, 53: 457

- 71. Kelly WK** (1998) Endocrine withdrawal syndrome and its relevance to the management of hormone refractory prostate cancer. *Eur Urol*, 34 Suppl 3: 18-23
- 72. Kestin L** (2002) Pathologic evidence of dose-response and dose-volume relationships for prostate cancer treated with combined external beam radio therapy and high-dose-rate brachytherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 54(1): 107-18
- 73. Key G, Kubbutat MH, Gerdes J** (1994) Assessment of cell proliferation by means of an enzyme-linked immunosorbent assay based on the detection of the Ki-67 protein. *J Immunol Methods*, 177(1-2): 113-7
- 74. Kirschmann DA, Seftor EA, Fong SF, Nieva DR, Sullivan CM, Edwards EM, Sommer P, Csiszar K, Hendrix MJ** (2002) A molecular role for lysyl oxidase in breast cancer invasion. *Cancer Res*, 62: 4478-4483
- 75. Kleppe K, Ohtsuka E, Kleppe R, Molineux I, Khorana HG** (1971) Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *J Mol Biol*, 14(2): 341-61
- 76. Klöppel G** (1993) Aktuelle Pathologie der Prostata und der ableitenden Harnwege. *Verh. Dtsch. Ges. Pathol. 77. Tagung*, Nr.: 9/93
- 77. Kononen E, Kanervo A, Salminen K, Jousimies-Somer H** (1999) Beta-lactamase production and antimicrobial susceptibility of oral heterogeneous *Fusobacterium nucleatum* populations in young children. *Antimicrob Agents Chemother*, 43(5): 1270-3
- 78. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP**

- (1998) Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*, 4(7): 844-7
- 79. Krebs in Deutschland** (2004) 4. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe. Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, Saarbrücken
- 80. Kuhn JM, Proeschel MF, Seurin DJ, Bertagna XY, Luton JP, Girard FL** (1989) Comparative assessment of ACTH and lipotropin plasma levels in the diagnosis and follow-up of patients with Cushing's syndrome: a study of 210 cases. *Am J Med*, 86(6 Pt 1): 678-84
- 81. Kupelian PA** (2002) Factors affecting recurrence rates after prostatectomy or radiotherapy in localized prostate carcinoma patients with biopsy Gleason score 8 or above. *Cancer*, 95(11): 2302-7 2002
- 82. Kupelian PA** (2002) Impact of biochemical failure on overall survival after radiation therapy for localized prostate cancer in the PSA era. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 52(3): 704-11
- 83. Kutay U, Hartmann E, Treichel N, Calado A, Carmo-Fonseca M, Prehn S, Kraft R, Gorlich D, Bischoff FR** (2000) Identification of two novel RanGTPbinding proteins belonging to the importin beta superfamily. *J Biol Chem*, 275: 40163-40168
- 84. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, et al** (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409(6822): 860-921; Erratum in: *Nature*, 412(6846): 565, (2001); *Nature*, 411(6838): 720, (2001)
- 85. Lange PH, Reddy PK, Medini E** (1988) Radiation therapy as adjuvant treatment after radical prostatectomy. *NCI Monogr*, (7): 141-9

- 86. Lieberfarb ME, Lin M, Lechpammer M, Li C, Tanenbaum DM, Febbo PG, Wright RL, Shim J, Kantoff PW, Loda M, Meyerson M, Sellers WR** (2003) Genome-wide loss of heterozygosity analysis from laser capture microdissected prostate cancer using single nucleotide polymorphic allele (SNP) arrays and a novel bioinformatics platform dChipSNP. *Cancer Res*, 63: 4781-4785
- 87. Lockhart DJ, Dong H, Byrne MC, Follettie MT, Gallo MV, Chee MS, Mittmann M, Wang C, Kobayashi M, Horton H, Brown EL** (1996) Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol*, 14(13): 1675-80
- 88. MacGrogan D, Levy A, Bostwick D, Wagner M, Wells D, Bookstein R** (1994) Loss of chromosome arm 8p loci in prostate cancer: mapping by quantitative allelic imbalance. *Genes Chromosomes Cancer*, 10: 151-159
- 89. Macoska JA, Trybus TM, Benson PD, Sakr WA, Grignon DJ, Wojno KD, Pietruk T, Powell IJ** (1995) Evidence for three tumor suppressor gene loci on chromosome 8p in human prostate cancer. *Cancer Res*, 55(22): 5390-5
- 90. Mahler C, Verhelst J, Denis L** (1998) Clinical pharmacokinetics of the antiandrogens and their efficacy in prostate cancer. *Clin Pharmacokinet*, 34(5): 405-17
- 91. Mantel N** (1936) Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration. *Cancer Chemother Rep*, 50: 163
- 92. Matsuyama H, Pan Y, Skoog L, Tribukait B, Naito K, Ekman P, Lichter P, Bergerheim US** (1994) Deletion mapping of chromosome 8p in prostate cancer by fluorescence in situ hybridization. *Oncogene*, 9: 3071-3076

- 93. Matzkin H, Perito PE, Soloway MS** (1993) Finasteride (Proscar) for benign prostatic hypertrophy. *Harefuah*, 125(12): 453-6, 496
- 94. Maulard-Durdux C, Dufour B, Hennequin C, Chretien Y, Vignes B, Droz D, Delanian S, Housse M** (1996) Postoperative radiation therapy in 26 patients with invasive transitional cell carcinoma of the upper urinary tract: no impact on survival. *J Urol*, 155(1): 115-7
- 95. McCullough AR** (2001) Prevention and management of erectile dysfunction following radical prostatectomy. *Urol Clin North Am*, 28(3): 613-27
- 96. Middleton RG, Thompson IM, Austenfeld MS, Cooner WH, Correa RJ, Gibbons RP, Miller HC, Oesterling JE, Resnick MI, Smalley SR** (1995) Prostate Cancer Clinical Guidelines Panel Summary report on the management of clinically localized prostate cancer. *J Urol*, 154(6): 2144
- 97. Miles BJ, Giesler B, Kattan MW** (1999) Recall and attitudes in patients with prostate cancer. *Urology*, 53(1): 169-74
- 98. Moch H, Kononen T, Kallioniemi OP, Sauter G** (2001) Tissue microarrays: what will they bring to molecular and anatomic pathology. *Adv Anat Pathol*, 8(1): 14-20
- 99. Moch H, Schraml P, Bubendorf L, Mirlacher M, Kononen J, Gasser T, Mihatsch MJ, Kallioniemi OP, Sauter G** (1999) High-throughput tissue microarray analysis to evaluate genes uncovered by cDNA microarray screening in renal cell carcinoma. *Am J Pathol*, 154(4): 981-6
- 100. Mucci NR, Akdas G, Manely S, Rubin MA** (2000) Neuroendocrine expression in metastatic prostate cancer: evaluation of high throughput

tissue microarrays to detect heterogeneous protein expression. *Hum Pathol*, 31(4): 406-14; Erratum in: *Hum Pathol*, 31(6): 778, (2000)

101. **Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H** (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Spring Harb Symp Quant Biol*, 51: 263-73
102. **Murphy WM** (1989) Urological pathology. *Saunders, Philadelphia*, Second Edition, S. 392-400
103. **Niehaus J** (15.08.2005)
http://www.netdokter.at/sex_partnerschaft/menshealth/prostata_und_harnorgane/prostatacarcinom.shtml
104. **Nocito A, Kononen J, Kallioniemi OP, Sauter G** (2001) Tissue microarrays (TMAs) for high-throughput molecular pathology research. *Int J Cancer*, 94(1): 1-5
105. **Oba K, Matsuyama H, Yoshihiro S, Kishi F, Takahashi M, Tsukamoto M, Kinjo M, Sagiya K, Naito K** (2001) Two putative tumor suppressor genes on chromosome arm 8p may play different roles in prostate cancer. *Cancer Genet Cytogenet*, 124: 20-26
106. **Ornstein DK, Cinquanta M, Weiler S, Duray PH, Emmert-Buck MR, Vocke CD, Linehan WM, Ferretti JA** (2001) Expression studies and mutational analysis of the androgen regulated homeobox gene NKX3.1 in benign and malignant prostate epithelium. *J Urol*, 165: 1329-1334
107. **Partin AW, Kattan MW, Subong EN, Walsh PC, Wojno KJ, Oesterling JE, Scardino PT, Pearson JD** (1997) Combination of prostate-specific antigen, clinical stage, and Gleason score to predict

pathological stage of localized prostate cancer. *JAMA*, 277(18): 1445-51;
Erratum in: *JAMA*, 278(2): 118, (1997)

- 108. Paulson DF, Moul JW, Walther PJ** (1990) Radical prostatectomy for clinical stage T1-2N0M0 prostatic adenocarcinoma: long-term results. *J Urol*, 144(5): 1180-4
- 109. Petersen RO** (1986) Urological pathology. *Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia London Mexico City*
- 110. Pollack A** (2000) External beam radiotherapy dose response characteristics of 1127 men with prostate cancer treated in the PSA era. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 48(2): 507-12
- 111. Raghavan D, Cox K, Pearson BS, Coorey GJ, Rogers J, Watt WH, Coates AS, McNeil E, Grygiel JJ** (1993) Oral cyclophosphamide for the management of hormone-refractory prostate cancer. *Br J Urol*, 72(5 Pt 1): 625-8
- 112. Rambeaud JJ** (1999) Intermittent complete androgen blockade in metastatic prostate cancer. *Eur Urol*, 35 Suppl 1: 32-6
- 113. Ray GR, Bagshaw MA, Freiha F** (1984) External beam radiation salvage for residual or recurrent local tumor following radical prostatectomy. *J Urol*, 132(5): 926-30
- 114. Remmele W, Helpap B** (1999) Pathologie, Männliche Genitale, Niere, Ableitende Harnwege, Skelettsystem, Gelenke, Sehnen und Sehnengleitgewebe, Bursen, Faszien, Haut. *Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York Toronto*, 2. Aufl., S. 68-93

- 115. Rost T, Pyritz V, Rathcke IO, Gorogh T, Dunne AA, Werner JA** (2003) Reduction of LOX- and LOXL2-mRNA expression in head and neck squamous cell carcinomas. *Anticancer Res*, 23: 1565-1573
- 116. Sauter G, Grabein B, Huber G, Mannes GA, Ruckdeschel G, Sauerbruch T** (1990) Antibiotic prophylaxis of infectious complications with endoscopic retrograde cholangiopancreatography. A randomized controlled study. *Endoscopy*, 22(4): 164-7
- 117. Schellhammer PF, Jordan GH, El-Mahdi AM** (1986) Pelvic complications after interstitial and external beam irradiation of urologic and gynecologic malignancy. *World J Surg*, 10(2): 259-68
- 118. Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO** (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, 270(5235): 467-70
- 119. Schena M, Shalon D, Heller R, Chai A, Brown PO, Davis RW** (1996) Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(20): 10614-9
- 120. Schiebler TH, Schmidt W, Zilles K** (1999) Zytologie, Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie des Menschen. *Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York Toronto*, 8. Aufl., S. 634-660
- 121. Schmidt H, DeAngelis G, Eltze E, Gockel I, Semjonow A, Brandt B** (2006) Asynchronous growth of prostate cancer is reflected by circulating tumor cells delivered from distinct, even small foci, harboring loss of heterozygosity of the PTEN gene. *Cancer Res*, 66(18):8959-65

- 122. Schmidt H, Semjonow A, Csiszar K, Korsching E, Brandt B, Eltze E** (2007) Mapping of a deletion interval on 8p21-22 in prostate cancer by gene dosage PCR validated by tissue micro array. *Pathology Research and Practice*, 203/5
- 123. Schmiedt E, Schmeller N, Mayer P** (1984) Complications following external radiotherapy of prostate cancer. Case reports and overview of the literature. *Urologe A*, 23(3): 149-52
- 124. Scholzen T, Gerdes J** (2000) The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*, 182(3): 311-22
- 125. Schraml P, Kononen J, Bubendorf L, Moch H, Bissig H, Nocito A, Mihatsch MJ, Kallioniemi OP, Sauter G** (1999) Tissue microarrays for gene amplification surveys in many different tumor types. *Clin Cancer Res*, 5(8): 1966-75
- 126. Skacel M, Skilton B, Pettay JD, Tubbs RR** (2002) Tissue microarrays: a powerful tool for high-throughput analysis of clinical specimens: a review of the method with validation data. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 10(1): 1-6
- 127. Smith D, Hansch H, Bancroft G, Ehlers S** (1997) T-cell-independent granuloma formation in response to *Mycobacterium avium*: role of tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma. *Immunology*, 92(4): 413-21
- 128. Spyro M, Kallioniemi A, Kauraniemi P, Elkahloun A, Kallioniemi OP** (2001) Clinical and functional target validation using tissue and cell microarrays. *Curr Opin Chem Biol*, 6: 97-101

- 129. Steadman DJ, Giuffrida D, Gelmann EP** (2000) DNA-binding sequence of the human prostate-specific homeodomain protein NKX3.1. *Nucleic Acids Res*, 28: 2389-2395
- 130. Strum SB, McDermed JE, Scholz MC, Johnson H, Tisman G** (1997) Anaemia associated with androgen deprivation in patients with prostate cancer receiving combined hormone blockade. *Br J Urol*, 79(6): 933-41
- 131. Swalwell JI, Vocke CD, Yang Y, Walker JR, Grouse L, Myers SH, Gillespie JW, Bostwick DG, Duray PH, Linehan WM, Emmert-Buck MR** (2002) Determination of a minimal deletion interval on chromosome band 8p21 in sporadic prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, 33: 201-205
- 132. Takahashi S, Shan AL, Ritland SR, Delacey KA, Bostwick DG, Lieber MM, Thibodeau SN, Jenkins RB** (1995) Frequent loss of heterozygosity at 7q31.1 in primary prostate cancer is associated with tumor aggressiveness and progression. *Cancer Res*, 55(18): 4114-9
- 133. Tannock IF, Osoba D, Stockler MR, Ernst DS, Neville AJ, Moore MJ, Armitage GR, Wilson JJ, Venner PM, Coppin CM, Murphy KC** (1996) Chemotherapy with mitoxantrone plus prednisone or prednisone alone for symptomatic hormone-resistant prostate cancer: a Canadian randomized trial with palliative end points. *J Clin Oncol*, 14(6): 1756-64
- 134. Theillet C** (1998) Full speed ahead for tumor screening. *Nat Med*, 4(7): 767-8
- 135. Tidow N, Boecker A, Schmidt H, Agelopoulos K, Boecker W, Buerger, H, Brandt B** (2003) Distinct amplification of an untranslated regulatory sequence in the egfr gene contributes to early steps in breast cancer development. *Cancer Res*, 63: 1172-1178

- 136. Torhorst J, Bucher C, Kononen J, Haas P, Zuber M, Kochli OR, Mross F, Dieterich H, Moch H, Mihatsch M, Kallioniemi OP, Sauter G** (2001) Tissue microarrays for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints. *Am J Pathol*, 159(6): 2249-56
- 137. Valicenti R** (2000) The multidisciplinary clinic approach to prostate cancer counselling and treatment. *Semin Urol Oncol*, 18(3): 188-91
- 138. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, et al.** (2001) The sequence of the human genome. *Science*, 291(5507): 1304-51
- 139. Vocke CD, Pozzatti RO, Bostwick DG, Florence CD, Jennings SB, Strup SE, Duray PH, Liotta LA, Emmert-Buck MR, Linehan WM** (1996) Analysis of 99 microdissected prostate carcinomas reveals a high frequency of allelic loss on chromosome 8p12-21. *Cancer Res*, 56(10): 2411-6
- 140. Wei JT, Su L, Coleman J** (1998) Detection of Prostate Cancer in First-Generation Chinese Men. *Asian Am Pac Isl J Health*, 6(2): 201-207
- 141. Wernert N** (1991) Immunhistochemie der Prostata und des Prostatakarzinoms. *Urban & Fischer, München*
- 142. Whitmore WF Jr, Warner JA, Thompson IM Jr** (1991) Expectant management of localized prostatic cancer. *Cancer*, 15, 67(4): 1091-6
- 143. Wittekind Ch, Meyer HJ, Bootz F** (2005) TNM-Klassifikation maligner Tumoren. *Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York Toront*, 6. Aufl., S. 172-175

- 144. Wolter H, Gottfried HW, Mattfeldt T** (2002) Genetic changes in stage pT2N0 prostate cancer studied by comparative genomic hybridization. *BJU Int*, 89: 310-316
- 145. Wulfing P, Diallo R, Muller C, Wulfing C, Poremba C, Heinecke A, Rody A, Greb RR, Bocker W, Kiesel L** (2003) Analysis of cyclooxygenase-2 expression in human breast cancer: high throughput tissue microarray analysis. *J Cancer Res Clin Oncol*, 129: 375-382
- 146. Ziegler A, Lange S, Bender R** (2004) Überlebenszeitanalyse: Der Log-Rang-Test. *Dtsch med Wochenschr*, 129: T4-T6 DOI: 10.1055/s-2004-836075
- 147. Zincke H, Bergstralh EJ, Blute ML** (1994) Radical prostatectomy for clinically localized prostate cancer: long-term results of 1,143 patients from a single institution. *J Clin Oncol*, 12(11): 2254-63

6. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit nutzen, einigen Personen, die am Zustandekommen dieser Arbeit beteiligt waren meinen herzlichen Dank auszusprechen.

Als erstes richtet sich mein Dank an Herrn Prof. Dr. med. Werner Böcker, für die Möglichkeit diese Arbeit im Gerhard-Domagk-Institut für Pathologie durchführen zu können.

Zudem richtet sich mein Dank an Frau Dr. med. Elke Eltze, nicht nur für die Überlassung des Themas dieser Arbeit, sondern auch für ihre tatkräftige Unterstützung und Hilfsbereitschaft während der letzten Jahre.

Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. med. Horst Bürger, durch dessen Einsatz und Vermittlungstätigkeit ich erst auf das Thema dieser Arbeit aufmerksam wurde. Zudem danke ich ihm, für seine stetige Hilfsbereitschaft und Unterstützung besonders im Anfangsstadium dieser Studie.

Ebenso gebührt mein Dank meinen beiden Kommilitonen, Mitdoktoranden und Freunden, Herrn Bernd Rademacher und Herrn Kai Teriet, für die unzähligen Stunden, Tage, Monate und Jahre die wir gemeinsam mit der Erstellung dieser Studie verbracht haben und in denen es uns dennoch niemals an guter Laune und Tatendrang fehlte.

Abschließend danke ich Frau Serin Dawed für ihren stetigen Wunsch nach beruhigenden Worten das Vorrankommen ihrer eigenen Doktorarbeit betreffend. Bei jedem Gespräch mit ihr festigte sich auch mein Glauben an einen erfolgreichen Abschluss dieser Studie.

Kirchhellen, den 30.07.2007

7. Lebenslauf

8. Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

- **PIN** Prostatistische intraepitheliale Neoplasie
- **TMA** Tissue Microarray
- **PSA** Prostataspezifisches Antigen
- **PCA** Lokalisiertes Prostatakarzinom
- **BPH** Benigne Prostatahyperplasie
- **HDR** High dose rate
- **LDR** Low dose rate
- **LHRH** Luteinising hormone releasing hormone
- **LOX** Lysyl oxidase
- **LOXL** Lysyl oxidase-like
- **LOXL2** Lysyl oxidase-like 2
- **FISH** Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
- **ICH** Immunhistochemie
- **DNA** Desoxyribonucleinacid
- **RNA** Ribonucleinacid
- **mRNA** Messenger Ribonucleinacid
- **cRNA** Cyclo Ribonucleinacid
- **PCR** Polymerase Chain Reaction
- **AI** Allelic Imbalance
- **LOH** Loss of heterozygosity
- **LZTS** Leucine zipper putative tumor suppressor
- **EGR** Early growth response
- **TNFRSF** Tumor necrosis factor receptor superfamily member
- **STC** Stanniocalcin
- **ER** Progesteron receptor
- **PR** Progesteron receptor
- **PDEF** Prostate derived Ets factors

-
- **PET** Positronen-Emissions-Tomographie
 - **CT** Computer-Tomographie
 - **DEGRO** Deutschen Gesellschaft für Radioonkologie e.V.
 - **DGMP** Deutsche Gesellschaft für Medizinische Physik e.V.
 - **Gy** Gray
 - **SPSS** Statistical Product and Service Solutions
 - **HE** Hämatoxylin-Eosin
 - **EDV** Elektronische Datenverarbeitung
 - **c-myc** Myelocytomatosis oncogene
 - **Ki-ras** Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
 - **Ha-ras** Harvey rat sarcoma virus oncogene
 - **c-fos** FBJ osteosarcoma oncogene
 - **c-erbB-2** Erythroblastic leukemia viral oncogene homolog
 - **MIB1** Mindbomb homolog
 - **Ki-67** Antigen identified by monoclonal antibody Ki-67
 - **Her2** Erythroblastic leukemia viral oncogene homolog
 - **LZTS** Leucine zipper, putative tumor suppressor
 - **RANBP16** RAN binding protein 16
 - **NKX3A** NK-3 transcription factor
 - **NEFL (CAN)** Neurofilament light polypeptide
 - **ADRA1A** Adrenergic receptor (Alpha 1a)
 - **SCAM-1** Venexin beta (SH3-containing adaptor molecule 1)
 - **EORTC** European Organisation for Research on Treatment of Cancer