

Aus dem Institut für Pathologie des HELIOS Klinikum Bad Saarow
Akademisches Lehrkrankenhaus
der Medizinischen Hochschule Brandenburg Theodor Fontane

DISSERTATION

Retrospektive morphologische Untersuchungen zum Tumor-Budding bei
Plattenepithelkarzinomen des Penis

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Anjun Jain

aus Berlin

Datum der Promotion: 22.09.2017

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Abstract.....	3
1. Wissenschaftliche Grundlagen.....	5
1.1 Epidemiologie	5
1.2 Ätiologie.....	5
1.3 Pathologie und Präkanzerosen.....	6
1.4 Klinik.....	7
1.5 TNM-Klassifikation (klinisch und pathologisch) und histopathologisches Grading	8
1.6 Diagnose.....	10
1.7 Therapie.....	12
1.8 Tumor-Budding.....	15
1.9 Antikörper	16
1.9.1 Zytokeratin 5/6	16
1.9.2 CD34	17
1.9.3 Cyclin D1	18
1.9.4 P16.....	18
1.9.5 E-Cadherin.....	19
1.9.6 Vimentin.....	20
1.9.7 Ki-67.....	22
1.9.8 Syndecan-1 (CD138).....	23
2. Fragestellung.....	25
3. Material und Methode.....	28
3.1 Patientenkollektiv	28
3.2 Material	29
3.3 Methode der immunhistochemischen Untersuchung	29
3.4 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen	34
3.5 Statistische Auswertung	35
4. Ergebnisse	36
4.1 Klinische und pathologische Parameter	36
4.1.1 Altersverteilung	36
4.1.2 Histologische Subtypen.....	36
4.1.3 Makroskopisches Wachstumsmuster.....	37

4.1.4	Koilozytose.....	38
4.1.5	Mikroskopisches Wachstumsmuster	38
4.1.6	Tumorlokalisation	39
4.1.7	Eindringtiefe des Tumors	40
4.1.8	Lymphgefäßinvasion	40
4.1.9	Blutgefäßinvasion.....	41
4.1.10	Perineurale Invasion	42
4.1.11	Invasion des Corpus cavernosum	42
4.1.12	Invasion des Corpus spongiosum	43
4.1.13	Invasion der Urethra.....	44
4.1.14	Invasionsmuster.....	44
4.1.15	pT-Kategorie	45
4.1.16	pN-Kategorie	46
4.1.17	Grading.....	47
4.1.18	G3-Anteil.....	48
4.1.19	Ausmaß des Operationsverfahrens	48
4.1.20	Tumorprogression	49
4.1.21	Lebensstatus	50
4.1.22	Karzinombezogener Lebensstatus	50
4.1.23	Follow-up	51
4.2	Histologische und immunhistologische Parameter	52
4.2.1	Anzahl der Buds	52
4.2.2	Anzahl der Blutgefäße.....	54
4.2.3	Cyclin D1 in Buds	56
4.2.4	p16 in den Buds.....	57
4.2.5	E-Cadherin im Zentrum des Tumors.....	60
4.2.6	E-Cadherin in den Tumorzellen der Invasionsfront	61
4.2.7	E-Cadherin in den Buds.....	62
4.2.8	Vimentin im Stroma	64
4.2.9	Vimentin in den Tumorzellen der Invasionsfront.....	64
4.2.10	Vimentin im Zentrum des Tumors	65
4.2.11	Vimentin in Buds.....	67
4.2.12	Ki-67 in den Tumorzellen der Tumormasse.....	68
4.2.13	Ki-67 in den Tumorzellen der Invasionsfront	69
4.2.14	Ki-67 in den Stromazellen.....	70
4.2.15	Ki-67 in den Buds.....	70

4.2.16	CD138 in den Tumorbuds	72
4.3	Korrelationen zwischen einzelnen Parametern	74
4.3.1	Cyclin D1-Expression in den Buds in Bezug auf die Anzahl der Tumorbuds	74
4.3.2	p16-Expression in den Buds in Bezug auf die Koilozytose	75
4.3.3	p16-Expression im Tumor in Bezug auf die Koilozytose	75
4.3.4	p16-Expression in den Buds in Bezug auf die p16-Expression im Tumor.....	76
4.3.5	p16-Expression in den Buds in Bezug auf das mikroskopische Wachstumsmuster beim Peniskarzinom.....	77
4.3.6	p16-Expression in den Buds in Bezug auf das Invasionsmuster beim Peniskarzinom	78
4.3.7	E-Cadherin-Expression im Zentrum des Tumors, in der Invasionsfront und in den Buds in Beziehung zur Anzahl der Buds.....	79
4.3.8	E-Cadherin-Expression in den Buds in Bezug auf die Ki-67-Expression in den Buds beim Peniskarzinom	80
4.3.9	E-Cadherin-Expression im Tumor in Bezug auf die E-Cadherin-Expression in der Invasionsfront.....	81
4.3.10	E-Cadherin-Expression im Tumor in Bezug auf die E-Cadherin-Expression in den Buds.....	82
4.3.11	E-Cadherin-Expression in der Invasionsfront in Bezug auf die E-Cadherin-Expression in den Buds	83
4.3.12	Vimentin-Expression in der Invasionsfront in Bezug auf die Vimentin-Expression in den Buds.....	84
4.3.13	Ki-67-Expression im Tumorzentrum, in der Invasionsfront und in den Buds in Beziehung zur Anzahl der Buds.....	85
4.3.14	Ki-67-Expression im Tumor in Bezug auf die Ki-67-Expression in der Invasionsfront.....	86
4.3.15	CD138-Expression in den Tumorbuds in Beziehung zur Anzahl der Buds	87
4.3.16	CD138-Expression in den Buds in Bezug auf das mikroskopische Wachstumsmuster beim Peniskarzinom.....	88
4.3.17	CD138-Expression in den Buds in Bezug auf das Invasionsmuster beim Peniskarzinom	89
4.3.18	Histologischer Subtyp in Beziehung zur Anzahl der Buds	90
4.3.19	Mikroskopisches Wachstumsmuster in Beziehung zur Anzahl der Buds	91
4.3.20	Invasion des Corpus spongiosum in Beziehung zur Anzahl der Buds	92
4.3.21	Anzahl der Buds in Beziehung zum Invasionsmuster des Tumors	93
4.3.22	pT-Kategorie in Beziehung zur Anzahl der Buds	95
4.3.23	pN-Kategorie in Beziehung zur Anzahl der Buds	96
4.3.24	Progressionsstatus des Peniskarzinoms in Bezug auf die Anzahl der Buds	96
4.3.25	Statistisch geprüfte nicht signifikante Zusammenhänge	98

4.4	Überlebenszeit	100
4.4.1	Gesamtüberleben	100
4.4.1.1	Die pT-Kategorie in Bezug auf das Gesamtüberleben	100
4.4.1.2	Die pN-Kategorie in Bezug auf das Gesamtüberleben.....	101
4.4.1.3	Progressionsstatus in Bezug auf das Gesamtüberleben	101
4.4.1.4	Anzahl der Buds in Bezug auf das Gesamtüberleben.....	102
4.4.2	Tumorabhängiges Überleben.....	104
4.4.2.1	Anzahl der Buds in Bezug auf den karzinombedingten Lebensstatus.....	104
4.4.2.2	Invasionsmuster in Bezug auf den karzinombedingten Lebensstatus	104
4.4.2.3	Progressionsstatus in Bezug auf den karzinombedingten Lebensstatus	105
4.5	Multivariate Analyse	107
4.5.1	Multivariate Analyse für das Gesamtüberleben	107
4.5.2	Logistische Regression zur Ermittlung von unabhängigen Einflussgrößen	
	für das Auftreten von Tumorbuds	107
5.	Diskussion	109
5.1	Diskussion von Material und Methode.....	109
5.2	Diskussion der Ergebnisse.....	110
5.3	Diskussion der zusammenhängenden Parameter.....	114
6.	Zusammenfassung.....	126
7.	Literaturverzeichnis	128
	Eidesstattliche Versicherung	152
	Teilpublikation	153
	Lebenslauf	154
	Publikationsliste	155
	Danksagung	156

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Alpha-SMA	alpha smooth muscle actin (glattmuskuläres Aktin)
Ca	Karzinom
CC	Corpus cavernosum (Corpora cavernosa)
CD	Cluster of differentiation
CDH	Cadherin
CDK	zyklinabhängige (dependant) Kinase
CO2-L	Kohlendioxid-Laser
CS	Corpus spongiosum
CT	Computertomgraphie
DAB	Diaminobenzidintetrahydrochlorid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSNB	dynamische Sentinel-Node-Biopsie
E-Cadherin	epitheliales Cadherin
EAU	European Association of Urology
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
FNAB	Feinnadelaspirationsbiopsie
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HPF	High power field
HPV	humanes Papillomavirus
HRP	Meerrettichperoxidase (engl. horseradish Peroxidase)

IF	Invasionsfront
IM	Invasionsmuster
IRS	immunreaktiver Score
kDa	Kilodalton
KI	Konfidenzintervall
kP	keine Penektomie
LS	Lebensstatus
MRT	Magnetresonanztomographie
Nd:YAG-L	Neodym-dotierter Yttrium-Aluminium-Granat-Laser
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
pP	partielle Penektomie
PSA	prostata-spezifisches Antigen
PUVA	UV-A Photochemotherapie
RR	relatives Risiko
SCC	Squamous cell carcinoma (Plattenepithelkarzinom)
Sul.cor.	Sulcus coronarius
TNM	Tumorgröße, Nodalstatus, Fernmetastasen
TP	Tumorprogression
tP	totale Penektomie
UICC	Union International Contre Le Cancer
WHO	World Health Organization

Zusammenfassung

Das Peniskarzinom ist mit einer Inzidenz von ca. 1,0 Neuerkrankung/100.000 Einwohner in Mitteleuropa und Nordamerika eine seltene Tumorerkrankung. Histologisch liegt am häufigsten ein Plattenepithelkarzinom vor. Die pathohistologische Diagnostik stellt die Grundlage für die Therapie dar und orientiert sich an der UICC-Klassifikation. Bei verschiedenen menschlichen Tumoren wurde das biologische Phänomen des Tumor-Buddings (Aussprossung von Tumorzellen vor der Invasionsfront = Buds) beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wird geprüft, ob dieses Phänomen beim Peniskarzinom reproduzierbar vorkommt und ob es eine prädiktive und prognostische Relevanz besitzt. Es wurden Gewebeproben von 79 Patienten (Alter zwischen 29 bis 92 Jahren) konventionell-histologisch und immunhistologisch (CK5/6, CD34, Cyclin D1, p16, E-Cadherin, Vimentin, Ki67, Syndecan/CD138) hinsichtlich des Tumor-Buddings unter Berücksichtigung klinischer und epidemiologischer Parameter analysiert. Die biostatistische Bewertung erfolgte mittels des Chi²-Tests. Die Berechnung der metrischen Variablen wurde mit der Varianzanalyse und dem t-Test nach Student durchgeführt. Die komplexen Zusammenhänge, die sich auf die Anzahl der Tumorbuds bezogen, wurden mit Hilfe der logistischen Regression bewertet. Bei der Analyse der Überlebensdaten fand die Kaplan-Meier-Methode und multivariat die Cox-Regression Anwendung.

Die immunhistologische Untersuchung anhand der Marker (CK5/6, CD34, Cyclin D1, p16, E-Cadherin, Vimentin, Ki67, Syndecan/CD138) konnte in Bezug auf das Tumor-Budding beim Peniskarzinom keine Signifikanzen im multivariaten Modell aufweisen.

Im univariaten und multivariaten Modell zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen der Anzahl der Tumorbuds und dem Invasionsmuster beim Peniskarzinom sowie zwischen vermehrtem Auftreten von Tumorbuds und Bildung von Lymphknotenmetastasen. Die pT-Kategorie besaß einen unabhängigen Einfluss auf die Patientenprognose. Auch konnte multivariat bestätigt werden, dass zwar der Progressionsstatus beim Peniskarzinom einen unabhängigen Einfluss auf das Gesamtüberleben besitzt, dies jedoch weder auf die pN-Kategorie noch die Anzahl der Tumorbuds zutrifft. Die Kaplan-Meier-Überlebenskurven ergaben, dass sich mit höherer pT-Kategorie die Überlebensprognose der Patienten verschlechterte und eine Tumorprogression mit reduziertem Gesamtüberleben und karzinombezogenen Lebensstatus assoziiert ist.

Das Tumor-Budding beim Peniskarzinom besitzt keine prognostische und prädiktive Relevanz. Ferner bleibt unklar, ob das Phänomen des Tumor-Buddings beim Peniskarzinom überhaupt existiert und nicht kontinuierliche Tumorproliferate schnittbedingt als Buds imponieren. Weiterführende dreidimensionale histologische Untersuchungen zur Verifizierung des Tumor-Buddings beim Peniskarzinom sind daher zu empfehlen.

Abstract

With an incidence rate of approximately 1 new case per 100,000 inhabitants in central Europe and North America, penile cancer is a rare tumor disease. Histologically, most penile cancers manifest as squamous cell carcinoma. The pathohistological diagnosis acts as the basis for therapy and is determined by the UICC classification. The biological phenomenon of tumor budding was found in different human carcinoma. The following study examines whether tumor budding exists in penile cancer and has reproducible and predictive relevance as a prognostic marker. Paraffin-embedded tissues from 79 patients (ages between 29 and 92) were subjected to a conventional histological and immunohistological (CK5/6, CD34, Cyclin D1, p16, E-Cadherin, Vimentin, Ki67, Syndecan/CD138) analysis regarding tumor budding taking into account clinical and epidemiological parameters. Biostatic evaluation was done using the Chi² test. Metric variables were calculated using analysis of variance and t-test. Complex relationships pertaining to the number of tumor buds have been assessed using logistical regression. The analysis of survival data were carried out using the Kaplan-Meier method. Multivariable analyses were calculated using a Cox regression analysis model.

The immunohistological examination under specific markers (CK5/6, CD34, Cyclin D1, p16, E-Cadherin, Vimentin, Ki67, Syndecan/CD138) did not show significant correlations between penile cancer and tumor budding in multivariate models.

Univariate and multivariate models showed a significant correlation between the number of tumor buds and invasion patterns in penile cancer as well as a correlation between an increase of tumor buds occurrence and lymph node metastases. The pT-category had an independent effect on the patient prognosis.

Using multivariate models it has also been confirmed that the progression status of penile cancer had an independent influence on overall survival which, however, was not true for pN-category and the number of tumor buds.

Kaplan-Meier survival curves indicated an exacerbation of the survival curve with an elevated pT-category. They also showed that tumor progression is associated with reduced overall survival and cancer-specific survival status.

Tumor budding in penile cancer does not carry prognostic and predictive significance. In addition, it remains unclear whether the phenomenon of tumor budding in penile cancer is present at all rather than continuous proliferation of tumors presenting themselves as buds. Three-dimensional (3-D) histological analyses are therefore recommended to verify the phenomenon of tumor budding in penile cancer.

1. Wissenschaftliche Grundlagen

1.1 Epidemiologie

Das Peniskarzinom stellt in Mitteleuropa und Nordamerika eine seltene Tumorerkrankung dar mit einer Inzidenzrate von unter 1 Neuerkrankung pro 100 000 Einwohner pro Jahr [11]. In Europa werden jährlich 4000 Neuerkrankungen diagnostiziert, das entspricht einer Rate von 0,5 % aller malignen Tumore beim Mann [45]. Es ist jedoch zu erwähnen, dass die Inzidenzrate des Peniskarzinoms innerhalb Europas einer Schwankung von unter 0,5 bis über 1,5 Neuerkrankungen pro 100 000 Einwohner pro Jahr unterliegt [142]. Im Gegensatz dazu liegt die Inzidenz des Peniskarzinoms in Indien bei 0,7-3 Neuerkrankungen pro 100 000 Einwohner, in Brasilien bei 8,3 Neuerkrankungen pro 100 000 Einwohner pro Jahr und stellt in diesen Ländern 10-20 % aller malignen Tumoren beim Mann dar. In Uganda ist das Peniskarzinom der am häufigsten diagnostizierte Tumor unter Männern [144]. Israel zählt mit 0,1 Erkrankungen pro 100 000 Einwohner pro Jahr zu dem Land mit der geringsten Inzidenzrate [33].

1.2 Ätiologie

Es gibt verschieden Risikofaktoren, die für die Entstehung eines Peniskarzinoms verantwortlich gemacht werden. Zu den wichtigsten Risikofaktoren zählen:

1. Phimose [70]
2. Chronisch entzündliche Veränderungen, wie Balanoposthitis und Lichen sclerosus et atrophicus [70, 131]
3. Behandlung mit Psoralen und UV-A Photochemotherapie (PUVA) [176]

Eine neonatal durchgeführte Zirkumzision kann das Risiko an einem Peniskarzinom zu erkranken um das 10-fache senken [127]. Von der American Cancer Society wird die Zirkumzision als eine Karzinom vorbeugende Maßnahme jedoch nicht empfohlen [169].

Es herrscht ein direkter Zusammenhang zwischen dem Risikofaktor Rauchen und dem Peniskarzinom. Wobei das Rauchen als Risikofaktor sowohl dosisabhängig als auch unabhängig zu anderen Risikofaktoren zu sehen ist [70]. Des Weiteren besteht eine Korrelation zwischen

dem Rauchen und der invasiven Form des Peniskarzinoms im Gegensatz zu dem Peniskarzinom in Situ [34].

Das Humane-Papilloma-Virus (HPV) zählt ebenfalls zu den Risikofaktoren des Peniskarzinoms. Dabei werden die HPV-Subtypen 16 und 18 für 70 % der Karzinome des Zervix, der Vagina und des Anus und für ca. 30-40 % der Karzinome der Vulva, des Penis und des Oropharynx verantwortlich gemacht [128]. Während das verhornende Plattenepithelkarziom in ca. 35 % und der verruköse Subtyp in ca. 33 % der Fälle mit HPV in Zusammenhang stehen, konnte der basaloide Subtyp in 80 % und der kondylomatöse Subtyp in 100 % der Fälle mit HPV in Beziehung gesetzt werden. Obwohl das HPV in ca. 42 % der Peniskarzinome nachgewiesen wurde, kann eine HPV-Infektion singulär nicht zu einem Peniskarzinom führen. Es sind weitere Faktoren für eine maligne Entartung notwendig [158].

Die Annahme, dass das menschliche Smegma karzinogen sei, ist nicht evidenzbasiert. Somit kann das Smegma als noch gegenwärtig häufig angegebener Risikofaktor für das Peniskarzinom ausgeschlossen werden [189].

1.3 Pathologie und Präkanzerosen

Bei den Präkanzerosen des Peniskarzinoms unterscheidet man zwischen fakultativen und obligatorischen prämaligen Läsionen [42].

Zu den fakultativen Präkanzerosen zählen:

1. Hyperkeratose mit Hornbildung
2. Balanitis xerotica obliterans (Lichen sclerosus et atrophicus)
3. Chronisch entzündliche Prozesse
4. Bowenoide Papulose (HPV 16, 18 assoziiert)
5. Buschke-Löwenstein-Tumor (Low-Risk-HPV 6, 11 assoziiert)

Zu den obligaten Präkanzerosen zählen:

1. Carcinoma in Situ
 - 1.1 Morbus Bowen (Läsion des Schaftes) (High-Risk-HPV 16, 18 assoziiert)

1.2 Erythroplasie de Queyrat (Läsion der Glans penis) (High-Risk-HPV 16, 18 assoziiert)

Bei malignen Tumoren des Penis handelt es sich in 95 % der Fälle um Plattenepithelkarzinome, die entsprechend der European Association of Urology (EAU)-Leitlinien und nach der histologischen Klassifikation der World Health Organization (WHO), gemäß dem morphologischen Code der International Classification of Diseases for Oncology, in Subtypen unterteilt werden. Dabei kommt das klassische Plattenepithelkarzinom in 65 % der Fälle, der papilläre Subtyp in 5-15 %, der gemischtzellige (koryomatös-basaloider und adenobasaloider) Subtyp in 9-10 %, der kondylomatöse Subtyp in 7-10 %, der basaloide Subtyp in 4-10 %, der verruköse Subtyp in 3-8 %, der sarkomatoide Typ in 1-3 % und der adenosquamöse Typ in weniger als in 1 % der Fälle vor. Während bei dem basaloiden und dem sarkomatoiden Subtyp ein starkes Metastasierungsverhalten beobachtet wurde, fiel die Metastasenbildung bei dem verrukösen und papillären Subtyp schwach aus [23, 32, 41, 62, 65, 150]. Zu den selten vorkommenden malignen Erkrankungen des Penis gehören das Basalzellkarzinom, das Melanom, das Sarkom, das Hämangioendotheliom und das Kaposi-Sarkom bei Humaner-Immundefizienz-Virus-Infektion (HIV) [42].

Das Wachstumsmuster des Peniskarzinoms kann in fünf Formen unterteilt werden [30, 31]:

1. Superfiziell-spreitend
2. Vertikal wachsend
3. Verrukös
4. Multizentrisch
5. Gemischt

Dabei konnte gezeigt werden, dass das vertikale Wachstumsmuster signifikant mit einem vermehrten Auftreten von Lymphknotenmetastasen in Zusammenhang steht [44, 191].

1.4 Klinik

Die Primärläsion des Peniskarzinoms manifestiert sich zu 48 % an der Glans penis, zu 21 % an dem Präputium, zu 14 % an der Glans, dem Präputium und dem Schaft, zu 9 % an der Glans und dem Präputium, zu 6 % an dem Sulcus coronarius und zu 2 % an dem Penisschaft [18].

Das Peniskarzinom ist in seiner klinischen Erscheinungsform variabel. Es kann als ein kleines induriertes Areal, als papulöse, exophytische oder flache ulzeröse Läsion in Erscheinung treten. Die primären Symptome reichen von einem Brennen oder Jucken unter der Vorhaut bis zu einer auftretenden Ulzeration an der Glans oder am Präputium. Eine vorherrschende Phimose kann dazu führen, dass ein Tumor unentdeckt bleibt und erst nach weiterer Progression durch sekundäre Symptome, wie Erosion durch das Präputium, fötidem Geruch und/oder blutigem Ausfluss, auffällig wird [18].

Aufgrund von Schamgefühlen, Angst, Ignoranz und persönlicher Vernachlässigung kommt es bei 15-50 % der Patienten zu einer einjährigen Verzögerung des Behandlungsbeginns. Dies führt dazu, wie eine Metaanalyse aus 16 Untersuchungen ergeben hat, dass zum Diagnosezeitpunkt 30-60 % der Patienten palpable Lymphknoten in der Leistenregion aufweisen [73]. Bei circa der Hälfte dieser Patienten, wie eine weitere Metaanalyse zeigte, handelt es sich bei der auftretenden Schwellung um Lymphknotenmetastasen, während bei der anderen Hälfte der Patienten die Lymphknotenschwellung auf eine entzündliche Reaktion des Primärtumors zurückzuführen ist [3].

Unbehandelte inguinale Metastasen können aufgrund exophytischen bzw. endophytischen Wachstums einerseits zu Ulzerationen an der Außenhaut führen und andererseits femorale Gefäßperforationen verursachen, welche immense Hämorrhagien nach sich ziehen [18]. In 1-10 % der Fälle kann es zur Bildung von Fernmetastasen in Knochen, Gehirn, Leber und Lunge kommen, wobei diese meist erst zu einem späteren Zeitpunkt auftreten, nachdem der Primärtumor bereits entfernt wurde [117]. Ein unbehandeltes Peniskarzinom führt nach zwei Jahren zum Tod [123].

1.5 TNM-Klassifikation (klinisch und pathologisch) und histopathologisches Grading

2009 kam es zur Veröffentlichung der überarbeiteten TNM-Klassifikation der Union International Contre Le Cancer (UICC) des Peniskarzinoms [171]. In der 7. Auflage der TNM-Klassifikation (Tumorgröße, Nodalstatus, Fernmetastasen) wurde eine Unterteilung des T1-Stadiums vorgenommen.

Berücksichtigung fand jedoch nicht die prognoserelevante Unterscheidung zwischen dem Befall des Corpus cavernosum und des Corpus spongiosum des T2-Stadiums.

Bei einem bis ins Corpus cavernosum infiltrierenden Peniskarzinom besteht eine erhöhte Rezidiv- und Mortalitätsrate sowie eine erhöhte Infiltrationstiefe. In Bezug auf Lymphknotenbeteiligung, lymphovaskulärer Infiltration und Metastasenbildung kommt es zwischen dem Corpus cavernosum und dem Corpus spongiosum jedoch zu keinen nennenswerten Unterschieden [155].

Klinische Klassifikation:

T-Primärtumor

- Tx Primärtumor kann nicht bestimmt werden
- T0 Keine Evidenz für einen Primärtumor
- Tis Carcinoma in situ
- Ta Nicht invasives, verruköses Karzinom
- T1 Tumor infiltriert das subepitheliale Bindegewebe
 - T1a ohne lymphovaskuläre Invasion und nicht schlecht oder undifferenziert
 - T1b mit lymphovaskulärer Invasion oder schlecht oder undifferenziert
- T2 Tumor infiltriert das Corpus spongiosum oder das Corpus cavernosum
- T3 Tumor infiltriert die Urethra
- T4 Tumor infiltriert andere Nachbarstrukturen

N-Regionäre Lymphknoten

- Nx Regionäre Lymphknoten können nicht bestimmt werden
- N0 Keine palpablen oder sichtbar vergrößerten Leistenlymphknoten
- N1 Ein palpabler mobiler unilateraler Leistenlymphknoten
- N2 Multiple oder bilaterale palpable mobile Leistenlymphknoten
- N3 Fixierte Leistenlymphknotenpakete oder uni- oder bilaterale pelvine Lymphadenopathie

M-Fernmetastasen

- M0 Keine Fernmetastasen
- M1 Fernmetastasen

Pathologische Klassifikation und histopathologisches Grading:

Die pT-Stadien entsprechen den T-Stadien.

pN-Regionäre Lymphknoten

- pNX Regionäre Lymphknoten können nicht bestimmt werden
- pN0 Keine regionären Lymphknotenmetastasen
- pN1 Metastase(n) in einem Leistenlymphknoten
- pN2 Metastasen in multiplen oder bilateralen Leistenlymphknoten
- pN3 Metastasen in Beckenlymphknoten (uni- oder bilateral) oder extranodale Ausbreitung regionärer Lymphknotenmetastasen

pM-Fernmetastasen

- pM0 Keine Fernmetastasen
- pM1 Fernmetastasen

G-Histopathologisches Grading

- Gx Differenzierungsgrad kann nicht bestimmt werden
- G1 gut differenziert
- G2 mäßig differenziert
- G3 schlecht differenziert/undifferenziert

1.6 Diagnose

Die Entscheidung für die zutreffende Behandlung des Peniskarzinoms erfordert eine präzise histologische Diagnose sowie ein korrektes Staging unter Berücksichtigung des Primärtumors und der regionalen Lymphknoten und eventuell feststehender Fernmetastasen [174]. Persistiert die primäre Penisläsion nach konservativer Behandlung ist eine Biopsieentnahme mit anschließender pathohistologischer Untersuchung erforderlich. Ist jedoch die Biopsieentnahme aufgrund einer vorherrschenden Phimose nicht möglich, ist eine vorausgehende Zirkumzision

indiziert. Bei der Probeentnahme ist darauf zu achten, diese aus der Peripherie der Läsion zu entnehmen, damit ebenfalls gesundes Gewebe in der zu untersuchenden Biopsieprobe enthalten ist [18].

Bei der klinischen Untersuchung des Peniskarzinoms müssen folgende Kriterien der primären Läsion berücksichtigt werden: Durchmesser, Lokalisation, Anzahl der Läsionen, Morphologie (papillär, nodulär, ulzerös oder flach), Beziehung zu Nachbarstrukturen (Submukosa, Tunica albuginea, Urethra, Corpus spongiosum und Corpus cavernosum), Farbe der Läsion sowie Läsionsgrenzen [144]. Der klinischen Untersuchung wird die höchste Sensitivität und Spezifität in Bezug auf das Tumor-Staging zugeschrieben.

Als unterstützende bildgebende Verfahren zur Beurteilung der Infiltrationstiefe des Peniskarzinoms kommen die Magnetresonanztomographie (MRT) sowie die Sonographie in Betracht, wobei letztere zu einer unzuverlässigen Diagnose führt. Die MRT-Untersuchung unter künstlich forcierter Erektion durch intrakavernöse Injektion von Prostaglandin E1 (Alprostadil) besitzt eine hohe Sensitivität und Spezifität in Bezug auf die Tumorf infiltration des Corpus cavernosum und wird als ergänzendes diagnosestützendes Verfahren empfohlen, vor allem dann, wenn die klinische Beurteilung des Peniskarzinoms aufgrund erschwerter Palpation zu einem uneindeutigen Ergebnis führt [85, 111].

An die Untersuchung der Primärläsion schließt sich eine sorgfältige Palpation der inguinalen Lymphknoten an, wobei eine alleinige klinische Untersuchung als nicht ausreichend zu erachten ist, da ca. 20 % der Patienten mit nicht palpablen Lymphknoten bereits Mikrometastasen aufweisen [123]. Aus diesem Grund muss die Diagnostik auf invasive Methoden ausgeweitet werden. Die ultraschallunterstützte Feinnadelaspirationsbiopsie (FNAB) stellt eine Möglichkeit dar, palpable sowie nicht palpable inguinale Lymphknoten auf Metastasenbefall zu untersuchen. Bei Patienten mit unauffälligen Lymphknoten beträgt die Sensitivität 39 % und Spezifität 100 % [93]. Werden palpable Lymphknoten mit der FNAB untersucht, kommt es zu einer Sensitivität von 93 % und einer Spezifität von 91 % [159].

Als weitere Untersuchungsmethode dient die dynamische Sentinel-Lymphknoten-Biopsie (DSNB). Bei dieser Methode kommt es zur Entfernung der "Wächter-(Sentinel)"-Lymphknoten, die präoperativ durch eine peritumorale Injektion des radioaktiven Technetium-99m-Nanokolloids mit Hilfe einer Gamma-Sonde und einer zusätzlichen, kurz vor der Operation durchgeführten Injektion von z.B. Patentblau, detektiert werden können. Mit Hilfe einer ergänzenden Modifikation der DSNB konnte die Falsch-Negativ-Rate dieser Methode von 22 % auf 4,8 % reduziert werden. Zu der Modifikation zählt eine zusätzliche ultraschallunterstützte FNAB, eine histopathologische Untersuchung der Wächterlymphknoten, eine chirurgische Untersuchung von

lymphszintigraphisch nicht dargestellten Wächterlymphknoten sowie eine intraoperative Palpation der Operationsregion [102].

Die Computer-, Magnetresonanz- und Positronen-Emissions-Tomographie (PET, CT/PET) sind für die Detektion nicht palpabler inguinaler Lymphknoten nicht empfehlenswert. Bei diesen bildgebenden Verfahren sind Metastasen nämlich erst ab einer Größe von ca. 2 mm ausfindig zu machen, so dass die erhöhte Gefahr besteht, dass okkulte Mikrometastasen unentdeckt bleiben. Bei jedoch bereits palpablen inguinalen Lymphknoten kann die Computertomographie (CT) und das MRT zur Detektion von pelvinen und retroperitonealen Metastasen angewendet werden [73, 77, 162].

Die Positronen-Emissions-Tomographie in Verbindung mit dem CT und dem Radiopharmakon Fluordesoxyglucose verspricht bei der Detektion von inguinalen Lymphknoten eine Sensitivität von 94 %. Die Eisenoxid-Nanopartikel-Magnetresonanztomographie erzielt bei der Detektion von inguinalen Lymphknoten eine Sensitivität von 100 % und Spezifität von 97 % [179]. Beide Methoden scheiterten jedoch daran Mikrometastasen aufzuspüren. Ebenfalls muss erwähnt werden, dass die zu den zwei letztgenannten Verfahren durchgeführten Studien aufgrund des geringen Patientenkollektivs kritisch zu beurteilen sind.

1.7 Therapie

Die Wahl der Therapiemethode des Peniskarzinoms ist abhängig vom Tumorstadium. In den Tumorstadien Tis, Ta und T1a kann eine organerhaltende Therapie durchgeführt werden. Zu den entsprechenden Therapiemethoden zählen unter anderem die Lasertherapie, bei der der Nd: Yag- und CO₂-Laser Anwendung findet. Während der Nd: Yag-Laser eine höhere Eindringtiefe besitzt, besteht bei der Anwendung des CO₂-Lasers die Möglichkeit einer Biopsiegewinnung. Aufgrund der hohen Rezidivrate von 42-48 % wird eine regelmäßige Nachsorge und eine gründliche Unterweisung des Patienten in die Selbstuntersuchung des Penis und der Lymphknoten empfohlen [28, 120, 163]. Bei organerhaltender Therapie konnte in einer weiteren Studie eine allgemeine Lokalrezidivrate von 28 % beobachtet werden, die jedoch einen anscheinend geringen Einfluss auf das Gesamtüberleben des Patienten ausübt [100].

Eine Alternative stellt die photodynamische Therapiemethode dar, die jedoch aufgrund der unzureichenden Datenlage und des geringen Patientenkollektivs kritisch beurteilt werden sollte [140].

Allein bei dem Carcinoma in situ kann eine topische Applikation des Immunmodulators Imiquimod oder des Chemotherapeutikums 5-Fluorouracil erfolgen [6a].

Eine weitere Therapiemethode ist die von Dr. Frederic Edward Mohs entwickelte schrittweise durchgeführte Tumorexzision mit unmittelbarer histologischer Untersuchung des jeweiligen Exzidats. Die schichtweise durchgeführte Exzision wird vollzogen bis mikroskopisch kein Tumorgewebe mehr vorhanden ist. Aufgrund der Rezidivrate von 32 % wird ein engmaschiges Recallsystem empfohlen [168].

T1-Tumoren, die sich auf das Präputium beschränken, können mit einer lokalen Exzision in Kombination mit oder ohne Zirkumzision, abhängig von der Tumorausbreitung, therapiert werden. Bei durchgeführter lokaler Exzision mit oder ohne Zirkumzision wird in der Literatur eine Rezidivrate von 7,7-9,4 % angegeben [12, 105].

Die empfohlene Therapiemethode der T1-Tumoren der Glans penis ist die Glansektomie oder partielle Penektomie mit Rekonstruktion einer Neoglans durch ein Hauttransplantat. Die Wahl dieser Therapie bietet ein hohes Maß an postoperativer Funktionalität und gutem kosmetischen Ergebnis des Penis bei geringer Rezidivrate mit jedoch reduzierter Sensibilität der Glans [143, 170]. Bei der Resektion von T1-Tumoren wird ein Sicherheitsabstand zum Tumor von ≥ 3 mm empfohlen. Der früher geforderte Sicherheitsabstand von 20 mm kann nach heutigen wissenschaftlichen Erkenntnissen als veraltet betrachtet werden. Bei T2-Tumoren wird ein Sicherheitsabstand der Resektionsränder von 10-15 mm empfohlen. Von höchster Wichtigkeit ist es, anhand eines Schnellschnitts die Tumorfreiheit der Resektionsränder zu überprüfen [4, 122, 144, 150]. Für T2-Tumoren mit Invasion der Corpora cavernosa sowie für T3 und T4 Tumoren wird eine partielle bzw. eine totale Penektomie als Therapiemethode empfohlen [91, 173, 105]. Bei T2-Tumoren, die keine Infiltration der Corpora cavernosa aufweisen, könnte eine noch teilweise organerhaltende Glansektomie in Betracht gezogen werden [150].

Lymphknotentherapie

Bei Patienten mit nicht palpablen Lymphknoten, einem Tumorstadium und Differenzierungsgrad ≤ 1 (pTis, pTa, pT1aG1) kann empfohlen werden, ein engmaschiges Beobachtungsprogramm zu erstellen solange eine sehr gute Compliance von Seiten des Patienten besteht [150]. Bei T1G2-Tumoren, die die mittlere Risikogruppe darstellen, wird eine DSNB angeraten [76]. Das Risiko des Auftretens von Lymphknotenmetastasen in dieser Gruppe reicht von 0-50 %, wobei die Untersuchung mit dem größeren Patientenkollektiv ein Risiko von 13 % angibt [69, 76, 132].

Eine früh durchgeführte Lymphadenektomie bei T2/T3 Karzinomen, die keine palpablen Lymphknoten aufwiesen, führte zu einer 3-Jahres-Überlebensrate von 84-91 %. Wurde die Lymphadenektomie jedoch erst bei während der Überwachungszeit palpatorisch auffällig gewordenen Lymphknoten durchgeführt, resultierte eine 3-Jahres-Überlebensrate von 35-79 %. Aus diesem Grund wird eine frühe Entfernung der Lymphknotenmetastasen mit vorausgehender DSNB empfohlen, da dieses Vorgehen zu einer Verbesserung des Gesamtüberlebens des Patienten beiträgt [94, 113, 137].

Bei nicht palpablen Lymphknoten wird im Zweifelsfall eine modifizierte inguinale Lymphadenektomie nach Catalona [22] empfohlen. Bei diesem Vorgehen fällt das Dissektionsgebiet lateral der Arteria femoralis und kaudal der Fossa ovalis weg. Ebenfalls kommt es zur Schonung der Vena saphena magna und des Musculus sartorius [22].

Da eine direkte lymphatische Drainage in die zentrale und die beiden superioren Zonen (medial und lateral) nach Daseler besteht, sollten diese Regionen in die modifizierte inguinale Lymphadenektomie mit einbezogen werden [103]. Der Vorteil der modifizierten gegenüber der radikalen Lymphadenektomie liegt in der signifikant geringeren Komplikationsrate. Es konnte gezeigt werden, dass die Spät-Komplikationen der radikalen Lymphadenektomie bei 43,1 % lagen, während sie bei der modifizierten Lymphadenektomie bei 3,4 % lagen [14].

Es besteht eine starke Beziehung zwischen der Bildung von Lymphknotenmetastasen und dem klinischen Stadium des Peniskarzinoms. Dabei zeigten Patienten mit palpablen Lymphknoten im pT3/pT4-Stadium in 50-100 % der Fälle und Patienten im pT2-Stadium in 50-70 % der Fälle Lymphknotenmetastasen [149]. Eine 4-6-wöchige antibiotische Vortherapie, um die Lymphknotenschwellung als Infektionsursache auszuschließen, ist als obsolet zu betrachten, da dieses Vorgehen eine Verzögerung zur Folge hätte, was wiederum einen negativen Effekt für die kurativen Prozesse bedeuten würde [69, 73, 159].

Patienten mit palpablen Lymphknoten weisen in 50 % der Fälle Lymphknotenmetastasen auf [149]. Bei Patienten mit palpablen inguinalen Lymphknoten wird zur Diagnostik eine Feinnadel-

Aspiration-Zytologie empfohlen [159]. Kommt es zu einem positiven Metastasenbefund der Lymphknoten wird eine sofortige Lymphadenektomie der betroffenen Seite empfohlen [69, 103, 137, 138, 149].

Werden bei der inguinalen Lymphadenektomie zwei oder mehr von Metastasen befallene Lymphknoten entdeckt und/oder besteht ein extrakapsuläres Wachstum der Lymphknoten, wird in den aktuellen EAU-Leitlinien, aufgrund der erhöhten Wahrscheinlichkeit für die pelvine Lymphknotenmetastasierung, eine pelvine Lymphadenektomie empfohlen [65].

Bei Patienten mit fixierten inguinalen Lymphknoten wird vor der radikalen Lymphadenektomie eine neoadjuvante Chemotherapie empfohlen. Bei den Patienten, die auf die neoadjuvante Chemotherapie ansprechen, konnte die allgemein schlechte Prognose dieser Patientengruppe verbessert werden [38, 65, 101].

1.8 Tumor-Budding

Der Begriff Tumor-Budding (Tumorsprossung) fand erstmals 1989 durch Morodomi et al. [126] Verwendung und wurde in Beziehung zu dem Metastasierungsverhalten und der lymphatischen Invasion des rektalen Karzinoms gesetzt. Tumor-Budding ist ein histopathologisches Merkmal, das das Vorhandensein von einzelnen isolierten dedifferenzierten Krebszellen oder einer Anhäufung bestehend aus weniger als fünf Krebszellen an der Invasionsfront der Haupttumormasse beschreibt [51, 52, 86, 146, 188]. Im Gegensatz zur Hämatoxylin–Eosin-Färbung stellt die immunhistochemische Färbung mit z.B. Pan-Zytokeratin eine Erleichterung bei der Detektion von Tumorzellen an der Invasionsfront dar, da dadurch eine Abgrenzung zu Fibroblasten und Lymphozyten erreicht werden kann [86, 146, 192]. Es wird ein Zusammenhang zwischen dem Tumor-Budding und dem biologischen Prozess der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) diskutiert [192, 199, 15]. Die EMT spielt einerseits in der embryologischen Entwicklung und andererseits in der Metastasierung von Tumoren eine wichtige Rolle. Einer von vielen wichtigen Prozessen der EMT ist das Herunterregulieren des Membranproteins E-Cadherin, welches für die Zell-Zell-Adhäsion verantwortlich ist. Durch diesen Prozess können sich die Tumorzellen aus dem Tumorverband lösen und eine Metastasierung des Karzinoms begünstigen [183, 184, 199].

Das Phänomen des Tumor-Buddings kann peri- sowie intratumoral beobachtet werden [82, 115] und wurde als prädiktives Merkmal mit negativer Prognose bei verschiedenen Karzinomen, wie

zum Beispiel dem Plattenepithelkarzinom der Zunge [192], dem ösophagealen Plattenepithelkarzinom [156], dem Plattenepithelkarzinom der Lunge [180], dem duktalem Adenokarzinom des Pankreas [82] und dem kolorektalen Adenokarzinom [67] beschrieben. Dabei korreliert das Tumor-Budding mit einem erhöhten Risiko einer lymphogenen Metastasierung, einer erhöhten Rezidivrate und einer verminderten Überlebensrate.

Das Tumor-Budding korreliert mit einer verminderten E-Cadherin- und einer vermehrten Vimentin-Expression in den Tumorzellen und Tumorbuds (Tumorknospen) der invasiven Tumorfront.

Das Tumor-Budding kann in Bezug auf die Intensität der histologischen Färbung in hochgradig und niedriggradig unterteilt werden. Vereinzelt auftretende Spindelzellen und Zellen mit multiplen Zellkernen, die von Endothelzellen bzw. Fibroblasten nicht unterschieden werden können, finden bei dem Auszählen der Tumor-Budding charakteristischen Tumorzellen keine Berücksichtigung [192].

1.9 Antikörper

1.9.1 Zytokeratin 5/6

Als Bestandteile des Zytoskeletts stellen die Zytokeratine die erste und zweite Gruppe der Intermediärfilamente dar, die für die Form und Stabilität der Zelle verantwortlich sind. In menschlichen Zellen unterscheidet man 20 verschiedene Zytokeratine, deren Molekulargewicht zwischen 40-68 kDa (Kilodalton) liegt. Zytokeratine werden gemäß des pI-Wertes in zwei Subtypen unterteilt, wobei die sauren Zytokeratine 9-20 zum Typ I und die basischen sowie neutralen Zytokeratine 1-8 zum Typ II zählen [124, 125]. Zytokeratin 5 besitzt eine Molekülmasse von 56 kDa und einen isoelektrischen pI-Wert von 7,4. Es wird in den mitotisch aktiven Basalzellen des Epithels gebildet. Im Differenzierungsprozess der Basalzellen zu Plattenepithelzellen, der mit dem Verlust der Zellteilung einhergeht, wird Zytokeratin 5 herunter reguliert [19, 95, 124]. Zytokeratin 6 hat eine Molekülmasse von 56 kDa und einen isoelektrischen pI-Wert von 7,8. In Karzinomen und während ablaufender Wundheilungsprozesse wird Zytokeratin 6 durch hyperproliferierende Epithelzellen produziert [133]. Bei Hautkrankheiten und Wundheilungsvorgängen kommt es zu einer verstärkten Expression von Zytokeratin 6 [29].

In einer Untersuchung von 29 Patienten, die an einem Mukoepidermoidkarzinom erkrankten, konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Expression von Zytokeratin 5 mit einer negativen Überlebensrate korrelierte [113]. Bhalla et al. [13] beobachteten, dass die gesteigerte Zytokeratin-5/6-Expression bei Mammakarzinomen mit einer positiven Rezidivrate und verstärkter Metastasierung in Beziehung steht. Zwei Studien zeigten, dass durch die immunhistochemische Färbung mit dem Zytokeratin-5/6-Antikörper beim Mammakarzinom zwischen benignen und malignen Läsionen unterschieden werden kann [1,13]. In der vorliegenden Arbeit soll die prognostische Relevanz des Tumor-Buddings beim Peniskarzinom ermittelt werden. Der Zytokeratin-Marker besitzt den Vorteil, dass er im Gegensatz zur Hämatoxylin-Eosin-Färbung eine leichtere Detektion des Tumor-Buddings ermöglicht, da Fibroblasten und Lymphozyten färbetechnisch abgegrenzt werden können [86, 146, 192].

1.9.2 CD34

Das CD34-Glykoprotein besitzt eine Molekülmasse von ca. 110 kDa und wird exprimiert von hämatopoetischen Stammzellen und Endothelzellen [26]. Der Genort des CD34 ist auf dem Chromosom 1q32 lokalisiert [75]. Obwohl die Funktionen des CD34-Proteins noch nicht vollständig geklärt sind, soll das CD34-Protein die Differenzierung inhibieren und die Proliferation in hämatopoetische Stammzellen fördern. Als Adhäsionsmolekül unterstützt es die hämatopoetische Zelladhäsion zum Stromalen Gewebe des Knochenmarks und ist beteiligt an der Regulierung von Stammzellen [68]. Des Weiteren ist es bei der Bindung von Lymphozyten an endotheliale Venolen in Lymphknoten beteiligt. Ebenfalls fungiert es als Antiadhäsionsmolekül, welches die Migration von Vorläuferzellen zum Knochenmark begünstigt [49]. In der vorliegenden Arbeit wurde der CD34-Antikörper benutzt, um die Blutgefäße an der Invasionsfront der Peniskarzinome zu identifizieren.

1.9.3 Cyclin D1

Cyclin D1 gehört, so wie das p16 zu den Zellzyklusregulatoren und reguliert den Zellzyklus zwischen der G1- und S-Phase. Zusammen mit den Cyclin-abhängigen Kinasen CDK4 und CDK6 bildet das Cyclin D1 Komplexe, die zur Phosphorylierung des Retinoblastomproteins führen. Nachdem das Retinoblastomprotein phosphoryliert wurde, kann es den Transkriptionsfaktor E2F1 nicht mehr inhibieren, so dass der Zellzyklus in die nächste Phase eintreten kann [9, 84, 106, 121]. Die Überexpression des Cyclin-D1-Proteins führt zu Schäden in der DNA, zu einer Anhäufung von genetischen Fehlern und zu selektiven Wachstumsvorteilen veränderter Zellen [129]. In 25 Plattenepithelkarzinomen der Wange wurde beobachtet, dass eine gesteigerte Expression des Cyclin-D1-Proteins mit einer schlechten Überlebensrate korreliert. Bei den in der gleichen Studie untersuchten 25 Plattenepithelkarzinomen der Zunge konnte keine Korrelation zwischen der Cyclin-D1-Expression und der Überlebensrate festgestellt werden [118]. In der Studie von Angadi et al. [7], in der 41 orale Plattenepithelkarzinome untersucht wurden, konnte ein Zusammenhang zwischen der Cyclin-D1-Expression und dem Differenzierungsgrad festgestellt werden, wobei eine starke Expression mit mangelnder Differenzierung korrelierte. Die immunhistochemisch mit dem Tissue Microarray Verfahren untersuchten Peniskarzinome, die auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, ergaben keine Korrelation zwischen dem Cyclin D1 und der Überlebensrate der untersuchten Patienten [61]. Eine weitere Untersuchung von Peniskarzinomen ergab eine positive Beziehung zwischen der Cyclin-D1-Expression und der Proliferationsaktivität, die jedoch als gering einzustufen war. Die Untersuchung von 21 Plattenepithelkarzinomen des Penis konnte eine Korrelation zwischen der Cyclin-D1-Expression und einer negativen Überlebensrate der Patienten zeigen [141].

1.9.4 P16

Das Tumorsuppressorprotein p16 Inka 4a ist ein Zellzyklusregulator, der eine wichtige Rolle in der Tumorprogression einnimmt und zur Familie der INKA 4a Proteine gehört, deren Mitglieder das p16-, p15-, p18- und p-19-Protein sind [59, 66, 72, 166]. Dem P16 INKA 4a-Gen, das auf dem Chromosomenabschnitt 9p21 sitzt, werden Tumorsuppressoraktivitäten zugeschrieben, da es in zahlreichen Karzinomen inaktiviert war [81, 135]. Durch die Bindung des p16-Proteins an die zyklinabhängigen Kinasen 4 und 6 (CDK4/6) kommt es zur Funktionsunterbrechung des

Cyklin-D-Proteins. Daraus resultiert, dass das Retinoblastomprotein nicht phosphoryliert werden kann und somit der Zellzyklus zwischen der G1- und S-Phase unterbrochen wird [81, 166]. Bei der Untersuchung von kolorektalen Karzinomen ergab die lineare Regressionsanalyse keine Beziehung zwischen einer erhöhten p16-Expression und einem vermehrten Tumor-Budding. Die Schlussfolgerung, aus dieser Studie war, dass es trotz geringer p16-Expression im Zellkern zu einem starken Tumor-Budding kommen kann [148]. Im Tumorgewebe und an der Invasionsfront des oralen Plattenepithelkarzinoms stellten Dragomir et al. [39] eine geringe p16-Expression fest. Im angrenzenden dysplastischen Epithel war die p16-Expression verstärkt, konnte jedoch nicht in Beziehung zu dem Grad der Dysplasie gesetzt werden [39]. Die p16-Expression war in fortgeschrittenen Tumorstadien der Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs reduziert und zeigte weder eine prognostische Relevanz zum metastatischen Verhalten der Tumoren, noch zur Überlebensrate der Patienten [194]. Poetsch et al. [145] zeigten bei der Untersuchung von 52 Plattenepithelkarzinomen des Penis, dass das Auftreten von Lymphknotenmetastasen im Zusammenhang mit einer reduzierten p16-Expression steht. Ein immunhistochemisch positiver Nachweis des p16-Antigens korrelierte mit einer besseren Überlebensprognose, die jedoch statistisch nicht signifikant war ($p=0,381$). Zwischen den Tumorstadien und der p16-Expression konnte kein Zusammenhang festgestellt werden [145]. Gunia et al. [60] zeigten bei 92 durch das Tissue Microarray Verfahren untersuchten Plattenepithelkarzinomen des Penis, die auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, dass eine positive p16-Expression in Korrelation mit einem besseren tumorspezifischen Überleben steht.

1.9.5 E-Cadherin

E (epitheliales)-Cadherin gehört zur Familie der klassischen Cadherine, zu denen die P (plazentaren)-Cadherine und die N (neuralen)-Cadherine gerechnet werden. Das E-Cadherin ist ein transmembranäres Glykoprotein der Zelloberfläche, welches durch das CDH(Cadherin)1-Gen auf dem Chromosom 16q21 kodiert wird. Das kalziumabhängige, interzelluläre Zelladhäsionsmolekül ist für den Zellkontakt gegenüberliegender Epithelzellen verantwortlich [15, 157]. Das Adhäsionsmolekül ist zusammengesetzt aus fünf extrazellulären Domänen, die aus jeweils ca. 110 Aminosäuren bestehen, einer transmembranen Domäne und einer cytoplasmatischen Domäne, die durch α -, β - und γ -Cateninbindung mit dem Aktinfilament verbunden ist [2, 87, 182]. Die extrazelluläre N-terminale Domäne ist für die cadherin-spezifische homophile Adhäsion zweier gegenüberliegender E-Cadherine verantwortlich [181].

Die verminderte Expression von E-Cadherin an der invasiven Tumorfront steht in Verbindung mit einem invasiven Progressionsverhalten des malignen Tumors. So konnten Wang et al. [192] an Plattenepithelkarzinomen der Zunge zeigen, dass E-Cadherin an der Zytoplasmamembran, in dem interzellulären Raum des karzinomfreien Epithels, im Tumorzentrum und an der Tumuroberfläche stark, an der invasiven Tumorfront hingegen nicht bis schwach angefärbt wurde. Eine schwache Expression von E-Cadherin an der invasiven Tumorfront korrelierte mit einer hohen Tumor-Budding-Intensität, die wiederum mit einer geringeren 5-Jahres-Überlebensrate der Patienten korrespondierte [192]. Liu et al. [110] demonstrierten, dass die reduzierte E-Cadherin-Expression an der invasiven Tumorfront oraler Plattenepithelkarzinome mit einer erhöhten Rezidivrate und einem verminderten krankheitsfreien Überleben der Patienten verbunden ist. Eine verstärkte Expression von E-Cadherin korrelierte mit einer besseren Prognose. Diniz-Freitas et al. [37] beobachteten, dass bei schwacher E-Cadherin-Expression die Invasivität der oralen Plattenepithelkarzinome stärker ausfiel. Bei untersuchten Gebärmutterkarzinomen konnte E-Cadherin in Zusammenhang mit einem schlechten Differenzierungsgrad und fortgeschrittenen Tumorstadien der Karzinome gebracht werden [92]. Bei der Untersuchung von Plattenepithelkarzinomen des Penis steht eine geringe E-Cadherin-Expression bei T1-Peniskarzinomen in Beziehung zu einem erhöhten Vorkommen von Metastasen [197].

1.9.6 Vimentin

Vimentin ist neben dem sauren Gliofilament-Protein und dem Desmin ein Typ III Intermediärfilamentprotein. Zusammen mit den Mikrofilamenten und den Mikrotubuli bilden die Intermediärfilamente das Zytoskelett. Vimentin besteht aus 466 Aminosäuren. Der α -helikale Mittelteil (Stab-Domäne) ist durch drei Verbindungsstellen, sogenannten Linkern (L1, L12, L2) in vier helikale Bereiche unterteilt (coil 1A, 1B, 2A, 2B). Die Stab-Domäne wird durch eine nicht α -helikale Kopf- und Schwanz-Domäne begrenzt [57]. Den Kopfteil stellt die n-terminale Aminogruppe dar, die eine wichtige Rolle für die Ausbildung der Tetramerstruktur spielt. Die Schwanz-Domäne wird durch die c-terminale Carboxylgruppe definiert [71]. Durch den antiparallel formierten Verbund zweier Dimere, die aus zwei in einer coiledcoil Struktur angeordneten Vimentinmonomere bestehen, wird ein Tetramer gebildet [53]. Vimentin kommt in Zellen mesenchymaler Herkunft vor [175], wobei die Vimentinfilamente sowohl mit dem Zellkern als auch mit der Plasmamembran in Verbindung stehen [47]. Vimentin verleiht der

mesenchymalen Zelle Beweglichkeit, unterstützt die Beständigkeit gegen mechanische Belastung und dient dem Erhalt der Zellform [27]. Bei Mäusen, denen Vimentin fehlte, konnten Wundheilungsstörungen gezeigt werden, die auf eine Motilitätsabnahme der Fibroblasten in der Wundregion zurückzuführen sind. Ferner verzögert Vimentin die Differenzierung der Fibroblasten zu Myofibroblasten, wodurch es zu einer Verzögerung der Wundkontraktion kommt [43].

Bei oralen Plattenepithelkarzinomen ist Vimentin ein immunhistologischer Marker, der prognostische Informationen über das biologische Verhalten des Tumors liefert [110]. In dem angrenzenden karzinomfreien Epithel, an der Tumoroberfläche und in dem Tumorzentrum des Plattenepithelkarzinoms der Zunge konnte immunhistochemisch kein Vimentin nachgewiesen werden. Dem gegenüber wiesen die invasive Tumorfront und die Zellen der Tumorbuds eine starke Vimentinfärbung auf, die in Zusammenhang mit einer hohen Tumorbudding-Intensität steht. Je größer die Intensität des Tumorbuddings war, desto stärker ausgeprägt waren die klinisch-pathologischen Merkmale wie Tumorgröße, Zelldifferenzierung Tumorstadium und Lymphknotenmetastasen. Ebenfalls war die 5-Jahres-Überlebensrate bei den Patienten mit hoher Tumorbudding-Intensität reduziert [192].

Die Expression von Vimentin und E-Cadherin stehen bei dem oralen Plattenepithelkarzinom in einem reziproken Verhältnis. Die Überexpression von Vimentin an der invasiven Tumorfront geht mit einer verminderten Expression von E-Cadherin einher. Die Überexpression von Vimentin und die reduzierte E-Cadherinexpression an der invasiven Tumorfront ist in oralen Plattenepithelkarzinomen verbunden mit einer erhöhten Rezidivrate und einem verminderten krankheitsfreien Überleben der Patienten. Umgekehrt steht eine niedrige Expression von Vimentin in Verbindung mit einer besseren Prognose für die Patienten [110]. Bei nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen steht die Vimentin-Expression im Zusammenhang mit dem Auftreten von Metastasen [35]. Tumorzellen der invasiven Tumorfront und Tumorbuds, die eine reduzierte E-Cadherin-Expression und verstärkte Vimentin-Expression zeigen, sowie morphologische Merkmale, wie Dedifferenzierung und Verlust der Zell-Zell-Adhäsion aufweisen, durchlaufen den Prozess der epithelial-mesenchymalen Transition, die mit einem verstärkten metastatischen Verhalten der Tumoren in Zusammenhang gebracht wird [192]. Eine verstärkte Expression von Vimentin ist in migratorisch aktiven Epithelzellen vorhanden, die an dem Prozess der Tumordinvasion beteiligt sind [56].

1.9.7 Ki-67

Das Ki-67-Protein wurde durch den monoklonalen Antikörper Ki-67, der durch Immunisierung von Mäusen mit Zellkernen der Hodgkin-Lymphom-Zelllinie L 428 erzeugt wurde, bestimmt [54]. Der Name des Proliferationsmarkers wurde zusammengesetzt aus dem Entdeckungsort (Kiel) und aus der Schachtnummer des Orginalklons in der 96-Wellplatte. Das Ki-67-Protein wird in den Zellkernen von Zellen exprimiert, die sich in der G1-, S-, G2- und M-Phase des Zellzyklus befinden [55] und stellt damit einen Marker dar, der zur Bestimmung des Proliferationsstatus von Zellpopulationen dient. Während der S-Phase steigt die Expression des Ki-67-Proteins an, erfährt in der G2-Phase eine zusätzliche Intensitätszunahme und erreicht ihren Höhepunkt in der Metaphase [40]. Das Ki-67-Protein kommt in zwei Isoformvarianten vor, wobei die Molekülmasse 320 kDa und 359 kDa beträgt [164]. Der Mangel an Kenntnissen über die Funktion des Ki-67-Proteins wird auf die fehlende Ähnlichkeit mit anderen Proteinen und auf die starke Anfälligkeit des Proteins zur Proteasenspaltung zurückgeführt, da diese erschwerte Bedingungen für biochemische Untersuchung darstellt [165]. In oralen Plattenepithelkarzinomen konnte gezeigt werden, dass ein erhöhter Ki-67-Labeling-Index mit einer erhöhten Tumorinvasivität und positiv mit dem histopathologischen Tumorgrad korrelierte [97, 186]. Papadopoulos et al. [141] zeigten in ihrer Studie keine signifikante Beziehung zwischen der Ki-67-Expression und dem Grad der Tumorinvasivität bei 21 Plattenepithelkarzinomen des Penis. Es konnte jedoch in fortgeschrittenen Tumorstadien eine verstärkte Ki-67-Expression festgestellt werden, die jedoch keine statistische Signifikanz aufwies ($p = 0,46$) [141]. Bei Plattenepithelkarzinomen der Zunge korrelierte eine gesteigerte Expression des Ki-67-Proteins mit einem negativen Überlebensstatus des Patienten und mit der Größe des Tumors [46]. Mehrere Untersuchungen zeigten, dass ein Zusammenhang zwischen der Ki-67-Expression und dem Tumorgrad, jedoch kein Zusammenhang zwischen dem Tumorstadium und der Lymphknotenmetastasierung bei Plattenepithelkarzinomen des Penis bestand [119, 174, 197]. Protzel et al. [151] konnten hingegen bei der Untersuchung von 28 Plattenepithelkarzinomen des Penis eine Korrelation zwischen einer erhöhten Ki-67-Expression und dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen aufzeigen. Ein gegenteiliges Ergebnis zeigte eine Studie von 125 untersuchten Peniskarzinomen, die eine Beziehung zwischen einer erhöhten Ki-67-Expression und einer geringen Lymphknotenmetastasierung beschreibt. Die Autoren äußerten als möglichen Erklärungsansatz, dass die erhöhte Proliferationsrate auf das bei der Mehrzahl der untersuchten Peniskarzinome aufgetretene exophytische Wachstum zurückzuführen ist, das mit einer geringeren Lymphknotenmetastasierung als das vertikale Wachstumsmuster korreliert [63]. Das

Ki-67-Protein besitzt bei Plattenepithelkarzinomen des Penis keine prognostische Aussagekraft in Bezug auf das tumorspezifische Überleben, das krankheitsfreie Überleben und das Gesamtüberleben [63, 119, 174, 197].

1.9.8 Syndecan-1 (CD138)

Syndecan-1 (CD138) ist ein transmembranäres Proteoglykan, das zur Familie der Syndecane gehört, die bei Säugetieren aus 4 Mitgliedern (Syndecan 1-4) besteht. Syndecan-1 besitzt eine kurze zytoplasmatische Domäne, die mit den Zytoskelettkomponenten interagiert, eine transmembranäre und eine extrazelluläre Domäne, die Heparansulfat- und Chondroitinsulfatketten besitzt, die mit den extrazellulären Matrixbestandteilen in Kontakt treten [152, 153, 154, 161]. Dabei binden die Heparansulfatketten an das Kollagen 1, 3 und 5, an das Fibronectin und an das Thrombospondin, so dass diese Bindungen eine weitere Adhäsionskomponente zwischen Epithelzellen darstellen [90, 160, 177]. In der Regel wird Syndecan-1 zum Nachweis von Plasmazellen im Rahmen der Plasmozytomdiagnostik eingesetzt. In der vorliegenden Untersuchung wird jedoch die Markierungseigenschaft von Epithelzellen ausgenutzt. So konnten Fujiya et al. [48] in ihrer Untersuchung von 105 Kolorektalkarzinomen belegen, dass die Epithelzellen des tumorfreien epithelialen Gewebes an der basolateralen Oberfläche eine starke Syndecan-1-Expression zeigten, wohingegen die Tumorzellen eine negative bis geringe Expression, mit in einzelnen Fällen, diffuser Expression im Zytoplasma aufwiesen. Bei den Tumoren, die keine Syndecan-1-Expression zeigten, konnte ein häufigeres Auftreten des Tumor-Buddings beobachtet werden. Bei den Kolorektalkarzinomen korrelierte ein Syndecan-1-Expressionsverlust mit einer negativen Prognose des Patienten [48]. Bei Untersuchungen der Syndecan-1-Expression im Prostatakarzinom kam es zu widersprüchlichen Ergebnissen. Kiviniemi et al. [89] zeigten, dass an der Basalschicht und in den Plasmazellen der gesunden Prostata Syndecan-1 stark exprimiert wurde. In den sekretorisch hochprismatischen Epithelzellen kam es hingegen zu einer schwachen Expression von Syndecan-1. Bei den Karzinomen der Prostata korrelierte eine schwache bis negative Syndecan-1-Färbung mit einer schlechten und eine starke Syndecan-1-Färbung mit einer guten Tumordifferenzierung [89]. Die univariate Untersuchung von Zellweger et al. [195] ergab, dass eine erhöhte Syndecan-Expression im Zusammenhang mit einem schlechten Gesamt- und tumorspezifischen Überleben steht. Die Studie von Shariat et al. [167] wies eine Korrelation zwischen der Syndecan-Expression und der PSA (prostataspezifisches Antigen)-Progression sowie einer aggressiven

Tumor-Progression in univariater Betrachtung auf, die in multivariater Hinsicht, in Bezug auf weitere pathologische Merkmale verloren ging. Beim Nasopharyngealkarzinom korrelierte jedoch eine verstärkte Syndecan-1-Expression mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium und einer negativen Prognose [25]. Die gleiche Beobachtung konnte bei Plattenepithelkarzinomen der Tonsille gemacht werden, wo es zu einer verminderten Syndecan-1-Expression an der Tumorzellmembran und zu einem Anstieg der Syndecan-1-Expression im Zytoplasma von Tumorzellen kam. Aufgrund der dadurch verloren gegangenen extrazellulären Syndecan-1-Funktion soll die Tumorzelle an Beweglichkeit gewinnen. Dies soll zu einer Begünstigung des Invasions- und Metastasierungsverhaltens der Tumorzellen führen [99]. Kim et al. [88] berichteten, dass zervikale Plattenepithelkarzinome, die eine starke zytoplasmatische Färbung von Syndecan-1 aufwiesen, mit einer günstigeren Prognose und einer positiven Überlebensrate einhergingen, als schlecht differenzierte Zervixkarzinome, die eine verminderte Syndecan-1-Expression zeigten. An der invasiven Tumorfront von oralen Plattenepithelkarzinomen stellten Kurokawa et al. [96] fest, dass eine verminderte Expression von Syndecan-1 mit einer negativen Prognose, einem schlechteren Differenzierungsgrad und einer reduzierten 5-Jahres-Überlebensrate korrelierte. Bei Kolonkarzinomen steht eine geringe Syndecan-1-Expression in Zusammenhang mit dem Vorkommen von Metastasen [185].

2. Fragestellung

In der Tumordiagnostik ist man ständig bestrebt, neue bzw. bessere Kriterien in der histologischen Diagnostik zu erforschen, um Tumoren treffsicher, auch hinsichtlich prädiktiver und prognostischer Faktoren, zu diagnostizieren und ihre Malignität abzuschätzen. Nach den wissenschaftlichen Erkenntnissen von 1989 bis heute ist das Phänomen des Tumor-Buddings bei verschiedenen Tumoren beschrieben und bei der Diagnostik verschiedener Tumoren eingesetzt worden. Beim Peniskarzinom fand bislang jedoch noch keine Untersuchung in Bezug auf das Tumor-Budding statt.

Peniskarzinome gehören zu den seltenen Tumorerkrankungen, so dass das Patientenkollektiv bekannter Studien meist gering war. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch, aufgrund der multizentrischen Zusammenarbeit mit sechs deutschen Instituten für Pathologie, ein Daten- und Untersuchungsmaterial von insgesamt 79 sehr gut diagnostizierten und Follow-up-kontrollierten Patienten gesammelt werden, was in Anbetracht des seltenen Auftretens des Peniskarzinoms eine enorme und für die Untersuchung interessante Anzahl an Patienten darstellt. In dieser Arbeit soll der Wert des Tumor-Buddings in der histologischen Diagnostik überprüft werden, um zu ermitteln, in wie weit mit dem Phänomen des Tumor-Buddings beim Peniskarzinom prognostische und diagnostische Aussagen zu treffen sind. Dazu wurden konventionell-morphologische und immunhistologische Parameter unter Einsatz von immunhistologischen Markern (Zytokeratin 5/6, CD34, Cyclin D1, p16, E-Cadherin, Vimentin, Ki-67, Syndecan-1/CD138) überprüft.

Insbesondere sollen folgende Fragestellungen geprüft werden:

- korreliert die Anzahl der Buds mit einer verstärkten Cyclin-D1-Expression der Buds
- besteht ein Zusammenhang zwischen der p16-Markierung der Tumorbuds und dem Auftreten einer Koilozytose
- besteht ein Zusammenhang zwischen der p16-Markierung des Tumors und dem Auftreten einer Koilozytose
- unterscheidet sich die p16-Markierung des Tumors von der p16-Markierung in den Tumorbuds
- korreliert die p16-Expression in den Tumorbuds mit dem mikroskopischen Wachstumsmuster und dem Invasionsmuster

- besteht eine Beziehung zwischen der E-Cadherin-Expression im Zentrum des Tumors und der Anzahl der Tumorbuds
- besteht eine Beziehung zwischen der E-Cadherin-Expression in der Invasionsfront und der Anzahl der Tumorbuds
- besteht eine Beziehung zwischen der E-Cadherin-Expression in den Buds und der Anzahl der Tumorbuds
- besteht ein Unterschied zwischen der E-Cadherin-Expression in den Buds und der Ki-67-Expression in den Buds
- besteht ein Unterschied zwischen der E-Cadherin-Expression im Tumor und der E-Cadherin-Expression in der Invasionsfront
- besteht ein Unterschied zwischen der E-Cadherin-Expression im Tumor und der E-Cadherin-Expression in den Buds
- besteht ein Unterschied zwischen der Vimentin-Expression in der Invasionsfront und der Vimentin-Expression in den Buds
- besteht eine Beziehung zwischen der Ki-67-Expression im Zentrum des Tumors und der Anzahl der Tumorbuds
- besteht eine Beziehung zwischen der Ki-67-Expression in der Invasionsfront und der Anzahl der Tumorbuds
- besteht eine Beziehung zwischen der Ki-67-Expression in den Buds und der Anzahl der Tumorbuds
- besteht ein Unterschied zwischen der Ki-67-Expression im Tumor in der Ki-67-Expression in der Invasionsfront
- besteht ein Zusammenhang zwischen der CD138-Expression in den Tumorbuds und der Anzahl der Buds
- besteht ein Zusammenhang zwischen der CD138-Expression in den Tumorbuds und dem mikroskopischen Wachstumsmuster
- besteht ein Zusammenhang zwischen der CD138-Expression in den Buds und dem Invasionsmuster
- besteht ein Zusammenhang zwischen der Anzahl der Buds und dem histologischen Subtyp
- unterscheidet sich die Anzahl der Buds bei den Varianten des mikroskopischen Wachstumsmusters
- besteht ein Zusammenhang zwischen der Tumordicke und der Anzahl der Buds

- besteht eine Beziehung zwischen der Anzahl der Tumorbuds und der Anzahl der Blutgefäße
- besteht eine Beziehung zwischen der Anzahl der Blutgefäße an der Invasionsfront und einem häufigeren Auftreten eines L1- bzw. V1-Status sowie einem höheren pT- und pN-Stadium
- besteht eine Beziehung zwischen der Invasion der Corpora cavernosa und der Anzahl der Tumorbuds
- besteht eine Beziehung zwischen der Invasion des Corpus spongiosum und der Anzahl der Tumorbuds
- besteht ein Zusammenhang zwischen der Anzahl der Tumorbuds und dem Invasionsmuster
- besteht eine Beziehung zwischen der pT-Kategorie und der Anzahl der Tumorbuds
- besteht eine Beziehung zwischen der pN-Kategorie und der Anzahl der Tumorbuds
- besteht ein Zusammenhang zwischen dem Tumor-Grading und der Anzahl der Tumorbuds
- hat die Anzahl der Buds einen Einfluss auf den Zeitraum bis zur Tumorprogression
- hat die Anzahl der Buds einen Einfluss auf den allgemeinen und karzinombezogenen Lebensstatus
- hat die Anzahl der Buds einen Einfluss auf den Progressionsstatus

3. Material und Methode

3.1 Patientenkollektiv

Die vorliegende retrospektive Studie umfasst ein Patientenkollektiv von 79 Plattenepithelkarzinomen des Penis, die aus sechs deutschen Instituten für Pathologie zusammengestellt wurden. Es stammten 17 Fälle aus dem Institut für Pathologie des Helios Klinikum Bad Saarow, 15 Fälle aus dem Institut für Pathologie des Carl-Thiem-Klinikum Cottbus, 16 Fälle aus dem Institut für Pathologie des Ernst von Bergmann Klinikum Potsdam, 16 Fälle aus dem Institut für Pathologie des Städtischen Klinikum Brandenburg an der Havel, 7 Fälle aus dem Institut für Pathologie des Klinikums Frankfurt/Oder und 8 Fälle aus dem Institut für Pathologie der Ruppiner Kliniken Neuruppin. Die Studie umfasst den Zeitraum zwischen 1994 und 2010. Zum Zeitpunkt der Operation lag das Alter der Patienten zwischen 29 und 92 Jahren. Histologisch wurden die Peniskarzinome gemäß den Kriterien der World Health Organization in gut, mäßig und schlecht differenziert eingeteilt. Für jeden Patienten wurde das Tumorstadium gemäß der TNM-Klassifikation der UICC, 7. Auflage, bestimmt. Für Patienten mit histologisch schlecht differenzierten Plattenepithelkarzinomen des Penis, die eine subepitheliale Gewebsinvasion (\geq pT1b) zeigten und/oder sechs Wochen nach chirurgischer Therapie fortbestehende palpable inguinale Lymphknoten aufwiesen, wurde die Empfehlung ausgesprochen, sich einer inguinalen Lymphknotendissektion zu unterziehen und im Falle von inguinalen Lymphknotenmetastasen, eine ipsilaterale pelvine Lymphadenektomie ergänzend anzuschließen. Patienten mit Lymphknotenmetastasen und/oder einer Infiltration der Corpora cavernosa wurden einer pelvinen sowie einer abdominalen kontrastmittelverstärkten Computertomographie und einer Thorax-Röntgenaufnahme unterzogen. Alle zusammengestellten Patientendaten wurden den Patientenberichten der einzelnen Institute entnommen. Die histologischen Schnitte wurden einer erneuten Untersuchung unterzogen, wobei die Tumorstadieneinteilung gemäß der 7. Auflage der TNM-Klassifikation der UICC erfolgte. Der Tumorgrad wurde gemäß der Klassifikation nach Broders [16] eingeteilt. Der histologische Lymphknotenstatus wurde gemäß der 7. Auflage der TNM Klassifikation der UICC bestimmt und in pN0, pNX bzw. pN+ unterteilt [16, 171]. Des Weiteren wurde das histologische Wachstumsmuster, der Status der Resektionsränder sowie die perineurale und lymphovaskuläre Invasion untersucht und dokumentiert. Die vertikale Infiltrationstiefe wurde eingeteilt in ≤ 5 vs > 5 mm [119].

3.2 Material

Die histopathologische Untersuchung der Resektionspräparate der 79 Peniskarzinome wurde in den jeweiligen, oben erwähnten sechs deutschen Instituten für Pathologie bzw. Kliniken für Urologie vorgenommen. Die in den jeweiligen Instituten in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Geweberesektate sowie die dazugehörigen mit Hämatoxylin-Eosin gefärbten histologischen Schnitte wurden uns mit freundlicher Genehmigung zur Verfügung gestellt. Die histologischen Schnitte wurden von zwei erfahrenen klinischen Pathologen, die weder Kenntnisse über die Patientendaten, noch über die originalen pathologischen Krankenakten besaßen, reklassifiziert (Tumorstadieneinteilung gemäß der 7. Auflage der TNM-Klassifikation, Regrading gemäß dem Grading System nach Broders [16]). Nachdem die vorliegende Studie durch den Arbeitskreis der medizinischen Ethikkommission des Landes Brandenburg genehmigt wurde (MEK-Nr.: 37588/11), konnten die tumorspezifischen Überlebensdaten für jeden Patienten durch das klinischen Krebsregister des Landes Brandenburg evaluiert werden.

Die Herstellung der histologischen Präparate, die immunhistologischen Färbungen und die Beurteilung der Schnittpräparate im Rahmen der vorliegenden Studie wurden im Institut für Pathologie des Klinikums Bad Saarow durchgeführt.

Im Land Brandenburg existiert seit 1994 ein flächendeckendes klinisches Krebsregister, in dem sämtliche relevante Verlaufsdaten, von der Tumorerstdiagnose bis zum Tode des Patienten bzw. bis zu seiner Heilung und darüber hinaus, in entsprechenden Abständen erfasst wurden. Die Ergebnisse der klinischen Krebsregistrierung des Landes Brandenburg werden einmal jährlich vom Tumorzentrum Land Brandenburg e.V. als onkologischer Sach- bzw. Qualitätsbericht publiziert. In diesem Sach- bzw. Qualitätsbericht befindet sich auch ein Kapitel zur Topographie des Peniskarzinoms (Nr.: C60) (Tumorzentrum Land Brandenburg Eigenverlag; siehe auch <http://www.tumorzentrum-brandenburg.de>). Da über dieses einmalige Datenwerk, das Follow-up des Patienten sehr genau nachverfolgt werden kann, wurden die Daten des klinischen Krebsregisters des Landes Brandenburg zur Beurteilung des Lebensstatus der 79 Patienten herangezogen.

3.3 Methode der immunhistochemischen Untersuchung

Es wurden von den in Paraffin eingebetteten Gewebeblöcken 3-4 µm dünne Schnitte (Microm HM 355, Thermo Fisher Scientific, USA) angefertigt. Nach dem Glätten der Schnitte im Wasserbad wurden diese auf einen Glasobjektträger (Superfrost Plus Firma Menzel) aufgezogen. Anschließend wurde der Glasobjektträger in einen Wärmeschrank (Thermo Fisher Scientific, USA) überführt und für 25 Minuten bei 60° C getrocknet, um Wasserrückstände zu beseitigen und somit eine optimale Verbindung zwischen dem Gewebe und dem Objektträger zu gewährleisten.

Die immunhistochemischen Färbungen wurden unter standardisierten Bedingungen mit dem vollautomatisierten Färbeautomaten der Firma Ventana Benchmark® XT (Ventana, Tucson, USA; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) durchgeführt. Auch die verwendeten Reagenzien stammten von der Firma Ventana (Tabelle 2). Als Detektionskit kam das ultraView DAB Detection Kit (Kat.-Nr.: 760-500, Ventana Medical Systems) zur Anwendung, welches ein biotinfreies, auf der indirekten Nachweismethode von primären Maus- und Kaninchenantikörpern basierendes System darstellt. Bei der indirekten immunhistochemischen Methode bindet zunächst der Primärantikörper an das Epitop, so dass im zweiten Schritt, der mit dem Enzym Meerrettichperoxidase (engl. horseradish peroxidase, HRP) gekoppelte Sekundärantikörper an das fc-Fragment des primären Antikörpers bindet. Unter Zusatz von Wasserstoffperoxid kommt es zur Oxidation des beigefügten Chromogens Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB), so dass folglich das Chromogen zu einem braunen Präzipitat reagiert.

Vor der Durchführung des immunhistochemischen Färbevorgangs wurden die angefertigten Schnitte unter standardisierten und vollautomatisierten Bedingungen mit dem Ventana Benchmark® XT System vorbehandelt. Nach jedem Inkubationsvorgang folgte das Abspülen und Waschen der Gewebeschnitte mit dem Reaktionspuffer-Konzentrat (Tris-basierte Pufferlösung 10X, Kat.-Nr. 950-300 2L, Ventana Medical Systems) für jeweils 2 Minuten bei 37 °C, um einen Reaktionsabbruch herbeizuführen, eine stetig stabile und wässrige Umgebung zu gewährleisten und um ungebundene Bestandteile zu entfernen, damit die nachfolgende Reaktion ungehindert ablaufen kann. Damit eine Grenzschicht zwischen den wässrigen Reagenzien und der Luft geschaffen wird, um eine Wasserverdunstung zu verhindern, wurde das Liquid Coverslip (LCS, High Temperature, Kat.-Nr.650-010 2L, Ventana Medical Systems) je nach Erfordernis während des Färbevorgangs appliziert.

Die Schnitte wurden zunächst mit EZ Prep Detergens (Kat.-Nr. 950-102, 2L, Ventana Medical Systems) bei 75 °C für fünf Minuten deparaffiniert. Durch die Gewebefixierung mit

Formaldehyd kommt es zur Bildung von kovalenten Bindungen zwischen dem Aldehyd und den Aminogruppen der Gewebsproteine. Diese Bindungen führen zu einer Abnahme der Antigenität sowie zu einer Denaturierung der Proteine. Es entstehen ebenfalls Quervernetzungen zwischen den Proteinen, die durch Methylenbrücken stabilisiert werden. Dies führt zu einer Bindungsblockade zwischen dem Antikörper und dem Epitop. Aus diesem Grund mussten die Schnitte mit dem Cell Conditioning 1 (CC1) (Kat.-Nr. 950-124, 2L, Ventana Medical Systems) für 8 Minuten bei 95 °C und für 30 Minuten bei 100 °C demaskiert werden, um die kovalenten Bindungen und Vernetzungen (durch Hydrolyse) aufzubrechen und dadurch eine Permeabilitätssteigerung für die Antikörper zu erzielen. Nach 30 minütigem Abkühlen bei Raumtemperatur wurden die Gewebsschnitte mit dem ultraView™ Universal DAB Inhibitor (3 % Wasserstoffperoxid-Lösung) für 4 Minuten bei 37 °C inkubiert, um die endogene Peroxidase zu inaktivieren. Nachfolgend kam es zur Inkubation mit den spezifischen Antikörpern (Tabelle 3):

1. Inkubation mit dem Confirm™ anti-Vimentin (V9) Primärantikörper von Ventana (Kat.-Nr.: 790-2917) bei 37 °C für 16 Minuten. Confirm™ anti-Vimentin ist ein monoklonaler Mausantikörper (IgG1), der gegen das Intermediärfilament Vimentin gerichtet ist.
2. Inkubation mit dem anti-E-Cadherin (36) Primärantikörper von Ventana (Kat.-Nr.: 790-4497) bei 37 °C für 16 Minuten. Anti-E-Cadherin ist ein monoklonaler Mausantikörper (IgG2a/K), der gegen das menschliche transmembrane Protein E-Cadherin gerichtet ist, welches in Epithelzellen exprimiert wird und für den Zellkontakt verantwortlich ist.
3. Inkubation mit dem anti-Zytokeratin 5/6 (D5/16B4) Primärantikörper von Ventana (Kat.-Nr.: 790-5454) bei 37 °C für 16 Minuten. Bei dem anti-Zytokeratin 5/6 handelt es sich um einen monoklonalen Mausantikörper, der das Zytokeratin 5/6 detektiert. Zytokeratin 6 wird im proliferierenden Plattenepithel exprimiert und das Zytokeratin 5 in basalen Epithelzellen des mehrschichtigen Plattenepithels.
4. Inkubation mit dem anti-CD138-Syndecan-1(B-A38) Primärantikörper von Cell Marque (Kat.-Nr.: 760-4248) bei 37 °C für 16 Minuten. Anti-CD138-Syndecan-1 ist ein monoklonaler Mausantikörper (IgG1), der normale und neoplastische Plasmazellen und Epithelzellen markiert.

5. Inkubation mit dem Confirm™ anti-Ki-67 (30-9) Primärantikörper von Ventana (Kat.-Nr.: 790-4286) bei 37 °C für 16 Minuten. Confirm™ anti-Ki-67 ist ein monoklonaler Kaninchenantikörper (IgG), der gegen den C-terminalen Teil des Ki-67-Antigens gerichtet ist.
6. Inkubation mit dem CINtec® p16 Histology Primärantikörper von Ventana (Kat.-Nr.: 705-4713) bei 37 °C für 16 Minuten. CINtec® p16 Histology enthält den anti-p16INK4a (E6H4) monoklonalen Mausantikörper, der gegen das p16INK4a-Protein gerichtet ist.
7. Inkubation mit dem anti-Cyclin D1 (SP4-R) Primärantikörper von Ventana (Kat.-Nr.: 790-4508) bei 37 °C für 16 Minuten. Anti-Cyclin D1 ist ein monoklonaler Kaninchenantikörper (IgG), der gegen den Zellzyklusregulator Cyclin D1 gerichtet ist.
8. Inkubation mit dem Confirm anti-CD34 (QBEnd/10) Primärantikörper von Ventana (Kat.-Nr.: 790-2927) bei 37 °C für 16 Minuten. Confirm anti-CD34 ist ein monoklonaler Mausantikörper (IgG1), der gegen das menschliche CD34 gerichtet ist.

Im Anschluss daran wurde das ultraView™ Universal HRP Multimer für 8 Minuten bei 37 °C appliziert, das den Sekundärantikörper darstellt und aus einer Mischung aus HRP-gekoppelten Antikörpern (Ziege anti-Maus IgG, Ziege anti-Maus IgM und Ziege anti-Kaninchen) zusammengesetzt ist. Als Substrat für die Meerrettichperoxidase wurde ultraView™ Universal DAB H₂O₂ (Phosphatpuffer mit 0.04 % Wasserstoffperoxid) für 8 Minuten inkubiert, so dass das ultraView™ Universal DAB Chromogen (0,2 % 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid) unter der katalytischen Wirkung der HRP in ein braun sichtbares Präzipitat umgesetzt werden konnte. Um die Färbung zu intensivieren wurde mit ultraView Universal Copper (Acetatpuffer mit Kupfersulfat, 5 g/l) für 4 Minuten bei 37 °C inkubiert.

Die Gegenfärbung wurde mit Hämatoxylin (Kat.-Nr. 760-2021, Ventana Medical Systems) für 8 Minuten bei 37 °C durchgeführt. Als Beize fungierte Aluminiumsulfat, so dass nach der Oxidation des Hämatoxylins das Reaktionsprodukt Hämatein durch Chelatbildung in Farbkomplexe umgewandelt werden konnte.

Mit dem Bluing Reagent (gepufferte Lithiumcarbonat-Lösung), (Kat.-Nr. 760-2037, Ventana Medical Systems) wurde die Hämatoxylin-Färbung, durch pH-Wert Erhöhung des Waschpuffers,

gebläut [116]. Anschließend wurden die immunhistochemisch bearbeiteten Objektträger mit Neutralbalsam eingedeckt.

Tabelle 1: Verwendete Reagenzien

Name	Hersteller
Reaktionspuffer-Konzentrat	Ventana: Kat.-Nr. 950-300
Liquid Coverslip (LCS)	Ventana: Kat.-Nr. 650-010
EZ Prep Detergens	Ventana: Kat.-Nr. 950-102
Cell Conditioning 1 (CC1)	Ventana: Kat.-Nr. 950-124
ultraView DAB Detection Kit: ultraView Universal DAB Inhibitor ultraView Universal HRP Multimer ultraView Universal DAB H2O2 ultraView Universal DAB Chromogen ultraView Universal Copper	Ventana: Kat.-Nr. 760-500
Hämatoxylin	Ventana: Kat.-Nr. 760-2021
Bluing Reagent	Ventana: Kat.-Nr. 760-2037

Tabelle 2: Verwendete Primär-Antikörper

Antikörper	Hersteller
Confirm™ anti-Vimentin (V9)	Ventana: Kat.-Nr. 790-2917
Anti-E-Cadherin (36)	Ventana: Kat.-Nr. 790-4497
Anti-Zytokeratin 5/6 (D5/16B4)	Ventana: Kat.-Nr. 790-5454
Anti-CD138-Syndecan-1(B-A38)	Cell Marque: Kat.-Nr. 760-4248
Confirm™ anti-Ki-67 (30-9)	Ventana: Kat.-Nr. 790-4286
CINtec® p16 Histology	Ventana: Kat.-Nr. 705-4713
Anti-Cyclin D1 (SP4-R)	Ventana: Kat.-Nr. 790-4508
Confirm anti-CD34 (QBEnd/10)	Ventana: Kat.-Nr. 790-2927

3.4 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

Die Zellen des normalen und neoplastischen Epithels und somit auch die Tumorbuds wurden immunhistochemisch mit Zytokeratin 5/6 markiert und in 10 Gesichtsfeldern mit einer 400-fachen Vergrößerung ausgezählt (10 HPF = high power fields). Als Tumorbuds wurden dabei nur einzelne isolierte Zellen und/oder eine Anhäufung, bestehend aus weniger als fünf Zellen, an der Invasionsfront der Haupttumormasse bei der Auszählung berücksichtigt.

Die im Stroma angrenzend an die Invasionsfront liegenden kapillären Blutgefäße wurden mit CD34 markiert und ebenfalls in 10 Gesichtsfeldern mit einer 400-fachen Vergrößerung semiquantitativ erfasst. Bei der Auszählung wurde streng darauf geachtet, die im Schwellkörper vorkommenden Blutgefäße nicht zu erfassen, sondern nur die Blutgefäße zu berücksichtigen, die sich im Stroma unmittelbar unter bzw. an der tumoralen Invasionsfront befanden.

Die Cyclin D1 gefärbten Schnitte wurden unter dem Kriterium ausgewertet, ob mehr oder weniger als 50 % der Tumorbuds angefärbt worden sind.

Beim p16-Marker wurde die Färbereaktion der Tumorbuds lediglich als vorhanden (positiv) bzw. als nicht nachweisbar (negativ) bewertet.

Der Vimentin-Marker unterlag ebenfalls der positiv/negativ Färbereaktionsbeurteilung, wobei neben den Tumorbuds, die Stromazellen und die Tumorzellen der Invasionsfront mit in die Bewertung einbezogen wurden.

Des Weiteren wurde das Markierungsverhalten der Tumorbuds, der Tumorzellen der zentralen Tumormasse sowie der Tumorzellen der Invasionsfront mit E-Cadherin untersucht und mit Hilfe des immunreaktiven Scores (IRS) ausgewertet. Der IRS ergibt sich aus der Multiplikation der ermittelten Farbintensität (0 = negativ, 1 = schwach, 2 = moderat, 3 = stark) und aus dem prozentualen Anteil der positiv gefärbten Zellen (0 = negativ, 1 = 10 %, 2 = 11-50 %, 3 = 51-80 %, 4 = > 80 %).

Die Ki-67-Expression wurde in den Tumorbuds, in den Tumorzellen der Tumormasse, in den Tumorzellen der tumoralen Invasionsfront und in den Stromazellen untersucht. Der Anteil der positiv gefärbten Zellen wurde prozentual ermittelt.

Die Intensität der Färbereaktion der Tumorbuds mit CD138 wurde in vier Intensitätsstufen unterteilt (0-3+).

3.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung des Untersuchungsmaterials erfolgte mit dem Programmsystem SPSS Version 21. Die Patientendaten (Untersuchungsdaten) wurden EDV-gerecht verschlüsselt, erfasst und an einem PC bearbeitet. Um die Zusammenhänge zwischen den Parametern zu bewerten, wurden die qualitativen Merkmale mit der Kontingenztafelmethode und dem parameterfreien Chi²-Test ausgewertet. Die Bewertung der metrischen Variablen erfolgte mit der Varianzanalyse und dem t-Test nach Student. Da von einer Irrtumswahrscheinlichkeit α von 5 % ausgegangen wurde, besteht ein signifikanter Zusammenhang zwischen den qualitativen Merkmalen bei $p < 0,05$.

Die komplexe Bewertung von Zusammenhängen mit der Anzahl der Tumorbuds erfolgte mit der logistischen Regression. Die Berechnung der Überlebenskurven erfolgte mit der Kaplan-Meier-Methode und multivariat mit der Cox-Regression. Dabei wurde bewertet, welche Variablen einen unabhängigen Einfluss auf das Überleben haben.

Da die biologische Bedeutung von Tumorbuds beim Peniskarzinom bislang noch nicht untersucht wurde, kann man sich vorstellen, dass auch eine Korrelation mit anderen klinisch prädiktiven und prognostischen Faktoren bestehen könnte.

4. Ergebnisse

4.1 Klinische und pathologische Parameter

4.1.1 Altersverteilung

Die Patienten waren im Alter von 29 bis 92 Jahren. Das Durchschnittsalter zum Diagnosezeitpunkt lag bei 67,4 Jahren und das mediane Alter bei 68 Jahren. 22 Patienten waren jünger als 60 Jahre, 24 Patienten waren zwischen 60-69 Jahre alt, 19 Patienten waren zwischen 70-79 Jahre alt und 14 Patienten waren 80 Jahre oder älter (Abb. 1).

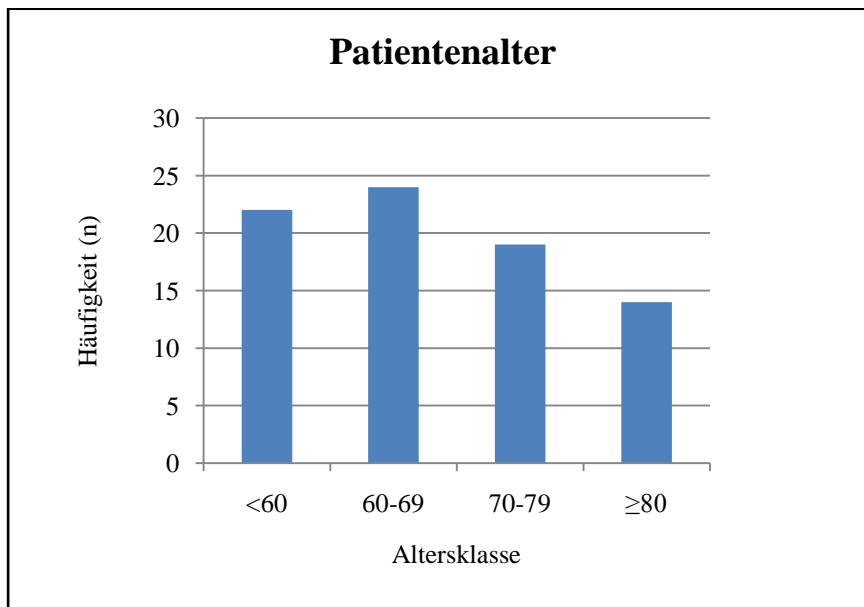


Abbildung 1: Anzahl der Peniskarzinome in Bezug auf die Altersverteilung.

4.1.2 Histologische Subtypen

Von insgesamt 79 Patientenfällen kam in 39 Fällen das verhornende und in 16 Fällen das nicht-verhornende Plattenepithelkarzinom vor. In jeweils 6 Fällen lag der basaloide und der warzige (kondylomatöse) Subtyp sowie das gemischtzellige Karzinom vor. In 4 Fällen trat der papilläre und in 2 Fällen der verruköse Subtyp auf (Abb. 2).

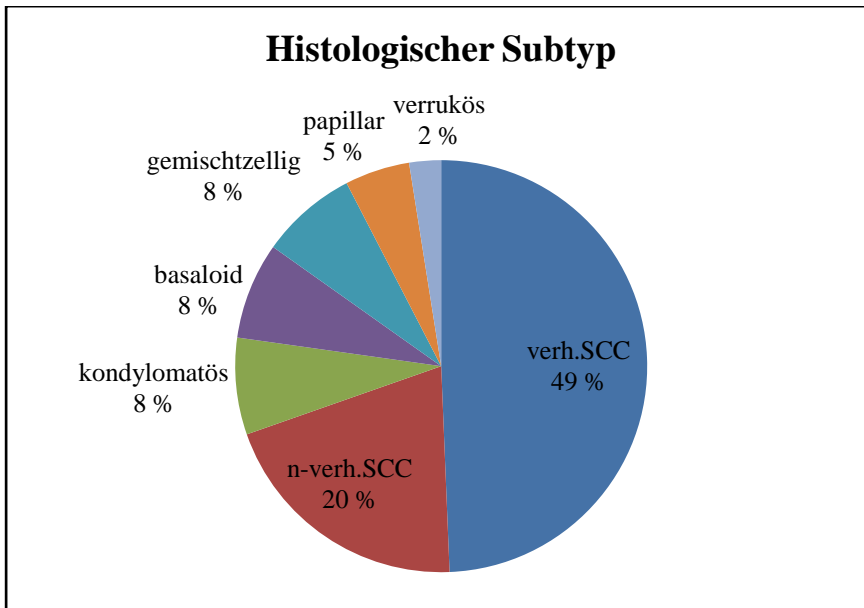


Abbildung 2: Anzahl der Peniskarzinome in Bezug auf den histologischen Subtyp.

4.1.3 Makroskopisches Wachstumsmuster

In 38 Fällen zeichnete sich eine exophytische, in 25 Fällen eine ulzeröse, in 13 Fällen eine flache und in 3 Fällen eine nodöse Läsion ab (Abb. 3).

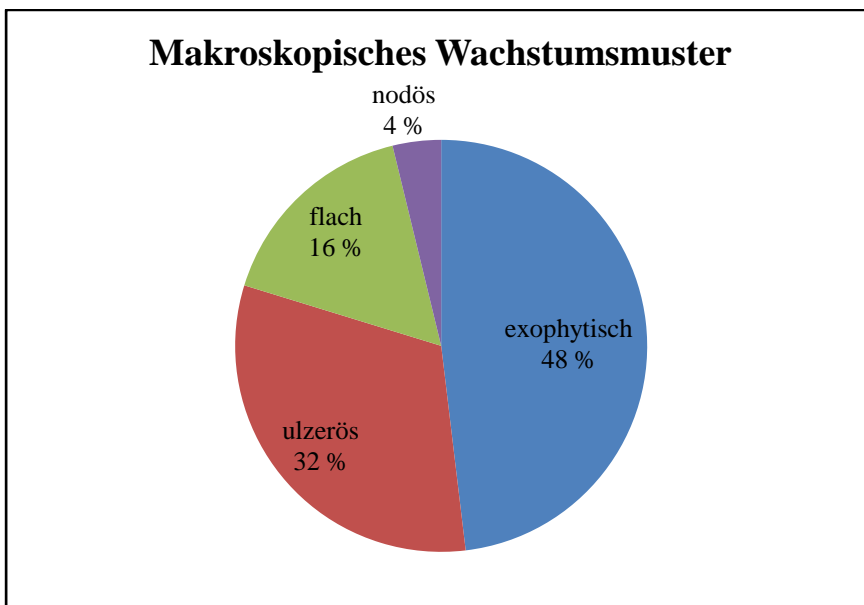


Abbildung 3: Anzahl der Peniskarzinome in Bezug auf das makroskopische Wachstumsmuster.

4.1.4 Koilozytose

In 43 Fällen konnten keine Koilozyten (K0) im histologischen Präparat der Karzinome festgestellt werden. In 36 Fällen wurde eine Koilozytose (K1) diagnostiziert (Abb. 4).

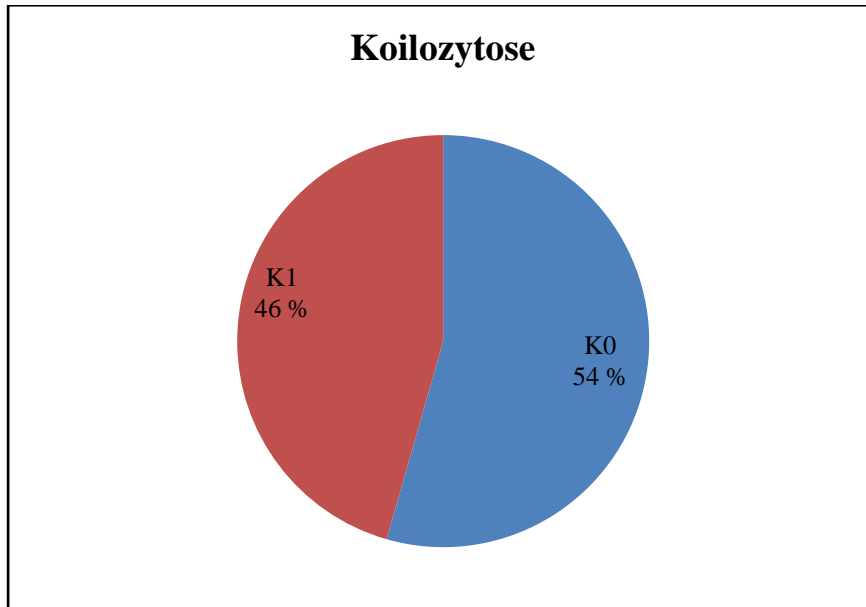


Abbildung 4: Anzahl der Peniskarzinome in Bezug auf die Koilozytose (Koilozytose = K1; keine Koilozytose = K0).

4.1.5 Mikroskopisches Wachstumsmuster

Je 31 der 79 untersuchten Peniskarzinome zeigten den superfiziell spreitenden und den vertikalen Wachstumstyp. 13 Peniskarzinome zeigten ein verruköses und 4 Fälle ein multizentrisches Wachstumsmuster (Abb. 5). Unter einem superfiziell spreitenden Wachstumsmuster wurde in der vorliegenden Arbeit eine horizontale Ausbreitung der Tumorzellen in wenig kohäsiven Verbänden im bedeckenden Epithel und mit Destruktion der Basalmembran verstanden.

Das vertikale Wachstumsmuster ist durch eine dominierende Ausbreitung in das subepitheliale Bindegewebe gekennzeichnet.

Beim verrukösen Wachstumsmuster erfolgte ein Wachstum mit auffälliger Vorwölbung der Oberfläche, epithelialen Zapfenbildungen und Invasion in das subepitheliale Bindegewebe.

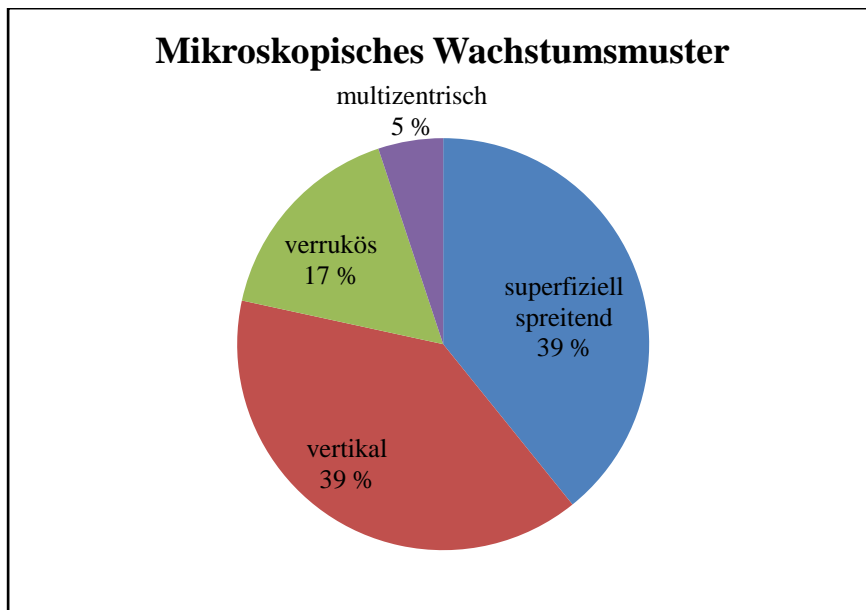


Abbildung 5: Anzahl der Peniskarzinome in Bezug auf das mikroskopische Wachstumsmuster.

4.1.6 Tumorlokalisation

In 45 Fällen manifestierte sich das Karzinom an der Glans, in 8 Fällen kam es sowohl an der Glans als auch am Sulcus coronarius vor, in 17 Fällen trat das Karzinom ausschließlich am Präputium auf und in 9 Fällen sowohl am Präputium als auch an der Glans (Abb. 6).

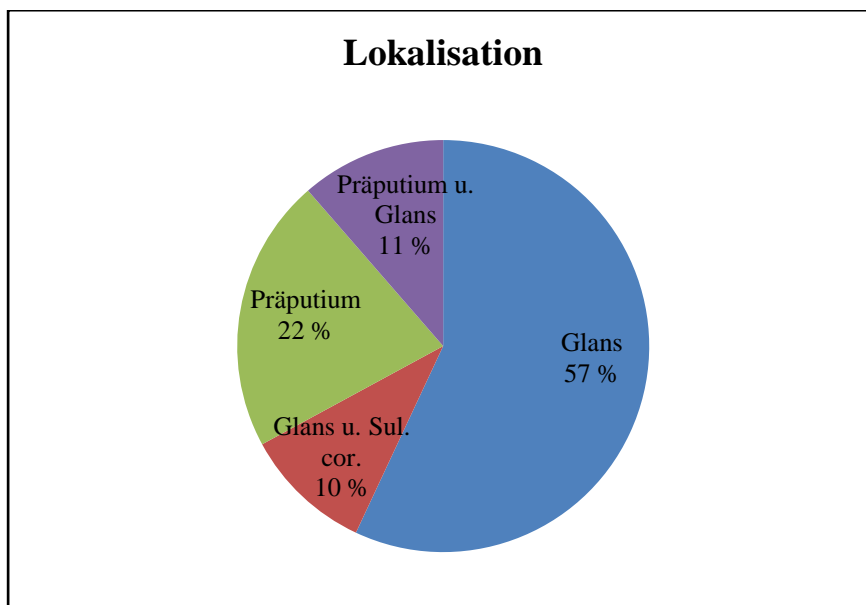


Abbildung 6: Anzahl der Peniskarzinome in Bezug auf die Lokalisation.

4.1.7 Eindringtiefe des Tumors

Bei 21 Patienten drang der Tumor weniger als 5 mm oder tiefer als 5 mm in das Gewebe ein. Bei 58 Patienten bestand eine Tumorinvasion von mehr als 5 mm in das Gewebe (Abb. 7).

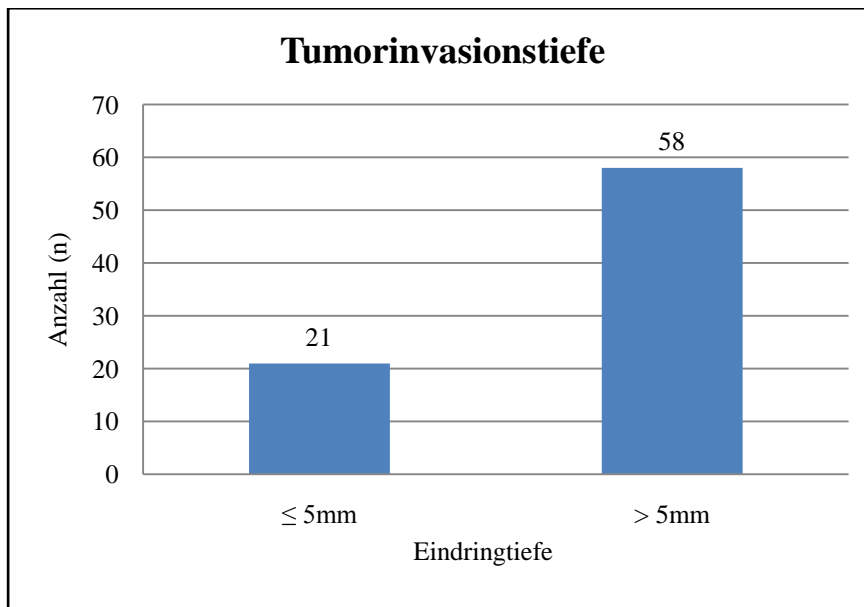


Abbildung 7: Anzahl der Peniskarzinome in Bezug auf die Invasionstiefe.

4.1.8 Lymphgefäßinvasion

52 Karzinome zeigten keine Tumorinvasion in das Lymphgefäßsystem der Tumorregion (L0).
27 Peniskarzinome wiesen eine Lymphgefäßinvasion (L1) auf (Abb. 8).

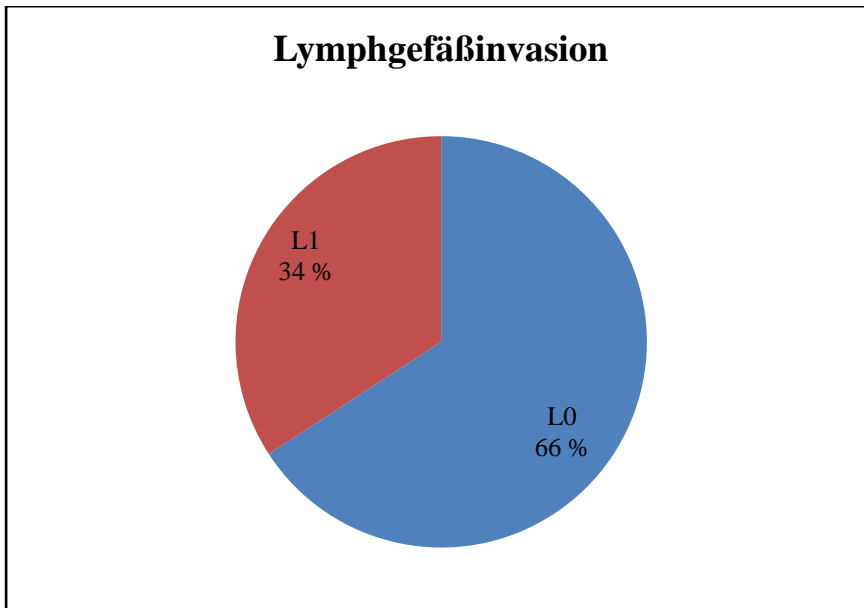


Abbildung 8: Anzahl der Peniskarzinome in Bezug auf die Lymphgefäßinvasion.

4.1.9 Blutgefäßinvasion

75 der untersuchten Peniskarzinome zeigten keine Blutgefäßinvasion (V0) und 4 Karzinome wiesen eine Blutgefäßinvasion (V1) auf (Abb. 9).

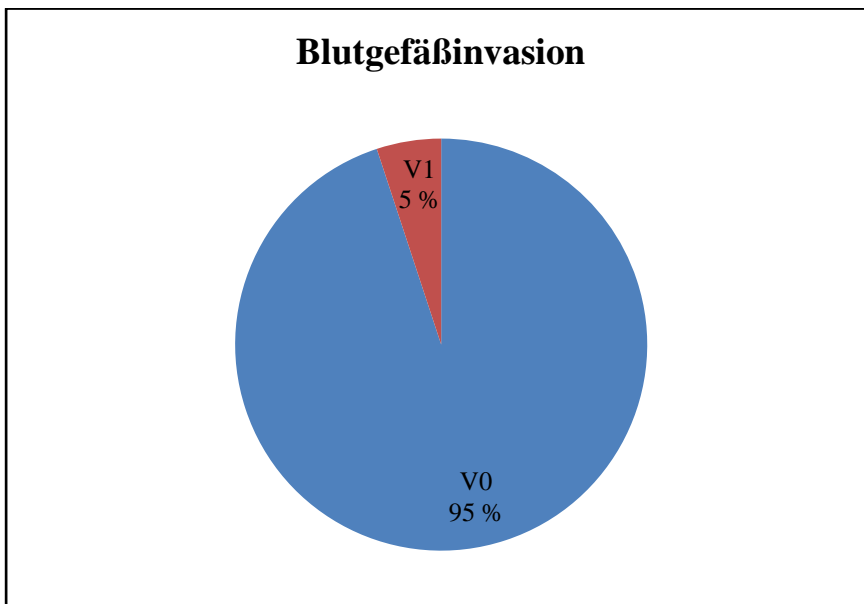


Abbildung 9: Anzahl der Peniskarzinome in Bezug auf die Blutgefäßinvasion.

4.1.10 Perineurale Invasion

In 64 Fällen konnte keine perineurale Invasion (Pn0) beobachtet werden, wo hingegen bei 15 Fällen eine perineurale Invasion (Pn1) vorhanden war (Abb. 10).

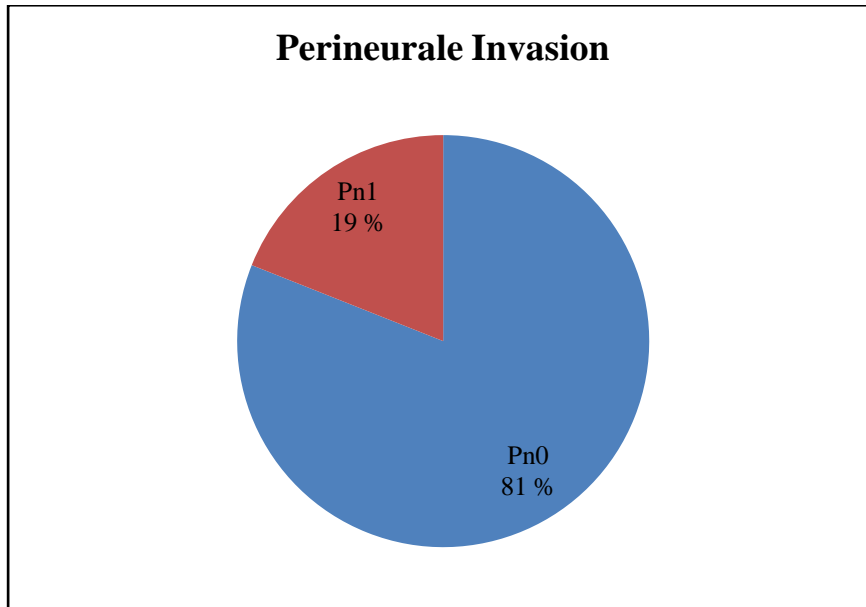


Abbildung 10: Anzahl der Peniskarzinome in Bezug auf die Perineurale Invasion (Perineurale Invasion = Pn1; keine Perineurale Invasion = Pn0).

4.1.11 Invasion des Corpus cavernosum

72 Patienten zeigten keine Tumorinvasion in die Corpora cavernosa (CC0). In 7 Fällen infiltrierte der Tumor die Corpora cavernosa (CC1) (Abb. 11).

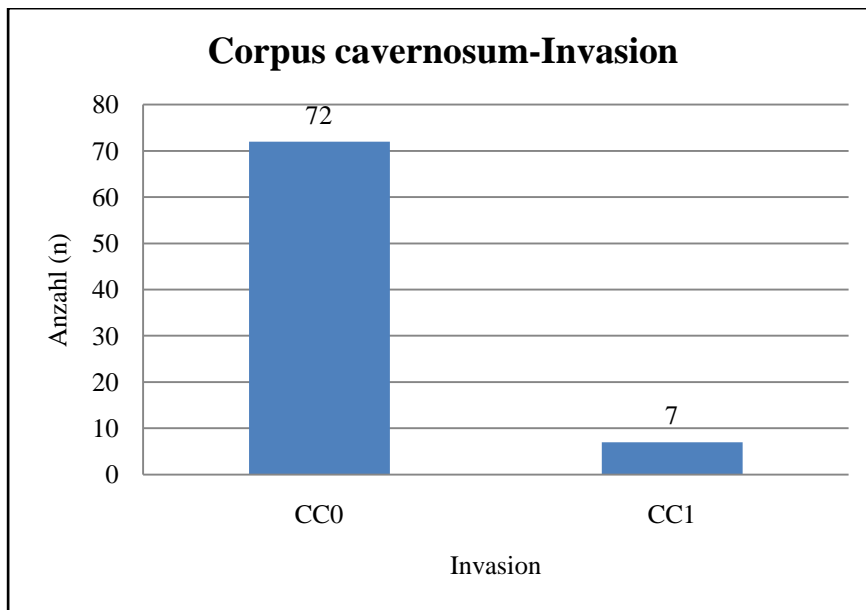


Abbildung 11: Anzahl der Peniskarzinome in Bezug auf die CC-Invasion (keine Corpora cavernosa Invasion = CC0; Corpora cavernosa Invasion = CC1).

4.1.12 Invasion des Corpus spongiosum

Bei 38 Patienten kam es zu einer Tumordinvasion in das Corpus spongiosum (CS1) und bei 41 Patienten infiltrierte der Tumor das Corpus spongiosum (CS0) nicht (Abb. 12).

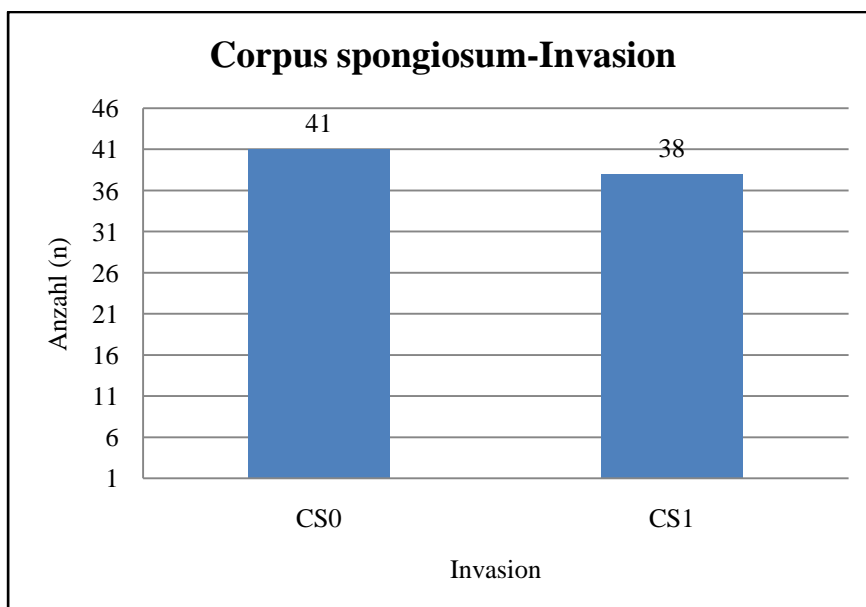


Abbildung 12: Anzahl der Peniskarzinome in Bezug auf die CS-Invasion (Invasion des Corpus spongiosum = CS1; keine Invasion des Corpus spongiosum = CS0).

4.1.13 Invasion der Urethra

Bei 16 Patienten wurde eine Tumorinvasion der Urethra (U1) diagnostiziert und bei 63 Patienten kam es nicht zu einer Invasion der Urethra (U0) (Abb. 13).

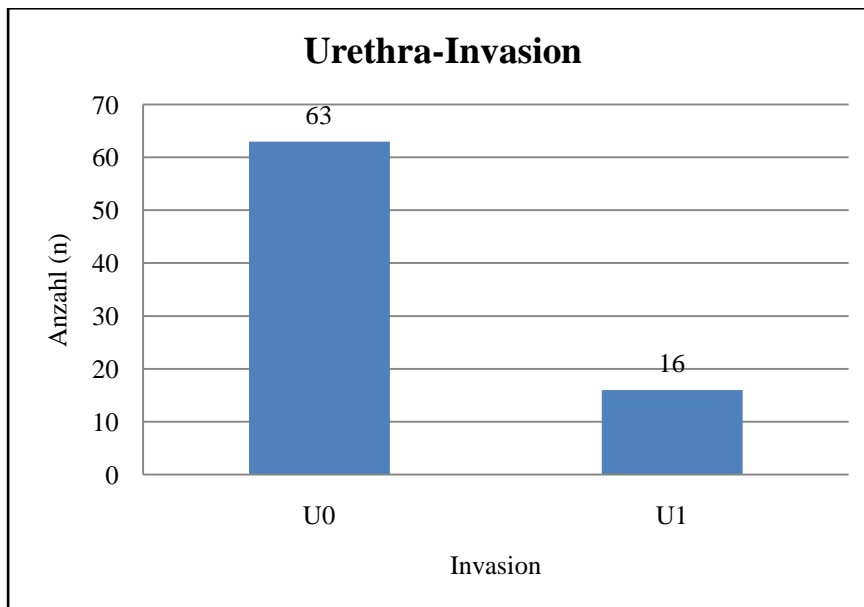


Abbildung 13: Anzahl der Peniskarzinome in Bezug auf die Urethra-Invasion (Tumorinvasion der Urethra = U1; keine Invasion der Urethra = U0).

4.1.14 Invasionsmuster

48 der untersuchten Peniskarzinome zeigten ein infiltratives Invasionsmuster und 31 Karzinome wuchsen expansiv (pushing) (Abb. 14).

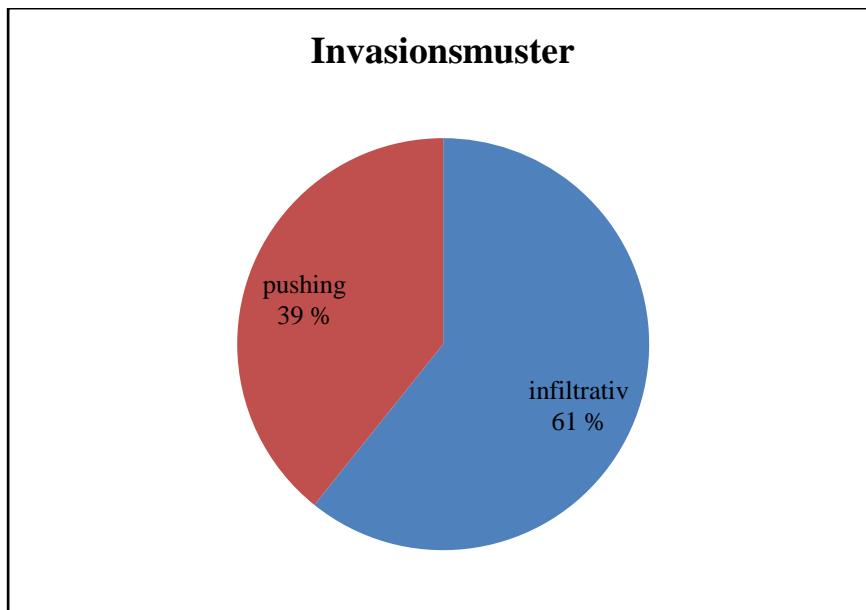


Abbildung 14: Anzahl der Peniskarzinome in Bezug auf das Invasionsmuster.

4.1.15 pT-Kategorie

25 der untersuchten Peniskarzinome infiltrierte das subepitheliale Bindegewebe ohne lymphovaskuläre Invasion und waren nicht schlecht oder undifferenziert (pT1a). 16 Fälle infiltrierte das subepitheliale Gewebe mit entweder lymphovaskulärer Invasion oder waren schlecht oder undifferenziert (pT1b). In 21 Fällen infiltrierte der Tumor entweder das Corpus spongiosum oder die Corpora cavernosa (pT2). 17 Tumoren infiltrierte die Urethra (pT3) (Abb. 15).

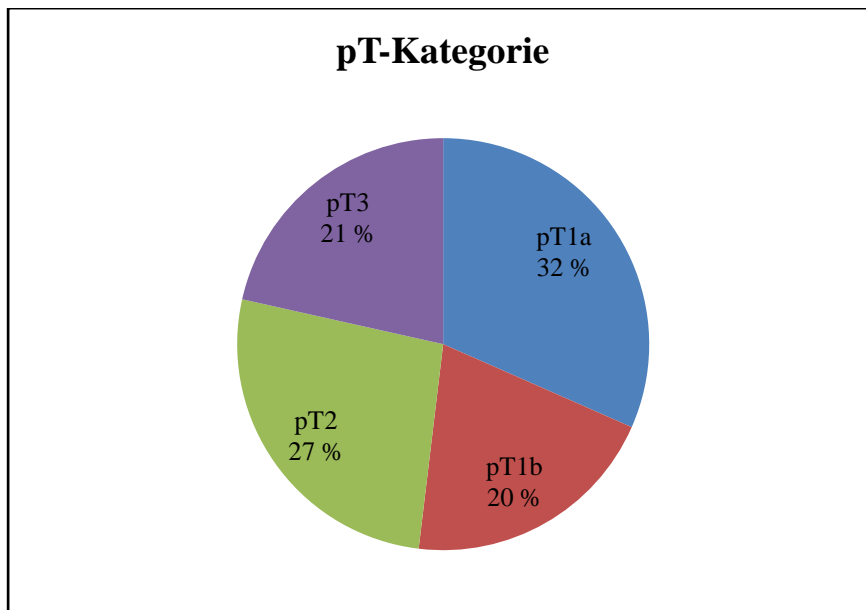


Abbildung 15: Anzahl der Peniskarzinome in Bezug auf die pT-Kategorie.

4.1.16 pN-Kategorie

In 57 Fällen konnten die regionären Lymphknoten nicht beurteilt werden, da diese 57 Patienten nicht lymphadenektomiert wurden (pNX). In 7 Fällen konnten keine regionären Lymphknotenmetastasen festgestellt werden (pN0). Bei 15 Patienten konnten Lymphknotenmetastasen detektiert werden (pN+) (Abb. 16). Zur Vereinfachung der Auswertung wurde das pN-Stadium in 3 Kategorien bewertet: pN0 = keine regionären Lymphknotenmetastasen, pN+ = regionäre Lymphknotenmetastasen vorhanden, pNX = regionäre Lymphknoten nicht zu beurteilen.

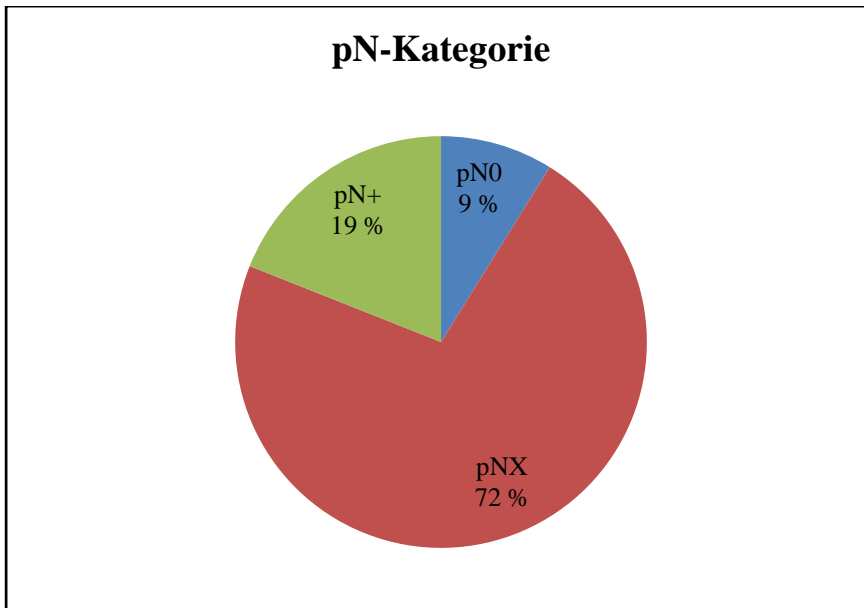


Abbildung 16: Anzahl der Peniskarzinome in Bezug auf die pN-Kategorie.

4.1.17 Grading

Von den 79 untersuchten Peniskarzinomen waren 16 gut differenziert (G1), 40 mäßig differenziert (G2) und 23 Tumoren schlecht differenziert (G3) (Abb. 17).

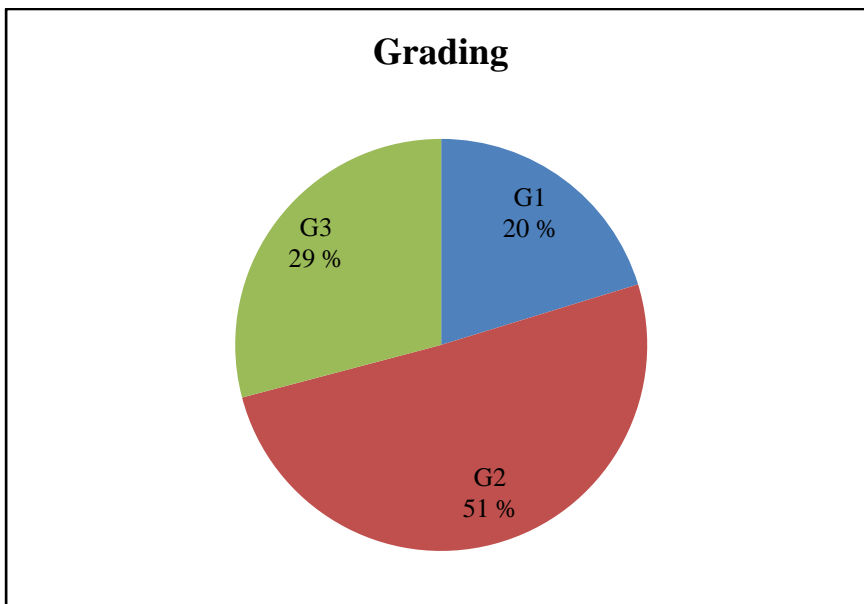


Abbildung 17: Anzahl der Peniskarzinome in Bezug auf das Grading

4.1.18 G3-Anteil

Bei 70 von 79 untersuchten Karzinomen war der G3-Anteil der gesamten Tumorfläche $< 50\%$. Bei 9 Peniskarzinomen war der G3-Anteil auf die gesamte Tumorfläche gesehen $\geq 50\%$ (Abb. 18). In vielen Tumoren lag ein unterschiedlicher Differenzierungsgrad (G1-G3) vor. Wenn in einem Tumor eine geringe Differenzierung vorlag, wurde der Differenzierungsgrad mit G3 ausgewiesen.

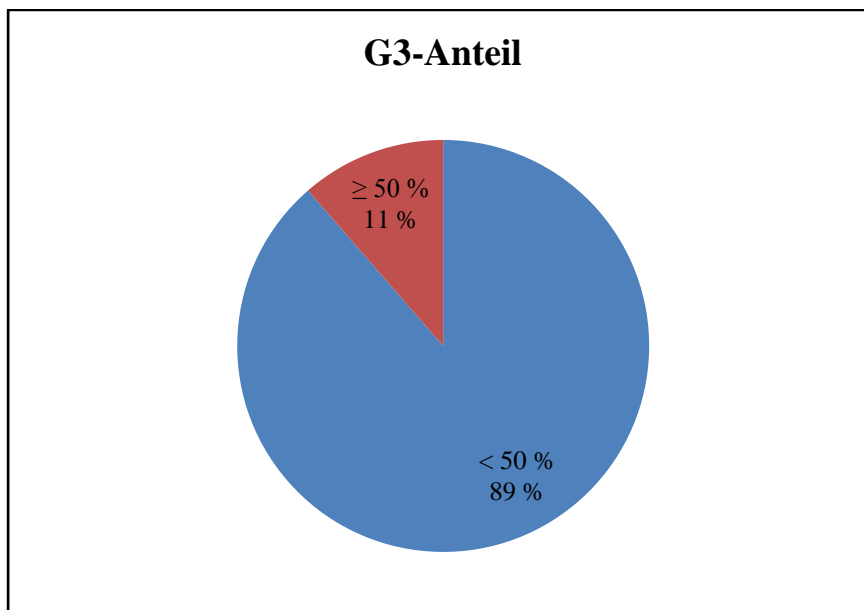


Abbildung 18: Anzahl der Peniskarzinome in Bezug auf den G3-Anteil

4.1.19 Ausmaß des Operationsverfahrens

Bei 21 Patienten wurde eine totale Penektomie (tP) durchgeführt. In 57 Fällen kam eine partielle Penektomie (pP) zur Anwendung und bei einem Patienten wurde weder eine partielle noch eine totale Penektomie (kP) angewandt (Abb. 19).

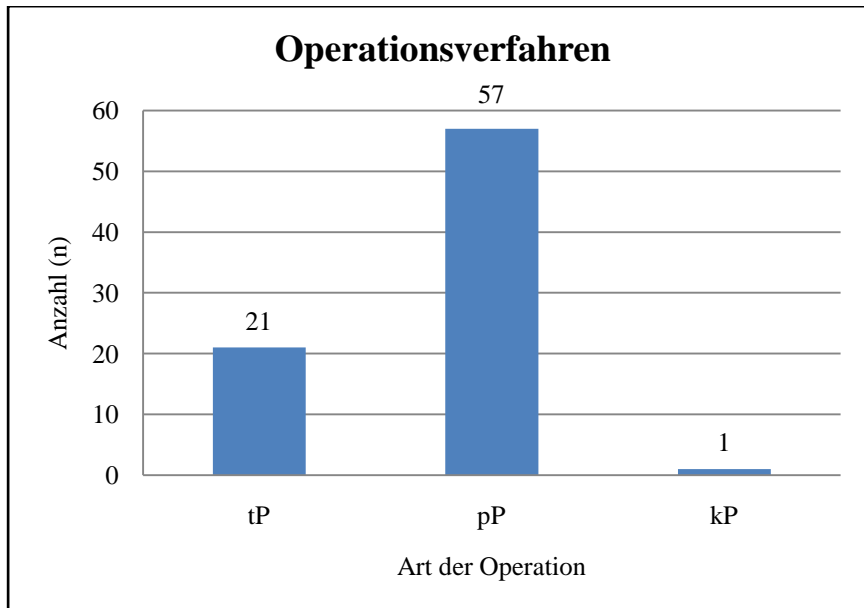


Abbildung 19: Anzahl der Peniskarzinome in Bezug auf das OP-Verfahren (totale Penektomie = tP; partielle Penektomie = pP; keine Penektomie = kP).

4.1.20 Tumorprogression

Während es bei 50 Patienten zu keiner Tumorprogression (0TP) kam, konnte in 29 Fällen eine Tumorprogression (TP) festgestellt werden (Abb. 20).

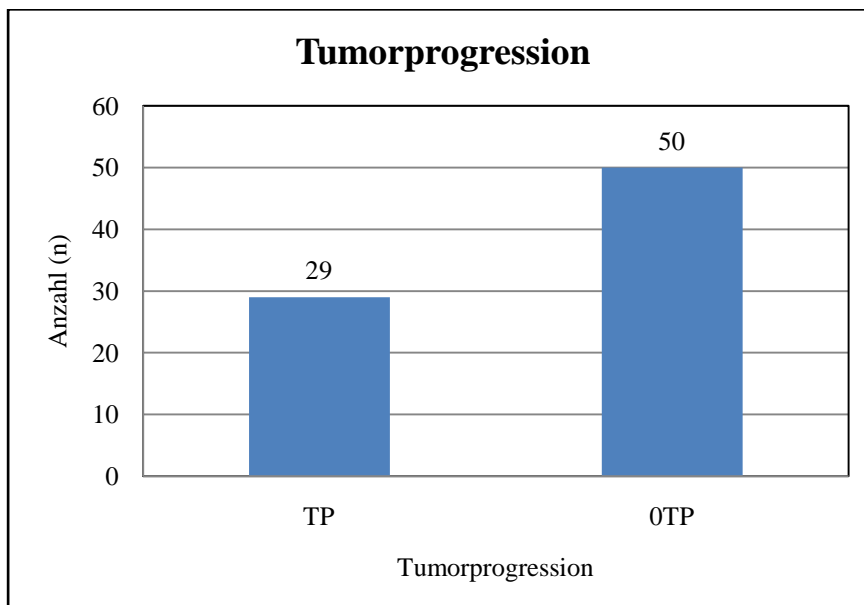


Abbildung 20: Anzahl der Peniskarzinome in Bezug auf die Tumorprogression (keine Tumorprogression = 0TP; Tumorprogression = TP).

4.1.21 Lebensstatus

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten 79 Fälle von Peniskarzinomen wurden in den Jahren 1994-2010 erstdiagnostiziert. Am 25.05.2011 lebten noch 40 der behandelten Patienten während bereits 39 verstorben waren (Abb. 21).

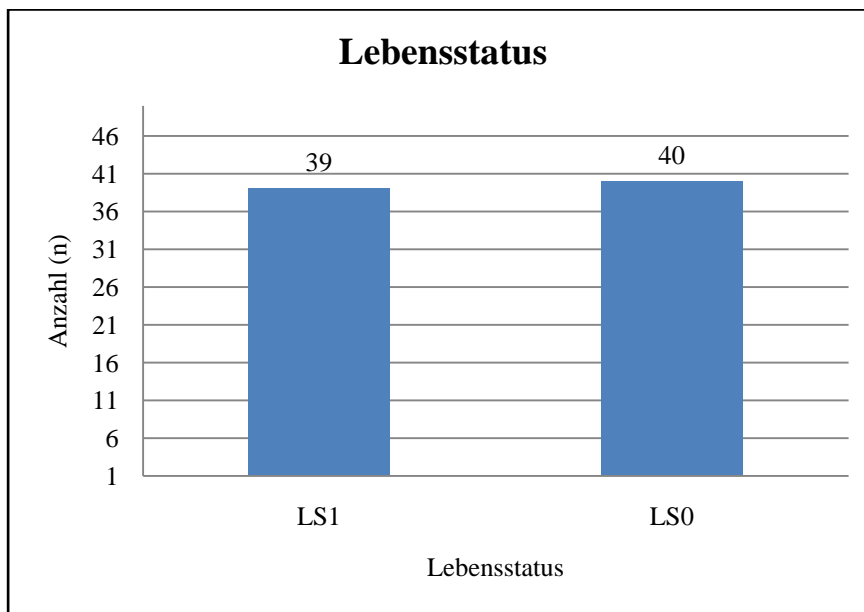


Abbildung 21: Anzahl der Peniskarzinome in Bezug auf den Lebensstatus (lebt = LS0; verstorben = LS1); Stichtag: 25.05.2011.

4.1.22 Karzinombezogener Lebensstatus

Aus der Verlaufsdokumentation des klinischen Krebsregisters des Landes Brandenburg geht hervor, dass bei 15 Patienten das Peniskarzinom die Todesursache (kLS1) darstellte. 64 Patienten sind nicht wegen des Karzinoms (kLS0) verstorben (Abb. 25).

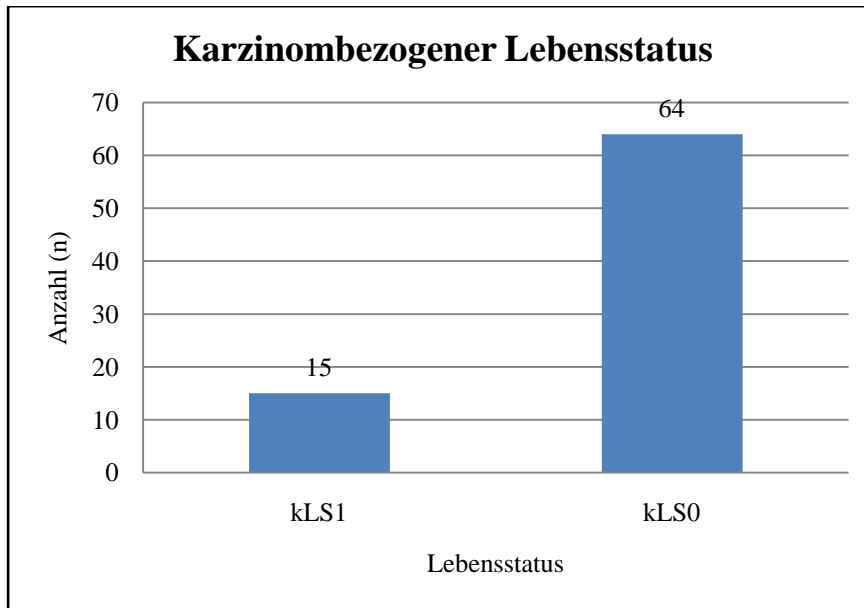


Abbildung 22: Anzahl der Peniskarzinome in Bezug auf den karzinombezogenen Lebensstatus (am Peniskarzinom verstorben = kLS1; nicht am Peniskarzinom verstorben = kLS0).

4.1.23 Follow-up

In der vorliegenden Studie wurde bei allen 79 Patienten das Follow-up durchgeführt. Dabei betrug das minimale Follow-up 1 Monat und das maximale Follow-up 111 Monate. Das mediane Follow-up lag bei 24 Monaten.

4.2 Histologische und immunhistologische Parameter

4.2.1 Anzahl der Buds

Unter dem Begriff Tumor-Budding versteht man das Vorkommen von separaten isolierten Einzelzellen oder Zellverbänden, die aus bis zu fünf Zellen bestehen (Abb. 24 und Abb. 25).

Die Tumorbuds wurden immunhistologisch mit Zytokeratin 5/6 markiert und pro Fall jeweils in 10 Gesichtsfeldern ausgezählt. Die Anzahl der ermittelten Buds wurde in drei Häufigkeitsgruppen eingeteilt: weniger als 10 Buds, 10-20 Buds und mehr als 20 Buds.

In 25 Fällen der 79 untersuchten Peniskarzinome wurden keine oder weniger als 10 Buds ausgezählt. Davon waren in 5 Fällen keine Tumorbuds nachweisbar. In 27 Fällen wurden jeweils 10-20 Buds und mehr als 20 Buds ermittelt (Abb. 23).

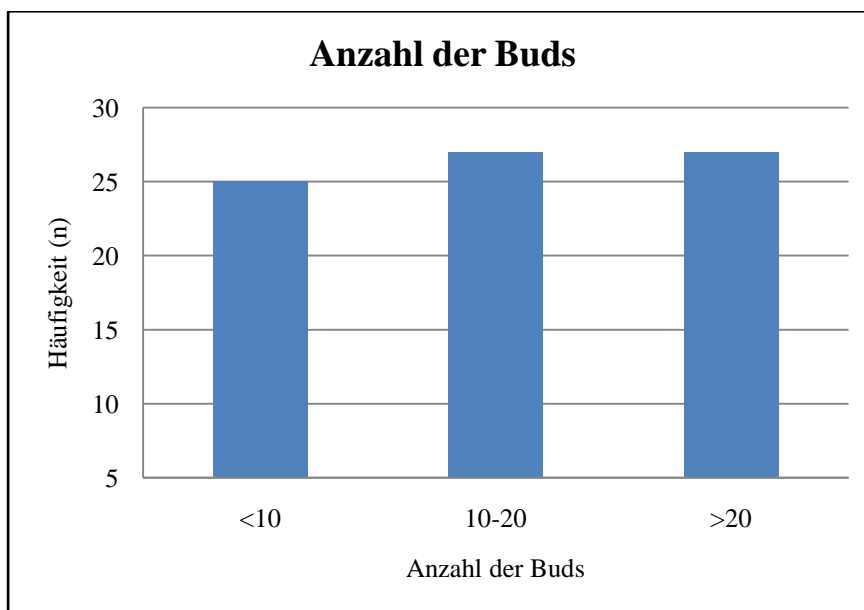


Abbildung 23: Anzahl der Peniskarzinome in Bezug auf die Anzahl der Buds.

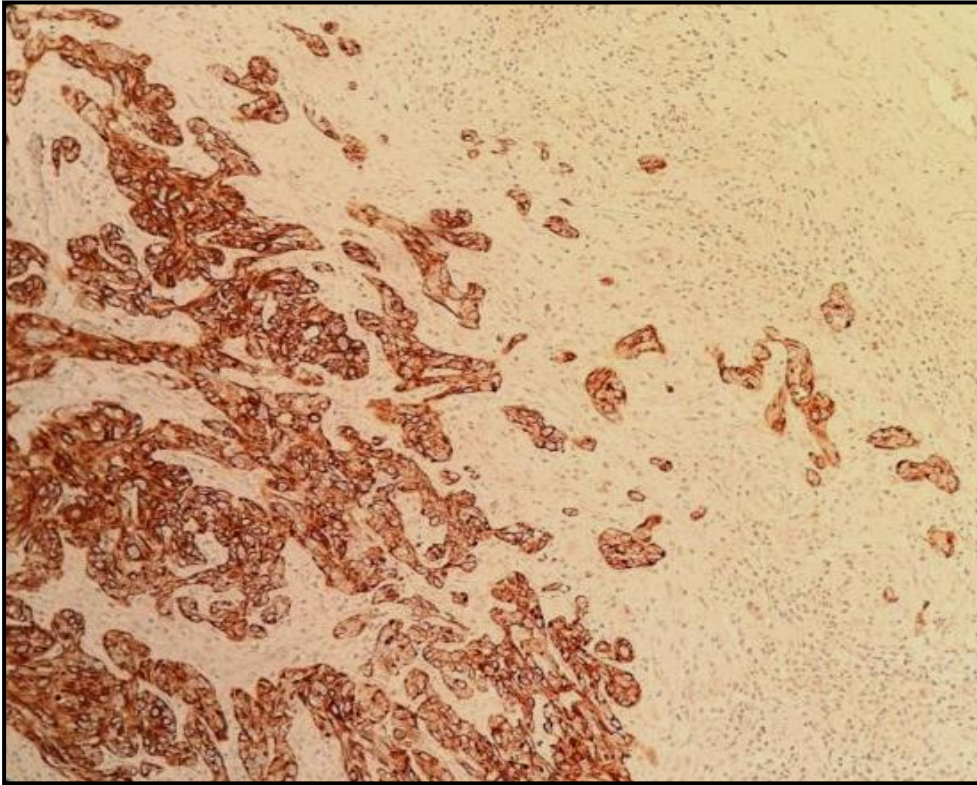


Abbildung 24: Zytokeratin 5/6-Markierung: Tumorbuds sind die an der Invasionsfront im Peniskarzinom anzutreffenden Epithelzellgruppen (≤ 5 Epithelzellen), 10-fache Vergrößerung.

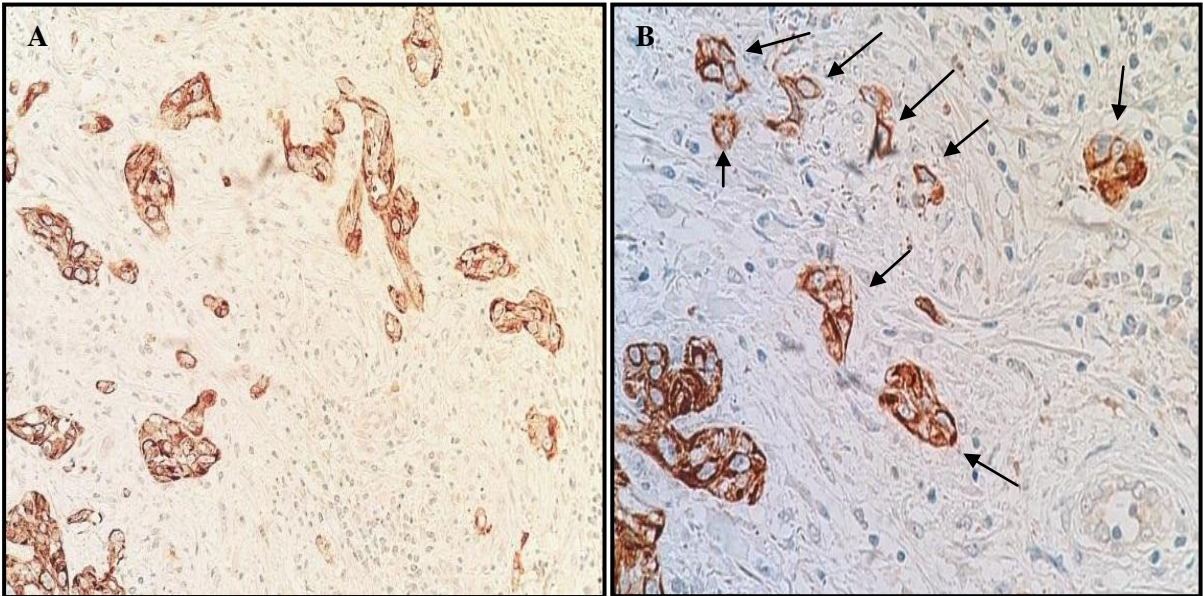


Abbildung 25: Zytokeratin 5/6-Markierung: A: Tumorbuds an der Invasionsfront im Peniskarzinom, 20-fache Vergrößerung. B: Tumorbuds (Pfeile) an der Invasionsfront im Peniskarzinom im Detail, 40-fache Vergrößerung.

4.2.2 Anzahl der Blutgefäße

Durch die CD34-Markierung wurde festgestellt, dass vor der Invasionsfront des Peniskarzinoms eine deutliche Zunahme kapillärer Blutgefäße bzw. von Blutgefäßanschnitten besteht. Diese markierten Gefäße wurden in jeweils 10 Gesichtsfeldern bei einer 400-fachen Vergrößerung ausgezählt. Die Einteilung erfolgte in drei Gruppen. In 26 Peniskarzinomen wurden weniger als 150 Blutgefäße, in 27 Karzinomen 150-200 Blutgefäße und in 26 Fällen mehr als 200 Blutgefäße gezählt (Abb. 26, Abb. 27, Abb. 28). Somit war in der Mehrheit der Fälle (n = 53) eine erhöhte Anzahl von Blutgefäßanschnitten nachweisbar, während bei 26 Fällen weniger als 150 Gefäßanschnitte/10 Gesichtsfelder gefunden wurden

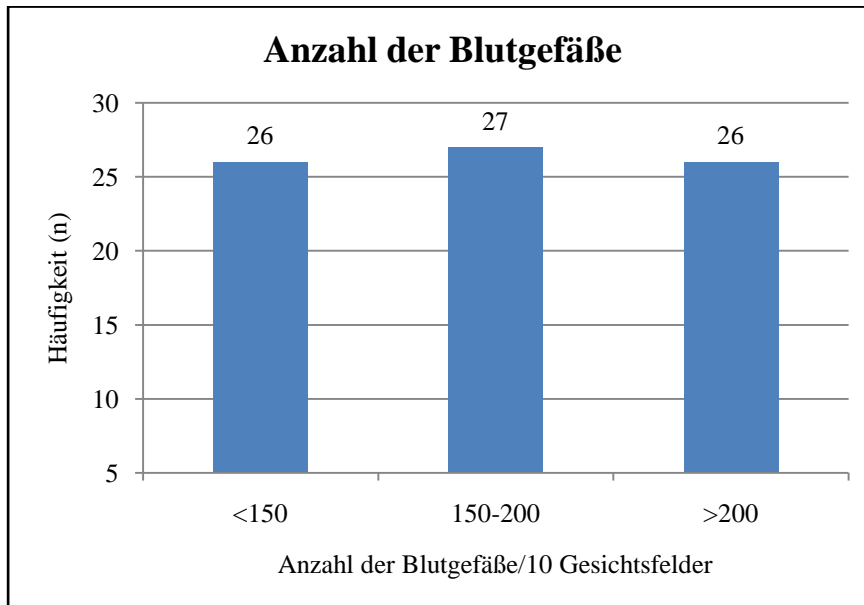


Abbildung 26: Anzahl der Peniskarzinome in Bezug auf die Anzahl der Blutgefäße vor der Invasionsfront.

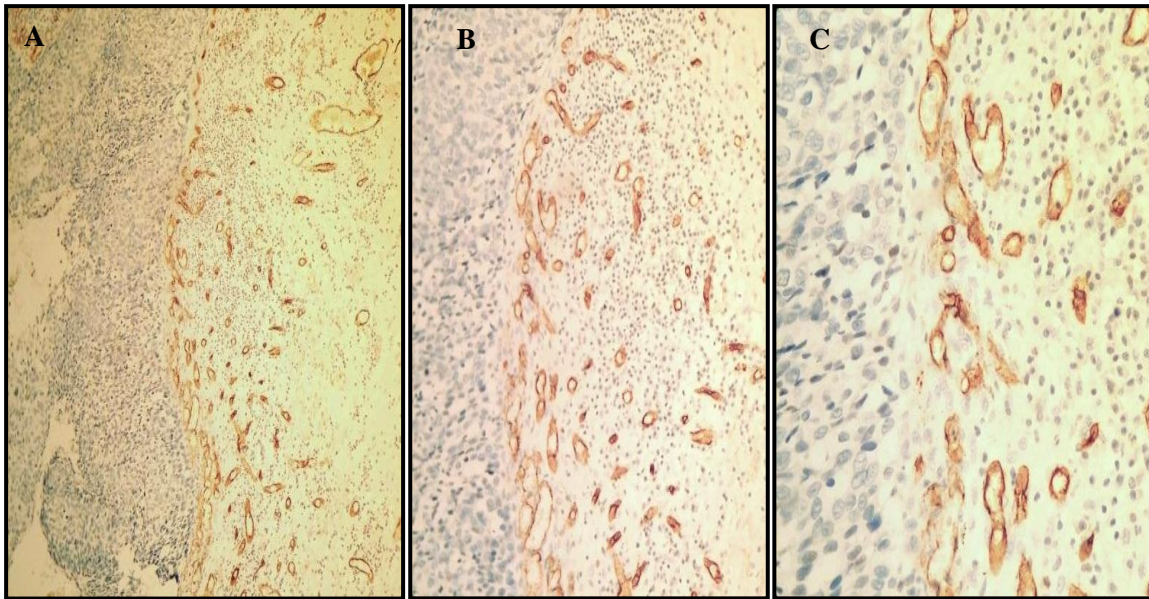


Abbildung 27: CD 34-Markierung; Peniskarzinom mit > 200 Blutgefäßen: A: Übersicht der positiv markierten Blutgefäße im Stroma angrenzend an die Invasionsfront eines Peniskarzinoms, 10-fache Vergrößerung. B: 20-fache Vergrößerung. C: 40-fache Vergrößerung.

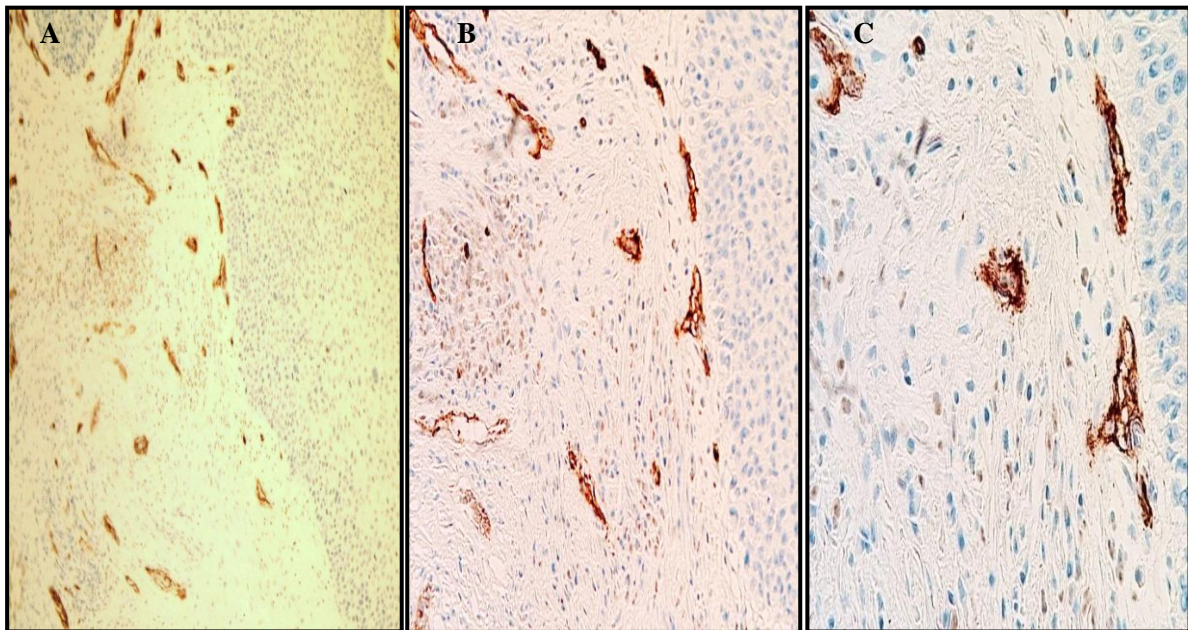


Abbildung 28: CD 34-Markierung; Peniskarzinom mit < 150 Blutgefäßen: A: Übersicht der positiv markierten Blutgefäße im Stroma angrenzend an die Invasionsfront eines Peniskarzinoms, 10-fache Vergrößerung. B: 20-fache Vergrößerung. C: 40-fache Vergrößerung.

4.2.3 Cyclin D1 in Buds

Untersucht wurde die Markierung der Buds mit dem Marker Cyclin D1 (Abb. 30). Insgesamt liegen 79 Beobachtungen vor. Mit dem Antikörper Cyclin D1 wird eine nukleäre Markierung bei positivem Reaktionsausfall beobachtet.

Bei 33 Peniskarzinomen waren mehr als 50 % der Buds mit Cyclin D1 angefärbt (Abb. 29). In 31 Fällen waren weniger als 50 % der Buds mit Cyclin D1 markiert.

In 15 Fällen konnten entweder keine Buds festgestellt werden oder die Buds waren nicht markiert. Diese Beobachtungen wurden in der Gruppe „keine Buds oder negative Markierung der Buds“ zusammengefasst.

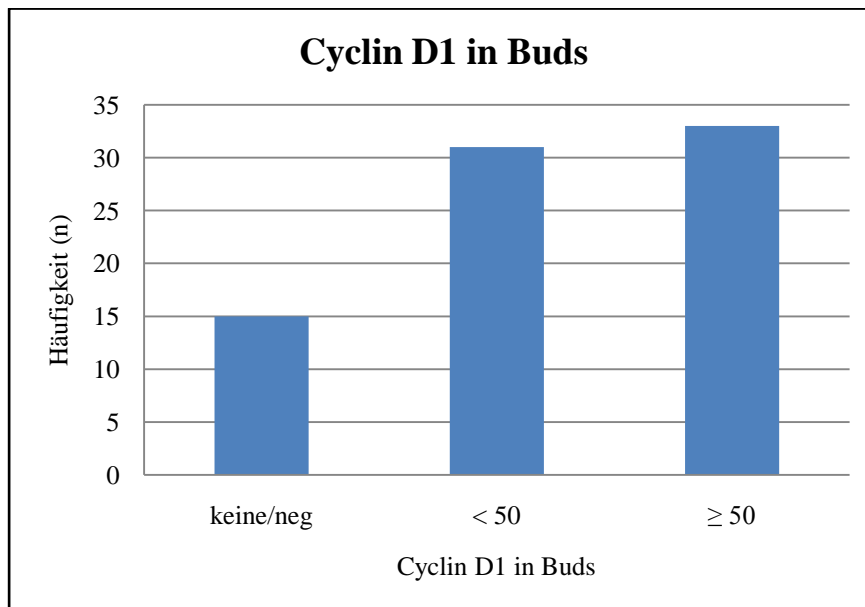


Abbildung 29: Anzahl der Peniskarzinome in Bezug auf die Cyclin-D1-Markierung der Buds.

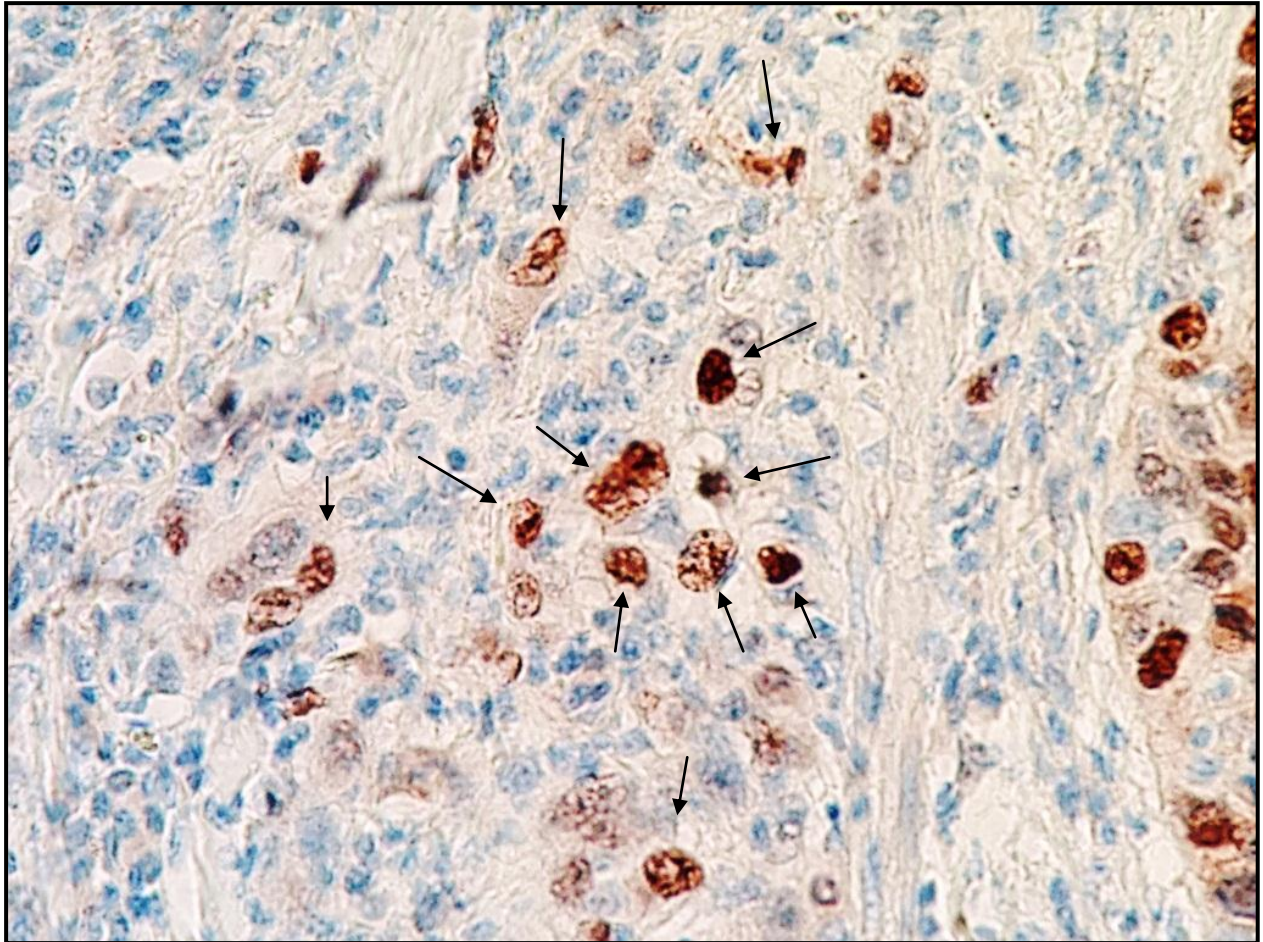


Abbildung 30: Cyclin-D1-Markierung: Tumorbuds (Pfeile) an der Invasionsfront im Peniskarzinom, 40-fache Vergrößerung. Nicht markiert (blau): Lymphozyten und Bindegewebszellen vor der Invasionsfront. Rechter Bildrand: kompakte Tumorverbände.

4.2.4 p16 in den Buds

Es wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen der p16-Expression und den Buds besteht (Abb. 32 und Abb. 33). In Bezug auf das Tumorbudding konnten in 10 Fällen keine Buds detektiert werden. Von den verbleibenden 69 Fällen wurden in 34 Fällen (zumeist stark) markierte Buds gefunden. In 35 Fällen war die p16-Reaktion in den Buds negativ (Abb. 31).

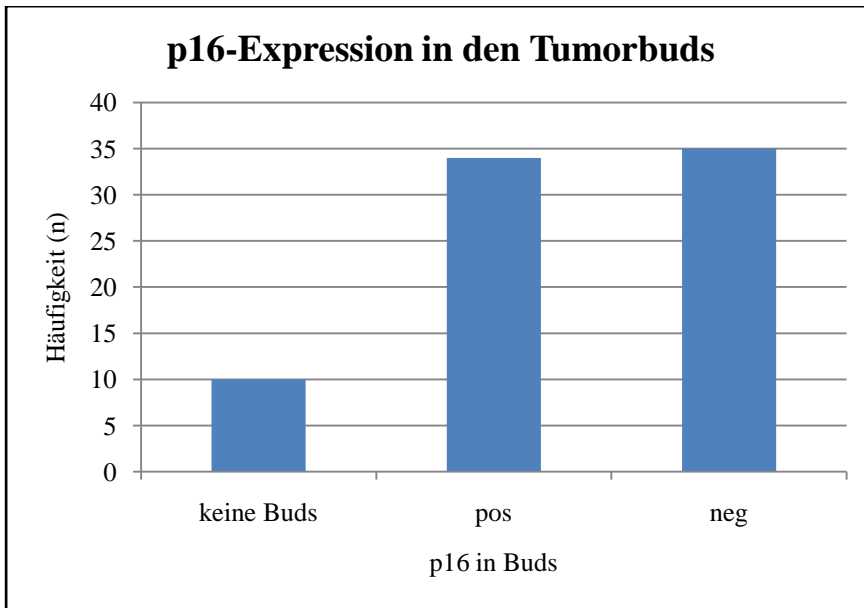


Abbildung 31: Anzahl der Peniskarzinome in Bezug auf die p16-Markierung in den Buds

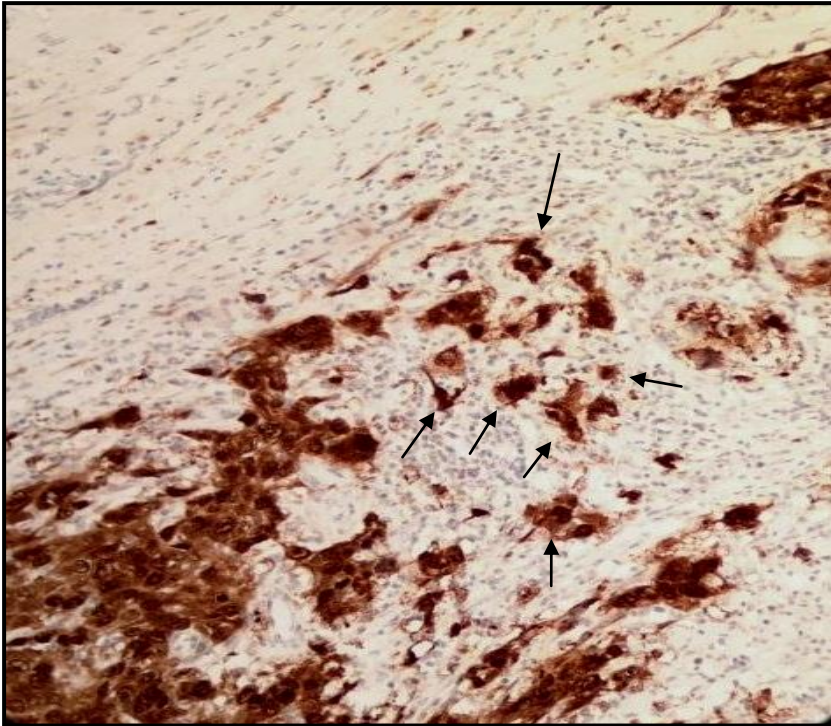


Abbildung 32: p16-Markierung: Tumorbus (Pfeile) an der Invasionsfront im Peniskarzinom, 20-fache Vergrößerung.

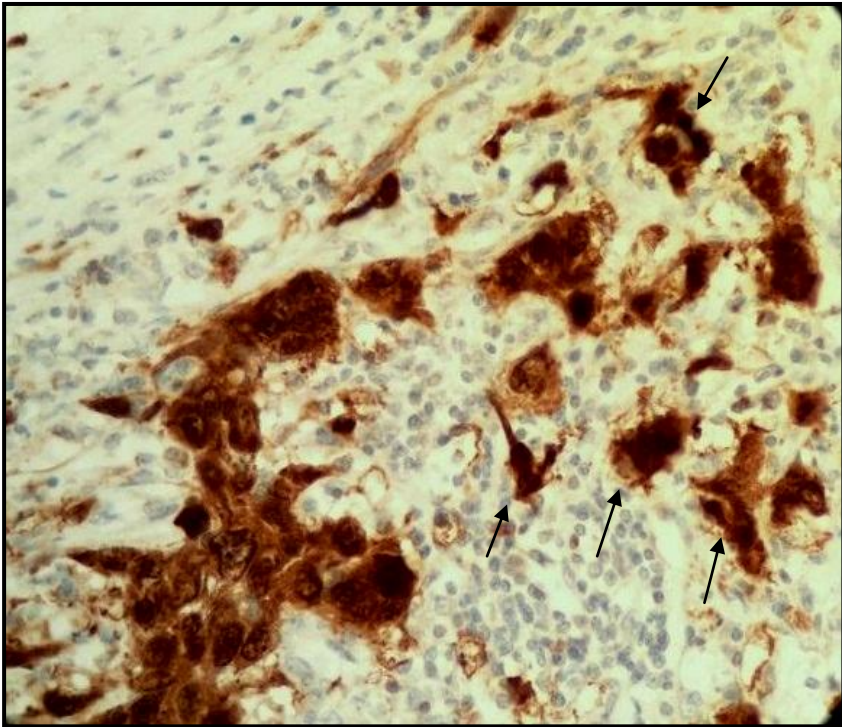


Abbildung 33: p16-Markierung: Tumorbus (Pfeile) an der Invasionsfront im Peniskarzinom, 40-fache Vergrößerung.

4.2.5 E-Cadherin im Zentrum des Tumors

Es wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen den Tumorzellen der Tumormasse und E-Cadherin besteht.

Das Färbungsverhalten der Tumorzellen der Tumormasse wurde mit Hilfe des immunreaktiven Scores ausgewertet (s. Kap. 3.4). Um eine statistische Auswertung zu ermöglichen, wurden die Klassen des IRS (0-12) in drei Gruppen zusammengefasst. Dabei besteht die Gruppe „schwache Markierung“ aus den IRS-Werten 3 und 4, sowie aus den Fällen die negativ markiert waren. Die IRS-Werte 6, 8 und 9 wurden in der Gruppe „mäßige Markierung“ zusammengefasst und der IRS-Wert 12 stellt die Gruppe „starke Markierung“ dar.

In 12 Fällen wurden die Tumorzellen der Tumormasse schwach angefärbt. In 31 Peniskarzinomen kam es zu einer mäßigen Markierung und in 36 Fällen wurde eine starke Färbung beobachtet (Abb. 34).

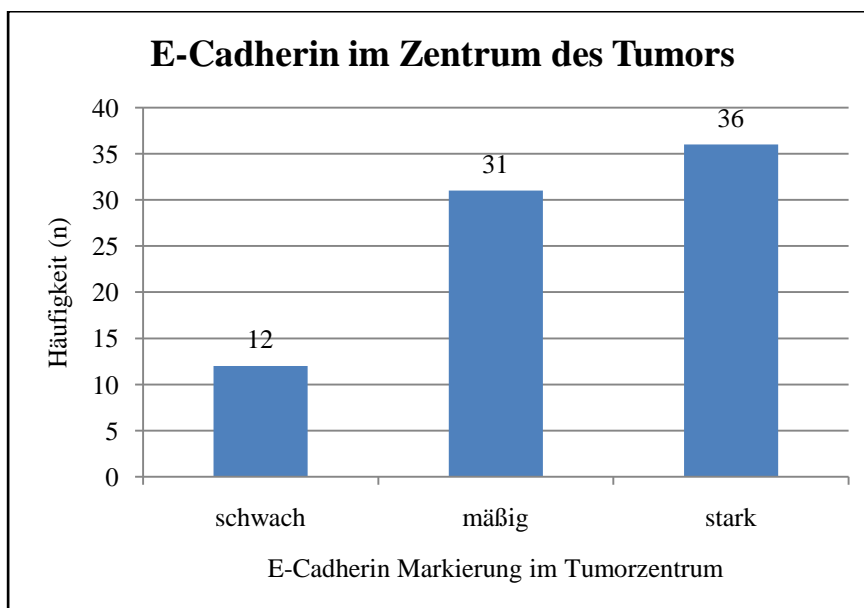


Abbildung 34: Anzahl der Peniskarzinome in Bezug auf die E-Cadherin-Markierung der Tumormasse.

4.2.6 E-Cadherin in den Tumorzellen der Invasionsfront

Untersucht wurde die Beziehung zwischen E-Cadherin und den Tumorzellen der Invasionsfront (IF). Die Markierungsintensität der Tumorzellen der Invasionsfront wurde mit Hilfe des immunreaktiven Scores ausgewertet (s. Kap. 3.4). Um eine statistische Auswertung zu ermöglichen, wurden die Klassen des IRS (0-12) in vier Gruppen zusammengefasst. Die Gruppe „schwache Markierung“ besteht aus den IRS-Werten 0, 3 und 4 und aus den Fällen, die eine negative Markierung aufwiesen. Die Gruppe „mäßig-schwache Markierung“ beinhaltet die IRS-Werte 5, 6 und 8. Der IRS-Wert 9 bildet die Gruppe „mäßige Markierung“ und die IRS-Werte 12 und 16 wurden in der Gruppe „starke Markierung“ zusammengefasst.

In 12 Fällen wurden die Tumorzellen der Invasionsfront schwach angefärbt. In 14 Fällen fiel die Markierung mäßig-schwach aus. Während es bei 24 Peniskarzinomen zu einer mäßigen Anfärbung kam, konnte in 29 Fällen eine starke Markierungsintensität beobachtet werden (Abb. 35).

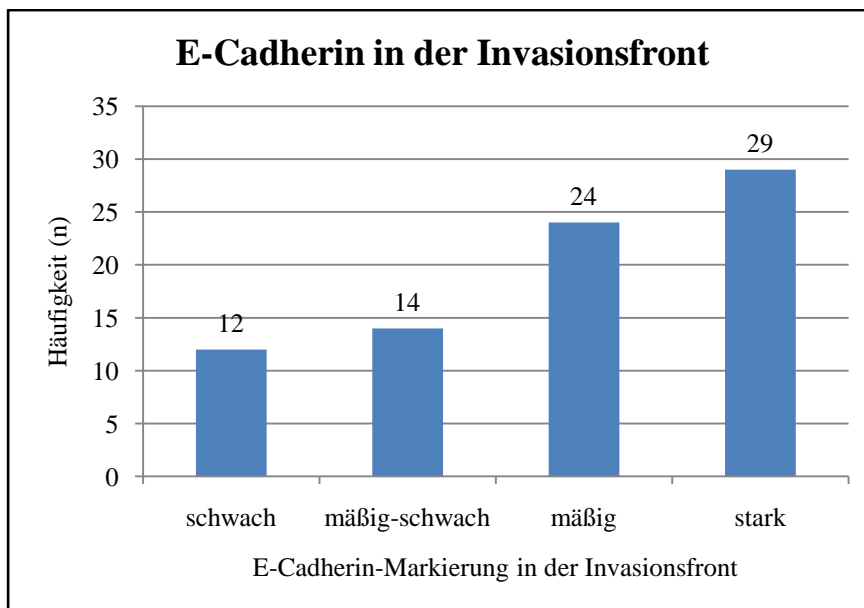


Abbildung 35: Anzahl der Peniskarzinome in Bezug auf die E-Cadherin-Markierung in der Invasionsfront.

4.2.7 E-Cadherin in den Buds

Ferner wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen E-Cadherin-Markierung und den Tumorbudens besteht (Abb. 37). Das Färbungsverhalten der Buds wurde mit Hilfe des immunreaktiven Scores ausgewertet (s. Kap. 3.4). Es wurde eine Zusammenfassung der IRS-Klassen (0-12) in drei Gruppen vorgenommen, um eine statistische Auswertung zu ermöglichen. Die Gruppe „schwache Markierung“ wurde aus den IRS-Werten 0, 2, 3 und 4 zusammengefasst. Die IRS-Werte 6 und 8 bilden die Gruppe mäßige Markierung und die IRS-Wert-Werte 9 und 12 stellen die Gruppe starke Markierung dar. Bei 25 Peniskarzinomen konnte eine schwache Färbereaktion in den Buds beobachtet werden. In 21 Fällen kam es zu einer mäßigen Anfärbung der Buds gegenüber E-Cadherin und in 33 Fällen fiel die Markierungsintensität stark aus (Abb. 36).

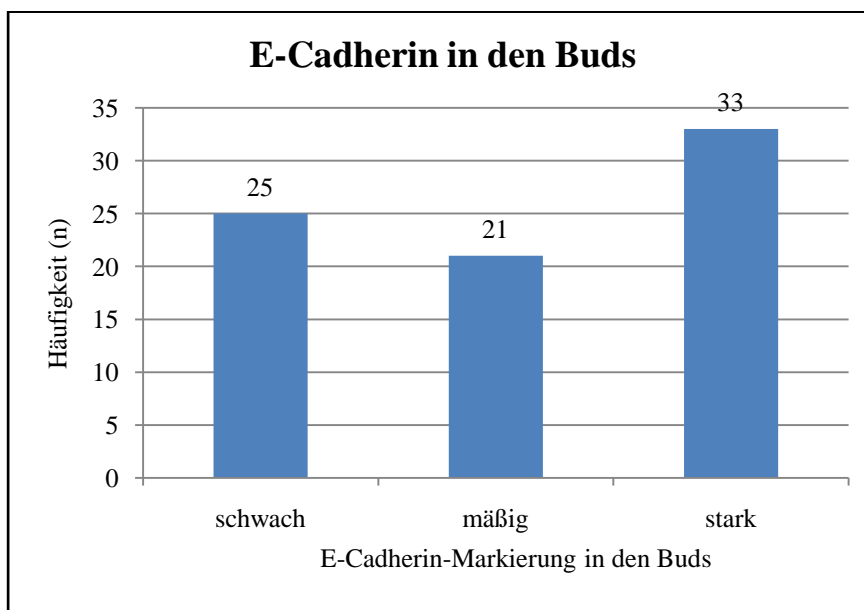


Abbildung 36: Anzahl der Peniskarzinome in Bezug auf die E-Cadherin-Markierung in den Buds.

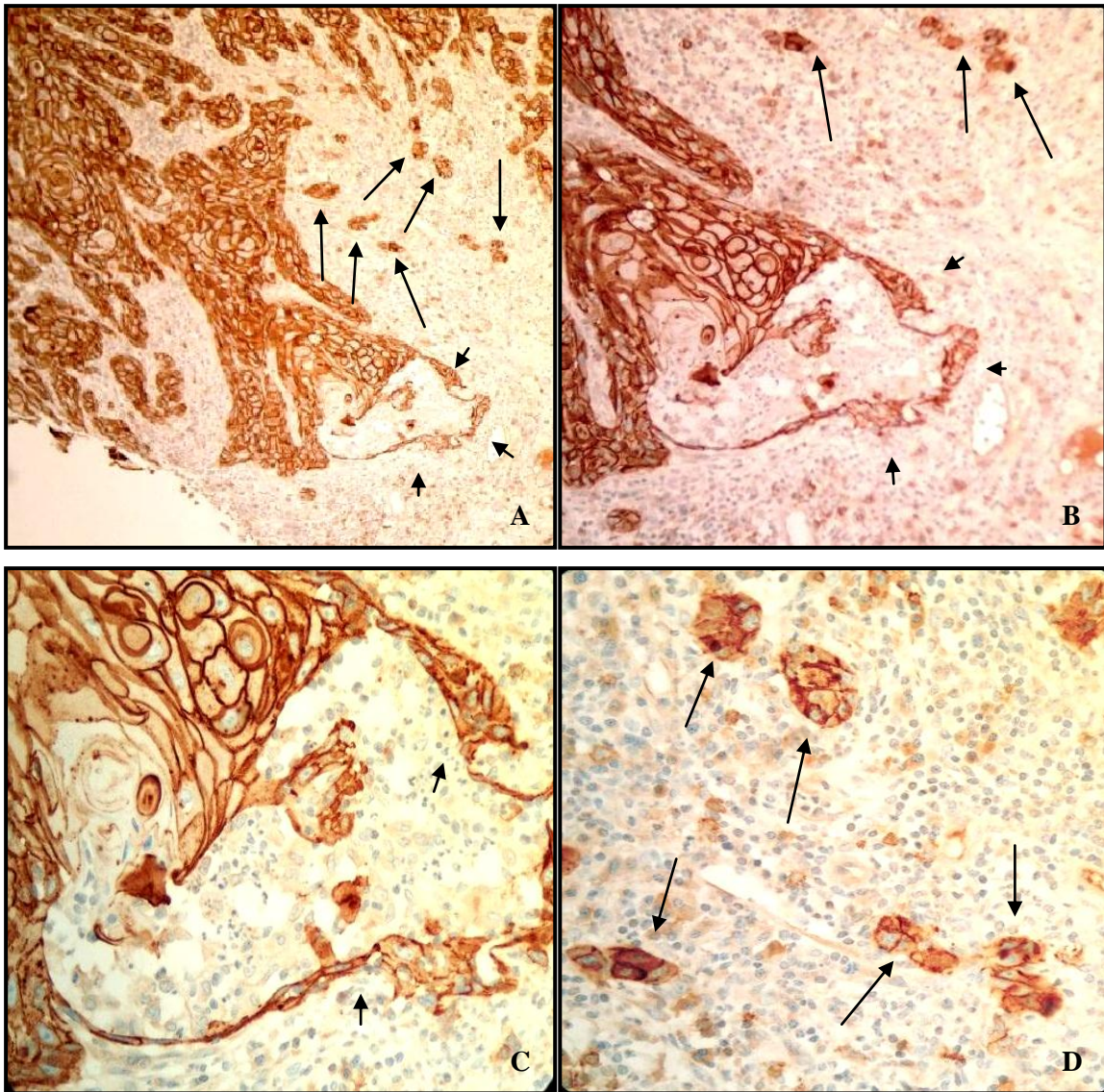


Abbildung 37: E-Cadherin-Markierung: A: Übersicht der Invasionsfront eines Peniskarzinoms mit Tumorausläufern (kurze Pfeile) und Tumorbuds (lange Pfeile), 10-fache Vergrößerung. B: Tumorausläufer (kurze Pfeile) und Buds (lange Pfeile), 20-fache Vergrößerung. C: fingerförmige Tumorausläufer (Pfeile) im Detail, 40-fache Vergrößerung. D: Tumorbuds im Detail (Pfeile), 40-fache Vergrößerung.

4.2.8 Vimentin im Stroma

Untersucht wurde, ob die Vimentin-Markierung der Zellen des Tumorstromas positiv oder negativ ausfiel.

In 77 Fällen kam es zu einer Färbung der Stromazellen. In zwei der untersuchten Peniskarzinome fiel die Markierung negativ aus (Abb. 38).

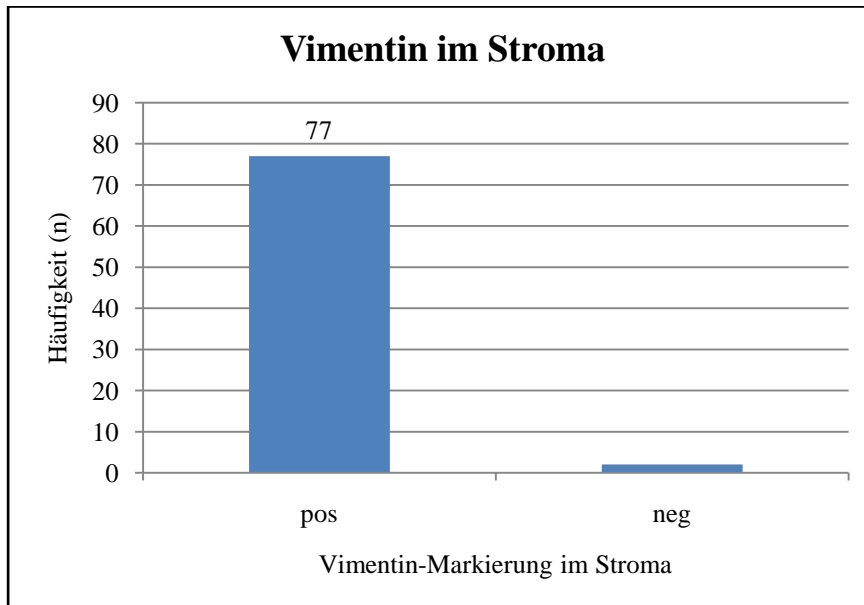


Abbildung 38: Anzahl der Peniskarzinome in Bezug auf die Vimentin-Markierung der Stromazellen.

4.2.9 Vimentin in den Tumorzellen der Invasionsfront

Untersucht wurde, ob auch die epithelialen Tumorzellen an der Invasionsfront eine Markierung mit Vimentin aufweisen, oder ob die Vimentin-Positivität nur ein Phänomen der Stromazellen darstellt (s. Abschn. 4.2.8). Das Markierungsverhalten wurde mit positiv oder negativ bewertet. Bei 21 Peniskarzinomen konnte eine positive Vimentin-Markierung der Tumorzellen an der Invasionsfront festgestellt werden, wo hingegen in 58 Fällen keine Färbung gegen Vimentin beobachtet wurde (Abb. 39).

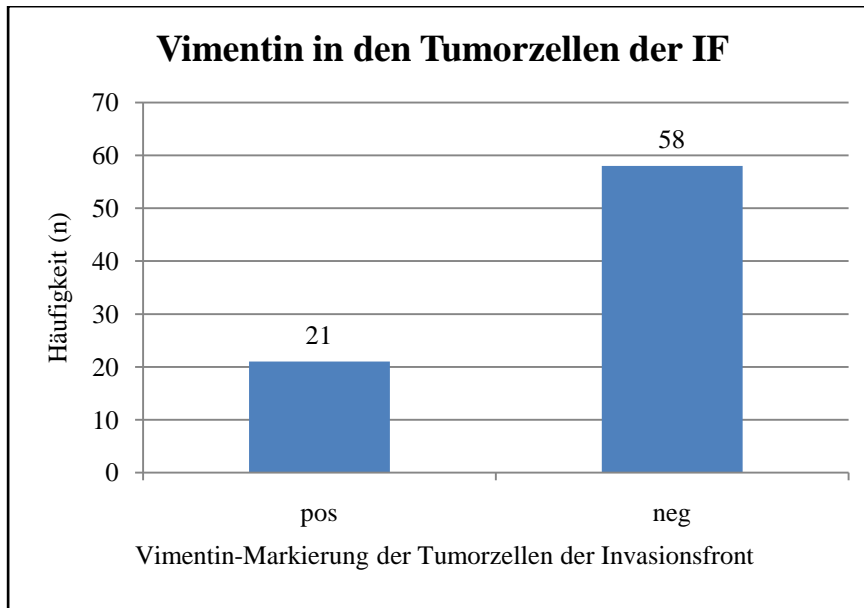


Abbildung 39: Anzahl der Peniskarzinome in Bezug auf die Vimentin-Markierung der Tumorzellen der Invasionsfront (IF).

4.2.10 Vimentin im Zentrum des Tumors

Analog zur Überprüfung, ob die Tumorzellen in der Invasionsfront eine (Ko-) Expression von Vimentin zeigen (vgl. Abschn. 4.2.9), wurde die Vimentin-Markierung epithelialer Tumorzellen im Zentrum der kompakten Tumormasse überprüft (Abb. 41 und Abb. 42). Das Markierungsverhalten der Tumorzellen wurde als positiv oder negativ beurteilt. In 3 Fällen stellte sich eine positive Färbung der Tumormasse gegen Vimentin heraus. Bei 76 Peniskarzinomen konnte eine negative Markierung der Tumormasse beobachtet werden (Abb. 40).

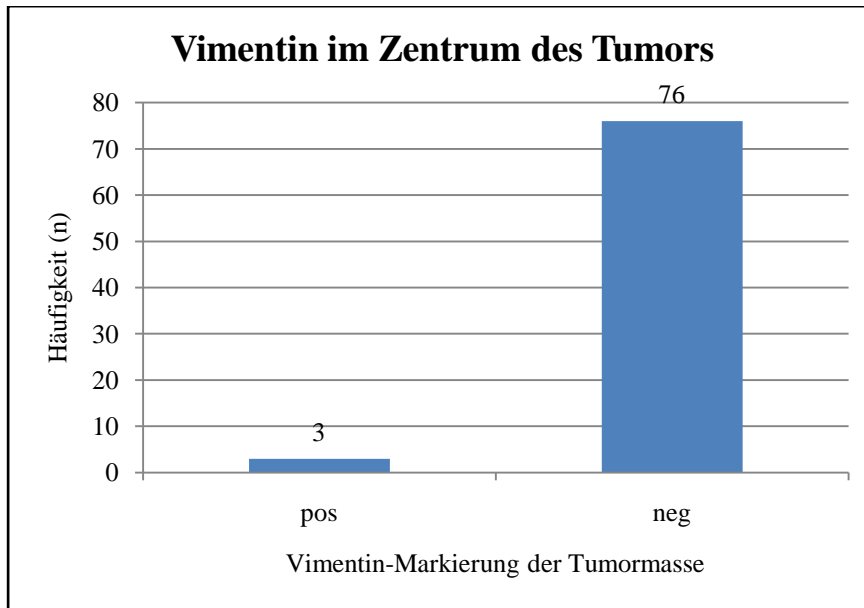


Abbildung 40: Anzahl der Peniskarzinome in Bezug auf die Vimentin-Markierung der Tumorzellen in der Tumormasse.

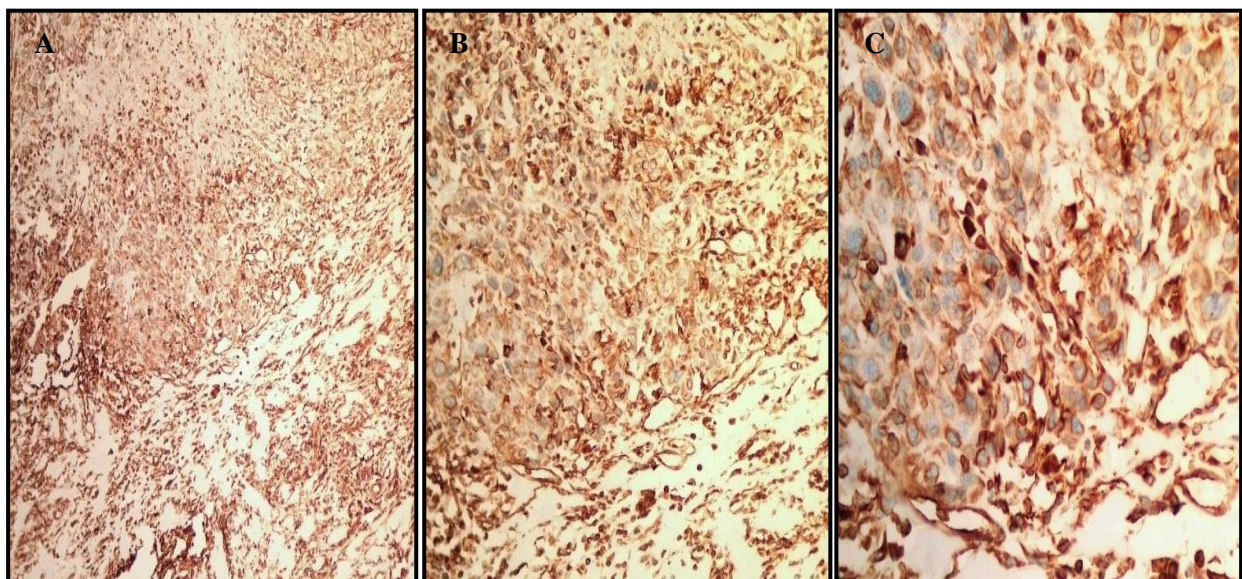


Abbildung 41: Vimentin-Markierung: A: Übersicht der positiv markierten Tumormasse eines Peniskarzinoms gegen Vimentin, 10-fache Vergrößerung. B: Positive Färbung der Tumormasse gegen Vimentin im Detail, 20-fache Vergrößerung. C: Positive Färbung der Tumormasse gegen Vimentin im Detail, 40-fache Vergrößerung.

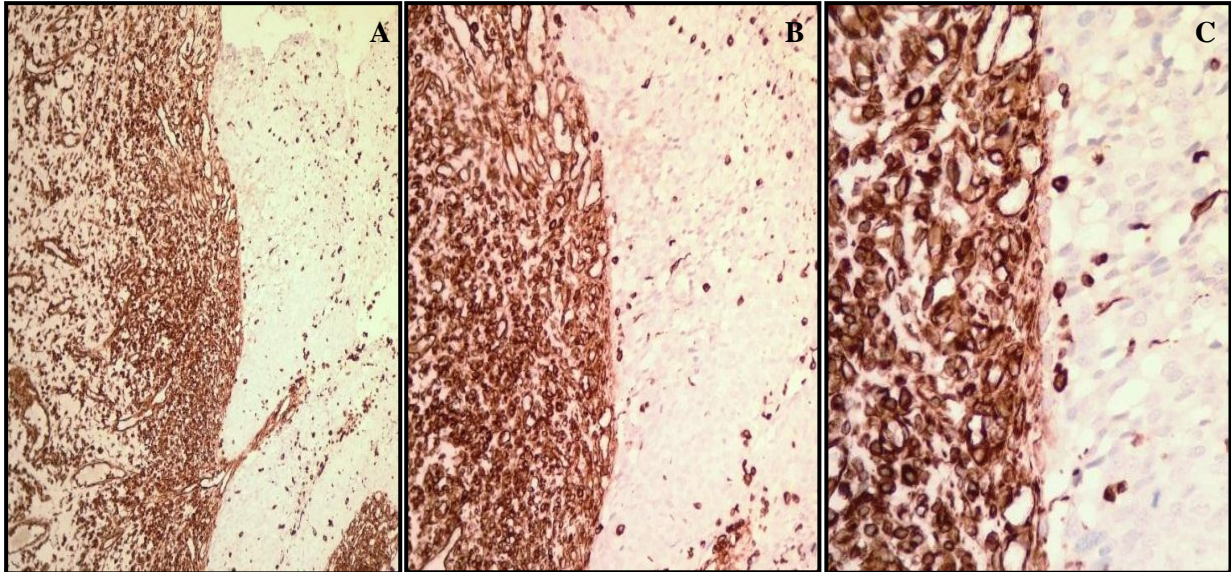


Abbildung 42: Vimentin-Markierung: A: Übersicht des negativ markierten Tumorzentrums und der negativ markierten Invasionsfront eines Peniskarzinoms gegen Vimentin (rechts), intensiv markiertes subepitheliales Stroma (links), 10-fache Vergrößerung. B: negative Färbung des Tumorzentrums und der Invasionsfront gegen Vimentin im Detail, 20-fache Vergrößerung. C: Negative Färbung des Tumorzentrums und der Invasionsfront gegen Vimentin im Detail, 40-fache Vergrößerung.

4.2.11 Vimentin in Buds

Untersucht wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen Vimentin und den Tumorbuds. In 10 von 79 Peniskarzinomen konnten keine Buds detektiert werden. In 15 Fällen waren die Buds positiv markiert, während die Färbung in 54 Fällen negativ ausfiel (Abb. 43).

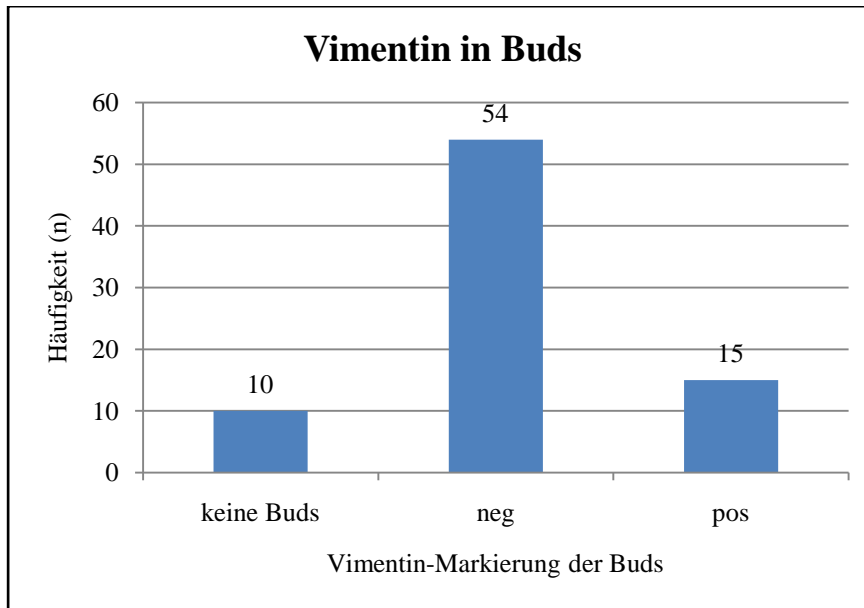


Abbildung 43: Anzahl der Peniskarzinome in Bezug auf die Vimentin-Markierung der Buds.

4.2.12 Ki-67 in den Tumorzellen der Tumormasse

Untersucht wurde der Zusammenhang zwischen der Ki-67-Markierung und den Tumorzellen des Tumorzentrums. Der Anteil positiv gefärbter Zellen wurde prozentual ermittelt. Um eine statistische Auswertung vornehmen zu können, wurden die Prozentangaben in 3 Klassen zusammengefasst. In 33 Fällen waren 0-25 % der Tumorzellen des Tumorzentrums positiv gegen Ki-67 markiert. In 32 Peniskarzinomen waren 26-65 % der Tumorzellen angefärbt und in 14 Fällen zeigten mehr als 65 % der Zellen eine positive Markierung (Abb. 44).

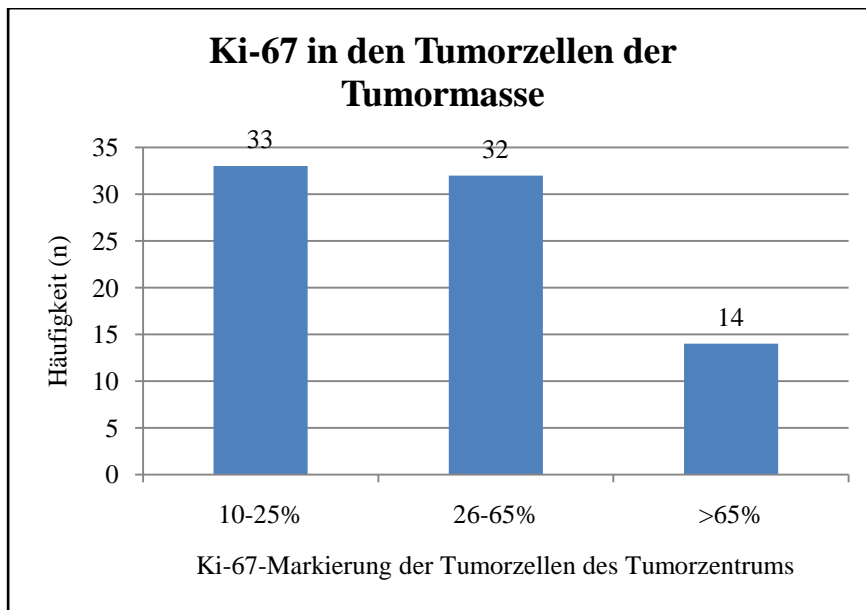


Abbildung 44: Anzahl der Peniskarzinome in Bezug auf die Ki-67-Markierung in den Tumorzellen des Tumorzentrums.

4.2.13 Ki-67 in den Tumorzellen der Invasionsfront

Es wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen Ki-67 und den Tumorzellen der Invasionsfront besteht. Um eine statistische Berechnung durchführen zu können, wurden die prozentual ermittelten Anteile der positiv gefärbten Zellen in 3 Klassen eingeteilt. In 26 Fällen wurden 0-60 % der Tumorzellen der Invasionsfront positiv markiert. In 24 Fällen wurden 70 % der Tumorzellen angefärbt und in 29 Peniskarzinomen lag die positive Markierung der Tumorzellen der Invasionsfront bei mehr als 70 % (Abb. 45).

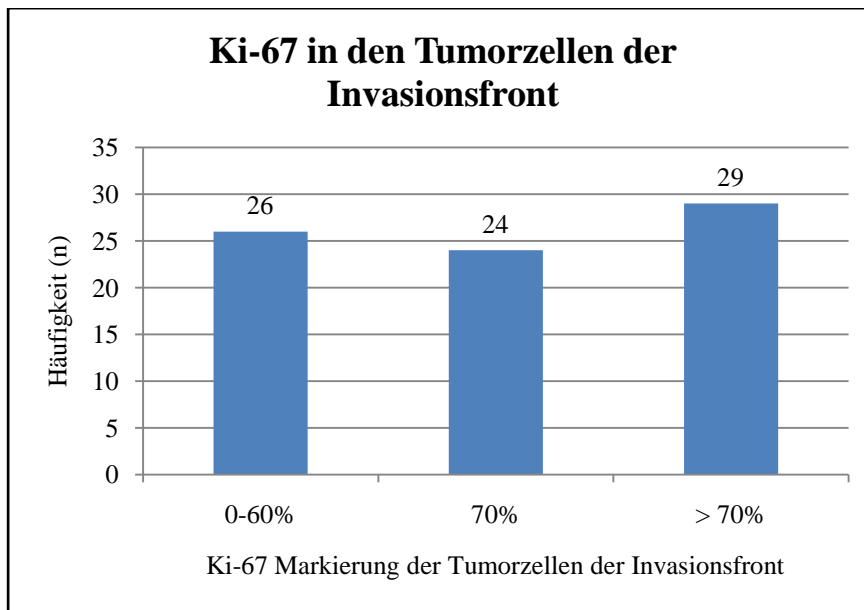


Abbildung 45: Anzahl der Peniskarzinome in Bezug auf die Ki-67-Markierung der Tumorzellen der Invasionsfront.

4.2.14 Ki-67 in den Stromazellen

Untersucht wurde, ob ein Zusammenhang zwischen der Ki-67-Markierung und den Stromazellen besteht. Der positiv markierte Anteil der Stromazellen wurde prozentual ermittelt. In 69 Fällen wurden 1 % der Stromazellen positiv angefärbt, in 2 Fällen keine, in einem Fall 3 %, in 3 Fällen 5 %, in 3 Fällen 10 % und in einem Fall wurden 60 % der Stromazellen positiv markiert.

4.2.15 Ki-67 in den Buds

Untersucht wurde eine bestehende Beziehung zwischen der Ki-67-Markierung und den Buds (Abb. 47). Die positive Markierung der Buds wurde prozentual ermittelt und anschließend in drei Gruppen zusammengefasst, um eine statistische Auswertung zu ermöglichen. In 18 Fällen wurden 0-25 % der Buds positiv markiert. In 35 Fällen lag der Anteil der positiv markierten Buds zwischen 26-65 %. In 26 Peniskarzinomen wurden mehr als 65 % der Buds angefärbt (Abb. 46).

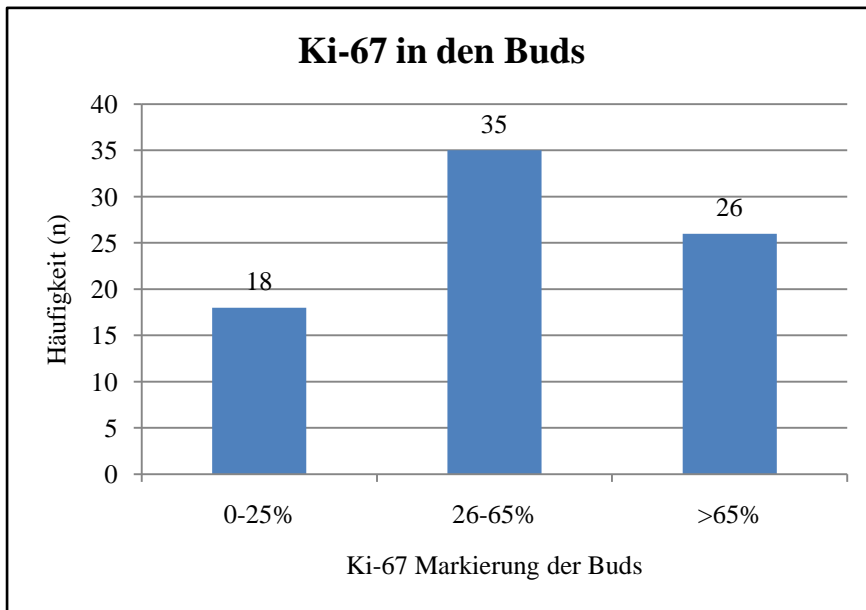


Abbildung 46: Anzahl der Peniskarzinome in Bezug auf die Ki-67-Markierung in den Buds.

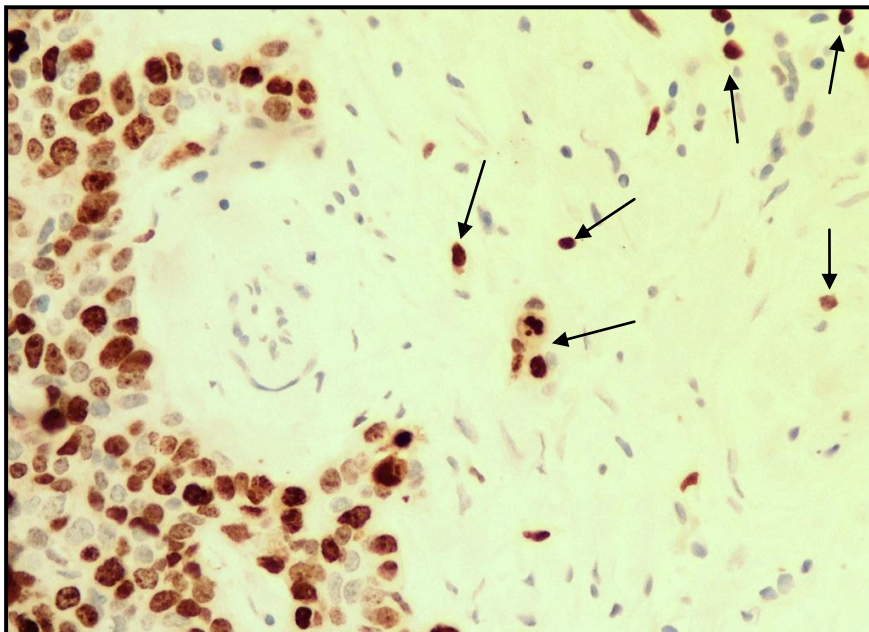


Abbildung 47: Ki-67-Markierung: Übersicht der Invasionsfront eines Peniskarzinoms mit Tumorbuds, ca. 60-fache Vergrößerung.

4.2.16 CD138 in den Tumorbuds

Es wurde untersucht, ob eine Beziehung besteht zwischen CD138 und den Tumorbuds (Abb. 52). Die Markierungsintensität der Buds gegen CD138 wurde bei der Untersuchung in vier Klassen unterteilt (0, 1+, 2+ und 3+). Für die statistische Bearbeitung der Werte wurden die Klassen 2+ und 3+ zu einer Gruppe zusammengefasst. Überwiegend wurde in den Tumorbuds eine zytoplasmatische Markierung der Zellen beobachtet. In 12 Peniskarzinomen wurden keine Buds durch die immunhistochemische Färbung mit Antikörpern gegen CD138 markiert. In 47 Fällen kam es zu einer mäßigen und in 20 Fällen zu einer starken Markierung der Tumorbuds (Abb. 48).

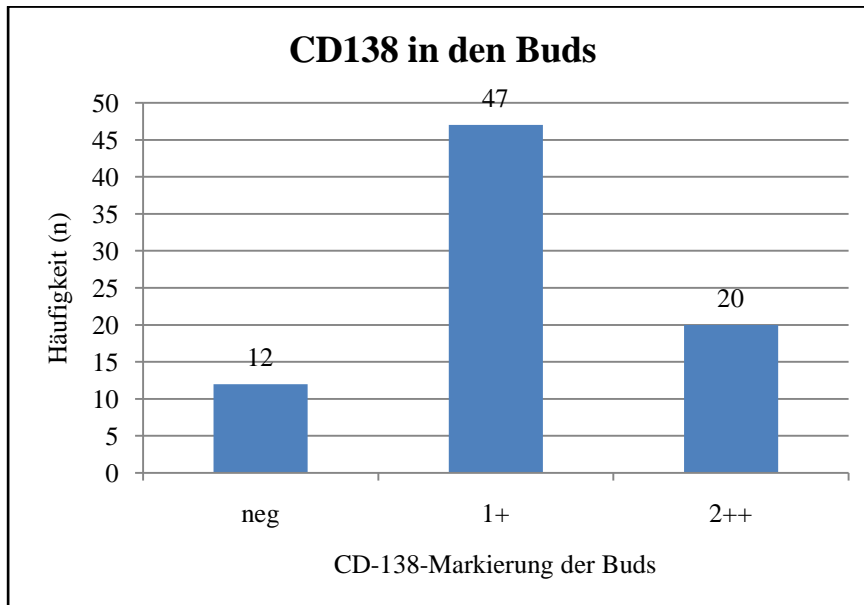


Abbildung 48: Häufigkeit der Peniskarzinome in Bezug auf die CD-138-Markierung der Tumorbuds.

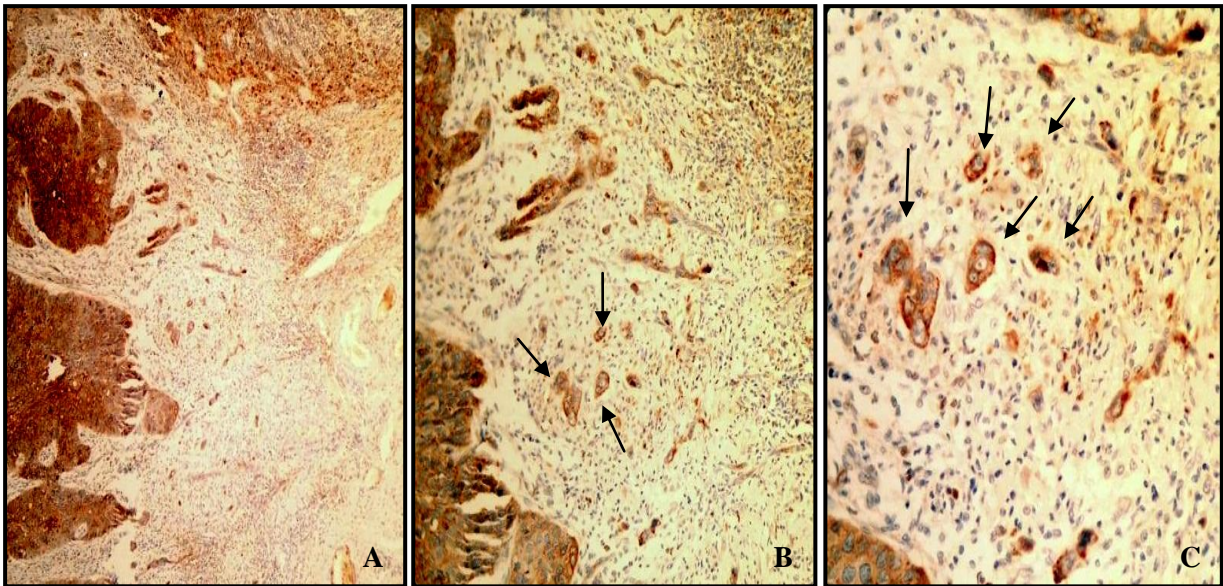


Abbildung 49: CD-138-Markierung: A: Übersicht der tumoralen Invasionsfront und der Tumorbuds (Pfeile) eines Peniskarzinoms, 5-fache Vergrößerung. B: Zytoplasmatische Markierung der Tumorbuds (Pfeile) im Detail, 20-fache Vergrößerung. C: Zytoplasmatische Markierung der Tumorbuds (Pfeile) im Detail, 40-fache Vergrößerung.

4.3 Korrelationen zwischen einzelnen Parametern

4.3.1 Cyclin D1-Expression in den Buds in Bezug auf die Anzahl der Tumorbuds

Es bestand ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Cyclin-D1-Expression in den Buds und der Anzahl der Buds ($p = 0,013$). In 15 von 79 untersuchten Peniskarzinomen wurde kein Tumor-Budding festgestellt bzw. fiel die Cyclin-D1-Expression in den Buds negativ aus. In 9 Fällen aus dieser Gruppe konnten weniger als 10 Buds, in 4 Karzinomen 10-20 Buds und in 2 Fällen mehr als 20 Buds gezählt werden. In 31 Fällen wurden weniger als 50 % der Tumorbuds durch Cyclin D1 markiert. 11 von diesen 31 Fällen zeigten weniger als 10 Buds, 7 Peniskarzinome 10-20 Buds und 13 Fälle mehr als 20 Tumorbuds. Die Cyclin-D1-Markierung der Buds war in 33 Karzinomen gleich oder stärker als 50 %. In 5 dieser Fälle wurden weniger als 10 Buds, in 16 Karzinomen 10-20 Buds und in 12 Fällen mehr als 20 Buds beobachtet. In den Fällen, in denen die Cyclin-D1-Expression in den Buds negativ ausfiel bzw. keine Buds detektiert wurden, gab es signifikant mehr Fälle (60 %) mit weniger als 10 Buds ($p = 0,013$). Wurden mehr als 50 % der Tumorbuds durch Cyclin D1 markiert, so sind signifikant weniger Fälle (15 %) mit weniger als 10 Buds und mehr Fälle (49 %) mit 10-20 Buds aufgetreten ($p = 0,013$) (Abb. 50).

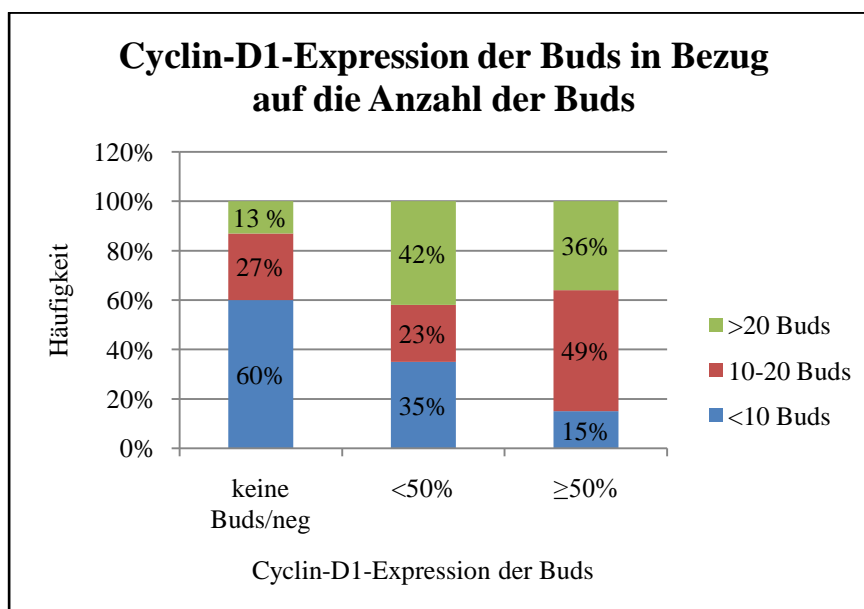


Abbildung 50: Anzahl der Peniskarzinome mit Cyclin-D1-Expression in Bezug auf die Anzahl der Buds.

4.3.2 p16-Expression in den Buds in Bezug auf die Koilozytose

Es besteht eine signifikante Korrelation zwischen der p16-Expression in den Buds und dem Auftreten einer Koilozytose ($p < 0,001$). In 10 von 79 Fällen wurden durch die p16-Markierung keine Buds detektiert. In 34 Fällen kam es zur positiven Expression von p16 in den Buds. In 25 Fällen aus dieser Gruppe ist eine Koilozytose aufgetreten und in 9 Karzinomen waren keine Koilozyten vorhanden. In 35 Fällen fiel die Expression von p16 in den Buds negativ aus.

31 Peniskarzinome aus dieser Gruppe zeigten kein Vorhandensein einer Koilozytose. In 4 von 35 Fällen bildeten sich koilozytische Dysplasien. Die positive p16-Expression in den Buds steht im signifikanten Zusammenhang mit dem erhöhten Auftreten einer Koilozytose (Abb. 51).

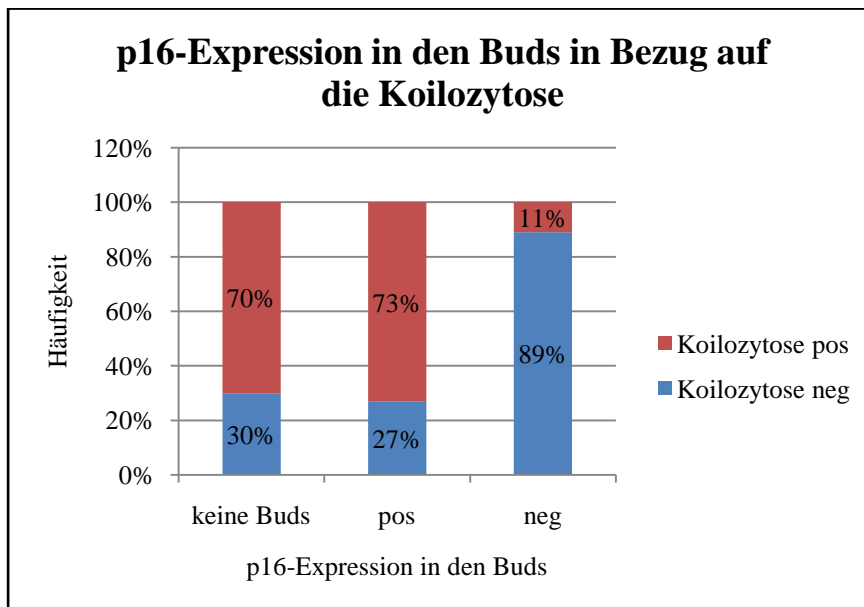


Abbildung 51: Anzahl der Peniskarzinome mit p16-Expression in den Buds in Bezug auf das Vorhandensein einer Koilozytose.

4.3.3 p16-Expression im Tumor in Bezug auf die Koilozytose

Es besteht ein signifikanter Zusammenhang zwischen der p16-Expression im Tumor und dem Auftreten einer Koilozytose ($p < 0,001$). In 28 Fällen kam es zur positiven Expression von p16 im Tumorgewebe. In 24 von 28 Fällen kam es zur Ausbildung von Koilozyten und in 4 Peniskarzinomen war das Vorhandensein einer Koilozytose negativ. Eine negative p16-Expression ist in 51 Karzinomen aufgetreten. In 39 Fällen aus dieser Gruppe kam es nicht zur

Koilozytose und in 12 Karzinomen bildeten sich Koilozyten. Zusammenfassend ist festzustellen, dass die positive p16-Expression im Tumor mit dem Vorkommen einer Koilozytose signifikant korrelierte (Abb. 52).

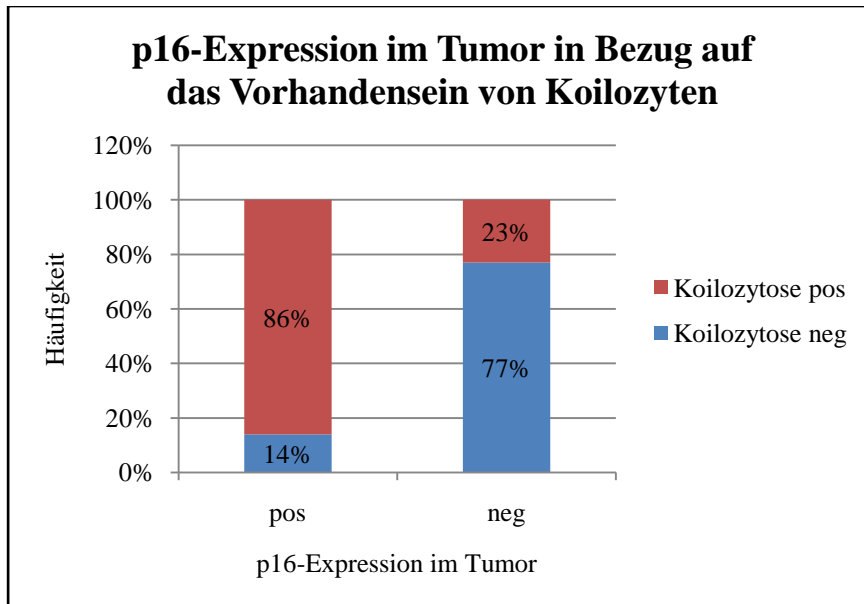


Abbildung 52: Anzahl der Peniskarzinome mit p16-Expression im Tumor in Bezug auf das Auftreten einer Koilozytose.

4.3.4 p16-Expression in den Buds in Bezug auf die p16-Expression im Tumor

Es besteht ein signifikanter Zusammenhang zwischen der p16-Expression in den Buds und der p16-Expression im Tumor ($p < 0,001$). In 10 Fällen konnten keine Buds durch die p16-Markierung detektiert werden. In 34 Fällen fiel die p16-Expression in den Buds positiv aus. In 20 Fällen aus dieser Gruppe kam es ebenfalls zur positiven p16-Expression im Tumorgewebe. In 14 Peniskarzinomen fiel die p16-Expression im Tumorgewebe negativ aus. 35 Karzinome zeigten eine negative p16-Expression in den Buds. 32 von diesen Fällen wiesen auch eine negative p16-Expression im Tumor auf und in 3 Peniskarzinomen trat eine positive p16-Expression im Tumor auf. In den Fällen, in denen eine positive p16-Expression in den Tumorbuds auftrat, kam es signifikant häufiger zu einer gleichzeitigen positiven p16-Expression im Tumor. Die Fälle, die eine negative p16-Expression in den Buds zeigten, wiesen signifikant häufiger eine gleichzeitige negative p16-Expression im Tumorgewebe auf (Abb. 53).

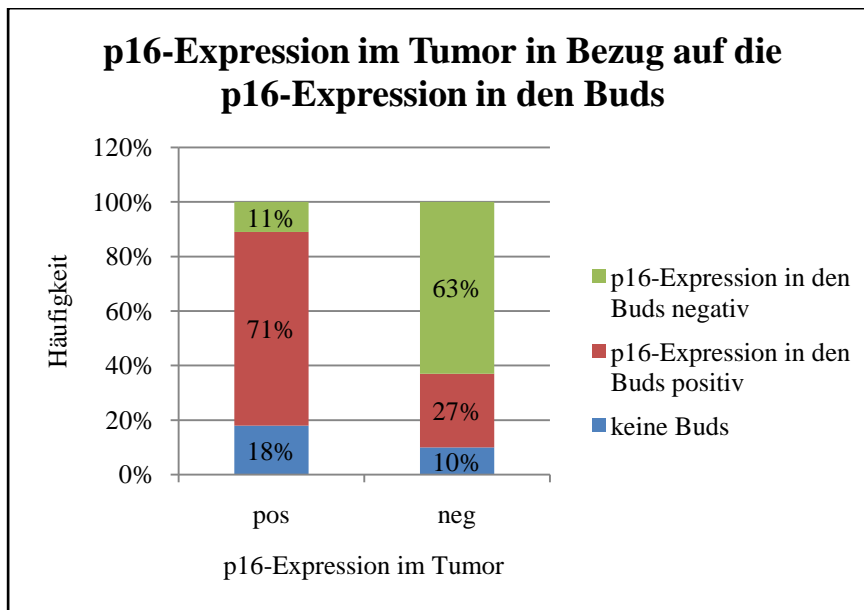


Abbildung 53: Anzahl der Peniskarzinome mit p16-Expression im Tumor in Bezug auf die Anzahl der Peniskarzinome mit p16-Expression in den Buds.

4.3.5 p16-Expression in den Buds in Bezug auf das mikroskopische Wachstumsmuster beim Peniskarzinom

Es besteht eine signifikante Beziehung zwischen der p16-Expression in den Buds und dem mikroskopischen Wachstumsmuster beim Peniskarzinom ($p = 0,003$). In 10 von 79 Fällen wurden unter der p16-Markierung keine Buds detektiert. Die 4 Fälle, die ein multizentrisches Wachstumsmuster aufwiesen, konnten aufgrund der geringen Fallzahl nicht mit in die statistische Bewertung einbezogen werden. In 32 Fällen trat eine positive p16-Markierung in den Buds der Peniskarzinome auf. 8 Fälle aus dieser Gruppe zeigten das superfiziell spreitende, 21 Karzinome das vertikale und 3 Fälle das verruköse Wachstumsmuster. 33 Fälle wiesen eine negative p16-Expression in den Buds auf. 18 der 33 Karzinome besaßen das superfiziell spreitende, 9 Fälle das vertikale und 6 Peniskarzinome das verruköse Wachstumsmuster. In den Fällen, in denen eine positive p16-Markierung in den Buds beobachtet wurde, trat signifikant häufiger das vertikale Wachstumsmuster auf. Kam es jedoch zur negativen p16-Expression in den Buds, so imponierte signifikant häufiger der superfiziell spreitende Wachstumstyp (Abb. 54).

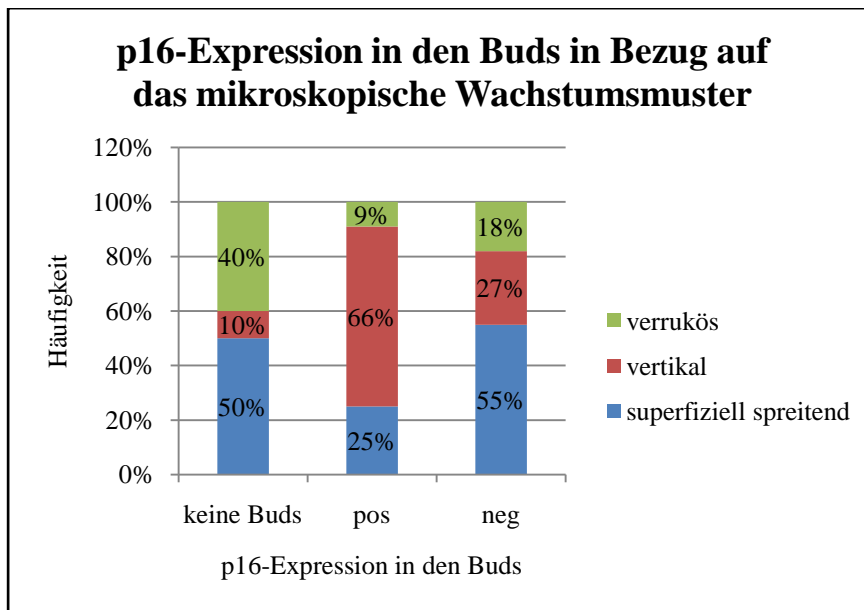


Abbildung 54: Anzahl der Peniskarzinome mit p16-Expression in den Buds in Bezug auf das mikroskopische Wachstumsmuster.

4.3.6 p16-Expression in den Buds in Bezug auf das Invasionsmuster beim Peniskarzinom

Es besteht ein signifikanter Zusammenhang zwischen der p16-Expression in den Buds und dem Invasionsmuster beim Peniskarzinom ($p = 0,001$). In 10 Fällen konnten keine Buds unter der p16-Färbung beobachtet werden. 9 von diesen 10 Karzinomen wiesen das zapfenförmig, kompakte, endophytische und ein Fall das infiltrative Invasionsmuster auf. In 34 Peniskarzinomen kam es zur positiven p16-Expression in den Buds. 26 Karzinome aus dieser Gruppe zeigten das infiltrative und 8 Fälle das endophytische Invasionsmuster. In 35 Fällen kam es zur negativen p16-Expression in den Buds. Hier bestand jedoch keine signifikante Korrelation zwischen der p16-Expression und dem Invasionsmuster. 21 Peniskarzinome aus dieser Gruppe besaßen das infiltrative und 14 Fälle das endophytische Invasionsmuster. Fiel die p16-Expression in den Buds positiv aus, so kam es signifikant häufiger zum Auftreten des infiltrativen Invasionsmusters. In den Fällen, in denen unter der p16-Markierung keine Buds detektiert wurden, trat signifikant häufiger das endophytische Wachstumsmuster auf (Abb. 55).

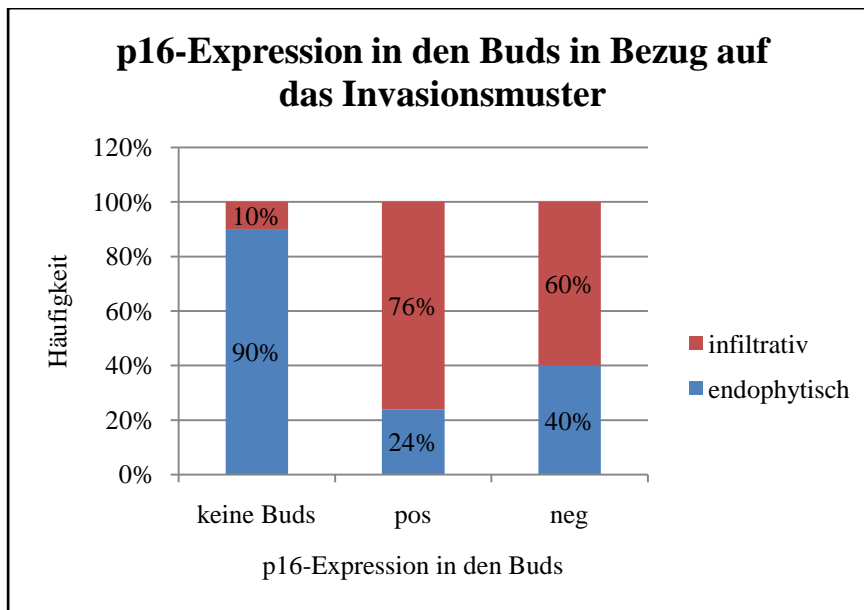


Abbildung 55: Anzahl der Peniskarzinome mit p16-Expression in den Buds in Bezug auf das Invasionsmuster.

4.3.7 E-Cadherin-Expression im Zentrum des Tumors, in der Invasionsfront und in den Buds in Beziehung zur Anzahl der Buds

Es besteht weder eine Korrelation zwischen der E-Cadherin-Expression im Zentrum des Tumors noch zwischen der E-Cadherin-Expression in den Tumorzellen der Invasionsfront und der Anzahl der Buds. Ein signifikanter Zusammenhang ($p < 0,001$) ist jedoch aufgetreten zwischen der Anzahl der Tumorbuds und der E-Cadherin-Expression in den Buds. Bei niedriger Anzahl der Tumorbuds fiel die E-Cadherin-Expression in den Tumorbuds gering aus. So zeigten 25 von 79 untersuchten Peniskarzinomen eine geringe E-Cadherin-Expression in den Tumorbuds, davon traten in 16 Fällen weniger als 10 Buds, in 3 Fällen 10-20 Buds und in 6 Fällen mehr als 20 Buds auf. In 25 Fällen traten weniger als 10 Buds auf, davon zeigten 16 Peniskarzinome eine geringe, 2 Fälle eine mäßige und 7 Fälle eine starke E-Cadherin-Expression in den Tumorbuds. In 21 Fällen trat eine mäßige E-Cadherin-Expression in den Buds auf, davon wiesen 2 Fälle weniger als 10, 7 Fälle 10-20 und 12 Fälle mehr als 20 Buds auf. In insgesamt 27 von 79 Peniskarzinomen kamen 10-20 Buds vor. 3 von 27 Fällen zeigten eine geringe, 7 Fälle eine mäßige und 17 Fälle zeigten eine starke E-Cadherin-Expression in den Tumorbuds (Abb. 56).

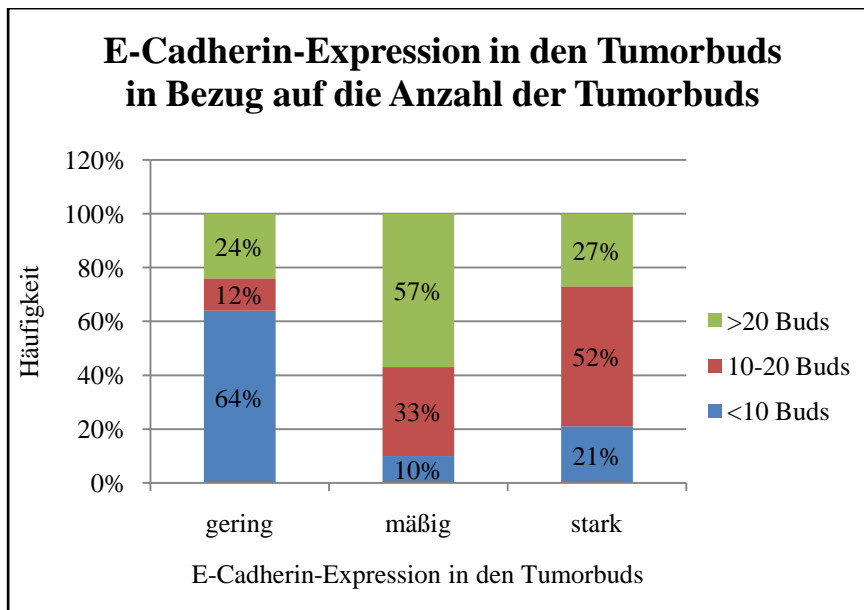


Abbildung 56: E-Cadherin-Expression in den Tumorbuds in Bezug auf die Anzahl der Tumorbuds.

4.3.8 E-Cadherin-Expression in den Buds in Bezug auf die Ki-67-Expression in den Buds beim Peniskarzinom

Es besteht ein signifikanter Zusammenhang zwischen der E-Cadherin-Expression in den Buds und der Ki-67-Expression in den Buds ($p = 0,001$). In insgesamt 25 von 79 untersuchten Peniskarzinomen trat eine schwache E-Cadherin-Expression in den Buds auf. In 13 Fällen aus dieser Gruppe wurden 0-25 % der Buds, in jeweils 6 Fällen 26-65 % und mehr als 65 % der Buds durch Ki-67 markiert. Eine mäßige E-Cadherin-Expression trat in 21 Fällen auf, jedoch ohne Signifikanz. In 3 Fällen aus dieser Gruppe zeigte sich eine 0-25 %ige, in 10 Fällen eine 26-65 %ige und in 8 Fällen eine höhere als 65 %ige Ki-67-Markierung in den Buds. 33 von 79 Peniskarzinomen wiesen eine starke E-Cadherin-Expression in den Buds auf. 2 Fälle aus dieser Gruppe zeigten eine Ki-67-Expression von 0-25 %, 19 Karzinome von 26-65 % und 12 Fälle von mehr als 65 %. In den Fällen, in denen sich eine schwache E-Cadherin-Expression in den Buds zeigte, wurden signifikant weniger Buds durch Ki-67 markiert. Fiel die E-Cadherin-Expression in den Buds stärker aus, so stieg ebenfalls die Anzahl der Ki-67 markierten Buds (Abb. 57).

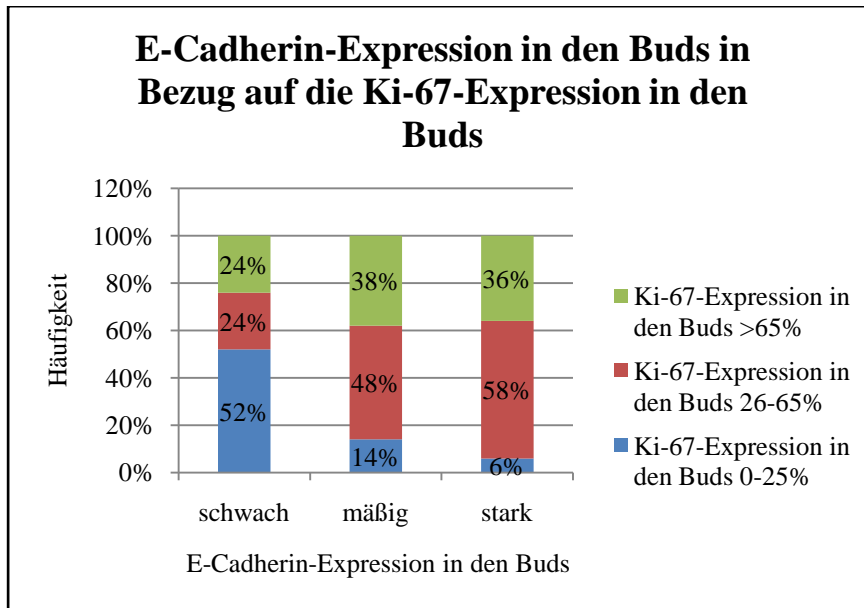


Abbildung 57: Anzahl der Peniskarzinome mit E-Cadherin-Expression in den Buds in Bezug auf die Anzahl der Peniskarzinome mit Ki-67-Expression in den Buds.

4.3.9 E-Cadherin-Expression im Tumor in Bezug auf die E-Cadherin-Expression in der Invasionsfront

Es besteht ein signifikanter Zusammenhang zwischen der E-Cadherin-Expression im Tumor und der E-Cadherin-Expression in der Invasionsfront ($p < 0,001$). In 12 von 79 Peniskarzinomen trat im Zentrum des Tumors eine schwache E-Cadherin-Expression auf. In 6 Fällen aus dieser Gruppe zeigte sich eine schwache, in 2 Peniskarzinomen eine mäßig-schwache, in keinem Fall eine mäßige und in 4 Karzinomen eine starke E-Cadherin-Expression in der Invasionsfront. In 31 von 79 Peniskarzinomen kam es zu einer mäßigen E-Cadherin-Expression im Tumor. 5 Karzinome aus dieser Gruppe wiesen eine schwache, 9 Fälle eine mäßig-schwache, 14 Fälle eine mäßige und 3 Karzinome eine starke E-Cadherin-Expression in der Invasionsfront auf. In 36 von 79 Fällen fiel die E-Cadherin-Expression in der Invasionsfront stark aus. 1 Fall zeigte ein schwache, 3 Fälle eine mäßig-schwache, 10 Peniskarzinome eine mäßige und 22 Karzinome eine starke E-Cadherin-Expression in der Invasionsfront. Je schwächer die E-Cadherin-Expression im Tumor ausfiel, desto schwächer war sie auch in der Invasionsfront. Je stärker die Expression von E-Cadherin im Tumor war, desto stärker war sie in der Invasionsfront (Abb. 58).

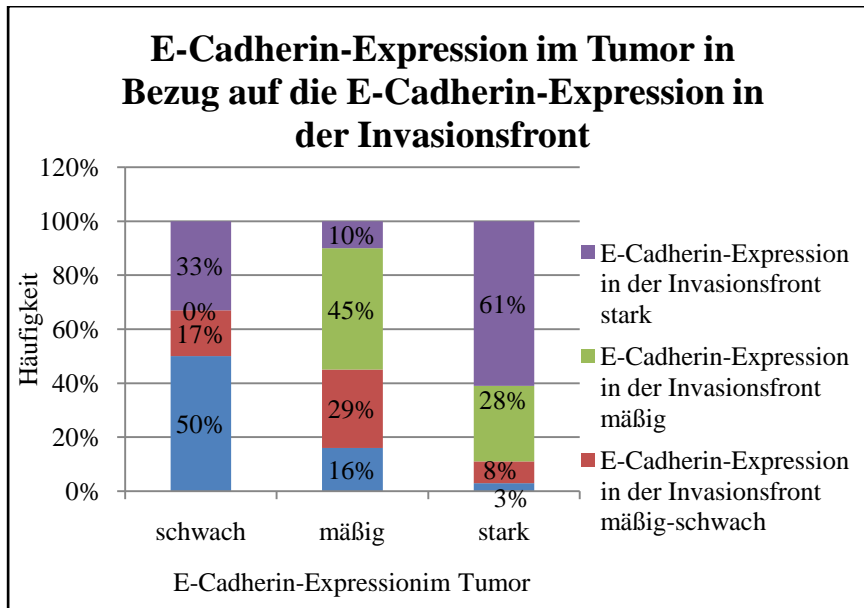


Abbildung 58: Anzahl der Peniskarzinome mit E-Cadherin-Expression im Tumor in Bezug auf die Anzahl der Peniskarzinome mit E-Cadherin-Expression in der Invasionsfront.

4.3.10 E-Cadherin-Expression im Tumor in Bezug auf die E-Cadherin-Expression in den Buds

Es besteht ein signifikanter Zusammenhang zwischen der E-Cadherin-Expression im Tumor und der E-Cadherin-Expression in den Buds ($p = 0,001$). In 12 von 79 Fällen zeigte sich eine schwache E-Cadherin-Expression im Tumor. 7 Fälle aus dieser Gruppe imponierten mit einer schwachen, 3 Karzinome mit einer mäßigen und 2 Peniskarzinome mit einer starken E-Cadherin-Expression in den Buds. 31 Karzinome wiesen eine mäßige E-Cadherin-Expression im Tumor auf. 13 von 31 Fällen besaßen eine schwache, 11 Karzinome eine mäßige und 7 Fälle eine starke E-Cadherin-Expression in den Buds. In 36 Peniskarzinomen kam es zu einer starken E-Cadherin-Expression im Tumor. 5 Karzinome aus dieser Gruppe waren gekennzeichnet durch eine schwache, 7 Fälle durch eine mäßige und 24 Peniskarzinome durch eine starke E-Cadherin-Expression in den Buds. Je stärker die E-Cadherin-Expression im Tumor ausfiel, desto stärker war die beobachtete E-Cadherin-Expression in den Buds. Je schwächer sich die E-Cadherin-Expression im Tumor kennzeichnete, desto schwächer fiel sie in den Buds aus (Abb. 59).

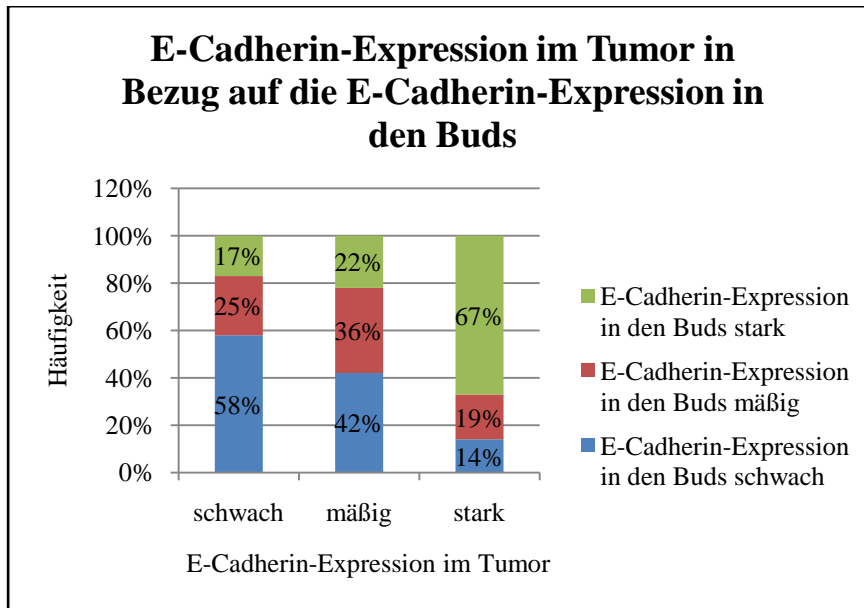


Abbildung 59: Anzahl der Peniskarzinome mit E-Cadherin-Expression im Tumor in Bezug auf die Anzahl der Peniskarzinome mit E-Cadherin-Expression in den Buds.

4.3.11 E-Cadherin-Expression in der Invasionsfront in Bezug auf die E-Cadherin-Expression in den Buds

Es besteht ein signifikanter Zusammenhang zwischen der E-Cadherin-Expression in der Invasionsfront und der E-Cadherin-Expression in den Buds ($p < 0,001$). In 12 von 79 Peniskarzinomen kam es zu einer schwachen E-Cadherin-Markierung in der Invasionsfront. 10 von diesen 12 Fällen zeigten eine schwache, 2 Fälle eine mäßige und kein Fall eine starke E-Cadherin-Expression in den Buds. 14 von 79 untersuchten Karzinomen wiesen eine mäßig-schwache E-Cadherin-Markierung in der Invasionsfront auf. 5 von diesen 14 Fällen kennzeichneten sich durch eine schwache, 9 Fälle durch eine mäßige und kein Fall durch eine starke E-Cadherin-Expression in den Buds. In 24 Peniskarzinomen fiel die E-Cadherin-Expression in der Invasionsfront mäßig aus. Aus dieser Gruppe zeigten 14 Karzinome eine starke und jeweils 5 Fälle eine schwache und eine mäßige E-Cadherin-Expression in den Buds. In 29 Fällen kam es zu einer starken E-Cadherin-Expression in der Invasionsfront. 19 dieser Fälle trugen eine ebenfalls starke und jeweils 5 Fälle eine schwache und eine mäßige E-Cadherin-Expression in den Buds. Je stärker die E-Cadherin-Expression in der Invasionsfront ausfiel, desto stärker war die E-Cadherin-Expression in den Buds. Je schwächer die E-Cadherin-Expression in der Invasionsfront war, desto schwächer war sie in den Buds (Abb. 60).

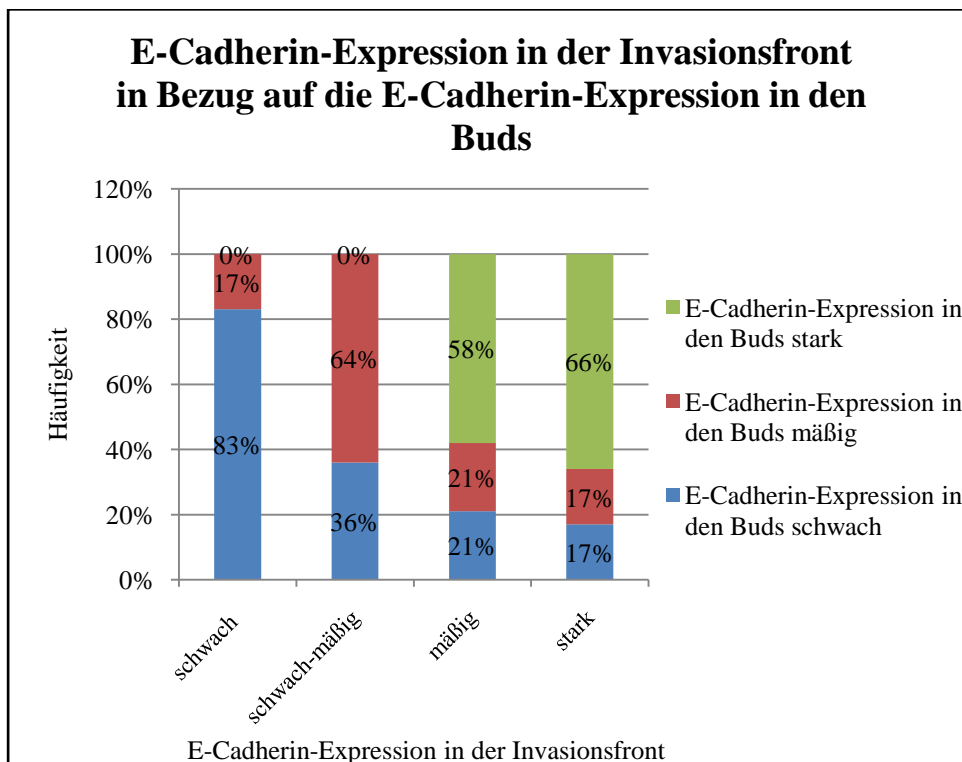


Abbildung 60: Anzahl der Peniskarzinome mit E-Cadherin-Expression in der Invasionsfront in Bezug auf die E-Cadherin-Expression in den Buds.

4.3.12 Vimentin-Expression in der Invasionsfront in Bezug auf die Vimentin-Expression in den Buds

Es besteht eine signifikante Korrelation zwischen der Vimentin-Expression in der Invasionsfront und der Vimentin-Expression in den Buds ($p = 0,002$). In 21 von 79 Fällen trat eine positive Vimentin-Expression in der Invasionsfront auf. In jeweils 8 von diesen 21 Fällen zeigte sich eine positive und negative Vimentin-Expression in den Buds. In 5 Peniskarzinomen dieser Gruppe konnten keine Buds beobachtet werden. 58 Karzinome wiesen eine negative Vimentin-Expression in der Invasionsfront auf. In 5 von diesen Fällen wurden keine Buds detektiert. 7 Fälle zeigten eine positive und 46 Peniskarzinome eine negative Vimentin-Expression in den Buds. In den Fällen, in denen eine negative Vimentin-Expression in der Invasionsfront auftrat, zeigte sich signifikant häufiger eine negative Vimentin-Expression in den Buds (Abb. 61).

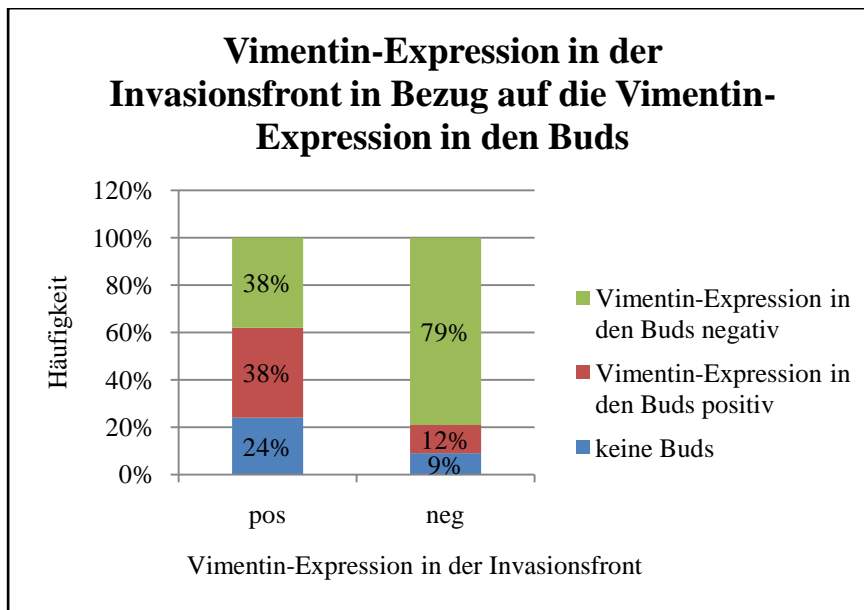


Abbildung 61: Anzahl der Peniskarzinome mit Vimentin-Expression in der Invasionsfront in Bezug auf die Vimentin-Expression in den Buds.

4.3.13 Ki-67-Expression im Tumorzentrum, in der Invasionsfront und in den Buds in Beziehung zur Anzahl der Buds

Es besteht weder ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Ki-67-Expression im Tumorzentrum, noch zwischen der der Tumorzellen der Invasionsfront und der Anzahl der Buds. Eine signifikante Korrelation ist zwischen der Anzahl der durch Ki-67 positiv markierten Tumorbuds und der Anzahl der Buds aufgetreten ($p < 0,001$). In den Fällen, in denen mehr Buds auftraten, wurden mehr Tumorbuds durch Ki-67 markiert. Je geringer die Anzahl der auftretenden Tumorbuds war, desto geringer fiel die Anzahl der durch Ki-67 markierten Buds aus. Je höher die Anzahl der durch Ki-67 markierten Buds war, desto höher war die generelle Anzahl der detektierten Buds. Insgesamt wurden in 18 von 79 Peniskarzinomen 0-25 % der Tumorbuds durch Ki-67 markiert. Dabei betrug die Anzahl der Buds in 14 Fällen weniger als 10, in 4 Fällen 10-20 Buds und kein Fall aus dieser Gruppe hatte mehr als 20 Buds. In 26 von 79 Peniskarzinomen betrug die Anzahl, der durch Ki-67 markierten Buds mehr als 65 %. 14 Fälle aus dieser Gruppe hatten mehr als 20 Buds, in 10 Peniskarzinomen traten 10-20 Buds auf und in 2 Fällen kamen weniger als 10 Buds vor (Abb. 62).

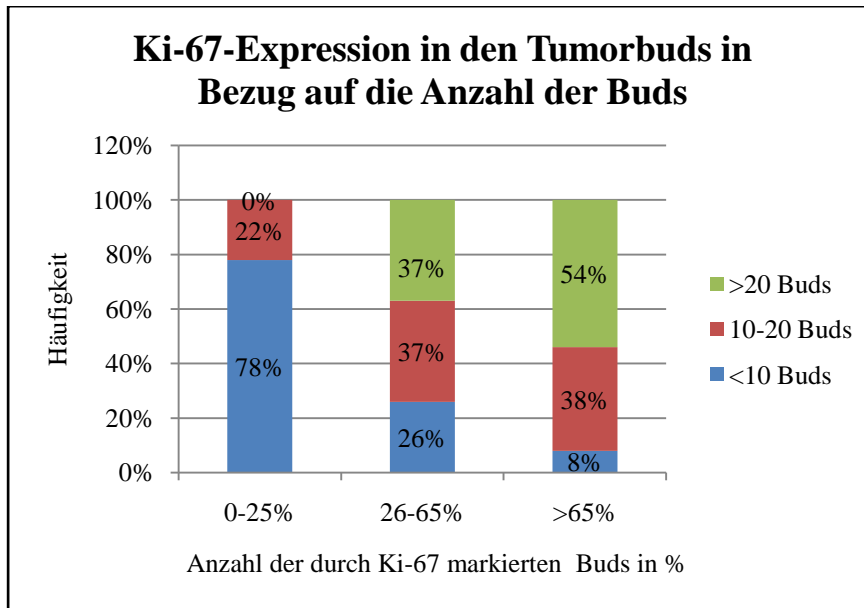


Abbildung 62: Anzahl der durch Ki-67markierten Tumorbuds in Bezug zur Anzahl der Buds.

4.3.14 Ki-67-Expression im Tumor in Bezug auf die Ki-67-Expression in der Invasionsfront

Es besteht eine signifikante Korrelation zwischen der Ki-67-Expression im Tumor und der Ki-67-Expression in der Invasionsfront ($p = 0,017$). In 33 von 79 untersuchten Peniskarzinomen trat eine 0-25 %ige Ki-67-Markierung im Tumor auf. 2 dieser Fälle zeigten eine 0-25 %ige, 14 Karzinome eine 26-65 %ige und 17 Fälle eine stärkere als 65 %ige Ki-67-Expression in der Invasionsfront. 14 von 79 Karzinomen zeigten eine höhere als 65 %ige Ki-67-Expression im Tumor. Alle diese 14 Peniskarzinome wiesen in der Invasionsfront eine ebenfalls stärkere als 65 %ige Ki-67-Expression auf. Je stärker die Ki-67-Expression im Tumor ausfiel, desto mehr Tumorzellen wurden durch Ki-67 in der Invasionsfront markiert (Abb. 63).

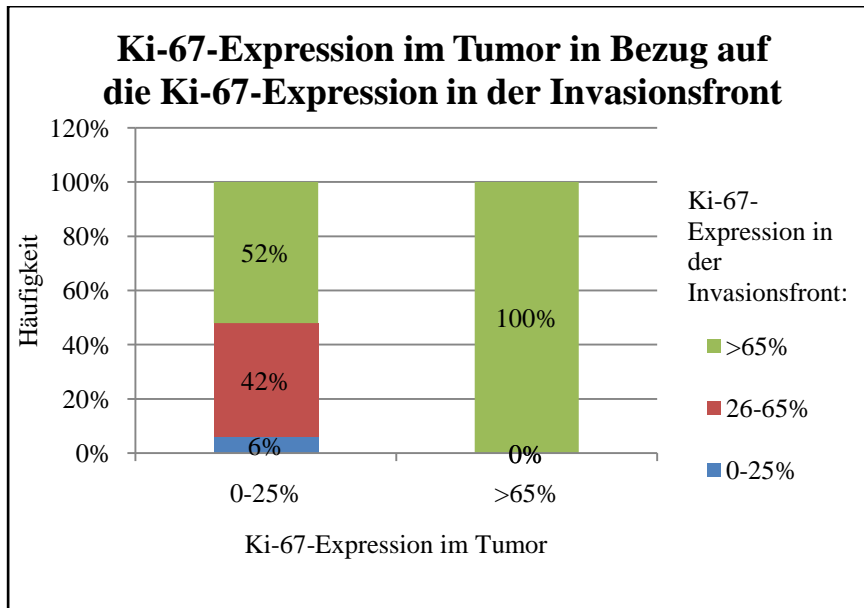


Abbildung 63: Anzahl der Peniskarzinome mit Ki-67-Expression im Tumor in Bezug auf Ki-67-Expression in der Invasionsfront.

4.3.15 CD138-Expression in den Tumorbuds in Beziehung zur Anzahl der Buds

Es besteht ein signifikanter Zusammenhang zwischen der CD138-Expression in den Tumorbuds und der Anzahl der vorkommenden Buds ($p < 0,001$). Je geringer die Anzahl der Buds war, desto schwächer fiel die CD138-Expression in den Buds aus. Je stärker die CD138-Expression in den Buds war, desto mehr Tumorbuds traten auf. In 12 Fällen kam es zu einer negativen CD138-Expression in den Buds. Davon besaßen 11 Fälle weniger als 10 Buds, 1 Fall 10-20 Buds und kein Fall mit negativer CD138-Expression hatte mehr als 20 Buds. In 20 von 79 untersuchten Peniskarzinomen zeigte sich eine starke CD138-Expression in den Tumorbuds. 10 Fälle aus dieser Gruppe wiesen mehr als 20 Buds auf, 8 Fälle 10-20 Buds und in 2 Fällen kamen weniger als 10 Buds vor (Abb. 64).

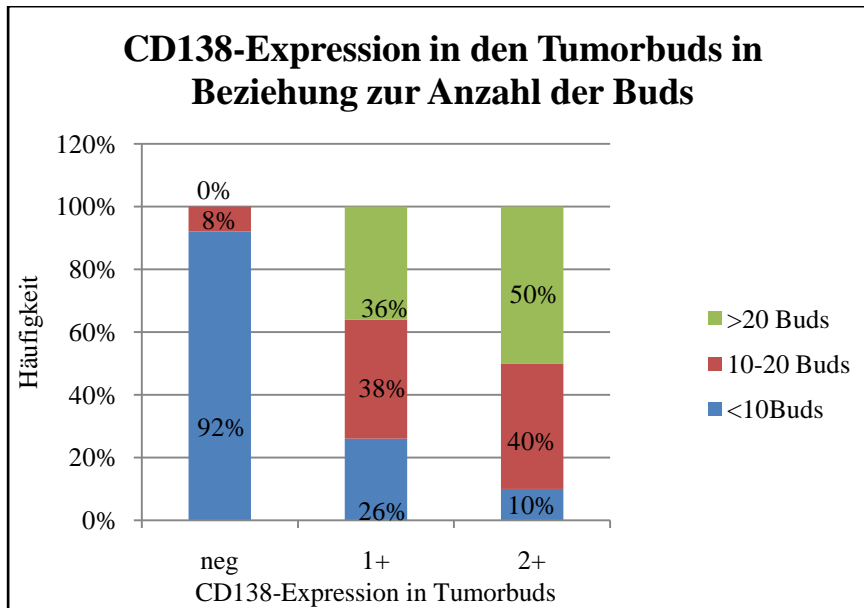


Abbildung 64: CD138-Expression in den Tumorbuds in Bezug zur Anzahl der Buds.

4.3.16 CD138-Expression in den Buds in Bezug auf das mikroskopische Wachstumsmuster beim Peniskarzinom

Es besteht ein signifikanter Zusammenhang zwischen der CD138-Expression und dem mikroskopischen Wachstumsmuster beim Peniskarzinom ($p = 0,041$). In 12 von 79 untersuchten Fällen fiel die CD138-Expression der Buds negativ aus. In 5 Fällen aus dieser Gruppe trat das superfiziell spreitende, in 2 Karzinomen das vertikale und in 5 Fällen das verruköse Wachstumsmuster auf. 45 Peniskarzinome wiesen eine schwache CD138-Expression in den Buds auf. 18 Karzinome aus dieser Gruppe besaßen das superfiziell spreitende, 19 Fälle das vertikale und 8 Peniskarzinome das verruköse Wachstumsmuster. 18 von 79 Karzinomen waren gekennzeichnet durch eine starke CD138-Expression in den Buds, wobei 8 Fälle das superfiziell spreitende, 10 Karzinome das vertikale Wachstumsmuster aufwiesen und kein Fall das verruköse Wachstumsmuster zeigte. Signifikant war, dass 42 % der Fälle, in denen die Buds durch CD138 nicht markiert wurden, das verruköse Wachstumsmuster besaßen, während bei einer stark auftretenden CD138-Expression in den Buds kein Fall das verruköse Wachstumsmuster aufwies (Abb. 65).

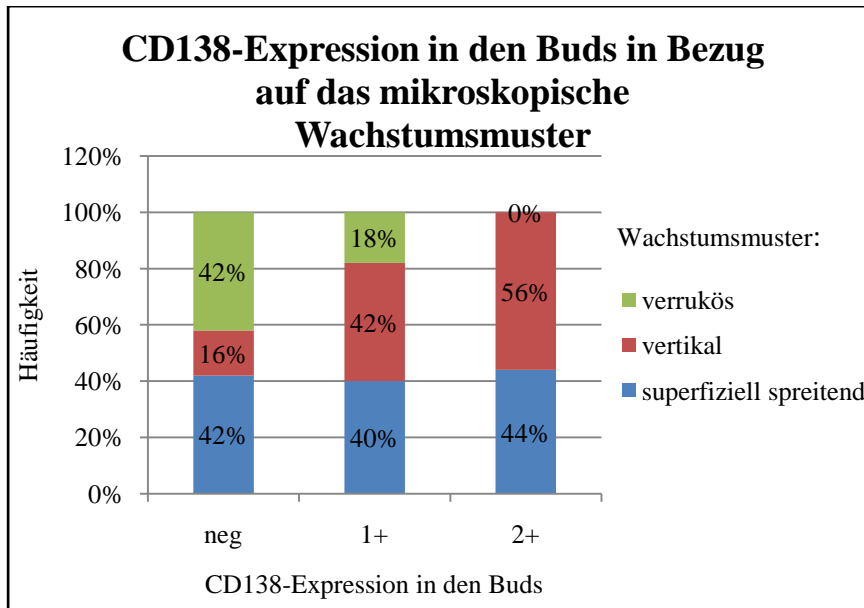


Abbildung 65: Anzahl der Peniskarzinome mit CD138-Expression in den Buds in Bezug auf das Wachstumsmuster.

4.3.17 CD138-Expression in den Buds in Bezug auf das Invasionsmuster beim Peniskarzinom

Die folgende Abbildung 66 zeigt den Zusammenhang zwischen der CD138-Expression in den Buds und dem Invasionsmuster. 12 von 79 Peniskarzinomen zeigten keine CD138-Expression in den Buds. 10 Fälle aus dieser Gruppe wiesen das endophytische und 2 Karzinome das infiltrative Invasionsmuster auf. In 47 Fällen fiel die CD138-Expression in den Buds schwach aus. 17 Karzinome aus dieser Gruppe besaßen das endophytische und 30 Peniskarzinome das infiltrative Invasionsmuster. 20 Fälle imponierten mit einer starken CD138-Expression in den Buds. 4 dieser 20 Karzinome waren vom endophytischen und 16 Karzinome vom infiltrativen Invasionstyp. Je stärker die CD138-Expression in den Tumorbuds ausfiel, desto mehr Peniskarzinome wiesen das infiltrative Invasionsmuster auf (Abb. 66). Dieser Zusammenhang ist statistisch gesichert ($p = 0,001$).

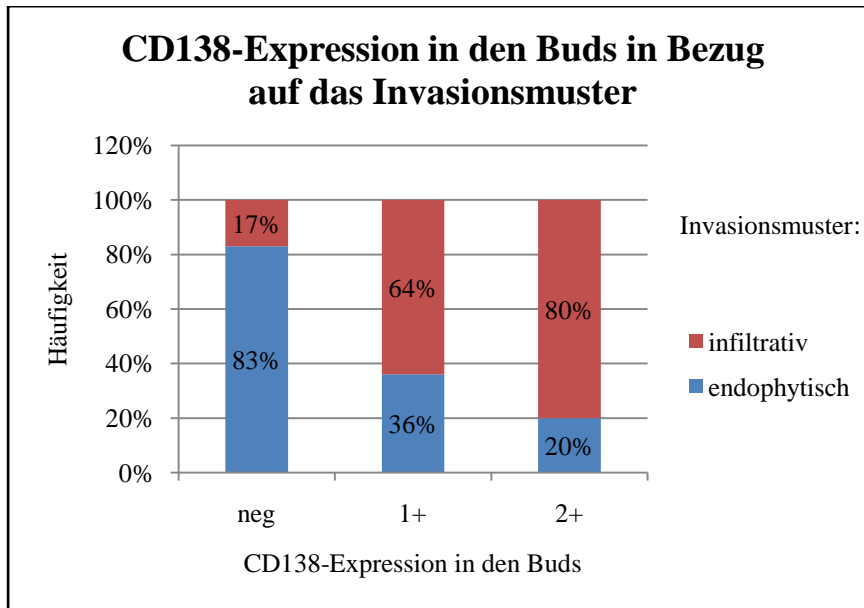


Abbildung 66: Anzahl der Peniskarzinome mit CD138-Expression in den Buds in Bezug auf das Invasionsmuster.

4.3.18 Histologischer Subtyp in Beziehung zur Anzahl der Buds

Werden die einzelnen histologischen Subtypen statistisch untersucht, ist die statistische Bewertung nicht möglich. Erst nach Gruppenbildung (1 = nicht verhornendes SCC, 2 = verhornendes SCC, 3 = basaloid, kondylomatös, gemischtzellig, papillär, verrukös) ist eine statistische Bewertung zulässig. Das Ergebnis ist, dass keine Signifikanz zwischen den histologischen Subtypen des Peniskarzinoms und der Anzahl der Buds besteht. In 39 Fällen trat das verhornende Plattenepithelkarzinom auf. In neun von diesen Fällen wurden weniger als 10 Buds beobachtet. In jeweils 15 Fällen wurden 10-20 und mehr als 20 Buds detektiert. In 16 Fällen kam das nicht verhornende Plattenepithelkarzinom vor. 4 Fälle aus dieser Gruppe zeigten weniger als 10 Buds und jeweils 6 Fälle wiesen 10-20 Buds und mehr als 20 Buds auf. Alle anderen Gruppen waren mit insgesamt 24 Fällen vertreten (basaloid = 6, kondylomatös = 6, gemischtzellig = 6, papillär = 4, verrukös = 2), wobei 12 Fälle weniger als 10 Buds aufwiesen und in jeweils 6 Fällen wurden 10-20 Buds und mehr als 20 Buds ausgezählt.

4.3.19 Mikroskopisches Wachstumsmuster in Beziehung zur Anzahl der Buds

Um eine statistische Auswertung zu ermöglichen, wurden die 4 Fälle, die ein multizentrisches Wachstumsmuster aufwiesen, nicht in die statistische Bearbeitung einbezogen. Das Wachstumsmuster korrelierte signifikant mit der Anzahl der auftretenden Buds ($p = 0,038$). Das verruköse Wachstumsmuster wies signifikant mehr Fälle mit weniger Buds auf, als das superfiziell spreitende und das vertikale Wachstumsmuster. In insgesamt 31 Fällen von 79 untersuchten Peniskarzinomen ist der superfiziell spreitende Typ aufgetreten. Dabei zeigten 11 Fälle weniger als 10 Buds, 7 Fälle 10-20 Buds und 13 Fälle mehr als 20 Buds. Der vertikale Wachstumstyp war ebenfalls mit 31 Fällen vertreten, wobei 6 Fälle weniger als 10 Buds, 13 Peniskarzinome 10-20 Buds und 12 Fälle mehr als 20 Buds aufwiesen. In 13 Fällen ist das verruköse Wachstumsmuster beobachtet worden. 8 Fälle aus dieser Gruppe hatten weniger als 10 Buds, 4 Fälle 10-20 Buds und 1 Fall zeigte mehr als 20 Buds (Abb. 59). Beim vertikalen Wachstumsmuster zeigten sich mit 19 % signifikant weniger Fälle mit weniger als 10 Buds. Das verruköse Wachstumsmuster imponierte hingegen durch signifikant mehr Fälle mit weniger als 10 Buds (62 %) und durch weniger Fälle mit mehr als 20 Buds (8 %) ($p = 0,038$) (Abb. 67).

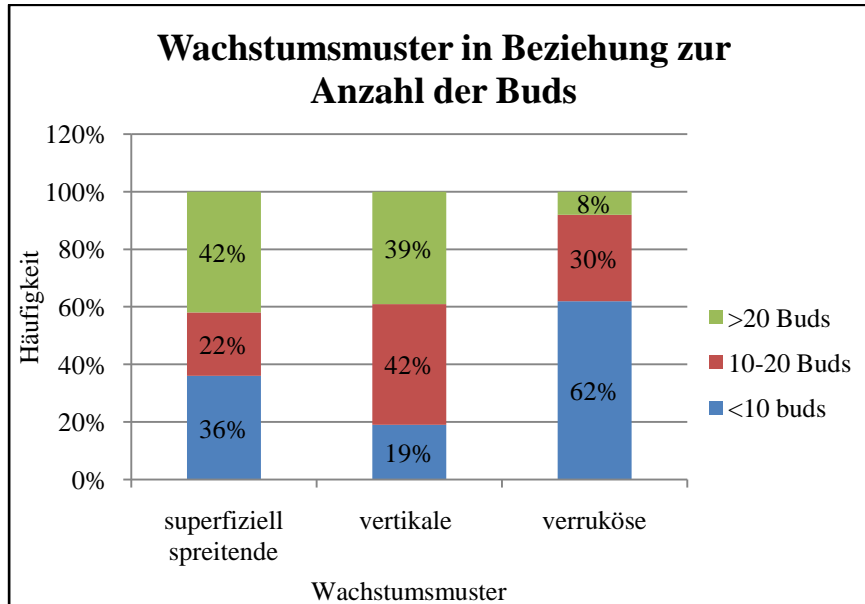


Abbildung 67: Wachstumsmuster des Peniskarzinoms in Beziehung zur Anzahl der Buds.

4.3.20 Invasion des Corpus spongiosum in Beziehung zur Anzahl der Buds

Es besteht eine signifikante Korrelation zwischen der Invasion des Corpus spongiosum und der Anzahl der Tumorbuds ($p = 0,008$). In 41 von 79 Fällen fiel die Invasion des Corpus spongiosum negativ aus. Aus dieser Gruppe zeigten 18 Peniskarzinome weniger als 10 Buds, 15 Fälle wiesen 10-20 Buds auf und in 8 Karzinomen wurden mehr als 20 Buds gefunden. In 38 Peniskarzinomen kam es zur Invasion des Corpus spongiosum. In 7 Fällen aus dieser Gruppe wurden weniger als 10 Buds detektiert. In 12 Karzinomen sind 10-20 Buds aufgetreten und in 19 Fällen lagen mehr als 20 Buds vor. Die Peniskarzinome, die eine Invasion des Corpus spongiosum zeigten, wiesen signifikant mehr Buds auf als die Fälle, in denen eine Invasion des Corpus spongiosum ausblieb. Die Peniskarzinome ohne Invasion des Corpus spongiosum zeigten mit 44 % signifikant mehr Fälle mit weniger als 10 Buds und mit 20 % signifikant weniger Fälle mit mehr als 20 Buds. Umgekehrt wiesen die Peniskarzinome mit Invasion des Corpus spongiosum mit 50 % signifikant mehr Fälle mit mehr als 20 Buds auf und mit 18 % signifikant weniger Fälle mit weniger als 10 Buds auf ($p = 0,008$) (Abb. 68).

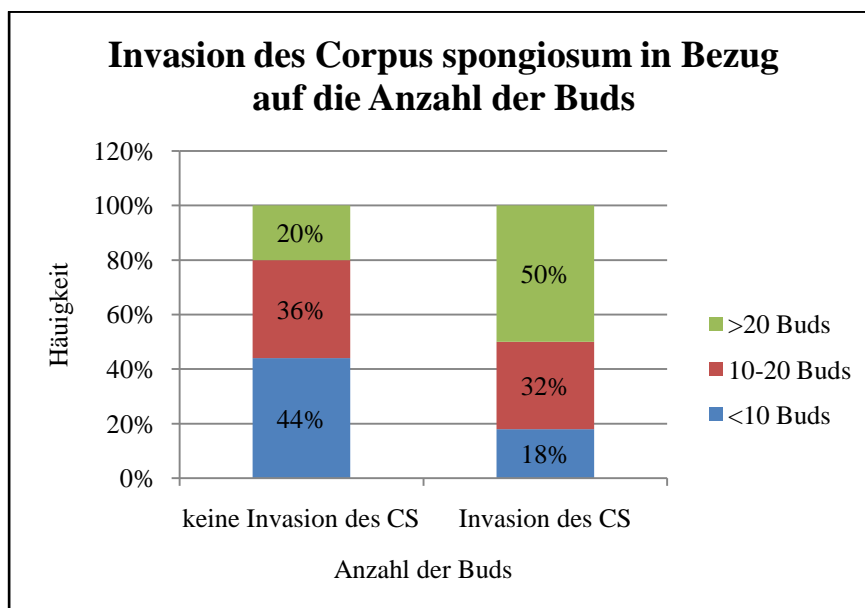


Abbildung 68: Invasion des Corpus spongiosum in Bezug auf die Anzahl der Buds.

4.3.21 Anzahl der Buds in Beziehung zum Invasionsmuster des Tumors

Beim Peniskarzinom unterscheidet man das infiltrative vom endophytischen (pushing) Invasionsmuster. Das Invasionsmuster des Peniskarzinoms korreliert signifikant mit der Anzahl der Tumorbuds ($p < 0,001$). 25 von 79 untersuchten Peniskarzinomen wiesen weniger als 10 Buds auf. Aus dieser Gruppe zeigten 18 Fälle das endophytische Invasionsmuster, d.h. das kompakt zapfenförmige Einwachsen des Tumors. In 7 Fällen trat das diffuse infiltrative Invasionsmuster auf. In insgesamt 27 von 79 Peniskarzinomen sind mehr als 20 Buds aufgetreten. 6 von diesen Fällen zeigten das endophytische und 21 Fälle wiesen das infiltrative Invasionsmuster auf (Abb. 69). Die Varianzanalyse ergab eine Signifikanz zwischen der Anzahl der Buds und dem Invasionsmuster von $p = 0,007$. Das Konfidenzintervall für den Mittelwert des endophytischen Invasionsmusters wies an der Untergrenze 6 Buds und an der Obergrenze 16 Buds auf. Das Konfidenzintervall für den Mittelwert des infiltrativen Invasionsmusters zeigte an der Untergrenze eine Anzahl von 18 Buds und an der Obergrenze eine Anzahl von 33 Buds. Der Mittelwert der Anzahl der Buds lag beim endophytischen Invasionsmuster bei 11 und beim infiltrativen Typ bei 25 (Abb. 70). Beim endophytischen Tumorwachstum, d.h. beim invertierenden, kompakt zapfenförmigen Einwachsen tritt Tumor-Budding nur sehr vereinzelt auf. Tumor-Budding tritt hingegen signifikant häufiger bei Peniskarzinomen auf, die ein diffuses infiltratives Invasionsmuster besitzen. Während das infiltrative Invasionsmuster bei den Karzinomen mit weniger als 10 Buds nur in 30 % der Fälle vorkam, zeigte sich ein Anteil des infiltrativen Invasionsmusters in den Fällen mit 10-20 Buds und mehr als 20 Buds von über 70 %. Hingegen wiesen die Fälle mit weniger als 10 Buds in 72 % das endophytische Invasionsmuster auf. Der Anteil des endophytischen Invasionsmusters lag in den Gruppen mit 10-20 Buds und mehr als 20 Buds bei unter 30 % ($p < 0,001$).

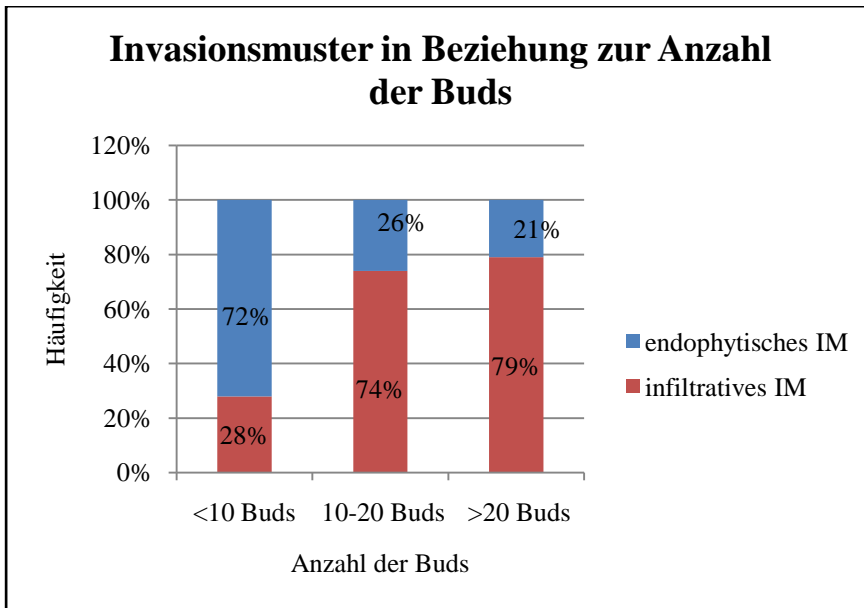


Abbildung 69: Anzahl der Tumorbuds in Bezug zum Invasionsmuster des Peniskarzinoms (Invasionsmuster = IM).

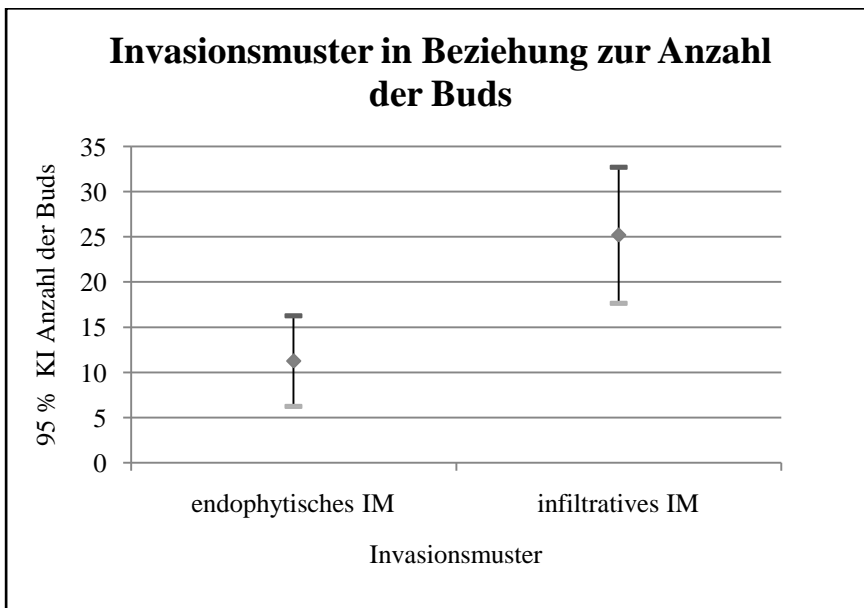


Abbildung 70: Verteilung der Anzahl der Buds in Abhängigkeit vom Invasionsmuster; (KI = Konfidenzintervall).

4.3.22 pT-Kategorie in Beziehung zur Anzahl der Buds

Es besteht ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem pT-Stadium und der Anzahl der Buds ($p = 0,006$). In 25 Fällen ist die pT1a-Kategorie aufgetreten. In jeweils 11 Fällen aus dieser Gruppe sind weniger als 10 Buds und 10-20 Buds aufgetreten. In 3 Fällen traten mehr als 20 Buds auf. In 21 von 79 Fällen ist die pT2-Kategorie aufgetreten. In 5 Fällen aus dieser Gruppe kamen weniger als 10 Buds vor. 3 Peniskarzinome wiesen 10-20 Buds auf und 13 Fälle zeigten mehr als 20 Buds. Die pT3-Kategorie trat in 17 Fällen auf. In 2 von 17 Fällen traten weniger als 10 Buds auf, in 9 Fällen kamen 10-20 Buds vor und 6 Karzinome besaßen mehr als 20 Buds. In der pT1a-Kategorie traten signifikant weniger Fälle mit mehr als 20 Tumorbuds auf. In der pT2-Kategorie traten signifikant weniger Fälle mit 10-20 Buds und signifikant mehr Fälle mit mehr als 20 Buds auf. Die pT2-Kategorie wies signifikant weniger Fälle mit weniger als 10 Tumorbuds auf. Mit 12 % kamen signifikant weniger Fälle mit mehr als 20 Buds in der pT1a-Kategorie vor. In der pT2-Kategorie wies hingegen die Gruppe mit 10-20 Buds mit 14 % signifikant weniger Fälle, aber mit 62 % deutlich mehr Fälle mit mehr als 20 Buds auf. In der pT3-Kategorie konnte man mit Signifikanz beobachten, dass mit 12 % weniger Fälle mit weniger als 10 Buds auftraten ($p = 0,006$) (Abb. 71).

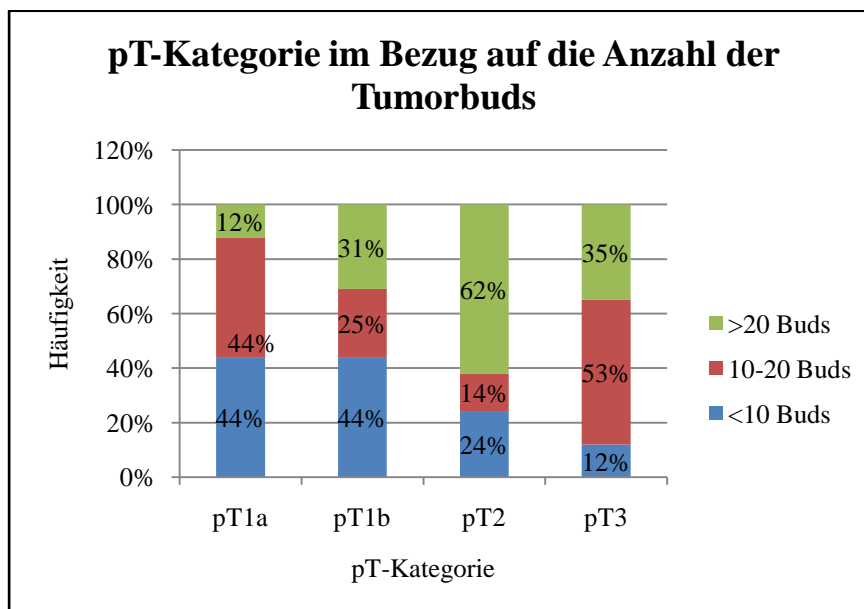


Abbildung 71: pT-Kategorie des Peniskarzinoms in Bezug auf die Anzahl der Buds.

4.3.23 pN-Kategorie in Beziehung zur Anzahl der Buds

Es besteht ein signifikanter Zusammenhang zwischen der pN-Kategorie und der Anzahl der Buds ($p = 0,006$). In 57 Fällen konnten die regionären Lymphknoten nicht beurteilt werden. In 7 Fällen konnten keine regionären Lymphknotenmetastasen festgestellt werden. In 3 dieser Fälle zeigten sich weniger als 10 Buds und in 4 Peniskarzinomen 10-20 Buds. Bei 15 Patienten konnten Lymphknotenmetastasen detektiert werden. 5 Peniskarzinome aus dieser Gruppe wiesen 10-20 Buds, 10 Fälle mehr als 20 Buds und kein Fall weniger als 10 Buds auf. Die Peniskarzinome, die keine regionären Lymphknotenmetastasen zeigten, besaßen in keinem Fall mehr als 20 Tumorbuds. Diejenigen Karzinome, bei denen Lymphknotenmetastasen festgestellt wurden, wiesen in keinem Fall weniger als 10 Buds und in 67 % der Fälle mehr als 20 Buds auf ($p = 0,006$) (Abb. 72).

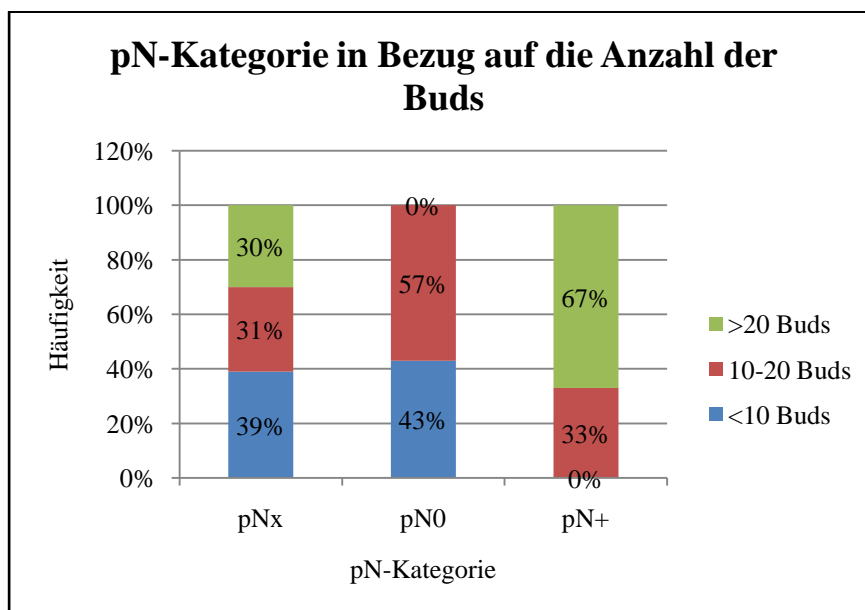


Abbildung 72: pN-Kategorie beim Peniskarzinom in Bezug auf die Anzahl der Buds.

4.3.24 Progressionsstatus des Peniskarzinoms in Bezug auf die Anzahl der Buds

Es besteht ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Progressionsstatus des Peniskarzinoms und der Anzahl der Tumorbuds ($p = 0,001$). In 50 von 79 Fällen trat keine Tumorprogression auf. 23 Peniskarzinome (46 %) aus dieser Gruppe wiesen weniger als 10 Buds auf, in 14 Fällen kamen 10-20 Buds vor und in 13 Karzinomen (26 %) wurden mehr als 20 Buds

gefunden. In 29 von 79 Karzinomen kam es zur Tumorprogression. 2 von 29 Fällen (7 %) hatten weniger als 10 Buds, 13 Fälle zeigten 10-20 Buds und 14 Karzinome (48 %) mehr als 20 Buds. In den Fällen, in denen es zur Tumorprogression gekommen ist, traten signifikant mehr Buds auf als in den Fällen mit ausgebliebener Tumorprogression (Abb. 73).

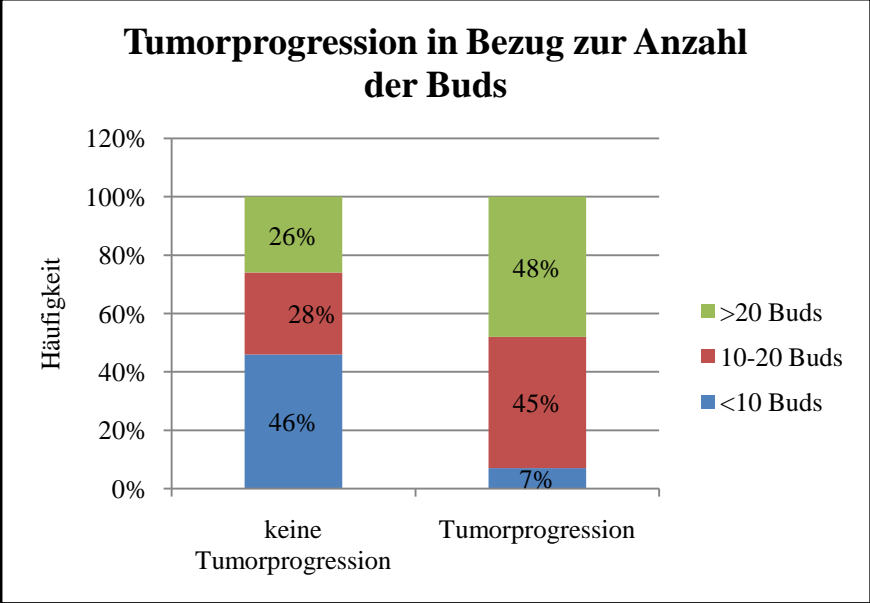


Abbildung 73: Progression des Peniskarzinoms in Bezug auf die Anzahl der Buds.

4.3.25 Statistisch geprüfte nicht signifikante Zusammenhänge

Ferner wurden folgende Parameter statistisch auf Zusammenhänge untersucht. Es konnten jedoch keine signifikanten Korrelationen festgestellt werden:

Das Tumor-Grading in Bezug auf die Anzahl der Tumorbuds.

Die Invasion der Corpora cavernosa in Bezug auf die Anzahl der Tumorbuds.

Die Tumordicke (Eindringtiefe des Tumors) in Bezug auf die Anzahl der Tumorbuds.

Die Anzahl der Läsionen in Bezug auf die Anzahl der Tumorbuds.

Der Zeitraum bis zur Tumorprogression, der karzinombezogene Lebensstatus und der allgemeine Lebensstatus in Bezug auf die Anzahl der Buds.

Die Anzahl der Blutgefäße in Bezug auf den L1- und V1-Status sowie auf die pT- und pN-Kategorie.

Die Anzahl der Blutgefäße in Bezug auf die Anzahl der Buds.

Die p16-Expression im Tumor in Bezug auf das mikroskopische Wachstums- und Invasionsmuster.

Die E-Cadherin-Expression im Tumor in Bezug auf die Ki-67-Expression im Tumor.

Die E-Cadherin-Expression in der Invasionsfront in Bezug auf die Ki-67-Expression im Tumor.

Die E-Cadherin-Expression in den Buds in Bezug auf die Ki-67-Expression im Tumor.

Die E-Cadherin-Expression im Tumor in Bezug auf die Ki-67-Expression in der Invasionsfront.

Die E-Cadherin-Expression in der Invasionsfront in Bezug auf die Ki-67-Expression in der Invasionsfront.

Die E-Cadherin-Expression in den Buds in Bezug auf die Ki-67-Expression in der Invasionsfront.

Die E-Cadherin-Expression im Tumor in Bezug auf die Ki-67-Expression in den Buds.

Die E-Cadherin-Expression in der Invasionsfront in Bezug auf die Ki-67-Expression in den Buds.

Die E-Cadherin-Expression in den Buds in Bezug auf die Ki-67-Expression in den Buds.

Die E-Cadherin-Expression im Tumor in Bezug auf das mikroskopische Wachstumsmuster.

Die E-Cadherin-Expression in der Invasionsfront in Bezug auf das mikroskopische Wachstumsmuster.

Die E-Cadherin-Expression in den Buds in Bezug auf das mikroskopische Wachstumsmuster.

Die Vimentin-Expression in den Stromazellen in Bezug auf die Vimentin-Expression in der Invasionsfront.

Die Vimentin-Expression in den Stromazellen in Bezug auf die Vimentin-Expression im Tumor.
Die Vimentin-Expression in den Stromazellen in Bezug auf die Vimentin-Expression in den Buds.
Die Vimentin-Expression in der Invasionsfront in Bezug auf die Vimentin-Expression im Tumor.
Die Vimentin-Expression im Tumor in Bezug auf die Vimentin-Expression in den Buds
Die Ki-67-Expression im Tumor in Bezug auf die Ki-67-Expression in den Buds.
Die Ki-67-Expression in der Invasionsfront in Bezug auf die Ki-67-Expression in den Buds.
Die E-Cadherin-Expression im Tumor in Bezug auf die pN-Kategorie.
Die E-Cadherin-Expression in der Invasionsfront in Bezug auf die pN-Kategorie.
Die E-Cadherin-Expression in den Buds und dem pN-Kategorie.
Die E-Cadherin-Expression im Tumor in Bezug auf den L1-Status.
Die E-Cadherin-Expression in der Invasionsfront in Bezug auf den L1-Status.
Die E-Cadherin-Expression in den Buds in Bezug auf den L1-Status.
Die E-Cadherin-Expression im Tumor in Bezug auf den V1-Status.
Die E-Cadherin-Expression in der Invasionsfront in Bezug auf den V1-Status.
Die E-Cadherin-Expression in den Buds in Bezug auf den V1-Status.

4.4 Überlebenszeit

4.4.1 Gesamtüberleben

Bei der Analyse des Überlebens kam die Kaplan-Meier-Methode und die Cox-Regression zum Einsatz. Voraussetzung war, dass das Zielereignis Tod durch ein vollständiges Follow-up erfasst wurde und dass alle Variablen ohne Fehlangaben waren, da der Datensatz sonst nicht hätte berücksichtigt werden können.

4.4.1.1 Die pT-Kategorie in Bezug auf das Gesamtüberleben

Anhand der Kaplan-Meier-Analyse konnte gezeigt werden, dass ein signifikanter Zusammenhang zwischen der pT-Kategorie des Peniskarzinoms und dem Gesamtüberleben des Patienten besteht ($p < 0,001$). Das kumulative Überleben lag bei der pT3-Kategorie nach ca. 41 Monaten bei 0 %. Hingegen zeigten Patienten mit der pT1a-Kategorie nach ca. 41 Monaten ein kumulatives Überleben von ca. 70 % (Abb. 74).

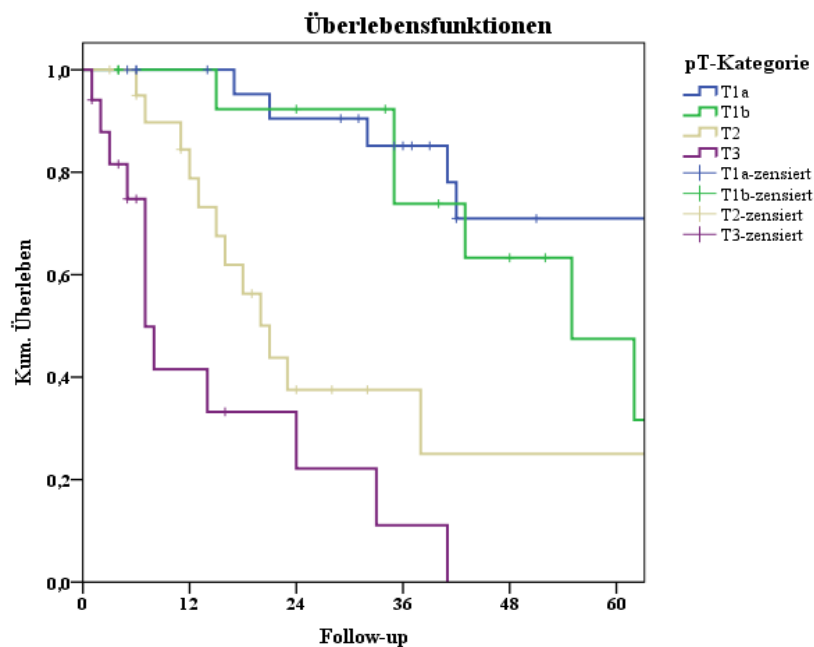


Abbildung 74: Kaplan-Meier-Analyse für das Gesamtüberleben in Bezug auf die pT-Kategorie beim Peniskarzinom.

4.4.1.2 Die pN-Kategorie in Bezug auf das Gesamtüberleben

Bei der pN-Kategorie konnte beobachtet werden, dass die Patienten, die Lymphknotenmetastasen aufwiesen, nach ca. 39 Monaten ein kumulatives Überleben von weniger als 30 % besaßen, während die Patienten, die keine Lymphknotenmetastasen besaßen bzw. bei denen die Lymphknoten nicht beurteilt werden konnten (pNX), nach 60 Monaten, ein kumulatives Überleben von noch fast 40 % zeigten (Abb.75). Es besteht jedoch kein signifikanter Zusammenhang zwischen der pN-Kategorie und dem Gesamtüberleben ($p = 0,148$).

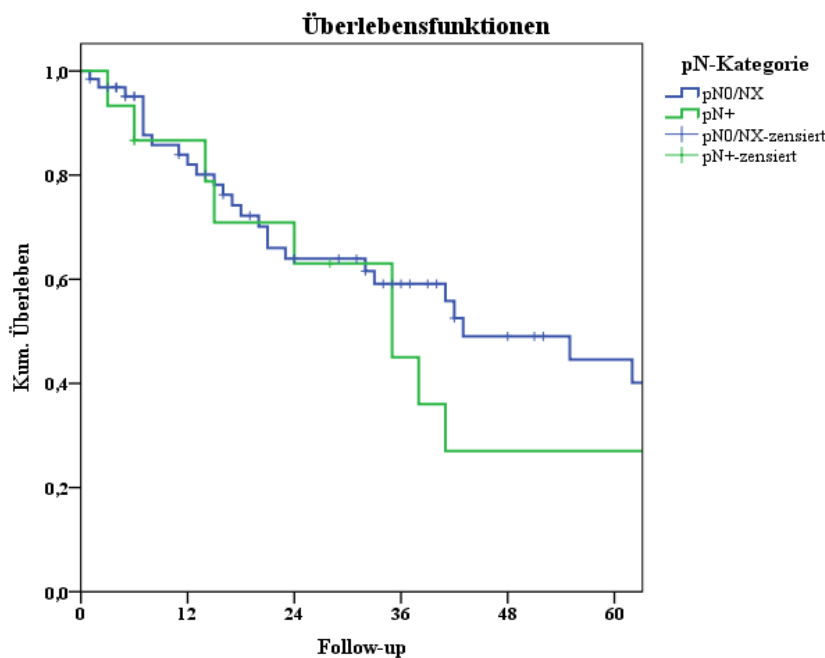


Abbildung 75: Kaplan-Meier-Analyse für das Gesamtüberleben in Bezug auf die pN-Kategorie beim Peniskarzinom.

4.4.1.3 Progressionsstatus in Bezug auf das Gesamtüberleben

In Bezug auf den Progressionsstatus wurde ermittelt, dass diejenige Patientengruppe, die keine Tumorprogression aufwies, nach 5 Jahren ein kumulatives Überleben von 50 % zeigte. Die Patienten, bei denen eine Tumorprogression beobachtet wurde, waren dadurch gekennzeichnet, dass nach 42 Monaten das kumulative Überleben bei weniger als 20 % lag (Abb. 76). Zwischen dem Progressionsstatus und dem Gesamtüberleben besteht eine Signifikanz von $p = 0,002$.

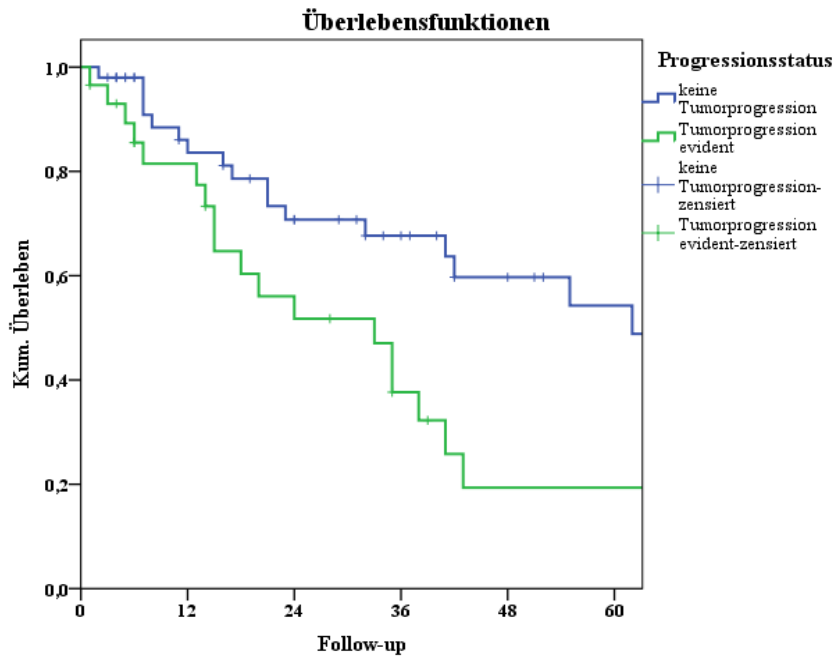


Abbildung 76: Kaplan-Meier-Analyse für das Gesamtüberleben in Bezug auf den Progressionsstatus beim Peniskarzinom.

4.4.1.4 Anzahl der Buds in Bezug auf das Gesamtüberleben

In der Kaplan-Meier-Analyse konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der Buds (gruppiert in drei Gruppen) keinen Einfluss auf das Gesamtüberleben der am Peniskarzinom erkrankten Patienten hat ($p = 0,317$). Die einzige Auffälligkeit, die sich feststellen lässt ist, dass die Kurven im ersten Jahr fast identisch sind, im Verlauf jedoch deutliche Vorteile für die Patienten mit weniger Buds erkennen lassen, wobei sich dieser Unterschied aber nach 5 Jahren wieder ausgleicht (Abb.77). Nach Änderung der Bud-Klassen-Einteilung in Klasse 1 (≤ 15 Buds) und Klasse 2 (> 15 Buds) wurde in der Kaplan-Meier-Analyse beobachtet, dass die Patienten mit mehr als 15 Buds eine geringfügig schlechtere Prognose besitzen als die Patienten mit 15 oder weniger als 15 Tumorbuds (Abb.78). Diese Werte liegen jedoch ebenfalls im Zufallsbereich und besitzen keine Signifikanz ($p = 0,106$).

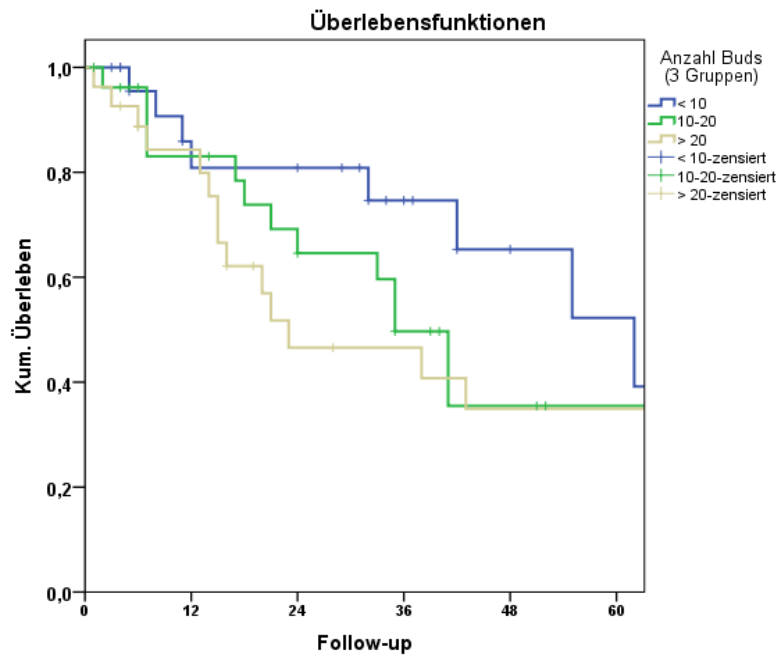


Abbildung 77: Kaplan-Meier-Analyse des Gesamtüberlebens in Bezug auf die Anzahl der Tumorbuds (3 Klassen) beim Peniskarzinom

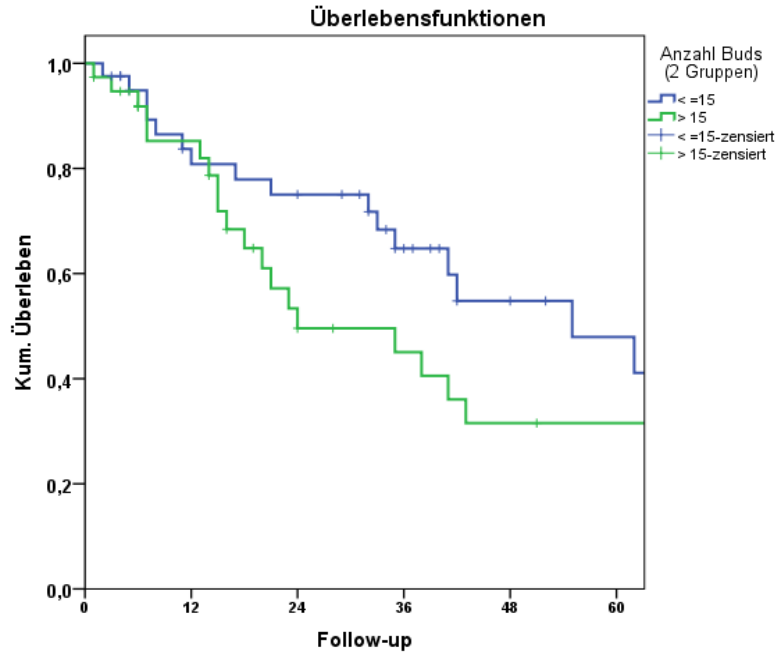


Abbildung 78: Kaplan-Meier-Analyse des Gesamtüberlebens in Bezug auf die Anzahl der Tumorbuds (2 Klassen) beim Peniskarzinom.

4.4.2 Tumorabhängiges Überleben

4.4.2.1 Anzahl der Buds in Bezug auf den karzinombedingten Lebensstatus

Zwischen der Anzahl der Buds und dem karzinombedingten Lebensstatus konnte in der Kaplan-Meier-Analyse ein signifikanter Zusammenhang beobachtet werden ($p = 0,017$). Die Patienten, die weniger Tumorbuds aufwiesen, hatten eine bessere Prognose als die Patienten, die mehr als 15 Tumorbuds besaßen (Abb.79). In der multivariaten Analyse konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der Tumorbuds in Bezug auf den karzinombedingten Lebensstatus keine statistische Signifikanz aufwies und somit der unabhängige Einfluss der Tumorbuds auf den karzinombedingten Lebensstatus verloren ging.

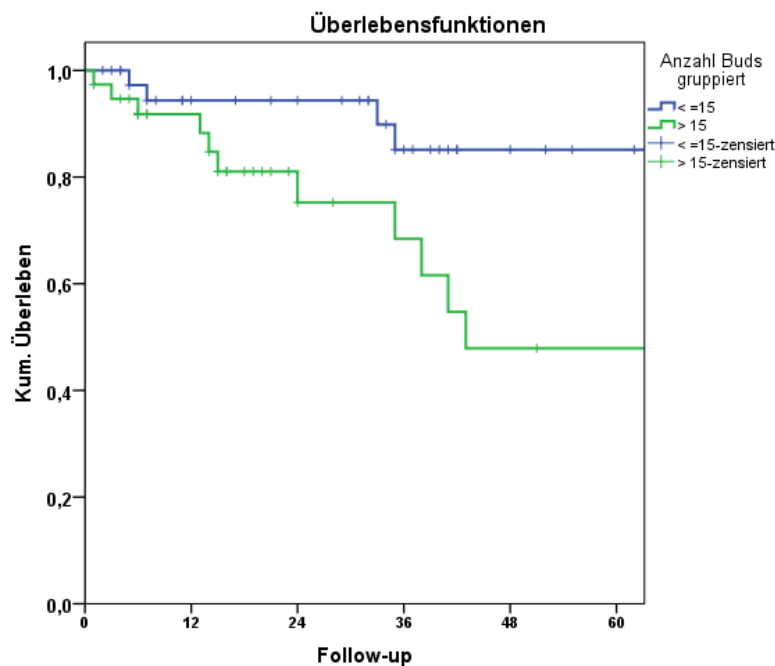


Abbildung 79: Kaplan-Meier-Analyse des karzinombedingten Tumorstatus in Bezug auf die Anzahl der Tumorbuds (2 Klassen) beim Peniskarzinom

4.4.2.2 Invasionsmuster in Bezug auf den karzinombedingten Lebensstatus

In der Beziehung zwischen dem karzinombedingten Lebensstatus und dem Invasionsmuster beim Peniskarzinom konnte keine Signifikanz beobachtet werden ($p = 0,732$).

Sowohl beim infiltrativen als auch beim expansiven (pushing) Invasionsmuster lag das kumulative Überleben der Patienten zwischen 60 % und 80 % (Abb.80).

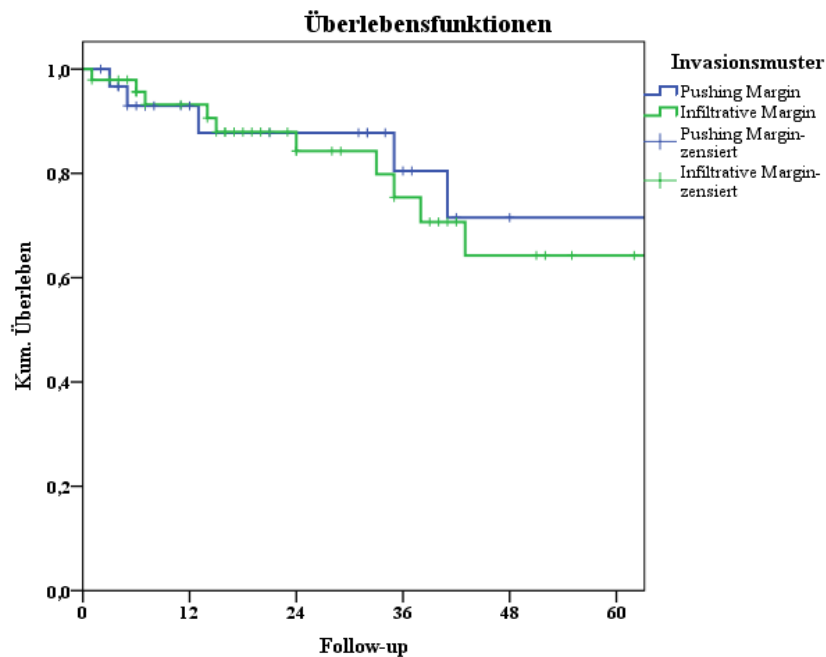


Abbildung 80: Kaplan-Meier-Analyse des karzinombedingten Tumorstatus in Bezug auf das Invasionsmuster beim Peniskarzinom.

4.4.2.3 Progressionsstatus in Bezug auf den karzinombedingten Lebensstatus

In der Kaplan-Meier-Analyse konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Progressionsstatus und dem karzinombedingten Lebensstatus beobachtet werden ($p < 0,001$).

Die Kaplan-Meier-Überlebenskurve zeigte, dass die Patientengruppe ohne Tumorprogression nach 5 Jahren ein kumulatives Überleben von 100 % aufwies. Bei den Patienten hingegen, bei denen eine Tumorprogression beobachtet wurde, lag das kumulative Überleben nach ca. 42 Monaten bei ca. 20 % (Abb. 81).

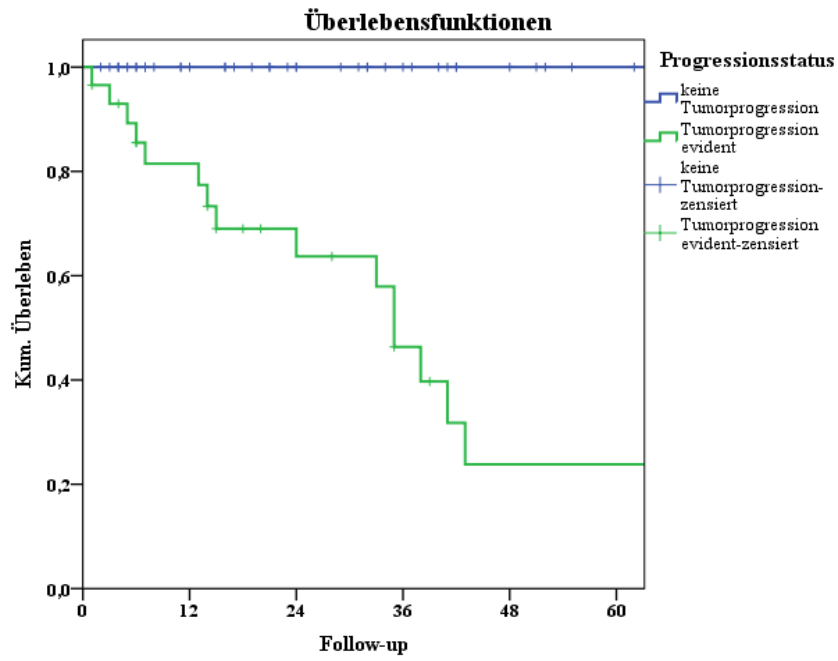


Abbildung 81: Kaplan-Meier-Analyse des karzinombedingten Tumorstatus in Bezug auf den Progressionsstatus beim Peniskarzinom

4.5 Multivariate Analyse

4.5.1 Multivariate Analyse für das Gesamtüberleben

Im Cox-Modell sollte untersucht werden, welche Variablen einen unabhängigen Einfluss auf das Gesamtüberleben haben. Hierzu wurden diejenigen Variablen ausgewählt, die bereits in der univariaten Analyse und in der Literatur als Risikofaktoren bekannt waren. In das Modell eingeflossen sind die Variablen Wachstumsmuster mit den Kategorien superfiziell spreitendes, vertikales und verruköses Wachstumsmuster, die pT- und pN-Kategorie, das Alter (Altersklassen), der Progressionsstatus und die Tumorlokalisation mit den Kategorien Glans und Präputium.

Zusätzlich wurde untersucht, ob auch die Tumorbuds, hier gruppiert in zwei Klassen, einen Einfluss auf das Gesamtüberleben besitzen. Die pN-Kategorie und die Anzahl der Buds stellten im multivariaten Modell keinen unabhängigen Prognosefaktor beim Peniskarzinom in Bezug auf das Gesamtüberleben dar. Die pT1b-Kategorie zeigte ein fast 2-mal so hohes relatives Risiko (RR = 1,9), welches jedoch noch im Zufallsbereich lag. Wenn eine pT2-Kategorie vorlag, so erhöhte sich das Risiko um fast das 10-fache (RR = 9,6) und bei pT3-Karzinomen sogar um das 20-fache (RR = 19,8) mit einem p-Wert < 0,001. Des Weiteren konnte im multivariaten Modell bestätigt werden, dass der Progressionsstatus einen unabhängigen Einfluss auf das Gesamtüberleben besitzt. Liegt eine Progression vor, so besteht ein 2,3-fach erhöhtes relatives Risiko mit einem p-Wert von 0.028.

4.5.2 Logistische Regression zur Ermittlung von unabhängigen Einflussgrößen für das Auftreten von Tumorbuds

Nach ausführlicher univariater Analyse der Zusammenhänge zwischen einzelnen Variablen und der Anzahl der Tumorbuds (s. Kap. 4.3) folgte zusammenfassend eine multivariate Analyse, um mit Hilfe der logistischen Regression die unabhängigen Einflussfaktoren auf die Zielgröße zu ermitteln. Dabei stellte die Anzahl der Buds die Zielgröße dar (gruppiert in zwei Klassen ≤ 15 und > 15 Buds). In das Modell eingeflossen sind die Variablen Wachstumsmuster mit den Kategorien superfiziell spreitendes, vertikales und verruköses Wachstumsmuster, die pT- und

pN-Kategorie, das Alter (Altersklassen), der Progressionsstatus, die Budklassen der CD138-Expression und das Invasionsmuster mit den Kategorien expansiv und infiltrativ.

Im Ergebnis der logistischen Regression konnte gezeigt werden, dass die pN-Kategorie und das Invasionsmuster einen unabhängigen Einfluss auf die Anzahl der Tumorbuds besitzen. Dabei wurde die pNX-Kategorie und die pN0-Kategorie zu einer Gruppe zusammengefasst. Multivariat zeigte sich, dass das vermehrte Auftreten von Buds mit dem Vorhandensein eines infiltrativen Invasionsmusters zusammenhängt. So stieg beim infiltrativen Invasionsmuster das Risiko, Tumorbuds zu entwickeln, um das 4-fache ($RR = 4,15$) bei einem p-Wert von 0,012. Des Weiteren konnte in der multivariaten Analyse beobachtet werden, dass es einen gesicherten statistischen Zusammenhang zwischen dem vermehrten Auftreten von Tumorbuds beim Peniskarzinom und Lymphknotenmetastasen gibt. Beim Auftreten von Lymphknotenmetastasen bestand somit ein 20-fach erhöhtes Risiko ($RR = 19,7$) bei einem p-Wert von 0,007, dass Tumorbuds auftraten.

5. Diskussion

5.1 Diskussion von Material und Methode

Die ausgewerteten Fälle sind aus sechs verschiedenen Instituten für Pathologie bzw. Kliniken für Urologie zusammengetragen worden. Der makroskopische Zuschnitt der Präparate erfolgte in allen Instituten für Pathologie nach den Vorgaben von schriftlich fixierten Zuschnittordnungen und kann somit als vergleichbar gelten.

Seit 1994 existiert im Land Brandenburg eine einheitliche Erfassung und Auswertung der klinischen Krebsregisterdaten, die eine hohe Datenvollständigkeit sichert.

Das Fehlen einer standardisierten Auswertungsmethode zur Quantifizierung von Tumorbuds führt zu einer erschwerten routinierten Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, so dass es rasch, aufgrund der unterschiedlichen Auswertungsmethoden, zu unterschiedlichen Ergebnissen kommen kann. Wang et al. [193] folgend wurden auch in der vorliegenden Studie alle vorhandenen Tumorschnitte eines Patientenfalls auf Tumor-Budding untersucht, da das Auftreten des Tumor-Buddings an der Invasionsfront keine Homogenität aufweist. Um das Detektieren und Auszählen der Tumorbuds zu vereinfachen und um eine bessere Reproduzierbarkeit des Ergebnisses zu gewährleisten, wurden in der vorliegenden Untersuchung die histologischen Schnitte immunhistochemisch mit dem Antikörper Zytokeratin 5/6 markiert [83, 147]. Die Anwendung der immunhistologischen Zytokeratin 5/6-Markierung verursacht für die histologische Routinediagnostik Zusatzkosten, was ihre Etablierung im Praxisalltag möglicherweise beeinträchtigen könnte [99, 193]. Zusätzlich stellt diese Methode jedoch gegenüber der Hämatoxylin-Eosin-Färbung einen erheblichen Vorteil im Erkennen der Tumorbuds dar und erleichtert das Abgrenzen von aktivierten Fibroblasten im Stroma [83]. Um die Anzahl der Tumorbuds pro Fall zu erfassen, wurde das 10-HPF-Scoring-System verwendet. Dabei wurden die Tumorbuds in 10 HPFs (High power fields) pro Patientenfall ausgezählt. Horcic et al. [74] verglichen in einer Untersuchung alle bekannten Scoring-Systeme und gelangten zu dem Resultat, dass die 10-HPF-Methode, in Bezug auf das Erfassen der Tumorbuds, als die verlässlichste und am besten reproduzierbarste Auswertungsmethode gilt [74, 83]. Hase et al. [67] beurteilten in ihrer Methode das Areal an der Invasionsfront mit den meisten Tumorbuds und bewerteten das Tumor-Budding als entweder kein/schwach oder als moderat/stark vorkommendes Tumor-Budding. Nakamura et al. [130] teilten das Tumor-

Budding in drei Grade ein: Grad 1 = kein/schwach auftretendes Tumor-Budding, wenn weniger als ein Drittel der Invasionsfront Tumorbuds zeigt; Grad 2 = moderat, wenn ein bis zwei Drittel der Invasionsfront Tumorbuds aufweisen; Grad 3 = stark, wenn mehr als zwei Drittel der Invasionsfront Tumorbuds beinhalten. Ueno et al. [187] teilten das Tumor-Budding unter 20-facher Vergrößerung in negativ (weniger als 5 Buds) und in positiv (mehr als 5 Buds) ein. Wang et al. [193] wählten drei histologische Schnitte aus und zählten die Tumorbuds in 5 Gesichtsfeldern mit einer 200-fachen Vergrößerung. Aus der Anzahl der Tumorbuds wurde der Medianwert gebildet, der Auskunft gibt, ob das Tumor-Budding positiv (mehr oder gleich ein Tumorbud) oder negativ (kein Tumorbud) ausfiel [193]. Bei der „schnellen-Tumorbud-Zähl-Methode“ (rapid-bud-count-method) wurde das auftretende Tumor-Budding der fünf Gesichtsfelder in positiv und negativ eingeteilt. Wurden mehr als 50 % der Gesichtsfelder, in Bezug auf das Tumor-Budding, als positiv bewertet, dann handelte es sich um ein stark auftretendes Tumor-Budding [193]. Hinzu kommt das Scoringsystem der 1-HPF- und der 10-HPF-Methode. Horcic et al. [74] bevorzugten bei der Untersuchung des Tumor-Buddings die 10-HPF- gegenüber der 1-HPF-Methode, da sich die Tumorbuds entlang der Invasionsfront heterogen verteilen und somit eine vorteilhaftere Erfassung der Anzahl der Tumorbuds gegeben ist. Die vorliegende Arbeit unterscheidet sich jedoch in der Gruppeneinteilung der Tumorbuds von der Studie, die Horcic et al. [74] durchführten. Während in der vorliegenden Studie drei Gruppen (< 10 Buds, 10-20 Buds und > 20 Buds) gebildet wurden, nahmen Horcic et al. [74] keine Gruppeneinteilung der ausgezählten Tumorbuds vor. Bei Karamitopoulou et al. [83], die ebenfalls die 10-HPF-Methode anwandten, wurden das Tumor-Budding in zwei Gruppen eingeteilt (≤ 10 Buds und > 10 Buds). Im Vergleich der verschiedenen Tumor-Budding-Quantifizierungsmethoden stand ausschließlich die 1-HPF- und 10-HPF-Methode in signifikanter Beziehung zum klinischen Outcome des Patienten [74].

5.2 Diskussion der Ergebnisse

Das Alter, der in der vorliegenden Arbeit untersuchten 79 Patienten, reichte vom 29. bis zum 92. Lebensjahr. Zum Diagnosezeitpunkt betrug das durchschnittliche Alter jedoch 67,4 Jahre und das mediane Alter 68 Jahre. Entsprechend der vorliegenden Studie zeigten auch Goodman et al. [58] und Guimarães et al. [62], dass der Altersgipfel der Patienten, die an einem Peniskarzinom erkrankten, in der sechzigsten und siebzigsten Lebensdekade angesiedelt war [62, 23].

In 69 % der Fälle waren die in der eigenen Arbeit untersuchten Peniskarzinome Plattenepithelkarzinome. In jeweils 8 % der Karzinome zeigte sich der kondylomatöse, basaloide und der gemischtzellige Subtyp. 5 % der Fälle gehörten zum papillären und 2 % der Peniskarzinome zum verrukösen Subtyp. Zu einer ähnlichen Verteilung der vorkommenden histologischen Subtypen wie in der eigenen Untersuchung kamen Cubilla et al. [32], Hakenberg et al. [65], Guimarães et al. [62] und Protzel et al. [150]. Das Plattenepithelkarzinom kam in 65 % der Fälle vor. Der basaloide Subtyp trat in 4-10 %, der kondylomatöse Subtyp in 7-10 %, der verruköse Subtyp in 3-8 %, der papilläre Subtyp in 5-15 % und der gemischtzellige Subtyp in 9-10 % der Fälle auf.

In 46 % der Fälle, also bei fast der Hälfte der in der vorliegenden Studie untersuchten Peniskarzinome wurde eine Koilozytose diagnostiziert. Zu einem vergleichbar ähnlichen Ergebnis gelangten Guimarães et al. [64], die in genau 50 % der Fälle eine Koilozytose beobachten konnten.

In einer Untersuchung von 66 Peniskarzinomen trat in 42 % der Fälle das superfiziell spreitende, in 32 % der Fälle das vertikale, in 18 % das verruköse und in 8 % der Fälle das multizentrische Wachstumsmuster auf [31]. In der vorliegenden Arbeit konnten fast ähnliche Zahlen demonstriert werden, wobei das superfiziell spreitende in 39 %, das vertikale in ebenfalls 39 %, das verruköse in 17 % und das multizentrische Wachstumsmuster in 5 % der Fälle vorkam.

Burgers et al. [18] demonstrierten, dass zu 48 % das Peniskarzinom an der Glans, zu 21 % an dem Präputium, zu 14 % an der Glans, dem Präputium und dem Schaft, zu 9 % an der Glans und dem Präputium, zu 6 % an dem Sulcus coronarius und zu 2 % am Penischaft auftrat. Die vorliegende Untersuchung zeigte ähnliche Ergebnisse, wobei die Einteilung der Lokalisation leicht variierte. In der vorliegenden Arbeit war das Peniskarzinom in 57 % der Fälle an der Glans, in 22 % der Fälle am Präputium, in 11 % der Fälle am Präputium und an der Glans und in 10 % der Fälle an der Glans und am Sulcus coronarius lokalisiert.

73 % der Peniskarzinome zeigten in der vorliegenden Untersuchung eine Eindringtiefe von mehr als 5 mm. In der Studie von Paive et al. kamen mit 67 % ebenfalls deutlich mehr Fälle mit einer Eindringtiefe des Tumors von mehr als 5 mm vor [139]. Ebenso zeigten Guimarães et al. [64], dass die Mehrheit mit 68 % der untersuchten Peniskarzinome eine Invasionstiefe von mehr als 5 mm aufwies.

In 66 % der 79 untersuchten Peniskarzinome kam es in der vorliegenden Arbeit zu keiner Invasion der Lymphgefäße und nur 34 % der Karzinome wiesen eine Lymphgefäßinvasion auf. In nur 5 % der in dieser Studie untersuchten Peniskarzinome kam es zu einer Invasion der Blutgefäße und in 95 % blieb diese aus. Eine perineurale Invasion konnte in 19 % der Karzinome beobachtet werden, wobei 81 % der 79 Peniskarzinome keine aufwiesen. In der Untersuchung von Paiva et al. [139] gelangte man zu vergleichbaren Ergebnissen, wobei in 16 % der Fälle eine angiolymphatische und in nur 19 % der Fälle eine perineurale Invasion beobachtet werden konnte. Auch Graafland et al. [50], die 342 Peniskarzinome untersuchten, zeigten eine in nur 16 % der Fälle vorkommende lymphovaskuläre Invasion. Vassallo et al. [190] wiederum zeigten in ihrer Untersuchung eine in 33 % der Fälle vorkommende vaskuläre und eine in 39 % der Fälle vorkommende perineurale Invasion. Somit kamen in der Arbeit von Vassallo et al. [190] deutlich mehr Fälle mit vaskulärer und perineuraler Invasion vor.

Eine Invasion des Corpus cavernosum konnte in der vorliegenden Arbeit in nur 9 %, eine Invasion des Corpus spongiosum in 48 % und die Invasion der Urethra in 20 % der Peniskarzinome beobachtet werden. Mit 77 % war der Anteil der Patienten, die in der Untersuchung von Paiva et al. [139] eine Invasion des Corpus spongiosum aufwiesen deutlich höher als in der vorliegenden Arbeit. 15 % der Patienten zeigten eine Invasion der Urethra und 39 % der Patienten eine Invasion des Corpus cavernosum. Graafland et al. [50] zeigten mit 18 % eine vergleichbar niedrige Invasionsrate des Corpus cavernosum. Mit 64 % kam die Invasion des Corpus spongiosum deutlich häufiger vor. Mit 9 % trat die Invasion der Urethra seltener auf als in der vorliegenden Untersuchung [50].

61 % der in der vorliegenden Arbeit untersuchten 79 Peniskarzinome zeigten ein infiltratives Invasionsmuster und 39 % ein expansives Invasionsmuster. In der Studie von Aita et al. [5], die 101 Peniskarzinome untersuchten, trat das infiltrative Invasionsmuster in 50,5 % der Fälle auf. Paiva et al. [139] untersuchten 378 Patienten und zeigten ähnliche Resultate, wobei in 54 % der Fälle ein infiltratives und in 46 % der Fälle ein expansives Invasionsmuster auftrat.

Im Gegensatz zu der Studie von Paiva et al. [139], die in 63 % der 378 untersuchten Peniskarzinome die pT2-Kategorie, in 20 % der Fälle die pT1-Kategorie und in nur 16 % der Fälle die pT3-Kategorie diagnostizierten, traten in der vorliegenden Arbeit deutlich mehr Fälle

mit der pT1-Kategorie auf. In 52 % der Fälle kam die pT1-Kategorie vor, dabei besaßen 31 % der Peniskarzinome die pT1a- und 20 % der Karzinome die pT1b-Kategorie. In nur 27 % der Fälle trat das pT2- und bei 21 % der Patienten die pT3- Kategorie auf. Das Patientenkollektiv in der Untersuchung von Aita et al. [5] wies in 57 % der Fälle die pT2-, in 27 % der Fälle die pT3- und in insgesamt 16 % der Karzinome die pT1-Kategorie auf. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die Verteilung der pT-Kategorien zwischen den verschiedenen Studien variieren, wobei sich die Patienten in der Arbeit von Aita et al. [5] und Paiva et al. [139] überwiegend in der pT2-Kategorie befanden.

In der vorliegenden Arbeit ist der hohe Anteil an Patienten, bei denen keine regionären Lymphknoten beurteilt werden konnten, mit 72 % auffällig hoch. In 9 % der untersuchten Peniskarzinome konnten keine Lymphknotenmetastasen detektiert werden. Nur 19 % der Patientenkohorte wiesen Lymphknotenmetastasen auf. Die Studie von Zini et al. [198], in der 856 Peniskarzinome untersucht wurden, zeigte eine ähnliche Verteilung der pN-Kategorien. Mit 84 % konnten ebenfalls bei dem größten Anteil der Patienten keine Lymphknoten diagnostiziert werden. In nur 9 % der Fälle konnten Lymphknotenmetastasen entdeckt werden und 7 % der untersuchten Karzinome besaßen keine Metastasen in den Lymphknoten [198].

Die Literaturangaben zeigten, dass das Vorkommen der verschiedenen histologischen Grading-Stadien zwischen den unterschiedlichen Studien variierte. So konnten Li et al. in ihrer Untersuchung demonstrieren, dass die Mehrheit der Peniskarzinome mit 55 % das G1-Stadium aufwies. Nur 14 % der Fälle besaßen das G3-Stadium und 31 % der Karzinome das G2-Stadium [107]. Die Mehrheit der von Paiva et al. [139] untersuchten Peniskarzinome wiesen jedoch mit 58 % das G2-Stadium auf. 33 % der Fälle wiesen ein G1-Stadium und 9 % der Patienten ein G3-Stadium auf. In der vorliegenden Studie gehörten wiederum 29 % der Karzinome dem G3-Stadium und 20 % der Fälle dem G1-Stadium an, wobei die G2-Tumoren mit 51 % den größten Anteil darstellten.

In 27 % der Fälle wurde bei den Patienten der vorliegenden Untersuchung eine totale Penektomie durchgeführt. In 72 % der Fälle kam es zu einer partiellen Penektomie. Zini et al. [198], die 856 Patienten untersuchten demonstrieren in Bezug auf die partielle Penektomie mit 76 % ein übereinstimmenden Wert, während die radikale Penektomie bei nur 4 % der Patienten zur Anwendung kam. Die Untersuchung von Vassallo et al. [190] kam ebenfalls zu sehr ähnlichen Ergebnisswerten, wobei in 28 % der Fälle eine komplette Amputation und bei 66 %

der Patienten eine partielle Penektomie durchgeführt wurde. In der Studie von Guimarães et al. [64] kam wiederum mit 60 % die totale Penektomie häufiger zur Anwendung. Bei 40 % der Patienten wurde eine partielle Penektomie angewandt.

Neben der Tatsache, dass es sich bei der vorliegenden Arbeit um eine retrospektive Studie handelt, gibt es weiter zu erwähnende Einschränkungen. Der Anteil der Patienten, die keine Lymphknotenmetastasen aufwiesen und bei denen keine Lymphknotenmetastasen beurteilt werden konnten ist mit 81 % auffällig hoch. In nur 19 % der Fälle traten Lymphknotenmetastasen auf. Des Weiteren ist nicht auszuschließen, dass in der vorliegenden Arbeit, bei der Auswertung der Patientendaten aus den Erkrankungsjahren 1994-2010, die aus sechs verschiedenen Instituten stammten, Störfaktoren bestanden [119]. Darunter ist unter anderem zu verstehen, dass es bei der Herstellung der histologischen Präparate in den jeweiligen Instituten zur unterschiedlichen Dauer der Fixierung, zur unterschiedlichen Konzentration und zu einem unterschiedlichen pH-Wert des Fixans gekommen sein könnte. Ein weiterer möglicher Störfaktor ist die subjektive Begutachtung der histologischen Präparate in den jeweiligen Instituten, aus denen die Präparate stammen. Eine weitere Limitierung der vorliegenden Studie liegt darin, dass die Komorbiditätsfaktoren, die Einfluss auf die Patientenprognose hätten nehmen können, in der statistischen Analyse keine Berücksichtigung fanden, da diesbezüglich Daten nicht verfügbar waren. [119].

5.3 Diskussion der zusammenhängenden Parameter

Das Cyclin-D1-Protein gehört zu den Zellzyklusregulatoren. Das Cyclin-D1-Protein ist ebenfalls bekannt als ein Onkogen, welches für die Zellzyklusprogression und der daraus resultierenden Proliferation von Zellen verantwortlich ist [9, 106]. Es führt demnach bei Überexpression zu selektiven Wachstumsvorteilen von veränderten Zellen [129].

In der vorliegenden Untersuchung der 79 Peniskarzinome konnte mit einer Signifikanz von $p = 0,013$ gezeigt werden, dass in den Fällen, in denen es zu einer starken Cyclin-D1-Expression kam, eine höhere Anzahl von Tumorbuds auftrat. Dieser Parameter korrelierte jedoch weder mit dem Allgemeinüberleben, noch mit dem karzinombezogenen Überleben der Patienten. Zu einem gleichen Ergebnis gelangten Gunia et al. [61], die anhand der Tissue-Microarray-Technik das Tumorgewebe von 110 Peniskarzinomen untersuchten und die keine Korrelation zwischen der Cyclin-D1-Expression und dem Überleben der Patienten feststellen konnten. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit analysierten Peniskarzinomfälle sind in der größeren Stichprobe von Gunia

et al. [61] enthalten. Die Untersuchung von Gunia et al. [61] wurde an Tissue-Micro-Arrays durchgeführt. Der dabei beurteilbare Ausschnitt aus einem Tumorgewebe ist relativ klein im Vergleich zu den Proben der vorliegenden Arbeit. Papadopoulos et al. [141], die das Tumorgewebe von 21 Peniskarzinomen untersuchten, konnten eine Korrelation zwischen der Cyclin-D1-Expression und der negativen Überlebensrate zeigen. Lin et al. [109] demonstrierten in ihrer Studie, dass eine Cyclin-D1-Überexpression in 60 oropharyngealen Plattenepithelkarzinomen mit einer schlechten Überlebensprognose korrelierte. Eine Erklärung für diese unterschiedlichen Ergebnisse kann darin liegen, dass in der vorliegenden Arbeit die Cyclin-D1-Expression der Tumorbuds untersucht wurde, während Papadopoulos et al. [141] und Lin et al. [109] die Cyclin-D1-Expression im Zentrum des Tumors beobachtet haben. Ein weiterer Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse kann die geringe Patientenzahl der zuletzt genannten zwei Studien sein.

Eine gegensätzliche Erklärung, die den Tumorbuds eine hypo-proliferative Aktivität zuschreibt, trotz der vorhandenen Cyclin D1-Expression, die eigentlich für eine Proliferationsaktivität steht, liefert die epithelial-mesenchymale Transition. Um den Zellzyklus zu arretieren, wird im nicht pathologischen Zustand Cyclin D1 direkt durch p16, welches sich im Zellkern befindet, inhibiert. Befindet sich p16 jedoch im Zytoplasma, so bindet es CDK4, welches für die Cyclin D1-Aktivierung erforderlich ist. In der Abwesenheit von CDK4 bildet Cyclin D1 mit CDK2 einen inaktiven Komplex, so dass es weiterhin zu einer Expression von Cyclin D1 kommt, das Cyclin-D1-Protein jedoch in einer inaktiven, also in einer nicht-proliferativen Form vorliegt [178].

In der vorliegenden Arbeit zeigte das p16-Protein, das an der Regulation des Zellzyklus beteiligt ist, in den Tumorbuds eine zytoplasmatische Expression. Dabei korrelierte die p16-Expression in den Buds und im Zentrum des Tumors univariat signifikant mit dem Auftreten einer Koilozytose. Diese Feststellung wurde bereits durch Gunia et al. [60] gemacht, wobei auch hier, die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Peniskarzinomfälle in der größeren Stichprobe von Gunia et al. [60], die die Untersuchungen jedoch an Tissue-Micro-Arrays durchführten, enthalten waren. Hinzu kommt, dass die zuletzt genannte Studie zeigte, dass Peniskarzinome mit einer p16-Expression im Zentrum des Tumors ein besseres krebsspezifisches Überleben aufzeigten [60]. Poetsch et al. [145] machten ähnliche Beobachtungen bei der Untersuchung von 52 Peniskarzinomen, in der sie demonstrierten, dass eine negative p16-Expression der Tumormasse signifikant mit dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen korrelierte. Einen möglichen Erklärungsansatz für die zwei zuletzt genannten Ergebnisse liefert die Studie von Zhang et al. [196], in der gezeigt wurde, dass das nukleär lokalisierte p16-Protein, durch Inhibition der

cyclin-abhängigen Kinase 4 und 6 den Zellzyklus in der G-1-Phase stoppt und somit als Tumorsuppressor fungiert.

Unter normalen Bedingungen befindet sich, wie oben bereits erwähnt wurde, das p16-Protein im Zellkern und inhibiert das Cyclin-D1-Protein, so dass es zur Arretierung des Zellzyklus kommt. In einer Untersuchung von 57 kolorektalen Karzinomen, in der man die nukleäre p16-Expression in den Tumorbuds analysierte, fand man keine Korrelation zwischen der p16-Expression im Zellkern der Tumorbuds und dem Auftreten des Tumor-Buddings [148]. Befindet sich das p16-Protein jedoch im Zytoplasma wird dieser Inhibitionsvorgang unterbrochen [178]. In der vorliegenden Arbeit und in der Studie von Jass et al. [78] konnte diese zytoplasmatische Lokalisation des p16-Proteins in den Tumorbuds bestätigt werden. Die Beobachtung der zytoplasmatischen p16-Expression in den Tumorbuds machten Jass et al. [78] bei der Untersuchung von 59 kolorektalen Karzinomen. Jass et al. [78] konnten jedoch, entgegen der vorliegenden Untersuchung, eine Korrelation zwischen der p16-Expression und dem Vorhandensein von Metastasen, einer schlechten Prognose für die Patienten und der Invasion der Karzinome aufzeigen. Die vorliegende Untersuchung zeigte, dass die p16-Expression in den Tumorbuds mit dem vertikalen Wachstumsmuster und dem infiltrativen Invasionsmuster nur in der univariaten Analyse in signifikanter Korrelation stand. Die Korrelation zwischen dem Tumor-Budding und der Invasion fand durch die Studie von Jass et al. [78] Bestätigung. Die p16-Expression in den Buds und in der Tumormasse korrelierte in der vorliegenden Arbeit jedoch mit keinem klinisch-pathologischen Parameter und besitzt deshalb keinen prädiktiven und prognostischen Wert beim Peniskarzinom.

Das interzelluläre Zelladhäsionsmolekül E-Cadherin ist für den Zellkontakt benachbarter Epithelzellen verantwortlich und wurde bereits in mehreren Studien in Bezug auf das Tumor-Budding untersucht. Durch den Verlust des E-Cadherin-Moleküls können sich einzelne Tumorzellen vom Tumor lösen und als Tumorbuds ins Gewebe eindringen. Dieser Vorgang wird der epithelial-mesenchymalen Transition zugeschrieben [146]. Wang et al. [192] zeigten in der Untersuchung von 230 Plattenepithelkarzinomen der Zunge, dass das Zell-Adhäsionsmolekül E-Cadherin in den Tumorzellen der Invasionsfront um 64 % und in den Tumorbuds um 90 % gegenüber der Haupttumormasse reduziert war. Zusätzlich stieg die Expression von Vimentin in den Tumorbuds an. Das Vorhandensein von Tumorbuds korrelierte mit einem schlechten Allgemeinüberleben des Patienten [192]. Bei der Untersuchung von 83 oralen Plattenepithelkarzinomen korrelierte eine reduzierte E-Cadherin-Expression und eine gesteigerte Vimentin-Expression signifikant mit einer erhöhten Rezidivrate sowie mit einem kurzen

krankheitsfreien Überleben [110]. Campos et al. [20] untersuchten 125 Peniskarzinome und zeigten, dass eine geringe E-Cadherin-Expression im Zentrum des Tumors in Beziehung zu einem erhöhten Risiko steht, Lymphknotenmetastasen zu entwickeln. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die E-Cadherin-Expression in den Buds in signifikanter Korrelation zu der Anzahl der Tumorbuds steht. Mit steigender E-Cadherin-Expression nahm die detektierte Anzahl der Buds zu. Bei geringer E-Cadherin-Expression in den Buds traten weniger Tumorbuds auf ($p < 0,001$). Des Weiteren konnte keine Beziehung zwischen der E-Cadherin-Expression im Tumor und der Invasionsfront und der Anzahl der Buds festgestellt werden. Stieg jedoch die E-Cadherin-Expression im Tumorgewebe, so konnte ein gleichzeitiger Anstieg der E-Cadherin-Expression in den Tumorbuds beobachtet werden ($p = 0,001$). Ähnlich verhielt sich die Beziehung zwischen der E-Cadherin-Expression in der Invasionsfront und der E-Cadherin-Expression im Zentrum des Tumors. Mit ansteigender E-Cadherin-Expression im Zentrum des Tumors trat eine zunehmende E-Cadherin-Expression in der Invasionsfront auf ($p < 0,001$). Ferner wurde festgestellt, dass sich die E-Cadherin-Expression in der Invasionsfront und in den Tumorbuds ebenfalls in einem direkten proportionalen Verhältnis befand. Je stärker die E-Cadherin-Expression in der Invasionsfront ausfiel, desto höher war sie in den Tumorbuds ($p < 0,001$). Entgegen der Studien von Wang et al. [192] und Liu et al. [110] konnte in der vorliegenden Studie kein signifikanter Zusammenhang zwischen der reduzierten E-Cadherin-Expression in den Tumorbuds und einer erhöhten Vimentin-Expression in den Tumorbuds demonstriert werden. Es trat ausschließlich eine signifikante Beziehung zwischen der Vimentin-Expression in der Invasionsfront und der Vimentin-Expression in den Buds auf. In den Fällen, in denen eine negative Vimentin-Expression in der Invasionsfront auftrat, zeigte sich signifikant häufiger eine negative Vimentin-Expression in den Buds ($p = 0,002$). Ferner fiel in 54 von 79 untersuchten Peniskarzinomen die Vimentin-Expression in den Tumorbuds negativ aus. Diese Beobachtungen stehen im Widerspruch zu den Ergebnissen der zuvor erwähnten Studien, die sich auf das Modell der epithelial-mesenchymalen Transition stützen [110, 146, 192]. Dem Modell der EMT folgend, hätten in der vorliegenden Arbeit bei geringer E-Cadherin-Expression in den Tumorbuds, in der Invasionsfront und im Zentrum des Tumors deutlich mehr und bei stärkerer E-Cadherin-Expression in den Buds, in der Invasionsfront und im Zentrum des Tumors deutlich weniger Tumorbuds beobachtet werden müssen. Die E-Cadherin-Expression im Tumor und in den Tumorbuds müssten in umgekehrter Proportionalität zueinander stehen mit gleichzeitig reziprok auftretender Proportionalität in Bezug auf die Vimentin-Expression in den Tumorbuds. Dies hätte zu der Erklärung führen können, dass es mit abnehmender E-Cadherin-Expression, also mit abnehmender Adhäsion der Zell-Zell-Kontakte, zum Ablösen der

Tumorbuds vom Tumormassiv kommen kann, so dass ein invasives Einwandern der Tumorbuds ins Gewebe die Folge wäre. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die Karzinogenese beim Peniskarzinom anderen Gesetzmäßigkeiten folgen muss, und dass das Modell des Tumorbuddings und der EMT auf das Peniskarzinom in Bezug auf die E-Cadherin-Expression nicht anzuwenden ist. Jensen et al. [79] konnten in 24 untersuchten oralen Plattenepithelkarzinomen keinen Zusammenhang zwischen dem Verlust der E-Cadherin-Expression und dem Anstieg der Vimentin-Expression feststellen. An der Invasionsfront konnte jedoch eine reduzierte E-Cadherin-Expression der Tumorbuds beobachtet werden. In den Tumorbuds konnte jedoch, nach Anfärbung mit dem EMT-Regulator Twist, kein Hinweis gefunden werden, der auf einen Ablauf der EMT in den Buds hindeuten würde [79]. Dies soll unter anderem demonstrieren, dass allein der Verlust der E-Cadherin-Expression für das Auslösen der EMT nicht ausreichend sein kann [79, 24, 134].

Dawson et al. [36] untersuchten Tumorbuds in Kolorektalkarzinomen und zeigten, dass die überwiegende Mehrzahl von Tumorbuds keine Ki-67-Expression aufwies und demnach nicht proliferationsaktiv waren. Jedoch wurden auch Tumorbuds mit Ki-67-Expression detektiert, die in Beziehung zu einer schlechten Überlebensrate der Patienten standen [36]. In der vorliegenden Untersuchung zeigte die Mehrzahl der Fälle eine Ki-67-Expression der Tumorbuds. Darüber hinaus konnte demonstriert werden, dass die Anzahl der durch Ki-67 markierten Buds mit der Anzahl der Tumorbuds anstieg. Eine mögliche Erklärung ist, dass nicht alle Tumorbuds, die nicht durch Ki-67 markiert wurden, aufgrund der schwierigen Unterscheidung am immunhistologischen Präparat, detektiert werden konnten. Die Ki-67-Expression der Tumorbuds stand jedoch nicht in Korrelation mit den klinisch-pathologischen Parametern. Der Ki-67-Marker besitzt somit beim Peniskarzinom keinen prädiktiven und prognostischen Wert in Bezug auf den Krankheitsverlauf des Patienten. Die vorliegenden Ergebnisse unterscheiden sich von denen, die Dawson et al. [36] beim kolorektalen Karzinom publizierten. Dawson et al. [36] zeigten nämlich, dass die Mehrzahl der Tumorbuds beim kolorektalen Karzinom keine Ki-67-Expression aufwies. Zu dem gleichen Ergebnis gelangten Jung et al. [80], die 56 kolorektale Karzinome untersuchten und das Ergebnis bestätigten, dass sich Tumorbuds in der G0-Phase des Zellzyklus befinden müssen, und somit nicht proliferationsaktiv sind, da dies die einzige Zellzyklusphase ist, in der es zu keiner Ki-67-Expression kommt [80]. In Studien des Peniskarzinoms, die eine Beziehung zwischen den Tumorzellen der Tumormasse und der Ki-67-Expression untersuchten, konnte gezeigt werden, dass die Ki-67-Expression in Bezug auf das Peniskarzinom über keinen

prognostischen Wert für die Patienten verfügt. [119, 174]. Auch hier war das in der vorliegenden Arbeit ausgewertete Probenmaterial in der Studie von May et al. [119] enthalten.

Das Proteoglykan Syndecan-1 (CD138) ist mitverantwortlich für die Zell-Zell-Adhäsion und für die Bindung der Zell-Matrixkomponenten [90, 152, 153, 154, 160, 161, 177]. Kurkowa et al. [96] zeigten in der Untersuchung von oralen Plattenepithelkarzinomen, dass eine reduzierte Syndecan-1-Expression an der Invasionsfront des Tumors mit einer schlechten Prognose und eine starke sowie mittlere Syndecan-1-Expression des Patienten mit einer besseren Prognose korrelierte. Anttonen et al. [8] demonstrierten in der Untersuchung von Kopf-Hals-Karzinomen, dass eine starke Syndecan-1-Expression mit dem Nichtauftreten von Lymphknotenmetastasen und einem besseren Allgemeinüberleben korrelierte. Eine reduzierte Syndecan-1-Expression korrelierte jedoch nicht mit dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen, aber in univariater Analyse mit einem schlechten Allgemeinüberleben der Patienten. In 105 untersuchten kolorektalen Karzinomen wurde ebenfalls die Beobachtung gemacht, dass ein Verlust der Syndecan-1-Expression mit einer schlechten Patientenprognose einhergeht. Des Weiteren wurde demonstriert, dass Syndecan-1-negative Tumoren ein invasives Tumorverhalten aufwiesen, so dass die Annahme formuliert wurde, dass Syndecan-1 eine suppressive Aufgabe im Invasions- und Metastasierungsverhalten bei kolorektalen Karzinomen übernimmt. Die Tumoren, die keine Syndecan-1-Expression aufwiesen, zeigten signifikant häufiger Lymphknotenmetastasen, als die Tumoren mit Syndecan-1-Expression. Darüber hinaus trat das Tumor-Budding häufiger in den Tumoren auf, die eine Syndecan-1-negative Expression besaßen [48]. Entgegen der zuvor genannten Studien, zeigten Untersuchungen an Mammakarzinomen, dass eine positive Syndecan-1-Expression des Tumorgewebes mit einem aggressiven Tumorverhalten, einer schlechten Prognose und einem negativen Allgemeinüberleben der Patienten korrelierte [10, 104, 108]. Lee et al. [99] zeigten in der Untersuchung von Plattenepithelkarzinomen der Tonsille, dass eine Korrelation zwischen der positiven Syndecan-1-Expression und dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen besteht. Ferner konnte beobachtet werden, dass die normalerweise membranöse Lokalisation des Syndecan-1 reduziert war und es in den Tumorzellen zu einer verstärkten zytoplasmatischen Syndecan-1-Markierung kam. Durch diese funktionale Störung des Proteoglykans kann es, laut der Autoren, aufgrund des verlorengegangenen Adhäsionsmechanismus, zur Migration der Tumorzellen kommen. Diese Erklärung soll begründen, dass es trotz positiver Syndecan-1-Expression zu positiven Resektionsrändern beim infiltrativen Invasionsmuster und zu Lymphknotenmetastasen gekommen ist [99]. In der vorliegenden Studie konnte eine zytoplasmatische Syndecan-1-Expression der Tumorbuds

demonstriert werden. Die Markierung der Haupttumormasse wurde jedoch nicht untersucht. Wie in der zuvor erwähnten Untersuchung konnte in der vorliegenden Arbeit eine signifikante Korrelation zwischen der Syndecan-1-Expression und dem infiltrativen Invasionsmuster festgestellt werden. Je stärker die Syndecan-1-Expression in den Tumorbuds ausfiel, desto mehr Peniskarzinome wiesen das infiltrative Invasionsmuster auf ($p = 0,001$). Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu der Studie von Fujiya et al. [48], die zeigten, dass Syndecan-1-negative Tumoren häufiger Tumorbuds zeigten und ein invasiveres Wachstumsmuster aufwiesen. Ferner konnte in der vorliegenden Untersuchung gezeigt werden, dass die Anzahl der Tumorbuds mit zunehmender Syndecan-1-Expression anstieg ($p < 0,001$). Eine weitere Beobachtung war, dass bei steigender Syndecan-1-Expression die Anzahl der Fälle mit verrukösem Wachstumsmuster abnahmen, so dass bei starker Syndecan-1-Markierung der Buds kein Fall mit verrukösem Wachstumsmuster mehr auftrat. In der multivariaten Analyse konnte jedoch kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Anzahl der Tumorbuds und der Syndecan-1-Expression festgestellt werden.

Ferner wurde in der vorliegenden Arbeit beobachtet, dass in der univariaten Analyse eine signifikante Korrelation ($p < 0,001$) zwischen der Anzahl der Tumorbuds und dem infiltrativen Invasionsmuster bestand. Tumor-Budding trat in den Fällen signifikant häufiger auf, in denen ein infiltratives Invasionsmuster vorhanden war. Die Fälle, die ein endophytisches, d.h. ein invertierendes, kompakt zapfenförmiges Tumorwachstum aufwiesen, zeigten ein deutlich geringeres Auftreten von Tumorbuds. Wang et al. [193] gelangten bei der Untersuchung von 128 kolorektalen pT3-Karzinomen zu einem ähnlichen Ergebnis und konnten einen Zusammenhang zwischen dem infiltrativen Invasionsmuster und dem Auftreten von Tumor-Budding aufzeigen. Darüber hinaus demonstrierten sie eine Korrelation zwischen dem Vorhandensein eines starken Tumor-Buddings und einem schlechten 5-jährigen-krebspezifischen Überleben [193]. Ferner wurde die Hypothese formuliert, dass das Tumor-Budding als ein unabhängiges Phänomen in der Karzinogenese von Tumoren betrachtet werden muss. Das Vorkommen von Tumorbuds darf also nicht nur im Zusammenhang mit dem Auftreten des infiltrativen Invasionsmusters gesehen werden, da es in der Untersuchung von Wang et al. [193] in 24 % der Tumoren, die ein expansives/endophytisches Invasionsmuster besaßen, ebenfalls zur Ausbildung von Tumorbuds an der Invasionsfront kam. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass in 72 % der Fälle, in denen das endophytische Invasionsmuster auftrat, weniger als 10 Buds detektiert wurden. In den Fällen, in denen mehr als 20 Buds vorhanden waren, trat das endophytische Invasionsmuster in 21 % der Fälle auf. Dies könnte beweisen, dass das Tumor-Budding ein

unabhängiges Phänomen ist, welches nicht ausschließlich und nur zwangsläufig im Zusammenhang mit dem infiltrativen Invasionsmuster auftreten muss. In der multivariaten Analyse konnte bestätigt werden, dass das Invasionsmuster einen unabhängigen Einfluss auf die Anzahl der Tumor buds besitzt. So konnte gezeigt werden, dass das vermehrte Auftreten von Tumor buds in einer signifikanten Beziehung mit dem Vorkommen eines infiltrativen Invasionsmusters steht.

In der Studie von Roh et al. [156], die 56 ösophageale Plattenepithelkarzinome untersuchten, konnte eine signifikante Korrelation zwischen dem Tumor-Budding und der pT-Kategorie erfasst werden. Eine Limitierung der Studie liegt zum einen an der geringen Patientenzahl von 56 und zum anderen an der ausgewählten Tumor-Budding-Scoring-Methode. Die Tumor buds wurden unter der Hämatoxylin-Eosin-Färbung ausgezählt und in nur einem Feld mit 20-facher Vergrößerung ermittelt. Trotz der enormen Auswertungsunterschiede in Bezug auf das Tumor-Budding erzielte die vorliegende Arbeit in der univariaten Analyse ähnliche Ergebnisse und demonstrierte eine signifikante Beziehung ($p = 0,006$) zwischen der Anzahl der Tumor buds und der pT-Kategorie. Während in der pT1a-Kategorie nur 12 % der Fälle mehr als 20 Buds aufwiesen, besaßen in der pT2-Kategorie 62 % der Fälle mehr als 20 Buds und in der pT3-Kategorie nur 12 % der Fälle weniger als 10 Buds (Abb. 71). In der multivariaten Analyse konnte jedoch nicht bestätigt werden, dass die pT-Kategorie einen unabhängigen Einfluss auf die Anzahl der Tumor buds ausübt. In der Kaplan-Meier-Überlebenskurve konnte lediglich veranschaulicht werden, dass die Patienten, die sich in einer fortgeschrittenen pT-Kategorie befanden, eine schlechte Überlebensprognose hatten (Abb.74). In der multivariaten Analyse wurde bestätigt, dass die pT-Kategorie beim Peniskarzinom einen unabhängigen Einfluss auf die Patientenprognose besitzt. Wang et al. [192] untersuchten 230 Plattenepithelkarzinome der Zunge und konnten eine Korrelation zwischen der Intensität des Tumor-Buddings und der pT-Kategorie feststellen. Wang et al. [193] stellten fest, dass das Auftreten von Tumor buds bei kolorektalen pT3-Karzinomen ein nachteiliger Prognosefaktor war. In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass pT4-Adenokarzinome des Kolons eine schlechtere Prognose als pT3-Karzinome besaßen. Das Vorhandensein von Tumor-Budding stand nicht in prädiktiver Beziehung zum Überleben des Patienten, erleichterte jedoch die peritoneale Invasion [21]. Der Unterschied der beiden zuletzt genannten Studien im Vergleich zur vorliegenden Arbeit liegt ebenfalls in der unterschiedlichen Verwendung der Auswertungsmethode des Tumor-Buddings. Diese verwendeten die „schnelle-Tumor bud-Zähl-Methode“ (rapid-bud-count-method) [193]. Karamitopoulou et al. [83], die ebenfalls die 10-HPF-Methode anwandten, konnten eine

signifikante Korrelation zwischen dem hochgradigen Tumor-Budding (gleich und mehr als 10 Tumorbuds) und der fortgeschrittenen pT-Kategorie aufweisen.

In der Untersuchung von 210 ösophagealen Adenokarzinomen, die sich in der pT1-Kategorie befanden, konnte gezeigt werden, dass das Tumor-Budding in einem signifikanten Zusammenhang mit Lymphknotenmetastasen stand. Ferner konnte ermittelt werden, dass ein starkes Tumor-Budding mit einer schlechten Patientenprognose und einer negativen Überlebensrate signifikant korrelierte [98a]. Der Unterschied zur vorliegenden Untersuchung liegt im angewandten Scoring-System für das Tumor-Budding. Landau et al. [98a] zählten die Tumor-Budding-Felder bei 20-facher Vergrößerung, wobei in einem Tumor-Budding-Feld mehr als 5 Tumorbuds vorhanden sein mussten. Eingeteilt wurden die Tumor-Budding-Gruppen in: kein Tumor-Budding (kein Feld mit mehr als 5 Tumorbuds), zentral auftretendes Tumor-Budding (1-2 Tumorbudding-Felder) und großflächig auftretendes Tumor-Budding (mehr als 3 Tumor-Budding-Felder) [98a]. In der vorliegenden Studie konnte in der univariaten Analyse festgestellt werden, dass diejenigen Karzinome, bei denen Lymphknotenmetastasen detektiert wurden, in keinem Fall weniger als 10 Buds und in 67 % der Fälle mehr als 20 Buds aufwiesen ($p = 0,006$) (Abb. 72). Es muss jedoch Erwähnung finden, dass bei 57 von 79 untersuchten Peniskarzinomen keine Lymphknotendissektion durchgeführt wurde, so dass keine verlässliche Aussage in Bezug auf die signifikante Korrelation zwischen dem Tumor-Budding beim Peniskarzinom und dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen getroffen werden kann. In der Kaplan-Meier-Analyse konnte gezeigt werden, dass die Patienten, die Lymphknotenmetastasen hatten, eine schlechtere Prognose in Bezug auf das Gesamtüberleben zeigten, als die Patienten, die keine Lymphknotenmetastasen aufwiesen bzw. bei denen keine Lymphknotenmetastasen ermittelt werden konnten (Abb. 75). Im multivariaten Modell zeigte sich jedoch, dass die pN-Kategorie und die Anzahl der Buds keinen unabhängigen Prognosefaktor beim Peniskarzinom in Bezug auf das Gesamtüberleben darstellten. Es stellte sich hingegen eine multivariate Signifikanz heraus, die beobachten ließ, dass die Anzahl der Tumorbuds einen unabhängigen Einfluss auf die pN-Kategorie ausübte. So kann zusammenfassend die Aussage getroffen werden, dass das vermehrte Auftreten von Tumorbuds beim Peniskarzinom das Risiko signifikant erhöht Lymphknotenmetastasen zu bilden. Diese Aussage ist in ihrem prädiktiven Wert jedoch dadurch zu reduzieren, dass in der vorliegenden Studie nur 19 % der Patienten Lymphknotenmetastasen aufwiesen und bei 81 % der Patienten die Lymphknoten nicht beurteilt werden konnten bzw. keine Lymphknotenmetastasen detektiert wurden. Ferner ist zu erwähnen,

dass für die multivariate Analyse, die pN0- und die pNX-Kategorie zu einer Gruppe zusammengefügt werden musste, um die statistische Berechnung zu ermöglichen.

In verschiedenen Untersuchungen von kolorektalen Karzinomen konnte ein Zusammenhang zwischen dem Tumor-Budding und der Tumorprogression ermittelt werden [98, 136, 200]. Almagush et al. [6] sprechen in einem Review von einer starken Assoziation zwischen dem Tumor-Budding und der Tumorprogression bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass im univariaten Modell eine signifikante Beziehung ($p = 0,001$) zwischen der Tumorprogression und dem Tumor-Budding beim Peniskarzinom bestand. Bei den Peniskarzinomen, die keine Tumorprogression aufwiesen, konnten in 46 % der Fälle weniger als 10 Buds detektiert werden. Bei den Peniskarzinomen, die eine Tumorprogression zeigten, hatten 48 % der Karzinome mehr als 20 Buds (Abb. 73). Diese signifikante Korrelation zwischen der Anzahl der Tumorbuds und der Tumorprogression könnte einen prädiktiven Wert in der Diagnostik der Peniskarzinome darstellen. In der multivariaten Analyse konnte jedoch diese signifikante Beziehung zwischen der Anzahl der Tumorbuds und der Tumorprogression nicht bestätigt werden. Die Kaplan-Meier-Analyse demonstrierte eine signifikante Beziehung zwischen der Tumorprogression und dem Allgemeinüberleben und dem karzinombezogenen Lebensstatus der Patienten, dabei wiesen diejenigen Patienten, die eine Tumorprogression zeigten, eine ungünstigere Prognose auf, als die Patienten ohne Tumorprogression (Abb. 76 und Abb. 81). Im multivariaten Analysemodell konnte eine signifikante Beziehung zwischen dem Allgemeinüberleben und der Tumorprogression bestätigt werden.

Die Anzahl der Buds stand in der Kaplan-Meier-Analyse in keinem signifikanten Zusammenhang mit dem Gesamtüberleben der Patienten (Abb. 77 und Abb. 78). Wiederum konnte univariat ein signifikanter Zusammenhang in der Kaplan-Meier-Analyse zwischen der Anzahl der Buds und dem karzinombezogenen Lebensstatus aufgedeckt werden (Abb. 79). Die Anzahl der Tumorbuds stand im multivariaten Modell jedoch weder im signifikanten Zusammenhang mit dem Allgemeinüberleben noch mit dem karzinombezogenen Lebensstatus. Ob die im multivariaten Modell festgestellten Zusammenhänge zwischen der pN-Kategorie und dem Invasionsmuster in Bezug auf das vermehrte Auftreten von Tumorbuds eine klinische Relevanz besitzen, bedarf weiterer Untersuchungen.

Des Weiteren konnte in der vorliegenden Untersuchung deutlich gezeigt werden, dass sich die Tumorzellen der Tumorbuds beim Peniskarzinom in Bezug auf die immunhistochemischen

Marker anders als z.B. bei den kolorektalen Karzinomen verhielten. Aus diesem Grund kommt die Frage auf, ob es sich bei den Tumorzellen an der Invasionsfront der Peniskarzinome um isolierte Tumorbuds handelt, oder ob diese Tumorzellen Ausläufer des Haupttumors sind und aus schnitttechnischen Gründen als abgetrennte Tumorzellen missinterpretiert wurden. Jensen et al. [79], die eine 3D-Konfokalmikroskopie an 30 µm dicken Präparaten von oralen Plattenepithelkarzinomen durchführten, zeigten, dass die Mehrzahl der Tumorbuds keine isolierten Zellen darstellten, sondern fingerförmige Abspreizungen des Haupttumorgewebes waren [79]. Bronsert et al. [17] demonstrierten in einer Studie, in der 15 Adenokarzinome verschiedener Entitäten (3 duktale Adenokarzinome des Pankreas, 3 kolorektale Adenokarzinome, 3 Metastasen der Leber eines kolorektalen Adenokarzinoms, 3 Adenokarzinome der Lunge und 3 invasive duktale Adenokarzinome der Brust) untersucht wurden, dass die Mehrheit der Tumorbuds, aufgrund einer nur zweidimensionalen Untersuchung der histologischen Schnitte, fälschlicherweise als isolierte Tumorzellen, also als Tumorbuds missinterpretiert wurden. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass nur 9-22 % der Tumorbuds isolierte, vom Haupttumor getrennte Tumorzellen waren und der Rest der Tumorbuds mit dem Haupttumorgewebe in Verbindung stand. Ob jedoch diese geringe Anzahl an Tumorbuds einen prognostischen Wert hat, bedarf nach Auffassung dieser Autoren weiterer Untersuchungen. Ferner zeigten Bronsert et al. [17], dass die Mehrheit der im zweidimensionalen Verfahren als Buds missinterpretierten invasiv migrierenden Einzelzellen im dreidimensionalen Modell einer Gruppe, bestehend aus mehreren Zellen, angehörten.

Die Studie von Jensen et al. [79] und Bronsert et al. [17] wirft die Frage auf, ob es sich bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Peniskarzinomen um Tumor-Budding handelte, oder ob die detektierten Tumorbuds Artefakte darstellten, die durch die Auswertung der zweidimensionalen histologischen Schnitte verursacht worden sind. Dass es sich bei den hier beobachteten Tumorzellen vor der Invasionsfront nicht um Tumorbuds handelte, sondern um mit dem Haupttumor in Verbindung stehenden Tumorzellen, könnte dadurch bestätigt werden, dass die überwiegende Mehrzahl der „Tumorbuds“ und die kompakte Tumormasse im Hintergrund der „Buds“ kein verändertes Färbeverhalten in Bezug auf die angewandten immunhistochemischen Marker zeigten. So wurde in der vorliegenden Arbeit demonstriert, dass die Expression der immunhistochemischen Marker in den Tumorbuds stets in einem proportionalen Verhältnis zu der Expression im Haupttumorgewebe stand. Diese Beobachtungen könnten die Vermutung stützen, dass es sich bei den in der vorliegenden Arbeit beobachteten „Tumorbuds“ um abgeschnittene Tumorzellen bzw. quergeschnittene Tumorausläufer horizontalgeschichteter,

fingerförmiger mit dem Haupttumor in Verbindung stehender Tumorknospen handelte. In Serienschnitten und dreidimensionalen Untersuchungsmethoden könnte geklärt werden, ob es sich bei den Tumorzellen an der Invasionsfront um Tumorbuds bzw. um isolierte vom Haupttumorgewebe abgetrennte Tumorzellen handelt, oder ob es sich bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten „Tumorbuds“ nur um missinterpretierte Tumorausläufer des kompakten Haupttumors handelt.

6. Zusammenfassung

Bei dem Peniskarzinom handelt es sich um eine selten auftretende Tumorentität, dessen Inzidenz in Europa bei ca. 1 Neuerkrankung pro 100 000 Einwohner liegt. In der vorliegenden retrospektiven Arbeit wurden 79 Peniskarzinome von 79 Patienten aus den Jahren 1994-2010 untersucht. Das Patientenmaterial wurde dabei aus sechs verschiedenen deutschen Instituten für Pathologie bzw. Kliniken für Urologie zusammengetragen. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob das Tumor-Budding beim Peniskarzinom einen prognostischen und prädiktiven Wert besitzt. Die Peniskarzinome wurden immunhistochemisch mit Antikörpern gegen Zytokeratin 5/6, CD34 Cyclin D1, p16, E-Cadherin, Vimentin, Ki67, Syndecan-1/CD138) untersucht.

Die Durchführung der immunhistochemischen Färbungen erfolgte unter standardisierten Bedingungen mit dem voll-automatisierten Färbeautomaten der Firma Ventana Benchmark® XT (Ventana, Tucson, USA; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland).

Um die Bewertung der Zusammenhänge zwischen den verschiedenen Parametern statistisch zu erfassen, kam der Chi²-Test zur Anwendung. Die Berechnung der metrischen Variablen erfolgte mit der Varianzanalyse und dem t-Test nach Student. Die komplexen Zusammenhänge mit der Anzahl der Buds wurden mit Hilfe der logistischen Regression bewertet. Zur Analyse der Überlebensdaten wurde die Kaplan-Meier Methode und multivariat die Cox-Regression verwendet.

In Bezug auf die immunhistochemischen Marker konnten nur in der univariaten Analyse signifikante Zusammenhänge ermittelt werden, die in den multivariaten Modellen jedoch keine Bestätigung fanden.

In Bezug auf das Invasionsmuster konnte hingegen im univariaten sowie im multivariaten Modell ein signifikanter Zusammenhang festgestellt werden. Es konnte beobachtet werden, dass das Tumor-Budding bei den Peniskarzinomen, die ein infiltratives Invasionsmuster aufwiesen, signifikant häufiger auftrat, als bei Peniskarzinomen, die ein endophytisches Invasionsmuster zeigten. Im multivariaten Analysemodell konnte bestätigt werden, dass das Invasionsmuster einen unabhängigen Einfluss auf die Anzahl der Tumorbuds besitzt. Ebenso konnte in der multivariaten Analyse gezeigt werden, dass die pT-Kategorie einen unabhängigen Einfluss auf die Patientenprognose besitzt. Ferner zeigte die Kaplan-Meier-Überlebenskurve, dass sich mit fortgeschrittener pT-Kategorie die Überlebensprognose verschlechterte. Des Weiteren konnte univariat und multivariat bestätigt werden, dass das vermehrte Auftreten von Tumorbuds das Risiko zur Bildung von Lymphknotenmetastasen verstärkt. Relativiert wird die Aussage

dadurch, dass bei 57 von 79 Patienten keine Lymphknotendissektion durchgeführt wurde. Ferner wurde im multivariaten Modell gezeigt, dass weder die pN-Kategorie noch die Anzahl der Tumor buds einen unabhängigen Einfluss in Bezug auf das Gesamtüberleben besaßen.

Es konnte keine signifikante Beziehung zwischen dem Zeitraum bis zur Tumorprogression, dem allgemeinen und karzinombezogenen Lebensstatus in Bezug auf die Anzahl der Tumor buds ermittelt werden. Auch wurde in der multivariaten Analyse kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Tumorprogression und der Anzahl der Tumor buds festgestellt. Hingegen konnte in der Kaplan-Meier-Analyse gezeigt werden, dass die Patienten mit Tumorprogression eine schlechtere Prognose in Bezug auf das Gesamtüberleben und den karzinombezogenen Lebensstatus hatten. In der multivariaten Analyse konnte bestätigt werden, dass der Progressionsstatus beim Peniskarzinom einen unabhängigen Einfluss auf das Gesamtüberleben besitzt.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass das Auftreten von Tumor buds beim Peniskarzinom als zusätzlicher prognostischer und prädiktiver Deskriptor der Erkrankung keine Relevanz besitzt.

Durch die eingehende Untersuchung der zahlreichen in dieser Studie durchmusterten Präparate muss bezweifelt werden, ob beim Peniskarzinom das histologische Phänomen des Tumor-Buddings überhaupt existiert. Auf Grund dieser Ergebnisse sollte es weiterführenden Untersuchungen vorbehalten sein, anhand von dreidimensionalen histologischen Rekonstruktionen, das Vorkommen des Tumor-Buddings zu verifizieren.

7. Literaturverzeichnis

1. Abd El-Rehim DM, Pinder SE, Paish CE, Bell J, Blamey RW, Robertson JF, Nicholson RI, Ellis IO. Expression of luminal and basal cytokeratins in human breast carcinoma. *J Pathol.* 2004 Jun; 203(2): 661-671.
2. Aberle H, Schwartz H, Kemler R. Cadherin–catenin complex: protein interactions and their implications for cadherin function. *J. Cell. Biochem* 1996; 61: 514–523.
3. Abi-Aad AS, de Kernion JB. Controversies in ilioinguinal lymphadenectomy for cancer of the penis. *Urol Clin North Am* 1992; 19: 319-24.
4. Agrawal A, Pai D, Ananthkrishnan N, Smile SR, Ratnakar C. The histological extent of the local spread of carcinoma of the penis and its therapeutic implications. *BJU Int* 2000; 85: 299–300.
5. Aita G, da Costa WH, de Cassio Zequi S, da Cunha IW, Soares F, Guimaraes GC, Lopes A. Pattern of invasion is the most important prognostic factor in patients with penile cancer submitted to lymph node dissection and pathological absence of lymph node metastasis. *BJU Int.* 2015 Oct; 116 (4):584-9.
6. Almangush A, Salo T, Hagström J, Leivo I. Tumour budding in head and neck squamous cell carcinoma - a systematic review. *Histopathology.* 2014 Nov; 65 (5):587-94. doi: 10.1111/his.12471. Epub 2014 Oct 6.
- 6a. Alnajjar HM, Lam W, Bolgeri M, Rees RW, Perry MJ, Watkin NA. Treatment of carcinoma in situ of the glans penis with topical chemotherapy agents. *Eur Urol.* 2012 Nov; 62 (5): 923-8. doi: 10.1016/j.eururo.2012.02.052. Epub 2012 Mar 8.
7. Angadi PV, Krishnapillai R. Cyclin D1 expression in oral squamous cell carcinoma and verrucous carcinoma: correlation with histological differentiation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007 Mar; 103 (3): e30-35.

8. Anttonen A, Kajanti M, Heikkilä P, Jalkanen M, Joensuu H. Syndecan-1 expression has prognostic significance in head and neck carcinoma. *Br J Cancer*. 1999 Feb; 79 (3-4): 558-64.
9. Baldin V, Lukas J, Marcote MJ, Pagano M, Draetta G. Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes Dev*. 1993 May; 7 (5): 812-821.
10. Barbareschi M, Maisonneuve P, Aldovini D, Cangi MG, Pecciarini L, Angelo Mauri F, Veronese S, Caffo O, Lucenti A, Palma PD, Galligioni E, Doglioni C. High syndecan-1 expression in breast carcinoma is related to an aggressive phenotype and to poorer prognosis. *Cancer*. 2003 Aug 1; 98 (3): 474-83.
11. Barnholtz-Sloan JS, Maldonado JL, Pow-sang J, Giuliano AR. Incidence trends in primary penile cancer. *Urol Oncol* 2007 Sep-Oct; 25 (5): 361-7.
12. Bissada NK, Yakout HH, Fahmy WE, et al. Multi-institutional long-term experience with conservative surgery for invasive penile carcinoma. *J Urol*. 2003; 169 (2): 500-502.
13. Bhalla A, Manjari M, Kahlon SK, Kumar P, Kalra N. Cytokeratin 5/6 expression in benign and malignant breast lesions. *Indian J Pathol Microbiol*. 2010 Oct-Dec; 53 (4): 676-680. doi: 10.4103/0377-4929.72026.
14. Bouchot O, Rigaud J, Maillet F, Hetet JF, Karam G. Morbidity of inguinal lymphadenectomy for invasive penile carcinoma. *Eur Urol* 2004; 45: 761–6, discussion 765–766.
15. Brabletz T, Hlubek F, Spaderna S, Schmalhofer O, Hiendlmeyer E, Jung A, Kirchner T. Invasion and metastasis in colorectal cancer: epithelial-mesenchymal transition, mesenchymalepithelial transition, stem cells and beta-catenin. *Cells Tissues Organs*. 2005; 179: 56-65.
16. Broders AC. Squamous-cell epithelioma of the Skin: A study of 256 cases. *Ann Surg*. 1921 Feb; 73 (2): 141-60.

17. Bronsert P, Enderle-Ammour K, Bader M, Timme S, Kuehs M, Csanadi A, Kayser G, Kohler I, Bausch D, Hoepfner J, Hopt UT, Keck T, Stickeler E, Passlick B, Schilling O, Reiss CP, Vashist Y, Brabletz T, Berger J, Lotz J, Olesch J, Werner M, Wellner UF. Cancer cell invasion and EMT marker expression: a three-dimensional study of the human cancer-host interface. *J Pathol*. 2014 Nov; 234 (3): 410-22.
18. Burgers JK, Badalament RA, Drago JR. Penile cancer. Clinical presentation, diagnosis and staging. *Urol Clin North Am* 1992; 19: 247-256.
19. Byrne C, Tainsky M, Fuchs E. Programming gene expression in developing epidermis. *Development*. 1994 Sep; 120 (9): 2369-83.
20. Campos RS, Lopes A, Guimarães GC, Carvalho AL, Soares FA. E-cadherin, MMP-2, and MMP-9 as prognostic markers in penile cancer: analysis of 125 patients. *Urology*. 2006 Apr; 67 (4): 797-802. Epub 2006 Mar 29.
21. Canney AL, Kevans D, Wang LM, Hyland JM, Mulcahy HE, O'Donoghue DP, O'Sullivan J, Geraghty R, Sheahan K. Stage II colonic adenocarcinoma: a detailed study of pT4N0 with emphasis on peritoneal involvement and the role of tumour budding. *Histopathology*. 2012 Sep; 61 (3): 488-96. doi: 10.1111/j.1365-2559.2012.04250.x. Epub 2012 Mar 28.
22. Catalona WJ. Modified inguinal lymphadenectomy for carcinoma of the penis with preservation of saphenous veins: technique and preliminary results. *J Urol* 1988; 140: 306-10.
23. Chaux A, Velazquez EF, Algaba F, Ayala G, Cubilla AL. Developments in the pathology of penile squamous cell carcinomas. *Urology*. 2010 Aug; 76 (2 Suppl 1): S7-S14. doi: 10.1016/j.urology.2010.02.038.
24. Chen A, Beetham H, Black MA, Priya R, Telford BJ, Guest J, Wiggins GA, Godwin TD, Yap AS, Guilford PJ. E-cadherin loss alters cytoskeletal organization and adhesion in non-malignant breast cells but is insufficient to induce an epithelial-mesenchymal transition. *BMC Cancer*. 2014 Jul 30; 14: 552. doi: 10.1186/1471-2407-14-552.

25. Chen CL, Ou DL. Expression of syndecan-1 (CD138) in nasopharyngeal carcinoma is correlated with advanced stage and poor prognosis. *Hum Pathol.* 2006 Oct; 37 (10): 1279-1285.
26. Civin CI, Strauss LC, Brovall C, Fackler MJ, Schwartz JF, Shaper JH. Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol.* 1984 Jul; 133 (1): 157-65.
27. Clarke E J, Allan V. Intermediate filaments: vimentin moves in. *Curr. Biol* 2002; 12: 596–598.
28. Colecchia M, Nicolai N, Secchi P, Bandieramonte G, Paganoni AM, Sangalli LM, Pizzocaro G, Piva L, Salvioni R. PT1 penile squamous cell carcinoma: a clinicopathologic study of 56 cases treated by CO2 laser therapy. *Anal Quant Cytol Histol.* 2009 Jun; 31 (3): 153-160.
29. Coulombe PA, Tong X, Mazzalupo S, Wang Z, Wong P. Great promises yet to be fulfilled: defining keratin intermediate filament function in vivo. *Eur J Cell Biol.* 2004 Dec; 83 (11-12): 735-746.
30. Cubilla AL. The role of pathologic prognostic factors in squamous cell carcinoma of the penis. *World J Urol* 2009 Apr; 27: 169-77.
31. Cubilla AL, Barreto J, Caballero C, et al. Pathologic features of epidermoid carcinoma of the penis. A prospective study of 66 cases. *Am J Surg Pathol* 1993 Aug; 17 (8): 753-63.
32. Cubilla AL, Reuter V, Velazquez E, Piris A, Saito S, Young RH. Histologic classification of penile carcinoma and its relation to outcome in 61 patients with primary resection. *Int J Surg Pathol.* 2001 Apr; 9 (2): 111-20.
33. Curado MP, Edwards B, Shin HR, et al. (Ed.) *Cancer Incidence in Five Continents. Vol. IX 2007*, IARC Scientific Publications, Lyon. No. 160.

34. Daling JR, Madeleine MM, Johnson LG, et al. Penile cancer: importance of circumcision, human papillomavirus and smoking in in situ and invasive disease. *Int J Cancer*. 2005; 116 (4): 606-16.
35. Dauphin M, Barbe C, Lemaire S, Nawrocki-Raby B, Lagonotte E, Delepine G, Birembaut P, Gilles C, Polette M. Vimentin expression predicts the occurrence of metastases in non small cell lung carcinomas. *Lung Cancer*. 2013 Jul; 81 (1): 117-22. doi: 10.1016/j.lungcan.2013.03.011. Epub 2013 Apr 4.
36. Dawson H, Koelzer VH, Karamitopoulou E, Economou M, Hammer C, Muller DE, Lugli A, Zlobec I. The apoptotic and proliferation rate of tumour budding cells in colorectal cancer outlines a heterogeneous population of cells with various impacts on clinical outcome. *Histopathology*. 2014 Mar; 64 (4): 577-84. doi: 10.1111/his.12294. Epub 2013 Dec 28.
37. Diniz-Freitas M, García-Caballero T, Antúnez-López J, Gándara-Rey JM, García-García A. Reduced E-cadherin expression is an indicator of unfavourable prognosis in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2006; 42: 190–200.
38. Djajadiningrat RS, Bergman AM, van Werkhoven E, Vegt E, Horenblas S. Neoadjuvant taxane-based combination chemotherapy in patients with advanced penile cancer. *Clin Genitourin Cancer*. 2015 Feb; 13 (1): 44-9. doi: 10.1016/j.clgc.2014.06.005. Epub 2014 Jun 8.
39. Dragomir LP, Simionescu C, Mărgăritescu C, Stepan A, Dragomir IM, Popescu MR. P53, p16 and Ki67 immunoexpression in oral squamous carcinomas. *Rom J Morphol Embryol*. 2012; 53 (1): 89-93.
40. du Manoir S, Guillaud P, Camus E, Seigneurin D, Brugal G. Ki-67 labeling in postmitotic cells defines different Ki-67 pathways within the 2c compartment. *Cytometry*. 1991; 12 (5): 455-463.

41. Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA, Hrsg. 2004. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. Lyon: IARC.
42. Eberle J, Hörtl W. Peniskarzinome. In: Rübber H, Uroonkologie; Springer 2001; 3. Aufl.: 507-522.
43. Eckes B, Colucci-Guyon E, Smola H, Nodder S, Babinet C, Krieg T, Martin P. Impaired wound healing in embryonic and adult mice lacking vimentin. *J Cell Sci* 2000; 113 (Pt 13): 2455-2462.
44. Emerson RE, Ulbright TM, Eble JN, Geary WA, Eckert GJ, Cheng L. Predicting cancer progression in patients with penile squamous cell carcinoma: the importance of depth of invasion and vascular invasion. *Mod Pathol*. 2001 Oct; 14 (10): 963-8.
45. ENCR (European Network of Cancer Registries). Eurocim version 4.0. European incidence database V2.2 (1999). Lyon: ENCR; 2001.
46. Faratzis G, Tsiambas E, Rapidis AD, Machaira A, Xiromeritis K, Patsouris E. VEGF and ki 67 expression in squamous cell carcinoma of the tongue: An immunohistochemical and computerized image analysis study. *Oral Oncol*. 2009 Jul; 45 (7): 584-588. doi: 10.1016/j.oraloncology.2008.08.002. Epub 2008 Sep 18.
47. Ferrari S, Battini R, Kaczmarek L, Rittling S, Calabretta B, de Riel J K, Philiponis V, Wei J F, Baserga R. Coding sequence and growth regulation of the human vimentin gene. *Mol Cell Biol* 1986; 6 (11): 3614-20.
48. Fujiya M, Watari J, Ashida T, Honda M, Tanabe H, Fujiki T, Saitoh Y, Kohgo Y. Reduced expression of syndecan-1 affects metastatic potential and clinical outcome in patients with colorectal cancer. *Jpn J Cancer Res*. 2001 Oct; 92 (10): 1074-1081.
49. Furness SG, McNagny K. Beyond mere markers: functions for CD34 family of sialomucins in hematopoiesis. *Immunol Res*. 2006; 34 (1): 13-32.

50. Graafland NM, Lam W, Leijte JA, Yap T, Gallee MP, Corbishley C, van Werkhoven E, Watkin N, Horenblas S. Prognostic factors for occult inguinal lymph node involvement in penile carcinoma and assessment of the high-risk EAU subgroup: a two-institution analysis of 342 clinically node-negative patients. *Eur Urol.* 2010 Nov; 58 (5): 742-7.
51. Gabbert H. Mechanism of tumor invasion: evidence from in vivo observations. *Cancer Metastasis Rev.* 1985; 4: 293–309.
52. Gabbert H, Wagner R, Moll R, Gerharz CD. Tumor dedifferentiation: an important step in tumor invasion. *Clin Exp Metastasis* 1985; 3: 257–79.
53. Geisler N, Kaufmann E, Weber K. Antiparallel orientation of the two double-stranded coiled-coils in the tetrameric protofilament unit of intermediate filaments. *J Mol Biol* 1985; 182 (1): 173-7.
54. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer.* 1983 Jan 15; 31 (1): 13-20.
55. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol.* 1984 Oct; 133 (4): 1710-1715.
56. Gilles C, Polette M, Piette J, Delvigne AC, Thompson EV, Foidart JM, Birembaut P. Vimentin expression in cervical carcinomas: association with invasive and migratory potential. *J Pathol* 1996; 180: 175–180.
57. Goldie KN, Wedig T, Mitra AK, Aebi U, Herrmann H, Hoenger A. Dissecting the 3-D structure of vimentin intermediate filaments by cryo-electron tomography. *J Struct Biol.* 2007; 158: 378–85.
58. Goodman MT, Hernandez BY, Shvetsov YB. Demographic and pathologic differences in the incidence of invasive penile cancer in the United States, 1995-2003. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007 Sep; 16 (9): 1833-9.

59. Guan KL, Jenkins CW, Li Y, Nichols MA, Wu X, O'Keefe CL, Matera AG, Xiong Y Growth suppression by p18, a p16INK4/MTS1- and p14INK4B/MTS2-related CDK6 inhibitor, correlates with wild-type pRb function. *Genes Dev.* 1994 Dec 15; 8 (24): 2939-2952.
60. Gunia S, Erbersdobler A, Hakenberg OW, Koch S, May M. p16(INK4a) is a marker of good prognosis for primary invasive penile squamous cell carcinoma: a multi-institutional study. *J Urol.* 2012 Mar; 187 (3): 899-907. doi: 10.1016/j.juro.2011.10.149. Epub 2012 Jan 15.
61. Gunia S, Kakies C, Erbersdobler A, Hakenberg OW, Koch S, May M. Expression of p53, p21 and cyclin D1 in penile cancer: p53 predicts poor prognosis. *J Clin Pathol.* 2012 Mar; 65 (3): 232-236. doi: 10.1136/jclinpath-2011-200429. Epub 2011 Dec 1.
62. Guimarães GC, Cunha IW, Soares FA, Lopes A, Torres J, Chaux A, Velazquez EF, Ayala G, Cubilla AL. Penile squamous cell carcinoma clinicopathological features, nodal metastasis and outcome in 333 cases. *J Urol.* 2009 Aug; 182 (2): 528-34; discussion 534. doi: 10.1016/j.juro.2009.04.028. Epub 2009 Jun 13.
63. Guimarães GC, Leal ML, Campos RS, Zequi Sde C, da Fonseca FP, da Cunha IW, Soares FA, Lopes A. Do proliferating cell nuclear antigen and MIB-1/Ki-67 have prognostic value in penile squamous cell carcinoma? *Urology.* 2007 Jul; 70 (1): 137-142.
64. Guimarães GC, Lopes A, Campos RS, Zequi Sde C, Leal ML, Carvalho AL, da Cunha IW, Soares FA. Front pattern of invasion in squamous cell carcinoma of the penis: new prognostic factor for predicting risk of lymph node metastases. *Urology.* 2006 Jul; 68 (1): 148-53.
65. Hakenberg OW, Compérat EM, Minhas S, Necchi A, Protzel C, Watkin N; European Association of Urology. EAU guidelines on penile cancer: 2014 update. *Eur Urol.* 2015 Jan; 67 (1):142-50. doi: 10.1016/j.eururo.2014.10.017. Epub 2014 Nov 1.

66. Hannon GJ, Beach D. p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature*. 1994 Sep 15; 371(6494): 257-261.
67. Hase K, Shatney C, Johnson D, Trollope M, Vierra M. Prognostic value of tumor budding in patients with colorectal cancer. *Diseases Colon Rectum* 1993; 36: 627-635.
68. Healy L, May G, Gale K, Grosveld F, Greaves M, Enver T. The stem cell antigen CD34 functions as a regulator of hemopoietic cell adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Dec 19; 92 (26): 12240-12244.
69. Hegarty PK, Kayes O, Freeman A, Christopher N, Ralph DJ, Minhas S. A prospective study of 100 cases of penile cancer managed according to European Association of Urology guidelines. *BJU Int* 2006; 98: 526–31.
70. Hellberg D, Valentin J, Eklund T, Nilsson S. Penile cancer: is there an epidemiological role for smoking and sexual behaviour? *Br Med J Clin Res* 1987; 295: 1306-1308.
71. Herrmann H, , Häner M, Brettel M, Müller SA, Goldie KN, Fedtke B, Lustig A, Franke WW, Aebi U. Structure and assembly properties of the intermediate filament protein vimentin: The role of its head, rod, and tail domains. *J Mol Biol*. 1996; 264: 933–953.
72. Hirai H, Roussel MF, Kato JY, Ashmun RA, Sherr CJ. Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6. *Mol Cell Biol*. 1995 May; 15 (5): 2672-2681.
73. Horenblas S. Lymphadenectomy for squamous cell carcinoma of the penis. Part 1: Diagnosis of lymph node metastasis *BJU International* (2001); 88: 467-472.
74. Horcic M, Koelzer VH, Karamitopoulou E, Terracciano L, Puppa G, Zlobec I, Lugli A. Tumor budding score based on 10 high-power fields is a promising basis for a standardized prognostic scoring system in stage II colorectal cancer. *Hum Pathol*. 2013 May; 44 (5): 697-705. doi: 10.1016/j.humpath.2012.07.026. Epub 2012 Nov 15

75. Howell SM, Molgaard HV, Greaves MF, Spurr NK. Localisation of the gene coding for the haemopoietic stem cell antigen CD34 to chromosome 1q32. *Hum Genet.* 1991 Sep; 87 (5): 625-627.
76. Hughes B, Leijte JAP, Kroon BK, et al. Lymph node metastasis in intermediate-risk penile squamous cell cancer: a two-centre experience. *Eur Urol.* 2010 Apr; 57 (4): 688-692.
77. Hughes B., Leijte J., Shabbir M., Watkin N., Horenblas S.. Non-invasive and minimally invasive staging of regional lymph nodes in penile cancer *World J Urol*, 27 (2009), pp. 197–203.
78. Jass JR, Barker M, Fraser L, Walsh MD, Whitehall VL, Gabrielli B, Young J, Leggett BA. APC mutation and tumour budding in colorectal cancer. *J Clin Pathol.* 2003 Jan; 56 (1): 69-73.
79. Jensen DH, Reibel J, Mackenzie IC, Dabelsteen E. Single cell migration in oral squamous cell carcinoma - possible evidence of epithelial-mesenchymal transition in vivo. *J Oral Pathol Med.* 2015 Oct; 44 (9): 674-9. doi: 10.1111/jop.12321. Epub 2015 Apr 16.
80. Jung A, Schrauder M, Oswald U, Knoll C, Sellberg P, Palmqvist R, Niedobitek G, Brabletz T, Kirchner T. The invasion front of human colorectal adenocarcinomas shows co-localization of nuclear beta-catenin, cyclin D1, and p16INK4A and is a region of low proliferation. *Am J Pathol.* 2001 Nov; 159 (5): 1613-7.
81. Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavitigian SV, Stockert E, Day RS 3rd, Johnson BE, Skolnick MH. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science.* 1994 Apr 15; 264 (5157): 436-440.
82. Karamitopoulou E, Zlobec I, Born D, Kondi-Pafiti A, Lykoudis P, Mellou, A, Gennatas K, Gloor B, Lugli A.. Tumour budding is a strong and independent prognostic factor in pancreatic cancer. *Eur J Cancer.* 2013 Mar; 49 (5): 1032-9. doi: 10.1016/j.ejca.2012.10.022. Epub 2012 Nov 21.

83. Karamitopoulou E, Zlobec I, Kölzer V, Kondi-Pafiti A, Patsouris ES, Gennatas K, Lugli A. Proposal for a 10-high-power-fields scoring method for the assessment of tumor budding in colorectal cancer. *Mod Pathol.* 2013 Feb; 26 (2): 295-301. doi: 10.1038/modpathol.2012.155. Epub 2012 Sep 28.
84. Kato J, Matsushime H, Hiebert SW, Ewen ME, Sherr CJ. Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK4. *Genes Dev.* 1993 Mar; 7 (3): 331-342.
85. Kayes O, Minhas S, Allen C, et al. The role of magnetic resonance imaging in the local staging of penile cancer. *Eur Urol* 2007 May; 51 (5): 1313-8.
86. Kazama S, Watanabe T, Ajioka Y, Kanazawa T, Nagawa H. Tumour budding at the deepest invasive margin correlates with lymph node metastasis in submucosal colorectal cancer detected by anticytokeratin antibody CAM5.2. *Br. J. Cancer* 2006; 94; 293–298.
87. Kemler R, Ozawa M. Uvomorulin–catenin complex: cytoplasmic anchorage of a Ca²⁺-dependent cell adhesion molecule. *BioEssays* 1989; 11: 88–91.
88. Kim YI, Lee A, Lee BH, Kim SY. Prognostic significance of syndecan-1 expression in cervical cancers. *J Gynecol Oncol.* 2011 September; 22 (3): 161–167.
89. Kiviniemi J, Kallajoki M, Kujala I, Matikainen MT, Alanen K, Jalkanen M, Salmivirta M. Altered expression of syndecan-1 in prostate cancer. *APMIS.* 2004 Feb; 112 (2): 89-97.
90. Koda JE, Rapraeger A, Bernfield M. Heparan sulfate proteoglycans from mouse mammary epithelial cells. Cell surface proteoglycan as a receptor for interstitial collagens. *J Biol Chem.* 1985 Jul 5; 260 (13): 8157-8162.
91. Korets R, Koppie TM, Snyder ME, et al. Partial penectomy for patients with squamous cell carcinoma of the penis: the Memorial Sloan-Kettering experience. *Ann Surg Oncol.* 2007; 14 (12): 3614.

92. Koyuncuoglu M, Koyuncuoglu M, Okyay E, Saatli B, Olgan S, Akin M, Saygili U Tumor budding and E-Cadherin expression in endometrial carcinoma: are they prognostic factors in endometrial cancer? *Gynecol Oncol.* 2012 Apr; 125 (1): 208-13. doi: 10.1016/j.ygyno.2011.12.433. Epub 2011 Dec 22.
93. Kroon BK, Horenblas S, Deurloo EE, Nieweg OE, Teertstra HJ. Ultrasonography-guided fine-needle aspiration cytology before sentinel node biopsy in patients with penile carcinoma. *BJU Int* 2005; 95: 517–21.
94. Kroon BK, Horenblas S, Lont AP, Tanis PJ, Gallee MP, Nieweg OE. Patients with penile carcinoma benefit from immediate resection of clinically occult lymph node metastases. *J Urol* 2005; 173: 816–819.
95. Kurokawa I, Takahashi K, Moll I, Moll R. Expression of keratins in cutaneous epithelial tumors and related disorders--distribution and clinical significance. *Exp Dermatol.* 2011 Mar; 20 (3): 217-228.
96. Kurokawa H, Zhang M, Matsumoto S, Yamashita Y, Tanaka T, Takamori K, Igawa K, Yoshida M, Fukuyama H, Takahashi T, Sakoda S. Reduced syndecan-1 expression is correlated with the histological grade of malignancy at the deep invasive front in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2006 May; 35 (5): 301-306.
97. Kurokawa H, Zhang M, Matsumoto S, Yamashita Y, Tanaka T, Tomoyose T, Takano H, Funaki K, Fukuyama H, Takahashi T, Sakoda S. The relationship of the histologic grade at the deep invasive front and the expression of Ki-67 antigen and p53 protein in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2005 Nov; 34 (10): 602-607.
98. Lai YH, Wu LC, Li PS, Wu WH, Yang SB, Xia P, He XX, Xiao LB. Tumour budding is a reproducible index for risk stratification of patients with stage II colon cancer. *Colorectal Dis.* 2014 Apr; 16 (4): 259-64. doi: 10.1111/codi.12454.
- 98a. Landau MS, Hastings SM, Foxwell TJ, Luketich JD, Nason KS, Davison JM. Tumor budding is associated with an increased risk of lymph node metastasis and poor prognosis

- in superficial esophageal adenocarcinoma. *Mod Pathol*. 2014 Dec; 27 (12): 1578-89. doi: 10.1038/modpathol.2014.66. Epub 2014 Apr 25.
99. Lee SH, Choi EJ, Kim MS, Park JW, Lee YS, Kim SY, Kang CS. Prognostic significance of syndecan-1 expression in squamous cell carcinoma of the tonsil. *Int J Clin Oncol*. 2014 Apr; 19 (2): 247-53. doi: 10.1007/s10147-013-0552-7. Epub 2013 Apr 4.
100. Leijte JA, Kirrander P, Antonini N, Windahl T, Horenblas S. Recurrence patterns of squamous cell carcinoma of the penis: recommendations for follow-up based on a two-centre analysis of 700 patients. *Eur Urol*. 2008 Jul; 54 (1): 161-8. doi: 10.1016/j.eururo.2008.04.016. Epub 2008 Apr 15.
101. Leijte JA, Kerst JM, Bais E, Antonini N, Horenblas S. Neoadjuvant chemotherapy in advanced penile carcinoma. *Eur Urol*. 2007 Aug; 52 (2): 488-94. Epub 2007 Feb 14.
102. Leijte JA, Kroon BK, Valdes Olmos RA, Nieweg OE, Horenblas S. Reliability and safety of current dynamic sentinel node biopsy for penile carcinoma. *Eur Urol* 2007; 52: 170–7.
103. Leijte JA, Valde´s Olmos RA, Nieweg OE, Horenblas S. Anatomical mapping of lymphatic drainage in penile carcinoma with SPECT-CT: implications for the extent of inguinal lymph node dissection. *Eur Urol* 2008; 54: 885–92
104. Leivonen M, Lundin J, Nordling S, von Boguslawski K, Haglund C. *Oncology*. Prognostic value of syndecan-1 expression in breast cancer. 2004; 67 (1): 11-8.
105. Li J, Zhu Y, Zhang SL, Wang CF, Yao XD, Dai B, Ye DW. Organ-sparing surgery for penile cancer: complications and outcomes. *Urology* 2011 Nov; 78 (5): 1121-4.
106. Li Y, Nichols MA, Shay JW, Xiong Y. Transcriptional repression of the D-type cyclin-dependent kinase inhibitor p16 by the retinoblastoma susceptibility gene product pRb. *Cancer Res*. 1994 Dec 1; 54 (23): 6078-6082.
107. Li ZS, Yao K, Chen P, Zou ZJ, Qin ZK, Liu ZW, Li YH, Zhou FJ, Han H. Disease-specific survival after radical lymphadenectomy for penile cancer: prediction by lymph

- node count and density. *Urol Oncol*. 2014 Aug; 32 (6): 893-900. doi: 10.1016/j.urolonc.2013.11.008. Epub 2014 Jun 30.
108. Lim GH, Tan PH, Jara-Lazaro AR, Thike AA, Sim WC, Yap VB, Yip GW. Syndecan-1 is a potential biomarker for triple-positive breast carcinomas in Asian women with correlation to survival. *Singapore Med J*. 2014 Sep; 55 (9): 468-72.
 109. Lin RJ, Lubpairee T, Liu KY, Anderson DW, Durham S, Poh CF. Cyclin D1 overexpression is associated with poor prognosis in oropharyngeal cancer. *J Otolaryngol Head Neck Surg*. 2013 Mar 19; 42: 23. doi: 10.1186/1916-0216-42-23.
 110. Liu LK, Jiang XY, Zhou XX, Wang DM, Song XL, Jiang HB. Upregulation of vimentin and aberrant expression of E-cadherin/ β -catenin complex in oral squamous cell carcinomas: correlation with the clinicopathological features and patient outcome. *Mod Pathol* 2010; 23: 213–24.
 111. Lont AP, Besnard AP, Gallee MP, et al. A comparison of physical examination and imaging in determining the extent of primary penile carcinoma. *BJU Int* 2003 Apr; 91 (6): 493-5.
 112. Lont AP, Horenblas S, Tanis PJ, Gallee MP, van Tinteren H, Nieweg OE. Management of clinically node negative penile carcinoma: improved survival after the introduction of dynamic sentinel node biopsy. *J Urol* 2003; 170: 783–6.
 113. Lueck NE, Robinson RA. High levels of expression of cytokeratin 5 are strongly correlated with poor survival in higher grades of mucoepidermoid carcinoma. *J Clin Pathol*. 2008 Jul; 61 (7): 837-40. doi: 10.1136/jcp.2008.055988.
 114. Lugli A, Cathomas G. Tumor Budding beim kolorektalen Karzinom: ein Spitzenspieler auf der Ersatzbank? *Schweiz Med Forum* 2012; 12 (3): 54–55.
 115. Lugli A, Vlajnic T, Giger O, et al. Intratumoral budding as a potential parameter of tumor progression in mismatch repair-proficient and mismatch repair-deficient colorectal cancer patients. *Hum Pathol* 2011; 42: 1833–40.

116. Luna, LG. Histopathologic methods and color atlas of special stains and tissue artifacts. Johnson Printers, Downers Grove, Illinois. 78-79, 1992.
117. Lynch DFJ, Pettaway C. Tumors of the Penis. In Campbell's Urology, Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED, Wein AJ (Eds). 2002, Saunders: Philadelphia, PA. p. 2945-2981.
118. Mahdey HM, Ramanathan A, Ismail SM, Abraham MT, Jamaluddin M, Zain RB. Cyclin D1 amplification in tongue and cheek squamous cell carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2011; 12 (9): 2199-2204.
119. May M, Burger M, Otto W, Hakenberg OW, Wieland WF, May D, Hofstädter F, Götz S, Niessl N, Fritsche HM, Birnkammer K, Gilfrich C, Peter J, Jain A, Koch S, Lebentrau S, Riedmiller H, Rössler W, Denzinger S, Brookman-May S, Gunia S. Ki-67, minichromosome maintenance 2 protein (MCM2) and geminin have no independent prognostic relevance for cancer-specific survival in surgically treated squamous cell carcinoma of the penis. *BJU Int*. 2013 Aug; 112 (4): E383-90. doi: 10.1111/j.1464-410X.2012.11735.x. Epub 2013 Jan 10.
120. Meijer RP, Boon TA, van Venrooij GEP, et al. Long-term follow-up after laser therapy for penile carcinoma. *Urology* 2007; 69: 759-762.
121. Meyerson M, Harlow E. Identification of G1 kinase activity for cdk6, a novel cyclin D partner. *Mol Cell Biol*. 1994 Mar; 14 (3): 2077-2086.
122. Minhas S, Kayes O, Hegarty P, Kumar P, Freeman A, Ralph D. What surgical resection margins are required to achieve oncological control in men with primary penile cancer? *BJU Int*. 2005 Nov; 96 (7): 1040-3.
123. Misra S, Chaturvedi A, Misra NC. Penile carcinoma: a challenge for the developing world. *Lancet Oncol* 2004; 5: 240-7.

124. Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell*. 1982 Nov; 31 (1): 11-24.
125. Moll R, Löwe A, Laufer J, Franke WW. Cytokeratin 20 in human carcinomas. A new histodiagnostic marker detected by monoclonal antibodies. *Am J Pathol*. 1992 Feb; 140 (2): 427-447.
126. Morodomi T, Isomoto H, Shirouzu K, Kakegawa K, Irie K, Morimatsu M. An index for estimating the probability of lymph node metastasis in rectal cancers: lymph node metastasis and the histopathology of actively invasive regions of cancer. *Cancer* 1989; 63: 539-43.
127. Moses S, Bailey RC, Ronald AR. Male circumcision: assessment of health benefits and risks. *Sex Transm Infect* 1998; 74: 368–73.
128. Muñoz N, Castelisague X, de Gonzalez AB, et al. HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine* 2006 Aug; 24 (Suppl 3): S.1-10.
129. Myo K, Uzawa N, Miyamoto R, Sonoda I, Yuki Y, Amagasa T. Cyclin D1 gene numerical aberration is a predictive marker for occult cervical lymph node metastasis in TNM Stage I and II squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer*. 2005 Dec 15; 104 (12): 2709-2716.
130. Nakamura T, Mitomi H, Kikuchi S, Ohtani Y, Sato K Evaluation of the usefulness of tumor budding on the prediction of metastasis to the lung and liver after curative excision of colorectal cancer. *Hepatogastroenterology*. 2005 Sep-Oct; 52 (65): 1432-5.
131. Nasca MR, Innocenzi D, Micali G. Penile cancer among patients with genital lichen sclerosis. *J Am Acad Dermatol* 1999; 41: 911–914.
132. Naumann CM, Alkatout I, Al-Najar A, et al. Lymph node metastasis in intermediate risk squamous cell carcinoma of the penis. *BJU Int* 2008; 102: 1102–1106.

133. Navarro JM, Casatorres J, Jorcano JL. Elements controlling the expression and induction of the skin hyperproliferation-associated keratin K6. *J Biol Chem*. 1995 Sep 8; 270 (36): 21362-21367.
134. Nilsson GM, Akhtar N, Kannius-Janson M, Baeckström D. Loss of E-cadherin expression is not a prerequisite for c-erbB2-induced epithelial-mesenchymal transition. *Int J Oncol*. 2014 Jul; 45 (1): 82-94. doi: 10.3892/ijo.2014.2424.
135. Nobori T, Miura K, Wu DJ, Lois A, Takabayashi K, Carson DA. Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature*. 1994 Apr 21; 368 (6473): 753-756.
136. Ogawa T, Yoshida T, Tsuruta T, Tokuyama W, Adachi S, Kikuchi M, Mikami T, Saigenji K, Okayasu I. Tumor budding is predictive of lymphatic involvement and lymph node metastases in submucosal invasive colorectal adenocarcinomas and in non-polypoid compared with polypoid growths. *Scand J Gastroenterol*. 2009; 44 (5): 605-14. doi: 10.1080/00365520902718911.
137. Ornellas AA, Kinchin EW, Nobrega BL, et al. Surgical treatment of invasive squamous cell carcinoma of the penis: Brazilian National Cancer Institute long-term experience. *J Surg Oncol* 2008 May; 97 (6): 487-495.
138. Ornellas AA, Seixas AL, Marota A, et al. Surgical treatment of invasive squamous cell carcinoma of the penis: retrospective analysis of 350 cases. *J Urol*. 1994; 151: 1244–1249.
139. Paiva GR, de Oliveira Araújo IB, Athanazio DA, de Freitas LA. Penile cancer: impact of age at diagnosis on morphology and prognosis. *Int Urol Nephrol*. 2015 Feb; 47 (2): 295-9. doi: 10.1007/s11255-014-0875-y. Epub 2014 Nov 11.
140. Paoli John, Ternesten Bratel Annika, Löwhagen Gun-Britt, Stenquist Bo, Forslund Ola, Wennberg Ann-Marie. Penile Intraepithelial Neoplasia: Results of Photodynamic Therapy. *Acta Derm Venereol* 2006; 86: 418–421.

141. Papadopoulos O, Betsi E, Tsakistou G, Frangoulis M, Kouvatseas G, Anagnostakis D, Kouvidou Ch. Expression of cyclin D1 and Ki-67 in squamous cell carcinoma of the penis. *Anticancer Res.* 2007 Jul-Aug; 27 (4B): 2167-2174.
142. Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Teppo L, Thomas DB (eds). *Cancer Incidence in Five Continents. Vol. VIII. IARC Scientific Publications. No. 155.* Lyon, France: IARC, 2002.
143. Pietrzak P, Corbishley C, Watkin N. Organ-sparing surgery for invasive penile cancer: early follow-up data. *BJU Int* 2004; 94: 1253–7.
144. Pizzocaro G. (past Chairman), Algaba F., Solsona E., Tana S., Van Der Poel H. , Watkin N., Horenblas S. (Chairman) EAU Guidelines on penile cancer. *Eur Urol Update* April 2010: 4-25.
145. Poetsch M, Hemmerich M, Kakies C, Kleist B, Wolf E, vom Dorp F, Hakenberg OW, Protzel C. Alterations in the tumor suppressor gene p16(INK4A) are associated with aggressive behavior of penile carcinomas. *Virchows Arch.* 2011 Feb; 458 (2): 221-229. doi: 10.1007/s00428-010-1007-4. Epub 2010 Nov 18.
146. Prall, F. Tumour budding in colorectal carcinoma. *Histopathology* 2007; 50: 151–162
147. Prall F, Nizze H, Barten M. Tumour budding as prognostic factor in stage I/II colorectal carcinoma. *Histopathology.* 2005 Jul; 47(1):17-24.
148. Prall F, Ostwald C, Weirich V, Nizze H. p16 (INK4a) promoter methylation and 9p21 allelic loss in colorectal carcinomas: relation with immunohistochemical p16(INK4a) expression and with tumor budding. *Hum Pathol.* 2006 May; 37 (5): 578-585. Epub 2006 Mar 13.
149. Protzel C, Alcaraz A, Horenblas S, Pizzocaro G, Zlotta A, Hakenberg OW. Lymphadenectomy in the surgical management of penile cancer. *Eur Urol.* 2009 May; 55 (5): 1075-88. doi: 10.1016/j.eururo.2009.02.021. Epub 2009 Feb 23.

150. Protzel C, Kakies C, Schwarzenboeck S, Kuhnt T, Erbersdobler A, Krause B, Hakenberg OW. Das Peniskarzinom. *Der Onkologe*. February 2013, Volume 19, Issue 2, pp 149-162.
151. Protzel C, Knoedel J, Zimmermann U, Woenckhaus C, Poetsch M, Giebel J. Expression of proliferation marker Ki67 correlates to occurrence of metastasis and prognosis, histological subtypes and HPV DNA detection in penile carcinomas. *Histol Histopathol*. 2007 Nov; 22 (11): 1197-1204.
152. Rapraeger A, Bernfield M. Cell surface proteoglycan of mammary epithelial cells. Protease releases a heparan sulfate-rich ectodomain from a putative membrane-anchored domain. *J Biol Chem*. 1985 Apr 10; 260 (7): 4103-4109.
153. Rapraeger A, Jalkanen M, Endo E, Koda J, Bernfield M. The cell surface proteoglycan from mouse mammary epithelial cells bears chondroitin sulfate and heparan sulfate glycosaminoglycans. *J Biol Chem*. 1985 Sep 15; 260 (20): 11046-11052.
154. Rapraeger A, Jalkanen M, Bernfield M. Cell surface proteoglycan associates with the cytoskeleton at the basolateral cell surface of mouse mammary epithelial cells. *J Cell Biol*. 1986 Dec; 103 (6 Pt 2): 2683-2696.
155. Rees RW, Freeman A, Borley N, et al. PT2 penile squamous cell carcinomas: cavernosus vs. spongiosus invasion. *Eur Urol Suppl* 2008; 7 (3): 111.
156. Roh MS, Lee JI, Choi PJ. Tumor budding as a useful prognostic marker in esophageal squamous cell carcinoma. *Diseases of the Esophagus* (2004); 17, 333–337.
157. van Roy F, Berx G. The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cell Mol Life Sci*. 2008 Nov; 65 (23): 3756-88. doi: 10.1007/s00018-008-8281-1.
158. Rubin MA, Kleter B, Zhou M, Ayala G, Cubilla AL, Quint WG, Pirog EC. Detection and typing of human papillomavirus DNA in penile carcinoma: evidence for multiple independent pathways of penile carcinogenesis. *Am J Pathol*. 2001 Oct; 159 (4): S. 1217 (1211-1218).

159. Saisorn I, Lawrentschuk N, Leewansangtong S, Bolton DM. Fine-needle aspiration cytology predicts inguinal lymph node metastasis without antibiotic pretreatment in penile carcinoma. *BJU Int* 2006; 97: 1225–8.
160. Saunders S, Bernfield M. Cell surface proteoglycan binds mouse mammary epithelial cells to fibronectin and behaves as a receptor for interstitial matrix. *J Cell Biol.* 1988 Feb; 106 (2): 423-430.
161. Saunders S, Jalkanen M, O'Farrell S, Bernfield M. Molecular cloning of syndecan, an integral membrane proteoglycan. *J Cell Biol.* 1989 Apr; 108 (4): 1547-56.
162. Scher B, Seitz M, Albinger W, Reiser B, Schlenker B, Stief CG, Mueller-Lisse U, Dressel S. Value of PET and PET/CT in the diagnostics of prostate and penile cancer. *Recent Results Cancer Res.* 2008; 170: 159-79.
163. Schlenker B, Tilki D, Seitz M, et al. Organ-preserving neodymium-yttrium-aluminum-garnet laser therapy for penile carcinoma: a long-term follow-up. *BJU Int* 2010; 106: 786-790
164. Schlüter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Becker MH, Key G, Flad HD, Gerdes J. The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *J Cell Biol.* 1993 Nov; 123 (3): 513-522.
165. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol.* 2000 Mar; 182 (3): 311-322.
166. Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature.* 1993 Dec 16; 366 (6456): 704-707.
167. Shariat SF, Svatek RS, Kabbani W, Walz J, Lotan Y, Karakiewicz PI, Roehrborn CG. Prognostic value of syndecan-1 expression in patients treated with radical prostatectomy. *BJU Int.* 2008 Jan; 101 (2): 232-237.

168. Shindel AW, Mann MW, Lev RY, et al. Moh's micrographic surgery for penile cancer: management and long-term follow up. *J Urol*. 2007; 178: 1980-1985.
169. Shingleton H, Heath Jr CW (American Cancer Society). Letter to Peter Rappo, M.D., February 16, 1996.
170. Smith Y, Hadway P, Biedrzycki O, et al. Reconstructive surgery for invasive squamous carcinoma of the glans penis. *Eur Urol*. 2007; 52:1179-1185.
171. Sobin LH, Gospodariwics M, Wittekind C (eds). *TNM Classification of Malignant Tumours*. UICC International Union Against Cancer 7th edition, Willy-Blackwell, 2009 Dec; 239-42.
172. Solsona E , Bahl A , Brandes SB et al . New developments in the treatment of localized penile cancer. *Urology*. 2010 Aug; 76 (2 Suppl 1): S36-42. doi: 10.1016/j.urology.2010.04.009..
173. Solsona E, Iborra I, Rubio J, et al. Prospective validation of the association of local tumor stage grade as a predictive factor for occult lymph node micrometastasis in patients with penile carcinoma and clinically negative inguinal lymph nodes. *J Urol* 2001 May; 165 (5): 1506-9.
174. Stankiewicz E, Ng M, Cuzick J, Mesher D, Watkin N, Lam W, Corbishley C, Berney DM. The prognostic value of Ki-67 expression in penile squamous cell carcinoma. *J Clin Pathol*. 2012 Jun; 65 (6): 534-7. doi: 10.1136/jclinpath-2011-200638. Epub 2012 Mar 23.
175. Steinert PM, Roop DR. Molecular and cellular biology of intermediate filaments. *Annu. Rev. Biochem* 1988; 57: 593-625.
176. Stern RS. Genital tumors among men with psoriasis exposed to psoralens and ultraviolet A radiation (PUVA) and ultraviolet B radiation. The Photochemotherapy Follow-up Study. *N Engl J Med* 1990; 322: 1093–1097.

177. Sun X, Mosher DF, Rapraeger A. Heparan sulfate-mediated binding of epithelial cell surface proteoglycan to thrombospondin. *J Biol Chem*. 1989 Feb 15 ; 264 (5): 2885-2889.
178. Sweeney KJ, Sarcevic B, Sutherland RL, Musgrove EA. Cyclin D2 activates Cdk2 in preference to Cdk4 in human breast epithelial cells. *Oncogene*. 1997 Mar20; 14 (11): 1329-40.
179. Tabatabaei S, Harisinghani M, McDougal WS. Regional lymph node staging using lymphotropic nanoparticle enhanced magnetic resonance imaging with ferumoxtran-10 in patients with penile cancer. *J Urol* 2005; 174: 923–7.
180. Taira T, Ishii G, Nagai K, Yoh K, Takahashi Y, Matsumura Y, Kojima M, Ohmatsu H, Goto K, Niho S, Takashima H, Inoue H, Ohe Y, Ochiai A. Characterization of the immunophenotype of the tumor budding and its prognostic implications in squamous cell carcinoma of the lung *Lung Cancer* 2012; 76: 423– 430.
181. Takeichi M. Cadherins: a molecular family important in selective cell–cell adhesion. *Annu. Rev. Biochem* 1990; 59: 237–252.
182. Takeichi M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* 1991; 251: 1451–1455.
183. Thiery, J.P. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat. Rev. Cancer* 2002; 2: 442–454.
184. Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7 (2): 131-42.
185. Todosi AM, Gavrilescu MM, Aniței GM, Filip B, Scripcariu V. Colon cancer at molecular level-usefulness of epithelial- mesenchymal transition analysis. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi*. 2012 Oct-Dec; 116 (4): 1106-11.

186. Tumuluri V, Thomas GA, Fraser IS. Analysis of the Ki-67 antigen at the invasive tumour front of human oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2002 Nov; 31 (10): 598-604.
187. Ueno H, Mochizuki H, Shinto E, Hashiguchi Y, Hase K, Talbot IC. Histologic indices in biopsy specimens for estimating the probability of extended local spread in patients with rectal carcinoma. *Cancer*. 2002 Jun 1; 94 (11): 2882-91.
188. Ueno H, Murphy J, Jass JR, Mochizuki H, Talbot IC. Tumour budding as an index to estimate the potential of aggressiveness in rectal cancer. *Histopathology* 2002; 40: 127-132.
189. Van Howe RS, Hodges FM. The carcinogenicity of smegma: debunking a myth. *Eur Acad Dermatol Venereol* 2006 Oct; 20 (9): 1046-54.
190. Vassallo J, Rodrigues AF, Campos AH, Rocha RM, da Cunha IW, Zequi SC, Guimarães GC, da Fonseca FP, Lopes A, Cubilla A, Soares FA. Pathologic and immunohistochemical characterization of tumoral inflammatory cell infiltrate in invasive penile squamous cell carcinomas: Fox-P3 expression is an independent predictor of recurrence. *Tumour Biol*. 2015 Apr; 36 (4): 2509-16. doi: 10.1007/s13277-014-2864-2. Epub 2015 Jan 5.
191. Villavicencio H, Rubio-Briones J, Regalado R, et al. Grade, local stage and growth pattern as prognostic factors in carcinoma of the penis. *Eur Urol* 1997; 32 (4): 442-7.
192. Wang C, Huang H, Huang Z, Wang A, Chen X, Huang L, Zhou X, Liu X. Tumor budding correlates with poor prognosis and epithelial-mesenchymal transition in tongue squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2011 Aug; 40 (7): 545-551.
193. Wang LM, Kevans D, Mulcahy H, O'Sullivan J, Fennelly D, Hyland J, O'Donoghue D, Sheahan K. Tumor budding is a strong and reproducible prognostic marker in T3N0 colorectal cancer. *Am J Surg Pathol*. 2009 Jan; 33 (1): 134-41. doi: 10.1097/PAS.0b013e318184cd55.

194. Yuen PW, Man M, Lam KY, Kwong YL. Clinicopathological significance of p16 gene expression in the surgical treatment of head and neck squamous cell carcinomas. *J Clin Pathol.* 2002 Jan; 55 (1): 58-60.
195. Zellweger T, Ninck C, Mirlacher M, Anefeld M, Glass AG, Gasser TC, Mihatsch MJ, Gelmann EP, Bubendorf L. Tissue microarray analysis reveals prognostic significance of syndecan-1 expression in prostate cancer. *Prostate.* 2003 Apr 1; 55 (1): 20-29.
196. Zhang HS, Postigo AA, Dean DC. Active transcriptional repression by the Rb-E2F complex mediates G1 arrest triggered by p16INK4a, TGFbeta, and contact inhibition. *Cell.* 1999 Apr 2; 97 (1): 53-61.
197. Zhu Y, Zhou XY, Yao XD, Dai B, Ye DW. The prognostic significance of p53, Ki-67, epithelial cadherin and matrix metalloproteinase-9 in penile squamous cell carcinoma treated with surgery. *BJU Int.* 2007 Jul; 100 (1): 204-208.
198. Zini L, Cloutier V, Isbarn H, Perrotte P, Capitanio U, Jeldres C, Shariat SF, Saad F, Arjane P, Duclos A, Lattouf JB, Montorsi F, Karakiewicz PI. A simple and accurate model for prediction of cancer-specific mortality in patients treated with surgery for primary penile squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2009 Feb 1; 15 (3): 1013-8. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1888.
199. Zlobec I, Lugli A. Epithelial mesenchymal transition and tumor budding in aggressive colorectal cancer: tumor budding as oncotarget. *Oncotarget* 2010; 1 (7): 651–661.
200. Zlobec I, Molinari F, Martin V, Mazzucchelli L, Saletti P, Trezzi R, De Dosso S, Vlajnic T, Frattini M, Lugli A. Tumor budding predicts response to anti-EGFR therapies in metastatic colorectal cancer patients. *World J Gastroenterol.* 2010 Oct 14; 16 (38): 4823-31.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Anjun Jain, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Retrospektive morphologische Untersuchungen zum Tumor-Budding bei Plattenepithelkarzinomen des Penis“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Berlin, den

Anjun Jain

Teilpublikation

Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Anjun Jain hatte folgenden Anteil an der nachstehenden Publikation:

May M, Burger M, Otto W, Hakenberg OW, Wieland WF, May D, Hofstädter F, Götz S, Niessl N, Fritsche HM, Birnkammer K, Gilfrich C, Peter J, **Jain A**, Koch S, Lebentrau S, Riedmiller H, Rössler W, Denzinger S, Brookman-May S, Gunia S. Ki-67, mini-chromosome maintenance 2 protein (MCM2) and geminin have no independent prognostic relevance for cancer-specific survival in surgically treated squamous cell carcinoma of the penis. *BJU Int.* 2013 Aug; 112 (4): E383-90. doi: 10.1111/j.1464-410X.2012.11735.x. Epub 2013 Jan 10.

Beiträge im Einzelnen:

Multizentrische Datenanalyse zu Patientenmaterial; Zusammenstellung der Paraffinblöckchen (Materialakquise); Vormusterung der histologischen Präparate; Lesen, Diskussion und Korrektur des Manuskripts.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

1. Gunia S, **Jain A**, Albrecht K, Koch S, Otto W, Denzinger S, Götz S, Niessl N, Burger M, May M. Diagnostic and prognostic impact of peritumoral stromal remodeling in patients with surgically treated invasive penile squamous cell cancer. *Hum Pathol.* 2014 Jun; 45 (6): 1169-76. doi: 10.1016/j.humpath.2014.01.012. Epub 2014 Jan 31.
2. Gunia S, Koch S, **Jain A**, May M. Does the width of the surgical margin of safety or premalignant dermatoses at the negative surgical margin affect outcome in surgically treated penile cancer? *J Clin Pathol.* 2014 Mar; 67 (3): 268-71. doi: 10.1136/jclinpath-2013-201911. Epub 2013 Oct 7.
3. Gunia S, **Jain A**, Koch S, Denzinger S, Götz S, Niessl N, May M. Periostin expression correlates with pT-stage, grading and tumour size, and independently predicts cancer-specific survival in surgically treated penile squamous cell carcinomas. *J Clin Pathol.* 2013 Apr; 66(4): 297-301. doi: 10.1136/jclinpath-2012-201262. Epub 2013 Jan 31.
4. Gunia S, Burger M, Hakenberg OW, May D, Koch S, **Jain A**, Birnkammer K, Wieland WF, Otto W, Hofstädter F, Fritsche HM, Denzinger S, Gilfrich C, Brookman-May S, May M. Inherent grading characteristics of individual pathologists contribute to clinically and prognostically relevant interobserver discordance concerning Broders' grading of penile squamous cell carcinomas. *Urol Int.* 2013; 90 (2): 207-13. doi: 10.1159/000342639. Epub 2012 Oct 26.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. habil. Stefan Koch, Chefarzt des Instituts für Pathologie, HELIOS Klinikum Bad Saarow, für die Überlassung des interessanten Themas, für seine hervorragende Betreuung und für seine ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft zu allen Zeiten dieser Arbeit.

In alphabetischer Reihenfolge danke ich für die Unterstützung der vorliegenden Arbeit durch das Zurverfügungstellen der archivierten Paraffinblöckchen: Frau Dr. med. V. Henn (seinerzeit Chefarztin des Instituts für Pathologie, Ruppiner Kliniken Neuruppin), Herrn Dr. med. J. Janda (seinerzeit Chefarzt des Instituts für Pathologie, Klinikum Frankfurt/Oder), Herrn Prof. Dr. med. H. Lobeck (seinerzeit Chefarzt des Instituts für Pathologie, Ernst-von-Bergmann-Klinikum Potsdam), Herrn Chefarzt Dr. med. R. Pauli (Institut für Pathologie, Gesundheitszentrum Brandenburg an der Havel) und Herrn Chefarzt Dr. med. M. Tuffaha (Institut für Pathologie, Carl-Thiem-Klinikum Cottbus).

Besonderer Dank gilt auch Herrn Dipl.-Math. Bernd Schicke für die statistische Analyse, die kritischen Bemerkungen und Anregungen für diese Arbeit.

Herrn Dr. med. Sven Gunia und Herrn PD Dr. med. Matthias May möchte ich für die Bereitstellung der klinischen und histologischen Daten, für die Reklassifizierung der histologischen Schnitte und für die freundliche Unterstützung in den verschiedenen Stadien meiner Arbeit danken.

Dem Ost-brandenburgischen Tumorzentrum Bad Saarow gebührt Dank für die Bereitstellung der Patientendaten.

Den medizinisch-technischen Assistentinnen und besonders Frau Lengsfeld, Leitende Med.-techn. Assistentin, Institut für Pathologie, HELIOS Klinikum Bad Saarow, danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung der immunhistochemischen Färbungen.

Meiner Familie danke ich für die liebevolle Unterstützung.