

Aus dem CharitéCentrum 10 für
Magen-, Darm-, Nieren- und Stoffwechselmedizin
Klinik für Urologie
Campus Benjamin Franklin
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. K. Miller

Habilitationsschrift

NEUE PARAMETER IN DER MOLEKULAREN DIAGNOSTIK DES PROSTATAKARZINOMS

zur Erlangung der Venia Legendi
für das Fachgebiet Urologie

Vorgelegt dem Fakultätsrat der
medizinischen Fakultät,
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Dr. med. Martin Schostak

Habilitation: 3. Dezember 2007

Dekan: Prof. Dr. M. Paul

1. Gutachter: Prof. Dr. B. Wullich / Universitätsklinikum Homburg-Saar

2. Gutachter: Prof. Dr. J. E. Gschwend, Universitätsklinikum der TU München

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

3D	Dreidimensional
AHT	Adjuvante Hormontherapie
AMACR	Alpha-Methylacyl-CoA-Racemase
ARE	Androgenresponsibles Element
AR	Androgenrezeptor
ASTRO	American Society for therapeutic Radiology and Oncology
AUC	Fläche unter der Kurve
BP	Basenpaar
BMI	Body-Mass-Index
BPH	Benigne Prostatahyperplasie
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GSTP1	Glutathion-S-Transferase P1 Gen
GSTP1-HM	Glutathion-S-Transferase-P1- Hypermethylation
HAT	Hormonablative Therapie
HE	Hematoxylin-Eosin
HIFU	Hochintensiver fokussierter Ultraschall
IHC	Immunhistochemie
LHRH	Luteinising hormone releasing hormone
MSP	Methylierungsspezifische Polymerase-Kettenreaktion
mRNA	Messenger Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
MSP	Methylierungsspezifische Polymerase-Kettenreaktion
M	Musculus
NHT	Neoadjuvante Hormontherapie
NPW	Negativer prädiktiver Wert
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
Pca	Prostate Carcinoma (Prostatakarzinom)
PZ	Periphere Zone
PIN	Prostatische intraepitheliale Neoplasie
PBGD	Porphobilinogen Deaminase
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PPW	Positiver prädiktiver Wert
PSA	Prostataspezifisches Antigen
RNA	Ribonucleic Acid (Ribonukleinsäure)
ROC-Kurve	Receiver Operating Characteristic-Kurve
RPX	Radikale Prostatektomie
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion)
SSCP	Single-Strand-Conformational-Polymorphism
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
TNM	Stadieneinteilung der Union internationale contre le cancer
TZ	Transitionszone
TRUS	Transrektaler Ultraschall
TUR-P	Transurethrale Resektion
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
vs	Versus (Gegen)
UICC	Union Internationale Contre Le Cancer
WHO	World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation)

Gliederung	S. 3
1. Einleitung	S. 8
1.1. Das Prostatakarzinom - Verbreitung und Ursachen	S. 8
1.1.1. Epidemiologie	S. 8
1.1.2. Ätiologie und Pathogenese	S. 9
1.1.3. Ethnographische Faktoren	S. 9
1.1.4. Diätetische Faktoren	S. 9
1.1.5. Genetische Faktoren	S. 9
1.1.6. Sexuelle Aktivität	S. 10
1.2. Anatomie der Prostata	S. 10
1.2.1. Makroskopische Anatomie	S. 10
1.2.2. Anatomische Unterteilung	S. 11
1.2.3. Histologie	S. 11
1.2.4. Immunhistochemische Verfahren	S. 12
1.2.4.1. Allgemeines	S. 12
1.2.4.2. PSA in der Immunhistochemie	S. 12
1.2.4.3. AMACR in der Immunhistochemie	S. 12
1.2.4.4. CD24 in der Immunhistochemie	S. 13
1.2.5. Klassifikation der Prostatakarzinome	S. 13
1.2.6. Grading	S. 14
1.2.7. Lokale Tumorausbreitung des Prostatakarzinoms	S. 15
1.3. Metastasierung	S. 15
1.4. Prognose des Prostatakarzinoms	S. 16
1.5. Diagnostik des Prostatakarzinoms	S. 16
1.5.1. Körperliche Untersuchung	S. 16
1.5.1.1. Digital rektale Untersuchung	S. 16
1.5.2. Bildgebung	S. 17
1.5.2.1. Transrektaler Ultraschall	S. 17
1.5.3. Labordiagnostik	S. 17
1.5.3.1. PSA im Serum	S. 17
1.5.4. Invasive Diagnostik	S. 18
1.5.4.1. Prostata-Biopsie	S. 18
1.5.4.2. Lymphadenektomie	S. 18

1.6. Neue molekularbiologische Untersuchungen	S. 19
1.6.1. PSA-Promoter-Polymorphismen	S. 19
1.6.2. PSA mRNA in pelvinen Lymphknoten bei Pca-Patienten	S. 21
1.6.3. Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen neu entdeckte, molekulare Marker	S. 22
1.6.3.1. Allgemeines	S. 22
1.6.3.2. Auswahl der in hier verwandten neuen Marker	S. 22
1.6.3.3. Alpha-methylacyl CoA Racemase (AMACR) mRNA in Prostatagewebe	S. 23
1.6.3.4. AMACR mRNA im Urin und Prostatasekreten	S. 23
1.6.3.5. CD24 mRNA in Prostatagewebe	S. 24
1.6.3.6. CD24 mRNA im Urin und Prostatasekreten	S. 24
1.6.3.7. Einfluss einer Hormonablation auf die Promoter Hypermethylation des "Detoxifying Glutathion-S-Transferase P1 Gens" (<i>GSTP1</i>)	S. 24
2. Patienten, Material und Methodik	S. 26
2.1. Allgemeines	S. 26
2.2. PSA-Promoter-Polymorphismen	S. 26
2.2.1. Patienten	S. 26
2.2.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	S. 26
2.2.3. Single-Strand-Conformational-Polymorphisms (SSCP)	S. 28
2.2.4. Klonierung	S. 29
2.2.5. Sequenzierung	S. 29
2.2.6. Enzymatische Spaltung	S. 30
2.2.7. Korrelation mit dem Stadium des Patienten	S. 31
2.3. PSA mRNA in pelvinen Lymphknoten bei Pca-Patienten	S. 32
2.3.1. Patienten	S. 32
2.3.2. Follow-up	S. 32
2.3.3. Proben	S. 32
2.3.4. RNA Extraktion	S. 32
2.3.5. cDNA Synthese und quantitative RT-PCR	S. 33
2.3.6. Auswertung	S. 34
2.3.7. Statistische Analyse	S. 34

2.4. Alpha-methylacyl CoA Racemase (AMACR) mRNA in Prostatagewebe	S. 35
2.4.1. Patienten	S. 35
2.4.2. Proben	S. 35
2.4.3. Follow-up	S. 35
2.4.4. RNA Extraktion	S. 35
2.4.5. Quantitative RT-PCR	S. 36
2.4.6. Auswertung	S. 36
2.4.7. Statistik	S. 36
2.5. AMACR mRNA im Urin und Prostatasekreten	S. 37
2.5.1. Patienten	S. 37
2.5.2. Exprimaturin und Morgenurin	S. 37
2.5.3. RNA Extraktion	S. 37
2.5.4. RT-PCR	S. 37
2.5.5. Auswertung	S. 37
2.5.6. Statistik	S. 38
2.6. CD24 mRNA in Prostatagewebe	S. 38
2.6.1. Patienten	S. 38
2.6.2. Proben	S. 38
2.6.3. Follow-up	S. 38
2.6.4. RNA Extraktion	S. 39
2.6.5. Quantitative RT-PCR	S. 39
2.6.6. Auswertung	S. 39
2.6.7. Statistik	S. 40
2.7. CD24 mRNA im Urin und Prostatasekreten	S. 40
2.7.1. Patienten	S. 40
2.7.2. Exprimaturin und Morgenurin	S. 40
2.7.3. RNA Extraktion	S. 40
2.7.4. Quantitative RT-PCR	S. 40
2.7.5. Auswertung	S. 41
2.7.6. Statistik	S. 41
2.8. Einfluss einer Hormonablation auf die Promoter Hypermethylation des “Detoxifying Glutathion-S-Transferase P1 Gens” (<i>GSTP1</i>)	S. 41
2.8.1. Patienten	S. 41
2.8.2. Histologie	S. 41

2.8.3.	DNA-Extraktion	S. 41
2.8.4.	Methylierungsspezifische Polymerase-Kettenreaktion (MSP)	S. 42
3.	Ergebnisse	S. 43
3.1.	PSA-Promoter-Polymorphismen	S. 43
3.1.1.	Patienten	S. 43
3.1.2.	SSCP-Analyse	S. 44
3.1.3.	Restriktionsanalyse	S. 46
3.1.4.	Korrelation zum klinischen Stadium	S. 47
3.1.4.1.	Lokales Stadium	S. 47
3.1.4.2.	Lymphknotenstadium	S. 48
3.1.4.3.	Fernmetastasierung	S. 49
3.2.	PSA mRNA in pelvinen Lymphknoten bei Pca-Patienten	S. 50
3.2.1.	Patienten	S. 50
3.2.2.	Lymphknoten	S. 51
3.2.3.	Follow-Up	S. 51
3.2.4.	Korrelation zwischen PSA mRNA-RT-PCR sowie Histopathologie und späterer Progression	S. 51
3.2.5.	RT-PCR vs. Histologie	S. 53
3.3.	Alpha-methylacyl CoA Racemase (AMACR) mRNA in Prostatagewebe	S. 54
3.3.1.	Patienten	S. 54
3.3.2.	AMACR mRNA-Expression	S. 55
3.3.3.	Follow-Up	S. 58
3.4.	AMACR mRNA im Urin und Prostatasekreten	S. 59
3.4.1.	Patienten	S. 59
3.4.2.	Exprimat-Urin	S. 59
3.4.3.	Morgenurin	S. 60
3.5.	CD24 mRNA in Prostatagewebe	S. 60
3.5.1.	Patienten	S. 60
3.5.2.	Relative CD24 mRNA-Expression	S. 61
3.5.3.	Follow-Up	S. 64
3.5.4.	CD24 mRNA im Urin und in Prostatasekreten	S. 65
3.5.5.	Patienten	S. 65
3.5.6.	Exprimat-Urin	S. 65

3.5.7. Morgenurin	S. 69
3.6. Einfluss einer Hormonablation auf die Promoter Hypermethylation des “Detoxifying Glutathion-S-transferase P1 Gens” (<i>GSTP1</i>)	S. 72
3.6.1. Patienten	S. 72
3.6.2. Methylierungsspezifische Polymerase-Kettenreaktion (MSP)	S. 72
4. Diskussion	S. 76
4.1. PSA-Promoter-Polymorphismen	S. 76
4.2. PSA mRNA in pelvinen Lymphknoten bei Pca-Patienten	S. 80
4.3. Alpha-methylacyl CoA Racemase (AMACR) mRNA in Prostatagewebe	S. 85
4.4. AMACR mRNA im Urin und in Prostatasekreten	S. 87
4.5. CD24 mRNA in Prostatagewebe	S. 88
4.6. CD24 mRNA im Urin und Prostatasekreten	S. 90
4.7. Einfluss einer Hormonablation auf die Promoter Hypermethylation des “Detoxifying Glutathion-S-transferase P1 Gens” (<i>GSTP1</i>)	S. 91
5. Fazit und Ausblick	S. 94
5.1. Allgemeines	S. 94
5.2. PSA-Promoter-Polymorphismen	S. 94
5.3. PSA mRNA in pelvinen Lymphknoten bei Pca-Patienten	S. 95
5.4. Alpha-methylacyl CoA Racemase (AMACR) mRNA in Prostatagewebe	S. 95
5.5. AMACR mRNA im Urin und in Prostatasekreten	S. 96
5.6. CD24 mRNA in Prostatagewebe	S. 96
5.7. CD24 mRNA im Urin und in Prostatasekreten	S. 96
5.8. Einfluss einer Hormonablation auf die Promoter Hypermethylation des “Detoxifying Glutathion-S-Transferase P1 Gens” (<i>GSTP1</i>)	S. 96
6. Literatur	S. 97
7. Danksagung	S. 117
8. Erklärung gem. § 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité	S. 118

1. Einleitung

1.1. Das Prostatakarzinom - Verbreitung und Ursachen

1.1.1. Epidemiologie

Das Prostatakarzinom ist in den westlichen Industrieländern der am häufigsten diagnostizierte maligne Tumor des älteren Mannes [Jemal et al. 2005; Luboldt et al. 2001].

In den Vereinigten Staaten von Amerika (USA) erhöhte sich die Zahl der Neuerkrankungen von ehemals 64.000 im Jahre 1979 auf 244.000 im Jahre 1995 [Parker et al. 1997].

Heute liegt die Inzidenz in den USA bei 161.200 Fällen pro Jahr. Diese Zahl übersteigt weit die Häufigkeit anderer neu entdeckter Malignome: Bronchialkarzinom 86.400, Kolon- und Rektumkarzinom 61.300, Blasenkarzinom 37.000 Erkrankte pro Jahr [U. S. Cancer Statistics Working Group 2002].

In der Bundesrepublik Deutschland ist seit Ende der 80er Jahre ebenfalls ein kontinuierlicher Anstieg der Inzidenz zu verzeichnen, jedoch weniger deutlich als in den USA. Erkrankten 1991 etwa 16.000 Männer an einem Prostatakarzinom, waren es 1995 20.000 Neuerkrankungen [Hölzel 1995].

Derzeit werden jährlich etwa 40.600 Prostatakarzinome diagnostiziert. So ist die Prostata mit ca. 20 % inzwischen die häufigste Lokalisation bösartiger Neubildungen beim Mann und hat damit 1998 erstmals das Bronchialkarzinom als führenden Tumor der Männer abgelöst [Arbeitsgemeinschaft bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland 2004].

Der Anstieg der Erkrankungsraten beruht neben dem zunehmenden Alter der Patienten auch auf der Einführung und Anwendung neuer spezifischer Methoden in der Diagnostik, insbesondere der Bestimmung des prostataspezifischen Antigens (PSA) [Smart 1997].

In den USA ist das Prostatakarzinom zur zweithäufigsten Todesursache geworden. Über 28.000 amerikanische Männer sterben jährlich an den Folgen des Karzinoms [U. S. Cancer Statistics Working Group 2002], in Deutschland sind es jährlich etwa 11.000 Patienten. Bei den zum Tode führenden Krebserkrankungen steht das Prostatakarzinom in Deutschland mit ca. 10 % an dritter Stelle. Es besteht eine erhebliche Diskrepanz zwischen Inzidenz und Mortalität.

Das mittlere Erkrankungsalter liegt in Deutschland bei 71 Jahren, 5 Jahre höher als allgemein für die Krankheit Krebs. [Arbeitsgemeinschaft bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland 2004].

1.1.2. Ätiologie und Pathogenese

Die genaue Ätiologie des Prostatakarzinoms ist nicht abschließend geklärt. Es ist von einem multifaktoriellen Geschehen auszugehen, wobei folgende Einflussgrößen diskutiert werden:

1.1.3. Ethnographische Faktoren

Die schwarze Bevölkerung der USA erkrankt im Vergleich zu anderen Bevölkerungsgruppen häufiger: Die alterskorrigierte Inzidenz liegt bei schwarzen Amerikanern bei 90/100.000 pro Jahr, bei weißen Amerikanern und Nordwesteuropäern bei 40-60/100.000 und bei Asiaten bei 2-10/100.000 pro Jahr [Keeley et al. 1996].

Die unterschiedliche Häufigkeit des Prostatakarzinoms zwischen den ethnischen Gruppen wird von einigen Autoren auf eine abweichende Androgenkonzentration zurückgeführt [Wu et al. 1995].

1.1.4. Diätetische Faktoren

Neben der rein ethnografischen Prädisposition scheinen auch Einflüsse der Umwelt und diätetische Faktoren bedeutend zu sein: Der Verzehr fettreicher und faserarmer Nahrung steigern, der Konsum von Getreide, grüngelben Gemüse und Soja senken das Risiko der Ausbildung eines Prostatakarzinoms. So unterliegen Asiaten, die in die USA immigrierten, dem gleichen Erkrankungsrisiko wie die einheimische amerikanische Bevölkerung [Wingo et al. 1995; Whittemore et al. 1995].

Auch der Body-Mass-Index (BMI) scheint einen Einfluss auf das Prostatakarzinom aufzuzeigen. In einer Studie von Amling et al. wurden bei Patienten mit einem BMI über 30 kg/m² häufiger pT3-Karzinome mit einem höheren Anteil von Lymphknotenmetastasen gefunden als bei Männern mit einem BMI unter 30 kg/m². Des Weiteren waren adipöse Patienten zum Zeitpunkt der initialen Diagnosestellung deutlich jünger [Amling et al. 2001].

1.1.5. Genetische Faktoren

Eine positive Familienanamnese ist mittlerweile als Risikofaktor für die Entstehung eines Prostatakarzinoms anerkannt [Kalish et al. 2000; Walsh et al. 1997; Waterbor et al. 1995].

Das Risiko, an einem Prostatakarzinom zu erkranken, ist umso höher, je mehr Fälle in der eigenen Familie zu finden sind [Villers et al. 1997]. Entscheidend ist der Verwandtschaftsgrad: Sind Verwandte 1. Grades (Vater oder Bruder) erkrankt, ist das Risiko am höchsten [Steinberg et al. 1990]. Außerdem wird die Erkrankungswahrscheinlichkeit umso größer, je jünger der Angehörige bei Diagnosestellung war [Carter et al. 1992].

Eine schlechtere Prognose für ein familiär gehäuft auftretendes Prostatakarzinom konstatieren viele Arbeitsgruppen [Wilson et al. 1984, Kupelian et al. 1997]. Dieser Zusammenhang konnte allerdings in aktuelleren Studien nicht belegt werden [Bratt et al. 1998; Bauer et al. 1998].

1.1.6. Sexuelle Aktivität

Eine große epidemiologische Studie aus Australien und Neuseeland zeigte einen reziproken Zusammenhang der sexuellen Aktivität mit der Wahrscheinlichkeit, an einem Prostatakarzinom zu erkranken. [Giles et al. 2003]. Die Zusammenhänge zwischen Hormonen und der Libido sind nicht im Detail geklärt, jedoch wurden Hormonspiegeldifferenzen als möglicherweise für die unterschiedliche sexuelle Aktivität verantwortlich gemacht [Knussmann et al. 1986, Mantzoros et al. 1995].

1.2. Anatomie der Prostata

1.2.1. Makroskopische Anatomie

Die Prostata ist ein ca. 3 cm langes, 4 cm breites und 2 cm dickes, kompaktes Organ und wiegt bei ausgewachsenen jungen Männern etwa 20-30 g [Benninghoff 2002]. Jenseits des 40. Lebensjahres beginnt eine allmähliche Umstrukturierung der Prostata: Teile der Transitionalzone verdicken sich, die periphere Zone hingegen bildet sich eher zurück [Lippert 2000].

Die Prostata wird zum größten Teil von einer derben bindegewebigen Kapsel umgeben. Apikal und anterior sowie basal ist diese jedoch nicht bzw. unvollständig ausgebildet [McNeal 1980]. Fasern quergestreifter Muskulatur, ausgehend vom Diaphragma urogenitale, dehnen sich v. a. apikal und anterior zwischen peripheren Anteilen der Prostata Drüsen aus [Kost et al. 1964]. Seitlich wird die Prostata vom anterioren Blatt der lateralen periprostatistischen Faszie umgeben.

An Apex und Basis der Prostata, speziell in der Mittellinie sowie an den Samenblasen und an den Ductus ejaculatorii, besteht eine Kontinuität von fibromuskulären Fasern zur Denonvillier-Faszie [Villers et al. 1993].

An der Grenze zwischen lateraler und posteriorer Prostataoberfläche beinhaltet die laterale periprostatistische Faszie die paarigen neurovaskulären Bündel, die sich – in Längsrichtung der Prostata verlaufend – zu den Corpora cavernosa des Penis erstrecken [Walsh et al. 1983].

1.2.2. Anatomische Unterteilung

Die Prostata wird nach McNeal anatomisch in vier Zonen unterteilt (Abb. 1):

1. Zentrale Zone, dorsokranial gelegen, mit weitlumigen Drüsen und aufgelockertem Stroma,
2. Transitionszone (TZ) oder präprostatitisches Segment bzw. periurethrale Mantelzone, mediolateral der Urethra gelegen, mit englumigen Drüsen und straffem Stroma
3. Periphere Zone (PZ) mit lockerem Stroma und Drüsen wie in der Transitionalzone (sie umgibt die zentrale Zone).
4. Aglanduläre Stromazone

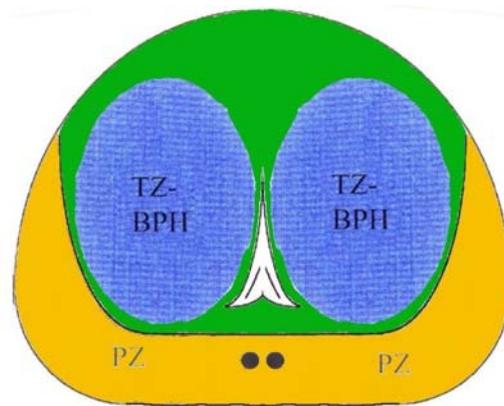


Abbildung 1: Zonale Unterteilung der Prostata im Querschnitt (modifiziert nach McNeal 1965); TZ-BPH (blau) = Transitionszone bei benigner Prostatahyperplasie, PZ (orange) = Periphere Zone

1.2.3. Histologie

Die ausgereifte Prostata ist aus 30-70 verzweigten tubuloalveolären Drüsen aufgebaut, die in ein Stroma aus Fibrozyten und glatten Muskelzellen eingebettet sind. Die Mündung der Drüsenausführungsgänge liegt vorwiegend in den Furchen lateral des Colliculus seminalis am Boden der distalen Urethra. Die Drüsen werden von einem zweischichtigen Epithel ausgekleidet, dessen innere Zylinderepithelschicht PSA (Prostata-spezifisches Antigen) und PAP (Prostata-spezifische saure Phosphatase) produziert. Insbesondere die Drüsen der zentralen Zone weisen physiologischerweise ausgeprägte papilläre und kribiforme Proliferationen auf. Eingestreut in das sekretorische Zylinderepithel finden sich zahlreiche multihormonale und zugleich PSA- und PAP-positive neuroendokrine Zellen [de Matteis 1992]. Auf der Basalmembran der Drüsen und vom Zylinderepithel bedeckt finden sich die

sekretorisch inaktiven sowie PSA- und PAP-negativen Zellen der Basalschicht [Warhol et al. 1985].

1.2.4. Immunhistochemische Verfahren

1.2.4.1. Allgemeines

Da die Basalzellen in Routinefärbungen oft nur schwer oder gar nicht erkennbar sind, ist ihre immunhistochemische selektive Darstellbarkeit mit einem Antikörper gegen hochmolekulares Zytokeratin von großer Bedeutung [Brawer et al. 1989, Hedrick et al. 1989, O'Malley et al. 1990]. Andere monoklonale Antikörper für immunhistochemische Färbungen wurden für das PSA, die Alpha-methylacyl CoA Racemase (AMACR) sowie CD24 entwickelt.

1.2.4.2. PSA in der Immunhistochemie

Im Rahmen der immunhistochemischen Diagnostik besitzt PSA ebenso wie hK2 einen hohen Stellenwert. Dabei wird die Färbung mithilfe einer Antigen-Antikörper-Reaktion herbeigeführt. Die Sensitivität und Spezifität dieses Verfahrens gilt zwar als hoch, allerdings bestehen insbesondere bei sehr kleinen Herden häufig Schwierigkeiten bei der Beurteilung (siehe 1.6.3.). Prinzipiell ist auch eine Immunhistochemie auch in Lymphknoten anwendbar. Der erhebliche Arbeitsaufwand steht jedoch in einem sehr ungünstigen Verhältnis zur niedrigen Prävalenz einer Lymphknotendissemination im Falle eines lokal begrenzten Pca. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, der Aufwand lohne sich nicht [Potter et al. 2000].

1.2.4.3. AMACR in der Immunhistochemie

Die feingewebliche Untersuchung des Prostatagewebes birgt erhebliche Schwierigkeiten. So ist der Nachweis der sog. Basalzellmembran von großer Wichtigkeit. Diese lässt sich jedoch mit konventionellen Färbemethoden oft nicht darstellen. Im Übrigen gibt es benigne Befunde *ohne* und maligne *mit* Basalzellen. PSA- und PAP-negative Zellen können sogar der immunhistologischen Detektion entgehen. Die Alpha-methylacyl CoA Racemase (AMACR) ist an der Konversion der R Stereoisomere gesättigter Fettsäuren zu S Stereoisomeren (Racemisation) beteiligt [Mobley et al. 2003]. Bekannte diätetische Risikofaktoren für ein Prostatakarzinom, welche mit einer Erhöhung des Enzyms in Prostatakrebszellen einhergehen, haben in jüngerer Zeit zur Entwicklung von AMACR-spezifischen Antikörpern geführt. Diese sind basalzellunabhängig und zeigen eine deutlich höhere Spezifität als bis dato existierende zytokeratinbasierte immunhistochemische Marker.

1.2.4.4. CD24 in der Immunhistochemie

Auf der Basis eines Genexpressionsprofils wurde jüngst ein Vergleich zwischen benignen Veränderungen, lokal begrenzten und lokal fortgeschrittenen Prostatakarzinomen durchgeführt und auf diese Weise eine Reihe von neuen molekularen Markern offengelegt, welche einen prognostischen Wert haben könnten [Sreekumar et al. 2001, Varambally et al. 2002, Kristiansen et al. 2005]. Eine dieser Untersuchungen führte zum Nachweis, dass CD24 ein signifikanter Prädiktor des PSA-Relapses sowie einer ungünstigen Prognose bei Prostatakrebs sei [Kristiansen et al. 2004]. CD24 ist ein kleines, stark glykosyliertes, mucinartiges Zelloberflächenprotein [Pirruccello et al. 1986]. Es wird einerseits in Granulozyten sowie in zahlreichen Vorläuferzellen wie Prä-B-Zellen, Keratinozyten und renalen Tubuluszellen exprimiert, andererseits aber auch bei verschiedensten Krebsarten [Fogel et al. 1999, Huang et al. 1995, Jackson et al. 1992, Senner et al. 1999, Choi et al. 2005, Liu et al. 2000, Karran et al. 2000, Raife et al. 1994, Droz et al. 1990, Figarella-Branger et al. 1993]. CD24 ist ein Ligand von P-Selektin, was die Dissemination von CD24-positiven Tumorzellen fördern könnte [Aigner et al. 1997].

1.2.5. Klassifikation der Prostatakarzinome

Bei 95 % der Prostatakarzinome handelt es sich um sogenannte gewöhnliche Tumoren, die aus dem drüsigen Teil der Prostata entstehen (sog. Adenokarzinome). Die übrigen 5% gehören zu den ungewöhnlichen Tumoren [Jocham/Miller 2004], die wichtigsten seien hier genannt:

- Muzinöses Adenokarzinom
- Adenozystisches Karzinom
- Basalzellkarzinom
- Neuroendokrin-differenziertes Adenokarzinom/Karzinoid
- Kleinzelliges Karzinom
- Undifferenziertes (weist an keiner Stelle eine Differenzierung im Sinne der genannten Karzinomtypen auf)
- Duktales Karzinom
- Übergangszellkarzinom
- Plattenepithelkarzinom

Die individuelle Häufigkeit dieser seltenen Tumore wurde von Helpap et al. dargestellt [Helpap et al. 1985].

1.2.6. Grading

Die im Vordergrund stehenden Adenokarzinome differieren stark in Struktur und Zytologie, was den Grad der Bösartigkeit des Tumors (Grading) bedingt. Um dies und die voneinander abweichenden biologischen Verhaltensweisen in Relation zu setzen, wurden verschiedene Klassifikationssysteme entwickelt. Drei histologische Gradingssysteme haben sich in der Praxis durchgesetzt:

1. Gleason – System [Gleason et al. 1974]
2. Grading nach WHO [Mostofi 1975]
3. Gradingssystem des Pathologischen - Urologischen Arbeitskreises [Helpap et al. 1985]. Tabelle 1 stellt die Unterschiede dieser Systeme dar.

Gleason Score:	Pathologisch-urologischer Arbeitskreis	Mostofi/WHO	Prognose:
2 Sehr gut differenziertes Adenokarzinom	G Ia	Grad 1	Günstig
3-4 Gut differenziertes Adenokarzinom	G Ib	Grad 1	Günstig
5-6 Mäßig differenziertes Adenokarzinom	G IIa	Grad 2	Günstig
7 Mäßig differenziertes Adenokarzinom	G IIb	Grad 3	Ungünstig
8-9 Schlecht differenziertes Adenokarzinom	G IIIa	Grad 3	Ungünstig
10 Undifferenziertes Adenokarzinom	G IIIb	Grad 3	Ungünstig

Tabelle 1: Unterschiede der üblichen pathologischen Klassifikationen des Pca.

1.2.7. Lokale Tumorausbreitung des Prostatakarzinoms

McNeal (1969) konnte durch Untersuchungen der Morphologie der Prostata zeigen, dass fast alle Adenokarzinome in den peripheren Drüsen der Prostata entstehen. Histogenetisch handelt es sich um Adenokarzinome des Epithels der tubuloalveolären Drüsen. Sie entstehen sehr häufig multifokal [Jewett, 1980].

Diese Verteilung wurde 2000 von Chen et al. erneut überprüft. Obwohl in den Jahrzehnten zwischen der ersten und dieser Veröffentlichung ein klinischer Stadienshift hin zu nicht tastbaren Tumoren stattfand, blieb die durchschnittliche Verteilung im Wesentlichen wie zuvor beschrieben [Chen 2000].

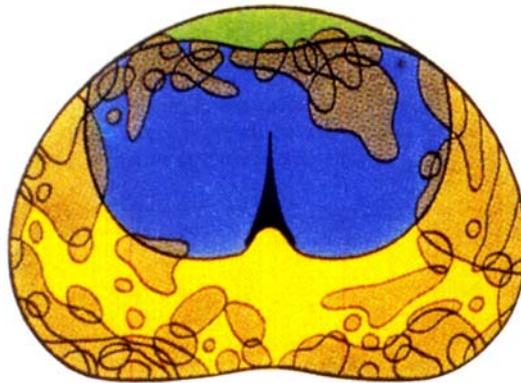


Abbildung 2: Typische Lokalisation des Pca in der Prostata, nach McNeal 1996

Die Ausbreitung des Karzinoms erfolgt zuerst in der äußeren und mittleren Organzone. Der periurethrale, innere Drüsenbereich wird erst gegen Ende der intraprostatistischen Ausbreitung infiltriert [Kastendieck, 1980]. Die Kapsel ist hingegen schon sehr früh betroffen (Byar et al., 1972; Franks, 1954), ein Kapseldurchbruch mit Infiltration des Rektums wird aber durch die Denonvillier-Faszie verzögert. Die Wahrscheinlichkeit einer Tumorausdehnung in Samenblasen, Blasenboden und regionäre Lymphknoten nimmt aber mit Penetration der Kapsel zu. Zudem bestimmt eine Tumorausdehnung außerhalb der Kapsel auch die Prognose, da ein Kapseldurchbruch erst im fortgeschrittenen Tumorstadium auftritt [Byar et al., 1972].

1.3. Metastasierung

Das Prostatakarzinom metastasiert sowohl lymphogen als auch hämatogen. Die hämatogene Metastasierung tritt im Allgemeinen später ein als die lymphogene. Dabei ist bevorzugt das Skelettsystem betroffen, aber auch Lunge und Leber, seltener andere Organsysteme [Saitoh, 1984].

1.4. Prognose des Prostatakarzinoms

Histologische Differenzierung und Grading sowie Tumorzvolumenbestimmung mit Stadienanalyse sind die wichtigsten prognostischen Faktoren.

Die Prognose hochdifferenzierter Karzinome mit kleinem Volumen bis maximal T2a ist gut.

Dies gilt vor allem auch für die inzidentellen Karzinome des Stadiums T1a.

Die Prognose der Gruppe der T2b- und T3-Karzinome mit günstigem Grading sowie ohne Samenblaseninfiltration und Lymphknotenmetastasen ist mit einer 10-Jahres-Überlebensrate von 60-70% gut (Low-risk-Gruppe), während die High-risk-Gruppe mit hochmalignen Karzinomen, Samenblaseninfiltrationen, Kapseldurchbruch und Metastasen 10-Jahres-Überlebensraten von nur 20-30% unabhängig von der eingeschlagenen Therapie aufweist [De Kernion et al. 1990].

1.5. Diagnostik des Prostatakarzinoms

Die Standarddiagnostik des Pca umfasst extrem zahlreiche Verfahren. Im Folgenden werden deshalb nur Methoden beschrieben, die für das Thema selbst relevant sind.

1.5.1. Körperliche Untersuchung

1.5.1.1. Digital rektale Untersuchung

Die DRU ist fester Bestandteil der klinischen Prostatakarzinomdiagnostik. Sie erfolgt in Steinschnittlage, Seitenlage oder beim vorgebeugten Patienten. Beurteilt werden können der Sphinktertonus, Hämorrhoidalveränderungen, Rektumampulle, sowie die Größe, Konsistenz, Abgrenzbarkeit und Druckschmerzhaftigkeit der Prostata. Als karzinomsuspekt gelten verhärtete, knotige Strukturen. Differentialdiagnostisch müssen jedoch gutartige Veränderungen wie granulomatöse Prostatitis, Prostatatuberkulose, Prostatasteine und andere seltene Prostatopathien abgegrenzt werden. Eine Prostatastanziopsie ist bei suspektem Tastbefund obligat.

Die klinische Stadieneinteilung im Falle eines durch die Biopsie bestätigten Pca erfolgt unter Anwendung der digital rektalen Untersuchung. Dabei wird dem TNM-Schlüssel des Stadiums ein „c“ vorangestellt (Tabelle 2).

Typisch für das Prostatakarzinom ist der holzharte Knoten oder im fortgeschrittenen Stadium die tumoröse Umwandlung des gesamten Organs.

Unauffälliger Tastbefund	=	cT1c
Suspekter Tastbefund	=	cT2
Einseitiger suspekter Tastbefund (weniger als die Hälfte des Lappens)	=	cT2a
Einseitiger suspekter Tastbefund (mehr als die Hälfte des Lappens)	=	cT2b
Suspekter Tastbefund auf beiden Seiten	=	cT2c

Tabelle 2: Einteilung der klinischen Klassifikation (DRU)

1.5.2. Bildgebung

1.5.2.1. Transrektaler Ultraschall

Der transrektale Ultraschall (TRUS) ist gut geeignet, die Prostatagröße zu bestimmen. Darüber hinaus können Biopsien der Prostata mithilfe des TRUS gezielter als nur digital rektal gesteuert appliziert werden. 1989 berichteten erstmals Lee et al. von der Ultraschallgesteuerten transrektalen Prostatabiopsie [Lee et al. 1989]. Heutzutage gilt die so durchgeführte Sextanten-Biopsie als Goldstandard in der invasiven Diagnostik des Prostatakarzinoms [Nakagawa et al. 1997, Imai et al. 1994, Ogawa et al. 1996, Hammerer et al. 1995, Wolff et al. 1997]. Die Vorhersagekraft des konventionellen transrektalen Ultraschalls bezüglich der Histologie ist jedoch umstritten. In einer Studie, in welcher 1800 Biopsie-Histologien mit dem jeweiligen Sonografiebefund korreliert wurden, konnten wir zeigen, dass der konventionelle transrektale Ultraschall allein keinerlei Vorhersage eines histologischen Befundes erlaubt [Schostak, 2002 a].

1.5.3. Labordiagnostik

1.5.3.1. PSA im Serum

Seit der Entdeckung des „Prostata-spezifischen Antigens“ (PSA) 1970 hat sich dieser Labormarker zunächst zum unverzichtbaren Standard entwickelt [Ablin 1970]. In den ersten Jahren schien PSA das pathologische Stadium, die Prognose und vieles mehr vorauszusagen [Stamey et al. 1987]. Das präoperative PSA ist unverzichtbarer Bestandteil der Abschätzung der klinischen und pathologischen Situation im Rahmen der sog. „Partin-Tables“ [Partin 1997 und 2001]. Dieser Serumwert weist eine extrem schlechte Spezifität insbesondere im sog. Graubereich, das heißt bei Serumwerten zwischen 4 und 10 ng/ml, auf. Bei Patienten mit unauffälliger digital rektaler Untersuchung führt dies sehr häufig zu –im Prinzip überflüssigen- Prostatabiopsien [Stamey 2004]. Diese Situation wird als PSA-Dilemma bezeichnet. Darüber hinaus zeigte sich zunächst in den USA, inzwischen auch in

Mitteleuropa, dass das präoperative PSA keineswegs mehr mit den pathologischen Stadien der Prostatektomiepräparate oder gar mit der Prognose korreliert.

1.5.4. Invasive Diagnostik

1.5.4.1. Prostata-Biopsie

Die sogenannte Sextanten-Biopsie gilt zwar noch immer als Goldstandard in der invasiven Diagnostik des Prostatakarzinoms [Wolff et al. 1997, Hammerer et al. 1995, Ogawa et al. 1996; Imai et al. 1994], allerdings konnten multiple Arbeitsgruppen zeigen, dass mehr Biopsien die Detektionsrate erhöhen. Chen et al. [Chen et al. 1997] untersuchten wie schon zuvor McNeal et al. [McNeal et al. 1992] Prostatapräparate nach radikaler Prostatektomie auf deren Durchsetzung mit Tumor. Die Digitalisierung der Großflächenpräparate erlaubte eine dreidimensionale Computerauswertung. Auf diese Weise entwickelte Chen ein virtuelles Biopsieschema mit insgesamt zehn Biopsien, welches in der Summation seiner pathologischen Präparate die höchste Detektionsrate erreichte. Wir konnten in einer klinischen Studie an 180 Patienten zeigen, dass dieses Schema in der Praxis die Detektionsrate um 9,8% zu steigern vermag [Schostak et al. 2005].

Das Verfahren ist schmerzhaft. Unterschiedlichste Verfahren der Anästhesie/Analgesie wurden deshalb in den letzten Jahren propagiert. In einer eigenen Studie verglichen wir drei dieser Methoden und die Untersuchung ohne Anästhesie randomisiert gegeneinander. Dabei zeigte sich, dass zwei transrektale Injektionen unter Verwendung einer sog. „Franzen-Nadel“ einerseits in sich am wenigsten schmerzhaft sind und andererseits den Schmerz der Biopsie in den allermeisten Fällen erträglich machen [Schostak et al. 2002b].

1.5.4.2. Lymphadenektomie

Die sog. pelvine Lymphadenektomie ist invasiver Standard im Falle einer radikalen Prostatektomie sowie bei höherem Risiko einer Lymphknotenmetastasierung bei Anwendung anderer Therapieformen wie z. B. der 3D-geplanten Radiotherapie. Dennoch ist die Spannbreite dessen, was darunter verstanden wird und bei welchen Patienten diese Methode anzuwenden ist, extrem groß. Die konventionelle Lymphadenektomie früherer Jahre umfasste lediglich die sog. Obturatorius-Lymphknotengruppe. Das heißt die Entfernung der Lymphknoten, welche sich zwischen der Vena iliaca externa ventral, der Beckenwand lateral, der Arteria iliaca interna cranial und dem Nervus obturatorius befinden. Die Abschätzung der Wahrscheinlichkeit einer Lymphknotenmetastasierung z. B. in den Partin-Tables beruht auf diesem eingeschränkten Operationsgebiet. Verschiedene Autoren konnten jedoch zeigen, dass

eine ausgedehntere Lymphadenektomie, die auch die Lymphknoten im Bereich der Arteria iliaca externa, der Arteria iliaca interna sowie der präsakralen Lymphknoten umfasste, nicht nur erheblich mehr Lymphknoten insgesamt, sondern v. a. deutlich mehr tumorbefallene Lymphknoten entfernen kann [Heidenreich et al. 2002, Bader et al. 2002, Clark et al. 2003, Schumacher et al. 2005]. Entgegen der früheren Einschätzung, dass im Falle einer Lymphknotenmetastasierung eine systemische Erkrankung vorliegt, die sich durch eine Operation nicht sanieren lässt, eröffneten diese Kollegen die Option, mit einer erweiterten Operation einen kurativen Effekt zu erzielen [Bader 2003].

1.6. Neue molekularbiologische Untersuchungen

1.6.1. PSA-Promoter-Polymorphismen

Das Kallikrein KLK3 als Prostataspezifisches Antigen (PSA) gilt als zentraler diagnostischer Parameter in Diagnose und Verlaufskontrolle des Tumors. Dieses Protein wird in normalem, hyperplastischem und malignem Prostatagewebe gebildet und dient der Verflüssigung des Samensekretes [Lilja 1985]. Weiterhin wird PSA in geringem Maße in der Brustdrüse, den Ovarien, der Leber, der Niere sowie den Nebennieren und den Parotisdrüsen gebildet [Levesque et al. 1995, Smith et al. 1995]. Die kodierenden Gene liegen auf dem menschlichen Chromosom 19q13.2 –13.4 [Riegmann et al. 1992]. Das PSA-Gen besteht aus fünf codierenden Exons und einer Promoter- sowie einer Enhancerregion, in der sich insgesamt drei androgenresponsible Elemente (ARE) befinden. Diese sind Bindungsorte des Androgenrezeptors (AR) und daher für die Steuerung der Expression des PSA unter Steroideinfluß mitverantwortlich. Es handelt sich um drei, je ca. 15 Basenpaare (BP) lange Segmente, welche auf der 5'-Seite des Expressionsstartpunktes liegen. ARE I liegt bei –156 bis –170 BP, ARE II liegt bei –380 bis –396 und ARE III liegt bei –4134 bis –4148 BP [Cleutjens et al. 1996 u. 1997, Schurr 1996]. Der Transkriptionsstart des PSA enthält die Startsequenz ATG (Abbildung 3).

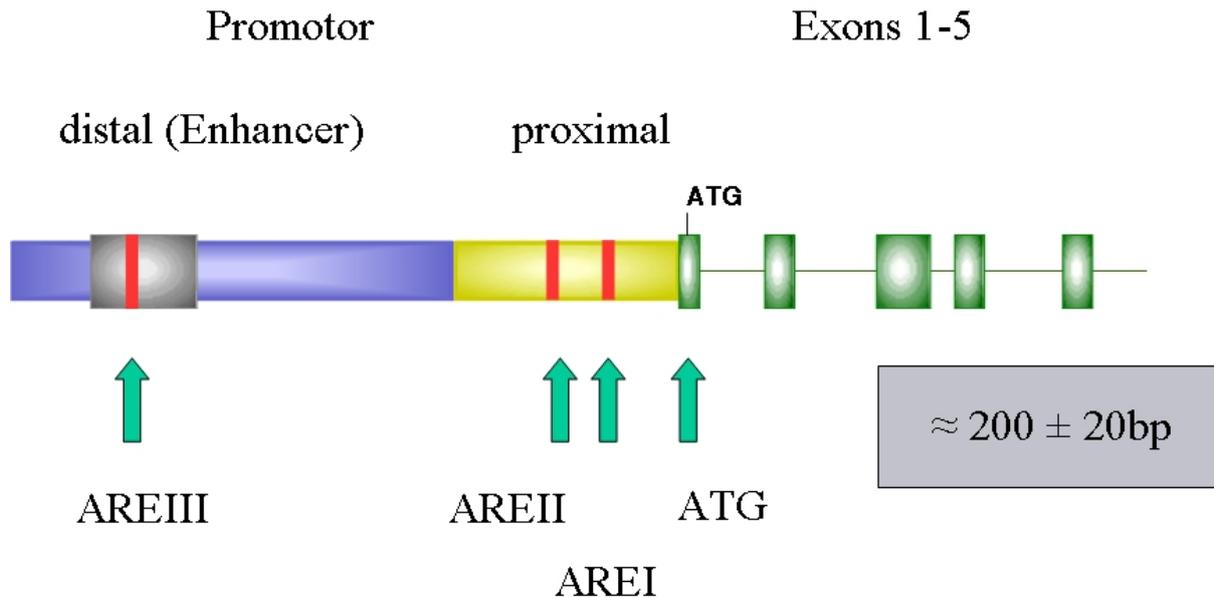


Abbildung 3: Konfiguration des PSA-Promotors. Rechtsseitig des Startcodons ATG liegen die Exons des PSA-Gens, linksseitig liegen die proximalen und distalen Promotoren (distal auch als Enhancerregion bezeichnet). Die grünen Pfeile stellen die Lage der im Verlauf analysierten Segmente (je ca. 200 Basenpaare) dar.

Vor einiger Zeit wurden in Japan sowohl bei Mamma-Karzinom-Patientinnen als auch bei Patienten mit Prostatakarzinom und jeweils entsprechenden Zelllinien Polymorphismen (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) in der Sequenz zwischen ARE I und ARE II beschrieben [Yang et al. 2000 u. 2001]. Weiterhin wurde in einer kanadischen Studie von Polymorphismen im Bereich von ARE I selbst berichtet [Majumdar 1999]. Veränderungen in der Promoterregion des PSA verursachen eine veränderte PSA-Expression und sind möglicherweise als diagnostischer Parameter insbesondere in der Frage der Prognose der vorliegenden Erkrankung hilfreich. So ist es noch immer unklar, welche molekularen Faktoren die Transition vom hormonsensitiven zum hormonrefraktären Prostatakarzinom beeinflussen bzw. bedingen. Die vorliegende Arbeit untersucht bei Patienten mit histologisch nachgewiesenem Prostatakarzinom sowie altersentsprechenden Kontrollpatienten, ob und an welchen Stellen Polymorphismen innerhalb der AREs und deren flankierenden Regionen bestehen. Zusätzlich wird der Startpunkt der PSA-Transkription selbst, welcher das ATG enthält, auf derartige Polymorphismen hin untersucht. Nach erfolgter Denaturierung eines PCR-Produktes führen Basenpaarungen innerhalb eines Einzelstranges zu einer dreidimensionalen Faltung und Schleifenbildung des Segments. Punktmutationen verändern diese Konfiguration bei annähernd gleicher PCR-Produktlänge. Dies bedingt eine Veränderung der Elektrophorese-Mobilität zwischen den Strängen des Wildtyps und den

mutierten Strängen. Mittels einer Analyse der Single-Strand-Conformational-Polymorphisms-Analyse (SSCP) gelingt es, diese morphologischen Unterschiede nachzuweisen. Die als auffällig detektierten Sequenzen wurden zunächst kloniert und dann enzymatisch sequenziert. Auf diese Weise können die Veränderungen der Sequenz dokumentiert werden. Die so festgestellten Polymorphismen wurden mit dem klinischen Stadium der Tumorerkrankung korreliert.

1.6.2. PSA mRNA in pelvinen Lymphknoten bei Pca-Patienten

Die zum Tode führenden Läsionen im Falle eines Prostatakarzinoms sind in den allermeisten Fällen Metastasen und nicht der Primärtumor. Liegt ein organbegrenzter Tumor vor, so ist auf der einen Seite die Wahrscheinlichkeit, durch eine radikale Prostatektomie eine langfristige Progressionsfreiheit zu erzielen, groß. Der Progress wird im Allgemeinen entweder durch einen Wiederanstieg des PSA aus dem Nullbereich oder durch einen klinischen Progress, z. B. das Auftreten von Fernmetastasen, definiert. Auf der anderen Seite haben Patienten mit lokal fortgeschrittenen Tumoren, z. B. in Form eines extraprostatatischen Wachstums oder einer Samenblaseninfiltration, ein höheres Risiko einer Progression [Beyer et al. 2003, Catalona et al. 1998, Cooperberg et al. 2005, Graefen et al. 1999, Hull et al. 2002, Moul et al. 2001, Rasiah et al. 2003]. Dies könnte durch eine bereits zum Zeitpunkt der Operation vorliegende Dissemination von Tumorzellen bedingt sein, welche der Diagnostik entgehen. Neben dem Knochenmark im Sinne einer hämatogenen Aussaat sind die pelvinen Lymphknoten besonders häufig betroffen. Die Bildgebung (z. B. Computertomografie, Kernspintomografie oder Positronen-Emissionstomografie) ist noch immer nicht geeignet, eine spezifische Aussage zu treffen. Insofern ist eine "Staging-Lymphadenektomie", d. h. stichprobenartige Entfernung pelviner Lymphknoten wie oben beschrieben, gut geeignet, eine prognostische Aussage zu dieser Frage zu treffen. Leider sind jedoch histologische und immunhistologische Verfahren v. a. im Falle von sog. Mikrometastasen in der Aussage und Detektionskraft sehr begrenzt. In Anbetracht der möglichen therapeutischen Konsequenzen, z. B. einer frühen adjuvanten Hormontherapie oder einer adjuvanten Radiatio, zeigt sich erneut, dass ein hoher Bedarf an neuen, hoch spezifischen Markern besteht, welche auch okkulte, jedoch klinisch relevante Metastasen detektieren.

Wir haben pelvine Lymphknoten bei Patienten, welche entweder eine radikale Prostatektomie oder eine laparoskopische Lymphadenektomie vor einer geplanten Radiatio erhielten, auf die Expression von PSA mRNA hin untersucht, um disseminierte Prostatazellen zu detektieren. Im Januar 2006 lag bei 81 % der Patienten ein Follow-Up vor. Im Rahmen unserer

Untersuchung gingen wir der Frage nach, ob und wie der Nachweis von PSA mRNA in pelvinen Lymphknoten den klinischen Verlauf im Zeitraum von sechs Jahren beeinflusst. Diese Ergebnisse sollen die Validität eines "Molekularen Lymphknotenstaging" als prognostischer Marker testen.

1.6.3. Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen neu entdeckte, molekulare Marker

1.6.3.1. Allgemeines

Ein grundsätzliches Problem immunhistochemischer Methoden ist die Subjektivität des Untersuchers bei der Beurteilung. Diese Verfahren sind nicht geeignet, quantitative Unterschiede zwischen benignem und malignem Gewebe aufzuweisen. Nur eine „Schwarz-Weiss“-Aussage im Sinne einer Spezifität von 100% könnte zu einer wirklich sicheren Diagnose führen. Keiner der bislang beschriebenen immunhistochemischen Marker für das Pca erreicht jedoch dieses Niveau.. Es lag deshalb nah, die Expression eben jener immunhistochemischer Marker bereits auf der Ebene der mRNA zu überprüfen. Das Resultat ist idealerweise reproduzierbar, quantitativ und vor allem objektiv.

Zwischen der experimentellen Entdeckung und der praktischen, kommerziellen Anwendung eines mRNA-Markers liegen viele Jahre. Seit Kurzem ist der erste mRNA-Marker für den Prostatakrebs kommerziell erhältlich: PCA3[®] im Exprimat-Urin [van Gils et al. 2007a und 2007b]. Vor allem wenn das Serum-PSA persistierend erhöht ist und Prostatabiopsien ohne Nachweis von Malignität bleiben, soll die relativ hohe PCA[®]3-Spezifität helfen, weitere überflüssige Biopsien zu vermeiden. Die erste Beschreibung dieses Markers liegt immerhin 8 Jahre zurück [Bussemakers 1999]. Daß es 2006 mit PCA3[®] erstmals gelungen ist, ein RT-PCR-Verfahren zur Marktreife zu bringen, dokumentiert, dass diese Technik nunmehr den Sprung von experimenteller Grundlagenforschung hin zur klinischen Anwendung geschafft hat. Deshalb haben wir im Rahmen unserer Untersuchungen einen besonderen Schwerpunkt auf RT-PCR-gestützte Techniken gelegt.

1.6.3.2. Auswahl der in hier verwandten neuen Marker

Unser Anliegen war es, Marker, welche anderweitig entweder im Rahmen von (Protein) - Arrays entdeckt worden waren und/oder bereits als immunhistochemische Antikörper etabliert sind, auf Ihre Eignung zur mRNA-Analyse hin zu überprüfen.

In Zweifelsfällen der Histologie oder bei besonders kleinen Befunden, z. B. in Stanzbiopsien, wäre die RT-PCR-Methode möglicherweise geeignet, die konventionelle Untersuchung zu ergänzen. Zeigt sich sogar im (Exprimat-)Urin ein Expressionsunterschied zwischen Patienten

mit benigner und maligner Erkrankung, so bedeutet dies die grundsätzliche Eignung der Methode zur nichtinvasiven Früherkennung. Unser Anliegen war es, in Zukunft auf diese Weise überflüssige Prostatabiopsien zu vermeiden.

Aus der Vielfalt der im letzten Jahrzehnt neu beschriebenen immunhistochemischen Marker haben sich zwei als besonders hoch spezifisch erwiesen: P504S bzw. Alpha-methylacyl CoA Racemase (AMACR) [Carswell et al. 2006, Vanguri et al. 2006] und CD24 [Kristiansen et al. 2004 u. 2005]. Deshalb wurden sie für die im Folgenden beschriebenen Untersuchungen ausgewählt.

Die PCA3[®]-mRNA-Analyse ist patentgeschützt, insofern konnte dieser, bereits kommerziell etablierte mRNA-Marker nicht in die eigenen Untersuchungen eingeschlossen werden.

Unterschiede der GSTP1-Promoter-Hypermethylierung in prostatistischem Gewebe, in Lymphknoten und Körperflüssigkeiten wurden von unserer Arbeitsgruppe und anderen Gruppen bereits im Vorfeld nachgewiesen. [Bastian et al. 2004, Goessl et al. 2000a, 2000b u. 2001, Kollermann et al. 2003]. Offen blieb allerdings die Frage des Einflusses einer Hormontherapie auf den Methylierungsstatus.

1.6.3.3. Alpha-methylacyl CoA Racemase (AMACR) mRNA in Prostatagewebe

AMACR ist wie in Absatz 1.2.4.3. beschrieben als immunhistochemischer Marker etabliert. Erste Berichte zeigten in einer quantitativen mRNA-Analyse eine Überexpression des korrespondierenden Genproduktes im Falle von Prostatakrebs gegenüber benignen Prostatazellen [Xu et al. 2000]. Unsere Untersuchungen zeigen die Möglichkeiten, Prostatakrebs unter Verwendung einer quantitativen fluoreszenzbasierten Real-time RT-PCR (LightCycler) zu detektieren. Unser Ziel war es dabei, einen objektiven molekularbiologischen Marker zu finden, welcher die konventionelle Histologie und die Immunhistologie in Zweifelsfällen ergänzen kann.

1.6.3.4. AMACR mRNA im Urin und in Prostatasekreten

Wir haben untersucht, ob AMACR-mRNA in den Urin oder in Prostatasekrete wie den sog. Exprimat-Urin sezerniert wird und ob sich dabei ebenfalls Unterschiede zwischen Patienten mit benigner und maligner Histologie zeigen. Derartige Marker wären eventuell geeignet, im Falle von erhöhten PSA-Werten weitere invasive Untersuchungen wie z. B. eine Biopsie die Prostata zunächst zu vermeiden.

1.6.3.5. CD24 mRNA in Prostatagewebe

Wir haben die CD24 mRNA-Expression mithilfe einer quantitativen fluoreszenzbasierten Real-time RT-PCR (LightCycler) als Alternative zu den vorherrschenden immunhistochemischen Färbungstechniken (monoklonale CD24-Antikörper) evaluiert. Unser Ziel war es dabei zu erforschen, ob die RT-PCR-basierte Detektion eine vergleichbare Sensitivität und Spezifität wie die erwähnten immunhistochemischen Verfahren erzielen kann. In diesem Fall könnte die quantitative CD24 mRNA-Analyse in Zweifelsfällen eine Ergänzung zu den subjektiven Untersuchungsmethoden des Pathologen darstellen.

1.6.3.6. CD24 mRNA im Urin und in Prostatasekreten

Das eigentliche Ziel unserer Untersuchungen war es, wie in 1.6.3.1. erwähnt, neue Marker zu entdecken, welche eine minimal invasive und hoch spezifische Detektion des Pca erlauben. Der Urin benetzt die prostatistische Harnröhre, darüber hinaus kann prostatistisches Sekret durch eine Prostatamassage gewonnen und analysiert werden. Urin und Exprimaturin wären daher ideale Träger für Marker. Die vorliegende Studie untersucht, ob CD24 in den Urin/Exprimaturin sezerniert wird und ob sich mithilfe der quantitativen RT-PCR wie oben beschrieben Unterschiede zwischen den Urinen/Exprimaten von Patienten mit benignen Erkrankungen und solchen mit einem Pca zeigen. Wäre dies der Fall, so könnte eine CD24-Urinprobe in Kombination mit einer digital rektalen Untersuchung möglicherweise weitere, invasivere und oft überflüssige Untersuchungen wie eine Biopsie vermeiden helfen.

1.6.7. Einfluss einer Hormonablation auf die Promoter Hypermethylierung des “Detoxifying Glutathione-S-Transferase P1 Gens” (*GSTP1*)

Der breite Einsatz des PSA hat in den letzten Jahrzehnten einen Stadien-Shift hin zu früheren Tumorstadien sowie eine Abnahme der Prostatakrebs-Mortalität bedingt [Bartsch et al. 2001]. Trotzdem zeigt ein erheblicher Anteil der Patienten nach vermeintlich kurativer radikaler Prostatektomie ungünstige Tumorcharakteristika (hoher Gleason Score, positive Absetzungsränder, nicht organbegrenzter Tumor), welche Indikatoren für ein hohes Tumorprogressionsrisiko darstellen [Han et al. 2001]. Jüngste Daten der EPC-Programm-Studiengruppe deuten darauf hin, dass sich eine frühe adjuvante Hormontherapie (AHT) bei diesen Patienten günstig auf das progressionsfreie Überleben auswirkt [Wirth et al. 2004]. Deshalb ist ein Anstieg des Anteils der Patienten, die eine frühere AHT erhalten, zu erwarten. Allerdings basiert diese Therapie vollständig auf statistischen Daten. Biomarker, die in der Lage sind, die tatsächliche Notwendigkeit für eine frühe AHT anzuzeigen und ein

Therapiemonitoring bei einem individuellen Patienten durchzuführen, sind dringend notwendig, um eine Übertherapie mit damit verbundenen Nebenwirkungen und Kosten zu vermeiden. Unglücklicherweise ist speziell das PSA als Standard-Prostatamarker in dieser Situation von extrem begrenzter Aussage. Weder ist PSA in der Lage, zuverlässig eine minimale Residualtumorlast anzuzeigen, noch ist es für das Therapiemonitoring geeignet, weil die Hormontherapie die PSA-Produktion supprimiert. Die Glutathione-S-Transferase-P1-CpG-Insel-Hypermethylation (GSTP1-HM) hat sich als vielversprechender neuer Marker für den Prostatakrebs (Pca) herausgestellt, dem man unterstellen kann, einige Nachteile des PSA zu umgehen. Die Promoter Hypermethylation des detoxifizierenden Glutathione-S-Transferase P1 Gens (*GSTP1*) ist die häufigste DNA-Alteration des primären Pca und wurde von unserer Arbeitsgruppe und anderen Gruppen bereits in prostatischem Gewebe, in Lymphknoten und Körperflüssigkeiten von Pca-Patienten nachgewiesen. [Bastian et al. 2004, Goessl et al. 2000a, 2000b u. 2001, Kollermann et al. 2003]. Trotzdem fehlen bislang Informationen über den Einfluss einer Hormontherapie auf die GSTP1-HM-Detektion. In einer Pilotstudie haben wir Tumorgewebe einer hochselektierten Patientenkohorte vor Beginn sowie nach einer neoadjuvanten Langzeithormontherapie auf das Vorhandensein einer GSTP1-HM unter Verwendung einer methylierungsspezifischen PCR (MSP) untersucht.

2. Patienten, Material und Methodik

2.1. Allgemeines

Die Probengewinnung im Rahmen der beschriebenen Studien erfolgte stets in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki. Für jede der beschriebenen Studien wurde ein Votum der Ethikkommission der Charité – Universitätsmedizin Berlin eingeholt. Alle Patienten haben vor dem Einschluss in die Studie eine Einverständniserklärung nach den Vorgaben des Komitees zur Einhaltung der Menschenrechte in der Forschung unterschrieben.

2.2. PSA-Promoter-Polymorphismen

2.2.1. Patienten

Männer mit histologisch nachgewiesenem Prostatakarzinom in unterschiedlichen klinischen Stadien sowie altersentsprechende Patienten ohne Prostataerkrankung wurden in die Studie eingeschlossen. Es handelte sich dabei in der Pca-Gruppe um Patienten, welche entweder eine Prostatabiopsie oder einen chirurgischen Eingriff (z. B. radikale Prostatektomie) erhielten, wie auch um Patienten, deren Diagnose auswärtig gesichert worden war. Die Kontrollgruppe setzte sich aus etwa altersgleichen Patienten mit anderen urologischen und internistischen Erkrankungen zusammen. Gemeinsam war allen, dass keinerlei Hinweise für das Vorliegen eines Pca bestand. Insbesondere in den Fällen ohne histologische Bestätigung der Benignität bestand weder ein suspekter digital-rektal Tastbefund noch ein erhöhtes PSA. Eine histologische Verifikation der Gutartigkeit lag bei Patienten vor, welche sich wegen Beschwerden einer operativen Desobstruktion unterzogen hatten und bei Patienten, die bei suspekten Befunden (s.o.) eine 10-fach-Prostatastanzbiopsie erhalten hatten. Nach Einholung des Einverständnisses wurden 5 ml EDTA-Blut über eine periphere Blutabnahme gewonnen. Daraus wurden Lymphozyten-Pellets mittels Lymphoprep (Nycomed Pharma AS) nach den Anweisungen des Herstellers gewonnen. Anschließend wurde die DNA mittels DNA-Prep (Qiagen) nach den Anweisungen des Herstellers extrahiert.

2.2.2. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Es wurden vier je ca. 200 BP lange Segmente ausgewählt, die zentral die AREs bzw. das Startcodon enthielten. Die Region, welche ARE III enthält, wird im Folgenden „A“ bezeichnet. Sie reicht von -4218 bis -4004. Die Region, welche ARE II enthält, wird im Folgenden „B“ bezeichnet. Sie reicht von -493 bis -291. Die Region, welche ARE I enthält, wird im Folgenden „C“ bezeichnet. Sie reicht von -285 bis -86. Die amplifizierte Region, welche das Startcodon enthält, wird in folgenden Text „D“ genannt, Sie reicht von -59 bis

+115 BP. Die Lage und Länge der Segmente sowie die verwendeten 5'- und 3'-Primer sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

	Länge	Lage	5'-Primer	3'-Primer
A	215	-4218 bis -4004	CTG CTC AGC CTT TGT CTC TG	TGT TTC AAG GAT GTT TGT AA
B	202	-493 bis -291	GGG TTG GGA GTG CAA GGA AA	CCG ATT CTT CAT ACA AAG CC
C	204	-285 bis -81	GTA CCC ACC CCC TGT TTC TG	AAG GCC CTC CCC ATG CTG CT
D	174	-59 bis +115	GGG CAG GGG CGG AGT CCT GG	TGC ATC CCC CCA ACC ATG GC

Tabelle 3: Primer der Gensequenzen, in welchen die Bereiche ARE I – III sowie ATG liegen.

Es wurde AmpliTaq[®]-Gold, sowie ein PCR-Gold-Buffer, MG-Cl-Lösung (25 mM) und ein dNTP-Mix (2,5 mM) der Firma Roche verwendet.

Die PCR wurde mit einem Perkin-Elmer 9600-Gerät durchgeführt. Zunächst wurde die optimale Annealing-Temperatur ermittelt. Hierzu wurden PCRs der Produkte A-D mit zwischen 55 und 65 Grad jeweils um ein Grad ansteigender Temperatur durchgeführt. Die Annealingtemperatur, welche die schärfste Bande bei fehlenden zusätzlichen Banden im Aggarose-Gel zeigte, wurde in den weiteren Versuchen verwendet.

Für die PCR der Segmente A und B wurde folgendes Schema verwendet:

Aktivierungszeit der AmpliTaq[®]-Gold bei 94 Grad: 10 Minuten. 35 Zyklen mit je 30 Sec. Denaturierung bei 94 Grad Celsius, 45 Sec. Annealing bei 55 Grad Celsius, 45 Sec. Synthese bei 72 Grad Celsius, 7 Minuten finale Extension bei 72 Grad Celsius.

Für die PCR der Segmente C und D wurde folgendes Schema verwendet:

Aktivierungszeit der AmpliTaq[®]-Gold[®]-Gold[®]-Gold bei 94 Grad: 10 Minuten. 35 Zyklen mit je 30 Sec. Denaturierung à 94 Grad Celsius, 45 Sec. Annealing bei 64 Grad Celsius, 45 Sec. Synthese bei 72 Grad Celsius, 7 Minuten final Extension bei 72 Grad Celsius.

Das Ergebnis jeder PCR wurde auf einem Aggarose-Gel überprüft. Als Positiv-Kontrolle diente ein PCR-Produkt mit LnCap-DNA, als Negativkontrolle ein PCR-Produkt mit Wasser statt DNA.

2.2.3. Single-Strand-Conformational-Polymorphisms (SSCP)

Die SSCP-Analyse wurde auf einem Acrylamid (10%) -Gel durchgeführt. Unmittelbar vor dem Auftragen der PCR-Produkte wurden die Proben bei 95 Grad Celsius 5 Minuten denaturiert und anschließend bis zum Auftragen in die Taschen des Gels sofort auf Eis gekühlt. Die Elektrophorese erfolgte über 17 Stunden bei Raumtemperatur (22 Grad Celsius) sowie in gleicher Weise bei 04 Grad Celsius. Die Färbung der Gele erfolgte mittels Silbernitratlösung. Das Ergebnis wurde digital dokumentiert.

Auf jedem Gel wurde neben den Proben von Patienten ein PCR-Produkt mit LnCap-DNA aufgetragen.

Im Regelfall, das heißt, sofern im überprüften Segment keine Polymorphismen vorliegen, zeigen sich im Gel zwei bis drei Banden, eine entspricht jedem Strang der DNS, die dritte entspricht ev. vorhandenen Primer-Resten. Zeigten sich andere Muster als Ausdruck veränderter Allele, wurden die Proben dieser Patienten als verdächtig gewertet, Polymorphismen zu enthalten. Diese Proben, aber auch ein Teil der unauffälligen Proben wurden anschließend zunächst kloniert und dann enzymatisch sequenziert. Abbildung 3 zeigt eine SSCP der PCR-Produkte aus der Region C, Abbildung 4 aus der Region B.

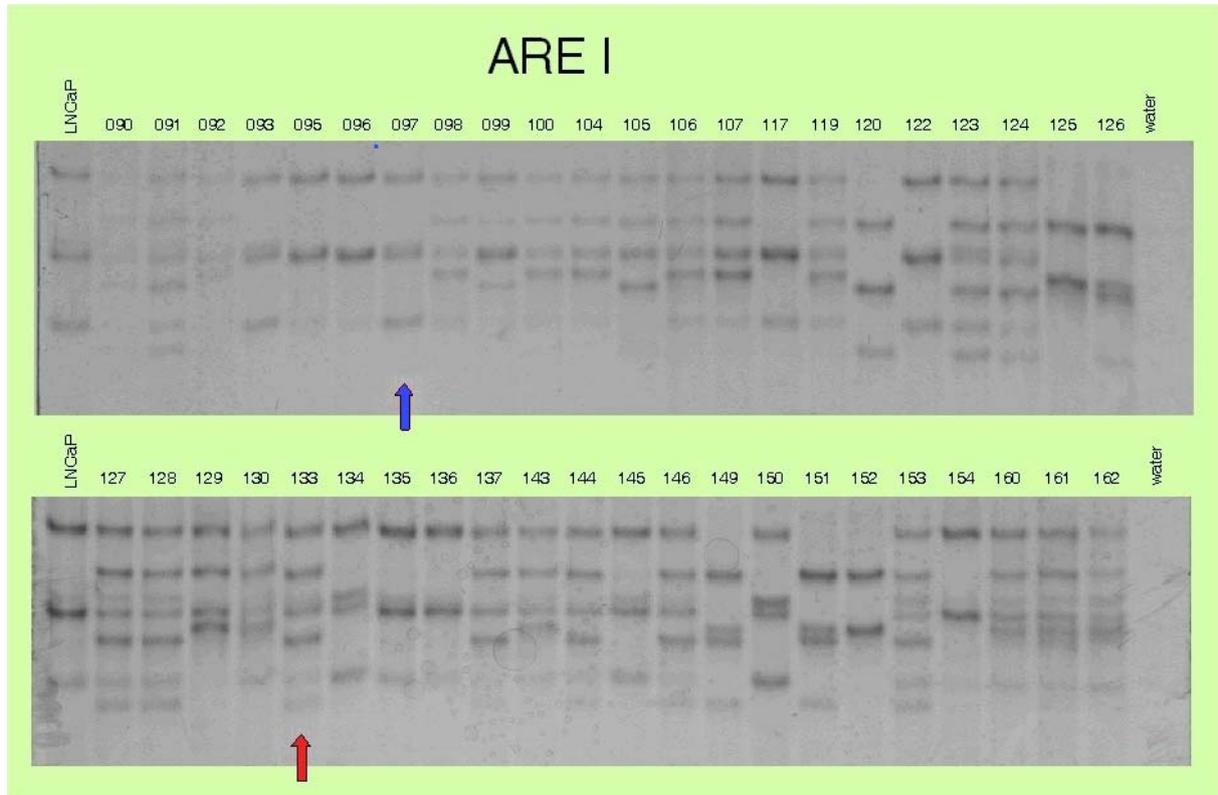


Abbildung 3: SSCP-Analyse der PCR-Produkte aus der Region C. Eine normale Konfiguration (ohne Polymorphismen) liegt zum Beispiel bei Patient 97 (blauer Pfeil) vor. Mehrere Polymorphismen bestehen bei Patient 133 (roter Pfeil).

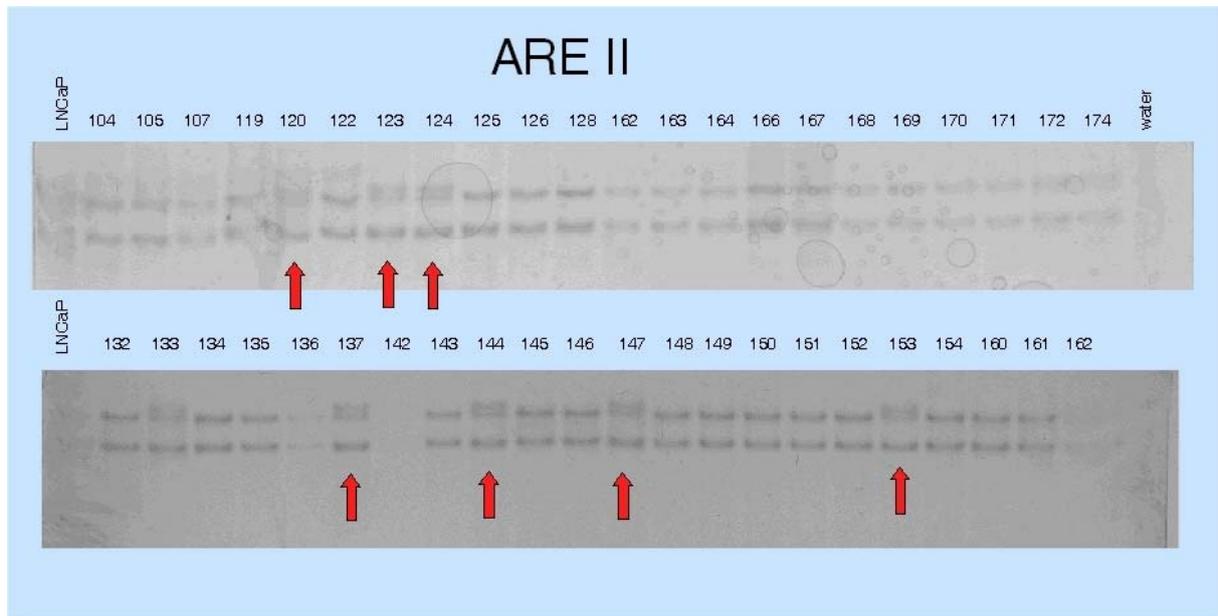


Abbildung 4: SSCP-Analyse der PCR-Produkte aus der Region B. Polymorphismen bestehen bei den mit roten Pfeilen markierten Patienten.

2.2.4. Klonierung

Verwendet wurde das Klonierungs-Set PCR[®] 2.1-TOPO (Invitrogen). Die Klonierung wurde nach Anweisung des Herstellers durchgeführt.

2.2.5. Sequenzierung

Die enzymatische Sequenzierung mit Laserdetektion erfolgte auf einem ABI 377-Gerät nach Anweisung und mit den Sets des Herstellers. Die Sequenzen der Klone wurden mit den publizierten Sequenzen der Promoter-Region sowie der Startsequenz (U 37672, AF 243527, AF 394907 und AC011523) mittels der Software Windows32 SeqMan 5.0 verglichen. Die festgestellten Abweichungen wurden dokumentiert. Abbildung 5 zeigt eine typische Sequenzanalyse.

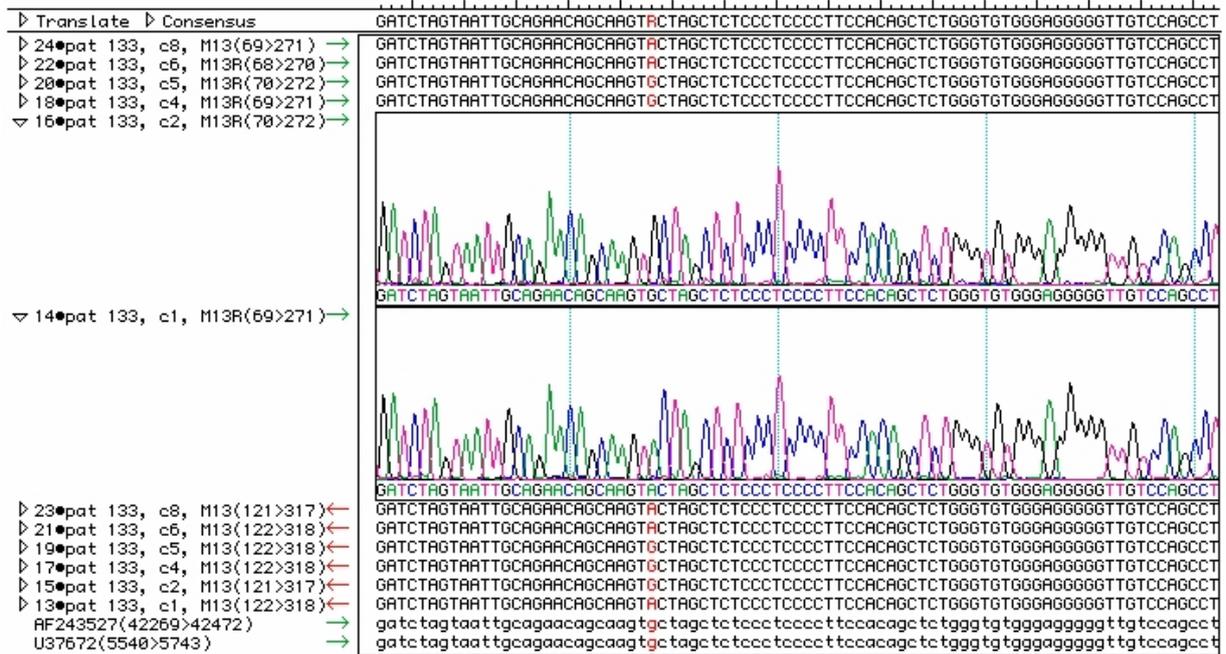


Abbildung 5: typisches Sequenzbild, welches nach Sequenzvergleich von 6 geklonten PCR-Fragmenten einen Polymorphismus bei nt-158 (Region C) aufzeigt. Die untersten Zeilen stellen die in der PubMed-Datenbank abgelegte Sequenz dar. Die in rot markierte Spalte zeigt, dass die geklonten PCR-Fragmente eine heterozygote Situation (AG statt GG) aufweisen.

2.2.6. Enzymatische Spaltung

Der bereits in anderen Veröffentlichungen beschriebene, besonders häufige Polymorphismus - 158 in der Region ARE I kann auch unter Verwendung eine Restriktionsanalyse mit den Enzymen NheI und Scal nachgewiesen werden. Sofern in den anderen Untersuchungen kein Anhalt für kombinierte Polymorphismen in unterschiedlichen Bereichen bestand, wurde diese Region mithilfe zweier Enzyme gespalten. Je nach Ergebnis der zwei Reaktionen kann so ermittelt werden, ob in diesem Bereich eine Homozygotie des Wildtyps, eine Heterozygotie oder eine Homozygotie der Mutation vorliegt. Abbildung 6 zeigt eine typische Restriktionsanalyse.

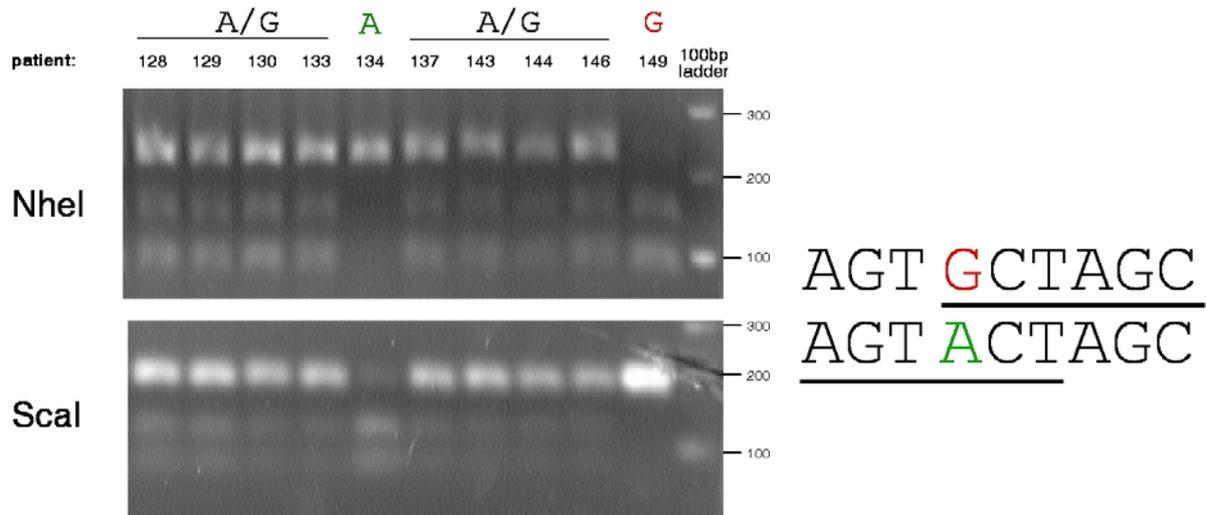


Abbildung 6: Der bei nt-158 liegende Polymorphismus kann auch über eine Restriktionsanalyse mit den Enzymen NheI und Scal nachgewiesen werden (heterozygote Proben in schwarz, homozygote farbig).

2.2.7. Korrelation mit dem Stadium des Patienten

Das individuelle Polymorphismenprofil eines Patienten wurde nun mit dem klinischen Stadium korreliert. Dabei wurden die Auffälligkeiten in der Gesamtzahl analysiert und zusätzlich im Bereich C (-158) vereinfacht dargestellt, ob es sich um eine homozygote oder heterozygote Konstellation handelte.

2.3. PSA mRNA in pelvinen Lymphknoten bei Pca-Patienten

2.3.1. Patienten

Verwendet wurde Gewebe aus Lymphknoten von Patienten mit Pca. Bei 53 Patienten erfolgte die Entnahme im Rahmen einer radikalen Prostatektomie, bei 17 Patienten war eine alleinige laparoskopische Staging-Lymphadenektomie im Rahmen der Planung einer 3D-Radiotherapie durchgeführt worden.

2.3.2. Follow-Up

Zum Zeitpunkt der Probenverarbeitung (2005) wurden Informationen über das aktuelle PSA und/oder einen klinischen Progress via Telefon eingeholt. Sofern bei den 53 Patienten, die eine radikale Prostatektomie erhalten hatten, postoperativ ein PSA im Null-Bereich erreicht war, wurden zwei aufeinanderfolgende PSA-Werte über 0,02 ng/ml oder ein klinischer Progress (wie z. B. das Auftreten von Metastasen) als Progress der Erkrankung gewertet. In den anderen Fällen sowie, wenn eine alleinige pelvine Lymphadenektomie durchgeführt worden war, wurde entweder ein klinischer Progress oder ein PSA-Anstieg entsprechend den ASTRO-Kriterien [Consensus Statement ASTRO 1997] als Progress gewertet.

2.3.3. Proben

Die chirurgisch gewonnenen pelvinen Lymphknoten wurden unmittelbar nach der Exzision auf Eis gelegt. Jeder manuell tastbare Lymphknoten wurde nun in zwei gleiche Hälften geschnitten, von denen die erste der pathologischen Routineuntersuchung zugeführt wurde und die zweite sofort bei -80 Grad Celsius bis zur RNA-Extraktion im Jahr 2005 gelagert wurde.

2.3.4. RNA Extraktion

Die Gesamt-RNA wurde mithilfe der RNAzolB™ Methode entsprechend den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Zuvor wurde das Gewebe durch den UltraTurrax T8 Homogenisierer aufgetrennt. Die RNA-Konzentration und Qualität (28S/18S) wurde nach einer Kapillarelektrophorese mithilfe der RNA Nano LabChip® Technologie überprüft. Dabei wurde ein „AGILENT Bioanalyzer 2100 Instrument“ (Agilent GmbH, Waldbronn, Germany) eingesetzt. Während der sechsjährigen Aufbewahrungszeit der Proben kam es nur in einem Fall zur RNA-Degradation (Abbildung 7).

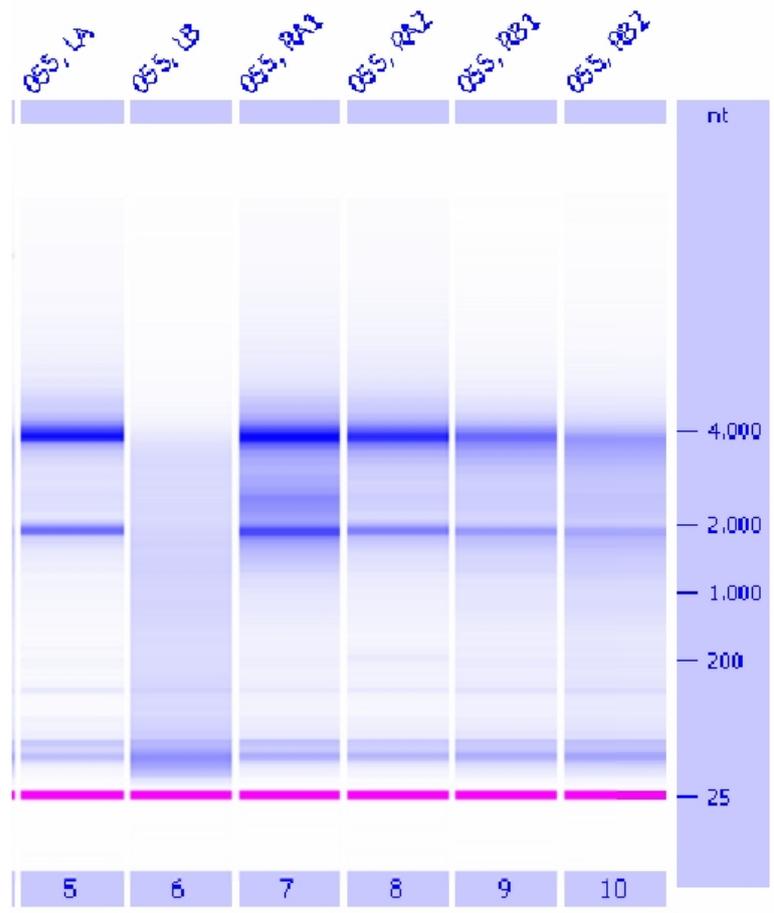


Abbildung 7: RNA-Qualitätskontrolle nach sechs Jahren Lagerzeit. Spalte 6 zeigt degradierte RNA, bei den anderen Patienten ist die Qualität ausreichend.

2.3.5. cDNA Synthese und quantitative RT-PCR

Die RT-PCR wurde mithilfe des „LightCycler[®]“ (Roche Diagnostics) durchgeführt. Dabei wurden PSA-spezifische Primer sowie Porphobilinogen Deaminase (PBGD) als Kontroll-Gen verwendet. 250 Nanogramm Gesamt-RNA wurden in einer Einschnitt-RT-PCR analysiert und zur Fluoreszenzmarkierung hybridisiert. Diese Hybridisierung wird zur Detektion benötigt (Abbildung 8).

Als PSA-Primer wurden in der einen Richtung 5'-GAGGAGTTCTTGACCCCAA-3' und in der Gegenrichtung 5'-CAGAATCACCCGAGC-AGGT-3' verwendet. Die für das 154 bp lange PSA-Gen spezifischen Hybridisierungsprimer waren CTTGCGCACACACGTCA-TTGGAA-FL (FL probe) sowie 5'-TAACATGGAG-GTCCACACACTGAA-PH-3'(LC Red640-probe). Für die Einschnitt-RT-PCR wurden zunächst 250ng RNA für 10 Min. bei 55° revers in cDNA transkribiert und später über 45 Zyklen amplifiziert (1 Sec. bei 95°C, 15 Sec. bei 66°C, 20 Sec. bei 72°C).

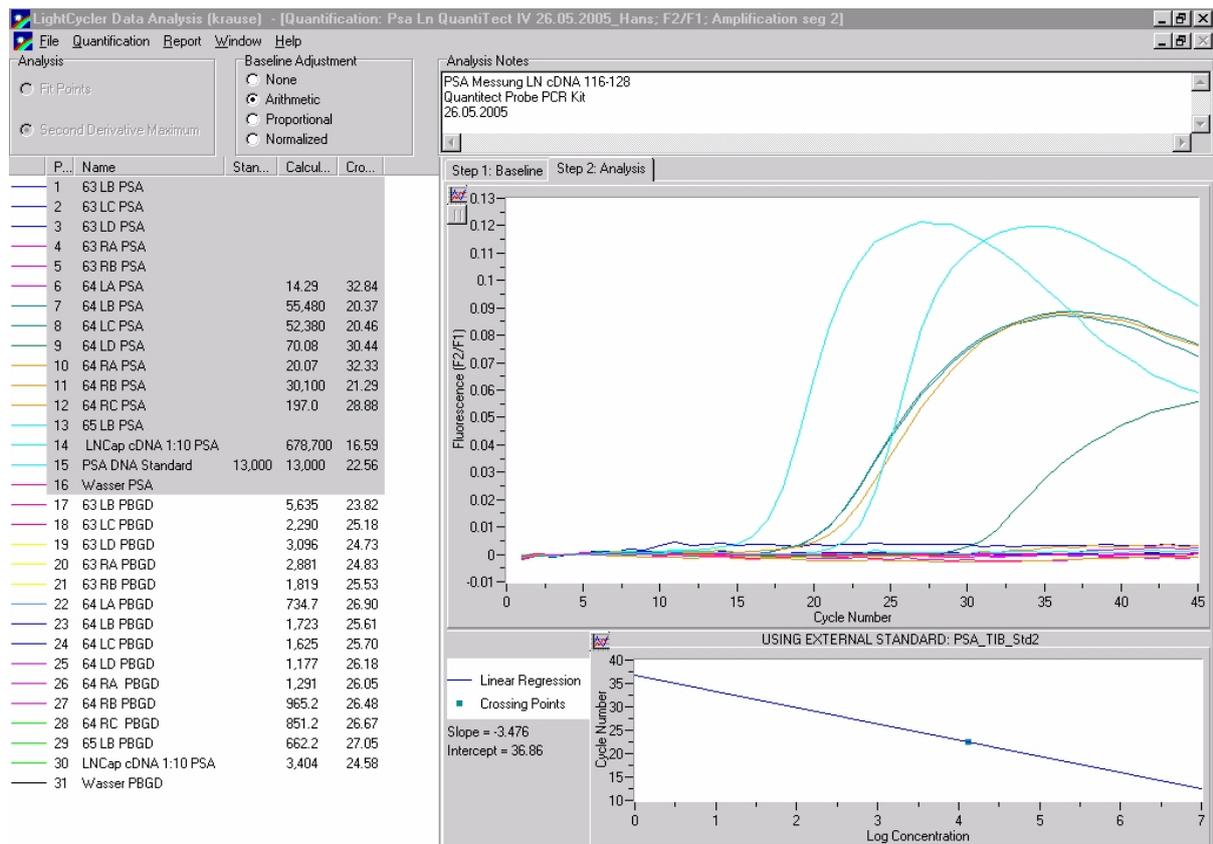


Abbildung 8: typischer LightCycler-Lauf. Dargestellt ist die quantitative PSA mRNA-Analyse. In der linken Hälfte sind die absoluten PSA- und PBGD-Werte aufgelistet, rechts ist der Replikationsverlauf grafisch dargestellt.

2.3.6. Auswertung

Die LightCycler Software in der Version 3.3 wurde verwendet, um die PCR-Kinetik zu analysieren und die quantitativen Daten zu errechnen. Eine in einem separaten Lauf generierte Standard-Kurve wurde in die Patienten-Läufe (ohne Standard-Kurven) geladen. Jeder Lauf enthielt eine Probe einer bekannten Konzentration im Bereich der Standard-Kurve. Die exakte Zahl der Kopien wurde nun mithilfe der Methode der zweiten Standardabweichung ermittelt. Bei jeder einzelnen Probe wurde die Zahl der PSA-mRNA-Kopien durch die der PBGD-mRNA-Kopien geteilt um die PSA-mRNA-Analyse zu normalisieren und damit Unterschiede zwischen den Proben, welche durch verschiedene RNA-Konzentrationen bedingt sind, zu egalisieren.

2.3.7. Statistische Analyse

Die Daten wurden unter Verwendung der Software Microsoft® Excel XP® erfasst und berechnet. Die Statistik war dabei rein deskriptiv.

2.4. Alpha-methylacyl CoA Racemase (AMACR)

2.4.1. Patienten

Das Gewebe für die Studie wurde bei 55 Patienten mit benigner Vergrößerung der Prostata (BPH) durch eine transurethrale Resektion (TUR-P) gewonnen. Bei 57 Patienten lag ein Pca vor. In 50 dieser Fälle wurde das Gewebe durch eine radikale Prostatektomie, in sieben der Fälle durch palliative TUR-P gewonnen.

2.4.2. Proben

In allen Fällen wurde das Gewebe sofort nach der Exzision in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei -80 Grad bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt. Dann wurden zehn 30µm dicke Gefrierschnitte von jeder Gewebeprobe mithilfe des „Cryostat 2800“ (Leica Instruments GmbH, Nussloch, Germany) angefertigt und mit Hematoxylin-Eosin (HE) gefärbt. Die Proben wurden durch einen Urologen in der fortgeschrittenen Weiterbildung zum Pathologen (Jens Köllermann) mikroskopisch untersucht. Nur Proben, welche mindestens 50% Tumor enthielten, wurden für die weitere mRNA-Analyse verwendet.

2.4.3. Follow-Up

Zum Zeitpunkt der Probenverarbeitung wurden Informationen über das aktuelle PSA und/oder einen klinischen Progress via Telefon eingeholt. Sofern bei den 50 Patienten, die eine radikale Prostatektomie erhalten hatten, postoperativ ein PSA im Null-Bereich erreicht war, wurden zwei aufeinanderfolgende PSA-Werte über 0,02 ng/ml oder ein klinischer Progress (wie z. B. das Auftreten von Metastasen) als Progress der Erkrankung gewertet. In den sieben Fällen mit palliativer TUR-P wurde entweder ein klinischer Progress oder ein PSA-Anstieg entsprechend den ASTRO-Kriterien [Consensus Statement ASTRO 1997] als Progress gewertet.

2.4.4. RNA Extraktion

Die RNA wurde mithilfe des „EZ1 BioRobot™“ (QIAGEN, Hilden, Germany) entsprechend den Anweisungen des Herstellers extrahiert. Zuvor wurde das Gewebe durch den UltraTurrax T8 Homogenisierer aufgetrennt. Die RNA-Konzentration und Qualität (28S/18S) wurde nach einer Kapillarelektrophorese mithilfe der RNA Nano LabChip® Technologie überprüft. Dabei wurde ein AGILENT-Bioanalyser 2100 Instrument (Agilent GmbH, Waldbronn, Germany) eingesetzt.

2.4.5. Quantitative RT-PCR

Die RT-PCR wurde mithilfe des LightCycler-Instruments (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) durchgeführt. Dabei wurden AMACR-spezifische Primer sowie Porphobilinogen Deaminase (PBGD) als Kontroll-Gen verwendet.

Als AMACR Primer wurden in der einen Richtung 5'-TGGCTTTGTCAGGTGTTC-3' und in der Gegenrichtung 5'-TATGCTGTTCCTTCCACCATAT -3' verwendet. Die für das AMACR-Gen spezifischen Hybridisierungsprimer waren CCCAGTGCACACATAAGGCC-FL (FL Probe) sowie CCACCAGCAAAGTCAGCCAC-PH (LC Red640-Probe).

Für die Einschnitt-RT-PCR wurden zunächst 250ng RNA für 10 Min. bei 55° revers in cDNA transkribiert und später über 45 Zyklen amplifiziert (1 Sec. bei 95°C, 15 Sec. bei 60°C, 20 Sec. bei 72°C).

Für die Amplifikation des Housekeeping Gens wurde das Porphobilinogen-Deaminase (PBGD) Housekeeping-Gen-Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) verwendet. Für die Amplifikation des Zielgens AMACR das RT-PCR-RNA-Amplifikationskit sowie AMACR-spezifische Primer (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland).

2.4.6. Auswertung

Die LightCycler Software in der Version 3.3 wurde verwendet, um die PCR-Kinetik zu analysieren und die quantitativen Daten zu errechnen. Eine in einem separaten Lauf generierte Standard-Kurve wurde in die Patienten-Läufe (ohne Standard-Kurven) geladen. Jeder Lauf enthielt eine Probe einer bekannten Konzentration im Bereich der Standard-Kurve. Die exakte Zahl der Kopien wurde nun mithilfe der Methode der zweiten Standardabweichung ermittelt. Bei jeder einzelnen Probe wurde die Zahl der AMACR-mRNA-Kopien durch die der PBGD-mRNA-Kopien geteilt um die AMACR-mRNA-Analyse zu normalisieren und damit Unterschiede zwischen den Proben, welche durch verschiedene RNA-Konzentrationen bedingt sind, zu egalisieren.

2.4.7. Statistik

Die Daten wurden mithilfe der Software Microsoft® Excel® XP erfasst und mit SPSS® for Windows® in der Version 13.0.1 ausgewertet. Die Normalverteilung der Proben und Unterschiede wurde überprüft. Im Falle einer Normalverteilung wurde der Students t-Test angewandt. Ansonsten wurde der Wilcoxon-Test verwandt. Ein Ergebnis mit einer zweiseitigen Irrtumswahrscheinlichkeit von unter 5% ($p < 0,05$) wurde als signifikant gewertet.

Die Ergebnisse wurden als ROC-Kurve grafisch aufgetragen, um zu analysieren, in wie weit die AMACR-mRNA-Expression Krebs von benignen Befunden unterscheiden kann. Eine Fläche unter der Kurve (AUC) wurde errechnet (von 0,0 bis 1,0). Mithilfe einer Koordinatentabelle wurde nun ein möglichst günstiger Schnittpunkt aus Sensitivität (Ordinate) und Spezifität (Abszisse) gewählt. Dies ist der Cutt-Off-Wert.

2.5. AMACR im Urin und in Prostatasekreten

2.5.1. Patienten

In die Studie eingeschlossen wurden Patienten, bei denen am Folgetag ein chirurgischer Eingriff wegen einer Prostataerkrankung geplant war. Das bei dieser Operation gewonnene Prostatagewebe wurde in weiterer Folge zur Validierung des Urintests verwandt.

2.5.2. Exprimaturin und Morgenurin

Vor jeder weiteren diagnostischen oder therapeutischen Maßnahme wurde eine digital-rektale Massage der Prostata über 20 Sekunden durchgeführt und der Patient gebeten, unmittelbar anschließend den Erststrahl des Urins in ein steriles Gefäß zu miktionieren. Dies wird als Exprimaturin bezeichnet. Weiterhin wurde er gebeten, die erste Urinportion des ersten Morgenurins in gleicher Weise zu asservieren (Morgenurin). Die weitere Verarbeitung der Proben erfolgte in allen Fällen innerhalb 30 Minuten. Bis dahin wurden die Proben im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt. Das bei der Zentrifugation entstandene Zellpellet wurde mit phosphatgepufferter Salzlösung gewaschen (PBS) und anschließend entsprechend den Anweisungen des Herstellers über Nacht mit RNAlater® (Ambion Inc. Austin, TX, USA) inkubiert. Schließlich wurde es bei – 20° C bis zur RNA-Extraktion gelagert.

2.5.3. RNA Extraktion

Die RNA-Extraktion erfolgte exakt wie im Kapitel 2.4.4. beschrieben.

2.5.4. RT-PCR

Die RT-PCR erfolgte exakt wie im Kapitel 2.4.5. beschrieben. Allerdings kam der hochsensible Picochip des LightCyclers zum Einsatz.

2.5.5. Auswertung

Die Auswertung der LightCycler-Ergebnisse erfolgte exakt wie im Kapitel 2.4.6. beschrieben.

2.5.6. Statistik

Die Dokumentation der Daten und statistische Auswertung erfolgte exakt wie im Kapitel 2.4.7. beschrieben.

2.6. CD24 mRNA in Prostatagewebe

2.6.1. Patienten

Das Gewebe für die Studie wurde bei 55 Patienten mit benigner Vergrößerung der Prostata (BPH) durch eine transurethrale Resektion (TUR-P) gewonnen. Bei 59 Patienten lag ein Pca vor. In 51 dieser Fälle wurde das Gewebe durch eine radikale Prostatektomie, in acht der Fälle durch palliative TUR-P gewonnen.

2.6.2. Proben

In allen Fällen wurde das Gewebe sofort nach der Exzision in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei -80 Grad bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt. Dann wurden zehn 30 µm dicke Gefrierschnitte von jeder Gewebeprobe mithilfe des Cryostat 2800 (Leica Instruments GmbH, Nussloch, Germany) angefertigt und mit Hematoxylin-Eosin (HE) gefärbt. Die Proben wurden durch einen Urologen in der fortgeschrittenen Weiterbildung zum Pathologen (Jens Köllermann) mikroskopisch untersucht.

Die untersuchten Blöcke wurden in zwei Gruppen eingeteilt:

A: 0 - 50 % maligne Zellen, B: mehr als 50% maligne Zellen

Nur Proben, welche mindestens 50% Tumor enthielten, wurden für die weitere mRNA-Analyse verwendet.

2.6.3. Follow-Up

Zum Zeitpunkt der Probenverarbeitung (2005) wurden Informationen über das aktuelle PSA und/oder einen klinischen Progress via Telefon eingeholt. Sofern bei den 51 Patienten, die eine radikale Prostatektomie erhalten hatten, postoperativ ein PSA im Null-Bereich erreicht war, wurden zwei aufeinanderfolgende PSA-Werte über 0,02 ng/ml oder ein klinischer Progress (wie z. B. das Auftreten von Metastasen) als Progress der Erkrankung gewertet. In den acht Fällen mit palliativer TUR-P wurde entweder ein klinischer Progress oder ein PSA-Anstieg entsprechend den ASTRO-Kriterien [Consensus Statement ASTRO 1997] als Progress gewertet.

2.6.4. RNA Extraktion

Die RNA wurde mithilfe des EZ1 BioRobotTM (QIAGEN, Hilden, Germany) entsprechend den Anweisungen des Herstellers extrahiert. Zuvor wurde das Gewebe durch den UltraTurrax T8 Homogenisierer aufgetrennt. Die RNA-Konzentration und Qualität (28S/18S) wurde nach einer Kapillarelektrophorese mithilfe der RNA Nano LabChip[®] Technologie überprüft. Dabei wurde ein AGILENT-Bioanalyser 2100 Instrument (Agilent GmbH, Waldbronn, Germany) eingesetzt.

2.6.5. Quantitative RT-PCR

Die RT-PCR wurde mithilfe des LightCycler-Instruments (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) durchgeführt. Dabei wurden CD24-spezifische Primer sowie Porphobilinogen Deaminase (PBGD) als Kontroll-Gen verwendet.

Die Primer für CD24 waren 5'-TGAAGAACATGTGAGAGGTTTGAC -3' (Orthograd) und 5'-GAAAACTGAATCTCCATTCCACAA -3' (Gegenrichtung). Die für das CD24-Gen spezifischen Hybridisierungsprimer waren GGATGTTGCCTCTCCTTCATCTTGTACA-TGFL (FL probe) und 5'-AACTCCAGCAGATTTAATATTGGCATTTCATCA-PH-3' (LC Red640-probe).

Für die Einschnitt-RT-PCR wurden zunächst 250 ng RNA für 10 Min. bei 55° revers in cDNA transkribiert und später über 45 Zyklen amplifiziert (1 Sec. bei 95°C, 15 Sec. bei 58°C, 20 Sec. bei 72°C).

Für die Amplifikation des Housekeeping Gens wurde das Porphobilinogen-Deaminase (PBGD) Housekeeping-Gen-Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) verwendet. Für die Amplifikation des Zielgens CD24 das RT-PCR-RNA-Amplifikationskit sowie CD24-spezifische Primer (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland).

2.6.6. Auswertung

Die LightCycler Software in der Version 3.3 wurde verwendet, um die PCR-Kinetik zu analysieren und die quantitativen Daten zu errechnen. Eine in einem separaten Lauf generierte Standard-Kurve wurde in die Patienten-Läufe (ohne Standard-Kurven) geladen. Jeder Lauf enthielt eine Probe einer bekannten Konzentration im Bereich der Standard-Kurve. Die exakte Zahl der Kopien wurde nun mithilfe der Methode der zweiten Standardabweichung ermittelt. Bei jeder einzelnen Probe wurde die Zahl der CD24-mRNA-Kopien durch die der PBGD-mRNA-Kopien geteilt um die CD24-mRNA-Analyse zu normalisieren und damit

Unterschiede zwischen den Proben, welche durch verschiedene RNA-Konzentrationen bedingt sind, zu egalisieren.

2.6.7. Statistik

Die Daten wurden mithilfe der Software Microsoft[®] Excel[®] XP erfasst und mit SPSS[®] for Windows[®] in der Version 13.0.1 ausgewertet. Statistische Tests sowie grafische Auswertungen wurden wie im Kapitel 2.4.7. beschrieben durchgeführt.

2.7. CD24 mRNA im Urin und in Prostatasekreten

2.7.1. Patienten

In die Studie eingeschlossen wurden Patienten, bei denen am Folgetag ein chirurgischer Eingriff wegen einer Prostataerkrankung geplant war. Das bei dieser Operation gewonnene Prostatagewebe wurde in weiterer Folge zur Validierung des Urintests verwandt.

2.7.2. Exprimaturin und Morgenurin

Vor jeder weiteren diagnostischen oder therapeutischen Maßnahme wurde eine digital-rektale Massage der Prostata über 20 Sekunden durchgeführt und der Patient gebeten, unmittelbar anschließend den Erststrahl des Urins in ein steriles Gefäß zu miktionieren. Dies wird als Exprimaturin bezeichnet. Weiterhin wurde er gebeten, die erste Urinportion des ersten Morgenurins in gleicher Weise zu asservieren (Morgenurin). Die weitere Verarbeitung der Proben erfolgte in allen Fällen innerhalb 30 Minuten. Bis dahin wurden die Proben im Kühlschrank bei 4° C aufbewahrt. Das bei der Zentrifugation entstandene Zellpellet wurde mit phosphatgepufferter Salzlösung gewaschen (PBS) und anschließend entsprechend den Anweisungen des Herstellers über Nacht mit RNAlater[®] (Ambion Inc. Austin, TX, USA) inkubiert. Schließlich wurde es bei – 20° C bis zur RNA-Extraktion gelagert.

2.7.3. RNA Extraktion

Die RNA-Extraktion erfolgte exakt wie im Kapitel 2.4.4. beschrieben.

2.7.4. Quantitative RT-PCR

Die RT-PCR erfolgte identisch wie in Absatz 2.6.5. beschrieben, allerdings kam der ultrasensible Picochip des LightCycler-Systems zum Einsatz.

2.7.5. Auswertung

Die Auswertung der LightCycler-Ergebnisse erfolgte exakt wie im Absatz 2.6.6. beschrieben.

2.7.6. Statistik

Die Daten wurden mithilfe der Software Microsoft[®] Excel[®] XP erfasst und mit SPSS[®] for Windows[®] in der Version 13.0.1 ausgewertet. Statistische Tests sowie grafische Auswertungen wurden wie im Kapitel 2.4.7. beschrieben durchgeführt.

2.8. Einfluss einer Hormonablation auf die Promoter Hypermethylierung des “Detoxifying Glutathione-S-Transferase P1 Gens” (*GSTP1*)

2.8.1. Patienten

Repräsentative, paraffineingebettete Tumorproben aus 15 Präparaten nach radikaler Prostatektomie, welche einen Karzinomanteil von wenigstens 50 % aufwiesen, wurden unter Verwendung einer methylierungsspezifischen PCR (MSP) untersucht. Alle Patienten hatten zuvor eine vollständige Androgendeprivation erhalten, bis der PSA-Nadir erreicht worden war (im Mittel 8 Monate).

Bei acht der Patienten lagen paraffineingebettete Prostatabiopsien vor, welche vor Beginn der Hormontherapie (HAT) entnommen worden waren. Diese wurden ebenfalls mittels MSP untersucht. In den übrigen Fällen konnte kein Material aus den prätherapeutischen Biopsien verwendet werden, weil im Zuge der routinemäßigen pathologischen Aufarbeitung (kleine Tumorherde, Verlust während des Nachschneidens, Immunhistochemie) nicht ausreichend Gewebe übrig geblieben war.

2.8.2. Histologie

Verschiedene 5 Mikrometer dicke Schnitte wurden nun aus jedem Paraffinblock gewonnen. Ein Bereich jedes Blockes wurde mit HE gefärbt, um das Vorhandensein von Prostatakrebs vor der MSP zu beweisen.

2.8.3. DNA-Extraktion

Die verbleibenden ungefärbten Bereiche wurden für die DNA-Extraktion wie folgt verwendet: Deparaffinisierung mittels Xylen 100 % sowie im Anschluss mit Ethanol 100 %. Dann wurde das Pellet in einem Lyse-Puffer resuspendiert, welcher Proteinase K enthält. Die DNA wurde mithilfe des QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) isoliert.

2.8.4. Methylierungsspezifische Polymerasekettenreaktion (MSP)

Unter Verwendung des CpGenome DNA Modification Kit (Intergen, Oxford, UK) nach Anweisung des Herstellers erfolgte die DNA-Modifikation durch eine Bisulfit-Behandlung, um die methylierten CpG-Residuen zu detektieren. Eine *GSTP1* Promoter Hypermethylierung, z. B. die Anwesenheit methylierter CpGs in der Promoterregion wurde mithilfe der MSP qualitativ festgestellt. [Goessl et al. 2000a]. Die Zielregion für MSP liegt im *GSTP1*-Promoter. *GSTP1*-Promoter-Sequenzen wurden für die methylierte Reaktion verwendet: 92-Basenpaar-Produkt mit blauer Fluoreszenz, die neoplastische DNA darstellend (Primer vorwärts: 5'-6FAM-TTC GGG GTG TAG CGG TCG TC-3'; Primer in Gegenrichtung: 5'-GCC CCA ATA CTA AAT CAC GAC G-3'). Für die unmethylierte Reaktion: 99-Basenpaar-Produkt mit grüner Fluoreszenz, die normale unmethylierte DNA darstellend (Primer vorwärts 5'-HEX-GAT GTT TGG GGT GTA GTG GTT GTT-3'; Primer in Gegenrichtung: 5'-CCA CCC CAA TAC TAA ATC ACA ACA-3')[Goessl et al. 2000b]. Die MSP (15 Minuten bei 95 °C; 35 Zyklen bei 59 °C für 30 Sekunden; 72 °C für 30 Sekunden; and 95 °C für 30 Sekunden) wurde in 10-µl Reaktionsvolumen durchgeführt (HotStar Taq Master Mix (Qiagen, Hilden, Deutschland). Die MSP-Produkte der methylierten und unmethylierten Reaktionen wurden durch Laserfluoreszenz auf einer automatischen Gensequenzierungsmaschine analysiert. Dabei wurde die Gene-Scan-Software verwendet [Goessl et al. 2000a]. Jeder Fall mit einem negativen Befund in der MSP wurde ein zweites Mal untersucht. Zusätzlich wurden Negativ- (reines Wasser) und Positivkontrollen (DNA aus LNCaP-Zellen mit bekannter *GSTP1* Promoter Hypermethylierung) durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1. PSA-Promoter-Polymorphismen

3.1.1. Patienten

Insgesamt 279 Patienten mit histologisch verifiziertem Prostatakrebs in unterschiedlichsten Stadien und 55 Kontrollpatienten ohne Prostatakarzinom wurden in die Studie eingeschlossen. In 267 der Fälle mit Pca und allen 55 Kontrollen zeigten sich auswertbare Ergebnisse. Bei den Pca-Patienten lag das mittlere Alter zum Zeitpunkt der Blutabnahme bei 59,1 Jahren, das mittlere initiale PSA lag bei 10,12 ng/ml (Median 6,9 ng/ml). Das mittlere Alter der Kontrollen lag bei 57,1 Jahren. Tabelle 3 zeigt klinisch-pathologische Daten der Pca-Patienten.

Grading (WHO)		Gleason-Score	
G1	13 4,65 %	Median	6
G2	170 60,93 %	Mittel	6
G3	44 15,77 %	Spanne	3-10
Unbekannt/fehlend	52 18,63 %	Unbekannt/fehlend	31
Gesamt	279 100 %	Gesamt	279
Lokale Ausdehnung		Lymphknoten	
Lokalisiert	186 66,7 %	Negativ	215 77,06 %
Lokal fortgeschritten	73 26,2 %	Positiv	16 5,73 %
Unbekannt/fehlend	20 7,17 %	Unbekannt/fehlend	48 17,2 %
Gesamt	279 100 %	Gesamt	279 100 %
Absetzungsränder		Fernmetastasen	
Negativ	32 11,46 %	Keine Fernmetastasen	126 45,1 %
Positiv	14 5,01 %	Fernmetastasen	12 4,3 %
Unbekannt/fehlend	233 83,51 %	Unbekannt/fehlend	141 50,5 %
Gesamt	279 100 %	Gesamt	279 100 %

Tabelle 4: pathologische Klassifikation der 279 Pca-Fälle

3.1.2. SSCP-Analyse

Insgesamt 189/279 (67,7 %) der Pca-Patienten zeigten Auffälligkeiten in der SSCP-Analyse. Bei 186 dieser Patienten bestand die Auffälligkeit im Bereich C (ARE I).

Bei 27/279 (9,7%) lagen zusätzliche Polymorphismen (SNPs) vor, davon 9 im Bereich B (ARE II).

Die SNP -179, -230 und -233 (Segment C, ARE I) sowie -356 (Segment B, ARE II) werden von unserer Gruppe das erste Mal beschrieben.

Abbildung 9 stellt Lage und Zahl der Polymorphismen der Pca-Patienten den jeweiligen pathologischen Stadien gegenüber.

Demgegenüber zeigten sich bei 15/55 (27,3 %) der Kontrollpatienten auffällige Läufe. Bei 14 dieser Patienten lag die Auffälligkeit im Segment C (ARE I), bei einem im Bereich B (ARE II; -356).

Der Unterschied in der Auftretenshäufigkeit eines Polymorphismus innerhalb der untersuchten Segmente zwischen Patienten mit Pca und der Kontrollgruppe war hochsignifikant (67,7 % vs. 27,3 %; $p < 0,001$). Bei 186/279 Pca-Patienten (66,6%) und 8 der 55 Kontrollpatienten (14,5 %) lag der bereits bekannte SNP bei -158 vor ($p < 0,0001$; Segment C, ARE I, Tabelle 5).

Insgesamt 11 Kontrollpatienten (20 %) zeigten zusätzliche Polymorphismen an anderen Stellen, davon 5 gemeinsam mit der Variation bei -158. Bei sechs weiteren (10,9 %) lagen ausschließlich SNPs bei -202 oder -252 vor.

Die bei Pca-Patienten beschriebenen Polymorphismen -233 und -230 traten in der Kontrollgruppe nicht auf. Der SNP -356 (Segment B, ARE II) wurde als einziger der von uns neu beschriebenen SNPs auch bei einem Kontrollpatienten beobachtet (ohne andere Variationen in den untersuchten Segmenten).

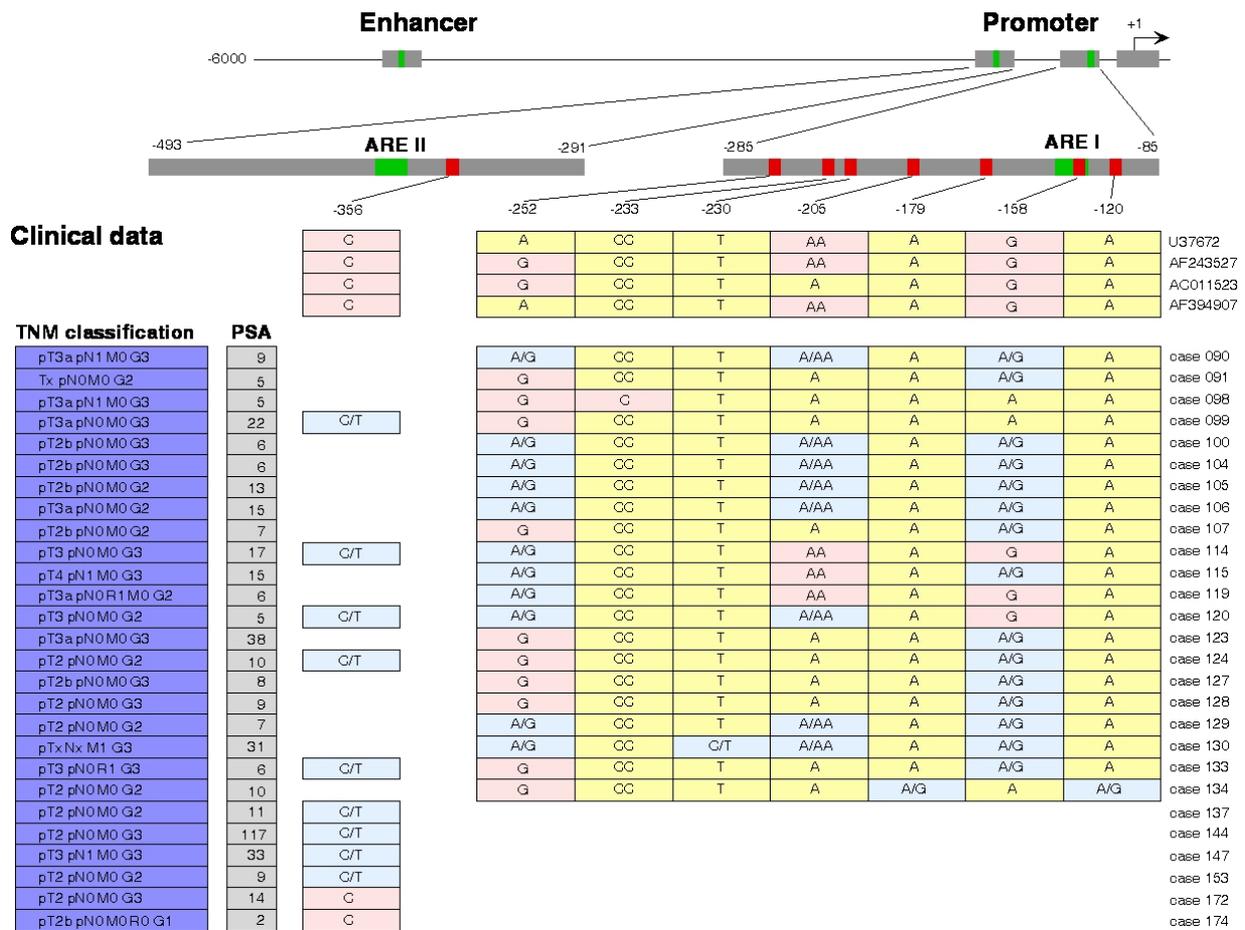


Abbildung 9: Lage und Konfiguration der verschiedenen Polymorphismen (blaue Felder). Die obersten vier Zeilen zeigen die Sequenzen, welche in der PubMed-Genome-Datenbank hinterlegt sind. Die übrigen Zeilen zeigen Patienten, bei welchen andere Polymorphismen als -158 im Bereich C (ARE I) bestanden. In den Fällen 114, 119 und 120 lagen ausschließlich andere Polymorphismen vor (rote Felder in der Spalte -158).

3.1.3. Restriktionsanalyse

Bei 266 Patienten mit Prostatakrebs und allen 55 Kontrollpatienten wurde zusätzlich eine Restriktionsanalyse durchgeführt. Diese analysiert isoliert den Polymorphismus bei -158 (Segment C, ARE I)

Tabelle 4 zeigt die Ergebnisse der Pca-Patienten, Tabelle 5 jene der Kontrollpatienten.

Polymorphismus-Typ (266 Pca)

	Häufigkeit	Prozent
Wildtyp (GG)	31	11,7
Heterozygot (GA)	167	62,8
Homozygot (AA)	68	25,6
Gesamt	266	100,0

Tabelle 4: Restriktionsanalyse der 279 Pca-Patienten; Verteilung der Zygote an der Stelle -158 im Bereich C (ARE I). 31 (11,7 %) zeigen den Homozygoten Wildtyp (GG), 68 (25,6 %) die homozygote Variation (AA) und 167 (62,8 %) eine Heterozygotie (GA).

Polymorphismus-Typ (55 Kontrollen)

	Häufigkeit	Prozent
Wildtyp (GG)	47	85,5
Heterozygot (GA)	5	9,1
Homozygot (AA)	3	5,5
Gesamt	55	100,0

Tabelle 5: Restriktionsanalyse der 55 Kontroll-Patienten; Verteilung der Zygote an der Stelle -158 im Bereich C (ARE I). 47 (85,5 %) zeigen den Homozygoten Wildtyp (GG), 5 (5,5 %) die homozygote Variation (AA) und 3 (5,5 %) eine Heterozygotie (GA).

3.1.4. Korrelation zum klinischen Stadium

Krebspatienten wiesen in 67,7 % der Fälle Polymorphismen auf, die Kontrollpatienten nur in 14,5%. Dieser Unterschied war signifikant ($p < 0,01$). Die meisten der Polymorphismen lagen im Segment C (ARE I) bei -158. 27 (9,7 %) der Pca-Patienten wiesen andere Polymorphismen auf, 14/55 (25,5%) der Kontrollpatienten. Zwischen der Anzahl der zusätzlichen Polymorphismen und dem Stadium des Pca-Patienten bestand keine Korrelation.

3.2.4.1. Lokales Stadium

Von insgesamt 259 diesbezüglich auswertbaren Patienten lag bei 19/29 (65,5 %) Patienten mit Wildtyp, bei 124/162 (76,5 %) Patienten mit Heterozygotie und bei 43/68 (63,2 %) Patienten mit homozygoter Allelvariation ein lokal begrenztes Stadium vor. Es bestand keine Korrelation zwischen dem Ausmaß der Variation und dem lokalen Stadium. (Zum Beispiel: Homozygotie bedeutet mehr lokal fortgeschrittene Patienten). Abbildung 10 stellt die Analyse der lokalen Ausdehnung des Karzinoms der Art des Polymorphismus bei -158 gegenüber.

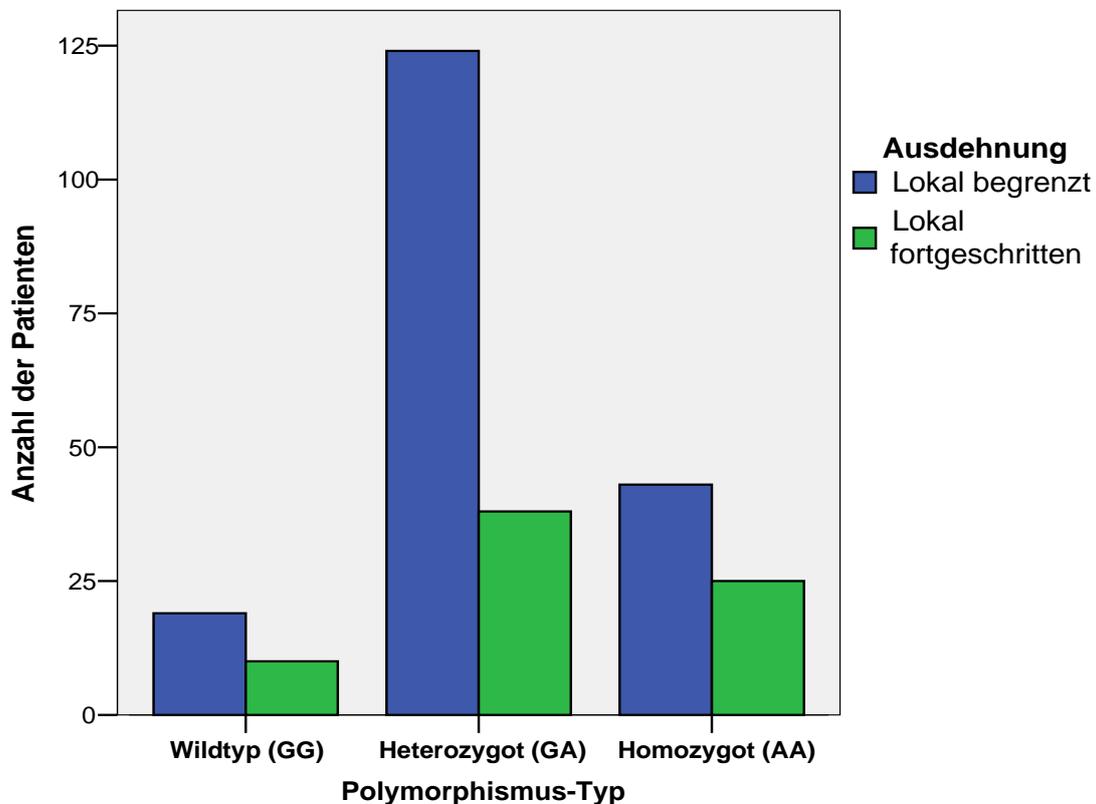


Abbildung 10: Analyse der Korrelation von lokalem Stadium und der Zygotie des Polymorphismus bei -158.

3.2.4.2. Lymphknotenstadium

Von insgesamt 231 diesbezüglich auswertbaren Patienten lag bei 20/21 (95,2 %) Patienten mit Wildtyp, bei 138/146 (94,5 %) Patienten mit Heterozygotie und bei 57/64 (89 %) Patienten mit homozygoter Variation ein lymphknotennegatives Stadium vor. Es bestand keine Korrelation zwischen dem Ausmaß der Variation und dem Lymphknotenstatus (zum Beispiel: Homozygotie bedeutet mehr lymphknotenmetastasierte Patienten). Abbildung 11 stellt die Analyse des Lymphknotenstadiums der Art des Polymorphismus bei -158 gegenüber.

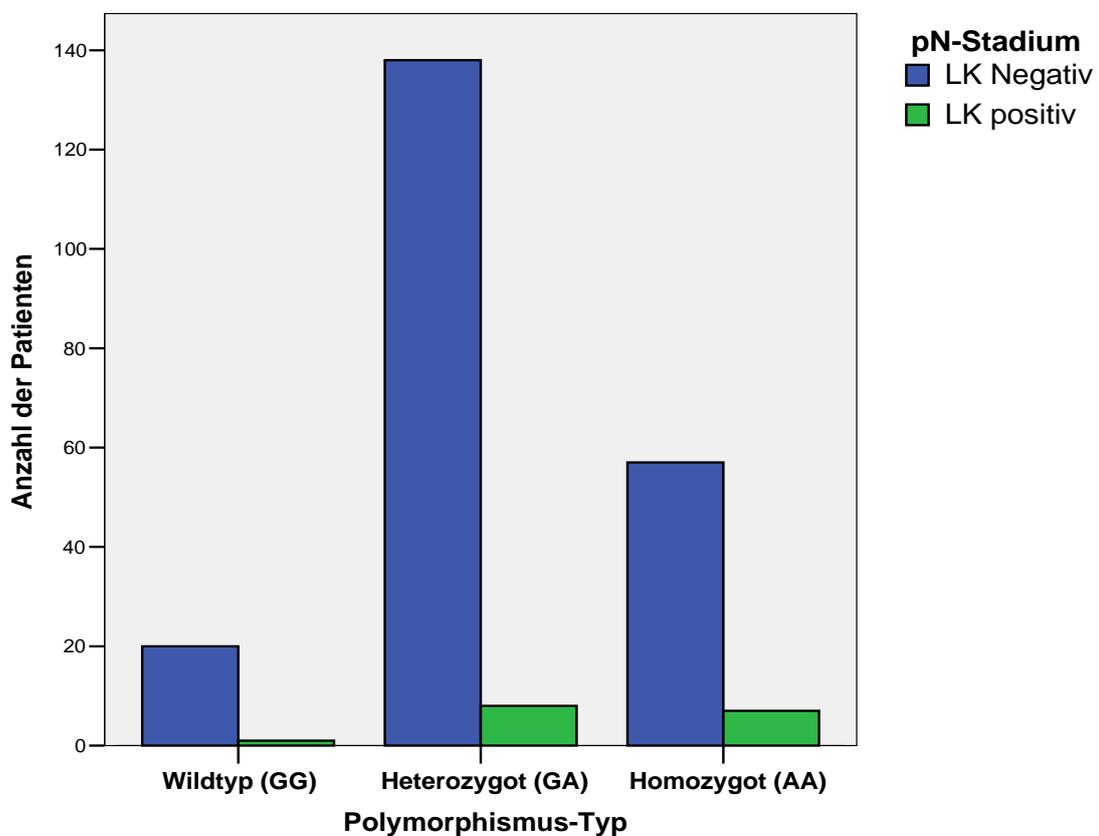


Abbildung 11: Analyse der Korrelation von Lymphknotenstadium und der Zygotie des Polymorphismus bei -158.

3.2.4.3. Fernmetastasierung

Von insgesamt 138 diesbezüglich auswertbaren Patienten lag bei 14/181 (77,8 %) Patienten mit Wildtyp, bei 74/80 (92,5 %) Patienten mit Heterozygotie und bei 38/40 (95 %) Patienten mit homozygoter Variation ein nicht fernmetastasiertes Stadium vor. Es bestand keine Korrelation zwischen dem Ausmaß der Variation und dem Fernmetastasierungsstatus (zum Beispiel: Homozygotie bedeutet mehr metastasierte Patienten). Abbildung 12 stellt die Analyse des Fernmetastasenstadium der Art des Polymorphismus bei -158 gegenüber.

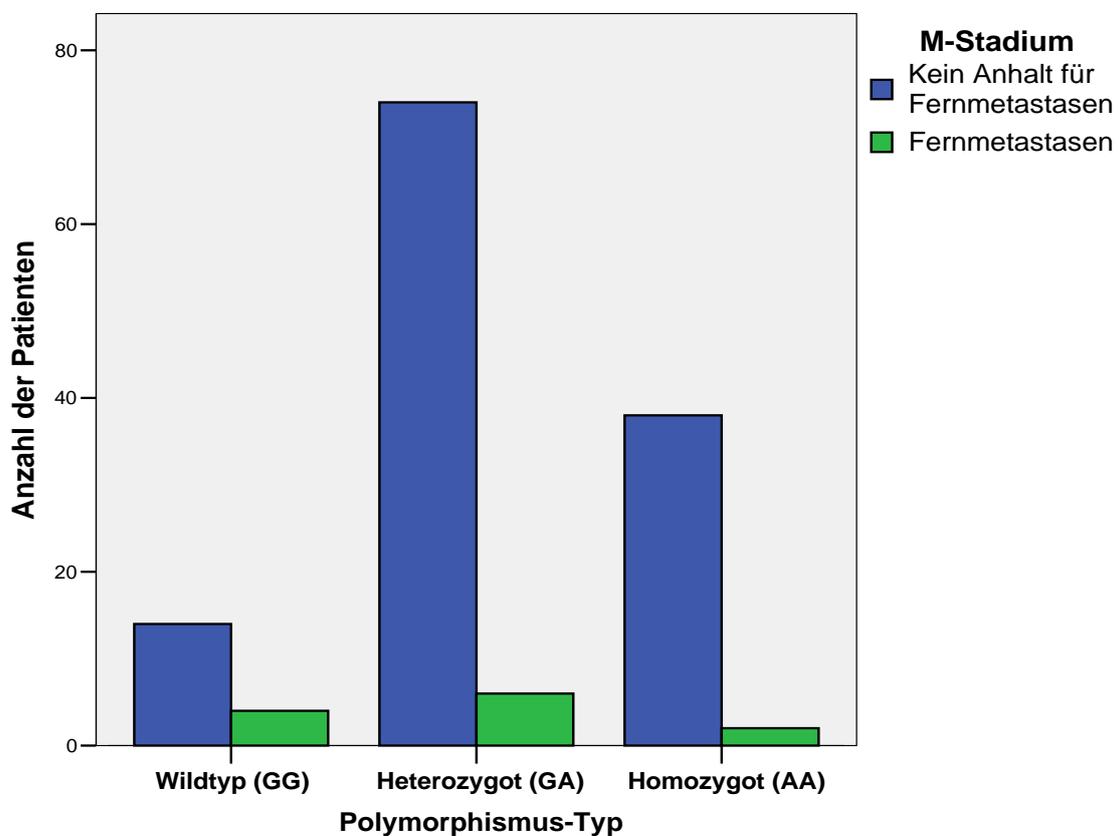


Abbildung 12: Analyse der Korrelation von Fernmetastasierungsstadium und der Zygotie des Polymorphismus bei -158.

3.2. PSA mRNA in pelvinen Lymphknoten bei Pca-Patienten

3.2.1. Patienten

Insgesamt 70 Patienten mit Pca wurden in die Studie eingeschlossen, 53 davon erhielten eine radikale Prostatektomie und 17 eine laparoskopische Staging-Lymphadenektomie. Das mittlere Alter zum Zeitpunkt des chirurgischen Eingriffs lag bei 65,1 Jahren, das mittlere präoperative PSA lag bei 10,72 ng/ml. Tabelle 6 zeigt zusätzliche klinisch-pathologische Daten.

Grading (WHO)			Gleason-Score		
G1	1	1,44 %	Median	7	
G2	29	41,42 %	Mittel	6,5	
G3	26	37,14 %	Spanne	4-10	
Unbekannt	14	20 %	Unklar	17	
Gesamt	70	100 %	Gesamt	70	
Lokale Ausdehnung			Lymphknoten		
Lokalisiert	33	47,14 %	Negativ	58	82,86 %
Lokal fortgeschritten	23	32,86 %	Positiv	12	17,14 %
Unbekannt	14	20 %	Unbekannt	0	0
Gesamt	70	100 %	Gesamt	70	100 %
Absetzungsränder			Fernmetastasen		
Negativ	36	51,43 %	Keine Fernmetastasen	70	100 %
Positiv	16	22,86 %	Fernmetastasen	0	
Unbekannt	18	25,1 %			
Gesamt	70	100 %	Gesamt	70	100 %

Tabelle 6 pathologische Klassifikation der 70 Pca-Fälle

3.2.2. Lymphknoten

Insgesamt wurden 457 Lymphknoten auf PSA mRNA-Transkripte hin analysiert (im Mittel 6,53 Lymphknoten pro Patient (Abbildung 13))

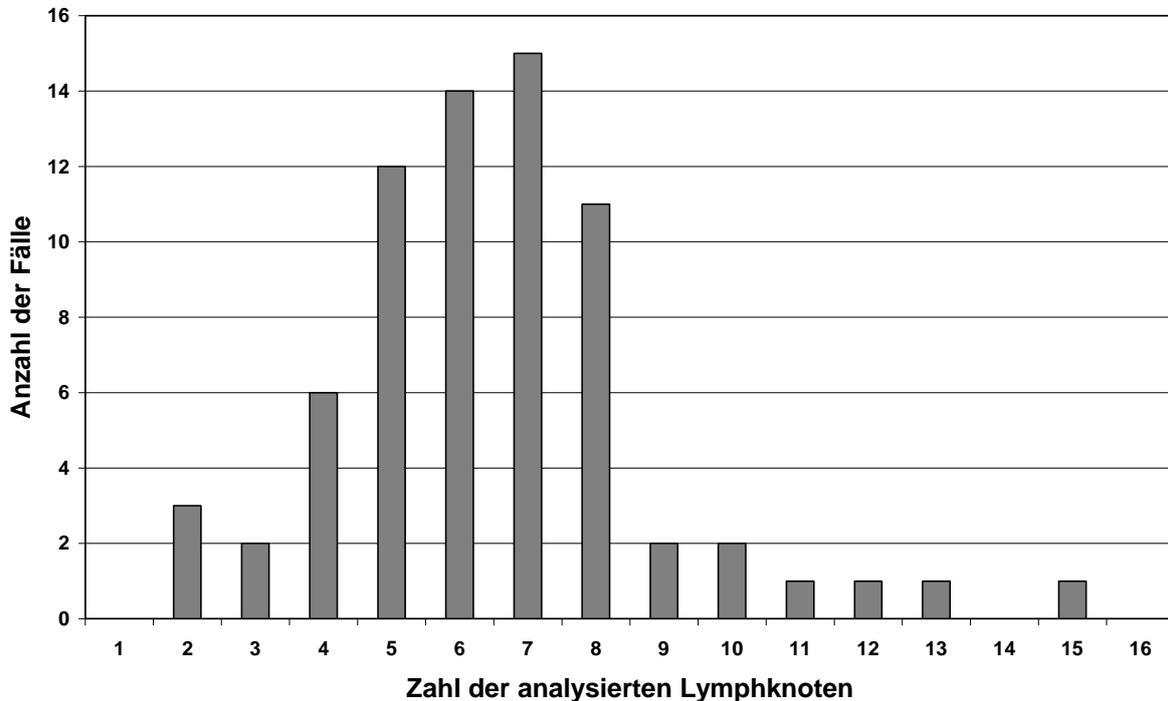


Abbildung 13: Anzahl der untersuchten Lymphknoten (Abszisse); Anzahl der jeweiligen Fälle

3.2.3. Follow-Up

Im Januar 2006 (6 Jahre Nachbeobachtungszeit) waren bei 13 Patienten keine Follow-Up-Daten verfügbar. 27 der übrigen Patienten zeigten ein biochemisches Rezidiv oder einen klinischen Progress (zwei Patienten sind krebsbedingt verstorben), weitere 30 sind frei von Krankheitszeichen.

3.2.4. Korrelation zwischen Histopathologie und späterer Progression

Acht der Patienten in der "Progressionsgruppe" wurden vonseiten der Pathologie ursprünglich als pN+ klassifiziert. Sechs dieser Patienten zeigten auch positive PSA- mRNA-Signale. Wir stellten auch bei 20 von 58 pN0-Patienten PSA mRNA-Signale fest. Fünf dieser Patienten zeigten zum Zeitpunkt der OP keinerlei sonstige etablierte Risikofaktoren für eine Krankheitsprogression ($PSA \geq 10\text{ng/ml}$, $\geq pT3$, Gleason Score ≥ 7 , R+, N+). 27 Patienten in der Gruppe ohne Progression (n=30) wurden initial als pN0 klassifiziert. Zehn dieser Patienten zeigten allerdings positive PSA RT-PCR Signale (Tabellen 7 und 8).

Histologie (HE + IHC, 1999)	Progression (2006)	Keine Progression (2006)	Fehlt	Gesamt
pN1	8	3	1	12
pN0	19	27	12	58
Gesamt	27	30	13	70

Tabelle 7: Korrelation zwischen Histopathologie und späterer Progression.

PSA mRNA RT-PCR (2005)	Progression (2006)	Keine Progression (2006)	Fehlt	Gesamt
Positiv	14	13	3	30
Negativ	13	17	10	40
Gesamt	27	30	13	70

Tabelle 8: Korrelation zwischen PSA mRNA-RT-PCR und späterer Progression.

Wir detektierten durch RT-PCR 2,5-fach mehr Patienten positiv als durch die konventionelle Histologie (30 vs. 12). In dieser Gruppe zeigten jedoch 48,1 % der 27 Patienten, bei denen ein Follow-Up vorlag nach sechs Jahren keine Krankheitszeichen. Dies entspricht einem positiven prädiktiven Wert (PPW) von 51,9 % für diese Technik. Der negative prädiktive Wert (NPW) beträgt 56,6 % (Tabellen 7 und 8).

3.2.5. RT-PCR vs. Histologie

Bezogen auf den “Goldstandard” (Histopathologie) hat die RT-PCR-Methode 10/12 (83,3 %) Patienten ebenfalls positiv detektiert. Darüber hinaus wurden 20 histologisch negative Fälle in der RT-PCR positiv bestimmt (Tabelle 9).

RT-PCR vs. Histologie	pN1	pN0	Gesamt
RT-PCR positiv	10	20	30
RT-PCR negativ	2	38	40
Gesamt	12	58	70

Tabelle 9: RT-PCR vs. Histologie

Wenn die Krankheitsprogression (PSA-Wiederanstieg) als Referenz verwendet wird, so zeigt das konventionelle histopathologische Lymphknotenstaging eine Sensitivität von 29,6 % (8/27) und eine Spezifität von 90 % (27/30). Der PPW beträgt 72,7 % (8/11, Tabelle 7).

3.3. Alpha-methylacyl CoA Racemase (AMACR) in Prostatagewebe

3.3.1. Patienten

Prostatagewebe von 120 Patienten wurde verwendet. 112 dieser Gewebeproben erfüllten die notwendigen RNA-Qualitätsstandards für eine weitere Analyse: 55 von 59 Patienten mit benigner Hyperplasie der Prostata (BPH) und 57 von 61 Patienten mit Pca.

Das Alter der Pca-Patienten lag im Median bei 63,1 (49 – 76) Jahren, in der BPH-Gruppe bei 61,4 (50 - 81) Jahren. Dieser Unterschied war nicht signifikant. Der Median des PSA in der BPH-Gruppe lag bei 2,9 ng/ml, in der Pca-Gruppe bei 9 ng/ml und ($p < 0,001$).

Tabelle 10 zeigt die pathologische Klassifikation der Pca-Patienten.

Grading (WHO)		Gleason-Score	
G1	3 5,3 %	Median	6
G2	30 52,6 %	Mittel	6
G3	24 42,1 %	Spanne	3 - 9
Gesamt	57 100 %	Gesamt	57
Lokale Ausdehnung		Lymphknoten	
Lokalisiert	25 43,9 %	Negativ	42 73,7 %
Lokal fortgeschritten	26 45,6 %	Positiv	13 22,8 %
Unbekannt	6 10,5 %	Unbekannt	2 3,5 %
Gesamt	57 100 %	Gesamt	57 100 %
Absetzungsrän­der		Fernmetastasen	
Negativ	34 59,6 %	Keine Fernmetastasen	55 96,5 %
Positiv	11 19,3 %	Fernmetastasen	2 3,5 %
Unbekannt	12 21,1 %		
Gesamt	57 100 %	Gesamt	57 100 %

Tabelle 10: pathologische Klassifikation der 57 Pca-Fälle

3.3.2. AMACR mRNA-Expression

Die relative AMACR-Expression lag in der Pca-Gruppe im Mittel bei 31,5 (Median 19,18) und bei 8,38 (Median 8,38) in der BPH-Gruppe. Die Pca-Population hatte eine 3,75-fach höhere AMACR-Expression als die BPH-Population. Dieser Unterschied war hochsignifikant ($p < 0,0001$).

Innerhalb der Pca-Gruppe zeigten sich keinerlei signifikante Korrelationen zwischen der relativen AMACR-mRNA-Expression und verschiedenen klinischen Parametern wie Alter, klinisches Stadium, pathologisches Stadium, Lymphknotenstatus, Gleason-Score oder Progression.

Die Abbildungen 14 und 15 stellen die AMACR mRNA-Expression grafisch dar.

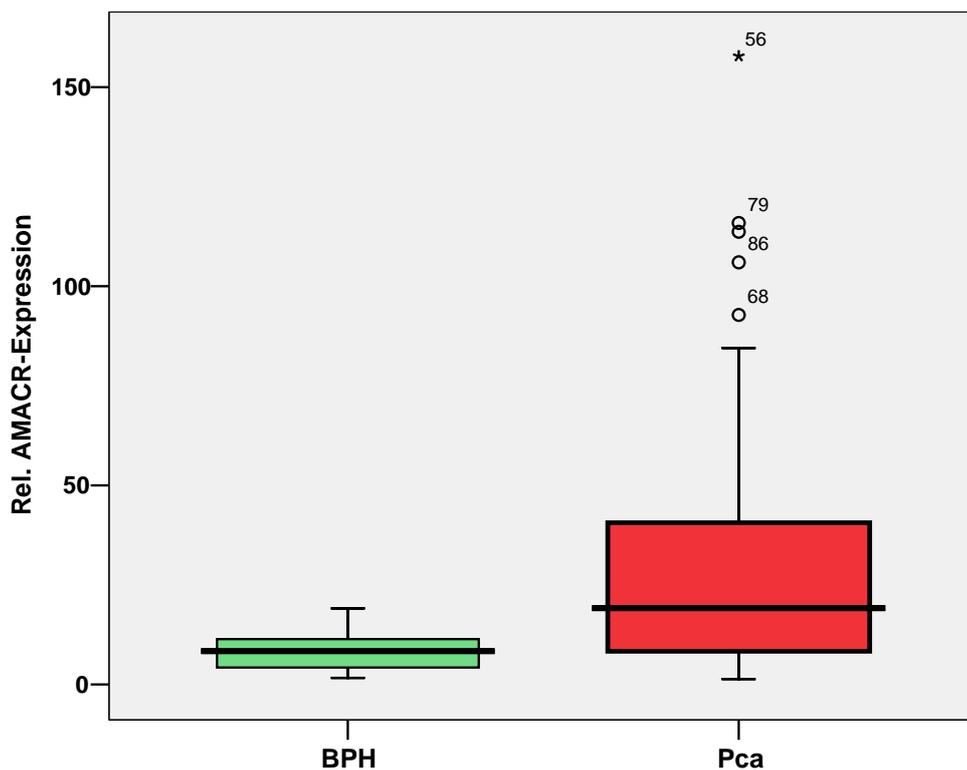


Abbildung 14: AMACR-mRNA-Expression in Gewebe aus Prostatakrebs (Pca) vs. Gewebe aus benigner Hyperplasie der Prostata (BPH) (n=112; 55 BPH + 57 Pca) Median, Quartilen (25%, 75%), Ausreißer (5%, 95%), Extreme.

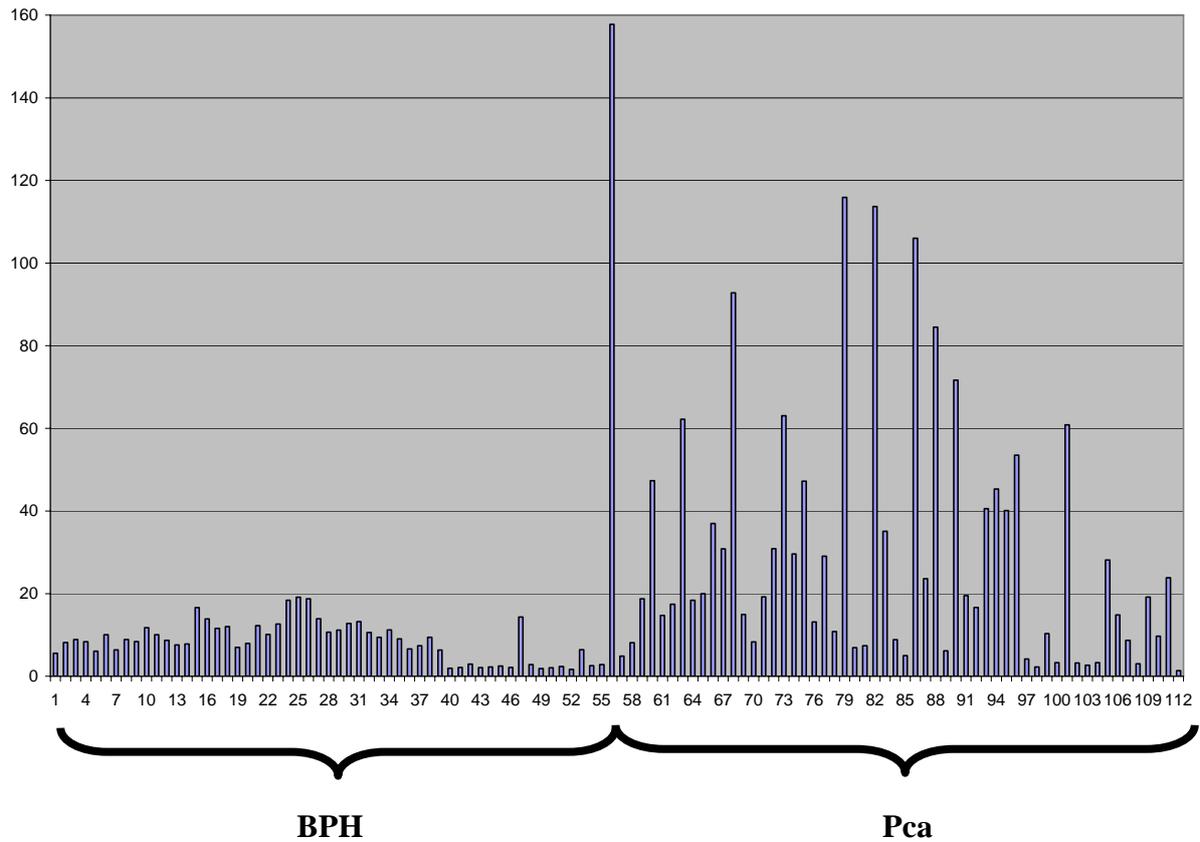


Abbildung 15: AMACR-mRNA-Expression in jedem individuellen Fall (N=112; 55 BPH + 57 Pca).

Die Analyse der ROC-Kurve (Abbildung 16) zeigt, dass eine Spezifität von 85,6 % und eine Sensitivität von 64,9 % erzielt werden kann, wenn der Cutt-Off-Wert auf 12,95 gesetzt wird. Die Fläche unter der Kurve misst 0,765. Der PPW beträgt 82,2 % (37/45 Patienten), während der NPW 70,1 % (47/67 Patienten) beträgt.

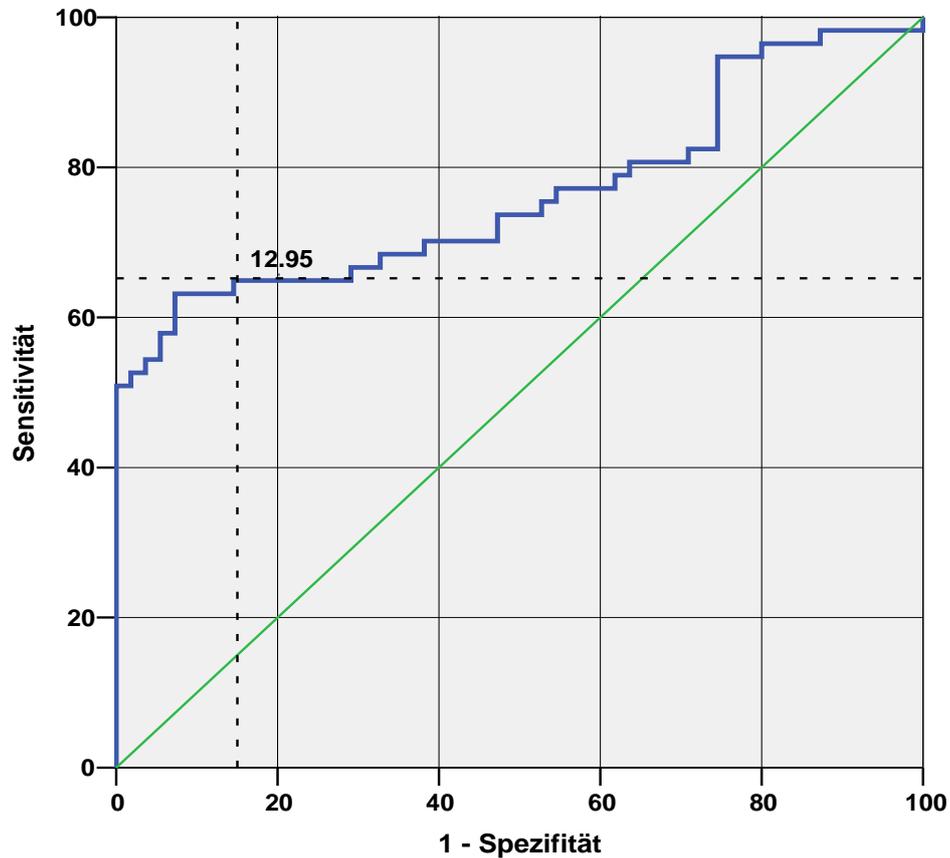


Abbildung 16: ROC-Kurve (blau); Fläche unter der Kurve 0,765; n=112; 57 Patienten mit Prostatakarzinom (Pca), 55 Patienten mit benigner Hyperplasie der Prostata (BPH).

Wird der Cutt-Off-Wert auf 12,95 gelegt, erreicht die relative AMACR-mRNA-Expression eine Sensitivität (Detektion der malignen Fälle) von 64,9% und eine Spezifität (Detektion der benignen Fälle) von 85,6%.

3.3.3. Follow-Up

Im Laufe des Follow-Up (im Mittel 3 Jahre, 2,4 – 3,3 Jahre) zeigten nur zwei Patienten nach radikaler Prostatektomie einen biochemischen Progress. Die relative AMACR-mRNA-Expression lag bei 14,71 im ersten Fall (Patient 61) und bei 113,7 im zweiten Fall (Patient 82). Zwei Patienten mit palliativer transurethraler Resektion zeigten einen klinischen Progress. Die relative jeweilige AMACR-mRNA-Expression lag bei 2,22 im ersten Fall (Patient 98) und bei 3,18 im zweiten Fall (Patient 102). Diese Werte entsprachen nicht einer signifikanten Korrelation.

3.4. AMACR im Urin und in Prostatasekreten

3.4.1. Patienten

Im Rahmen der Studie wurden Exprimat-Urine und Morgenurine von 51 Patienten mit Pca und 21 Patienten mit BPH untersucht.

43 der Pca-Patienten erhielten eine radikale Prostatektomie, acht unterzogen sich einer diagnostischen, laparoskopischen pelvinen Lymphadenektomie. Das Alter der Pca-Patienten lag im Median bei 63,1 (51 – 76) Jahren, in der BPH-Gruppe bei 62,1 (50 - 81) Jahren. Dieser Unterschied war nicht signifikant. Der Median des PSA lag bei 2,8 ng/ml in der BPH-Gruppe und 8,76 ng/ml in der Pca-Gruppe ($p < 0,001$).

Tabelle 11 zeigt die pathologische Klassifikation der Pca-Patienten. Der Median des PSA lag bei 2,8 ng/ml in der BPH-Gruppe und 8,7 ng/ml in der Pca-Gruppe.

Grading (WHO)		Gleason-Score	
G1	3 5,9 %	Median	6
G2	25 49 %	Mittelwert	6
G3	23 45,1 %	Spanne	3 - 9
Gesamt	51 100 %	Gesamt	51
Lokale Ausbreitung		Lymphknoten	
Lokalisiert	22 43,1 %	Negativ	36 70,6 %
Lokal fortgeschritten	21 41,2 %	Positiv	12 23,5 %
Unbekannt	8 15,7 %	Unbekannt	3 5,9 %
Gesamt	51 100 %	Gesamt	51 100%
Absetzungsränder		Fernmetastasen	
Negativ	29 56,9 %	Keine Fernmetastasen	50 98 %
Positiv	10 19,6 %	Fernmetastasen	1 2 %
Unbekannt	12 23,5 %		
Gesamt	51 100 %	Gesamt	51 100 %

Tabelle 11: pathologische Klassifikation der 51 Pca-Fälle.

3.4.2. Exprimat-Urin

Von einigen Patienten lag nur eine der beiden Urinproben vor. Sowohl Exprimaturin als auch Morgenurin war bei 47 von 51 Pca-Patienten und bei 17 der 21 BPH-Patienten verfügbar.

Weder bei den Pca-Patienten, noch bei den BPH-Patienten konnte AMACR mRNA im Urin detektiert werden.

3.4.3. Morgenurin

Weder bei den Pca-Patienten, noch bei den BPH-Patienten konnte AMACR mRNA im Urin detektiert werden.

3.5. CD24 mRNA in Prostatagewebe

3.5.1. Patienten

Prostatagewebe von 120 Patienten wurde verwendet. 114 dieser Gewebeprobeen erfüllten die notwendigen RNA-Qualitätsstandards (28S/18S) für eine weitere Analyse: 55 von 59 Patienten mit benigner Hyperplasie der Prostata (BPH) und 59 von 61 Patienten mit Pca. Das Alter der Pca-Patienten lag im Median bei 63,1 (49 – 76) Jahren, in der BPH-Gruppe bei 61,4 (50 - 81) Jahren. Das PSA lag im Median bei 2,8 ng/ml bei den BPH-Patienten und bei 9,76 ng/ml bei den Pca-Patienten ($p < 0,001$). Tabelle 12 zeigt die pathologische Klassifikation der Pca-Patienten.

Grading (WHO)		Gleason-Score	
G1	3 5,1 %	Median	6
G2	31 52,5 %	Mittel	6
G3	25 42,4 %	Spanne	3 - 9
Gesamt	59 100 %	Gesamt	59
Lokale Ausdehnung		Lymphknoten	
Lokalisiert	25 42,4 %	Negativ	42 71,2 %
Lokal fortgeschritten	26 44,1 %	Positiv	14 23,7 %
Unbekannt	8 13,5 %	Unbekannt	3 5,1 %
Gesamt	59 100 %	Gesamt	59 100 %
Absetzungsrän­der		Fernmetastasen	
Negativ	34 57,6 %	Keine Fernmetastasen	57 96,6 %
Positiv	11 18,7 %	Fernmetastasen	2 3,4 %
Unbekannt	14 23,7 %		
Gesamt	59 100 %	Gesamt	59 100 %

Tabelle 12 : pathologische Klassifikation der 59 Pca-Patienten

3.5.2. Relative CD24 mRNA-Expression

Die relative CD24 mRNA-Expression lag in der Pca-Gruppe im Mittel bei 0,21 (Spanne 0,013-1,02; Median 0,14) und bei 0,08 (Spanne 0,001-0,29; Median 0,06) in der BPH-Gruppe. Die Pca-Population hatte eine 2,69-fach höhere CD24-mRNA-Expression als die BPH-Population. Dieser Unterschied war hochsignifikant ($p < 0,0001$).

Innerhalb der Pca-Gruppe zeigten sich keinerlei signifikante Korrelationen zwischen der relativen CD24-mRNA-Expression und verschiedenen klinischen Parametern wie Alter, klinisches Stadium, pathologisches Stadium, Lymphknotenstatus, Gleason-Score oder Progression.

Die relative CD24-mRNA-Expression ist grafisch in den Abbildungen 17 und 18 dargestellt.

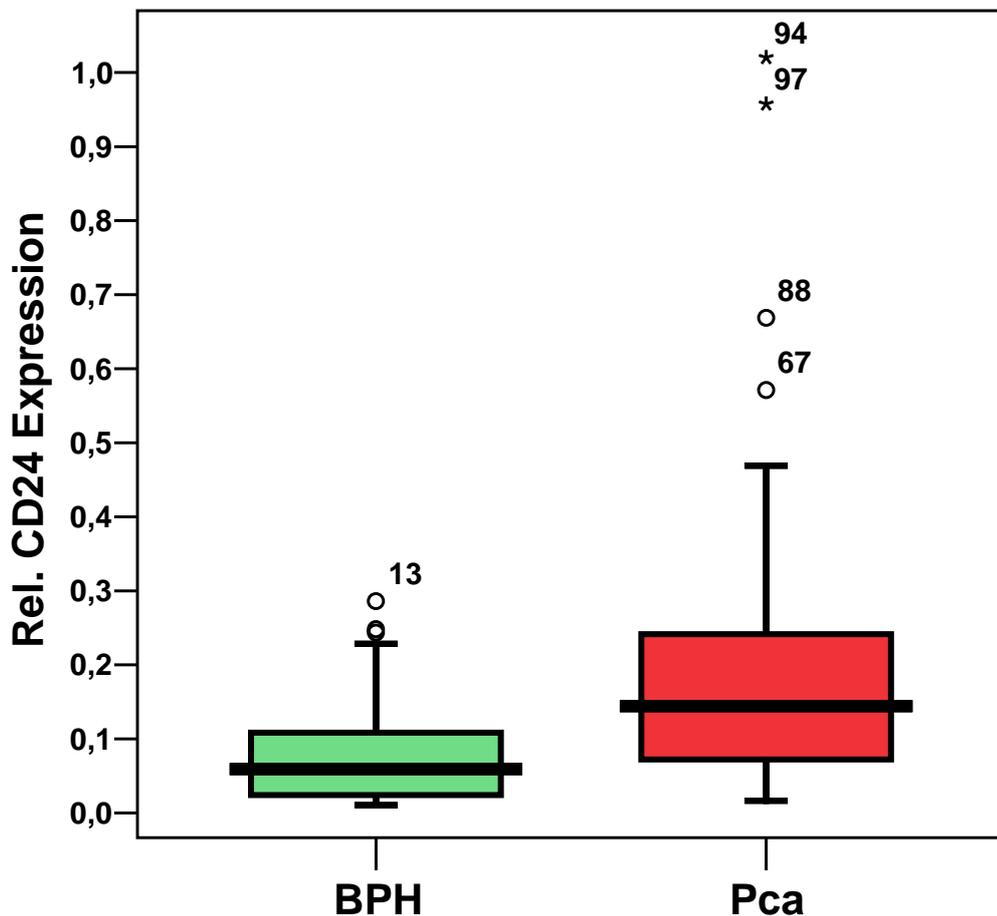


Abbildung 17: CD24-mRNA-Expression in Gewebe aus Prostatakrebs (Pca) vs. Gewebe aus benigner Hyperplasie der Prostata (BPH) (n=114; 55 BPH + 59 Pca). Median, Quartilen (25%, 75%), Ausreißer (5%, 95%), Extreme.

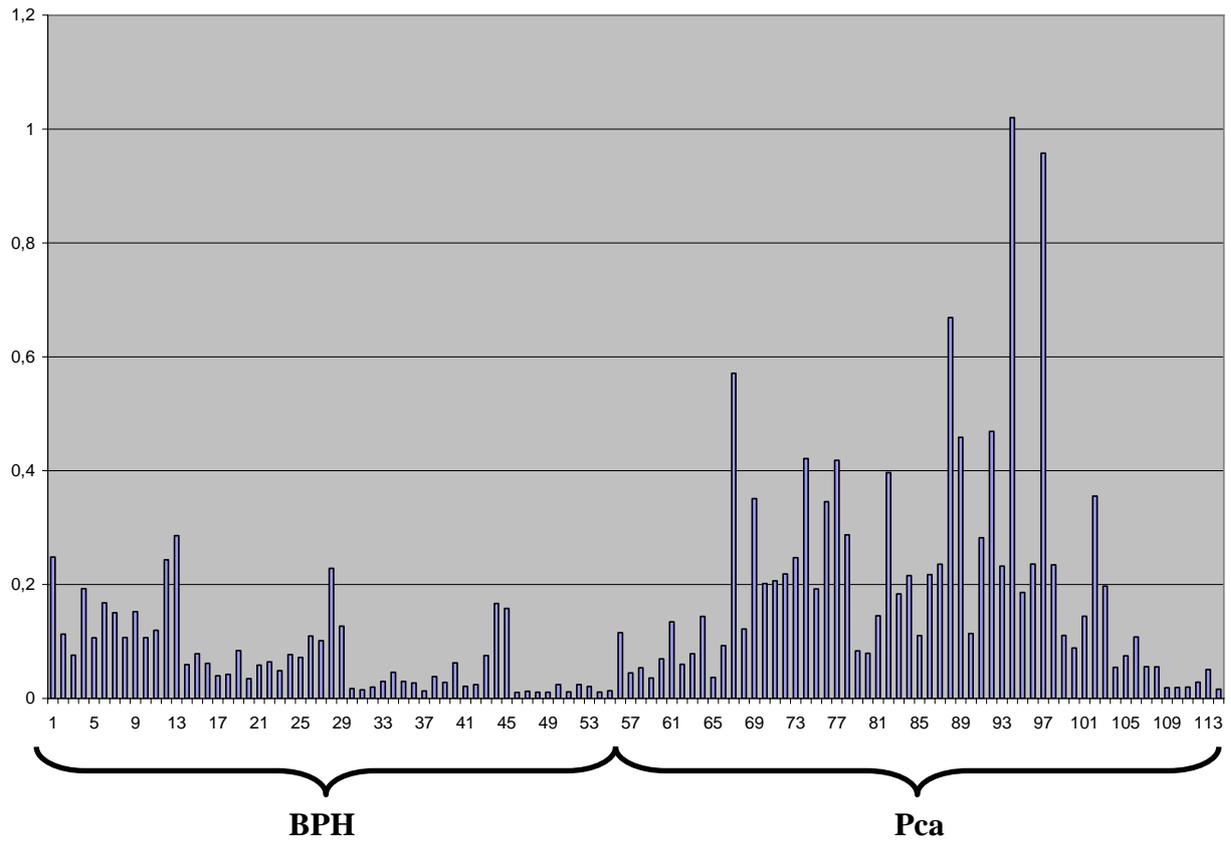


Abbildung 18: CD24 mRNA-Expression in jedem individuellen Fall
(N=114; 55 BPH + 59 Pca).

Die Analyse der ROC-Kurve (Abbildung 9) zeigt, dass zwar nur eine mäßige Spezifität von 47,3 % aber eine hohe Sensitivität von 84,6 % erzielt werden kann, wenn der Cutt-Off-Wert auf 0,0498 gesetzt wird. Die Fläche unter der Kurve misst 0,754. Der PPW beträgt 64,9 % (50/77 Patienten), während der NPW 75,7 % (28/37 Patienten) beträgt. Die Fläche unter der Kurve beträgt 0,754 (Abbildung 19). Die Analyse der ROC-Kurve des initialen PSA ergab eine Fläche unter der Kurve von 0,921 (Abbildung 10).

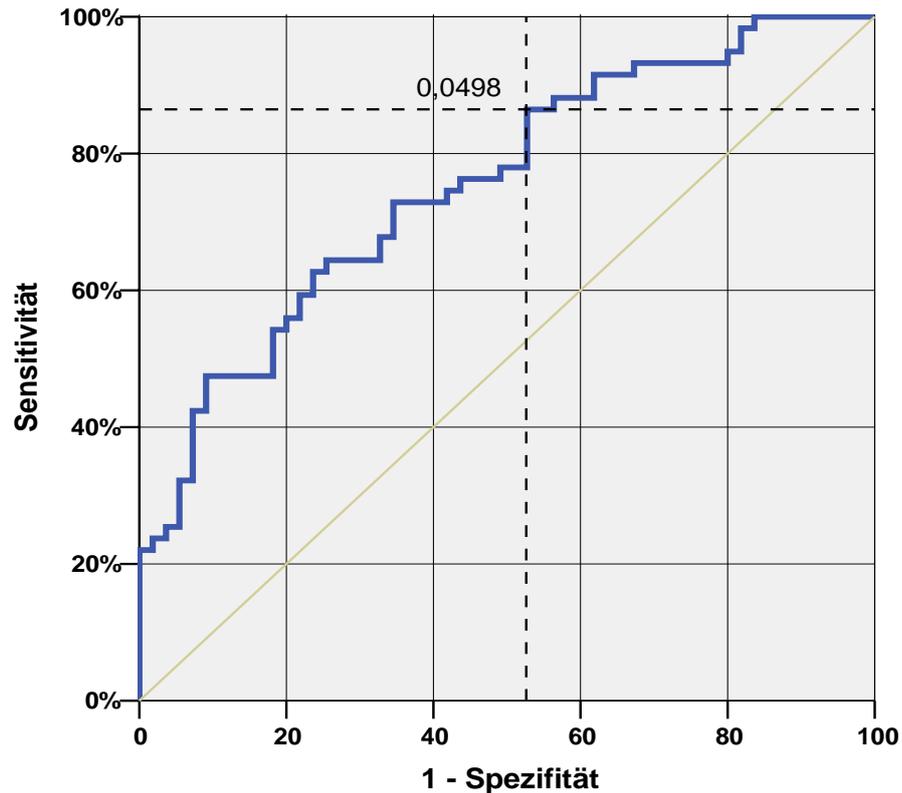


Abbildung 19: ROC-Kurve (blau); Fläche unter der Kurve 0,765; n=114; 59 Patienten mit Prostatakarzinom (Pca), 55 Patienten mit benigner Hyperplasie der Prostata (BPH).

Wird der Cutt-Off-Wert auf 0,0498 gelegt, erreicht die relative Cd24-mRNA-Expression eine Sensitivität (Detektion der malignen Fälle) von 86,4% und eine Spezifität (Detektion der benignen Fälle) von 47,3%.

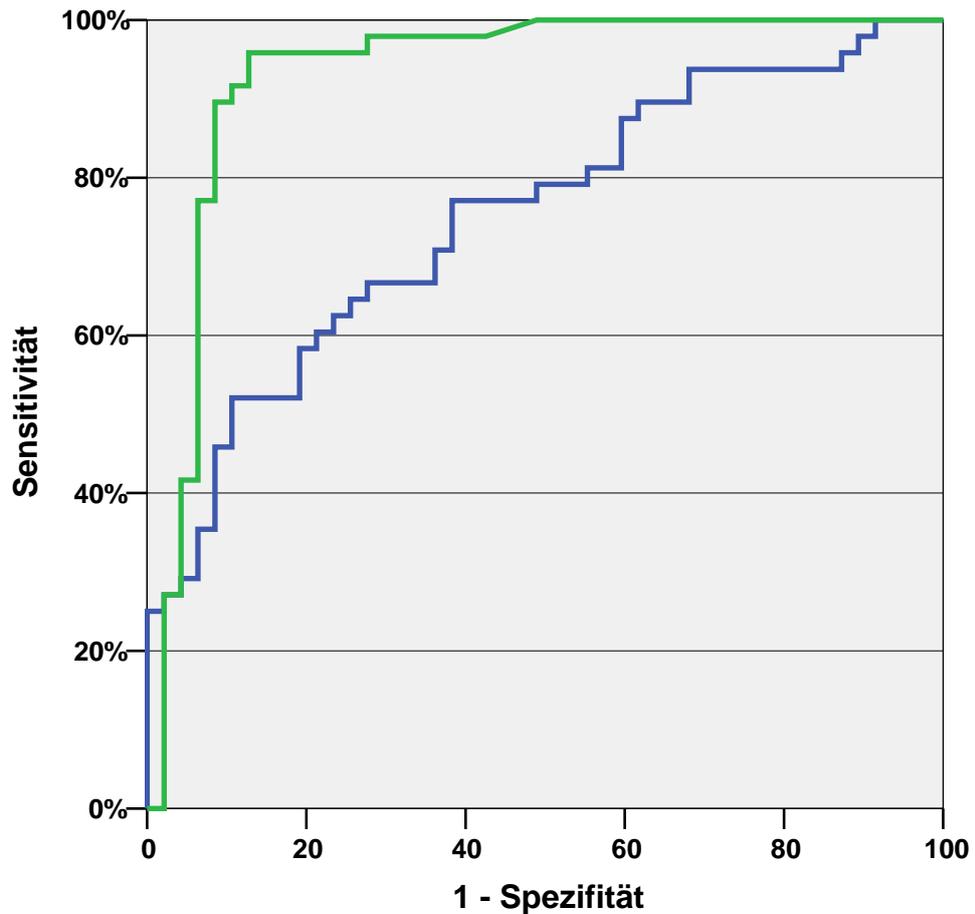


Abbildung 20: ROC-Kurve der CD24 mRNA-Expression aus dem Gewebe (blau) und des initialen PSA im Serum (grün); Fläche unter der Kurve 0,754 beziehungsweise 0,932.

3.5.3. Follow-Up

Im Laufe des Follow-Up (im Mittel 3 Jahre, 2,4 – 3,3 Jahre) zeigten nur zwei Patienten nach radikaler Prostatektomie einen biochemischen Progress. Die relative CD24-mRNA-Expression lag im Bereich aller Pca-Patienten (0,202 bei Patient 70; 0,42 bei Patient 74). Zwei Patienten mit palliativer transurethraler Resektion zeigten einen klinischen Progress. Die relative jeweilige CD24-mRNA-Expression lag bei 0,3552 im ersten Fall (Patient 102) und bei 0,075 im zweiten Fall (Patient 105). Diese Werte entsprachen nicht einer signifikanten Korrelation.

3.6. CD24 mRNA im Urin und in Prostatasekreten

3.6.1. Patienten

Im Rahmen der Studie wurden Exprimat-Urine und Morgenurine von 51 Patienten mit Pca und 21 Patienten mit BPH untersucht.

43 der Pca-Patienten erhielten eine radikale Prostatektomie, acht unterzogen sich einer diagnostischen, laparoskopischen pelvinen Lymphadenektomie. Das Alter der Pca-Patienten lag im Median bei 63,1 (51 – 76) Jahren, in der BPH-Gruppe bei 62,1 (50 - 81) Jahren. Dieser Unterschied war nicht signifikant. Der Median des PSA lag bei 2,8 ng/ml in der BPH-Gruppe und 8,7 ng/ml in der Pca-Gruppe. Tabelle 9 zeigt die pathologische Klassifikation der Pca-Patienten.

Grading (WHO)		Gleason-Score	
G1	3 5,9 %	Median	6
G2	25 49 %	Mittelwert	6
G3	23 45,1 %	Spanne	3 - 9
Gesamt	51 100 %	Gesamt	51
Lokale Ausbreitung		Lymphknoten	
Lokalisiert	22 43,1 %	Negative	36 70,6 %
Lokal fortgeschritten	21 41,2 %	Positive	12 23,5 %
Unbekannt	8 15,7 %	Unknown	3 5,9 %
Gesamt	51 100 %	Gesamt	51 100 %
Absetzungsränder		Fernmetastasen	
Negativ	29 56,9 %	Keine Fernmetastasen	50 98 %
Positiv	10 19,6 %	Fernmetastasen	1 2 %
Unbekannt	12 23,5 %		
Gesamt	51 100 %	Gesamt	51 100 %

Tabelle 13: pathologische Klassifikation der 51 Pca-Fälle.

3.6.2. Exprimat-Urin

Von einigen Patienten lag nur eine der beiden Urinproben vor. Sowohl Exprimaturin als auch Morgenurin war bei 47 von 51 Pca-Patienten und bei 17 der 21 BPH-Patienten verfügbar.

Ein CD24-mRNA-Wert oberhalb der Detektionsgrenze konnte im Exprimaturin von 36 der 51 Pca-Fälle und von 13 der 21 BPH-Patienten festgestellt werden. Die mittlere relative CD24-mRNA-Expression betrug in der Pca-Gruppe 8,08 (0,001 – 49; Median 1,63) und 5,24 (0,02-51,1; Median 1,39) in der BPH-Gruppe. Dieser Unterschied war nicht signifikant ($p=0,53$). Die Ergebnisse der relativen CD24-mRNA-Expression im Exprimaturin sind grafisch in den Abbildungen 21 und 22 dargestellt. Die Analyse der ROC-Kurve (Abbildung 23) zeigte eine Fläche unter der Kurve von 0,56.

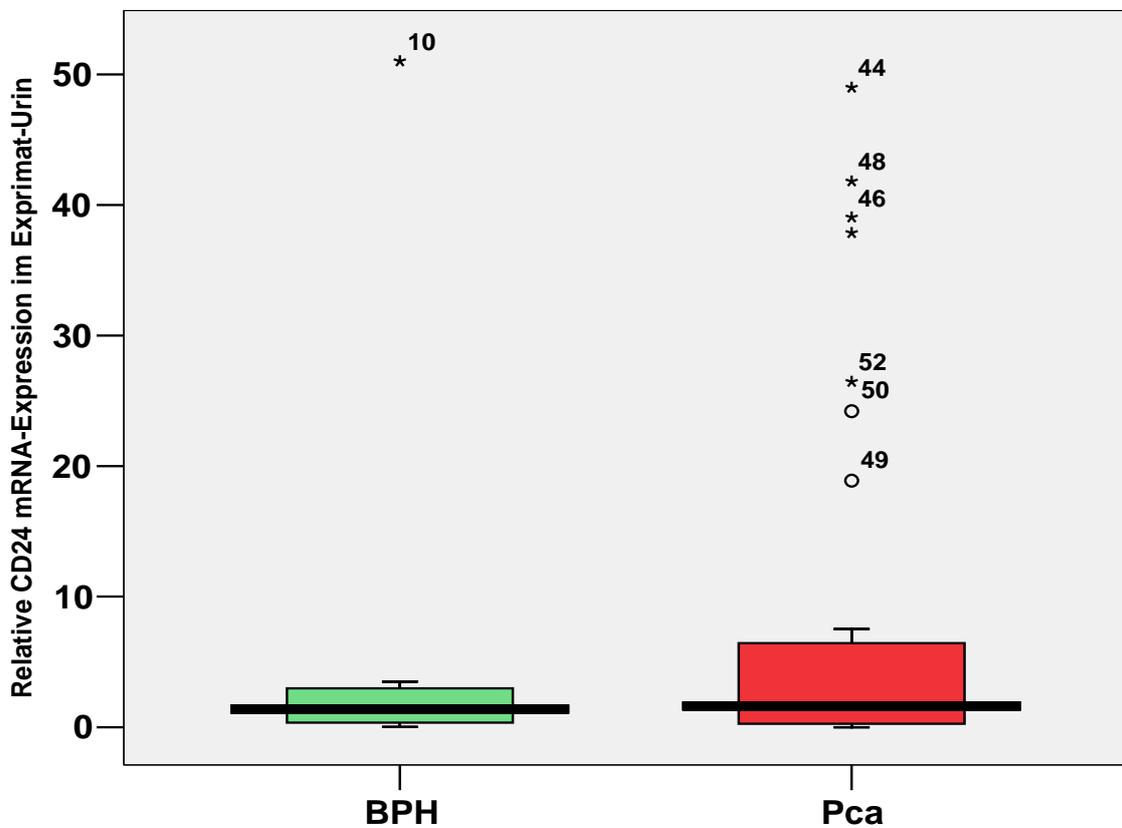


Abbildung 21: CD24 mRNA im Exprimaturin: 51 Prostatakarzinome (Pca) vs. 21 Fälle mit benigner Hyperplasie der Prostata (BPH).

Median, Quartilen (25%, 75%), Ausreißer (5%, 95%), Extreme.

Relative CD24-mRNA-Expression im Exprimat-Urin

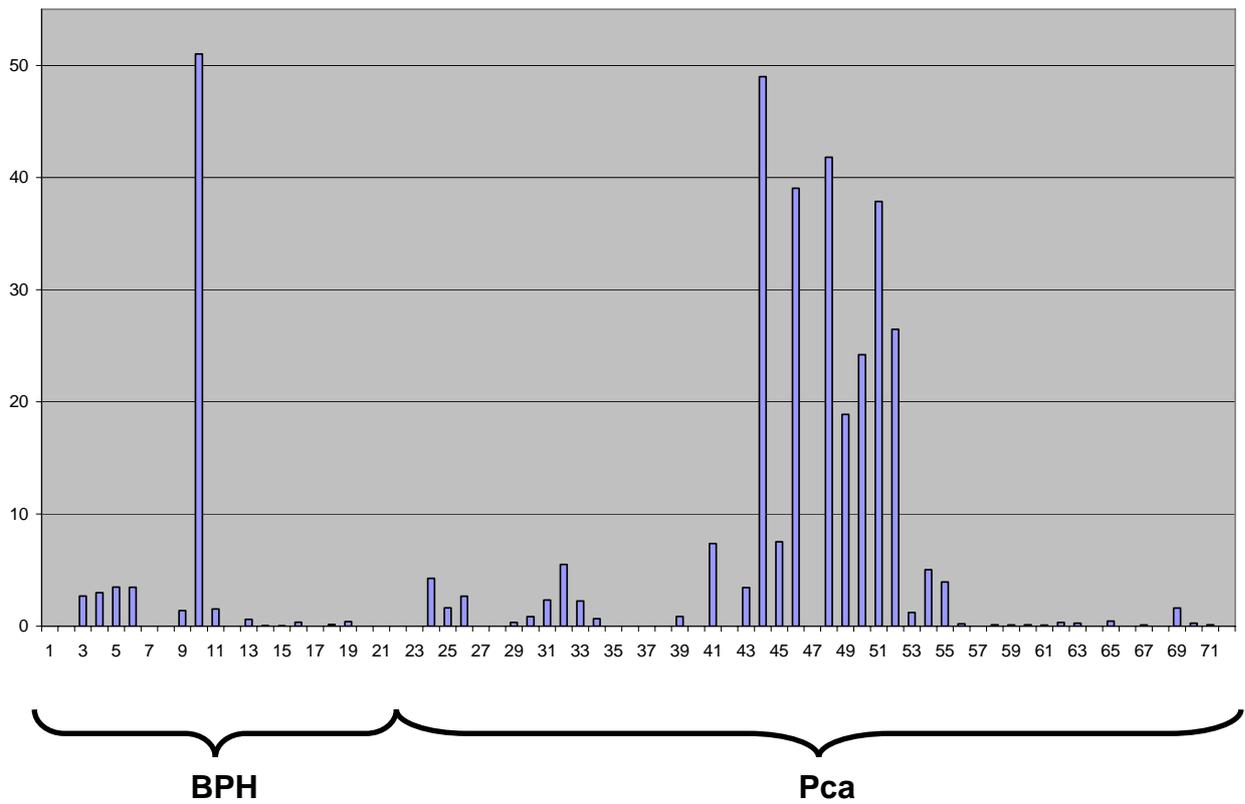


Abbildung 22: CD24 mRNA-Expression im Exprimaturin in jedem individuellen Fall (N=72; 21 BPH + 51 Pca).

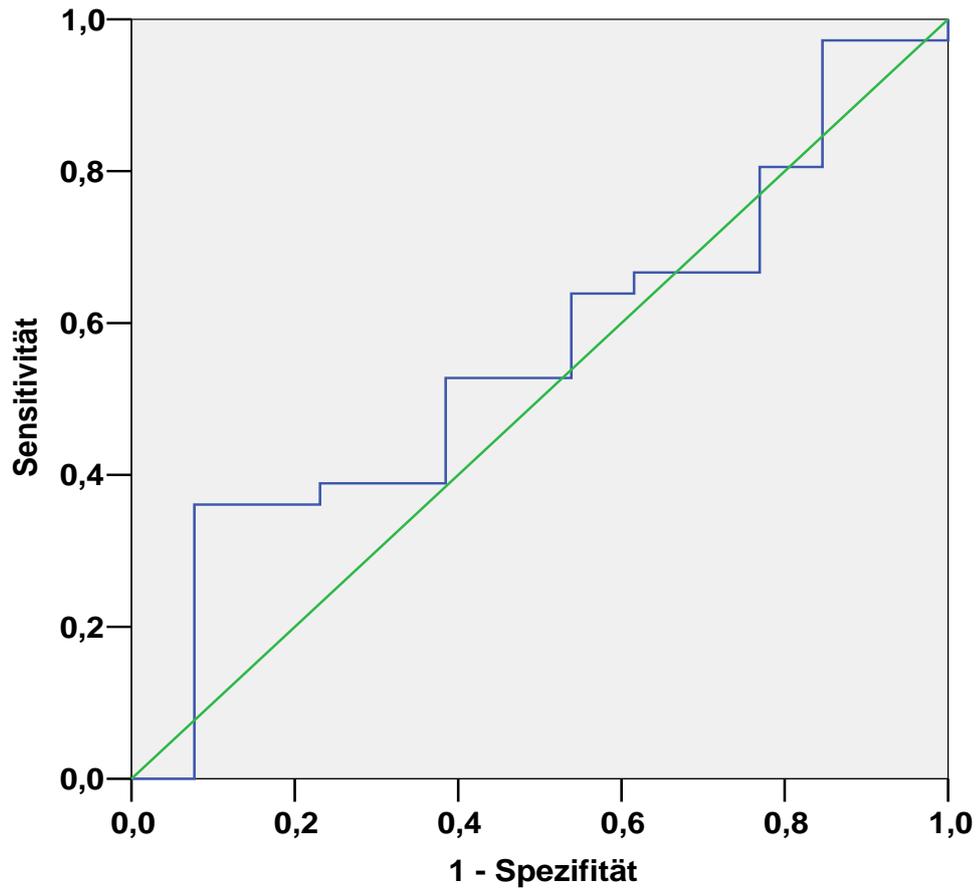


Abbildung 23: ROC-Kurve (blau) der CD24 mRNA-Expression im Exprimaturin. Fläche unter der Kurve 0,56.

3.6.3. Morgenurin

Ein CD24-mRNA-Wert oberhalb der Detektionsgrenze konnte in 34 der 47 verfügbaren Morgenurine der 51 Pca-Fälle und in 16 der 17 verfügbaren Morgenurine der 21 BPH-Patienten detektiert werden. Die mittlere relative CD24-mRNA-Expression betrug in der Pca-Gruppe 7,86 (0,08 – 51,6; Median 1,53) und 15,7 (0,02-162,6; Median 1,68) in der BPH-Gruppe. Dieser Unterschied war nicht signifikant ($p=0,42$). Die Ergebnisse der relativen CD24-mRNA-Expression im Exprimaturin sind grafisch in den Abbildungen 24 und 25 dargestellt. Die Analyse der ROC-Kurve (Abbildung 26) zeigte eine Fläche unter der Kurve von 0,46.

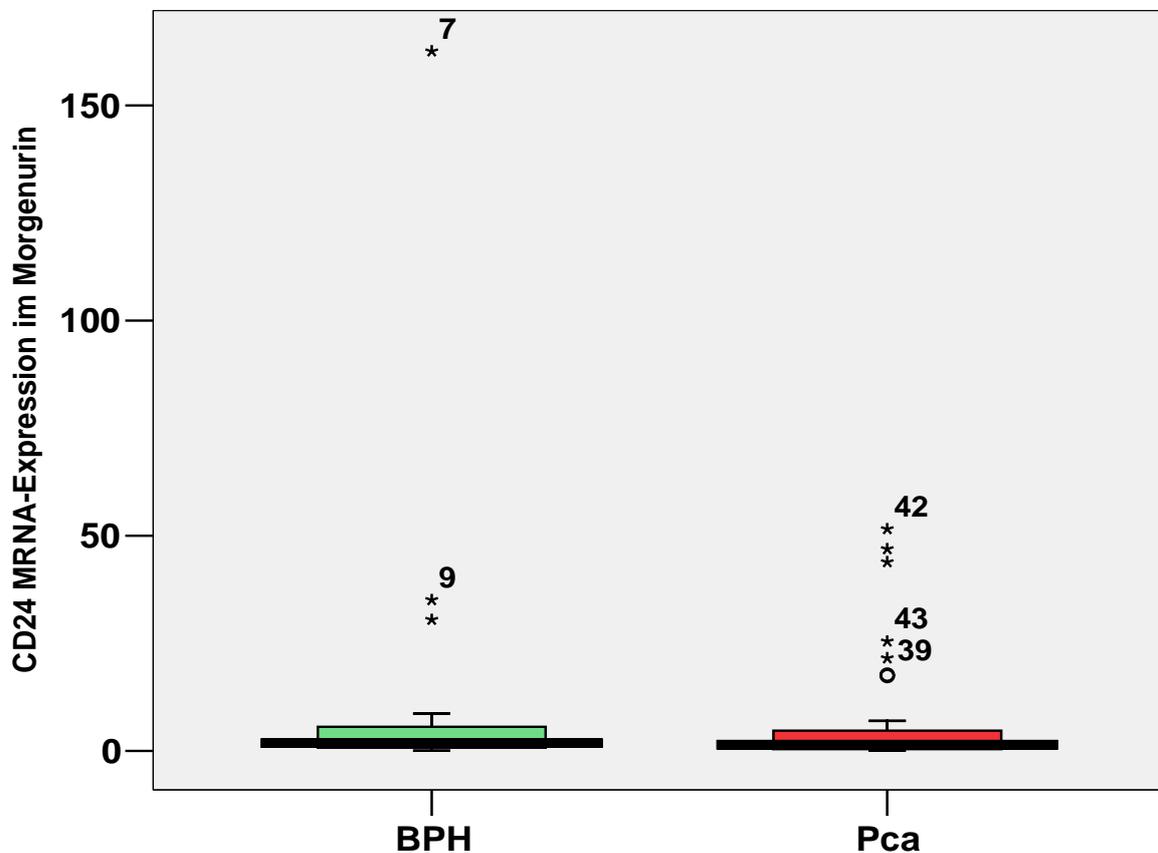


Abbildung 24: CD24 mRNA im Morgenurin (47Pca vs. 17 BPH).

Median, Quartilen (25%, 75%), Ausreißer (5%, 95%), Extreme.

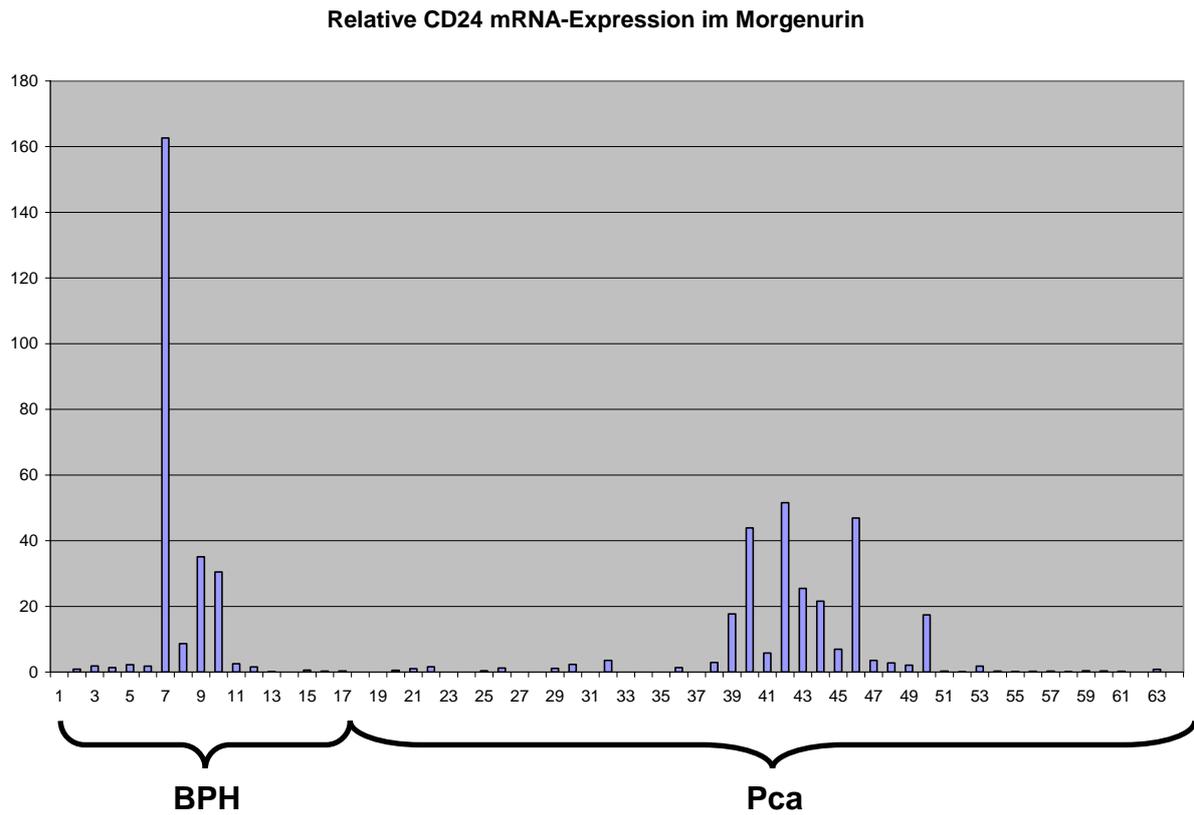


Abbildung 25: detaillierte CD24 mRNA-Expression in jedem individuellen Fall.

(N=64; 17 BPH + 47 Pca).

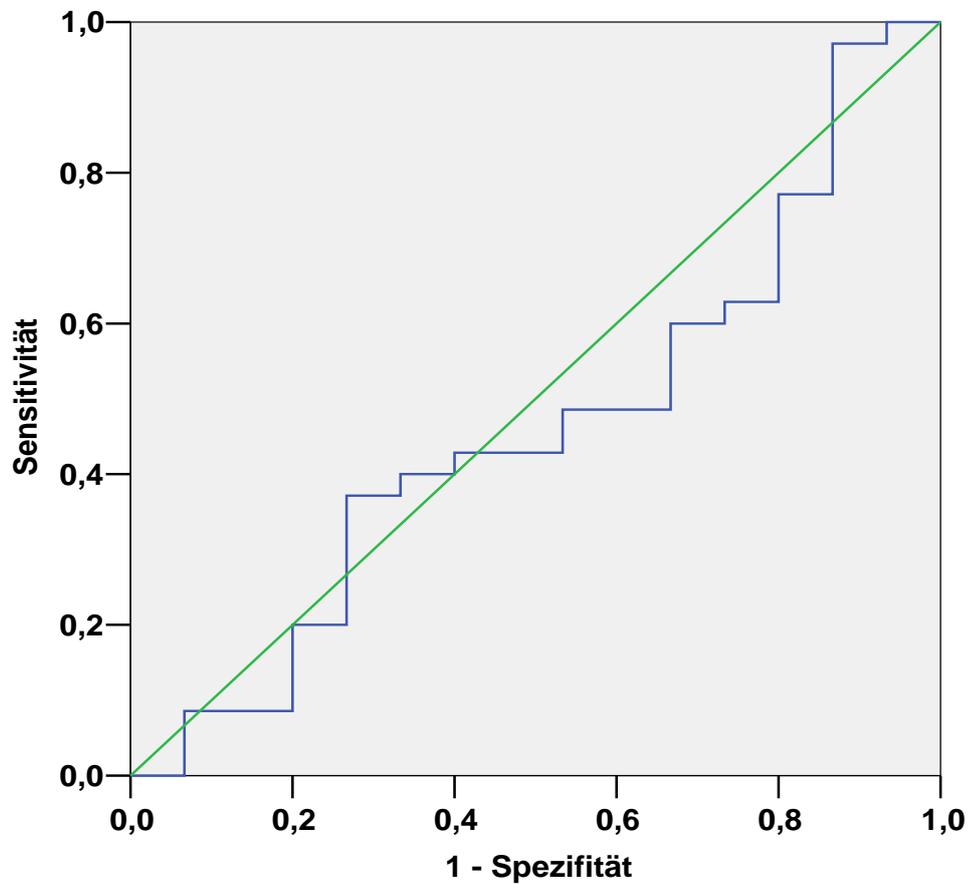


Abbildung 26: ROC-Kurve (blau) der CD24 mRNA-Expression im Morgenurin; Fläche unter der Kurve 0,463

Die Pca-Patientengruppe zeigte weder im Exprimaturin noch im Morgenurin eine Korrelation zwischen der relativen CD24 mRNA-Expression und verschiedenen klinischen Parametern wie Alter, klinisches Stadium, pathologischem Stadium, Lymphknotenstadium, Absetzungsrandern, Grading und dem Gleason-Score.

3.7. Einfluss einer Hormonablation auf die Promoter Hypermethylation des

“Detoxifying Glutathione-S-transferase P1 Gens” (*GSTP1*)

3.7.1. Patienten

Relevante klinische Daten der Patienten sind in Tabelle 14 dargestellt. Das mittlere Alter zum Zeitpunkt der Diagnose lag bei 65 Jahren (57 – 73 Jahre). Der Median des initialen PSA lag bei 14,4 ng/ml (6,4 – 63,7 ng/ml).

3.7.2. Methylierungsspezifische Polymerasekettenreaktion (MSP)

Durch die MSP konnte eine *GSTP1*-Promotor-Hypermethylation (*GSTP1* HM) in 13/15 der Proben nach radikaler Prostatektomie nachgewiesen werden. Die Mehrheit der Proben zeigte eine moderate Regression (Regressionsgrad 2). Nur bei zwei Patienten lagen minimale, bei einem starke Regressionsveränderungen nach HT vor. In zwei der Gewebeproben nach RPX lag laut MSP keine *GSTP1* HM vor (Abbildung 27). Beide Tumorproben zeigten moderate regressive Veränderungen (Tabelle 14).

Alle Proben aus Prostatabiopsien, welche vor der HT entnommen worden waren, zeigten eine *GSTP1* HM (8/8). Interessanterweise betraf dies auch die beiden Patienten, bei denen im RPX-Präparat keine *GSTP1* HM nachweisbar war. (Tabelle 14, Abbildung 28).

Fall	pT-Stadium	Finaler Gleason Score	RG	Biopsie GSTP1	RPX GSTP1
1	2	8	1	k.M.	Pos
2	2	7	2	k.M.	Pos
3	2	7	2	k.M.	Pos
4	2	8	2	Pos	Pos
5	2	6	2	k.M.	Pos
6	2	8	2	Pos	Pos
7	2	7	2	k.M.	Pos
8	2	6	2	k.M.	Pos
9	2	6	3	Pos	Pos
10	2	6	2	k.M.	Pos
11	2	6	2	Pos	Pos
12	2	7	2	Pos	Pos
13	2	7	2	Pos	Neg
14	2	6	2	Pos	Neg
15	2	7	1	Pos	Pos

Tabelle 14: Ergebnisse in der Gruppe der Pca-Patienten (n=15); Aufgelistet werden das pT-Stadium, der finale Gleason-Score, der Regressionsgrad nach Helpap (RG) [Helpap et al. 1985] sowie der GSTP1-HM-Status in der initialen Biopsie und dem korrespondierenden RPX-Präparat nach neoadjuvanter Hormontherapie (HT). Entspricht Tumor-DNA.

k.M. =kein Material, Pos = Positiv, Neg = Negativ.

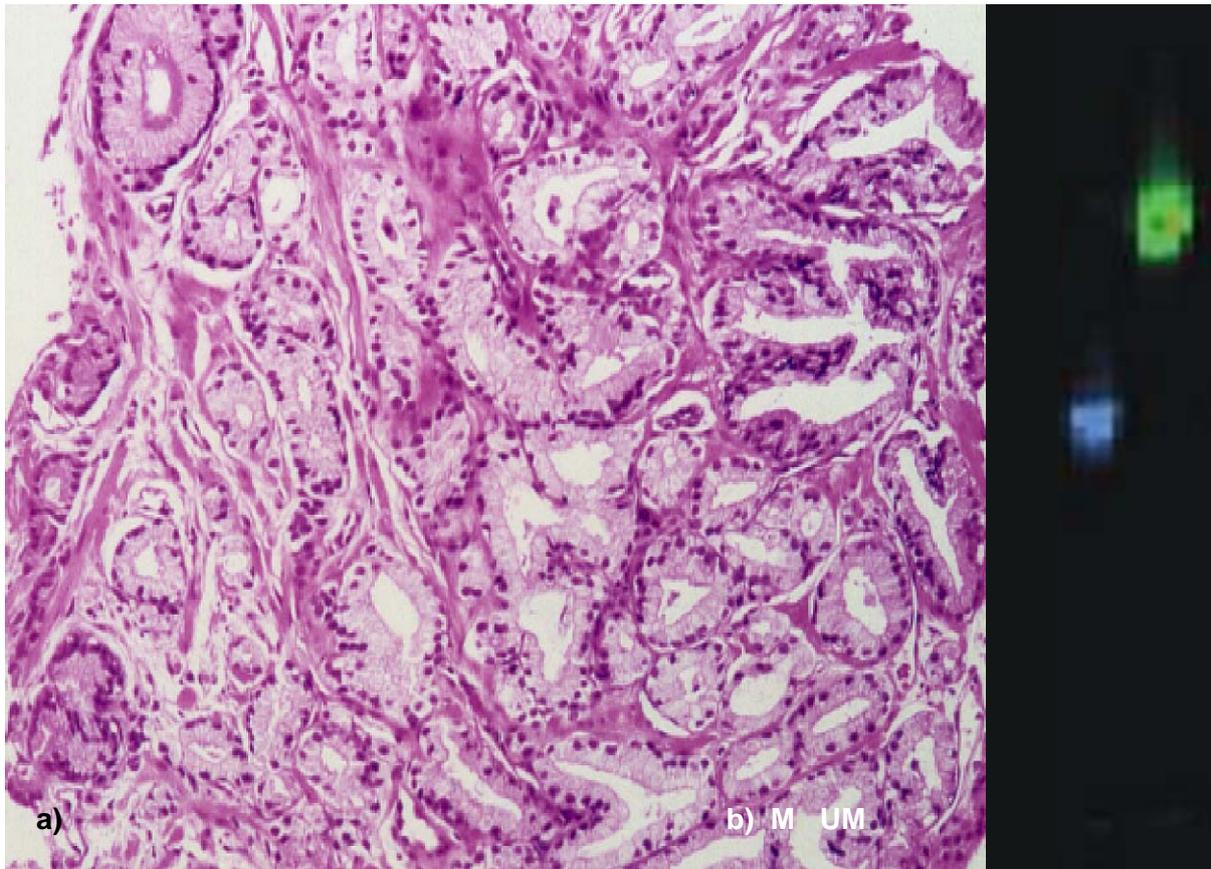


Abbildung 27: a) Prostatabiopsie mit gut differenziertem Adenokarzinom vor Beginn der neoadjuvanten antiandrogenen Therapie (HE-Färbung). b) Die Analyse der GSTP1 Promotor Hypermethylation zeigt das methylierte Produkt (M, 92-Baasenpaare (BP), blaue Fluoreszenz entspricht Tumor-DNA) und unmethylierte GSTP1-Promotorsequenzen (UN, 99-BP, grüne Fluoreszenz).

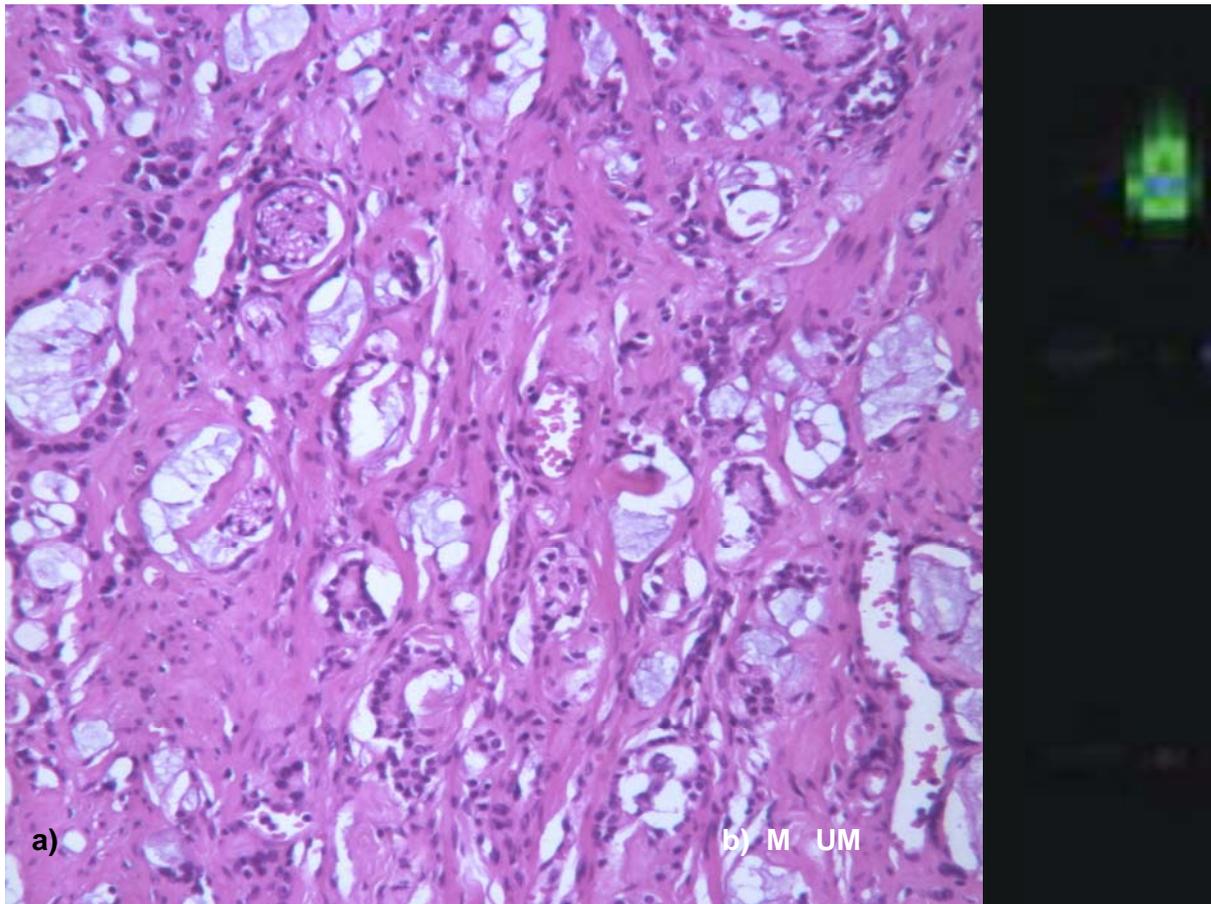


Abbildung 28: a) Präparat des gleichen Patienten nach neoadjuvanter Hormontherapie (NHT) und radikaler Prostatektomie. b) Die Analyse der GSTP1 Promotor Hypermethylation zeigt nur unmethylierte GSTP1-Promotorsequenzen (UN, 99-BP, grüne Fluoreszenz). Methylierte Sequenzen (M, 92-Baasenpaare (BP), blaue Fluoreszenz entspricht Tumor-DNA) fehlen.

4. Diskussion

4.1. PSA-Promoter-Polymorphismen

Einzelne Polymorphismen (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs) kommen im Genom sehr häufig vor [Judson et al. 2002]. Es handelt sich um natürliche Variationen des Genoms. Polymorphismen im Androgen-Rezeptor-Gen bei Prostatakrebspatienten sind ausgiebig dokumentiert [Fukatsu et al. 2004, Strom et al. 2004, Thompson et al. 2003]. Für den Brustkrebs wird eine Häufung von SNPs im Bereich BRCA1 und BRCA2 als Prädisposition zur Krebsentstehung angesehen [Kirchhoff et al. 2004]. Interessanterweise wurden auch im PSA-Promoter von Brustkrebspatientinnen Polymorphismen entdeckt [Bharaj et al. 2000, Majumdar, Diamandis 1999]. Es handelt sich um die gleiche Punktmutation im Bereich ARE I (Segment C, -158), die auch bei Pca-Patienten ausgiebig dokumentiert wurde. Die Häufigkeit wird zwischen 56 % und 87,3 % angegeben [Cramer et al. 2003, Wang et al. 2003, Medeiros et al. 2002, Severi et al. 2006]. In der vorliegenden Serie beobachteten wir diesen SNP in 66,6% der Pca-Fälle. Es wurde ein hochsignifikanter Unterschied in der Häufigkeit dieses SNP zwischen Prostatakrebspatienten und den altersentsprechenden Kontrollen (27,3 %) gesehen. Die meisten Autoren fanden ebenfalls einen signifikanten Unterschied [Cramer et al. 2003, Medeiros et al. 2002], allerdings beschrieben Wang et al., dass in der japanischen Population kein Unterschied in der Prävalenz dieses Polymorphismus zwischen Pca- und BPH-Patienten bestünde (57,9 % bei Pca- vs. 56,7 % bei BPH-Patienten).

Der SNP bei -158 wurde in unserer Studie in drei Gruppen klassifiziert: Wildtyp (GG), Heterozygot (GA) und Homozygoter SNP (AA). Es zeigte sich keine Korrelation zwischen dem Ausmaß der DNA-Störung und dem Stadium der Erkrankung (s. o.). Analysiert wurde dabei die lokale Ausdehnung, der Lymphknotenstatus, der Absetzungsrandstatus (im Falle einer RPX) sowie eine mögliche Fernmetastasierung. Diese Feststellung wird zwar durch Wang et al. bestätigt [Wang et al. 2003], Medeiros et al. beobachteten jedoch eine Assoziation [Medeiros et al. 2002]. Möglicherweise sind die Unterschiede in der Rasse bedingt. Wir untersuchten deutsche, Wang et al. japanische und Medeiros et al. portugiesische Männer.

Vier der in der vorliegenden Arbeit dargestellten Polymorphismen im Bereich der Promoterregion des PSA-Gens werden erstmals dargestellt: -179, -230 und -233 (Segment C, ARE I) sowie -356 (Segment B, ARE II). Sämtliche neu vorgestellten Polymorphismen sind jedoch -zumindest in unserer Kohorte aus insgesamt 334 Patienten- äußerst selten. Zusätzliche, seltene Polymorphismen an anderen Stellen traten in der Kontrollgruppe sogar in höherer Frequenz als bei Pca-Patienten (20 % vs. 9,7 %) auf, jedoch lässt die für diese Frage zu kleine Kontrollgruppe (n=55) keine abschließende Aussage zu, ob dieser Unterschied

klinisch bedeutsam und tatsächlich signifikant ist. Bei Patienten mit mehreren SNPs bestand keine Korrelation zum Stadium der Erkrankung (zum Beispiel: mehrere SNPs bedeuten ein weiter fortgeschrittenes Stadium).

Die vorliegende Untersuchung verwendet eine SSCP mit konsekutiver Sequenzanalyse, um den SNP zu verifizieren. Dieses Verfahren ist sehr aufwendig. Andere Autoren benutzten lediglich die ebenfalls von uns durchgeführte Restriktionsanalyse. Diese ist jedoch nur geeignet, den Polymorphismus bei -158 festzustellen. In Anbetracht der von uns festgestellten Seltenheit anderer Polymorphismen wäre ein Kollektiv von Tausenden Patienten und Gesunden notwendig, um eine eventuelle Assoziation dieser zusätzlichen SNPs zum Pca zu beweisen.

Cramer et al. untersuchten die PSA-Promoterregion ebenfalls unter Verwendung einer Sequenzanalyse. Diese Studiengruppe entdeckte auch eine Reihe von zusätzlichen Polymorphismen, welche bei 1,97 % bis 29,78 % der Fälle vorlagen [Cramer et al. 2003]. Jene SNPs wurden unsererseits nicht gesehen, weil sie außerhalb der von uns untersuchten Sequenzen lagen.

Die in der PubMed-Genome-Datenbank hinterlegte Gen-Sequenz stammt von drei „typischen“ gesunden Männern. DNA-SNPs bestehen naturgemäß seit der Geburt. Sofern ein SNP für die Entstehung einer Krebserkrankung prädisponiert, so bleibt dennoch der konkrete Ausbruch der Erkrankung –zumindest zeitlich- unsicher. Im Übrigen ist die Entstehung von Krebs ein höchst komplexes, multifaktorielles Geschehen, welches in verschiedenen Phasen abläuft. Eine Prädisposition bedeutet in keinem Fall ein garantiertes Auftreten der Erkrankung. Denkbar wäre, dass die Freiwilligen, die für die Genomsequenzierung zur Verfügung standen, in höherem Alter an einem Prostatakarzinom erkrankt wären. Ein eventuell vorhandener SNP wäre als „normal“ hinterlegt. Dies vorausgesetzt würde ein Vergleich unserer Patienten mit dieser Sequenz zu einem –falsch negativen- Ergebnis führen. In der vorliegenden Studie setzte sich die altersentsprechende Kontrollpopulation aus Patienten mit den unterschiedlichsten (urologischen) Erkrankungen zusammen: Steinerkrankungen, BPH, Zystitis u. a.. Bei diesen Patienten bestand zwar zum Zeitpunkt der Blutabnahme sicher kein Pca, jedoch ist es denkbar, dass ein Teil der „Gesunden“ im weiteren Leben doch ein Pca entwickelt. Verschiedene Autoren berichten von einer ansteigenden Häufigkeit eines (bis zum Tod aus anderen Gründen asymptomatischen) Prostatakarzinoms bei seziierten Männern. In der 4. Lebensdekade bestünde laut Sakr et al. bereits bei 29% ein (latenter) Prostatakrebs [Sakr et al. 1994]. Diese Tatsache führt zu einer falsch zu niedrigen Differenz in der Auftretenswahrscheinlichkeit von malignen Befunden und „Gesunden“.

Unsere Kontrollgruppe ist deshalb nahezu altersgleich mit den Karzinompatienten. Auf diese Weise konnten wir zumindest ausschließen, dass die Kontrollpatienten im für eine eventuelle Beeinträchtigung des Überlebens relevanten Zeitraum an einem Prostatakrebs erkrankt waren. In anderen Serien wurden zum Teil „Gesunde Kontrollen“ verwendet, welche nicht altersgleich und nicht auf Ihre tatsächliche urologische Situation hin überprüft worden waren (z. B. Blutspender) [Wang et al. 2003, Medeiros et al. 2003]. Insofern ist diese Studie nicht direkt vergleichbar mit den beschriebenen Serien.

Bei den Patienten der Kontrollgruppe mit histologisch gesicherter benigner Hyperplasie der Prostata war im Falle eines erhöhten PSA oder eines Tastbefundes wenigstens eine 10-fach-Stanzbiopsie, bei klinischer Obstruktion anschließend zusätzlich eine TUR-P oder Enukleation erfolgt. In den Fällen mit unauffälligem Tastbefund und unauffälligem PSA nur eine TUR-P oder Prostataenukleation. Bei letzteren Patienten besteht zwar die theoretische Möglichkeit, dass sich in der peripheren Zone ein okkultes Pca befindet und die Erkrankung dieses Patienten folgerichtig als falsch benigne klassifiziert wird, dieses Risiko liegt jedoch sicher unter 5% (kein Tastbefund, unauffälliges PSA und negatives Resektat). Wir verzichteten deshalb auf eine zusätzliche Biopsie der Peripherie weil sie weder klinisch notwendig, noch ethisch vertretbar wäre.

SNPs in Promoterregionen könnten dazu führen, dass die Exons der entsprechenden Gene nicht oder nicht mehr richtig exprimiert werden. PSA ist kein eigentliches Onkogen, sondern ein Enzym, welches die Funktion der Spermaverflüssigung in der Prostata erfüllt. Sofern die Expression (durch den SNP im Promoter) gehemmt ist, müsste das Proteinprodukt PSA geringer ausgeprägt vorliegen als im Normalfall. Im Gegensatz dazu weisen die meisten der Pca-Patienten ein erhöhtes PSA auf. Dieser im Prinzip reziproke theoretische Zusammenhang bleibt unklar. Denkbar wäre, dass andere (relevante) Gene durch die SNPs in dieser Region ebenfalls in der Expression gestört werden. Abbildung 29 zeigt, dass in unmittelbarer Nähe der festgestellten Polymorphismen potenzielle Transkriptionsbindungsstelle anderer Gene liegen.

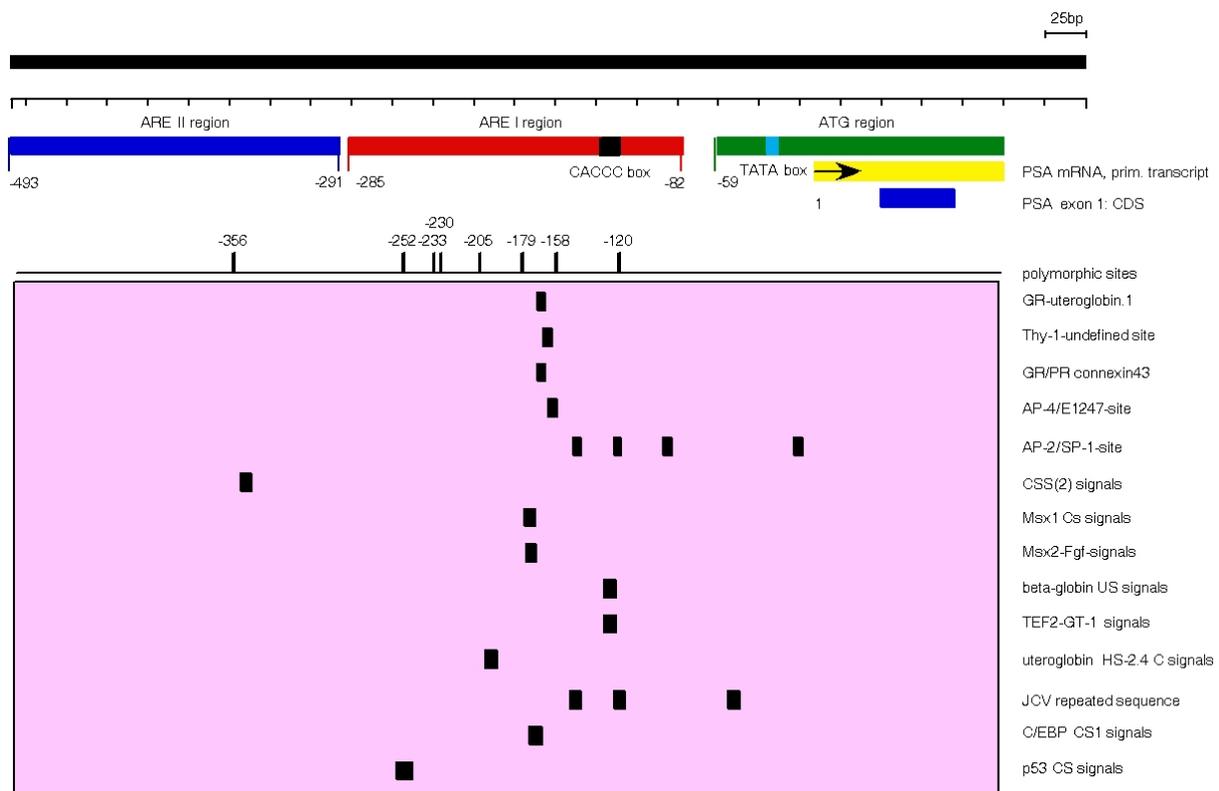


Abbildung 29: Potenzielle Transkriptionsorte andere Gene in der überprüften Region

In der vorliegenden Studie wurden vier Segmente mit etwa 200 Basenpaaren Länge auf das Vorhandensein von Polymorphismen überprüft. Die Segmente enthielten „wichtige“ Regionen wie die sog. Androgenreponsiblen Elemente (ARE). PSA wird androgenabhängig sezerniert. Insofern sind die Bereiche, in welchen die Androgene einen Effekt auf die Expression ausüben, besonders wichtig. Trotzdem wäre es denkbar, dass weitere (wichtige) SNPs außerhalb dieser Segmente bestehen und durch die vorliegende Untersuchung übersehen wurden. Besonders sensibel für Polymorphismen scheint die Region C (ARE I) zu sein. Im Bereich A (ARE III) sowie im Bereich D (Startcodon der Exons) traten überhaupt keine Polymorphismen auf.

Die SSCP-Analyse testete die Konfiguration gegen LnCap-DNA. LnCap ist eine Zelllinie eines metastasierten Prostatakarzinoms. Sofern in der korrespondierenden LnCap-Sequenz ebenfalls SNPs bestünden, würde ein Teil eventuell vorhandener SNPs der Patienten nicht erkannt. Die LnCap-Sequenz entspricht jedoch der in der PubMed-Genome-Datenbank hinterlegten Sequenz. Der Gebrauch von LnCap-DNA als Kontrolle in der SSCP erscheint daher gerechtfertigt.

Eine SSCP sollte stets bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt werden, da so ein höherer Anteil der auf Polymorphismen suspekten Sequenzen aufgedeckt werden kann. In den

Analysen der vorliegenden Arbeit konnte jedoch kein zusätzlicher Polymorphismus durch eine SSCP bei 04 Grad Celsius gesehen werden, der nicht auch bei Raumtemperatur zu sehen war.

4.2. PSA mRNA in pelvinen Lymphknoten bei Pca-Patienten

Unsere Arbeitsgruppe konnte im Vorfeld zeigen, dass eine RT-PCR von PSA mRNA geeignet ist, Absetzungsrän­der im Rahmen einer radikalen Prostatektomie auf eine Infiltration mit Tumorzellen hin zu untersuchen. Bislang wurde der Einzug einer PCR-basierten Methode in die Routine durch verschiedene Probleme verhindert. Zum einen sind die Primer für PSA zwar organ-, jedoch nicht karzinomspezifisch, zudem variiert die Expression sowohl im Primärtumor als auch in seinen Absiedelungen, zum anderen ist die Expression der Primer androgenabhängig. Die PSA-Expression nimmt unter Hormonentzug ebenso ab wie die hK2-Expression, die des prostataspezifischen Membran-Antigens (PSMA) nimmt hingegen zu [Wright et al. 1996]. Gelegentlich scheint PSMA auch von normalen Leukozyten exprimiert zu werden [Lintula et al. 1997]. Smith beschrieb das gleiche Phänomen auch für PSA [Smith et al. 1995]. Die Arbeiten unserer Arbeitsgruppe [Straub et al. 2002, Schostak et al. 2007] sind zudem RNA-basiert. RNA degradiert sehr rasch. Für derartige Untersuchungen muss daher Frischgewebe gewonnen und sofort verarbeitet werden.

Wir haben die beschriebene sehr hohe Sensitivität und Spezifität der Methode ausgenutzt und trotzdem im Prinzip nur eine qualitative Aussage getroffen. Die Tatsache, dass PSA sowohl von Karzinom wie auch von benignem Gewebe exprimiert wird, spielt in Lymphknoten keine Rolle, da benignes Gewebe nicht metastasiert. Insofern ist der Nachweis von PSA mRNA in pelvinen Lymphknoten in jedem Fall als pathologisch anzusehen. Dieser Überlegung folgend wäre wahrscheinlich auch eine nicht quantitative Methode, z. B. eine PCR, grundsätzlich geeignet gewesen, eine ähnlich Aussage zu treffen. Wir wollten jedoch die besonders hohe Sensitivität des RT-PCR-Verfahrens ausnutzen.

Nahezu sämtliche Details der histopathologischen Klassifikation des Prostatakrebses sowie ein initiales PSA über 10 ng/ml gelten als prognostische Faktoren: Grading, Gleason-Score, T-Stadium, Resektionsrän­der. Histologisch nachgewiesene Lymphknotenmetastasen gelten als der härteste Vorhersageparameter für einen späteren Progress mit Fernmetastasen, unabhängig vom scheinbaren Erfolg einer lokal „kurativen“ Maßnahme [Beyer et al. 2003, Catalona et al. 1998, Cooperberg et al. 2005, Graefen et al. 1999, Hull et al. 2002, Moul et al. 2001, Rasiah et al. 2003, Walsh et al. 1994]. Im Falle unbehandelter tumorbefallener Lymphknoten liegt die Wahrscheinlichkeit eines zehnjährigen progressionsfreien Überlebens

deutlich unter 20 % [Gervasi et al. 1989, Messing et al. 2006]. Im Gegensatz dazu besteht bei lymphknotenpositiven Patienten, die eine radikale Prostatektomie und eine sofortige adjuvante Hormontherapie erhalten haben, eine exzellente lokale Tumorkontrolle und es liegt ein vergleichbares krankheitsspezifisches Überleben vor wie bei Patienten mit negativen Lymphknoten [Messing et al. 2006]. Aus diesem Grund wird im Allgemeinen bereits unmittelbar nach der Sicherung dieser Diagnose (pelvine Lymphadenektomie) eine systemische Therapie im Sinne einer Hormonablation begonnen. Die in der vorliegenden Studie 12 histologisch als pN1 klassifizierten Patienten wurden postoperativ mit einem LHRH-Analogon behandelt. In ca. 30 % der Fälle kommt es trotz der Klassifikation als vermeintlich lokal begrenzte Erkrankung später zum systemischen Progress [Diblasio et al. 2003, Han et al. 2001]. Nur bei einem Teil dieser Patienten handelt es sich dabei um ossäre, das heißt sicher hämatogene Metastasen, bei einem anderen Teil liegen Lymphknotenmetastasen vor. Heidenreich und Bader führen dies vor allem auf das jahrelang übliche, begrenzte Gebiet der Lymphadenektomie zurück. 10 bis 30 % initial tumorbefallener Lymphknoten befinden sich außerhalb der Obturatorius-Loge und werden bei der Standard-Lymphadenektomie daher nicht erfasst [Heidenreich et al. 2002, Bader et al. 2002]. Seit einigen Jahren führen wir deshalb eine erweiterte (extended) Lymphadenektomie durch. Die Daten der vorliegenden Studie basieren jedoch auf einem konventionellen Dissektionsgebiet, welches sich nur auf die Obturatorius-Loge begrenzt. Trotzdem bleibt es im individuellen Fall unklar, ob es sich im Falle des Lymphknoten-Progresses um primär wegen des zu kleinen Gebietes nicht operativ entfernte, jedoch prinzipiell bereits vorhandene Lymphknotenmetastasen handelt oder ob lediglich die initiale histologische Diagnose nicht korrekt gestellt wurde. Im Mittel wurden in der vorliegenden Studie 6,53 Lymphknoten je Patient entfernt. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten, die im Rahmen einer radikalen Prostatektomie offen operiert worden waren und solchen, die eine laparoskopische Lymphadenektomie erhalten hatten. Derzeit werden in unserer Klinik im Rahmen der Extended Lymphadenektomie durchschnittlich 18.5 Lymphknoten entfernt. Bader et al. zeigten, dass es lymphknotenmetastasierte Fälle gibt, bei welchen es im Lauf der Jahre trotz fehlender systemischer Therapie niemals zu einem Progress kommt. Signifikante Unterschiede zeigten sich dabei zwischen Patienten, bei denen ein minimaler Lymphknotenbefall (maximal ein Lymphknoten betroffen) vorlag und solchen mit Metastasen in mehreren Lymphknoten [Bader et al. 2003]. Nicht jede "sichere" Lymphknotenmetastasierung ist daher als prognostisch äquivalent anzusehen.

Die histopathologische Sensitivität für Mikrometastasen ist besonders gering. Es wurde errechnet, dass ein Pathologe nur eine einprozentige Chance hat, eine Mikrometastase mit einem Durchmesser von drei Tumorzellen auch zu finden [Neville et al. 1990]. Basis der vorliegenden Arbeit war es daher, nicht die initiale histologische bzw. immunhistochemische Klassifikation der Lymphknotenmetastasierung, sondern den klinischen Verlauf als Referenzparameter für die Prädiktionskraft der vorgestellten molekularbiologischen Methode anzuwenden. Eine Sensitivität und/oder Spezifität könnte nur gegenüber einer Standardmethode (Histopathologie) bestimmt werden. Hierbei wird als korrekt bestimmt bezeichnet, wenn die Referenzmethode diesen Fall identisch beurteilt hat. Die Prädiktion einer Methode richtet sich hingegen nach dem klinischen Verlauf. Als positive Prädiktion wurden alle Fälle der vorliegenden Studie gewertet, in welchen die PSA-mRNA-RT-PCR der Lymphknoten ein positives Ergebnis zeigte und es im Beobachtungszeitraum von sechs Jahren zu einem Progress kam. Als negative Prädiktion wurde demgegenüber gewertet, wenn PCR oder RT-PCR ein negatives Ergebnis zeigte und es nicht zum Progress kam. Die hier vorgestellte Methode stellt das biologische Potenzial des Tumors in den Mittelpunkt. Da es wie erwähnt zahlreiche Fälle gibt, die eine unerwartete Entwicklung zeigen, ist die histologische Klassifikation zum Zeitpunkt der Diagnose offenbar weniger relevant als der klinische Verlauf. Shariat et al. zeigten, dass nur 40 % von 199 Patienten mit histopathologisch klassifizierten pT3 pN0-Tumoren keine PSA mRNA-Expression (RT-PCR) in Lymphknoten aufwiesen [Shariat et al. 2003]. Andere Serien erbrachten teilweise kontroverse Ergebnisse [Deguchi et al. 1993, Ferrari et al. 1997, Okegawa et al. 2000, Potter et al. 2000]. Die neue Methode kann nur dann als „besser“ eingestuft werden, wenn wenigstens alle durch die konventionelle Diagnostik identifizierten positiven Lymphknoten ebenfalls detektiert werden. Hier zeigen sich Defizite in der vorliegenden Studie: 2/12 (16.6 %) der histologisch bestätigten positiven Lymphknoten wurden durch die RT-PCR als negativ eingestuft. Shariat berichtete von einer vergleichbaren Rate [Shariat et al. 2003]. In anderen Serien wurden hingegen alle pN1-Klassifikationen via RT-PCR bestätigt [Kurek et al. 2004, Martinez-Pineiro et al. 2003]. Mehrere Erklärungsmöglichkeiten existieren für diese „falsche Klassifikation“: Die Lymphknoten wurden im Rahmen der vorliegenden Studie unmittelbar nach der chirurgischen Entfernung in zwei Portionen geteilt, von denen die erste der histologischen Analyse, die zweite der molekularbiologischen Methode zugeführt wurde. Denkbar wäre, dass in den zwei Fällen, welche mithilfe der RT-PCR nicht detektiert wurden, die Metastasierung tatsächlich nur in jener Portion vorlag, die der konventionellen histologischen Analyse zugeführt wurden. Das unklare biologische Verhalten mancher

Tumore ist eine weitere mögliche Erklärung. In der Tat gibt es Fälle mit einer extrem hohen Progressionswahrscheinlichkeit (z. B. Gleason-Score 10), bei denen es dennoch nicht zum Progress kommt und umgekehrt. Ein biochemischer Progress tritt üblicherweise früher auf, wenn Tumore mit einem hohen Progressionspotenzial vorliegen (Gleason 8 oder mehr, positive Absetzungsränder, positive Lymphknoten usw.) und später, wenn ein niedriges Progressionsrisiko besteht [Freedland et al. 2005]. Allerdings zeigen Langzeitbeobachtungen, dass es auch nach 20 Jahren noch zum biochemischen Rezidiv kommen kann [Allaf et al. 2006]. Bei acht der progredienten Patienten unserer Serie hat sich der biochemische Progress erst innerhalb der letzten 12 Monate, d. h. nach über fünf Jahren gezeigt. Bei 13 RT-PCR-positiven Patienten bestand auch nach sechs Jahren noch immer kein Progress. Drei dieser 13 Patienten waren jedoch primär histologisch als pN1 klassifiziert worden und erhalten deshalb noch immer eine Hormonablation. Nach Messing ermöglicht eine kombinierte Therapie aus Operation und Hormonentzug bei einer Vielzahl der Betroffenen eine vollständige Progressionsfreiheit innerhalb der Lebensspanne des Betroffenen [Messing 2006]. Deshalb kann die Validität dieser drei "falsch positiven" RT-PCR-Befunde möglicherweise niemals klinisch bestätigt werden. Wären diese Patienten unbehandelt geblieben, ergäbe sich ein besserer positiver prädiktiver Wert der Methode (17/27, 62,96%). Im Gegensatz zu Aussage von Messing zeigte sich allerdings in unserem Kollektiv bei acht von 12 histologisch detektierten und hormontherapierten pN1-Patienten ein späterer biochemischer Progress. Ob dies jemals klinische Auswirkungen haben wird, bleibt zunächst offen.

Über die vorgenannten Patienten hinaus hatten drei weitere histologisch negative, jedoch RT-PCR-positive Patienten wegen einer ungünstigen Gleason-Klassifikation neoadjuvant vor Strahlentherapie eine dreimonatige Hormonentzugstherapie erhalten. Möglicherweise führt dies ebenfalls zu einem späteren Progress und es zeigen sich deshalb zur Zeit noch „falsch positive“ RT-PCR-Resultate.

In unserer Klinik wird ein Hormonentzug nach Radikaloperation nur durchgeführt, wenn sich histologisch positive Lymphknoten zeigen. Hingegen wurde bei einigen Patienten mit positiven Schnitträndern eine adjuvante Bestrahlung der Prostataloge durchgeführt. Dies beeinflusst nicht den Lymphknotenstatus und ist daher für die vorliegende Untersuchung ohne Relevanz.

Wir verwenden einen sog. „supersensitiven“ PSA-Test. Die untere Detektionsgrenze liegt bei 0,02 ng/ml. Sofern nach radikaler Prostatektomie ein postoperativer Nadir unterhalb dieser Nachweisgrenze erreicht wurde, wurde ein durch eine Kontrolle nach zwei Wochen bestätigter PSA-Wert über 0,02 ng/ml als biochemisches Rezidiv gewertet. Es bleibt unklar,

welche untere PSA-Grenze als Standard verwendet werden sollte. Andere Serien verwandten „nicht nachweisbar“ bis 0,4 mg/ml [Shariat et al. 2003, Edelstein et al. 1996, Okegawa et al. 2000]. Bei Patienten, die eine perkutane Radiotherapie nach vorangegangener pelviner Lymphadenektomie mit unauffälliger Histologie erhalten hatten, wurden die ASTRO-Kriterien angewandt [Consensus Statement 1997]. Diese befinden sich zwar speziell wegen der Rückdatierung des biochemischen Versagens [Kuban et al. 2005] in der Diskussion, es handelte sich aber zur Zeit der Auswertung um den in unserer Klinik und ganz Deutschland gültigen Standard. 2006 wurden die Ergebnisse einer neuerlichen Konsensus-Konferenz veröffentlicht [Roach et al. 2006].

Der optimale Zeitpunkt für eine sekundäre Hormontherapie ist unklar. Einige Studien zeigen zum Beispiel, dass ein früher Hormonentzug das Langzeitüberleben zwar nicht beeinflusst, aber die Lebensqualität durch Vermeidung krankheitsspezifischer Symptome verbessern kann [Newling 2001]. Andere warnen vor Risiken und Nebenwirkungen des Hormonentzuges (z. B. Osteoporose) und weisen auf zahlreiche, überflüssig behandelte Patienten hin. Sie empfehlen deshalb einen verzögerten Einsatz, erst als Sekundärtherapie [Fowler et al. 2002, Hoff et al. 2005, Abrahamsson et al. 2005]. In dieser Hinsicht eröffnet die besonders niedrige untere Nachweisgrenze in unserer Serie die Möglichkeit einer Sekundärtherapie sobald sich ein Wiederanstieg des PSA zeigt. Klinische Konsequenzen (Überleben?) dieser Therapiemöglichkeit bleiben jedoch noch unklar.

Ein biochemisches Rezidiv nach radikaler Prostatektomie kann unterschiedliche Gründe haben: ein lokales Rezidiv in der Prostataloge, Lymphknotenmetastasen oder eine Fernmetastasierung. Das Intervall seit dem Eingriff kann gewisse Hinweise auf die Lokalisation geben. Im Falle von Lymphknotenmetastasen kommt es früher zum PSA-Rezidiv als beim Vorliegen eines Lokalrezidives [Freedland et al. 2005]. Unter der Annahme eines Lokalrezidives wäre eine Bestrahlung des Prostatagebietes oder andere lokale Verfahren wie hochintensiver fokussierter Ultraschall (HIFU) eine Therapieoption [Gelet et al. 2004, Chaussy et al. 2005]. Liegen jedoch in Wirklichkeit Lymphknotenmetastasen vor, führen diese Maßnahmen naturgemäß nicht zum Erfolg, bergen jedoch die Gefahr von Nebenwirkungen. Stattdessen wäre eine Hormonablation indiziert. Zusätzliche Marker wie die hier vorgestellte Methode weisen Auswege aus diesem Dilemma. Die RT-PCR könnte entscheidende Hinweise geben, ob eine lokale Salvage-Maßnahme oder eine systemische Hormonablation angezeigt ist.

Vom Hersteller wird PBGD als ideales Referenz-Gen (Housekeeping-Gen) angegeben. Diese Angabe basiert laut den beiliegenden Informationen auf einer umfangreichen Serie von

internen Untersuchungen. Die PBGD mRNA-Expression ist vollständig stabil unter verschiedensten experimentellen Bedingungen und liegt darüber hinaus im mRNA-Expressionsbereich des Zielgens. Keine anderen Referenzgene wurden verwendet.

4.3. Alpha-methylacyl-CoA-Racemase (AMACR) in Prostatagewebe

Die Entdeckung des Prostatasezifischen Antigens (PSA) 1970 [Ablin et al. 1970] hat die Diagnostik des Prostatakrebses revolutioniert. Bis zur Einführung des PSA in die Klinik konnte das Pca quasi ausschließlich durch das Tasten eines Knotens bei der digital rektalen Untersuchung, gefolgt von einer bioptischen Sicherung, festgestellt werden. Lokal fortgeschrittene Stadien gehören heutzutage eher der Vergangenheit an. PSA zeigt eine hohe Sensitivität, jedoch eine sehr niedrige Spezifität als Serummarker für das Pca. Das Protein wird sowohl in malignem, wie auch in normalem und BPH-Gewebe exprimiert. Ejakulationen oder digital-rektale Untersuchungen können zu extremen Schwankungen führen. Aus diesem Grund ist es in den letzten Jahren zu einem steigenden Anteil von (im Prinzip überflüssigen) Prostatabiopsien mit winzigen Pca-Herden oder sogar ohne Tumorzellen gekommen. Dies bedeutet eine große Herausforderung für den Pathologen. Unabhängig von atypischen Drüsen und Kernatypien ist vor allem das Fehlen der Basalmembran in der HE-Färbung ein wichtiger Hinweis für das Vorliegen eines Pca [Thorson et al. 2000]. Wenn die konventionelle Färbung kein eindeutiges Ergebnis liefert, werden heute meistens immunhistochemische Untersuchungen mit 34ßE12 und/oder K903-Antikörpern [Thorson et al. 2000, Abrahams et al. 2002, Varani et al. 1999] gegen verschiedene Zytokeratine durchgeführt. Allerdings weisen diese Prozeduren ebenfalls technische Grenzen auf. Verwertbare Resultate lassen sich nur erreichen, wenn es gelingt, die Basalmembran benigner Zellen innerhalb derselben Probe nachzuweisen. Dies ist als interner Standard erforderlich. Eine Langzeit-Formalinfixierung ist dafür bekannt, die Detektion von Basalzellen zu behindern [Varma et al. 1999 und 2005, Zhou et al. 2003, Magi-Galluzzi et al. 2003]. Überdies führen einige benigne Veränderungen in der Prostata ebenfalls zu einer Kontinuitätsunterbrechung der Basalmembran. Umgekehrt können einige Varianten des Pca (duktales Karzinom) die Anwesenheit einer Basalmembran simulieren [Oliai et al. 2002]. Der immunhistochemische Nachweis des AMACR P504S-Proteins wurde jüngst mit großem Erfolg als ergänzende Technik eingeführt [Magi-Galluzzi et al. 2003, Jiang et al. 2001, 2002 und 2004, Beach et al. 2002, Luo et al. 2002, Rubin et al. 2002, Zhou et al. 2002, Evans et al. 2003]. AMACR ist ein in die β -Oxidation verzweigtkettiger Fettsäuren involviertes Protein [Mobley et al. 2003]. Es ist unabhängig von der Anwesenheit einer Basalmembran. Es zeigt eine Sensitivität zwischen 82 und 100 % sowie eine Spezifität zwischen 79 und 100 % [Evans et al. 2003]. Das

immunhistologische Verfahren kann Krebsherde sogar nach einer Bestrahlung der Prostata [Yang et al. 2003] oder einer Langzeit-Hormonablation [Suzue et al. 2005] detektieren. Hier weisen die konventionelle Histologie (HE) und oben erwähnte immunhistochemische Verfahren erhebliche Schwächen auf. Die vorliegende Studie zeigt, dass eine quantitative AMACR mRNA-Analyse mithilfe einer RT-PCR ebenfalls mit einer hohen Spezifität und akzeptablen Sensitivität in der Lage ist, einen Prostatakrebs von einer BPH zu unterscheiden. Die Tatsache, dass unsere Studie zwar eine vergleichbare Spezifität aufweist wie Serien, in welchen eine AMACR-Immunhistochemie angewandt wurde, dass jedoch eine deutlich niedrigere Sensitivität besteht, deutet darauf hin, dass das untersuchte Gewebe relativ heterogen in puncto AMACR mRNA-Expression sein muss. Eine Lasermikrodissektion hätte möglicherweise das Resultat verbessern können. Dies entsprach jedoch nicht unserem Ziel, eine möglichst einfache molekularbiologische Methode zu entwickeln. In unserem Experiment wurden die Gewebeproben vor der mRNA-Analyse mithilfe einer HE-Färbung untersucht. Nur Proben mit einem hohen Tumoranteil wurden der weiteren Analyse zugeführt. Immunhistologische Studien zeigen, dass die AMACR-Immunfärbung eine sinnvolle Ergänzung speziell bei sehr kleinen Tumoren darstellt. Wie klein der minimale Tumoranteil sein darf, um gerade noch ein positives Ergebnis zu erzielen, bleibt unklar. Sofern die mRNA-Expression auch in Gewebeproben mit winzigen Tumoren detektiert werden kann, erlaubt dies prinzipiell die Anwendung in Gewebeproben nach Nadelbiopsien und sogar in Urinproben oder prostatistischen Sekreten. Rogers et al. gelang es, AMACR mithilfe einer Western-Blot-Analyse im Urin nachzuweisen [Rogers et al. 2004], Zielie et al. erzielten das gleiche Resultat mithilfe einer RT-PCR in Prostatasekreten (Exprimaturin) [Zielie et al. 2004]. Sollte es in Zukunft gelingen, die Sensitivität zu verbessern und damit die untere Nachweisgrenze zu senken, so könnte die in unserer Studie vorgestellte Technik eine exzellente Ergänzung der konventionellen und/oder immunhistochemischen Diagnostik in Zweifelsfällen darstellen.

In der vorliegenden Untersuchung zeigte sich keinerlei Korrelation zwischen dem mRNA-Expressionsniveau und klinischen oder pathologischen Parametern wie dem Tumorstadium oder der Metastasierung. Die in Tabelle 7 dargestellten Pca-Fälle stellen eine Mischung verschiedenster Tumorstadien ohne eine spezielle Selektion dar. Auch Proben von Patienten mit frühem Rezidiv unterschieden sich nicht signifikant in der mRNA-Expression von solchen anderer Tumorpatienten. In dieser Hinsicht stimmen die vorgestellten Ergebnisse mit denen immunhistochemischer Verfahren überein [Luo et al. 2002, Rubin et al. 2002].

Bezüglich der Sicherheit der Diagnose in der BPH-Gruppe (Zusätzliche Biopsien der peripheren Zone im Falle einer TUR-P/Enukleation) gilt die gleiche Argumentation aus Absatz 4.1..

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass eine AMACR-Immunreaktion offenbar auch in Fällen einer höhergradigen prostatichen intraepithelialen Neoplasie („high grade PIN“) vorkommt [Ananthanarayanan et al. 2005, Wu et al. 2005]. Diese Beobachtung passt zur vorliegenden Studie. Die beiden höchsten RT-PCR-positiven Proben zeigten neben BPH kleine Anteile High Grade PIN.

4.4. AMACR im Urin und in Prostatasekreten

Jüngst konnten wir nachweisen, dass der Nachweis der AMACR mRNA via RT-PCR eine Differenzierung zwischen BPH und Pca im Prostatagewebe erlaubt. Unser Verfahren erzielte eine hohe Spezifität, jedoch nur eine mäßige Sensitivität [Schostak et al. 2006b]. Prostatamarker mit hoher Spezifität, die in den Urin bzw. in Prostatasekrete (Exprimaturin) sezerniert werden, hätten den großen Vorteil, dass sie eine weitere, invasivere Diagnostik wie z. B. eine Biopsie vermeiden können. Speziell in puncto Spezifität weisen alle bislang bekannten Serummarker und insbesondere das PSA gravierende Schwächen auf.

Trotz der Anwendung des extrem sensiblen sog. LightCycler-„Picochips“ gelang es in der vorliegenden Studie nicht, AMACR-mRNA im Urin oder im Exprimaturin nachzuweisen. Dies steht im krassen Gegensatz zu ersten Berichten von Rogers (Western-Blot) [Rogers et al. 2004] und Zielie (RT-PCR) [Zielie et al. 2004]. Mögliche Gründe könnten prinzipiell in der Art der Gewinnung (Spontanmiktion bzw. DRU und anschließende Erststrahlmiktion), der Aufbewahrung bis zur weiteren Verarbeitung oder der Methode selbst liegen. Rogers et al. beschreiben, dass ein spontan miktionierter Urin unmittelbar nach einer durchgeführten Prostatabiopsie gewonnen wurde. Im Gegensatz dazu handelte es sich in der vorliegenden Studie um die erste Portion des Morgenurins von Patienten, bei welchen noch keinerlei Maßnahmen an der Prostata durchgeführt worden waren sowie um Exprimaturin nach einer digital rektalen Untersuchung. Ob die in der Rogers-Studie beschriebene Biopsie dazu führt, dass AMACR im Urin nachweisbar wird, bleibt unklar. Unser Verfahren würde am ehesten einem Setting beim Hausarzt entsprechen. Die Spontanurinprobe sollte ja gerade die Biopsie vermeiden. Zielie et al. beschreiben, dass vor der Abgabe des Erststrahlurins eine (zeitlich nicht näher definierte) Prostatamassage durchgeführt wurde. Dies entspricht dem Verfahren der vorliegenden Studie (20 Sekunden Massage und anschließend Erststrahlurin). In der Rogers-Studie wird der Urin (ohne Definition des Zeitraumes) mit 2000 G zentrifugiert,

Zielie et al. zentrifugierten "sofort" mit 500 G. In beiden Serien wurde das Pellet unserer Serie vergleichbar weiterverarbeitet. In unserer Studie wurde mit 1000 G zentrifugiert, der (Exprimat-)Urin wurde ebenfalls sofort, d. h. innerhalb weniger Minuten bearbeitet und bis dahin im Kühlschrank bei 4 Grad Celsius aufbewahrt. Zielie gelang der Nachweis mithilfe eines TaqMan-Systems der Firma Applied Biosystems (USA). Quantitative Unterschiede in der mRNA-Expressionsanalyse gegenüber dem unsererseits verwendeten LightCycler (Roche, Deutschland) sind bislang nicht beschrieben.

Bezüglich der Sicherheit der Diagnose in der BPH-Gruppe (Zusätzliche Biopsien der peripheren Zone im Falle einer TUR-P/Enukleation) gilt die gleiche Argumentation aus Absatz 4.1..

4.5. CD24 mRNA in Prostatagewebe

Wie im Absatz 4.3. beschrieben, stellt der Nachweis von kleinsten Prostatakrebsherden den Pathologen vor große Herausforderungen.

In den letzten Jahren wurde eine große Anzahl neuer molekularer Marker (DNA, RNA, Protein) für unterschiedlichste Tumore inklusive des Prostatakrebses unter Verwendung der sog. Microarray-Technik entdeckt [Dhanasekaran et al. 2001, Halvorsen et al. 2005, Xu et al. 2005, Calvo et al. 2005, Quinn et al. 2005, Landers et al. 2005]. Der klinische Wert solcher aufkommenden, neuen Marker muss nun in größeren klinischen Studien überprüft werden. Einer dieser Marker ist CD24. Er wurde jüngst von Kristiansen et al. Auf der Basis eines RNA-Expressionsprofils beschrieben. Dabei wurden 102 Gewebeproben aus der Prostata und 31 Proben aus Lymphknotenmetastasen untersucht. Die in der Kristiansen-Studie angewandte Immunhistochemie erreichte eine Sensitivität von nur 48 % in den Prostatagewebeproben und 68 % in den Lymphknoten. Dabei zeigte sich eine starke Anfärbung nur in 12 % bzw. 29%, die allermeisten Proben färbten sich lediglich sehr schwach an [Kristiansen et al. 2004]. Es zeigte sich keine Assoziation zum Tumorgrading oder Stadium [Kristiansen 2004 und 2005]. Da keine benignen Kontrollen in dieser Studie untersucht wurden, konnte die Spezifität nicht berechnet werden. Jüngst zeigte Kristiansen exemplarisch, dass CD24 mRNA via RT-PCR in lasermikrodissoziierten Prostatagewebeproben nachweisbar ist. Eine positive Reaktion wurde aber nur in 38,5 % der Fälle erzielt [Kristiansen et al. 2005].

Die hohe Heterogenität der CD24 mRNA-Expression sogar innerhalb eines Tumors desselben Individuums ist offenbar nicht nur ein Problem bei der CD24 Immunhistochemie des Pca, sondern auch bei anderen Tumorentitäten. Das generelle Problem der eingeschränkten

Reproduzierbarkeit einer Immunhistochemie wird dadurch besonders verstärkt [Kristiansen et al. 2004].

Basierend auf dem RT-PCR-LightCycler-Protokoll konnte unsere Studie deutlich erhöhte Werte der CD24-Expression von Pca-Patienten gegenüber Patienten mit benigner Histologie nachweisen. Die Sensitivität (korrekt detektierte Krebspatienten) unserer Serie (86,4 %) liegt weit über den Ergebnissen anderer Studien (38,5 % und 48 %) [Kristiansen 2004 und 2005].

Bezüglich des Tumolvolumens ist die untere Nachweisgrenze für CD24 noch unklar. Wie in den Absätzen 2.7., 3.6., 4.4. und 5 beschrieben, ist CD24 im Morgenurin und im Exprimaturin nachweisbar. Insofern könnte die CD24 mRNA-RT-PCR in Zukunft eine wichtige, nichtinvasive Ergänzung zu anderen Untersuchungsmethoden im Rahmen der Krebsfrüherkennung (DRU und PSA) darstellen.

Trotzdem verhindert die mäßige Spezifität (korrekt erkannte Patienten ohne Krebs), dass das hier vorgestellte Verfahren andere pathologische Verfahren sinnvoll ergänzen oder gar ersetzen könnte.

Die Histologie aller Patienten war im Voraus bekannt. Alle 55 BPH-Patienten hatten entweder ein niedriges präoperatives PSA oder eine Malignität war im Vorfeld durch eine Biopsie ausgeschlossen worden. Insofern hatten wir es mit einer PSA-Selektion zu tun. Diese Vermutung wird durch die weit überdurchschnittliche AUC des initialen PSA (0,932, Abbildung 10) untermauert. Eine Kombination aus den prädiktiven Werten von PSA und CD24 ist deshalb zumindest auf der Basis der vorliegenden Daten nicht sinnvoll.

Bezüglich der Sicherheit der Diagnose in der BPH-Gruppe (Zusätzliche Biopsien der peripheren Zone im Falle einer TUR-P/E nukleation) gilt die gleiche Argumentation aus Absatz 4.1..

Auf eine Lasermikrodissektion wurde primär verzichtet, weil wir einerseits die Prozedur möglichst unkompliziert halten wollten und weil Kristiansen zuvor von der ohnehin bestehenden CD24-Expressionsheterogenität berichtet hatte. Wir haben deshalb nur Gewebe untersucht, welches in der HE-Färbung einen Tumoranteil von wenigstens 50 % hatte.

Vom Hersteller wird PBGD als ideales Referenz-Gen (Housekeeping-Gen) angegeben. Diese Angabe basiert laut den beiliegenden Informationen auf einer umfangreichen Serie von internen Untersuchungen. Die PBGD mRNA-Expression ist vollständig stabil unter verschiedensten experimentellen Bedingungen und liegt darüber hinaus im mRNA-Expressionsbereich des Zielgens. Keine anderen Referenzgene wurden verwendet.

Andere Studiengruppen haben folgende Ergebnisse bei anderen Tumorentitäten gefunden: Fogel et al. zeigten, dass CD24 in vier von sechs Brustkrebszelllinien exprimiert wurde (66,7

% Sensitivität) [Fogel et al. 1999]. Droz wies nach, dass klarzellige Nierenzellkarzinome stets eine starke Reaktion aufweisen (100 % Sensitivität) [Droz et al. 1990]. Die Sensitivität für ovarielle Karzinome liegt bei 84% [Landers et al. 2005] und bei 76% für nichtkleinzellige Lungentumore [Kristiansen et al. 2003]. Huang et al. zeigten, dass CD24 mRNA in 66 % der hepatozellulären Karzinome (HCC) exprimiert wird [Huang et al. 1995]. In keiner dieser genannten Studien wurde jedoch malignes gegen benignes Gewebe verglichen. Insofern können nur Vermutungen über die Spezifität angestellt werden.

Wir konnten in der vorliegenden Serie keine Korrelation zwischen der CD24 mRNA-Expression und klinischen oder pathologischen Parametern wie einer (Lymphknoten-) Metastasierung feststellen. Sogar Proben von Patienten, welche ein besonders frühes Rezidiv zeigten, unterschieden sich nicht signifikant von Proben von Patienten in anderen Tumorstadien. Nur bei zwei von 13 Pca-Patienten mit einer relativen CD24 mRNA-Expression über 0,3 liegt derzeit eine Progression (PSA-Wiederanstieg oder klinische Progression) vor. Diese Ergebnisse weichen vollständig von den im Vorfeld durch Kristiansen et al. beschriebenen Ergebnissen ab. Dieser stellte CD24 als starken, unabhängigen Prädiktor für ein Rezidiv nicht nur für das Pca, sondern auch für Lungen-, Brust- und Eierstockkrebs vor [Kristiansen 2002, 2003a, 2003b und 2004]. Weitere multizentrische Follow-Up-Studien zur Klärung der Wertigkeit einer CD24 RT-PCR als prognostischer Marker sind aus diesem Grund notwendig.

4.6. CD24 mRNA im Urin und in Prostatasekreten

Wie oben beschrieben haben wir jüngst CD24 mRNA als neuen molekularbiologischen Marker für das Pca beschrieben. CD24 mRNA zeigte dabei eine sehr gute Sensitivität (71 %) und eine akzeptable Spezifität [Schostak et al. 2006a]. Wie im Absatz 4.5. diskutiert, könnte CD24 mRNA, sofern es im (Exprimat-)Urin nachweisbar ist, besonders sinnvoll in der Früherkennung des Pca eingesetzt werden.

Die jetzt vorliegende Studie zeigt nach unserer Kenntnis zum ersten Mal, dass CD24 in prostatischen Sekreten und sogar im Morgenurin nachweisbar ist. Mit der hier angewandten Technik konnte allerdings bislang kein signifikanter Expressions-Unterschied zwischen den Pca-Patienten und BPH-Patienten aufgedeckt werden. Dennoch ist der Nachweis des Vorhandenseins allein bereits wichtig. Möglicherweise gelingt es mit zukünftigen, noch sensibleren Verfahren, einen Cut-off und damit Sensitivität und Spezifität des Markers im (Exprimat-)Urin zu bestimmen.

Nur bei 49/72 Patienten in der Analyse der Exprimat-Urine (68 %) und 50/64 (78 %) Patienten in der Analyse der Morgenurine zeigten sich Werte über der Nachweisgrenze (diese liegt beim Picochip des LightCyclers bei einer relativen Expression von 0.001). Dafür gibt es zwei mögliche Erklärungen. Zum einen kann selbst die Nachweisgrenze des Picochips des LightCycler-Systems noch zu hoch liegen. Möglicherweise werden zukünftige, sensiblere Verfahren schließlich signifikante Unterschiede aufdecken. Zum anderen besteht eine hohe interindividuelle Variabilität, z. B. was die Menge und Konzentration des (Morgen-) Urins angeht. Im Falle einer Pollakisurie und/oder Nykturie als Symptom der bestehenden Prostataerkrankung ist der Zeitraum, in welchem sich der Urin über Nacht ansammelt, selbstverständlich unterschiedlich. Die Molalität des zu untersuchenden Urins wurde in der vorliegenden Studie nicht überprüft. Des Weiteren zeigte sich sowohl in der Analyse des Exprimat- als auch des Morgenurins von Pca-Patienten eine relative hohe Varianz mit zahlreichen Extremwerten über der zweiten Standardabweichung (95%). Sollten im Rahmen von zukünftigen Studien (mit größeren Fallzahlen) deutlich mehr Werte in dieser Höhe vorkommen, so ergibt sich automatisch ein signifikanter Unterschied zu den Werten von BPH-Patienten, die insgesamt wesentlich homogener verteilt liegen.

Bezüglich der Sicherheit der Diagnose in der BPH-Gruppe (zusätzliche Biopsien der peripheren Zone im Falle einer TUR-P/Enukleation) gilt die gleiche Argumentation aus Absatz 4.1..

Wie im Absatz 4.5. bereits ausführlich diskutiert, wurde PGBD als Referenz-Gen verwendet, weil es vom Hersteller als ideales Referenzgen angegeben wird.

Die Histologie aller Patienten war im Voraus bekannt. Alle 21 BPH-Patienten hatten entweder ein niedriges präoperatives PSA oder eine Malignität war im Vorfeld durch eine Biopsie ausgeschlossen worden. Insofern hatten wir es mit einer PSA-Selektion zu tun.

4.7. Einfluss einer Hormonablation auf die Promoter Hypermethylation des

“Detoxifying glutathione-S-transferase P1 Gens” (*GSTP1*)

Seit der Erkenntnis, dass eine enge Beziehung zwischen der *GSTP1* CpG Insel Hypermethylation und der Krebsentstehung besteht, [Lee et al. 1994] wird das Potenzial dieser Assoziation als Krebsbiomarker in zahlreichen Studien untersucht. Die Durchführbarkeit des Verfahrens sowohl für die Diagnosestellung und das Staging wie auch als prognostischer Marker wurde ausführlich für Prostatagewebe (Biopsien und Operationspräparate), Biopsiewaschflüssigkeit, Ejakulat, Blut, Urin und Lymphknoten durch

unsere und andere Gruppen beschrieben [Bastian et al. 2004, Goessl et al. 2000 und 2001, Köllermann et al. 2003].

Die kontinuierliche technische Verbesserung von der Southern-Blot-Analyse über die Polymerasekettenreaktion (PCR), der weiteren Verbesserung durch die Einführung des methylierungsspezifischen Verfahrens (qualitativ und quantitativ) bis hin zur Multi-Gen-Methylierungsanalyse hat zu einem stetigen Zuwachs der diagnostischen und prognostischen Aussagekraft geführt [Enokida et al. 2005, Frommer et al. 1996, Herman et al. 1996, Jeronimo et al. 2001].

Die Möglichkeit, bei Prostatakrebspatienten eine GSTP1-HM im Serum zu detektieren [Goessl et al. 2000a und 2000b] sowie jüngste Berichte über deren prognostische Bedeutung [Bastian et al. 2005] deuten darauf hin, dass die Bestimmung der GSTP1-HM im Serum zu einem sehr vielversprechenden Tool für die Verlaufskontrolle von Prostatakrebspatienten werden könnte. Dafür spricht auch der zu erwartende Anstieg einer frühen (adjuvanten) AHT und oben erwähnte Grenzen des PSA in dieser Situation. Bislang existieren allerdings, zumindest nach unserem Wissen, keine Informationen über den Einfluss einer Hormontherapie auf die GSTP1-HM.

In den meisten Fällen (13/15) war die MSP in der Lage, die GSTP1-HM nach einer prolongierten Hormontherapie nachzuweisen. Bei zwei Patienten zeigte sich allerdings ein negativer Befund. Das Bestehen der GSTP1-HM in den initialen Biopsien beider Patienten deutet darauf hin, dass eine Hormontherapie den Nachweis einer GSTP1-HM in einer Subgruppe von Patienten beeinflussen könnte. Ergänzend zur unterstellten hormonellen Interaktion müssen weitere Erklärungen für unsere Ergebnisse kritisch diskutiert werden. Vor allem könnte der negative GSTP1-HM-Befund durch technische Probleme erklärt werden (falsch negative MSP). Obwohl dies nicht vollständig ausgeschlossen werden kann, sprechen verschiedene Faktoren stark gegen diese Hypothese:

1. Vor Beginn der DNA-Analyse wurde jedes Präparat nach radikaler Prostatektomie mikroskopisch (HE-Färbung) auf die Anwesenheit von Tumor überprüft (siehe 2.8.2.). Nur Gewebe mit wenigstens 50 % Tumoranteil wurde eingeschlossen.
2. Beide negativen MSP-Proben wurden doppelt untersucht.
3. Interne Negativ- (reines Wasser) und Positivkontrollen (DNA aus LNCaP-Zellen) wurden in jedem Experiment verwendet.
4. Unmethylierte GSTP1 Promotersequenzen wurden in beiden Proben nachgewiesen.

Darüber hinaus muss man die Möglichkeit bedenken, dass auch beide Tumore primär keine GSTP1-HM hätten aufweisen können (falsch positive MSP). Allerdings spricht der Nachweis

der GSTP1-HM in den entsprechenden Tumorbiopsien vor der Hormontherapie gegen diese Vermutung.

Es ist heute selbst in Kooperation mit einem spezialisierten Zentrum für Uropathologie (B. Helpap) ein großes Problem, Gewebeproben vor *und* nach Hormonablation zu erhalten. Insofern ist die Zahl der analysierten Proben unserer Studie sehr gering und die Ergebnisse erlauben allenfalls, zu schließen, dass eine Hormonablation wahrscheinlich die GSTP1-HM beeinflusst. Um das tatsächliche Ausmaß dieses Effekts beschreiben zu können, sind weitere Studien mit größeren Patientenkohorten notwendig.

5. Fazit und Ausblick

5.1. Allgemeines

Über 30 Jahre nach der Entdeckung des PSA besteht noch immer das Problem der schlechten Spezifität dieser Untersuchung. Auch die übrige, heutzutage zur Verfügung stehende Diagnostik beschreibt die Krankheit Prostatakrebs (Pca) sehr unscharf. Neue Marker in Prostatagewebe, Blut und Körperflüssigkeiten sollten vor allem in dieser Hinsicht eine wesentliche Verbesserung aufweisen. Auf diese Weise könnten einerseits tausende, im Prinzip gesunde Männer vor einer überflüssigen Diagnostik oder Therapie bewahrt werden und andererseits wäre es möglich, den klinischen und prognostischen Status eines Pca-Patienten besser zu definieren.

Diese Arbeit beschreibt verschiedene Ansätze, dieses Dilemma zu lösen. Zum einen wurden in einer Analyse der PSA-Promotor-Gensequenz Unterschiede zwischen Krebspatienten und altersentsprechenden Kontrollen aufgedeckt. Die Alpha-Methylacyl-CoA-Racemase (AMACR) und CD24 wurden als neue Marker im Prostatagewebe sowie im Urin und in Prostatasekreten untersucht. Die Ergebnisse könnten zu einer verbesserten pathologischen Diagnostik und Früherkennung beitragen. Die Hypermethylierung des Detoxifying Glutathion-S-Transferase-P1-Gens (GSTP1-HM) wurde bereits an anderer Stelle als sehr viel versprechender Marker für den Prostatakrebs beschrieben. Wir untersuchten mögliche Einflüsse einer Hormonablation auf den GSTP1-HM-Status.

5.2. PSA-Promoter-Polymorphismen

In unserer Studie konnten wir bei 66,6 % der Prostatakrebs (Pca) -Patienten den bereits bekannten Polymorphismus (SNP) bei -158 im Segment C (ARE I) nachweisen. Demgegenüber zeigte sich diese Auffälligkeit nur bei 14,5 % der altersentsprechenden Kontrollpatienten ohne Pca. Dieser Unterschied war hochsignifikant ($p < 0,0001$). Innerhalb der Pca-Gruppe bestand keine weitere Korrelation in Anzahl und Art der Ausprägung des SNP (Wildtyp, Heterozygot oder Homozygot) mit dem Stadium der Krebserkrankung.

Zusätzlich lagen in der Pca-Gruppe zu 9,7 % und bei den Kontrollen zu 20 % weitere Polymorphismen an anderen Stellen der Promotorregion vor. Vier dieser fünf zusätzlichen Polymorphismen wurden von uns erstmals beschrieben. Die kleine Kontrollgruppe ($n=55$) erlaubt keine abschließende Aussage über mögliche Unterschiede zwischen Patienten mit Prostatakrebs und den Kontrollen.

5.3. PSA mRNA in pelvinen Lymphknoten bei Pca-Patienten

Isoliert betrachtet kann die Analyse der PSA mRNA-Expression in pelvinen Lymphknoten von Prostatakrebspatienten keine bessere prognostische Aussage liefern als die histopathologische Aufarbeitung. Allerdings konnte das Verfahren einige zusätzliche Patienten identifizieren, welche bei initial-negativer Lymphknotenhistologie später tatsächlich einen Progress aufwiesen.

Im Vergleich zum „Goldstandard“ (Histopathologie) erzielt das Verfahren eine Sensitivität von 83,3 % und eine Spezifität von 65,5 %. Wird eine spätere Progression als Maßstab angenommen, erreicht aber auch ein konventionelles Lymphknotenstaging nur eine Sensitivität von 29,6 %, jedoch eine Spezifität von 90 % und einen positiven prädiktiven Wert von 72,7 %.

Unsere vorläufigen Follow-up-Daten (PSA-Wiederanstieg) zeigen, dass eine PSA mRNA RT-PCR die Detektionsrate einer primären Lymphknotenmetastasierung erhöht.

Trotz der niedrigen Spezifität kann die PSA mRNA-Analyse Patienten ohne sonstige etablierte Risiken für einen Progress als Kandidaten für eine stratifiziertere Therapie identifizieren, wenn das PSA beginnt, wieder zu steigen.

5.3. Alpha-Methylacyl-CoA-Racemase (AMACR) mRNA in Prostatagewebe

Im Gewebe von Prostatakrebspatienten fanden sich im Durchschnitt 3,75-fach höhere AMACR mRNA-Werte als in der BPH-Kontrollgruppe. Dieser Unterschied war hochsignifikant ($p < 0,0001$). Das Verfahren weist eine gute Sensitivität (85,6 %) und Spezifität (64,9 %) auf.

Die AMACR mRNA-Expression im Prostatagewebe war weder mit dem Tumor- oder dem Lymphknotenstadium, dem Grading (WHO), den Absetzungsrändern oder dem Gleason-Score statistisch assoziiert.

Die vorliegende Studie demonstriert die Machbarkeit einer quantitativen AMACR mRNA-Analyse in Prostatagewebe sogar ohne Anwendung einer Lasermikrodissektion. Trotzdem führen die vorgestellten Ergebnisse nicht zu einer wesentlichen Verbesserung der Standard-Gewebediagnostik.

5.4. AMACR mRNA im Urin und in Prostatasekreten

Trotz der Anwendung des sog. LightCycler-Picochips konnte AMACR weder im Exprimat-Urin, noch im Morgenurin nachgewiesen werden. Im positiven Falle hätte der Marker zu einer Verbesserung der Früherkennung des Prostatakrebses führen können.

5.6. CD24 mRNA in Prostatagewebe

Im Gewebe von Prostatakrebspatienten fanden sich im Durchschnitt 2,69-fach höhere CD24 mRNA-Werte als in der BPH-Gruppe. Dieser Unterschied war hochsignifikant ($p < 0,0001$). Das Verfahren weist eine gute Sensitivität (86,4 %) und eine moderate Spezifität (47,3 %) auf.

Die CD24 mRNA-Expression im Prostatagewebe war weder mit dem Tumor- oder dem Lymphknotenstadium, dem Grading (WHO), den Absetzungsrändern oder dem Gleason-Score statistisch assoziiert.

Die vorliegende Studie demonstriert die Machbarkeit einer quantitativen CD24 mRNA-Analyse in Prostatagewebe sogar ohne Anwendung einer Lasermikrodissektion. Trotzdem führen die vorgestellten Ergebnisse nicht zu einer wesentlichen Verbesserung der Standard-Gewebediagnostik.

5.7. CD24 mRNA im Urin und in Prostatasekreten

Die vorliegende Studie demonstriert die Durchführbarkeit einer CD24 mRNA-Analyse sowohl im Exprimat-Urin als auch im Morgenurin. Allerdings erreichten Unterschiede zwischen Pca und BPH-Patienten nicht das Signifikanzniveau.

Wie schon im Prostatagewebe gezeigt, war die CD24 mRNA-Expression in den genannten Flüssigkeiten weder mit dem Tumor- oder dem Lymphknotenstadium, dem Grading (WHO), den Absetzungsrändern oder dem Gleason-Score statistisch assoziiert.

5.8. Einfluss einer Hormonablation auf die Promoter Hypermethylation des „Detoxifying Glutathione-S-Transferase P1 Gens“ (GSTP1)

In den meisten Fällen beeinflusst eine Hormontherapie nicht den GSTP1-HM-Status. Allerdings deutet der Wechsel von einem positiven zu einem negativen Befund bei einer Subgruppe der Patienten auf eine, zumindest partielle Androgenabhängigkeit hin. Weitere Studien mit größeren Kohorten sind notwendig, um die exakte Frequenz dieses Phänomens und damit das Ausmaß der hormonellen Interaktion zu bestimmen.

6. Literaturverzeichnis

Ablin RJ, Soanes WA, Bronson P, Witebsky E: Precipitating antigens of the normal human prostate. *J Reprod Fertil* 1970 Aug;22(3):573-4

Abrahams NA, Ormsby AH, Brainard J. Validation of cytokeratin 5/6 as an effective substitute for keratin 903 in the differentiation of benign from malignant glands in prostate needle biopsies. *Histopathology* 2002;41:35-41.

Abrahamsson PA, Anderson J, Boccon-Gibod L, Schulman C, Studer UE, Wirth M: Risks and benefits of hormonal manipulation as monotherapy or adjuvant treatment in localised prostate cancer. *Eur Urol* 2005, 48(6):900-905.

Aigner S, Stoege ZM, Fogel M, Weber E, Zarn J, Ruppert M, Zeller Y, Vestweber D, Stahel R, Sammar M, Altevogt P. CD24, a mucin-type glycoprotein, is a ligand for P-selectin on human tumor cells. *Blood*. 1997, 89: 3385-95.

Ainsworth PJ, Surh LC and Coulter-Mackie MB. Diagnostic single strand conformational polymorphism, (SSCP): a simplified non-radioisotopic method as applied to a Tay-Sachs B1 variant. *Nucleic Acids Res*. 1991, 19: 405-406.

Allaf M, Partin AW, Walsh PC: Who is cured? How long after Radical Prostatectomy can PSA rise? In Annual Meeting of the American Association of Urology. 2006 Edited by Elsevier. Atlanta, USA.

Amling CL, Kane CJ, Riffenburgh RH, Ward JF, Roberts JL, Lance RS, Friedrichs PA, Moul JW. Relationship between obesity and race in predicting adverse pathologic variables in patients undergoing radical prostatectomy. *Urology* 2001; 58(5):72-728.

Andriole GL, Smith DS, Rao G, Goodnough L, Catalona WJ. Early complications of contemporary anatomical radical retropubic prostatectomy. *J Urol* 1994; 152:1858-1860.

Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland. Krebs in Deutschland – Häufigkeiten und Trends, 4. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe Saarbrücken, 2004; 65-67.

Bader P, Burkhard FC, Markwalder R, Studer UE: Is a limited lymph node dissection an adequate staging procedure for prostate cancer? *J Urol*. 2002 Aug;168(2):514-8

Bader P, Burkhard FC, Markwalder R, Studer UE: Disease progression and survival of patients with positive lymph nodes after radical prostatectomy. Is there a chance of cure? *J Urol.* 2003 Mar;169(3):849-54.

Bartsch G, Horninger W, Klocker H, Reissigl A, Oberaigner W, Schonitzer D, Severi G, Robertson C, Boyle P: Prostate cancer mortality after introduction of prostate-specific antigen mass screening in the Federal State of Tyrol, Austria. *Urology* 2001, 58(3):417-424.

Bastian PJ, Nakayama M, De Marzo AM, Nelson WG: [GSTP1 CpG island hypermethylation as a molecular marker of prostate cancer]. *Urologe A* 2004, 43(5):573-579.

Bastian PJ, Palapattu GS, Lin X, Yegnasubramanian S, Mangold LA, Trock B, Eisenberger MA, Partin AW, Nelson WG: Preoperative serum DNA GSTP1 CpG island hypermethylation and the risk of early prostate-specific antigen recurrence following radical prostatectomy. *Clin Cancer Res* 2005, 11(11):4037-4043.

Bauer JJ, Srivastava S, Connelly RR, Sesterhenn IA, Preston DM, McLeod DG, Moul JW. Significance of familial history of prostate cancer to traditional prognostic variables, genetic biomarkers, and recurrence after radical prostatectomy. *Urology* 1998; 51(6):970-6.

Beach R, Gown AM, De Peralta-Venturina MN, Folpe AL, Yaziji H, Salles PG, Grignon DJ, Fanger GR, Amin MB. P504S immunohistochemical detection in 405 prostatic specimens including 376 18-gauge needle biopsies. *Am J Surg Pathol* 2002;26:1588-96.

Benninghoff A, Drenckhahn D (Hrsg). *Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie*, Band 1, 16. Auflage, Urban & Fischer Verlag München und Jena 2002; 824-27.

Beyer DC, Thomas T, Hilbe J, Swenson V: Relative influence of Gleason score and pretreatment PSA in predicting survival following brachytherapy for prostate cancer. *Brachytherapy* 2003, 2(2):77-84.

Bharaj B, Scorilas A, Diamandis EP, Gai M, Levesque MA, Sutherland DJ, Hoffman BR. Breast cancer prognostic significance of a single nucleotide polymorphism in the proximal androgen response element of the prostate specific antigen gene promoter. *Breast Cancer Res Treat.* 2000 May;61(2):111-9.

Bratt O, Kristoffersson U, Olsson H, Lundgren R. Clinical course of early onset prostate cancer with special reference to family history as a prognostic factor. *Eur Urol* 1998; 34(1):19-24.

Brawer MK, Nagle RB, Pitts W, Freiha F, Gamble SL.: Keratin immunoreactivity as an aid to the diagnosis of persistent adenocarcinoma in irradiated human prostates. *Cancer*. 1989 Feb 1;63(3):454-60.

Bussemakers MJ, van Bokhoven A, Verhaegh GW, Smit FP, Karthaus HF, Schalken JA, Debruyne FM, Ru N, Isaacs WB. DD3: a new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer. *Cancer Res*. 1999 Dec 1;59(23):5975-9.

Byar DP, Mostofi FK, VA Cooperative Urological Research Group. Carcinoma of the prostate: prognostic evaluation of certain pathological features in 208 radical prostatectomies. *Cancer* 1972; 30:5-13.

Calvo A, Gonzalez-Moreno O, Yoon CY, Huh JI, Desai K, Nguyen QT, Green JE: Prostate cancer and the genomic revolution: Advances using microarray analyses. *Mutat Res* 2005, 576(1-2):66-79.

Carswell BM, Woda BA, Wang X, Li C, Dresser K, Jiang Z. Detection of prostate cancer by alpha-methylacyl CoA racemase (P504S) in needle biopsy specimens previously reported as negative for malignancy. *Histopathology*. 2006 May;48(6):668-73.

Carter BS, Beaty TH, Steinberg GD, Childs B, Walsh PC. Mendelian inheritance of familial prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:3367-3371.

Catalona WJ, Smith DS: Cancer recurrence and survival rates after anatomic radical retropubic prostatectomy for prostate cancer: intermediate-term results. *J Urol* 1998, 160(6 Pt 2):2428-2434.

Chaussy C, Thuroff S, Rebillard X, Gelet A: Technology insight: High-intensity focused ultrasound for urologic cancers. *Nat Clin Pract Urol* 2005, 2(4):191-198.

Chen ME, Troncoso P, Johnston DA, Tang K, Babaian RJ. Optimization of prostate biopsy strategy using computer based analysis. *J.Urol.*, 158: 2168, 1997

Chen ME, Johnston DA, Tang K, Babaian RJ, Troncoso P. Detailed mapping of prostate carcinoma foci: biopsy strategy implications. *Cancer* 2000; 89(8):1800-1809.

Cheng L, Zincke H, Blute ML, Bergstralh EJ, Scherer B, Bostwick DG: Risk of prostate carcinoma death in patients with lymph node metastasis. *Cancer* 2001, 91(1):66-73.

Choi YL, Kim SH, Shin YK, Hong YC, Lee SJ, Kang SY and Ahn G: Cytoplasmic CD24 expression in advanced ovarian serous borderline tumors. *Gynecol Oncol.* 97: 379-86, 2005.

Clark T, Parekh DJ, Cookson MS, Chang SS, Smith ER Jr, Wells N, Smith JA Jr. Randomized prospective evaluation of extended versus limited lymph node dissection in patients with clinically localized prostate cancer. *J Urol* 2003; 169:145-148.

Cleutjens KB, van Eekelen CC, van der Korput HA, Brinkmann AO and Trapman J. Two androgen response regions cooperate in steroid hormone regulated activity of the prostate-specific antigen promoter. *J.Biol.Chem.* 1996, 271: 6379-6388.

Cleutjens KB, van der Korput HA, van Eekelen CC, van Rooij HC, Faber PW and Trapman, J. An androgen response element in a far upstream enhancer region is essential for high, androgen-regulated activity of the prostate-specific antigen promoter. *Mol.Endocrinol.* 1997, 11: 148-161.

Consensus statement: guidelines for PSA following radiation therapy. American Society for Therapeutic Radiology and Oncology Consensus Panel. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1997, 37(5):1035-1041.

Cooberberg MR, Pasta DJ, Elkin EP, Litwin MS, Latini DM, Du Chane J, Carroll PR: The University of California, San Francisco Cancer of the Prostate Risk Assessment score: a straightforward and reliable preoperative predictor of disease recurrence after radical prostatectomy. *J Urol* 2005, 173(6):1938-1942.

Cramer SD, Chang BL, Rao A, Hawkins GA, Zheng SL, Wade WN, Cooke RT, Thomas LN, Bleecker ER, Catalona WJ, Sterling DA, Meyers DA, Ohar J, Xu J. Association between genetic polymorphisms in the prostate-specific antigen gene promoter and serum prostate-specific antigen levels. *J Natl Cancer Inst.* 2003 Jul 16;95(14):1044-53.

Dhanasekaran SM, Barrette TR, Ghosh D, Shah R, Varambally S, Kurachi K, Pienta KJ, Rubin MA, Chinnaiyan AM: Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer. *Nature* 2001, 412(6849):822-826.

Deguchi T, Doi T, Ehara H, Ito S, Takahashi Y, Nishino Y, Fujihira S, Kawamura T, Komeda H, Horie M et al: Detection of micrometastatic prostate cancer cells in lymph nodes by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Cancer Res* 1993, 53(22):5350-5354.

deKernion JB, Neuwirth H, Stein A, Dorey F, Stenzl A, Hannah J, Blyth B.: Prognosis of patients with stage D1 prostate carcinoma following radical prostatectomy with and without early endocrine therapy. *J Urol.* 1990 Sep;144(3):700-3.

de Matteis A.: Tissue markers in the diagnosis and prognosis of prostatic carcinoma. *Eur Urol.* 1992;21 Suppl 1:66-70. Review.

Diblasio CJ, Kattan MW: Use of nomograms to predict the risk of disease recurrence after definitive local therapy for prostate cancer. *Urology* 2003, 62 Suppl 1:9-18.

Droz D, Zachar D, Charbit L, Gogusev J, Chretien Y and Iris L: Expression of the human nephron differentiation molecules in renal cell carcinomas. *Am J Pathol.* 1990;137: 895-905.

Edelstein RA, Zietman AL, de las Morenas A, Krane RJ, Babayan RK, Dallow KC, Traish A, Moreland RB: Implications of prostate micrometastases in pelvic lymph nodes: an archival tissue study. *Urology* 1996, 47(3):370-375.

Enokida H, Shiina H, Urakami S, Igawa M, Ogishima T, Li LC, Kawahara M, Nakagawa M, Kane CJ, Carroll PR, Dahiya R: Multigene methylation analysis for detection and staging of prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2005, 11(18):6582-6588.

Evans AJ. Alpha-methylacyl CoA racemase (P504S): overview and potential uses in diagnostic pathology as applied to prostate needle biopsies. *J Clin Pathol* 2003;56:892-7.

Ferrari AC, Stone NN, Eyler JN, Gao M, Mandeli J, Unger P, Gallagher RE, Stock R: Prospective analysis of prostate-specific markers in pelvic lymph nodes of patients with high-risk prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 1997, 89(20):1498-1504.

Figarella-Branger D, Moreau H, Pellissier JF, Bianco N and Rougon G: CD24, a signal-transducing molecule expressed on human B lymphocytes, is a marker for human regenerating muscle. *Acta Neuropathol (Berl).* 1993, 86: 275-84.

Fogel M, Friederichs J, Zeller Y, Husar M, Smirnov A, Roitman L, Altevogt P and Stoeberl ZM: CD24 is a marker for human breast carcinoma. *Cancer Lett.* 1999, 143: 87-94.

Fowler FJ, Jr., McNaughton Collins M, Walker Corkery E, Elliott DB, Barry MJ: The impact of androgen deprivation on quality of life after radical prostatectomy for prostate carcinoma. *Cancer* 2002, 95(2):287-295.

Freedland SJ, Humphreys EB, Mangold LA, Eisenberger M, Dorey FJ, Walsh PC, Partin AW: Risk of prostate cancer-specific mortality following biochemical recurrence after radical prostatectomy. *Jama* 2005, 294(4):433-439.

Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, Molloy PL, Paul CL: A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992, 89(5):1827-1831.

Fukatsu T, Hirokawa Y, Araki T, Hioki T, Murata T, Suzuki H, Ichikawa T, Tsukino H, Qiu D, Katoh T, Sugimura Y, Yatani R, Shiraishi T, Watanabe M. Genetic polymorphisms of hormone-related genes and prostate cancer risk in the Japanese population. *Anticancer Res.* 2004 Jul-Aug;24(4):2431-7.

Gelet A, Chapelon JY, Poissonnier L, Bouvier R, Rouviere O, Curiel L, Janier M, Vallancien G: Local recurrence of prostate cancer after external beam radiotherapy: early experience of salvage therapy using high-intensity focused ultrasonography. *Urology* 2004, 63(4):625-629.

Gervasi LA, Mata J, Easley JD, Wilbanks JH, Seale-Hawkins C, Carlton CE, Jr., Scardino PT: Prognostic significance of lymph nodal metastases in prostate cancer. *J Urol* 1989, 142(2 Pt 1):332-336.

Giles GG, Severi G, English DR, McCredie MRE, Borland R, Boyle P and Hopper JL. Sexual factors and prostate cancer. *BJU Int* 2003; 92:211-216.

Gleason D, Mellinger G, and the Veterans Administration Cooperative Urological Research Group. Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *J Urol* 1974; 111:58-64.

Goessl C, Krause H, Muller M, Heicappell R, Schrader M, Sachsinger J, Miller K: Fluorescent methylation-specific polymerase chain reaction for DNA-based detection of prostate cancer in bodily fluids. *Cancer Res* 2000a, 60(21):5941-5945.

Goessl C, Muller M, Miller K: Methylation-specific PCR (MSP) for detection of tumour DNA in the blood plasma and serum of patients with prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2000b, 3(S1):S17.

Goessl C, Muller M, Heicappell R, Krause H, Straub B, Schrader M, Miller K: DNA-based detection of prostate cancer in urine after prostatic massage. *Urology* 2001, 58(3):335-338.

Graefen M, Noldus J, Pichlmeier U, Haese A, Hammerer P, Fernandez S, Conrad S, Henke R, Huland E, Huland H: Early prostate-specific antigen relapse after radical retropubic prostatectomy: prediction on the basis of preoperative and postoperative tumor characteristics. *Eur Urol* 1999, 36(1):21-30.

Halvorsen OJ, Oyan AM, Bo TH, Olsen S, Rostad K, Haukaas SA, Bakke AM, Marzolf B, Dimitrov K, Stordrange L, Lin B, Jonassen I, Hood L, Akslen LA, Kalland KH: Gene expression profiles in prostate cancer: association with patient subgroups and tumour differentiation. *Int J Oncol* 2005, 26(2):329-336.

Hammerer P, Henke RP, Hubner D, et al: Preoperative assessment of tumor aggressiveness in localized prostatic carcinoma. *Urologe A* 1995; 34: 413-418

Han M, Partin AW, Pound CR, Epstein JI, Walsh PC: Long-term biochemical disease-free and cancer-specific survival following anatomic radical retropubic prostatectomy. The 15-year Johns Hopkins experience. *Urol Clin North Am* 2001, 28(3):555-565.

Hedrick L, Epstein JI: Use of keratin 903 as an adjunct in the diagnosis of prostate carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 1989 May;13(5):389-96.

Heidenreich A, Varga Z, Von Knobloch R.: Extended pelvic lymphadenectomy in patients undergoing radical prostatectomy: high incidence of lymph node metastasis. *J Urol.* 2002 Apr;167(4):1681-6.

Helpap B, Bocking A, Dhom G, Faul P, Kastendieck H, Leistenschneider W, Muller HA. [Classification, histologic and cytologic grading and regression grading of prostate cancer] *Urologe A.* 1985 May;24(3):156-9. German.

Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB: Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, 93(18):9821-9826.

Hölzel D. Prostatakarzinom - Ist die Früherkennung in einer Sackgasse? Deutsches Ärzteblatt 1995; 92:1353-1363.

Hoff AO, Gagel RF: Osteoporosis in breast and prostate cancer survivors. *Oncology (Williston Park)* 2005, 19(5):651-658.

Huang LR and Hsu HC: Cloning and expression of CD24 gene in human hepatocellular carcinoma: a potential early tumor marker gene correlates with p53 mutation and tumor differentiation. *Cancer Res* 1995; 55: 4717-21.

Hull GW, Rabbani F, Abbas F, Wheeler TM, Kattan MW, Scardino PT: Cancer control with radical prostatectomy alone in 1,000 consecutive patients. *J Urol* 2002, 167(2 Pt 1):528-534.

Imai K, Ogura H, Ichinose Y, et al: The significance of six sextant biopsy for prostate cancer. *Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi* 1994; 85: 460-465

Jackson D, Waibel R, Weber E, Bell J and Stahel RA: CD24, a signal-transducing molecule expressed on human B cells, is a major surface antigen on small cell lung carcinomas. *Cancer Res.* 1992, 52: 5264-70.

Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, Tiwari RC, Ghafoor A, Feuer EJ, Thun MJ. Cancer statistics, 2005. *CA Cancer J Clin* 2005; 55(1):10-30.

Jeronimo C, Usadel H, Henrique R, Oliveira J, Lopes C, Nelson WG, Sidransky D: Quantitation of GSTP1 methylation in non-neoplastic prostatic tissue and organ-confined prostate adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2001, 93(22):1747-1752.

Jewett HJ. Radical perineal prostatectomy for palpable, clinically localized, non-obstructive cancer: experience at the Johns Hopkins Hospital 1909-1963. *J Urol* 1980; 124(4):492-494.

Jiang Z, Woda BA, Rock KL, Xu Y, Savas L, Khan A, Pihan G, Cai F, Babcook JS, Rathanaswami P, Reed SG, Xu J, Fanger GR. P504S: a new molecular marker for the detection of prostate carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2001; 25:1397-404.

Jiang Z, Iczkowski KA, Woda BA, Tretiakova M, Yang XJ. P504S immunostaining boosts diagnostic resolution of "suspicious" foci in prostatic needle biopsy specimens. *Am J Clin Pathol* 2004;121:99-107.

Jiang Z, Wu CL, Woda BA, Dresser K, Xu J, Fanger GR, Yang XJ. P504S/alpha-methylacyl-CoA racemase: a useful marker for diagnosis of small foci of prostatic carcinoma on needle biopsy. *Am J Surg Pathol* 2002;26:1169-74.

Jiang Z, Iczkowski KA, Woda BA, Tretiakova M, Yang XJ. P504S immunostaining boosts diagnostic resolution of "suspicious" foci in prostatic needle biopsy specimens. *Am J Clin Pathol* 2004;121:99-107.

Jocham/Miller (Hrsg.): Praxis der Urologie, 2. überarbeitete Auflage 2002, Thieme-Verlag Stuttgart

Judson R, Salisbury B, Schneider J, Windemuth A, Stephens JC. How many SNPs does a genome-wide haplotype map require? *Pharmacogenomics*. 2002 May;3(3):379-91. Review.

Kalish LA, McDougal WS, McKinlay JB. Family history and the risk of prostate cancer. *Urology* 2000; 1;56(5):803-806.

Karran L, Jones M, Morley G, van Noorden S, Smith P, Lampert I and Griffin BE: Expression of a B-cell marker, CD24, on nasopharyngeal carcinoma cells. *Int J Cancer*. 1995; 60: 562-6.

Kastendieck H, Bressel M, Henke A, Hüsselmann H. Häufigkeit regionärer Lymphknotenmetastasen beim operablen Prostatakarzinom. *DMW* 1980; 105:1348-1354.

Keeley FX, Gomella LG. Chapter 1: Epidemiology of prostate cancer. In: Ernststoff MS, Heaney JA, Peschel RE, *Urologic cancer*. Blackwell, Cambridge / MA, Oxford, London 1996; 2-14.

Kirchhoff T, Kauff ND, Mitra N, Nafa K, Huang H, Palmer C, Gulati T, Wadsworth E, Donat S, Robson ME, Ellis NA, Offit K. BRCA mutations and risk of prostate cancer in Ashkenazi Jews. *Clin Cancer Res*. 2004 May 1;10(9):2918-21.

Knussmann R, Christiansen K., Couwenbergs C. Relations between sex hormone levels and sexual behaviour in men. *Arch Sex Behav* 1986; 15:429-45.

Kollermann J, Muller M, Goessl C, Krause H, Helpap B, Pantel K, Miller K: Methylation-specific PCR for DNA-based detection of occult tumor cells in lymph nodes of prostate cancer patients. *Eur Urol* 2003, 44(5):533-538.

Kost LV, Evans GW. Occurrence and significance of striated muscle within the prostate. *J Urol* 1964; 92:703-704.

Kristiansen G, Denkert C, Schluns K, Dahl E, Pilarsky C, Hauptmann S: CD24 is expressed in ovarian cancer and is a new independent prognostic marker of patient survival. *Am J Pathol* 2002, 161(4):1215-1221.

Kristiansen G, Schluns K, Yongwei Y, Denkert C, Dietel M, Petersen I: CD24 is an independent prognostic marker of survival in nonsmall cell lung cancer patients. *Br J Cancer* 2003a, 88(2):231-236.

Kristiansen G, Winzer KJ, Mayordomo E, Bellach J, Schluns K, Denkert C, Dahl E, Pilarsky C, Altevogt P, Guski H, Dietel M: CD24 expression is a new prognostic marker in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2003b, 9(13):4906-4913.

Kristiansen G, Pilarsky C, Pervan J, Sturzebecher B, Stephan C, Jung K, Loening S, Rosenthal A and Dietel M: CD24 expression is a significant predictor of PSA relapse and poor prognosis in low grade or organ confined prostate cancer. *Prostate*. 2004; 58: 183-92.

Kristiansen G, Pilarsky C, Wissmann C, Kaiser S, Bruemmendorf T, Roepcke S, Dahl E, Hinzmann B, Specht T, Pervan J, Stephan C, Loening S, Dietel M, Rosenthal A. Expression profiling of microdissected matched prostate cancer samples reveals CD166/MEMD and CD24 as new prognostic markers for patient survival. *J Pathol*. 2005; 205: 359-76.

Kuban D, Thames H, Levy L, Horwitz E, Kupelian P, Martinez A, Michalski J, Pisansky T, Sandler H, Shipley W et al: Failure definition-dependent differences in outcome following radiation for localized prostate cancer: can one size fit all? *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005, 61(2):409-414.

Kupelian PA, Kupelian VA, Witte JS, Macklis R, Klein EA. Family history of prostate cancer in patients with localized prostate cancer: an independent predictor of treatment outcome. *J Clin Oncol*. 1997; 15(4):1478-80.

Kurek R, Nunez G, Tselis N, Konrad L, Martin T, Roeddiger S, Aumuller G, Zamboglou N, Lin DW, Tunn UW et al: Prognostic value of combined "triple"-reverse transcription-PCR analysis for prostate-specific antigen, human kallikrein 2, and prostate-specific membrane antigen mRNA in peripheral blood and lymph nodes of prostate cancer patients. *Clin Cancer Res* 2004, 10(17):5808-5814.

Lee F, Torp-Pedersen ST, Carroll JT, Siders DB, Christensen-Day C, Mitchell AE. Use of transrectal ultrasound and prostate-specific antigen in diagnosis of prostatic intraepithelial neoplasia. *Urology*. 1989 Dec;34(6 Suppl):4-8.

Lee WH, Morton RA, Epstein JI, Brooks JD, Campbell PA, Bova GS, Hsieh WS, Isaacs WB, Nelson WG: Cytidine methylation of regulatory sequences near the pi-class glutathione S-transferase gene accompanies human prostatic carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, 91(24):11733-11737.

Levesque M, Hu H, D'Costa M and Diamandis EP: Prostate-specific antigen expression by various tumors. *J.Clin.Lab Anal.* 1995, 9: 123-128.

Lilja H: A kallikrein-like serine protease in prostatic fluid cleaves the predominant seminal vesicle protein. *J.Clin.Invest* 1985, 76: 1899-1903.

Lintula S, Stenman UH.: The expression of prostate-specific membrane antigen in peripheral blood leukocytes. *J Urol.* 1997 May;157(5):1969-72.

Lippert, Herbert. *Lehrbuch Anatomie*, 5. Auflage, Urban & Fischer Verlag München, Jena 2000; 422.

Liu W and Vadgama JV: Identification and characterization of amino acid starvation-induced CD24 gene in MCF-7 human breast cancer cells. *Int J Oncol.* 2000; 16: 1049-54.

Luboldt HJ, Swoboda A, Borgermann C, Fornara P, Rubben H. Clinical usefulness of free PSA in early detection of prostate cancer. *Onkologie* 2001; 24(1):33-37.

Luo J, Zha S, Gage WR, Dunn TA, Hicks JL, Bennett CJ, Ewing CM, Platz EA, Ferdinandusse S, Wanders RJ, Trent JM, Isaacs WB, De Marzo AM. Alpha-methylacyl-CoA racemase: a new molecular marker for prostate cancer. *Cancer Res* 2002;62:2220-6.

Magi-Galluzzi C, Luo J, Isaacs WB, Hicks JL, de Marzo AM, Epstein JI. Alpha-methylacyl-CoA racemase: a variably sensitive immunohistochemical marker for the diagnosis of small prostate cancer foci on needle biopsy. *Am J Surg Pathol* 2003;27:1128-33.

Majumdar S and Diamandis EP. The promoter and the enhancer region of the KLK 3 (prostate specific antigen) gene is frequently mutated in breast tumours and in breast carcinoma cell lines. *Br.J.Cancer* 1999, 79: 1594-1602.

Mantzoros CS, Georgiadis EI, Trichopoulos D. Contribution of dihydrotestosterone to male sexual behaviour. *Br Med J* 1995; 310:1289-91.

Martinez-Pineiro L, Rios E, Martinez-Gomariz M, Pastor T, de Cabo M, Picazo ML, Palacios J, Perona R: Molecular staging of prostatic cancer with RT-PCR assay for prostate-specific antigen in peripheral blood and lymph nodes: comparison with standard histological staging and immunohistochemical assessment of occult regional lymph node metastases. *Eur Urol* 2003, 43(4):342-350.

McNeal JE. Morphogenesis of prostatic carcinoma. *Cancer* 1965; 18(12):1659-1666.

McNeal JE. Origin and development of carcinoma of the prostate. *Cancer* 23, 1969; 24.

McNeal JE. Anatomy of the prostate: a historical survey of divergent views. *Prostate* 1980; 1:3-13.

McNeal JE: Cancer volume and site of origin of adenocarcinoma in the prostate: relationship to local and distant spread. *Hum.Pathol.*, 23: 258, 1992

Medeiros R, Morais A, Vasconcelos A, Costa S, Pinto D, Oliveira J, Carvalho R, Lopes C. Linkage between polymorphisms in the prostate specific antigen ARE1 gene region, prostate cancer risk, and circulating tumor cells. *Prostate*. 2002 Sep 15;53(1):88-94.

Messing EM, Manola J, Yao J, Kiernan M, Crawford D, Wilding G, di'SantAgnese PA, Trump D; Eastern Cooperative Oncology Group study EST 3886. Immediate versus deferred androgen deprivation treatment in patients with node-positive prostate cancer after radical prostatectomy and pelvic lymphadenectomy. *Lancet Oncol*. 2006 Jun;7(6):472-9.

Mobley JA, Leav I, Zielie P, Wotkowitz C, Evans J, Lam YW, L'Esperance BS, Jiang Z, Ho SM. Branched fatty acids in dairy and beef products markedly enhance alpha-methylacyl-CoA racemase expression in prostate cancer cells in vitro. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003;12:775-83

Mostofi FK. Grading of prostatic carcinoma. *Cancer Chemotherapy Reports* 1975; 59(1):111-117.

Moul JW, Connelly RR, Lubeck DP, Bauer JJ, Sun L, Flanders SC, Grossfeld GD, Carroll PR: Predicting risk of prostate specific antigen recurrence after radical prostatectomy with the Center for Prostate Disease Research and Cancer of the Prostate Strategic Urologic Research Endeavor databases. *J Urol* 2001, 166(4):1322-1327.

Nakagawa S, Watanabe M, Nomoto T, et al: Mass screening for prostatic cancer. *Hinyokika Kyo* 1997; 43: 447-452

Neville AM, Bettelheim R, Gelber RD, Goldhirsch A.: Occult axillary lymph-node micrometastases in breast cancer. *Lancet*. 1990 Sep 22;336(8717):759.

Newling DW: Early versus late androgen deprivation therapy in metastatic disease. *Urology* 2001, 58(2 Suppl 1):50-55.

Ogawa O, Shichiri Y, Ohnishi H, et al: Usefulness of ultrasound-guided prostate biopsy in the diagnosis and treatment of localized prostate cancer. *Hinyokika Kyo* 1996; 42: 805-810

Okegawa T, Noda H, Kato M, Miyata A, Nutahara K, Higashihara E: Value of reverse transcription polymerase chain reaction assay in pathological stage T3N0 prostate cancer. *Prostate* 2000, 44(3):210-218.

Oliai BR, Kahane H, Epstein JI. Can basal cells be seen in adenocarcinoma of the prostate?: an immunohistochemical study using high molecular weight cytokeratin (clone 34betaE12) antibody. *Am J Surg Pathol* 2002; 26:1151-60.

O'Malley FP, Grignon DJ, Shum DT.: Usefulness of immunoperoxidase staining with high-molecular-weight cytokeratin in the differential diagnosis of small-acinar lesions of the prostate gland. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*. 1990;417(3):191-6.

Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K and Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A* 1989, 86: 2766-2770.

Parker SL, Tong T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 1997. *CA Cancer J Clin* 1997; 47(1):5-27.

Partin AW, Kattan MW, Subong EN, Walsh PC, Wojno KJ, Oesterling JE, Scardino PT, Pearson JD. Combination of prostate-specific antigen, clinical stage and Gleason score to predict pathological stage of localized prostate cancer. A multi-institutional update. *JAMA* 1997; 277:1445-1451.

Partin AW, Mangold LA, Lamm DM, Walsh PC, Epstein JI, Pearson JD. Contemporary update of prostate cancer staging nomograms (Partin Tables) for the new millennium. *Urology* 2001; 58(6):843-7.

Pirruccello SJ and LeBien TW: The human B cell-associated antigen CD24 is a single chain sialoglycoprotein. *J Immunol.* 1986, 136: 3779-84.

Potter SR, Mangold LA, Shue MJ, Taylor DC, Lecksell KL, Epstein JI, Walsh PC, Partin AW.: Molecular and immunohistochemical staging of men with seminal vesicle invasion and negative pelvic lymph nodes at radical prostatectomy. *Cancer.* 2000 Dec 15;89(12):2577-86.

Quinn DI, Henshall SM, Sutherland RL: Molecular markers of prostate cancer outcome. *Eur J Cancer* 2005, 41(6):858-887.

Raife TJ, Lager DJ, Kemp JD and Dick FR: Expression of CD24 (BA-1) predicts monocytic lineage in acute myeloid leukemia. *Am J Clin Pathol.* 1994; 101: 296-9.

Rasiah KK, Stricker PD, Haynes AM, Delprado W, Turner JJ, Golovsky D, Brenner PC, Kooner R, O'Neill GF, Grygiel JJ et al: Prognostic significance of Gleason pattern in patients with Gleason score 7 prostate carcinoma. *Cancer* 2003, 98(12):2560-2565.

Riegmann PH, Vlietstra RJ, Suurmeijer L, Cleutjens CB and Trapman J. Characterization of the human kallikrein locus. *Genomics*, 1992, 14: 6-11,.

Roach M 3rd, Hanks G, Thames H Jr, Schellhammer P, Shipley WU, Sokol GH, Sandler H. Defining biochemical failure following radiotherapy with or without hormonal therapy in men with clinically localized prostate cancer: recommendations of the RTOG-ASTRO Phoenix Consensus Conference. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2006 Jul 15;65(4):965-74.

Rogers CG, Yan G, Zha S, Gonzalgo ML, Isaacs WB, Luo J, De Marzo AM, Nelson WG, Pavlovich CP. Prostate cancer detection on urinalysis for alpha methylacyl coenzyme a racemase protein. *J Urol* 2004;172:1501-3.

Rubin MA, Zhou M, Dhanasekaran SM, Varambally S, Barrette TR, Sanda MG, Pienta KJ, Ghosh D, Chinnaiyan AM. alpha-Methylacyl coenzyme A racemase as a tissue biomarker for prostate cancer. *Jama* 2002;287:1662-70.

Saitoh H, Hida M, Shimbo T, Nakamura K, Yamagata J, Satoh T. Metastatic patterns of prostatic cancer. Correlation between sites and number of organs involved. *Cancer* 1984; 54:3078-3084.

Sakr WA, Grignon DJ, Crissman JD, Heilbrun LK, Cassin BJ, Pontes JJ, Haas GP. High grade prostatic intraepithelial neoplasia (HGPIN) and prostatic adenocarcinoma between the ages of 20-69: an autopsy study of 249 cases. *In Vivo*. 1994 May-Jun;8(3):439-43.

Schostak M, Christoph C, Muller M, Panick M, Staehler M, Miller K: Transrektaler Ultraschall: mehr als nur eine Punktionshilfe? *Aktuelle Urologie* 2002a; 33: 364-367

Schostak M, Christoph F, Muller M, Heicappell R, Goessl G, Staehler M, Miller K.: Optimizing local anesthesia during 10-core biopsy of the prostate. *Urology*. 2002b Aug;60(2):253-7.

Schostak M, Christoph F, Schrader M, Panick M, Lingnau A, Miller K.: Prostatabiopsie – Chens virtuelles Schema in der Praxis. *Aktuelle Urologie* 2005 Apr;36(2):149-53.

Schostak M, Krause H, Miller K, Schrader M, Weikert S, Christoph F, Kempkensteffen C, Kollermann J. Quantitative real-time RT-PCR of CD24 mRNA in the detection of prostate cancer. *BMC Urol*. 2006a Mar 15;6:7.

Schostak M, Miller K, Krause H, Schrader M, Kempkensteffen C, Kollermann J. Kinetic fluorescence reverse transcriptase-polymerase chain reaction for alpha-methylacyl CoA racemase distinguishes prostate cancer from benign lesions. *Cancer Detect Prev*. 2006b;30(5):449-54.

Schostak M, Krause H, Miller K, Schrader M, Kempkensteffen C, Kollermann J. Does the molecular staging in pelvic lymph nodes improve the detection of relevant prostate cancer metastases? An assessment after 6 years. *BJU Int*. 2007 Apr 8; [Epub ahead of print]

Schumacher M, Burkhard FC, Studer UE. Stellenwert der pelvinen Lymphadenektomie beim klinisch lokalisierten Prostatakarzinom. *Urologe A* 2005; 44:645-651.

Schurr ER, Henderson GA, Kmetec LA, Miller JD, Lamparski HG and Henderson DR. Prostate-specific antigen expression is regulated by an upstream enhancer. *J.Biol.Chem.*, 1996, 271: 7043-7051.

Senner V, Sturm A, Baur I, Schrell UH, Distel L and Paulus W: CD24 promotes invasion of glioma cells in vivo. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1999, 58: 795-802.

Severi G, Hayes VM, Neufing P, Padilla EJ, Tilley WD, Eggleton SA, Morris HA, English DR, Southey MC, Hopper JL, Sutherland RL, Boyle P, Giles GG. Variants in the prostate-specific antigen (PSA) gene and prostate cancer risk, survival, and circulating PSA. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006 Jun;15(6):1142-7.

Shariat SF, Kattan MW, Erdamar S, Nguyen C, Scardino PT, Spencer DM, Wheeler TM, Slawin KM: Detection of clinically significant, occult prostate cancer metastases in lymph nodes using a splice variant-specific rt-PCR assay for human glandular kallikrein. *J Clin Oncol* 2003, 21(7):1223-1231.

Smart CR. The results of prostate carcinoma screening in the U.S. as reflected in the surveillance, epidemiology, and end results program. *Cancer* 1997; 80:1835-1844.

Smith MR, Biggar S and Hussain M: Prostate-specific antigen messenger RNA is expressed in non-prostate cells: implications for detection of micrometastases. *Cancer Res.* 1995, 55: 2640-2644.

Sreekumar A, Nyati MK, Varambally S, Barrette TR, Ghosh D, Lawrence TS and Chinnaiyan AM: Profiling of cancer cells using protein microarrays: discovery of novel radiation-regulated proteins. *Cancer Res.* 2001, 61: 7585-93.

Stamey TA, Yang N, Hay AR, McNeal JE, Freiha FS, Redwine E: Prostate-specific antigen as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate. *N Engl J Med.* 1987 Oct 8;317(15):909-16.

Stamey TA, Caldwell M, McNeal JE, Nolley R, Hemenez M, Downs J: The prostate specific antigen era in the United States is over for prostate cancer: what happened in the last 20 years? *J Urol.* 2004 Oct;172(4 Pt 1):1297-301.

Steinberg GS, Carter BS, Beaty TH, Childs B, Walsh PC. Family history and the risk of prostate cancer. *Prostate* 1990; 17:337-347.

Straub B, Muller M, Krause H, Goessl C, Schrader M, Heicappell R, Miller K.: Molecular staging of pelvic surgical margins after radical prostatectomy: comparison of RT-PCR for prostate-specific antigen and telomerase activity. *Oncol Rep.* 2002 May-Jun;9(3):545-9.

Strom SS, Gu Y, Zhang H, Troncoso P, Babaian RJ, Pettaway CA, Shete S, Spitz MR, Logothetis CJ. Androgen receptor polymorphisms and risk of biochemical failure among prostatectomy patients. *Prostate.* 2004 Sep 1;60(4):343-51.

Suzue K, Montag AG, Tretiakova M, Yang XJ, Sahoo S. Altered expression of alpha-methylacyl-coenzyme A racemase in prostatic adenocarcinoma following hormone therapy. *Am J Clin Pathol* 2005;123:553-61.

Thompson J, Hyytinen ER, Haapala K, Rantala I, Helin HJ, Janne OA, Palvimo JJ, Koivisto PA. Androgen receptor mutations in high-grade prostate cancer before hormonal therapy. *Lab Invest.* 2003 Dec;83(12):1709-13.

Thorson P, Humphrey PA. Minimal adenocarcinoma in prostate needle biopsy tissue. *Am J Clin Pathol* 2000;114:896-909.

U.S. Cancer Statistics Working Group. United States Cancer Statistics: 2002. Incidence and Mortality. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention and National Cancer Institute; 2005.

van Gils MP, Hessels D, van Hooij O, Jannink SA, Peelen WP, Hanssen SL, Witjes JA, Cornel EB, Karthaus HF, Smits GA, Dijkman GA, Mulders PF, Schalken JA.: The time-resolved fluorescence-based PCA3 test on urinary sediments after digital rectal examination; a Dutch multicenter validation of the diagnostic performance. *Clin Cancer Res.* 2007a Feb 1;13(3):939-43.

van Gils MP, Cornel EB, Hessels D, Peelen WP, Witjes JA, Mulders PF, Rittenhouse HG, Schalken JA.: Molecular PCA3 diagnostics on prostatic fluid. *Prostate.* 2007b Apr 17 [Epub ahead of print]

Vanguri VK, Woda BA, Jiang Z. Sensitivity of P504S/alpha-methylacyl-CoA racemase (AMACR) immunohistochemistry for the detection of prostate carcinoma on stored needle biopsies. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2006 Sep;14(3):365-8.

Varambally S, Dhanasekaran SM, Zhou M, Barrette TR, Kumar-Sinha C, Sanda MG, Ghosh D, Pienta KJ, Sewalt RG, Otte AP, Rubin MA, Chinnaiyan AM. The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature*. 2002, 419: 624-9.

Varani J, Dame MK, Wojno K, Schuger L, Johnson KJ. Characteristics of nonmalignant and malignant human prostate in organ culture. *Lab Invest* 1999;79:723-31.

Varma M, Linden MD, Amin MB. Effect of formalin fixation and epitope retrieval techniques on antibody 34betaE12 immunostaining of prostatic tissues. *Mod Pathol* 1999;12:472-8.

Varma M, Jasani B. Diagnostic utility of immunohistochemistry in morphologically difficult prostate cancer: review of current literature. *Histopathology* 2005;47:1-16.

Villers A, McNeal JE, Freiha FS, Boccon-Gibod L, Stamey TA. Invasion of Denonvilliers' fascia in radical prostatectomy specimens. *J Urol* 1993; 149:793-798.

Villers A, Soulie M, Haillet O, Boccon-Gibod L. Prostate cancer screening (III): risk factors, natural history, course without treatment. Characteristics of detected cancers. *Prog Urol* 1997; 7(4):655-661.

Walsh PC, Lepor H, Eggleston JC. Radical prostatectomy with preservation of sexual function: anatomical and pathological considerations. *Prostate* 1983; 4:473-485.

Walsh PC, Partin AW, Epstein JI: Cancer control and quality of life following anatomical radical retropubic prostatectomy: results at 10 years. *J Urol* 1994, 152(5 Pt 2):1831-1836.

Walsh PC, Partin AW. Family history facilitates the early diagnosis of prostate carcinoma. *Cancer* 1997; 80(9):1871-1874.

Wang LZ, Sato K, Tsuchiya N, Yu JG, Ohyama C, Satoh S, Habuchi T, Ogawa O, Kato T. Polymorphisms in prostate-specific antigen (PSA) gene, risk of prostate cancer, and serum PSA levels in Japanese population. *Cancer Lett*. 2003 Dec 8;202(1):53-9.

Warhol MJ, Longtine JA: The ultrastructural localization of prostatic specific antigen and prostatic acid phosphatase in hyperplastic and neoplastic human prostates. *J Urol*. 1985 Sep;134(3):607-13

Waterbor JW, Bueschen AJ. Prostate cancer screening (United States). *Cancer Causes Control* 1995; 6(3):267-274.

Whittemore AS, Wu AH, Kolonel LN, John EM, Gallagher RP, Howe GR, West DW, Teh CZ, Stamey T. Family history and prostate cancer risk in black, white, and Asian men in the United States and Canada. *Am J Epidemiol* 1995; 141(8):732-40.

Wilson JM, Kemp IW, Stein GJ. Cancer of the prostate. Do younger men have a poorer survival rate? *Br J Urol* 1984; 56(4):391-396.

Wingo PA, Tong T, Bolden S. Cancer statistics, 1995. *CA Cancer J Clin* 1995; 45(1):8-30.

Wirth MP, See WA, McLeod DG, Iversen P, Morris T, Carroll K: Bicalutamide 150 mg in addition to standard care in patients with localized or locally advanced prostate cancer: results from the second analysis of the early prostate cancer program at median followup of 5.4 years. *J Urol* 2004, 172(5 Pt 1):1865-1870.

Wolff JM, Borchers H, Jakse G: Determination of local tumour extension in cases of carcinoma of the prostate. *Arch Esp Urol* 1997; 50: 546-553

Wright GL Jr, Grob BM, Haley C, Grossman K, Newhall K, Petrylak D, Troyer J, Konchuba A, Schellhammer PF, Moriarty R.: Upregulation of prostate-specific membrane antigen after androgen-deprivation therapy. *Urology*. 1996 Aug;48(2):326-34.

Wu AH, Whittemore AS, Kolonel LN, John EM, Gallagher RP, West DW, Hankin J, Teh CZ, Dreon DM, Paffenbarger RS Jr. Serum androgens and sex hormone-binding globulins in relation to lifestyle factors in older African-American, white, and Asian men in the United States and Canada. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1995; 4(7):735-741.

Xu J, Stolk JA, Zhang X, Silva SJ, Houghton RL, Matsumura M, Vedvick TS, Leslie KB, Badaro R, Reed SG. Identification of differentially expressed genes in human prostate cancer using subtraction and microarray. *Cancer Res* 2000;60:1677-82

Xu L, Tan AC, Naiman DQ, Geman D, Winslow RL: Robust prostate cancer marker genes emerge from direct integration of inter-study microarray data. *Bioinformatics* 2005, 21(20):3905-3911.

Yang Q. F., Sakurai, T., Shan, L., Yu, Z., Yoshimura, G., Suzuma, T., Tamaki, T., Umemura, T., Nakamura, M., Nakamura, Y., Mori, I., and Kakudo, K. Novel polymorphisms of prostate-specific antigen (PSA) gene associated with PSA mRNA expression in breast cancer. *J.Hum.Genet.* 2000, 45: 363-366.

Yang Q., Shan, L., Segawa, N., Nakamura, M., Nakamura, Y., Mori, I., Sakurai, T., and Kakudo, K. Novel polymorphisms in prostate specific antigen gene and its association with prostate cancer. *Anticancer Res.* 2001, 21: 197-200.

Yang XJ, Laven B, Tretiakova M, Blute RD Jr, Woda BA, Steinberg GD, Jiang Z. Detection of alpha-methylacyl-coenzyme A racemase in postradiation prostatic adenocarcinoma. *Urology* 2003;62:282-6.

Zhou M, Chinnaiyan AM, Kleer CG, Lucas PC, Rubin MA. Alpha-Methylacyl-CoA racemase: a novel tumor marker over-expressed in several human cancers and their precursor lesions. *Am J Surg Pathol* 2002;26:926-31.

Zhou M, Jiang Z, Epstein JI. Expression and diagnostic utility of alpha-methylacyl-CoA-racemase (P504S) in foamy gland and pseudohyperplastic prostate cancer. *Am J Surg Pathol* 2003;27:772-8.

Zielie PJ, Mobley JA, Ebb RG, Jiang Z, Blute RD, Ho SM. A novel diagnostic test for prostate cancer emerges from the determination of alpha-methylacyl-coenzyme a racemase in prostatic secretions. *J Urol* 2004;172:1130-3.

7. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn **Prof. Dr. med. K. Miller** für die langjährige, intensive Förderung und die Schaffung der Rahmenbedingungen, die diese Arbeit ermöglicht haben. Das in mich gesetzte Vertrauen hat mich zutiefst berührt und anhaltend motiviert.

Herrn **Dr. rer. nat. Hans Krause** danke ich herzlich für die geduldige, freundschaftliche und konstruktive Unterstützung und Zusammenarbeit in allen molekularbiologischen und technischen Fragen.

Meinem engen Kooperationspartner Herrn **Priv.-Doz. Dr. med. Jens Köllermann** danke ich für die freundschaftliche, intensive und konstruktive Zusammenarbeit auf dem Weg zu unserem gemeinsamen Ziel.

Herrn **Prof. Dr. med. Markus Müller** danke ich für die konstruktive Zusammenarbeit, zahlreiche wissenschaftliche Anregungen und die gute Unterstützung.

Frau **Dr. med. Klaudia Matischak** danke ich für die konstruktive Unterstützung bei der Erstellung des Manuskripts.

Herrn **cand. prom. Christian Braun** danke ich für die sorgfältige Aufarbeitung der PSA-Promotersequenzen.

Für die hochmotivierte und engagierte technische Assistenz danke ich zuallererst **Frau MTA Antonia Maas** sowie auch herzlich **Frau MTA Waltraud Jekabsons** und **Frau MTA Petra von Kwiatkowski**. Ohne ihre prompte und sehr verlässliche Zuarbeit im Labor wäre mein Projekt nicht möglich gewesen.

Meiner Ehefrau **Brigitte** und meinen Söhnen **Jonathan** und **Gabriel** danke ich von Herzen für die liebevolle, geduldige und optimistische Unterstützung, die stete Motivierung sowie die Bereitschaft, für dieses Projekt auf viele gemeinsame Stunden zu verzichten.

ERKLÄRUNG

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wird bzw. wurde,
- welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

.....
Datum

.....
Unterschrift