

Aus der Urologischen Klinik und Poliklinik
der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. H. Riedmiller

**Immunhistochemische Untersuchungen
zu PSA-Expression und Neovaskularisierung
von Mamma- und Prostatakarzinom**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Elisabeth Thomasius

aus Leer

Würzburg, Februar 2005

Referent: Professor Dr. med. H. Riedmiller

Koreferent: Professor Dr. med. A. Marx

Dekan: Professor Dr. med. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Oktober 2005

Die Promovendin ist Ärztin.

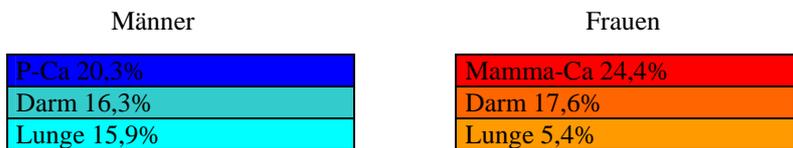
INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	
1.1 Grundlagen des Mammacarcinoms	2
1.2 Grundlagen des Prostatacarcinoms	4
1.3 Untersuchte Parameter	
1.3.1 Prostata-spezifisches Antigen	5
1.3.2 Human Hematopoietic Progenitor Cell Antigen (CD34)	7
2. MATERIAL UND METHODEN	
2.1 Tumormaterial	
2.1.1 Herkunft	9
2.2 Herstellung der immunhistochemisch gefärbten Schnitte	
2.2.1 Prinzipien der Immunhistochemie	12
2.2.2 ABC – Methode	
2.2.3 Färbetechnik und verwendete Materialien	13
2.3 Auswertung der Schnitte	15
2.4 Statistische Analyse	17
3. ERGEBNISSE	19
4. DISKUSSION	28
5. ZUSAMMENFASSUNG	40
6. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	41
7. LITERATURVERZEICHNIS	42

1. EINLEITUNG

Neben den Herz-Kreislauf-Erkrankungen gehören die Malignome heute zu den Hauptursachen von Morbidität und Mortalität in den westlichen Industrienationen (**Sellers et al, 2002**).

Sowohl das Mamma- als auch das Prostatacarcinom sind in der geschlechtsspezifisch aufgeführten, geschätzten Zahl der Krebsneuerkrankungen in der Bundesrepublik Deutschland jeweils führend. So beträgt der prozentuale Anteil des P-Cas etwa 20%, der des Mamma-Cas sogar 25%, gefolgt von Malignomen des Darms und der Lunge bei beiden Geschlechtern.



(Daten entnommen aus: „Krebs in Deutschland“, 4.überarbeitete und aktualisierte Ausgabe, Arbeitsgemeinschaft bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, Saarbrücken 2004)

Das Prostata- und das Mammacarcinom weisen einige Gemeinsamkeiten auf:

- beide Tumoren sind hormonabhängig (**Dunsmuir et al, 1998**) und werden auch durch die Ernährung beeinflusst (**Ross, 2003**);
- beide metastasieren hämatogen bevorzugt in das (Achsen-)Skelett;
- und es handelt sich jeweils um Erkrankungen, deren Inzidenz kontinuierlich mit dem Lebensalter ansteigt, wobei der jeweilige Altersgipfel bei 40-70 Jahren (Mamma) respektive 50-60 Jahren (Prostata) liegt.

Vor allem aber läßt sich bei Patienten und Patientinnen, die an einem dieser beiden Tumore leiden, das Prostata-spezifische Antigen (PSA) im Serum sowie auch im Tumorgewebe nachweisen. Da es das Ziel dieser Arbeit ist, die Frage nach einem möglichen kausalen Zusammenhang zwischen dem qualitativen PSA-Gehalt der immunhistochemisch untersuchten Tumoren und der Anzahl der quantitativ bestimmten Gefäße im Sinne einer möglichen antiangiogenen Potenz des Proteins zu klären, sind die sich in Epidemiologie und Ätiologie ähnelnden Carcinome, für deren Diagnostik

und Therapie das PSA als Tumormarker bereits etabliert ist oder – für das Mammacarcinom – möglicherweise von prognostischem Wert sein kann, für eine diesbezügliche Untersuchung geeignet.

Die Prognose jedes malignen Tumors ist in hohem Maße von seinem angiogenen Potential beziehungsweise dem Wachstum neuer, Sauerstoff und Nährstoffe zuführender Blutgefäße abhängig (**Folkman et al, 1990**). Das PSA verfügt aber über mögliche antiangiogene Eigenschaften (**Fortier et al, 1999**), die eben diese Gefäßneubildung behindern oder unterbinden könnten, was theoretisch mit einer verzögerten Tumorprogression und folglich einer besseren Prognose für den Patienten verbunden wäre. Um diese etwaige Potenz des PSA zu prüfen, wurde in der vorliegenden Arbeit zum einen der PSA-Gehalt des jeweiligen Tumors anhand immunhistochemischer Untersuchungen bestimmt und zum anderen färbten wir mit Hilfe des Gefäßmarkers CD34 die Gefäßendothelien an, um anschließend quantitative Aussagen bezüglich der Angiogenese im Gewebe treffen zu können. In der statistischen Auswertung wurde als zu untersuchende Hypothese ein negativ korrelierender Zusammenhang dieser beiden Parameter zugrunde gelegt.

1.1 Grundlagen des Mammacarcinoms

Das Mammacarcinom ist das in der weiblichen, nordamerikanischen Bevölkerung am häufigsten diagnostizierte Malignom überhaupt und rangiert bezüglich der Mortalität nur hinter dem Bronchialcarcinom an zweiter Stelle (**Sellers et al, 2002**). In der deutschen Bevölkerung gilt das Carcinom sogar als die Haupttodesursache bei Frauen zwischen 40 und 50 Jahren (**Goerke et al, 2003**). Die Tatsache, daß seine Inzidenz einer großen geographischen sowie ethnologischen Variationsbreite unterliegt, läßt darauf schließen, daß äußere Faktoren wie die Lebensweise diesbezüglich großen Einfluß ausüben (**Sellers et al, 2002**). So sind nutritive Gewohnheiten wie fettreiche Kost und das häufig konsekutive Übergewicht ebenso wie starker Alkoholkonsum und eine generell ungesunde Lebensführung (körperliche Inaktivität, Rauchen) wahrscheinliche Risikofaktoren (**Sellers et al, 2002**). Als gut etablierte Risikofaktoren gelten alle Ursachen eines verlängerten Östrogeneinflusses wie frühe Menarche, späte Menopause, Nulliparität oder späte Erstgravidität (**Pfleiderer et al, 2000**).

Desweiteren erhöhen vorausgegangene Tumoren der kontralateralen Seite und andere gynäkologische Malignome (Endometrium-CA, Ovarial-CA) sowie die Mastopathie 2. oder 3. Grades das relative Risiko (**Goerke et al, 2003**). Nur in 5-10 % aller Fälle konnte eine genetische Prädisposition nachgewiesen werden, die v.a. auch bei der familiären Häufung des frühzeitig (<40 Jahren) auftretenden Tumors zum Ausdruck kommt. Bei über 90 % dieser erblichen Variante wurden Mutationen im sogenannten BRCA-1-(Chromosom 17) oder BRCA-2-Gen (Chromosom 13) gefunden, deren Trägerinnen wiederum ein ca. 90 %iges Erkrankungsrisiko haben (**Pfleiderer et al, 2000**). Auch wenn also das Risiko der einzelnen Frau bei einer positiven Familienanamnese um ein Vielfaches erhöht sein kann, ist der Anteil dieser Patientinnen an der Gesamtzahl der Mammacarcinome eher gering.

Histologisch unterscheidet man im wesentlichen zwei Hauptformen:

- das von den kleinen Milchgangepithelien ausgehende *duktale Carcinom*, das mit 80 % aller Fälle das weitaus häufigere darstellt
- und das primär in den Drüsenazini entstehende *lobuläre Carcinom* (10 %)

Daneben finden sich diverse Sonderformen wie das tubuläre, das medulläre, das kribriforme, das muzinöse oder das inflammatorische Mammakarzinom (**Tavassoli et Devilee, 2003**).

Die Therapie der Wahl besteht in der operativen excisio in sano. Bei kleinen Tumoren (< 2cm) oder wenn im Falle eines ausgedehnten Befundes durch eine primäre Chemotherapie eine Reduktion des Tumors zu erreichen war, können brusterhaltende Operationsverfahren zur Anwendung kommen (**Pfleiderer et al, 2000**). In Abhängigkeit von Größe und Lage des Carcinoms wird eine Quadrantektomie, Segmentresektion / Lumpektomie oder eine reine Tumorexcision durchgeführt. Obligat ist immer ein ausreichender tumorfreier Randsaum sowie eine postoperative Radiatio und die Entfernung der axillären Lymphknoten. Sind diese allerdings klinisch und sonographisch unauffällig besteht auch die Möglichkeit, nur den sogenannten „Sentinel – Lymphknoten“ zu entfernen und bei fehlendem Nachweis von Tumorzellen in der Schnellschnittuntersuchung auf die Axillardissektion zu verzichten. Dazu wird der „Wächterlymphknoten“ präoperativ radioaktiv und / oder mit Blaulösung markiert, mit Hilfe einer Sonde intraoperativ differenziert und entnommen (**Goerke et al, 2003**). Bei infiltrierend wachsenden oder multifokalen Mammacarcinomen sowie ausgedehnten

Gefäßeinbrüchen und begleitender Lymphangiosis carcinomatosa besteht hingegen grundsätzlich die Indikation zu einer modifizierten radikalen Mastektomie mit Dissektion der axillären Lymphknoten, es sei denn, eine bereits erfolgte Fernmetastasierung ist für die weitere Prognose der Patientin entscheidend, so daß die operative Therapie auf eine palliative Sanierung des Primärherdes beschränkt bleibt. Je nach Staging, Grading, Alter, Lymphknotenstatus und Hormonrezeptorstatus kann generell eine (neo)adjuvante oder palliative Radiatio oder systemische Chemotherapie erfolgen. Etwa 80% der Tumoren sind östrogen- / gestagenrezeptorpositiv, so daß sich bei diesen Patientinnen auch eine gezielte hormonelle Behandlung anbietet (**Goerke et al, 2003**).

1.2 Grundlagen des Prostatacarcinoms

Beim Prostatacarcinom (PCa) besteht eine Besonderheit in seinem langjährigen, klinisch inapparenten Verlauf, so daß bei 40 % der über 50jährigen und 55 % der über 80jährigen post mortem ein sogenanntes *latentes CA* im Rahmen einer Autopsie entdeckt wurde. Als Risikofaktoren gelten Alter, familiäre Belastung (auch wenn diese Fälle ähnlich wie beim Mammacarcinom nur etwa 10% der Gesamtzahl ausmachen), exogene Einflüsse wie Alkoholkonsum oder Vitaminmangelzustände (v.a. der Vitamine A, B6, B12 oder des Spurenelementes Selen) bei fehlerhafter, einseitiger Ernährung (**Bastian et al, 2004**) und vor allem endokrinologische Veränderungen im Sinne eines verstärkten Androgeneinflusses. Klinisch fällt dieser Tumor häufig erst durch seine Metastasierung (lumbosakrale Ischialgien bei osteoblastischen Metastasen) auf. Eine allgemeine B-Symptomatik (Gewichtsverlust, Tumoranämie) kann ebenso ein Hinweis auf ein PCa sein wie die Zeichen einer Urämie im Sinne eines mechanisch bedingten (Ureterverschluß durch Carcinomwachstum) postrenalen Nierenversagens. Da der Tumor als hoch-, mittel- bzw. schwachdifferenziertes Adenocarcinom (**Eble et al, 2004**) seinen Ausgangspunkt vom Drüsenepithel der Außenzone nimmt, fehlen typische Symptome, wie man sie beispielsweise bei der benignen Prostatahypertrophie (BPH) im Sinne von häufigem Harndrang, Strahlabschwächung oder Nykturie findet (**Merkle et al, 1997**). Das Carcinom entzieht sich also häufig einer frühzeitigen Detektion, auch eine effektive Prävention sowie ein kurativer Therapieansatz bei fortgeschrittenem

Tumor sind bisher nicht bekannt (**Luboldt et al, 2004**). Umso bedeutsamer ist die ab dem 45. Lebensjahr empfohlene klinische Untersuchung und eine Bestimmung des Prostata-spezifischen Antigens, mithilfe dessen das Malignom im organbegrenzten Stadium durch eine Probebiopsie erkannt werden kann (**Luboldt et al, 2004**).

In der Therapie des PCas hat sich der operative Ansatz der radikalen Prostatektomie (=Entfernung des gesamten Organs mit den Samenblasen und anschließender Blasen-Urethra-Anastomose) beim lokal begrenzten Tumor etabliert (**Eichenauer et al, 2003**). Alternativ dazu ist bei Patienten mit niedrigem Risiko (PSA < 10ng/mL, Gleason-Score < 6 und T1c bis T2a in der TNM-Klassifikation) auch eine reine perkutane Strahlentherapie möglich (**Stuschke et al, 2004**), die im Vergleich zur Operation mit einer geringeren Inkontinenz- und Impotenzrate einhergeht (**Merkle et al, 1997**). Beim lokal fortgeschrittenen oder metastasierten Malignom hat sich der endokrine therapeutische Ansatz im Sinne einer Androgenentzugstherapie bewährt, welche sich operativ (Orchiektomie) oder medikamentös (Antiandrogene, Östrogene, LH-RH-Analoga) durchführen läßt. Der Erfolg bestätigt die Erkenntnis, daß hormonelle Faktoren zu Entstehung und Wachstum dieser Erkrankung beitragen (**Merkle et al, 1997**). Der kombinierte Einsatz von Hormonentzugstherapie und Radiatio bei Hochrisikopatienten (PSA > 20ng/mL, Gleason-Score > 8) kann im Einzelfall eine kurative Option sein, auch wenn der zusätzliche Nutzen der Strahlentherapie generell umstritten ist. Es läßt sich aber vor allem eine gute lokale Tumorkontrolle erreichen (**Stuschke et al, 2004**).

1.3 Untersuchte Parameter

1.3.1 Prostata-spezifisches Antigen

Als einer der wichtigsten Tumormarker überhaupt hat sich der Nachweis des Prostata-spezifischen Antigens (PSA) im Serum in der Diagnostik und Therapieüberwachung des Prostatacarcinoms erwiesen (**Lein et al, 2000**). Entgegen langjähriger und weitverbreiteter Annahmen wird es nicht nur in sekretorisch differenzierten Zellen des prostatistischen Epithels respektive also dem männlichen Organismus gebildet, sondern läßt sich auch in zahlreichen Körperflüssigkeiten und Geweben der Frau nachweisen.

So wurde PSA im Endometrium (**Clements et al, 1994**), im Pankreas, den Speicheldrüsen (**Elgamal et al, 1996**) sowie auch in Fruchtwasser (**Mannello et al, 1997**), Speichel und Liquor (**Melegos et al, 1997**) entdeckt. Hauptproduzent im weiblichen Organismus ist jedoch die Mamma; zum einen zeigt sich das PSA in maligne entartetem Gewebe, zum anderen aber auch bei benignen Brustkrankungen und gesunden Kontrollpersonen (**Yu et al, 1996**) sowie in der Milch der laktierenden Mamma (**Yu et al, 1995**) und den aus Cysten oder Mamillen aspirierten Flüssigkeiten (**Yu et al, 1999**).

Das PSA ist eine Serinprotease, die sowohl vom gesunden als auch dem maligne entarteten Prostataepithel gebildet wird (**Stenman et al, 1999**). Es ist seit langem in der Diagnostik des Prostatacarcinoms etabliert (**Peehl et al, 1995** und **De Angelis et al, 2000**) und ein dementsprechend gut untersuchter Marker. Die enzymatisch aktive Form des PSA zeigt sich als ein einkettiges Glykoprotein aus 237 Aminosäuren, das eine molekulare Masse von etwa 33 kDa hat und zu der auf Chromosom 19 kodierten Kallikrein-Genfamilie zählt (**Henttu et al, 1994**). Selbige setzt sich aus drei Mitgliedern zusammen : dem PSA (auch als hK-3 bezeichnet), dem „tissue kallikrein“ (prKK oder hK-2) und dem „human glandular kallikrein 1“ (hGK-1). Alle drei zeigen nicht nur Sequenzhomologien, nämlich 80 % im Falle von PSA und hGK-1 (**Schaller et al, 1987**) respektive 62 % im Vergleich PSA und prKK (**Watt et al, 1986**), sondern scheinen auch einer hormonellen Regulation zu unterliegen (**Diamandis et al, 2000**). Desweiteren zeichnen sie sich durch ihre enzymatische Aktivität aus, die bei prKK und hGK-1 dem Trypsin, einem Verdauungsenzym des Pankreas, und bei PSA dem Chymotrypsin ähnelt, welches ebenfalls im Pankreas gebildet wird und als Endopeptidase Peptidketten v.a. nach aromatischen Aminosäuren spaltet (**Pschyrembl, 1994**).

Die physiologische Hauptfunktion des PSAs im männlichen Organismus besteht in der proteolytischen Spaltung der gelformenden Proteine aus den Samenblasen, Seminogelin1 und 2 und Fibronektin. Dadurch kommt es zu einer Verflüssigung des Ejakulats und einer konsekutiven Erhöhung der Spermienmotilität (**De Angelis et al, 2000**). Zuvor ist allerdings die Aktivierung der unreifen sezernierten Vorstufe – dem sogenannten PSA-Zymogen – durch das humane Kallikrein2 (hK-2), ein

Gewebskallikrein, das ebenfalls in der Prostata gebildet wird, notwendig (**De Angelis et al, 2000**).

Nun läßt sich das PSA aber nicht nur in Prostatagewebe und Seminalplasma nachweisen, sondern man findet es auch im Serum sowohl gesunder Probanden als auch von Patienten, die an einem PCa oder einer benignen Hyperplasie dieses Organs leiden (**Stenman et al, 1999**).

Dabei ist von Bedeutung, daß es in verschiedenen Formen vorkommt:

- als freies, nicht gebundenes PSA;
- im Komplex mit alpha1-Antichymotrypsin (ACT), wobei dieses mit etwa 70-90 % den größten Anteil ausmacht;
- sowie gebunden an andere Mitglieder der sogenannten „Superfamilie der extrazellulären Serinproteasen-Inhibitoren (serpins)“ , z.B. alpha1-Antitrypsin (**Lilja et al, 1993**).

Diese molekularen Unterschiede sind von prognostischem Wert, da sich erwiesen hat, daß gerade bei nur geringfügiger Erhöhung der PSA-Werte die diagnostische Grauzone einer Unterscheidung zwischen BPH und lokalem CA Probleme bereitet (**De Angelis et al, 2000**). Hier hat die Berechnung des Anteils von freiem PSA an der Gesamtmenge (prozentuales PSA), also die Bildung des Quotienten fPSA/tPSA diskriminativen Wert bezüglich der Fragestellung benigne oder maligne Prostataerkrankung erlangt (**Becker et al, 2000**), denn bei einem „allgemein akzeptierten tPSA- Grenzwert von 4 ug/l“ (**Lein et al, 2000**) „steigt die Wahrscheinlichkeit, an einem Prostatakarzinom erkrankt zu sein, mit sinkenden fPSA-Werten.“

1.3.2 Human Hematopoietic Progenitor Cell Antigen (CD34)

Bei dem sogenannten CD34 handelt es sich um ein transmembranäres Glykoprotein, dessen molekulare Masse 110 kDa beträgt (**van de Rijn et al, 1994**) und das auf Chromosom 1 kodiert wird (**Howell et al, 1991**). Seine Funktion ist augenblicklich noch ungeklärt (**Enzinger und Weiss, 2001**), es wird jedoch eine etwaige modulatorische Bedeutung bezüglich der Zelladhäsion und auch der intrazellulären Signaltransduktion diskutiert. Für ersteres spricht die Tatsache, daß die CD34-

Expression einer inversen Korrelation bezüglich der Expression zweier weiterer Oberflächenmoleküle, ELAM-1 und ICAM-1, unterliegt (**Delia et al, 1993**). Je mehr CD34 sich also nachweisen läßt, desto geringer ist die Ausprägung dieser für den Zell-Zell-Kontakt bedeutenden Moleküle. Eine mögliche Beteiligung am komplexen Vorgang der Signaltransduktion ins Zellinnere erscheint plausibel, wenn man bedenkt, daß das CD34 in Folge einer Proteinkinase C-Aktivierung phosphoryliert werden kann (**Sutherland et al, 1992 und Fackler et al, 1990**), ein biochemischer Mechanismus, der in diesem Zusammenhang bekannt und gut untersucht ist. CD34 findet sich nicht nur in dendritischen Zellen, glatten Muskelzellen, Zellen des lymphatischen Systems und bei verschiedenen malignen Prozessen, sondern v.a. auch in den Gefäßendothelien (**van de Rijn et al, 1994**). Molekularbiologisch fällt hier auf, daß sich die normalerweise luminal gewandte Expression bei den in malignen Tumoren sprossenden Gefäßen eher nach der dem Lumen abgewandten, cytoplasmatischen Seite verschoben hat. Von solchen Phänomenen bleibt sein unbestrittener Wert als Gefäßmarker in immunhistochemischen Untersuchungen allerdings unbeeinträchtigt (**Fina et al, 1990**), weswegen er auch in der vorliegenden Studie in diesem Sinne verwandt wird.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Tumormaterial

2.1.1 Herkunft

Die vorliegende Studie basiert auf zwei Gruppen von Patienten der Universitätskliniken Würzburg:

Zum einen wurden Tumorschnitte von 18 Patientinnen der Frauenklinik untersucht, welche sich alle im Laufe des Jahres 1999 einer operativen Therapie des bei ihnen diagnostizierten Mammacarcinoms unterzogen hatten. Die niedrige Anzahl der Probandinnen erklärt sich daraus, daß nur von diesen auch PSA-Serum-Werte bestimmt worden waren, die ursprünglich ebenfalls in die Studie einfließen sollten. Da allerdings nur bei 2 Patientinnen messbare Werte nachweisbar waren, ließ sich die geplante Untersuchung des Zusammenhangs von PSA-Nachweis im Serum und PSA-Nachweis im Tumor nicht in die statistischen Berechnungen übernehmen.

Zum anderen stammten die Präparate von 33 Patienten der Urologischen Klinik, bei welchen dort im Jahr 2000 eine radikale Prostatektomie durchgeführt worden war.

Bei den männlichen Patienten wurde außerdem anhand der initial im Blut bestimmten PSA-Werte eine weitere Unterteilung in vier Gruppen vorgenommen, bei der in Gruppe 1 ein Gesamtwert von 0 bis 4 mg/ml, in Gruppe 2 von 4 bis 10 mg/ml, in Gruppe 3 von 10 bis 20 mg/ml und in Gruppe 4 von mehr als 20 mg/ml zugrunde gelegt wurde.

Da bei den Patientinnen, die an einem Mammacarcinom erkrankt waren, entgegen unserer ursprünglichen Erwartung der PSA-Wert im Serum bis auf zwei Fälle – in denen er auch nur minimal messbar war - unter der Nachweisgrenze lag (s.o.), wurde hier auf weitere Einteilungen verzichtet.

Alle Präparate waren am Pathologischen Institut der Universität Würzburg histologisch untersucht und unter Berücksichtigung der TNM-Klassifikation (**Wittekind, 2003**) reklassifiziert worden. Hinsichtlich des Malignitätsgrades wurde die Bestimmung

entsprechend der Richtlinien der Weltgesundheitsorganisation WHO durchgeführt. Beim Prostatacarcinom erfolgte außerdem eine Einteilung nach dem Gleason-Score, der das Tumor-Grading anhand morphologischer Kriterien bestimmt, für die je nach Ausprägung ein Punktwert gegeben wird. Die Summe der einzelnen Kategorien, zu denen Drüsenform, -größe und -abstand sowie Herdgrenze und Stromainvasion zählen, ergibt den sogenannten Gleason-Score. Dieser liegt im Bereich von 2 bis 10 Punkten und gilt bei < 6 als günstig, ab 7 als ungünstig (Amin et al, 2004).

Tabelle 1: Mammacarcinom

Patient	Gruppe	PSA	Gefäße/MW	TU-Grade	TNM-Stadium	Alter [Jahre]
639/99	0	0	11,33	2	T1b N1 M0	64
2414/99	0	0	12,33	3	T2 N1 M0	59
2858/99	0	0	5,33	1	T2 N0 Mx	42
3472/99	0	0	10,33	3	T2 N1 M0	48
6039/99	0	1	11	2	T1c N0 M0	75
6349/99	0	1	11	2	T2 N1 M0	43
7143/99	0	1	11,67	2	T2 N0 Mx	80
9473/99	0	0	14,67	3	T2 N2 M0	53
9939/99	0	0	9	3	T1c N0 Mx	55
10893/99	0	1	8,67	2	T1c N0 Mx	70
11463/99	0	1	10,67	3	T2 N1 Mx	74
11574/99	0	1	12,5	2	T2 N0 M0	58
11883/99	0	1	9,33	2	T1c N0 Mx	83
11950/99	0	0	9,67	3	T1c N1 Mx	58
12238/99	0	0	21,33	3	T1c N1 M0	54
12695/99	0	0	9,33	2	T1b Nx M0	63
17963/99	0	0	12,67	3	T2 Nx Mx	80
19315/99	0	0	13,33	2	T2 N1 M0	44

Tabelle 2: Prostatacarcinom

Patient	Gruppe	PSA	Gefäße/MW	TU-Grade	TNM-Stadium	Alter [Jahre]
1794/00	1	1	9	2	T2a N0 Mx	69
4808/00	1	1	11,33	2	T2b Nx M0	62
8324/00	1	2	15	2	T2a N0 Mx	65
10757/00	1	1	19,67	3	T2b N0 Mx	65
12295/00	1	2	15,33	2	T2b Nx Mx	55
14919/00	1	2	19	2	T2b NxMx	74
15085/00	1	0	7,5	2	T2b N0 Mx	75
15962/00	1	0	25,67	3	T4 N0 Mx	56
641/00	2	1	17	2	T3a N0 Mx	61
716/00	2	1	14	2	T3a Nx Mx	56
1463/00	2	1	19	2	T3a N0 Mx	70
1982/00	2	1	13,33	2	T2b N0 Mx	72
2728/00	2	2	9,67	2	T2b N0 Mx	69
4521/00	2	1	16,67	2	T2a N0 Mx	35
4782/00	2	1	24,67	2	T2b N0 Mx	62
4801/00	2	1	18,67	3	T2b Nx Mx	72
5065/00	2	2	23,33	3	T2b N0 Mx	69
5261/00	2	1	13,33	3	T3a N1 Mx	56
1377/00	3	2	27	3	T3b N0 Mx	61
1923/00	3	3	15,33	2	T2b N0 Mx	59
3458/00	3	1	35,67	3	T2b N1 Mx	61
3998/00	3	2	42	3	T3b N0 Mx	67
9565/00	3	1	12	2	T2b Nx Mx	72
11128/00	3	2	11	3	T2c N0 Mx	61
12456/00	3	2	14,67	2	T3a N0 Mx	56
3048/00	4	0	36	2	T2b N1 Mx	59
4162/00	4	1	6,67	3	T3b N1 M1a	66
5320/00	4	1	5,33	2	T2a N0 Mx	57
6009/00	4	2	27,33	3	T3b N1 Mx	54
8291/00	4	2	59,67	3	T3b N0 Mx	69
10793/00	4	2	30,67	2	T3a N0 Mx	63
13502/00	4	2	11,67	2	T4 N0 Mx	59
24702/00	4	3	28	3	T3b N1 Mx	60

2.2. Herstellung der immunhistochemisch gefärbten Schnitte

2.2.1. Prinzipien der Immunhistochemie

Die Immunhistochemie nutzt die grundlegende Affinität der immunologischen Antikörper-Antigen-Reaktion. Indem man einen Antikörper, der gegen den zu untersuchenden Gewebebestandteil (Antigen) gerichtet ist, direkt oder indirekt mit einem Farbstoff markiert, lassen sich gezielt verschiedene Strukturen sichtbar machen.

Grundsätzlich unterscheidet man zwei Klassen von Antikörpern: zum einen die monoklonalen, zum anderen die polyklonalen. Der kennzeichnende Unterschied besteht darin, daß erstere von einem einzigen Plasmazellklon abstammen, wohingegen letztere von vielen verschiedenen Plasmazellen gebildet werden. Daraus ergibt sich auch der signifikante Vorteil der monoklonalen Antikörper – die hohe Spezifität. Sie sind nur gegen ein einziges bestimmtes Epitop gerichtet, welches dadurch gezielt sichtbar gemacht werden kann; übermäßige zusätzliche Anfärbung unerwünschter Intra- und Interzellulärstrukturen läßt sich somit weitgehend vermeiden, was eine spätere Auswertung erheblich erleichtert.

Allerdings kann sich gerade diese Eigenschaft paradoxerweise auch recht nachteilig auswirken, wenn es nämlich zu unerwarteten Kreuzreaktionen kommt. Dies ist dann der Fall, wenn nicht nur das untersuchte sondern auch andere Antigene das entsprechende Epitop aufweisen. Ein weiteres Problem beim Einsatz monoklonaler Antikörper in der Immunhistochemie liegt in ihrer Sensitivität, die leider oftmals durch den Fixationsvorgang beträchtlich leidet; wird nämlich das für den Nachweis entscheidende Epitop zerstört, so bleibt das Antigen für die Färbung unsichtbar, obwohl es gegebenenfalls vorhanden ist (**Naish, 1989**).

Trotzdem haben sich die monoklonalen Antikörper gegenüber den polyklonalen bezüglich des immunhistochemischen Einsatzes deutlich bewährt.

2.2.2. ABC-Methode

Bei der ABC-Methode handelt es sich um ein immunhistochemisches Färbeverfahren, das sich die natürliche Affinität von Avidin zu Biotin im Sinne eines Avidin-Biotin-

Komplexes (ABC) zunutze macht, und mit dessen Hilfe sich bestimmte Zellbestandteile sichtbar machen lassen.

Avidin ist ein tetrameres Glykoprotein mit vier Bindungsstellen für das wasserlösliche Vitamin Biotin, dessen Molekulargewicht 68 kDa beträgt und das ursprünglich aus Hühnereiweiß gewonnen wurde.

Um die dabei zuweilen auftretenden unspezifischen Reaktionen zu vermeiden, bedient man sich heute des reineren, gentechnisch hergestellten *Streptavidin*, welches sich aus dem Bakterium *Streptomyces avidinii* isolieren lässt.

Damit sich zwischen dem das zu untersuchende Antigen bindenden Primärantikörper und dem mit einem – für die spätere Farbreaktion wichtigen – Enzym (z.B. Peroxidase oder alkalische Phosphatase) gekoppelten ABC-Komplex eine Verbindung herstellen läßt, bedient man sich biotinylierter Brückenantikörper. Dabei handelt es sich meistens um sogenannte Multi-Link-Antikörper, also eine Lösung mit Brücken-Antikörpern verschiedener Tierspezies.

Diese binden über jeweils drei der vier möglichen Bindungsstellen des Avidins ein Molekül Biotin.

Der imminente Vorteil dieser Methode liegt in ihrer hohen Sensitivität, die beispielsweise 4-8 fach stärker ist als die der PAP- oder APAAP-Methode; leider läßt sich im Gegensatz zu diesen beiden aber auch keine Signalverstärkung durch wiederholte Durchführung erreichen.

Ein Problem stellt außerdem etwaiges endogenes Biotin dar, das, wenn es im Gewebe vorhanden ist, zu unerwünschten, überlagernden Hintergrundreaktionen führen kann (**Noll und Schaub-Kuhnen, 2000**).

2.2.3. Färbetechnik und verwendete Materialien

Zunächst wurde das Tumorgewebe in Form von formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten 1µm-dicken Schnitten auf Objektträger aufgebracht und somit der immunhistochemischen Färbung zugänglich gemacht. Diese wurden dann durch aufeinander folgende, jeweils 15- minütige Behandlungen in Xylol, Aceton und Aceton/TRIS-Puffer-Lösung (Verhältnis Aceton : TRIS-Puffer = 1 : 2) entparaffiniert und anschließend kurz in TRIS-Puffer gespült, dessen Herstellung folgendermaßen

erfolgte: 4,5g TRIS, 34,25g TRIS-HCl und 43,9g NaCl wurden mit Aqua dest. auf 5l aufgefüllt und auf einen pH-Wert von 5.6 eingestellt. Um letzte Paraffinreste sicher zu entfernen, erfolgte danach die Vorbehandlung der Schnitte durch Kochen in 10mM Citratpuffer (pH 6,0 Zusammensetzung: 9ml Stammlösung A (21,01g (0,1M) Citronensäure in 1000ml A.dest.) und 41ml Stammlösung B (29,41g (0,1M) Natriumcitrat in 1000ml A.dest.); Autoklav bei 1bar; 30 min) und anschließendes Abkühlen in demselben (CD34 über 25min; PSA über 40min). Nachdem die Proben anschließend über weitere 30 Minuten mit 0,3% H₂O₂ (endogene Phosphatase) behandelt und durch kurzes Einstellen (20 Minuten) in 20%iges Pferdeserum mögliche unspezifische Bindungsstellen weitgehend blockiert worden waren, konnte mit der eigentlichen immunhistochemischen Färbung begonnen werden.

Der von der Maus stammende, monoclonale Primärantikörper (CD34: M0616 von DakoCytomation Hamburg, Klon: QBEnd/10) (PSA: M0750 von DakoCytomation Hamburg, Klon: ER-PR8) wurde in 1:150facher Phosphatpuffer-Verdünnung (PBS, Zusammensetzung: 140mM NaCl, 2mM KCl, 10mM NaH₂PO₄, 1,5 mM KH₂PO₄ auf 1l mit A.dest., pH 7,4) aufgetragen und die Schnitte anschließend für 60 Minuten inkubiert. Nach kurzer Spülung in TRIS-Puffer konnte dann der über das Fc-Fragment an Biotin gebundene Sekundärantikörper (biotinylierter spez. Pferde-AK gegen Maus, Ziege und Kaninchen, BA-1300 von Vector Lab/Linaris, Wertheim, Ansatz: 4Tropfen auf 5ml PBS) ebenfalls in Verdünnung mit PBS (1 : 200) hinzugegeben und die Präparate erneut über 30 Minuten inkubiert werden. Es folgte der Ansatz des mit der Peroxidase verbundenen ABC-Kits (PK-6100 von Vector Lab/Linaris, Wertheim) mit 30minütiger und schließlich des Färbesubstrates Histogreen (E109 von Vector Lab/Linaris, Wertheim) mit 5minütiger Inkubation. Zum Schluß wurden die Schnitte der besseren Übersichtlichkeit wegen mit Hämalaun gegengefärbt (5sec), in TRIS-Puffer stabilisiert und gebläut (2-3min) und schließlich in aufsteigender Alkoholreihe entwässert sowie mit Vectamount (H-6003 von Vector Lab/Linaris, Wertheim) eingedeckt.

Die Inkubationen erfolgten ausschließlich bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer, anschließend wurde jeweils gründlich mit TRIS-Puffer gespült. Die Kontrollen wurden mit PCNA-AK (billiger und immer stark positiver Zellproliferationsantikörper) durchgeführt.

2.3. Auswertung der Schnitte

Alle Schnitte wurden zum einen auf ihren immunhistochemisch nachweisbaren PSA-Gehalt, zum anderen auf das quantitative Vorkommen des Endothelmarkers CD34 untersucht. Zur qualitativen Einschätzung der PSA-Färbung bediente man sich einer graduellen Positiv-Negativ-Skala, anhand derer sich das Material als „negativ“, „schwach positiv“, „deutlich positiv“ und „stark positiv“ klassifizieren ließ. Diese Bewertung bezieht sich allerdings nur auf die Tumorzellen, Normalgewebe diente der inneren Kontrolle färberischer Qualität und wurde nicht gewertet.

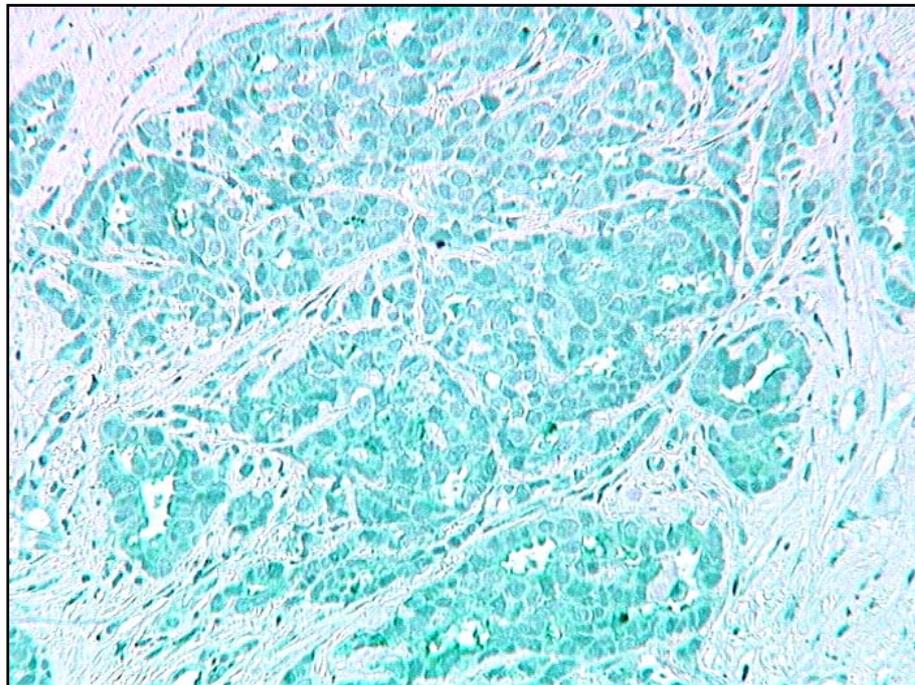


Abbildung 1: Mammacarcinom-Gewebeschnitt nach PSA-Histogreen-Anfärbung (*grün colorierte Bildbereiche*), deutlich positiver PSA-Nachweis in den Carcinomzellen im Vergleich zum umliegenden Bindegewebe

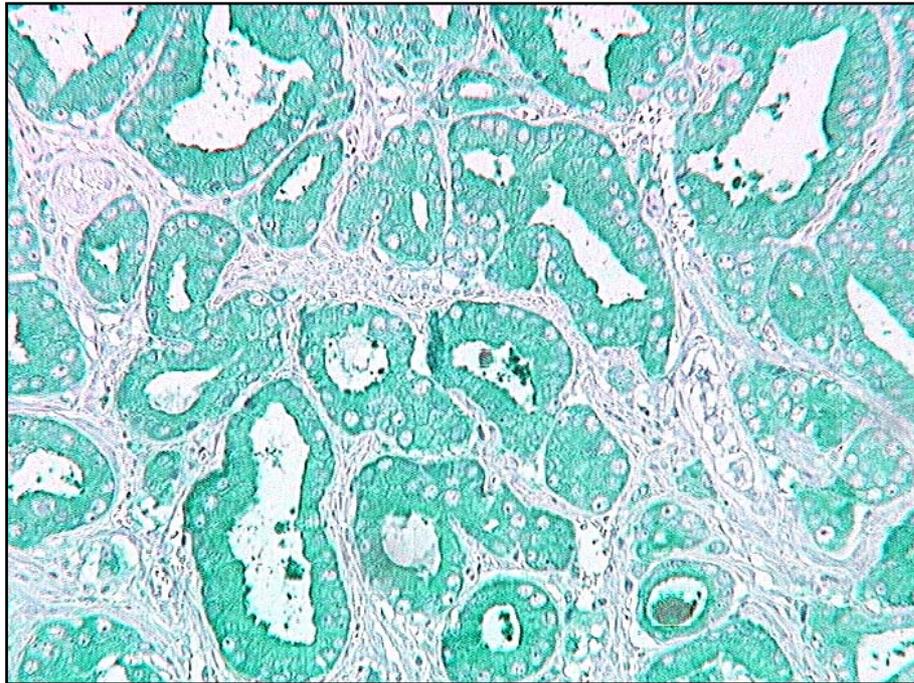


Abbildung 2: Prostatacarcinom-Gewebeschnitt nach PSA-Histogreen-Anfärbung (*grün colorierte Bildbereiche*), stark positiver intrazellulärer PSA-Nachweis

Bei der Beurteilung des CD34-Gehaltes wurde hingegen, in Anlehnung an die von Weidner et al. 1991 erstmals beschriebene Methode zur Auswertung der Gefäßneubildung beim invasiven Mammacarcinom, mit sogenannten „hot spots“ gearbeitet; das heißt, daß pro Schnitt drei besonders stark angefärbte, also gefäßreiche Areale untersucht und die Anzahl der dort vorhandenen positiven Zellen ausgezählt wurden. Dazu durchsuchten wir die Präparate zunächst bei kleiner Vergrößerung (100fach; 10er Objektiv, 10er Okular) meanderförmig nach Zonen mit der höchsten Anzahl abgrenzbarer Gefäßeinheiten; diese mußten mit Sicherheit im Tumorgewebe liegen, Gefäße im gesunden Gewebe dienten auch hier als innere Qualitätskontrolle für die CD34-Färbung. An diesen Stellen wurde bei höherer Vergrößerung (400fach; 40er Objektiv, 10er Okular) mit der Auszählung begonnen.

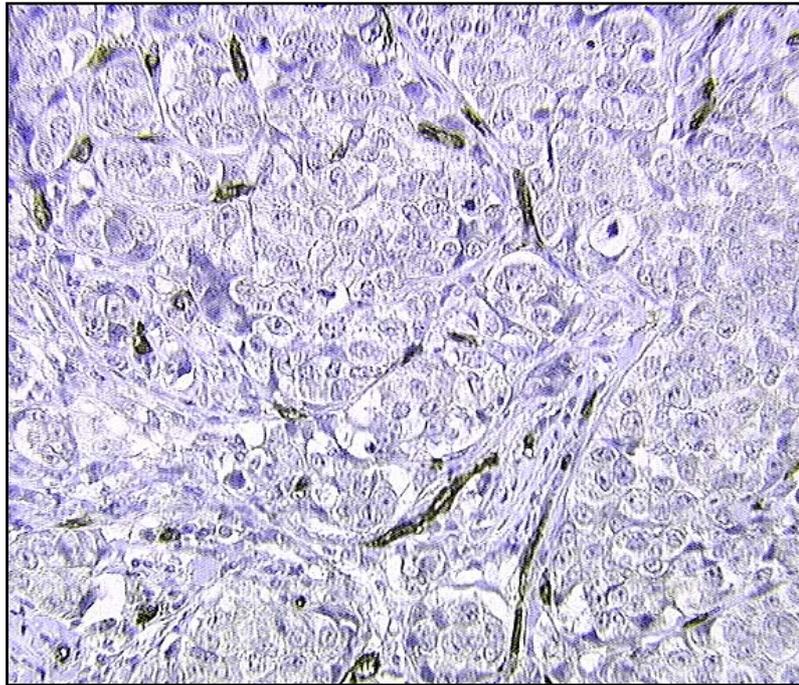


Abbildung 3: Darstellung der CD34-Färbung am Beispiel des Mammacarcinoms, die Gefäße sind fast schwarz coloriert im Vergleich zum hier bläulich erscheinenden Tumorgewebe

2.4 Statistische Analyse

Wir bedienen uns verschiedener statistischer Testverfahren, die zum Prüfen von Annahmen geeignet sind, sogenannte *Hypothesentests*.

Unsere Annahme war, daß das PSA eine antiangiogenetische Potenz besitzt und folglich eine umgekehrte Korrelation zur Gefäßzahl gegeben sein müsste.

Im Sinne der statistischen Prüfverfahren lassen sich selbige in Tests für unverbundene (unabhängige) und für verbundene (abhängige) Variablen unterteilen. Werden diese, wie im vorliegenden Fall, für jede Testung neu aus der Grundgesamtheit gewonnen und sind nicht Folge mehrmals wiederholter oder parallel erfolgter Bestimmungen, so handelt es sich um unabhängige Stichproben.

Sind weiterhin die Voraussetzungen für die Durchführung parametrischer Testverfahren (Normalverteilung der Werte, ungefähre Varianzübereinstimmung innerhalb eines maximalen Zufallsschwankungsbereiches, Linearität der Zusammenhänge) nicht sicher

gegeben, empfiehlt es sich, auf nicht-parametrische oder verteilungsfreie Schätz – und Prüfverfahren zurückzugreifen. Sie sind meist ausreichend sensibel und effizient (**Fassl, 1999**).

Die zu untersuchenden Zusammenhänge bestanden in drei Korrelationstestabschnitten. Zunächst wurde die mögliche Einflussnahme des PSA-Gehaltes im Blut auf den lichtmikroskopisch bestimmten PSA-Gehalt im Tumor untersucht, wobei sich die in vier Gruppen unterteilten PSA-Werte der Patienten, die an einem Prostata-Carcinom erkrankt waren, dem Tumor-PSA-Gehalt derselben gegenüber gestellt und dem Kruskal-Wallis-Test sowie dem Mann-Whitney-U-Test unterzogen wurden. Im zweiten Schritt wurde dann direkt die Korrelation von PSA- und Gefäßgehalt des Tumors anhand des Spearman-Rho-Korrelationskoeffizienten errechnet und ebenfalls mit dem Kruskal-Wallis-Test geprüft, wobei dies für beide Tumoren geschah.

Um schließlich einen etwaigen klinischen Wert der Bestimmungen nicht außer Acht zu lassen, analysierten wir den möglichen Zusammenhang von PSA-Gehalt und dem sogenannten Tumor-Grading, einem bewährten, histologischen Maß für den Malignitätsgrad eines bösartigen Tumors.

Für sämtliche statistischen Berechnungen wurde die Software *SPSS für Windows, Version 11.05* verwandt. Bezüglich der Signifikanz legten wir eine festgesetzte Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% zugrunde ($p=0,05$).

3. ERGEBNISSE

PSA in Blut und Tumorgewebe

Wir überprüften als erstes, ob zwischen dem bekannten PSA-Gehalt im Blut der Patienten und der von uns immunhistochemisch – qualitativ bestimmten Expression im Tumor ein signifikanter Zusammenhang bestünde, was die Wertigkeit des Proteins als Marker unterstützen würde. Der dazu durchgeführte Kruskal-Wallis-Test konnte allerdings nur für das Prostatacarcinom angewandt werden, da in der Gruppe der Mammacarcinompatientinnen zu wenig Probandinnen (n=2) überhaupt einen positiven PSA - Nachweis im Blut aufwiesen, um in die statistische Auswertung einzugehen.

Kruskal-Wallis-Test

Ränge

	GRUPPE	N	Mittlerer Rang
PSA	1	8	14,00
	2	10	13,80
	3	7	22,07
	4	8	19,56
	Gesamt	33	

Statistik für Test (a,b)

	PSA
Chi-Quadrat	5,152
df	3
Asymptotische Signifikanz	,161
Exakte Signifikanz	,161
Punkt-Wahrscheinlichkeit	,000

a Kruskal-Wallis-Test

b Gruppenvariable: GRUPPE

Beim direkten Vergleich aller vier Gruppen der Patienten mit Prostatacarcinom zeigte sich keine signifikante Korrelation zwischen dem PSA-Gehalt im Blut und dem im Tumorgewebe ($p=0,161$). Wenn allerdings die Gruppen im Sinne von niedrigen beziehungsweise hohen PSA-Werten im Blut zu zwei Populationen zusammengefasst

wurden, so zeigte sich im daraufhin durchgeführten Mann-Whitney-U-Test eine signifikante Unterscheidung hinsichtlich des Tumorgewebegehaltes ($p=0,03$), die dahingehend interpretiert werden konnte, daß mit steigenden gemessenen Blutwerten auch von einer entsprechend erhöhten PSA-Expression im Tumor auszugehen ist.

Mann-Whitney-Test

Ränge

	GRUPPE	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
PSA	1+2	18	13,89	250,00
	3+4	15	20,73	311,00
	Gesamt	33		

Statistik für Test (b)

	PSA
Mann-Whitney-U	79,000
Wilcoxon-W	250,000
Z	-2,203
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,028
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	,044(a)
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,030
Exakte Signifikanz (1-seitig)	,017
Punkt-Wahrscheinlichkeit	,005

- a Nicht für Bindungen korrigiert.
b Gruppenvariable: GRUPPE2

Auch die Betrachtung der genauen Verteilungsmuster, die sich aus der Kreuztabelle ablesen lassen, unterstreicht noch einmal, dass die Patienten mit stark erhöhten PSA-Werten in der Blutuntersuchung auch eine hochpositive Expression im Tumor aufwiesen (53,3 % deutlich positiv, 13,3% stark positiv), während diejenigen, die in den Voruntersuchungen bezüglich des PSA nur wenig auffällig waren, hauptsächlich einen schwach positiven immunhistochemischen Nachweis zeigten (61,1%).

Kreuztabellen

GRUPPE2 * PSA Kreuztabelle

			PSA				Gesamt
			0	1	2	3	
GRUPPE2	1+2	Anzahl	2	11	5		18
		% von GRUPPE2	11,1%	61,1%	27,8%		100,0%
	3+4	Anzahl	1	4	8	2	15
		% von GRUPPE2	6,7%	26,7%	53,3%	13,3%	100,0%
Gesamt		Anzahl	3	15	13	2	33
		% von GRUPPE2	9,1%	45,5%	39,4%	6,1%	100,0%

PSA und Gefäßgehalt

Im zweiten Schritt wurde der Zusammenhang von PSA-Expression und der mittleren Gefäßanzahl im Tumor untersucht. Wir unterschieden zunächst nicht zwischen den beiden Carcinomen und bestimmten den Spearman-Rho-Rangkoeffizienten.

Korrelationen

			PSA	GEFÄßE
Spearman-Rho	PSA	Korrelationskoeffizient	1,000	,380(**)
		Sig. (2-seitig)	,	,006
		N	51	51
	GEFÄßE	Korrelationskoeffizient	,380(**)	1,000
		Sig. (2-seitig)	,006	,
		N	51	51

** Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 signifikant (2-seitig).

Es zeigte sich nun eine deutlich signifikante ($p=0,006$), schwach positive Korrelation (Korrelationskoeffizient 38), die auch durch den Kruskal-Wallis-Test unterstützt werden konnte ($p=0,031$).

Kruskal-Wallis-Test

Ränge

	PSA	N	Mittlerer Rang
GEFÄßE	0	14	21,00
	1	22	22,73
	2	13	34,88
	3	2	39,25
	Gesamt	51	

Statistik für Test (a,b,c)

	GEFÄßE
Chi-Quadrat	8,889
df	3
Asymptotische Signifikanz	,031

a Kruskal-Wallis-Test

b Gruppenvariable: PSA

c Einige oder alle exakten Statistiken können nicht berechnet werden, da nicht genügend Speicherplatz vorhanden ist.

Mit steigendem PSA-Gehalt des Tumors war also eine erhöhte Gefäßanzahl nachweisbar und umgekehrt.

Dieser Zusammenhang wurde noch deutlicher, wenn wir – aufgrund der kleinen Anzahl von Patienten mit stark positiver PSA-Expression (n=2) – die beiden Gruppen mit qualitativ mehr PSA-Gehalt zu einer zusammenfassten.

Kruskal-Wallis-Test

Ränge

	PSA02	N	Mittlerer Rang
GEFÄßE	0	14	21,00
	1	22	22,73
	2+3	15	35,47
	Gesamt	51	

Statistik für Test (a,b,c)

	GEFÄßE
Chi-Quadrat	8,739
df	2
Asymptotische Signifikanz	,013

a Kruskal-Wallis-Test

b Gruppenvariable: PSA02

c Einige oder alle exakten Statistiken können nicht berechnet werden, da nicht genügend Speicherplatz vorhanden ist.

Hier zeigt sich die Signifikanz noch besser ($p=0,013$).

Allerdings ließen sich diese Ergebnisse bei der getrennten Betrachtung der beiden Carcinome leider nicht bestätigen.

Kruskal-Wallis-Test

Ränge

GRUPPE0		PSA02	N	Mittlerer Rang
0	GEFÄßE	0	11	10,14
		1	7	8,50
		Gesamt	18	
1-4	GEFÄßE	0	3	19,67
		1	15	13,77
		Gesamt	33	
		2+3	15	19,70

Statistik für Test (a,b,c)

GRUPPE04		GEFÄßE
0	Chi-Quadrat	,403
	df	1
	Asymptotische Signifikanz	,526
	Exakte Signifikanz	,550
	Punkt-Wahrscheinlichkeit	,029
1-4	Chi-Quadrat	3,076
	df	2
	Asymptotische Signifikanz	,215

a Kruskal-Wallis-Test

b Gruppenvariable: PSA02

c Einige oder alle exakten Statistiken können nicht berechnet werden, da nicht genügend Speicherplatz vorhanden ist.

Wurden nämlich die Carcinome als zwei getrennte Gruppen im Kruskal-Wallis-Test betrachtet, ließ sich nun überhaupt kein signifikanter Zusammenhang belegen ($p=0,55$).

Um zu überprüfen, ob also die scheinbare Korrelation von PSA- und Gefäßgehalt wirklich aussagekräftig war, oder nur durch die Vermischung der beiden unterschiedlichen Carcinompatientengruppen entstand, untersuchten wir diese noch einmal auf mögliche signifikante Unterschiede mit dem Mann-Whitney-U-Test.

Mann-Whitney-Test

Ränge

	gruppe04	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
psa	0	18	14,50	261,00
	1-4	33	32,27	1065,00
	Gesamt	51		
gefäße	0	18	16,50	297,00
	1-4	33	31,18	1029,00
	Gesamt	51		

Statistik für Test (a)

	psa	gefäße
Mann-Whitney-U	90,000	126,000
Wilcoxon-W	261,000	297,000
Z	-4,343	-3,372
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,000	,001
Exakte Signifikanz (2-seitig)	,000	,001
Exakte Signifikanz (1-seitig)	,000	,000
Punkt-Wahrscheinlichkeit	,000	,000

a Gruppenvariable: gruppe04

Dieser zeigte eine hochsignifikante Unterscheidung der beiden Carcinome sowohl hinsichtlich der PSA-Ausprägung als auch der Gefäßanzahl ($p=0,001$), welche beide beim Prostatacarcinom deutlich höher lagen als beim Mammacarcinom.

Damit läßt sich sagen, daß die vermeintliche positive Korrelation wohl eher das Resultat der unterschiedlichen Verteilung der (kleinen Anzahl) verschiedener Carcinompatientinnen und -patienten auf die einzelnen PSA- beziehungsweise Gefäßgehaltgruppen zurückzuführen und per se nicht wirklich aussagekräftig ist.

PSA und Grading

So konnten wir auch beim abschließenden Vergleich der PSA-Expression und des Malignitätsgrades des Tumors ("grading") keine signifikanten Zusammenhänge nachweisen.

Korrelationen

GRUPPE04				PSA	TU_GRADE
0	Spearman-Rho	PSA	Korrelationskoeffizient	1,000	-,396
			Sig. (2-seitig)	,	,104
			N	18	18
		TU_GRADE	Korrelationskoeffizient	-,396	1,000
			Sig. (2-seitig)	,104	,
			N	18	18
1-4	Spearman-Rho	PSA	Korrelationskoeffizient	1,000	,131
			Sig. (2-seitig)	,	,467
			N	33	33
		TU_GRADE	Korrelationskoeffizient	,131	1,000
			Sig. (2-seitig)	,467	,
			N	33	33

Sowohl bei der gemeinsamen als auch der für beide Tumortypen getrennt betrachteten Erstellung des Spearman-Rho-Koeffizienten zeigte sich keine signifikante Korrelation. Beim Mammacarcinom konnte ein negativer (Korrelationskoeffizient= -39) beim Prostatacarcinom hingegen ein positiver (Korrelationskoeffizient=13) Zusammenhang beschrieben werden, die aber gleichfalls nicht signifikant waren ($p=0,104$ und $p=0,467$).

Entsprechend verhielt sich auch das Ergebnis bei der undifferenzierten Betrachtung hinsichtlich beider Tumorarten gemeinsam (Korrelationskoeffizient= -37, p=0,795).

Korrelationen

			PSA	TU_GRADE
Spearman-Rho	PSA	Korrelationskoeffizient	1,000	-,037
		Sig. (2-seitig)	,	,795
		N	51	51
	TU_GRADE	Korrelationskoeffizient	-,037	1,000
		Sig. (2-seitig)	,795	,
		N	51	51

4. DISKUSSION

Beim Mammacarcinom ist fast immer - im Sinne eines ganzheitlichen Ansatzes, der das Mamma-CA nicht als isolierte Erkrankung der weiblichen (oder selten auch männlichen) Brust sondern eher als ein Multiorgangeschehen versteht - mit Rezidiven oder einer späteren Metastasierung zu rechnen (**Folkman, 1995: "infection without disease"**). Es gehört damit zu den führenden Ursachen weiblicher Morbidität und Mortalität in den westlichen Industrieländern (s.o.) und ist sogar die häufigste maligne Erkrankung der weiblichen Bevölkerung Nordamerikas überhaupt (**Forbes, 1997**). Auch das Prostatacarcinom hat unter den Krebserkrankungen des Mannes einen hohen Stellenwert, da es mit der höchsten Inzidenz und zweithöchsten Mortalität in der männlichen Bevölkerung Westeuropas und Nordamerikas auftritt (**Bastian et al, 2004**). Einerseits kann es durch entsprechende Vorsorgeuntersuchungen erfasst werden, andererseits bleibt es aber lange klinisch inapparent und macht sich oft erst durch seine Metastasen bemerkbar. Daher werden von verschiedenen Forschungsgruppen in aller Welt immer neue Möglichkeiten zur frühzeitigen Erkennung respektive Prävention und Therapie dieser Leiden gesucht.

Neben den bereits gut untersuchten und bewährten Prognosefaktoren wie Tumorgröße, histologisches oder nukleäres Grading, Hormonrezeptorstatus und axillärer Lymphknotenbefall wird beim Mammacarcinom die Bestimmung weiterer Parameter diskutiert. Dazu zählen beispielsweise das Her2-Onkogen, das im Zusammenhang mit dem möglichen Therapieeffekt von Aromataseinhibitoren steht, der Nachweis von Tumorzellen im Knochenmark ebenso wie im peripheren Blut, verschiedene andere Proteasen (neben dem PSA) und schließlich das DNA-Mapping, was das Gebiet der empirischen Onkologie verlässt und den Beginn der molekularen Forschung verspricht (**Kaufmann et al, 2004**). Viele dieser Möglichkeiten werden aber zur Zeit noch kontrovers beurteilt und sind für den flächendeckenden klinischen Einsatz vorerst weder sinnvoll noch praktikabel. Ein geeigneter serologischer Marker schien auch im PSA gefunden zu sein, welches sich beim Prostatacarcinom bereits bewiesen hatte und hier breiteste klinische Anwendung findet (**Seliger et al, 1998 und Armbruster et al, 1993**). Das Protein war zum ersten Mal 1984 auch im weiblichen Organismus entdeckt

worden (**Pollen et al, 1984**), und zwar in den periurethralen Drüsen, die auch als „weibliche Prostata“ oder „Skene´s gland“ bezeichnet werden, da sich eine evolutionsbiologische Homologie zum männlichen Organ nachweisen ließ (**Tepper et al, 1984**). Bei beiden Geschlechtern unterliegt die Genexpression einer hormonellen Regulation (**Black et al, 2000**) über Steroidrezeptoren für Androgene, Gestagene, Glukokortikoide und Mineralokortikoide (**Murtha et al, 1993 und Zarghami et al, 1997**), welche allesamt stimulierend wirken, wohingegen über den aktivierten Östrogenrezeptor keine Triggerung erfolgt (**Yu et al, 1994**). Klinisch bedeutsam erscheint in diesem Zusammenhang auch die Tatsache, daß die Forschungsgruppe um Yu und Diamandis, die sich intensiv mit dem Thema beschäftigt, durch Gabe von Tamoxifen, also einen sehr häufig im Sinne einer adjuvanten Therapie bei hormonsensitiven Tumoren verabreichten Östrogenrezeptorantagonisten (mit partiell agonistischer Wirkung), in verschiedenen malignen Mamma-Zellreihen (*in vitro*) eine vermehrte PSA-Produktion induzieren konnte (**Yu et al, 1994**). Außerdem zeigte diese Arbeit, daß die PSA-Bildung durch Östrogen direkt unterbunden wird, woraus die Autoren folgerten, daß der Nachweis von PSA ein möglicher Indikator für verminderte, respektive unterdrückte (lokale) Östrogeneinflüsse bzw. antiöstrogene Effekte auf den Tumor ist. Es erwies sich jedenfalls als positiver Prognosefaktor und ging mit einem signifikant erniedrigten Rezidivrisiko im Vergleich zu einer Patientengruppe mit PSA-negativen Tumoren einher. Wichtig erscheint vor allem auch die Beobachtung, dass sich bei einer Beurteilung der untersuchten Tumoren bezüglich des PSA-Wertes eventuell nicht nur eine Prognose über den weiteren Krankheitsverlauf, sondern auch für ein etwaiges Therapieansprechen stellen läßt. Es zeigte sich nämlich gerade bei den Patienten, deren PSA-positive Tumoren eine Östrogenrezeptornegativität aufwiesen, daß eine adjuvante Therapie mit Tamoxifen, Chemotherapeutika oder einer Kombination dieser beiden zu einer signifikanten Reduktion der Rezidivraten führte (**Yu et al, 1995**). Damit würde dem PSA in seiner Funktion als biologischem Marker eine besondere Stellung gegenüber anderen Faktoren von prädiktivem Wert, wie zum Beispiel Alter, Staging, Grading oder menopausaler Status, zufallen. Yu et al vermuten, daß sich eventuell mit Hilfe des Produktionsnachweises von PSA eine nochmalige Unterteilung der Mammacarcinome in östrogen- und gestagen/androgenabhängige Tumore machen läßt – wobei letztere dann durch die Fähigkeit zur PSA-Bildung

gekennzeichnet würden, welche dann grundlegend im Prozeß der Therapieplanung eingebracht werden könnte. Eine These, die sich auch durch Seliger et al unterstützen läßt, die im PSA einen gestageninduzierten Indikator einer funktionierenden Steroidbiosynthese sehen (**Seliger et al, 1998** und **Graves, 1995**). Daß also zwischen dem PSA und dem Gehalt an Steroidhormonrezeptoren ein Zusammenhang besteht, scheint mittlerweile ebenso gesichert wie die Tatsache, daß eine höhere PSA-Expression mit einer besseren Prognose im Sinne längerer krankheitsfreier Perioden, beziehungsweise längerer Überlebenszeiten einhergeht (**Yu et Berkel, 1999**). Auch eine inverse Korrelation von PSA-Gehalt und anderen Faktoren wie Tumorgröße, klinischem Stadium und dem Anteil an Zellen mit hoher Proliferationskapazität konnte in einigen Studien gezeigt werden (**Griniatsos et al, 1998**).

Wie aber erklärt man sich diesen positiven Effekt? Neben den bereits erwähnten etwaigen Antiöstrogeneffekten, für die das PSA aber wohl lediglich Indikator und weniger Verursacher selbst wäre, wird auch eine mögliche Inhibition von insulin-like growth factor binding protein -3 (IGFBP-3) diskutiert, dessen Nachweis wiederum mit schlechter Prognose assoziiert ist (**Rocha et al, 1997** und **Yu et Levesque, 1998**). Auch Holmgren berichtet über eine effektive Apoptose-Suppression bei sogenannten "dormant metastases", also klinisch noch inapparenten Mikrometastasen eines soliden Primärtumors, durch IGF-1, was unterstreicht, daß diesem eventuell eine Rolle in der komplexen Regulation von Cancerogenese an sich oder im Zuge des Metastasierungsprozesses zukommt (**Holmgren et al, 1995**) – ein möglicher Angriffspunkt des PSA, welches hier also eventuell IGF-1-modulierend einwirkt (**Cohen et al, 1992**). Ein anderer Ansatz, der auch der vorliegenden Arbeit als Basishypothese zugrunde liegt, geht eher von einem Wirkmechanismus aus, der mit der Neovaskularisation zusammenhängt. So lässt sich nachweisen, daß in Analogie zur PSA-Induktion durch Tamoxifen auch ein Anstieg der VEGF-Konzentration im Tumor zu verzeichnen ist (**Adams et al, 2000**). Dieses ist als ein sehr potenter und spezifischer Angiogenesestimulator bekannt (**Folkman et al, 1992**). Bei Patienten mit bereits metastasierten Carcinomen oder Tumoren, die sich auch unter Therapie noch progressiv verhalten, konnten deutlich erhöhte Spiegel nachgewiesen werden (**Kondo et al, 1994** und **Salven et al, 1997**), was auf die grundlegende Bedeutung der Gefäßversorgung ebenso hinweist wie die signifikante positive Korrelation von Tumorgröße und VEGF-

Gehalt (**Horak et al, 192**). Auch ließ sich zeigen, daß eine Neutralisation des VEGF – beispielsweise durch Kastration, da auch seine Expression von Androgenen gesteuert wird – zur Obliteration kleiner Gefäße und konsekutiv zur Inhibition von weiterer Angiogenese, Metastasenwachstum und einer Reduktion der Prostatamasse führte (**Pili et al, 2002**). Wenn also ein Wachstumsfaktor der Angiogenese mit schlechterer Prognose vergesellschaftet ist, so erscheint es nur logisch, daß ein Protein wie PSA, dem eine antiangiogene Potenz nachgesagt wird, über eine mögliche Inhibition des Gefäßwachstums zur Unterversorgung des Tumors und damit zur Herabsetzung der Wachstumsgeschwindigkeit – letztlich also zur Verbesserung der Patientenaussichten – führt.

So vermuten auch Diamandis et Yousef , daß die große Kallikrein-Genfamilie, zu der ja auch das PSA gezählt wird, insgesamt eine Bedeutung für die Tumorprogression allgemein respektive die diese zu großen Teilen bedingende Angiogenese im Besonderen hat, da sie berichten, daß ein weiteres Mitglied der Kallikreine (normal epithelial cell specific 1 gene (NES-1)) ein Tumor-Suppressor-Protein des Mamma-CAs und das PSA ein potenter Inhibitor der Gefäßbildung zu sein scheint (**Diamandis et Yousef, 2000**). Sehr wichtig ist in diesem Zusammenhang auch die Arbeit von Fortier et al, die durch PSA eine eindeutige dosisabhängige Inhibition von Endothelzell-Proliferation, -Migration und -Invasion *in vitro* und eine 40%ige Reduktion der Metastasenanzahl eines primären Melanoms im Mausmodell konstatieren konnten (**Fortier et al, 1999**). Daß diese Effekte auf antiangiogene Prozesse zurückzuführen sind, wird zum einen auch dadurch unterstützt, daß sich keine direkte Wirkung auf die Carcinomzellen selbst nachweisen ließ; zum anderen zeigen auch andere bekannte Angiogenese-Inhibitoren wie Angiostatin und Endostatin die gleichen –sogar noch deutlich stärkeren – Ergebnisse. Fortier et al vermuten, daß diese Fähigkeit des PSA in hohem Maße von seiner enzymatischen Aktivität als Protease abhängig ist, da durch Blockierung derselben in Form von Bindung an Alpha1-Antichymotrypsin (ACT) auch die inhibitorischen Effekte auf die Endothelzellmigration deutlich nachließen, was ebenfalls auf eine generelle antiangiogene Potenz der Serinproteasen oder der Kallikrein-Genfamilie hinweisen würde. Wenn wir also davon ausgehen, daß das charakteristische langsame Wachstum des Prostatacarcinoms sowie der beschriebene positive Prognosewert bezüglich des Mammacarcinoms möglicherweise auf einer – u.a.

auch von PSA beeinflussten – Homöostase verschiedener angiogener Stimulatoren und Inhibitoren beruht, dann wären spekulative Ansätze wie die Entwicklung von Anti-PSA-Vakzinen, von denen die betreffenden Forscher sich eine antiproliferative Wirkungsweise auf das Prostatacarcinom erhoffen (**Hodge et al, 1995**) irrig. Die Arbeiten von Folkman et al geben weitere Hinweise darauf, daß eine Störung der angiogenen Balance weitreichende Folgen haben könnte: er geht nämlich von zwei diversen Zellpopulationen in soliden Malignomen aus, den Tumorzellen selber und den zur Angiogenese befähigten Zellen. Diese unterliegen einer gegenseitigen Beeinflussung, sind aber auch beispielsweise parakrinen Stimuli durch das im Zuge der Angiogenese neu entstehendes Endothel ausgesetzt (**Folkman, 1995**). Man geht dabei von der Option eines sogenannten „switch“ aus, bei dem die zur Angiogenese grundsätzlich befähigten Zellen aus einem ruhenden in einen aktiv-proliferativen Zustand überführt werden und damit dann nicht nur die Neovaskularisation sondern in der Folge auch das Tumorwachstum begünstigen. Wie und wodurch diese plötzliche Zustandsänderung allerdings genau initiiert wird, bleibt noch Gegenstand weiterer Untersuchungen. Durch das angiogene Gleichgewicht werden aber auch die Proliferations- und Apoptoserate der Carcinomzellen selbst ausbalanciert, wobei vor allem die Apoptoserate bei unveränderter Proliferation unter antiangiogenem Einfluß deutlich erhöht ist (**Holmgren et al, 1995**); dieser Effekt ließ sich auch durch exogene Faktoren (TNP-470 = O-Chloracetylcarbonyl fumagillol) sowie Angiostatin erzielen. Ein solches Modell bietet gute Erklärungsmöglichkeiten für den über Jahre möglichen „schlafenden Zustand“ von Mikrometastasen und das dann scheinbar überraschende Auftreten von Spätrezidiven oder eben Fernmetastasen (**Gimbrone et al, 1972** und **Hanahan et al, 1996**), wie wir es vom Mammacarcinom her kennen. Die Angiogenese ist also nicht nur für die Versorgung des Primärtumors mit Nährstoffen oder seine lokale Aktivität bedeutsam, sondern gegebenenfalls auch ein Regulator der Metastasierung (**Demicheli et al, 1994**). Interessanterweise konnte in diesem Zusammenhang auch gezeigt werden, daß das Metastasenwachstum nach der Resektion des Primärtumors plötzlich extrem ansteigt (**Holmgren et al, 1995**), wohingegen präoperativ deutlich erhöhte Angiostatinlevel im Blut nachweisbar waren, was dafür spricht, daß zwischen dem primären Malignom und seinen Filiae eine angiogen kontrollierte Form von Kommunikation stattfindet. Auch für das in freier Form

vorkommende Prostata-spezifische Antigen konnte bei Mammacarcinom-Patientinnen eine solche prä- versus postoperative Diskrepanz nachgewiesen werden (**Black et al, 2000**).

Wie aber kann nun das PSA hier eingreifen? In einer Arbeit von Heidtmann et al wird ebenso wie von Fortier et al (s.o.) ein Zusammenhang mit der enzymatischen Aktivität vermutet; es konnte beobachtet werden, daß das PSA durch Katalisation proteolytischer Prozesse aktive Angiostatin-ähnliche Fragmente aus Plasminogen spalten kann (**Gately et al, 1996**), welche eindeutige antiangiogene Wirksamkeit zeigen und *in vitro* zur erfolgreichen Inhibition von endothelialer Proliferation und Formation befähigt sind (**Heidtmann et al, 1999**). Das PSA zeigte dabei seine Spezifität durch eine eigene Schnittstelle („*cleavage site*“), die vollkommen von denen anderer Proteinase im Plasminogen differierte, was ein Hinweis auf verschiedene Isoformen des Angiostatins sein könnte; grundsätzlich sind aber auch andere Enzyme in der Lage, diese Konversion zu vollziehen (**Dong et al, 1997** und **Lijnen et al, 1998**) und damit ebenfalls von prädiktivem Wert zu sein. So zeigen Becker et Noldus, dass sich die Detektionsrate des Prostatacarcinoms signifikant verbessern lässt, wenn in das übliche PSA-Screening auch die Bestimmung des humanen Kallikreins-2 (hK-2) einbezogen wird (**Becker et Noldus, 2001**). Gerade in der Grauzone niedriger PSA-Werte (3-10 ng/ml) scheint dadurch außerdem die Differenzierung von organbegrenztem und –überschreitendem Carcinom sowie die Abgrenzung zu benignen Pathologien erleichtert, da das hK-2 bei Adenocarcinomen der Prostata im Vergleich zum normalen Epithel erhöht ist (**Lilja, 2000** und **Becker et Piironen, 2000**).

Es deutet also vieles darauf hin, daß die Regulation der Angiogenese weitreichende Bedeutung für die Tumorgenese besitzt; es sei hier am Rande erwähnt, daß sogar die beim (familiären) Mamma-CA bekannten Protoonkogene p53 und bcl-2 in diesem Prozeß eine Rolle spielen, die über die reine Proliferations- und Apoptosekontrolle hinausgeht, da Allelverlust auch zu einer Reduktion des Angiogenese-Inhibitors Thrombospondin und in der Folge zu verstärkter Neovaskularisation führt (**Engels et al, 1997**). Gleichzeitig gibt es aber auch Hinweise darauf, daß der Tumor selbst nicht gleichsam schicksalhaft der erfolgreichen Gefäßneubildung ausgeliefert ist, sondern die neoplastische Angiogenese in einem offensichtlich hochkomplexen Prozess intensiver Interaktion von Tumorzellen und Endothelien direkt vom Malignom beeinflusst wird. So

gehen Fidler et al davon aus, daß nicht nur das Metastasenwachstum auf der Heterogenität der Tumorzellpopulationen und deren Eingreifen in homöostatische Mechanismen des umgebenden Mikromilieus beruht (**Fidler et al, 2004: “seed and soil – Hypothese“**), sondern auch zwischen Endothel – und Malignomzellen ein Austausch von genetischer Information (z.B. durch Umdifferenzierungsprozesse, Zellfusion oder Aufnahme apoptotischer Zellreste) und folglich eine Regulation der Gefäßbildung stattfindet (**Fidler et al, 2004**).

Daher ist es verständlich, dass sich zunehmend therapeutische Ansätze in Richtung der Angiogenese bewegen. Judah Folkman formulierte 1995 bereits prinzipielle Merkmale der antiangiogenen Therapie, die als „guidelines“ dienen können: so zeichnet sie sich durch gute Verträglichkeit bei geringer Toxizität aus, Resistenzentwicklungen, wie wir sie von den Chemotherapeutika her kennen, stellen kein signifikantes Problem dar und optimale Effekte scheinen nur durch eine langwährende (Monate bis Jahre) tägliche oder intermittierende Gabe zu erreichen zu sein. Insgesamt schien gerade die Kombination von herkömmlichen cytotoxischen Chemotherapeutika und antiangiogenen Medikamenten sehr vielversprechend, da somit nicht nur unterschiedliche Wirkungsansätze abgedeckt würden, sondern einige Studien auch darauf hinwiesen, dass sich die Aufnahme der Cytotoxika in den Tumor verbesserte (**Folkman, 1995**). Dabei lassen sich grundsätzlich verschiedene Möglichkeiten der antiangiogenen Wirkung unterscheiden: entweder werden Stimulatoren der Angiogenese beziehungsweise ihre Rezeptoren blockiert, Endothelzellen direkt inhibiert oder endothelspezifische Signale unterbunden (**Pili et al, 2002**). Außerdem gibt es natürlich auch unspezifische Mechanismen, die das Tumor- respektive Gefäßwachstum beeinträchtigen können. So üben Umweltfaktoren des Mikromilieus wie Sauerstoff- und Glukosegehalt einen Einfluß auf die VEGF-Expression aus (**Stein et al, 1995**) und auto- sowie parakrine Wachstumsfaktoren können zum Beispiel im Rahmen eines inflammatorischen Geschehens regulierend wirken, was sich exemplarisch am Interleukin-6 (IL-6) zeigen läßt (**Daliani et al, 2000**), welches übrigens wiederum einen stimulierenden Einfluß auf die Thrombozyten hat, die daraufhin vermehrt VEGF ausschütten – ein Vorgang, der sich sowohl beim Prostata- als auch beim Mammacarcinom nachweisen ließ (**Caine et al, 2004**). Aber auch wenn die genauen Wirkungsweisen sehr komplex und oftmals vielleicht noch nicht bis ins Detail

verstanden sind, ist es umso ermutigender, daß die antiangiogenen Therapeutika mittlerweile bereits in großen klinischen Studien geprüft werden (**Engels et al, 1997**) und sich hierin deutlich bewährt haben. So konnten nicht nur eine Verbesserung der Überlebensrate (**Dahut et al, 2004**) sowie ein deutliches Abklingen der jeweiligen klinischen Symptomatik (**Figg et al, 2001**) beziehungsweise der geschilderten Schmerzen (**Daliani, 2000**) durch den Einsatz von Thalidomid, einem potenten Antiangiogenikum, erreicht, sondern auch unerwünschte Nebenwirkungen weitgehend vermieden werden – in diesem Zusammenhang ist nämlich hauptsächlich nur von dosisabhängigem Auftreten von Müdigkeit, Schwindel und leichter Benommenheit die Rede (**Leibowitz et al, 2002**), was sich durch eine entsprechende Dosisreduktion auch im Sinne intermittierender Gaben vermeiden ließ. Einige Studien legen allerdings nahe, daß der therapeutische Effekt nicht allein auf die angiogene Inhibition zurückzuführen ist, sondern auch das Carcinomwachstum selbst direkt durch Thalidomid gehemmt wird (**Capitasti et al, 2004**). Als Maß für das therapeutische Ansprechen wurde dabei wieder das PSA verwandt, das – im Sinne seiner Bedeutung als Tumormarker gerade auch im postoperativen Verlauf – mit entsprechendem Abfall (bis zu 40% des Ausgangswertes, **Figg et al, 2004**) reagierte. Im Gegensatz dazu stehen allerdings einige präklinische Studien des selben Autors, der eher über einen Anstieg der PSA- Level unter Thalidomid berichtete, was die These einer möglichen eigenen Wirkung der Protease im Inhibitionsprozeß der Antiangiogenese unterstützen würde. Die bisherigen Ausführungen zeigen also, daß eine solche direkte und selbständige antiangiogene Potenz des PSAs durchaus in einigen Arbeiten gezeigt werden konnte, der direkte Nachweis klinischen Nutzens aber noch aussteht und weiterer größerer Studien bedarf. Auch die vorliegende Arbeit weist zwar in der Gesamtbetrachtung auf einen Zusammenhang von PSA-Gehalt und Gefäßwachstum hin, bleibt aber die genaue Erklärung schuldig, zumal wir leider nicht die vermuteten antiangiogenen Fähigkeiten des PSA untermauern konnten, sondern im Gegenteil eine positive Korrelation von PSA-Gehalt in Serum respektive Tumor und der Gefäßanzahl feststellten. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen besteht unserer Meinung nach darin, daß das PSA eventuell Ausdruck der Aktivierung körpereigener Abwehrreaktionen ist (**Fortier et al, 1999: “attempt of the fighting body“**) und sich daher vermehrt dort nachweisen läßt, wo sich durch eine verstärkte Neovaskularisation eine gestörte

angiogene Balance und damit eine potentielle Tumorprogression äußert. Hinzu kommt, daß sich bei einer getrennten Betrachtung der beide Carcinome keine signifikanten Einflüsse des PSAs auf die Gefäßexpression zeigten und wir daher nur sagen können, daß unsere Untersuchungen keinen Hinweis auf eine PSA-induzierte Inhibition des Gefäßwachstums lieferten. Insgesamt lässt sich also aus den bisherigen Veröffentlichungen und anhand der vorliegenden Arbeit noch keine eindeutige Antwort auf die Frage nach der eigentlichen Bedeutung und möglichen antiangiogenen Potenz des Prostata-spezifischen Antigens ableiten.

Daß es als Tumormarker geeignet ist, hat sich für das Prostatacarcinom schon lange bewährt und wird auch in der neueren Literatur immer wieder bekräftigt (**Luboldt et al, 2004**). Umstritten bleibt allerdings nach wie vor die Bedeutung im Rahmen des Mammacarcinoms. Es gilt als gesichert, daß das im weiblichen Organismus gefundene Prostata-spezifische Antigen mit dem prostatistischen respektive seminalen identisch ist; so konnten sowohl bezüglich der Molekularmasse (**Mannello et Sebastiani, 1997**) als auch hinsichtlich der Sequenzen von messenger RNA (**Monne et al, 1994**) und der kodierenden DNA-Regionen – bei Mutationen in anderen Bereichen des Gens - (**Tsuyuki et al, 1997**) generelle Übereinstimmungen festgestellt werden. Was aber die physiologische Funktion im weiblichen Körper an sich oder auch die etwaige pathophysiologische Funktion im Rahmen der Tumorerkrankung angeht, so herrscht weiterhin Ungewißheit; eine mögliche Bedeutung als Regulator allgemeiner Wachstumsfaktoren wird ebenso diskutiert wie eine translationale respektive post-transkriptionale Proteinmodulation (**Mannello et Gazzanelli, 2001**). Vor allem die Frage nach der enzymatische Aktivität scheint hier ausschlaggebend zu sein, denn nach wie vor ist nicht gesichert, inwieweit das PSA im weiblichen Gewebe seine proteolytische Potenz einsetzt. Interessanterweise konnten in weiblichen Sera sowohl die freie, enzymatisch aktive als auch die an ACT gebundene, inaktive Form gefunden und zu verschiedenen Pathologien der weiblichen Brust in Beziehung gesetzt werden. Während bei der Mehrheit gesunder Frauen oder Patientinnen mit benignen Brusterkrankungen, wie zum Beispiel Zysten, nämlich die im ACT-Komplex gebundene Form überwiegt, konnte im Serum von Brustkrebspatientinnen das freie PSA als die dominierende Form identifiziert werden und erwies sich als hoch spezifisch für das Mamma-CA, wenn auch bei deutlich geringerer Sensitivität. Im Gegensatz dazu

zeigte die Bestimmung des PSA-Gesamtwertes (tPSA) die höchste Sensitivität für die Detektion von Brustkrebs, ließ aber die nötige Spezifität zur Differenzierung zwischen Carcinompatientinnen, Frauen mit benignen Mammopathologien und gesunden Probandinnen vermissen (**Black et al, 2000**). Damit besteht eine offensichtliche Diskrepanz zu den Studien mit an einem Prostatacarcinom leidenden, männlichen Patienten, bei denen der prozentuale Anteil des freien PSAs gerade abnimmt (**Stenman et al, 1991**). Eine mögliche Erklärung dafür könnte darin bestehen, daß die Tumorzellen selbst ein hinsichtlich der Bindungskapazität leicht verändertes PSA produzieren, das sich nicht durch Proteaseinhibitoren blockieren lässt; oder aber sie könnten auf dem Wege der posttranslationalen Modifikation Einfluß auf das von gesundem Brustgewebe sezernierte PSA nehmen, beispielsweise über eine Endopeptidase, die das Protein so spaltet respektive verändert, daß es in der Folge einer Komplexierung mit ACT entgeht (**Black et al, 2000**). Eine diese These unterstützende Beobachtung besteht darin, daß die nachweisbaren Serumspiegel des freien PSA postoperativ, also nach Entfernung des Primärtumors, deutlich absinken (**Black et al, 2000**). Insgesamt aber sind die Aussagen zu PSA und seinem serologischen oder auch immunhistochemischen Nachweis in Blut oder Gewebe von Mammacarcinom-Patientinnen weitgehend deskriptiv und die vorliegenden Arbeiten und Studien bleiben nach wie vor kausal ansetzende Erklärungsmodelle über die mögliche Funktion und Bedeutung der Serinprotease im weiblichen Organismus weitgehend schuldig. In unseren Untersuchungen konnten wir zwar an sich den immunhistochemischen Nachweis des PSAs im weiblichen Brustdrüsengewebe erbringen (von achtzehn Patientinnen hatten sieben einen PSA-positiven Tumor (39%)), diesen aber in keinen logischen Kontext setzen. So gibt es mittlerweile viele widersprüchliche Veröffentlichungen zu diesem Themenkomplex, die sowohl was das Auftreten verschiedener Molekularformen als auch die physiologische oder pathophysiologische Bedeutung sowie den etwaigen prognostischen Wert betrifft, zu keinen einheitlichen Aussagen finden. So konnten Yu et al einen positiven prädiktiven Wert konstatieren (**Yu et Giai, 1995**), da mit höherem immunhistochemischem PSA-Gehalt des malignen Gewebes geringere Tumorgöße, frühere Krankheitsstadien bei Diagnosestellung und häufig auch ein positiver Östrogenrezeptornachweis assoziiert waren. Dieses wird durch die Arbeitsgruppe um Sauter unterstützt, da sie ebenfalls eine inverse Korrelation von PSA-Expression –

allerdings gemessen in Mamillenaspirat – und lokaler Tumorausdehnung, Metastasierung, Krankheitsstadium und Lymphknotenbeteiligung nachwies (**Sauter et al, 2004**). Bei **Alanen et al, 1999** und **Heyl et al, 1999** zeigten sich in der immunhistochemischen Analyse hingegen keine signifikanten Zusammenhänge und **Foekens et al, 1999** berichten bei verstärkter PSA-Expression sogar von einem schlechteren Therapieansprechen des Mammacarcinoms unter Tamoxifen, obwohl in *in vitro*-Studien konträr dazu gerade eine vermehrte Expression des Prostata-spezifischen Antigens induziert werden konnte (**Yu et al, 1994** und **Zarghami et al**). Ein grundsätzliches Problem bei der Bewertung dieser offensichtlich diskrepanten Ergebnisse ist sicherlich nicht nur die Tatsache, daß die Studien zum einen vom serologischen, zum anderen aber auch vom immunhistochemischen PSA-Nachweis ausgehen und sowohl das freie PSA als auch der Gesamtgehalt betrachtet werden, sondern vor allem das fehlende Wissen um die physiologische Funktion des Proteins, deren Verständnis möglicherweise zur Erklärung der so offensichtlichen Kontroversen beitragen könnte.

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt scheint es also nicht sinnvoll bei Brustkrebspatientinnen ein generelles Screening auf den PSA-Gehalt des Tumors oder in Form eines Bluttests durchzuführen, da es zum einen nicht geeignet ist, die Frauen, die wirklich an einem Carcinom leiden, zuverlässig aus dem Gesamtklientel herauszufiltern und einer entsprechenden Therapie zuzuführen (**Romppanen et al, 1999**) und zum anderen keine sichere Aussage über die Bedeutung des PSA für die betroffenen Patientinnen oder seine antiangiogene Wirksamkeit gemacht werden kann. Selbst bezüglich der Rolle der Angiogenese an sich (im Mamma-CA) herrscht keine vollkommenen Einigkeit zwischen den verschiedenen Forschungsgruppen. Die meisten Autoren verstehen die tumoreigene Produktion angiogen stimulierend wirkender Stoffe wie zum Beispiel des VEGFs als Ausdruck seines Wachstums- und Metastasierungsbestrebens (**Balsari et al, 1999**) und werten somit die konsekutive verstärkte Neovaskularisation als schlechtes prognostisches Zeichen (**Guidi et al, 2000**). Dementsprechend versuchen sie zunehmend, diese Stimuli – im Sinne des antiangiogenen Therapieansatzes – in irgendeiner Form auszuschalten, sei es durch neutralisierende Antikörper, „selektives `Targeting` des Tumorendothels mit Toxin-beladenen VEGF-Molekülen“ oder Unterbindung der zellulären Signaltransduktion (z.B. spezifische Tyrosinkinase-

Inhibitoren) (**Dreves et al, 2000**). Andere beschreiben hingegen eine inverse Korrelation von VEGF-Expression und Tumor-Grading und konnten auch eine Induktion dieses Wachstumsfaktors unter Tamoxifen beobachten, was insgesamt für einen positiven Effekt desselben sprechen würde (**Adams et al, 2000**).

Aber auch wenn die mannigfaltigen Mechanismen der Angiogeneseregulation im einzelnen oft unklar und daher viele Fragen offen bleiben, scheint die momentan vorherrschende Forschungsmeinung doch in der Fähigkeit, das Wachstum neuer Gefäße zu induzieren und damit Anschluß an das arterielle sowie venöse Gefäßsystem des Organismus zu gewinnen, einen der Schlüsselmechanismen der Cancerogenese zu sehen. Um die Möglichkeiten einer diesbezüglich ansetzenden Therapie voll ausschöpfen zu können, bleiben allerdings weitere große, klinische Studien abzuwarten. Was das Prostata-spezifische Antigen betrifft, so konnte die von einigen Autoren beschriebene antiangiogene Potenz in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Auch diese Frage bleibt diesbezüglich gezielten Arbeiten überlassen. Sein Einsatz als Marker zur Früherkennung und der Therapieerfolgskontrolle des Prostatacarcinoms ist aber nach wie vor in der gegenwärtigen Literatur unumstritten, wobei sich abzuzeichnen scheint, daß gerade die kombinierte Bestimmung verschiedener Mitglieder der Kallikrein-Genfamilie (PSA und hK-2) sowie die differenzierte Betrachtung der verschiedenen Molekularformen der Protease (frei oder im Komplex mit ACT oder Alpha2-Makroglobulin), auch im Verhältnis zum Gesamtwert – vor allem in den niedrigen PSA-Bereichen -, zu signifikant verbesserten Ergebnissen führen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Wir konnten keine signifikanten Zusammenhänge zwischen dem immunhistochemisch nachweisbaren PSA-Gehalt und der Gefäßanzahl des Mamma – respektive Prostatacarcinoms belegen. Eine eigene antiangiogene Wirkung und damit die direkte Inhibition der Neovaskularisation, wie sie von einigen Autoren beschrieben wird, ließ sich in unseren Untersuchungen nicht bestätigen. Es zeigte sich in der statistischen Analyse sogar gegenteilig eine leichte Tendenz bezüglich einer positiven Korrelation von PSA-Gehalt und Gefäßwachstum, was für eine eher fördernde Wirkung des Proteins auf die Angiogenese sprechen würde. Allerdings ist diese im Hinblick auf die kleine Patientenzahl und die gemeinsame Betrachtung beider Carcinome eher kritisch zu sehen, handelt es sich doch eher um ein durch die Studenumstände entstandenes Rechenergebnis, denn um einen wirklichen kausalen Zusammenhang.

Abschließend läßt sich also feststellen, daß es viele Hinweise auf die Bedeutung der angiogenen Prozesse im Rahmen der Cancerogenese gibt und das Prostata-spezifische Antigen an diesen möglicherweise beteiligt ist, die vorliegende Arbeit aber weder eine positive noch eine negative Einflussnahme belegen konnte. Unbestritten bleibt, daß sich das PSA auch im weiblichen Organismus finden läßt, wenn auch die eigentliche Bedeutung dieser Entdeckung weiterhin unklar ist.

Insgesamt bietet der vielversprechende antiangiogene Forschungsansatz in der Onkologie sicher noch ein weites Betätigungsfeld und es muß zukünftigen Arbeiten - eventuell auch bezüglich des Prostata-spezifischen Antigens – überlassen bleiben, Antworten auf die zahlreichen noch offenen Fragen zu liefern.

6. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACT	Alpha1-Antichymotrypsin
ABC	Avidin-Biotin-Komplex
Aqua dest.	destilliertes Wasser
bFGF	basic fibroblast growth factor
CA	Carcinom
DNA	Desoxyribonukleinsäure
et al	et alteri, und andere
Hrsg.	Herausgeber
IGF-1	Insulin-like growth factor-1
IGFBP-3	Insulin-like growth factor binding protein-3
IL-6	Interleukin-6
kDa	Kilodalton
Mamma-CA	Mammacarcinom
mM	Millimol
<i>messenger RNA</i>	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
PCa	Prostatacarcinom
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
PSA f	f = frei, Anteil des ungebundenen Prostata-spezifischen Antigens
PSA t	t = total, Gesamtmenge des vorhandenen Prostat-spezifischen Antigens
s.o.	siehe oben (im Text)
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
VEGF	vascular endothelial growth factor

7. LITERATUR

Adams J, Carder PJ, Downey S (2000)

“VEGF in breast cancer: comparison plasma, serum and tissue VEGF and microvessel density and effects of tamoxifen“

Cancer Res, 60 (11): 2898-2905

Alanen KA, Kuopio T, Collan YU (1999)

“Immunohistochemical labelling for postate-specific antigen in breast carcinomas“

Breast Cancer Res Treat, 56: 169-176

Amin MB, Hrsg. (2004)

“Gleason grading of prostate cancer: a contemporary approach“

Lippincott, Williams & Wilkins

Armbruster DA (1993)

“PSA – biochemistry, analytical methods and clinical application“

Clin Chem, 39: 181-195

Balsari A, Maier JA, Colnaghi MI (1999)

“Correlation between tumor vascularity, VEGF production by tumor cells, serum VEGF levels and serum angiogenic activity in patients with breast carcinoma“

Lab Invest, 79(7): 897-902

Bastian PJ, Waha A, Müller SC (2004)

“Epigenetische Veränderungen in der Karzinogenese des Prostatakarzinoms“

Deutsches Ärzteblatt, Jg.101: A1981-1985 (Heft 27)

Becker C, Piironen T, Petterson K, Björk T (2000)

“Discrimination of men with prostate cancer from those with benign disease by measurements of hK2 in serum“

J Urol 163: 311-316

Becker C, Piironen T, Petterson K (2000)

“Clinical value of hK2 and free and total prostate-specific serum from a population of men with PSA-levels 3,0 ng/ml“

Urology, 55: 694-699

Becker C, Noldus J, Diamandis EP (2001)

“The role of molecular forms of PSA and hK2 in the diagnosis and monitoring of prostate cancer and in extra-prostatic disease“

Crit Rev Clin Lab Sci, 38 (5): 357-399

Black M, Gai M, Yu H, Diamandis EP (2000)

“Serum total and free Prostate-specific antigen for breast cancer diagnosis in women“

Clin Cancer Res, 6 (2): 467-473

Black MH, Diamandis EP (2000)

“The diagnostic and prognostic utility of prostate-specific antigen for diseases of the breast“

Cancer Res Treat, 59: 1-14

Borchert GH, Melegos DN, Tomlinson G (1997)

“Molecular forms of PSA in the serum of women with benign and malignant breast diseases“

Br J Cancer, 76: 1087-1094

Caine GJ, Lip GY, Stonelake PS (2004)

“Platelet activation, coagulation and angiogenesis in breast and prostate carcinoma“

Thromb Haemost, 92 (1): 185-190

Camp RL, Rimm EB, Rimm DL (2000)

“A high number of tumor free axillary lymph nodes from patients with lymph node negative breast carcinoma is associated with poor outcome“

Cancer, 88 (1): 108-113

Capitasti SM, Hansen TP, Brown ML (2004)

“Thalidomide analogues demonstrate dual inhibition of both angiogenesis and prostate cancer“

Bioorg Med Chem, 12 (2): 327-336

Clements J, Mukhtar A (1994)

“Glandular kallikreins and PSA are expressed in the human endometrium”

J Clin Endocrinol Metab, 78: 1536-1539

Cohen P, Graves HC, Peehl DM (1992)

“PSA is an insulin-like growth factor binding protein-3 protease (...)“

J Clin Endocrinol Metab, 75: 1046-1053

Dahut WL, Gulley JL, Arlen PM (2004)

“Randomized Phase 2-Trial of Docetaxel and Thalidomide in androgen independent prostate cancer“

J Clin Oncol, 22 (13): 2232-2239

Daliani D (2000)

“Development of angiogenesis inhibition as therapy for prostate cancer“

Oncology, (14) Supplement 13 zu Band 12: 21-23

De Angelis G, Brandt B, Schmid HP, Semjonow A (2000)

“Vom Antigen zum Tumormarker“

Der Urologe, 39: 309-312

Delia D, Lampugnani MG, Resnati M (1993)

“CD34 expression is regulated reciprocally with adhesion molecules in vascular endothelial cells in vitro”

Blood 81; 1001-1008

Demicheli R (1994)

“Local recurrences following mastectomy: support for the concept of tumor dormancy“

J Natl Cancer Inst, 86: 45-48

Diamandis EP, Yu H, Lopez-Onin (1996)

“PSA- a new constituent of breast cyst fluid”

Breast Cancer Res Treat, 38: 259-264

Diamandis EP, Yousef GM, Luo I (2000)

“The new human kallikrein gene family: implications in carcinogenesis”

Trends Endocrinol Metab, Mar 11(2): 54-60

Dong Z, Kumar R, Yang X (1997)

“Macrophage-derived metalloelastase is responsible for the generation of angiostatin in

Lewis lung carcinoma“

Cell, 88: 801-810

Drachenberg DE, Elgamal AA, Rowbotham R (1999)

“Circulaing levels of IL-6 in patients with hormone refractory prostate cancer“

Prostate, 41: 127-133

Dreves J, Sachsenmaier C, Unger C (2000)

“Angiogenese-Inhibition, von der Prälinik zur klinischen Studie“

Arzneimitteltherapie, 18 (8): 246-249

Dunsmuir WD, Edwards S, Eeles RA (1998)

“The association of Breast and Prostate Cancer” in

“New perspectives in prostate cancer”

Hrsg. Belldegrun A, Kirby RS, Oliver RDT

Isis Medical Media, Oxford

Eble JN, Hrsg. (2004)

”Pathology and genetics of tumours of the urinary system and male genital organs –
WHO Classification of tumours”

IARC Press, Lyon

Eichenauer R, Sandmann J, Vanherpe H (2003)

”Klinikleitfaden, Urologie”

Urban & Fischer Verlag

3. Auflage

Elgamal AA, Ectors NL, Sunardi-Widyaputra S et al (1996)

“Detection of PSA in pancreas and salivary glands: a potential impact on prostate
cancer overestimation”

J Urol, 156: 464-468

Engels K, Fox SB, Harris AL (1997)

“Angiogenesis as a biologic and prognostic indicator in human breast cancer“ in
“Regulation of angiogenesis“

Hrsg. Goldberg ID, Rosen EM

Birkhäuser Verlag, Basel

Fackler MJ, Civin CI, Sutherland DR (1990)

“Activated protein kinase C directly phosphorylates the CD34 antigen on
hematopoietic stem cells”

J Biol Chem, 265: 11056-11061

Fassl H (1999)

“Einführung in die medizinische Statistik“

Johann Ambrosius Barth Verlag, Heidelberg

Fidler IJ, Ellis LM (2004)

“Neoplastic angiogenesis – not all blood vessels are created equal”

N Engl J Med, 351 (3): 215-216

Figg WD, Dahut W, Duray P (2001)

“A randomized Phase 2-Trial of Thalidomide, an angiogenesis inhibitor, in patients with androgen-independent prostate cancer”

Clin Cancer Res, 7 (7): 1888-1893

Foekens JA, Diamandis EP, Yu H (1999)

“Expression of prostate-specific antigen correlates with poor response to tamoxifen therapy in recurrent breast cancer”

Br J Cancer, 79: 888-894

Folkman J (1990)

“What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent?”

J Natl Cancer Inst, 82: 4-6

Folkman J (1992)

“The role of angiogenesis in tumor growth”

Semin Cancer Biol, 3: 65-71

Folkman J (1995)

“Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease”

Nature Medicine, 1 (1): 27-30

Fortier AH, Nelson BJ, Grella DK (1999)

“Antiangiogenic activity of prostate-specific antigen”

J Natl Cancer Inst, 91 (19): 1635-1640

Forbes JF (1997)

“The incidence of breast cancer: the global burden, public health considerations“

Semin Oncol, 24: 120-135

Gately S, Twardowski P, Stack MS (1996)

“Human prostate carcinoma cells express enzymatic activity that converts plasminogen to the angiogenesis inhibitor, angiostatin“

Cancer Res, 56: 4887-4890

Gimbrone M, Leapman S, Cotran R (1972)

“Tumor dormancy in vivo by prevention of neo-vascularisation“

J Exp Med, 136: 261-276

Goerke K, Steller J, Valet A (2003)

“Klinikleitfaden, Gynäkologie und Geburtshilfe“

Urban & Fischer Verlag

6. Auflage

Guidi AJ, Berry DA, Broadwater G (2000)

“Association of angiogenesis in lymph node metastases with outcome of breast cancer“

J Natl Cancer Inst, 92 (6): 486-492

Graves HCB (1995)

“Nonprostatic sources of PSA: a steroid hormone-dependent phenomenon?“

Clin Chem, 41: 7-9

Griniatsos J, Diamandis EP, Gioti J (1998)

“Correlation of PSA-immunoreactivity to other prognostic factors in female breast cancer“

Anticancer Res, 18: 683-688

Hanahan D, Folkman J (1996)

“Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis“

Cell, 86: 353-364

Hayes AJ, Li LY, Lippman ME (1999)

“Antivascular therapy: a new approach to cancer treatment“

B M J, 318: 853-856

Heidtmann HH, Nettelbeck DM, Mingels R (1999)

“Generation of angiostatin-like fragments from plasminogen by PSA“

British Journal of Cancer, 0: 00-00; Cancer Research Campaign

Henrysson S, Haseloff OW, Hoffmann HJ (1960)

“Kleines Lehrbuch der Statistik für Mediziner etc...“

Walter de Gruyter Verlag, Berlin

Heyl W, Wolff JM, Biesterfeld S (1999)

“Immunohistochemical analysis of prostate-specific antigen does not correlate to other prognostic factors in breast cancer“

Anticancer Res, 19 (4A): 2536-2565

Hodge JW, Schlom J, Donohue SJ (1995)

“A recombinant vaccinia virus expressing PSA: safety and (...“

Int J Cancer, 63: 231-237

Holmgren L, O`Reilly MS, Folkman J (1995)

“Dormancy of micrometastases: Balanced proliferation and apoptosis in (...“

Nature Medicine, 1 (2): 149-152

Horak ER, Leek R, Klenk N (1992)

“Angiogenesis (...) as indicator of node metastases and survival in breast cancer“

Lancet, 340: 1120-1124

Kaufmann M, von Minckwitz G, Eiermann W (2004)
“Therapie primärer Mammcarcinome“ (Kongressbericht)
Deutsches Ärzteblatt, Jg.101: 162-166 (Heft 4)

Kraus B, Metzler M (1988)
“Angewandte Statistik“
Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin
2. Auflage

Kondo S, Asano M, Matsuo K (1994)
“VEGF (...) is detectable in the sera of tumor mice and cancer patients“
Biochem Biophys Acta, 1221: 211-214

Lein M, Stephan C, Jung K, Schnorr D, Loening SA (2000)
“Molekulare Formen des PSA und des humanen Kallikreins² als mögliche Indikatoren
in der Prostatakarzinomdiagnostik“
Der Urologe, 39: 313-323

Lijnen HR, Uguwu F, Bini A (1998)
“Generation of an angiosatin-like fragment from plasminogen by stromelysin-1“
Biochemistry, 37: 4699-4702

Lilja H (1993)
“Structure, function and regulation of the enzyme activity of PSA”
World J Urol, 11: 188-191

Lilja H (2000) in
“Fortschritte in der Therapie und Diagnostik des Prostatacarcinoms“
Hrsg. Heidenreich A
Onkologie, Supplement 8 zu Band 23

Luboldt HJ, Rübgen H (2004)

“Früherkennung des Prostatakarzinoms“

Deutsches Ärzteblatt, Jg.101: A1763-1738 (Heft 24)

Mannello F, Bianchi G, Gazzanelli G (1996)

“Immunoreactivity of PSA in plasma and saliva of healthy women“

Clin Chem, 42: 1110-1111

Mannello F, Sebastiani M, Amati S (1997)

“Prostate-specific antigen expression in a case of intracystic carcinoma of the breast: characterization of immunoreactive protein and literature surveys“

Clin Chem, 43: 1448-1454

Mannello F, Gazzanelli G (2001)

“Prostate-specific antigen (PSA/hK3): a further player in the field of breast cancer diagnostics?“

Breast Cancer Res, 3 (4): 238-243

Melegos DN, Freedman MS, Diamandis EP (1997)

“PSA in cerebrospinal fluid“

Clin Chem, 43: 855

Merkle W, Hrsg. (1997)

“Urologie“

MLP-Duale Reihe

Hippokrates Verlag

Monne M, Croce CM, Yu H (1994)

“Molecular characterization of prostate-specific antigen messenger RNA expressed in breast tumors“

Cancer Res, 54: 6344-6347

Naish SJ (1989)

“Handbuch immunhistochemischer Färbemethoden 2”

Carpinterra, Kalifornien, USA

DAKO-Corporation: 11-31

Noll S, Schaub-Kuhnen S (2000) in

“Praxis der Immunhistochemie“

Hrsg. Höfler H und Müller KM

Urban & Fischer Verlag

1.Auflage

Peehl DM (1995)

“Prostate-specific antigen: role and function“

Cancer, 75: 2021-2026

Pfleiderer A, Breckwoldt M, Martius G (2000)

“Gynäkologie und Geburtshilfe“

Thieme Verlag

3.Auflage

Pili R, Carducci M, Denmeade S (2000) in

“Prostate Cancer: Principles and Practice“

Hrsg. Kantoff P, Carroll P, D’Amico A (2002)

Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia

Pollen JJ, Dreilinger A (1984)

“Immunohistochemical identification of (...)PSA in female periurethral glands“

Urology, 23: 303-304

“Pschyrembl Klinisches Wörterbuch“

Walter de Gruyter Verlag

257.Auflage

van de Rijn M, Rouse RV (1994)

“CD34 – A Review“

Appl Immunohistochem, 2 (2): 71-80

Rocha RL, Hilsenbeck SG, Jackson JG (1997)

“IGFBP-3 and insulin receptor substrate-1 in breast cancer (...)“

Clin Cancer Res, 3: 103-109

Romppanen J, Kesikuru R, Kataja V (1999)

“Measurement of prostate-specific antigen in detection of benign or malignant breast disease in women“

Br J Cancer, 79 (9-10): 1583-1587

Ross SA (2003)

„Diet and DNA methylation interactions in cancer prevention“

Ann NY Acad Sci, 983: 197-207

Salven P, Maenpaa H, Orpana A (1997)

“Serum-VEGF is often elevated in Patients with disseminated cancer“

Clin Cancer, 3: 647-651

Sauter ER, Daly M, Linahan K et al. (1996)

„PSA levels in nipple aspirate fluid correlate with breast cancer risk“

Cancer Epidemiol Biomark Prev, 5: 967-970

Schaller J, Akiyama K, Tsuda R, Hara M, Marti T, Rickli E (1987)

“Isolation, characterization and amino-acid sequence of gamma-seminoprotein, a glycoprotein from human seminal plasma”

Eur J Biochem, 170: 111-120

Seliger E, Kaltwasser P, Röpke F (1998)

“Die Bestimmung des PSA im Zytosol von Mammatumoren...“

Zentralblatt Gynäkol, 120: 172-175

Sellers TA, Grabrick DM (2002)

“The epidemiology of breast cancer“ in

“Manual of breast diseases“

Hrsg. Jatoi I

Lippincott Williams & Wilkins

Stenman UH, Leinonen J, Alfthan H (1991)

“A complex between PSA and ACT is the major form of PSA in serum of patients with prostate cancer: assay of the complex improves clinical sensitivity for cancer“

Cancer Res, 51: 222-226

Stenman UH, Leinonen J, Zhang WM, Fima P (1999)

“Prostate-specific antigen“

Semin Cancer Biol, 9: 83-93

Stuschke M, Budach V, Böhmer D (2004)

”Strahlentherapie des Prostatakarzinoms“

Deutsches Ärzteblatt, Jg. 101: A2690-2694 (Heft 40)

Sutherland DR, Fackkler MJ, May WS (1992)

“Activated protein kinase C directly phosphorylates the CD34 antigen in acute lymphoblastic leukaemia cells“

Leuk Lymphoma, 8: 337-344

Tavassoli F, Devilee P, Hrsg. (2003)

“Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs – WHO Classifications of tumours“

IARC Press, Lyon

Tepper SL, Jagirdar J, Heath D (1984)

“Homology between the female paraurethral gland and the prostate (...)“

Arch Pathol Lab Med, 108: 423-425

Tsuyuki D, Grass L, Diamandis EP (1997)

“Frequent detection of mutations in the 5' flanking region of the prostate-specific antigen gene in female breast cancer“

Eur J Cancer, 33: 1851-1854

Watt KWK, Lee PJJ, M'Tinkulu T, Chan WP, Loo R (1986)

“Human PSA: structural and functional similarity with serine proteases”

Proc Natl Acad Sci USA, 83: 3166-3170

Weiss SW, Goldblum JR (2001)

“Enzinger and Weiss's soft tissue tumors“

Mosby, Inc

4. Edition: 222

Wittekind, Christian (2003)

“TNM-Klassifikation maligner Tumoren“

Springer Verlag

6. Auflage

Yu H, Diamandis EP, Zarghami N (1994)

“Induction of PSA-production by steroids and tamoxifen in breast cancer cell lines“

Breast Cancer Res. Treat., 32: 291-300

Yu H, Gai M (1995)

“PSA is a favorable prognostic indicator for women with breast cancer“

Cancer Research, 55: 2104-2110

Yu H, Diamandis EP (1995)

“PSA in milk of lactating women”

Clin Chem, 41: 54-58

Yu H, Diamandis EP, Levesque M et al (1996)

“PSA in breast cancer, benign breast disease and normal breast tissue”

Breast Cancer Res Treat, 40: 171-178

Yu H, Levesque MA, Clark GM (1998)

“Prognostic value of PSA for women with breast cancer: a large United States cohort study“

Clin Cancer Res, 4: 1489-1497

Yu H, Levesque MA, Khosravi MJ (1998)

“IGFBP-3 and breast cancer survival“

Int J Cancer, 79: 624-628

Yu H, Berkel H (1999)

“PSA in women“

J La State Med Soc, 151: 209-213

Zarghami N, Grass L, Diamandis EP (1997)

“Steroid hormon regulation of PSA gene expression in breast cancer“

Br J Cancer, 75: 579-588

Danksagung

An dem erfolgreichen Entstehen dieser Arbeit haben mehrere Personen Anteil, denen ich an dieser Stelle ganz besonders herzlich danken möchte.

In erster Linie danke ich Herrn Professor Dr. H. Riedmiller und Herrn Privatdozenten Dr. K. Weingärtner für die Überlassung des Themas. Letzterem sei vor allem auch für die unermüdliche und engagierte Betreuung sogar über Städte- und Ländergrenzen hinweg gedankt! Sein besonderer Einsatz hat bedeutend zum Gelingen der Dissertation beigetragen.

Dann gilt mein Dank Frau Dr. A.-M. Gassel, ohne deren Hilfe die histopathologische Beurteilung der Präparate kaum möglich gewesen wäre und die mich außerdem sehr nett und herzlich in langen Mikroskopierstunden begleitet hat.

Herrn Professor Dr. A. Marx danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferates.

Herrn Professor Dr. Caffier danke ich für die Überlassung der Patientendaten und die Erlaubnis zur Benutzung des Patientenarchivs der universitären Frauenklinik, Würzburg.

Ganz besonders möchte ich Frau Barbara Dexler hervorheben, die in ihrer Eigenschaft als MTA im Forschungslabor der Urologischen Universitätsklinik, Würzburg von unschätzbarem Wert für die Herstellung respektive Färbung der immunhistochemischen Präparate war.

Ihr danke ich außerdem sehr für die freundliche und herzliche Aufnahme im persönlichen Kontakt und ein immer offenes Ohr für Fragen.

Besonderer Dank gilt außerdem Herrn Alois Spahn im Rechenzentrum der Universität Würzburg, der mir bei der statistischen Auswertung außerordentlich hilfreich war.

Außerdem möchte ich meinen Eltern danken, die mir nicht nur das Medizinstudium und die Fertigstellung dieser Arbeit ermöglicht, sondern diesbezüglich – ebenso wie meine ganze Familie - auch immer sehr viel Geduld und Verständnis sowie jegliche Form der Unterstützung gezeigt haben. Meinem lieben Markus danke ich für das Korrekturlesen der Arbeit und dafür, daß er immer für mich da ist!

Curriculum Vitae

Name : Elisabeth Thomasius

Geburtsdatum : 05. Dezember 1976

Geburtsort : Leer / Ostfriesland

Familienstand : ledig

Staatsangehörigkeit : deutsch

Adresse : Gartenstraße 14, 26789 Leer ; Tel: 0491 / 9799719
elisabeth.thomasius@web.de

Schulbildung : 1983 – 1987 Grundschule Daalerschule in Leer-Loga
1987 – 1989 Orientierungsstufe Möörkenschule in Leer-Loga
1989 – 1996 Ubbo-Emmius-Gymnasium in Leer mit Abschluss Abitur, Note: 1,5

Au pair : 08/1996 – 04/1997 Aufenthalt als Au pair-Mädchen in Stockholm, Schweden

Studium : 05/1997 – 11/2003 Studium der Humanmedizin an der Bayerischen Maximilian-Julius-Universität, Würzburg

Physikum : 24. März 1999 Note: 1,6 (gut)

Ärztliche Prüfung (1. Teil) : 23. März 2000 Note: befriedigend

Ärztliche Prüfung (2. Teil) : 11. September 2002 Note: 1,6 (gut)

Ärztliche Prüfung (3. Teil) : 20. November 2003 Note: sehr gut

Famulaturen : 10/99 Innere Medizin am Borromäus-Hospital in Leer

04/00 Gynäkologie und Geburtshilfe an der Ignaz Semmelweiss-Klinik in Wien, Österreich

08/00 Gynäkologie und Geburtshilfe am Mercy Hospital for Women in Melbourne, Australien

	03/01	Chirurgie am Sjukhus Solleftea in Solleftea, Schweden
	04/01	Kinderheilkunde am Kreiskrankenhaus in Leer
	03/02	Allgemeinmedizin in der Praxis Dr. Besuden in Leer
<u>Praktisches Jahr</u>	: 1.Tertial:	Chirurgie am Allgemeinen Regionalkrankenhaus in Bozen, Italien
	2.Tertial:	Innere Medizin an der Universitätsklinik Würzburg unter Prof. Dr. B. Allolio
	3.Tertial:	Gynäkologie und Geburtshilfe am Kantonsspital Luzern, Schweiz unter Prof. Dr. B. Schüssler
<u>Ärztin im Praktikum</u>	: 01.01.2004 -30.06.2004	Gem.schaftspraxis Dres.Temme / Metzger für Endokrinologie und Reproduktionsmedizin, Berlin

Elisabeth Thomas