

Aus dem Pathologischen Institut
der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. Andreas Rosenwald

**Erstellung einer histologisch evaluierten Prostata DNA
– Bank aus Prostatakarzinom im Vergleich zu
Normalgewebe**

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

Vorgelegt von
Florian Elflein
aus Rentweinsdorf

Würzburg, März 2010

Referent: Prof. Dr. Philipp Ströbel

Korreferent: Prof. Dr. Hubertus Riedmiller

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 29.09.2010

Der Promovend ist Arzt

| | |
|---|----|
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1 Allgemeines | 1 |
| 1.2 Grundlagen zur Anatomie der Prostata | 2 |
| 1.3 Das Prostatakarzinom | 4 |
| 1.3.1 Formen des Prostatakarzinoms | 4 |
| 1.3.2 Histologie | 5 |
| 1.3.3 Regeln zur Klassifikation von Prostatakarzinomen nach TNM-Atlas | 7 |
| 1.4 Ätiologie | 10 |
| 1.5 Risikofaktoren | 11 |
| 2. Material und Methoden | 12 |
| 2.1 Auswertung | 12 |
| 2.2 Blöcke | 13 |
| 2.3 Schnitte | 14 |
| 2.4 Vom Frischgewebe zum Präparat unter dem Mikroskop | 14 |
| 2.5 Histologisches Grading nach Gleason | 15 |
| 2.6 Histologisches Grading nach WHO und Mostofi | 21 |
| 2.7 Prostatistische intraepitheliale Neoplasie (PIN) | 22 |
| 2.8 Atypische adenomyomatöse Hyperplasie (AAH) | 24 |
| 2.9 Prostatitis | 25 |
| 2.10 Adenomyomatöse Hyperplasie | 25 |
| 2.11 Vorgehensweise für die Extraktion von DNA aus dem Gewebeblock | 25 |
| 2.12 Photometrische DNA – Messung | 31 |
| 2.13 PCR | 31 |

| | |
|--|-----------|
| 2.14 Primer-Sequenzen für Mikrosatelliten-Analysen | 31 |
| •PTEN | 32 |
| •MYC | 32 |
| •CTCF | 32 |
| •BORIS..... | 32 |
| 2.15 Statistik | 32 |
| 2.16 Substanzen und Geräte | 32 |
| 3. Ergebnisse | 34 |
| 3.1 Altersverteilung | 34 |
| 3.2 Histopathologische Befunde..... | 35 |
| 3.2.1 Stadienverteilung..... | 35 |
| 3.2.2 Gleason-Scores | 37 |
| 3.2.3 Lymphknotenstatus..... | 40 |
| 3.2.4 Resektionsstatus | 43 |
| 3.2.5 High- Grade Prostatistische intrepitheliale Neoplasie (HGPIN)..... | 46 |
| 3.2.6 Prostatitis | 48 |
| 3.3 Einfluß histologischer Tumorparameter auf die Rezidivhäufigkeit | 49 |
| 3.3.1 Einfluß des pT –Stadiums auf die Rezidivhäufigkeit..... | 49 |
| 3.3.2 Einfluß des Gleason-Scores auf die Rezidivhäufigkeit | 51 |
| 3.3.3 Einfluß des Lymphknotenstatus auf die Rezidivhäufigkeit..... | 54 |
| 3.3.4 Einfluß des Resektionsstatus auf die Rezidivhäufigkeit..... | 56 |
| 3.4 Molekularbiologische Mikrosatelliten-Analysen zum Nachweis einer LOH (loss of heterocygosity) an paraffin-extrahierter DNA..... | 58 |

| | |
|--|----|
| 4. Diskussion | 60 |
| 4.1 Prostatitis und Prostatakarzinom | 60 |
| 4.2 Die Bedeutung von Gleason-Score 7..... | 61 |
| 5. Zusammenfassung | 62 |
| 6. Literaturverzeichnis | 63 |

1. Einleitung**1.1 Allgemeines**

Das Prostatakarzinom ist in den westlichen Industriestaaten das am häufigsten diagnostizierte Karzinom und die zweithäufigste Todesursache. Es ist eine Erkrankung des alternden Mannes mit einem Inzidenzgipfel zwischen dem 7. und 8. Lebensjahrzehnt (S. Madersbacher, U.E.Studer; Prostatakarzinom; Schweiz Med. Forum, Nr. 46).

Beim Prostatakarzinom hat man ca. 25000 Neuerkrankungen pro Jahr in Deutschland und damit ist es die zweithäufigste Krebstodesursache nach dem Bronchialkarzinom (Krebsinformationsdienst, Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg; Prostatakrebs). Unter den urologischen Tumoren bedingt das Prostatakarzinom die häufigste Todesursache und ist zugleich ab dem 80. Lebensjahr die häufigste tumorbedingte Todesursache überhaupt (Hözel, D; Epidemiologie des Prostatakarzinom; Fortschr. Med. 109 (26); 521-525; 1991). Die Inzidenzrate bei der durchschnittlichen männlichen Population beträgt in Westeuropa und Nordamerika etwa 88/100000/Jahr (NCI, 1988). Sie steigt mit zunehmendem Lebensalter: Bei 55 jährigen Männern beträgt sie 20/100000 (W.Tomschl; Prostatakarzinom-Inzidenz-Ätiologie-Risikofaktoren; 1994), bei den 60 Jährigen 50/100000 und bei den 75 - 85 Jährigen bis auf mehr als 400/100000. Das mittlere Alter bei Diagnose liegt bei 71,4 Jahren, das mittlere Sterbealter bei 78 Jahren (N. Schmeller; Prostatakarzinom; www.krebsinfo.de). Durch den routinemäßigen Einsatz der Bestimmung des prostata-spezifischen Antigens (PSA) seit etwa 20 Jahren ist es zu einem deutlichen Anstieg der Inzidenz des Prostatakarzinoms bei zurückgehender tumorbedingter Mortalität gekommen (Elgamal, van Poppel et al.; 1997). Es besteht eine sehr deutliche Diskrepanz zwischen der sehr hohen Prävalenz post mortem identifizierter Prostatakarzinome (etwa 30 – 40 % bei Männern über 50 Jahre) und der Prävalenz klinisch auffälliger Prostatakarzinome (etwa 8 %). Weiterhin scheint die Prävalenz „präklinischer“ Prostatakarzinome weltweit eher geringen Schwankungen zu unterliegen (Breslow, Chan et al. 1977), während klinisch auffällige Prostatakarzinome sehr starke geographische und ethnische Differenzen aufweisen.

Auch eine familiäre Häufung des Prostatakarzinoms ist gesichert (Carter BS, Bova GS; Hereditary Prostate Cancer: Epidemiologic and Clinical Features; J. Urol.150 (3): 797-802, 1993)

Eine Besonderheit des Prostatakarzinoms ist der so genannte latente Tumor, der als Zufallsbefund im Rahmen einer Autopsie festgestellt wird. Er wird bei rund 10 % der 50-Jährigen und bei 70 % der 80-Jährigen gefunden (Sheldon CA, Williams RD et al; Incidental Carcinoma of the Prostate; A Review of the Literature and Critical Reappraisal of Classification. J. Urol.124 (5): 626-631; 1980). Wird ein Prostatakarzinom zufällig im Rahmen einer Operation wegen adenomyomatöser Hyperplasie gefunden, spricht man von einem inzidentiellen Prostatakarzinom.

Die Prostata ist das einzige Organ des Menschen, das physiologischerweise mit zunehmendem Alter an Größe zunimmt.

1.2 Grundlagen zur Anatomie der Prostata

1.2.1 Zonale Gliederung

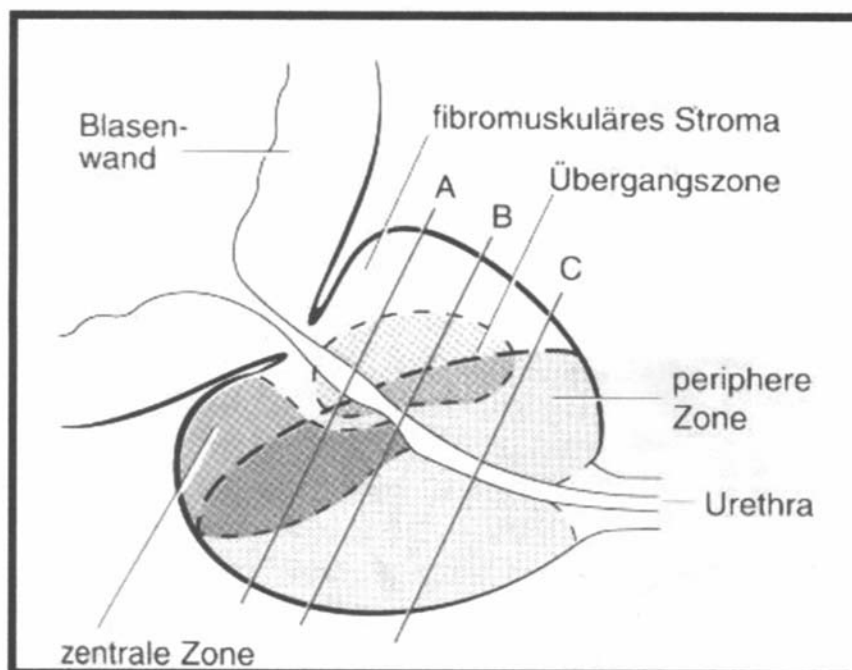
Die Prostata lässt sich in mehrere Zonen gliedern. Die prostatistische Urethra gliedert sich jeweils in ein gleichlanges proximales und distales Urethrasegment. In Beziehung zur Urethra unterscheidet man unterschiedliche Regionen:

1. Zentrale Zone: Sie enthält 25 % des glandulären Prostataparenchyms und bildet eine konusförmige Zone zwischen Blasenaustritt, Ductus ejaculatorius und proximalem Urethrasegment. Sie enthält große Drüsen ähnlich denen in der Samenblase mit kompaktem, muskulärem Stroma. Das Epithel enthält papilläre und kribriiforme Proliferationen mit teils basophilem Zytoplasma und leicht verschobener Kern-Plasma-Relation. Daher kann es leicht mit der prostatistischen intraepithelialen Neoplasie (PIN) verwechselt werden.

2. Transitionalzone: Sie enthält das periurethrale Drüsenparenchym im Bereich des proximalen Urethrasegments und liegt überwiegend vor der Urethra, weshalb sie auch als anterolaterale Zone bezeichnet wird. In dieser Zone entstehen die meisten Formen der adenomyomatösen Prostatahyperplasie. Der Home'sche Mittellappen resultiert aus

einer Hyperplasie periurethraler Drüsen, die hinter dem proximalen Urethrasegment gelegen sind. Etwa 20 % aller Prostatakarzinome entstehen in der Transitionalzone. Das fibromuskuläre Stroma ist kompakt und zellreich.

3. Periphere Zone: Sie wird auch als posterolaterale Zone bezeichnet. Sie bildet mit etwa 70 % die Hauptmasse der Prostata. Sie umfasst den Hinter- und Seitenlappen, die Apex-Region und umschließt hufeisenförmig die Transitionalzone. In der peripheren Zone entstehen 70 – 80 % der Prostatakarzinome und der PIN-Läsionen. Hyperplasien sind hier selten, mit Ausnahme der prostatistischen Hyperplasie. Das sekretorische Epithel ist hell und enthält kleine, runde Zellkerne. Das fibromuskuläre Stroma ist locker und wenig zellreich.



1.2.2 Die Prostatakapsel

Die Prostatakapsel besteht aus komprimiertem, fibromuskulärem Prostatastroma, zum Teil mit quergestreiften Muskelbündeln. Im Bereich des neurovaskulären Bündels, der Apexregion und des Blasenausganges fehlt sogar eine eindeutige Kapsel, was sowohl die extraprostatistische Ausdehnung eines Prostatakarzinomes erleichtern und begünstigen

kann als auch die Beurteilung erschwert, inwieweit ein Tumor bereits die Organgrenzen überschritten hat.

1.2.3 Das Prostataepithel

Das Prostataepithel besteht hauptsächlich aus drei Zelltypen.

1. Sekretorisches Epithel: Dieses Epithel ist androgenabhängig und exprimiert sehr stark den Androgenrezeptor (AR). Nur die sekretorischen Zellen enthalten das prostataspezifische Antigen (PSA) und die saure Prostataphosphatase (SPP).
2. Basalzellen: Sie sind in ihrer Funktion androgenunabhängig und bleiben nach Androgenentzug erhalten. Sie exprimieren teilweise auch Östrogen und Progesteron. Des Weiteren exprimieren Basalzellen hochmolekulare Zytokeratine (Clon 34ß E12), die in der Prostata für Basalzellen spezifisch sind.
3. Neuroendokrine Zellen: Diese Zellen sind mit speziellen endokrinen Markern nachweisbar z.B. mit Chromogranin A. Sie kommen disseminiert im Prostataepithel vor und sekretieren viele neurosekretorische Substanzen, von denen wohl Serotonin am bedeutensten ist.

1.3 Das Prostatakarzinom

1.3.1 Formen des Prostatakarzinoms

Klinisch kann sich das Prostatakarzinom als manifest, latent, inzident oder okkult zeigen.

1.3.1.1 Klinisch manifestes Prostatakarzinom

Dieses Karzinom wird bei der klinischen Untersuchung entdeckt und nachfolgend histologisch und zytologisch abgesichert. Bei rektaler Untersuchung wird oft eine Verhärtung der Prostata bemerkt, teils in Form eines Knotens oder bei fortgeschrittenem Stadium in Form eines verhärteten Lappens. Lokale Beschwerden wie z.B. eine Harnwegsobstruktion sind nur bei fortgeschrittenem Stadium zu finden. Teilweise kann das Prostatakarzinom auch im Ultraschallbild entdeckt werden. Im Serum des Patienten

kann das prostataspezifische Antigen (PSA) und als weiterer spezifischer Prostatamarker die saure Prostataphosphatase (SPP) erhöht sein.

1.3.1.2 Latentes Prostatakarzinom

So wird ein Prostatakrebs beschrieben, der bei der Autopsie entdeckt wird. Er wird bei einem Drittel aller Männer jenseits des 45. Lebensjahres und bei fast der Hälfte jenseits des 70. Lebensjahres gefunden. Bei diesem Karzinom handelt es sich um ein langsam wachsendes, überwiegend hochdifferenziertes Karzinom, das teilweise größer als 1cm werden und multizentrisch auftreten kann. Latente Karzinome sind niemals Todesursache.

1.3.1.3 Inzidentes Prostatakarzinom

Man versteht darunter einen Zufallsbefund im Biopsiematerial bei klinisch unverdächtiger Prostata.

1.3.1.4 Okkultes Prostatakarzinom

Dieses Karzinom wird aufgrund einer Metastase auffindig gemacht. Beim Prostatakrebs ist dies am häufigsten eine Knochenmetastase. Indem man nun mittels immunhistochemischer Nachweismethoden PSA in der Metastase bestätigt, kann man die Lokalisation des Primärtumors in der Prostata sichern.

1.3.2 Histologie

Man unterscheidet gewöhnliche von seltenen oder ungewöhnlichen Prostatakarzinomen. Des Weiteren kann man eine Aufteilung in uniforme Karzinome mit nur einem Grundmuster und pluriforme Karzinome mit mehreren verschiedenen Grundmustern vornehmen.

1.3.2.1 Gewöhnliche Prostatakarzinome

Man unterscheidet vier Wachstumsmuster, die im Folgenden beschrieben werden:

→ Hochdifferenziertes Adenokarzinom:

Das Karzinom hat verhältnismäßig regelmäßige Drüsen, die sich von normalem Drüsengewebe durch das Fehlen der Basalzellschicht und der Einfaltungen

unterscheiden. Die Zellkerne sind noch regelmäßig geformt und angeordnet, aber vergrößert. Die deutlich vergrößerten Nucleoli fallen auf.

→ Wenig differenziertes Adenokarzinom:

Die Drüsen liegen im Stroma verstreut und sind kleiner und unregelmäßiger. Auch ist die Kern-Plasma-Relation eindeutig zugunsten des Kerns verschoben. Man kann sehr schön die prominenten Nucleoli sehen.

→ Kribriiformes Karzinom: Es handelt sich um Karzinomflächen, die siebartig durchlöchert erscheinen. Der Name leitet sich aus dem Lateinischen von cribrum (= Sieb) ab.

→ Solides (undifferenziertes) Karzinom: Hier fehlen drüsige und kribriiforme Strukturen. Der Krebs wächst als großes Zellfeld. Die Zellen zeigen eine starke Kernpolymorphie.

1.3.2.2 Ungewöhnliche Prostatakarzinome

→ Muzinöse Prostatakarzinome: Es handelt sich um stark verschleimte Karzinome mit meist kribriiformem Wachstum.

→ Duktalpapilläre Karzinome: Diese Karzinome können in die prostatistische Urethra einwachsen und dort zur Hämaturie und Harnwegsobstruktion führen.

→ Karzinomide und kleinzellige Karzinome: Diese Karzinome leiten sich von den endokrinen Zellen der Prostata ab und können auch endokrin tätig sein.

→ Transitionalzellkarzinome: Die Krebszellen füllen unter Zerstörung des Prostataepithels die Epithelgänge aus und dringen ins Stroma vor. Die Prognose im Fall des Transitionalzellkarzinoms ist schlecht. Häufig liegt ein Carcinoma in situ der Harnblase mit kontinuierlicher oder diskontinuierlicher Ausbreitung in der Harnblase, der Urethra und den prostatistischen Gängen vor.

→ Adenoid-zystisches Karzinom: Ursprung dieses Karzinomtyps sind die Basalzellen. Dieser Karzinomtyp zeigt eine überwiegend günstige Prognose.

→ Plattenepithelkarzinome: Sie können infolge einer langdauernden Östrogentherapie aus Plattenepithelmetaplasie entstehen, sind aber sehr selten.

(Pathologie; Blümcke, S; Walter de Gruyter; Berlin; New York; 1995)

1.3.3 Regeln zur Klassifikation von Prostatakarzinomen nach TNM-Atlas (UICC 6)
(TNM-Atlas, Wittekind, C; Klimpfnger, M; Sobin, L.H.; 5.Aufl.; 2005)

Verfahren zur Bestimmung der T-, N- und M-Kategorie sind:

T-Kategorien: Klinische Untersuchung, bildgebende Verfahren, Endoskopie, Biopsie
und biochemische Tests

N-Kategorien: Klinische Untersuchung und bildgebende Verfahren

M-Kategorien: Klinische Untersuchung, bildgebende Verfahren, Skelettuntersuchungen
und biochemische Tests

TNM: Klinische Klassifikation

T- Primärtumor

TX Primärtumor kann nicht beurteilt werden

T0 kein Anhalt für Primärtumor

T1 Klinisch nicht erkennbarer Tumor, der weder tastbar noch in
bildgebenden Verfahren sichtbar ist

T1a Tumor ist zufälliger histologischer Befund ("incidental carcinoma") in 5 % oder
weniger des resezierten Gewebes

T1b Tumor ist zufälliger histologischer Befund ("incidental carcinoma") in mehr als
5 % des resezierten Gewebes

T1c Tumor durch Nadelbiopsie diagnostiziert (z.B. wegen erhöhtem PSA)

T2 Tumor begrenzt auf Prostata¹

T2a Tumor befällt die Hälfte eines Lappens oder weniger

T2b Tumor befällt mehr als die Hälfte eines Lappens

T2c Tumor in beiden Lappen

T3 Tumor durchbricht die Prostatakapsel²

T3a Extrakapsuläre Ausbreitung (einseitig oder beidseitig)

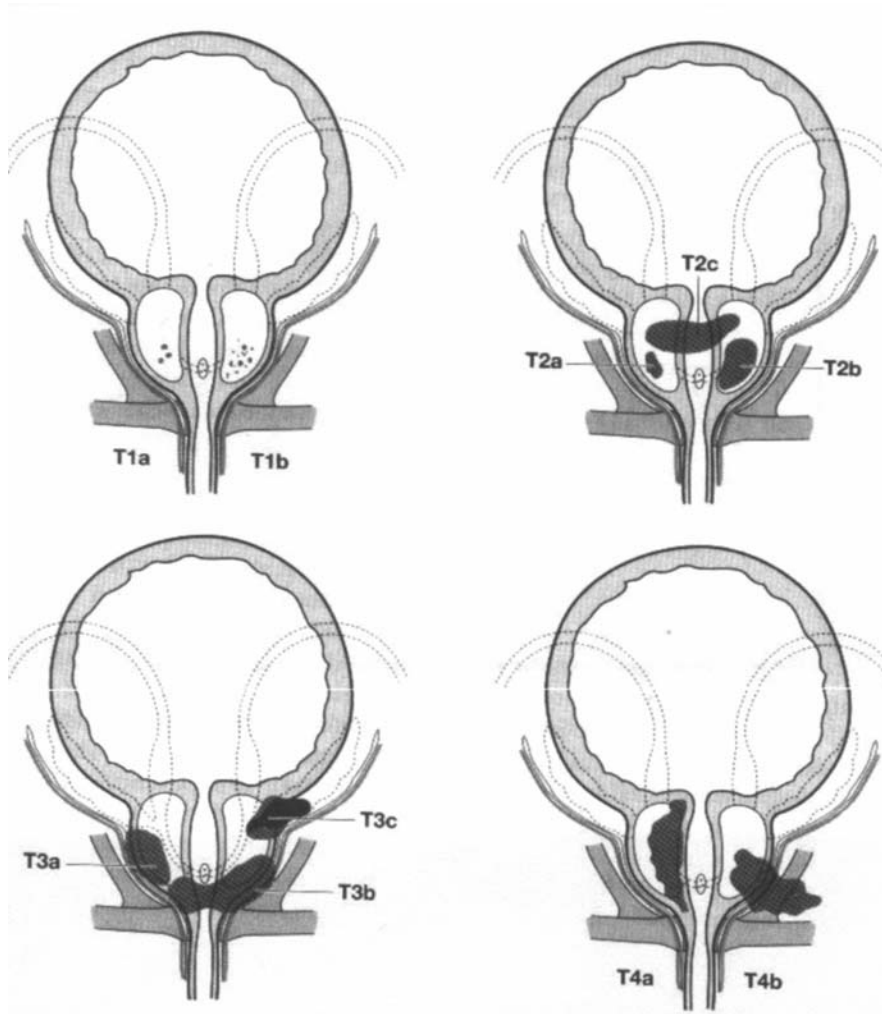
T3b Tumor infiltriert Samenblase(n)

T4 Tumor ist fixiert oder infiltriert andere benachbarte Strukturen als Samenblasen, z.B. Blasenhal, Sphincter externus, Rektum, und/oder Levatormuskel und/oder ist an Beckenwand fixiert

Anmerkung:

¹Ein Tumor, der durch Nadelbiopsie in einem oder beiden Lappen gefunden wird, aber weder tastbar noch in bildgebenden Verfahren sichtbar ist, wird als T1c klassifiziert.

²Invasion in den Apex der Prostata oder in die Prostatakapsel (aber nicht darüber hinaus) wird als T2 (nicht als T3) klassifiziert.



N - Regionäre Lymphknoten

NX Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden

N0 Keine regionären Lymphknotenmetastasen

N1 Regionäre Lymphknotenmetastasen

M - Fernmetastasen

MX Fernmetastasen können nicht beurteilt werden

M0 Keine Fernmetastasen

M1 Fernmetastasen

- M1a Nichtregionäre(r) Lymphknoten
- M1b Knochen
- M1c Andere Lokalisation(en)

Anmerkung: Wenn die Metastasen in mehr als einer Lokalisation nachweisbar sind, soll die höchste Kategorie benutzt werden.

pTNM: Pathologische Klassifikation

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

Anmerkung: Eine Metastase, die nicht größer als 0,2cm ist, kann mit pN1mi verschlüsselt werden.

1.4 Ätiologie

In der letzten Zeit wurde die familiäre Häufung des Prostatakarzinoms gesichert. Es besteht ein etwa 2- bis 3fach erhöhtes Risiko, auch ein Prostatakarzinom zu entwickeln, wenn Vater oder Bruder am Prostatakarzinom erkrankt waren, sogar 5faches Risiko, wenn beide am Prostatakarzinom erkrankt waren. Dass genetische Faktoren existieren, zeigen auch Migrationsstudien. Japaner und Chinesen erreichen in den USA 50 % der Prostatakarzinom-Inzidenz, aber 100 % der Inzidenz von kolorektalen Tumoren im Vergleich zu den Weißen (N. Schmeller, Prostatakarzinom; www.krebsinfo.de). In der Inzidenzrate bestehen geografische und ethnische Unterschiede. Niedrige Inzidenzraten haben Asiaten (z.B. Japan 5/100000) und Juden. Hohe Inzidenzraten hat die schwarze Bevölkerung (z.B. in Afrika und Jamaika). Im Mittelfeld liegen Schweden, Deutschland, Österreich und Nordamerika.

Das Risiko, am Prostatakarzinom zu sterben, ist bei der schwarzen Bevölkerung 2- bis 3-mal so hoch wie bei der weißen Bevölkerung. Bei der weißen Bevölkerung ist die Sterblichkeit ungefähr 10-mal so hoch wie bei den Asiaten.

1.5 Risikofaktoren

Der größte Risikofaktor ist das Alter. Daneben stellen äußere Einflüsse wie Sexualverhalten, Nikotinabusus, übermäßiger Verzehr von Milchprodukten und tierischen Fetten und insbesondere eine familiäre Disposition ein erhöhtes Erkrankungsrisiko dar. Dieses Risiko ist umso höher, je mehr Prostatakarzinomfälle in einer Familie zu finden sind. Es besteht ein etwa 2,2fach erhöhtes Risiko, auch ein Prostatakarzinom zu entwickeln, wenn Vater oder Bruder an Prostatakarzinom erkrankt waren, sogar 4,9faches Risiko, wenn beide am Prostatakarzinom erkrankt waren, und 10,9faches Risiko bei drei erkrankten Verwandten. Das Risiko ist auch abhängig vom Verwandtschaftsgrad der betroffenen Angehörigen. Sind der Vater oder der Bruder (Verwandtschaft 1. Grades) erkrankt, ist das eigene Prostatakarzinomrisiko höher, als wenn nur der Onkel, Cousin oder Großvater (Verwandtschaft 2. Grades) betroffen wären.

Das Erkrankungsalter der Angehörigen mit Prostatakarzinom spielt ebenso eine Rolle. Wird beispielsweise bei einem Bruder ein Prostatakarzinom schon mit 50 Jahren diagnostiziert, so steigt das Risiko um das 1,9fache gegenüber jemandem, bei dessen Bruder ein Prostatakarzinom erst im Alter von 70 Jahren festgestellt wurde. Wäre zusätzlich ein zweiter Bruder bereits mit 50 Jahren erkrankt, erhöht sich das relative Risiko weiter auf das 7,1fache des Referenzwertes (AUO-Manual, Albrecht, W; Flamm, J; et all.; 1992; Ergänzung; 1994).

2. Material und Methoden

Untersucht wurden 305 Fälle von radikalen Prostatektomien. Die Präparate stammen aus der Urologischen Uniklinik Würzburg. Sie wurden nach onkologischen Kriterien zugeschnitten. Es handelte sich um 8 bis 12 Scheiben, die jeweils seitengetrentt komplett eingebettet wurden.

Die Altersverteilung erstreckt sich von 35 bis 78 Jahre.

2.1. Auswertung

Quantitativ bzw. semiquantitativ wurden folgende Punkte ausgewertet:

1. Prozent der Karzinomfläche:

- die Fläche schwankte zwischen < 5 % bis > 75 %

2. Stadium

- pathologische Klassifikation nach pTNM mit Beurteilung der Ausbreitung des Primärtumors, der Lymphknoten und der Fernmetastasen

3. Malignität

- Beurteilung nach Wachstumsmuster (tubulär, kribriform, solide) und Kernatypien (gering, mäßig, hoch)

4. Gleason-Score

- Beurteilt wurden die zwei größten Areale in Bezug auf das Wachstum zwecks Einteilung des Gleason-Scores

5. Perineuralscheideninfiltration extrakapsulär

- Beurteilt wurde das Vorhandensein in zwei Abstufungen

6. Lymphangiosis

- Beurteilt wurde das Vorhandensein in zwei Abstufungen

7. Prostatistische intraepitheliale Neoplasie(PIN) gesamt

- Beurteilt wurde die gesamte PIN-Fläche, d.h. High- und Low-grade PIN

8. High-grade PIN gesamt

- Beurteilt wurde die High-grade PIN im Verhältnis zur Gesamt-PIN-Fläche

9. Atypische adenomyomatöse Hyperplasie(AAH)

- Beurteilt wurde das Vorhandensein und der Prozentsatz

10. Basalzellhypertrophie

- Beurteilt wurde das Vorhandensein in zwei Abstufungen

11. Adeno-Myomatöse-Prostatahyperplasie

- Beurteilt wurde das Vorhandensein in zwei Abstufungen

12. Prostatitis

- Beurteilt wurde das Vorhandensein in zwei Abstufungen

13. Resektionsstadium

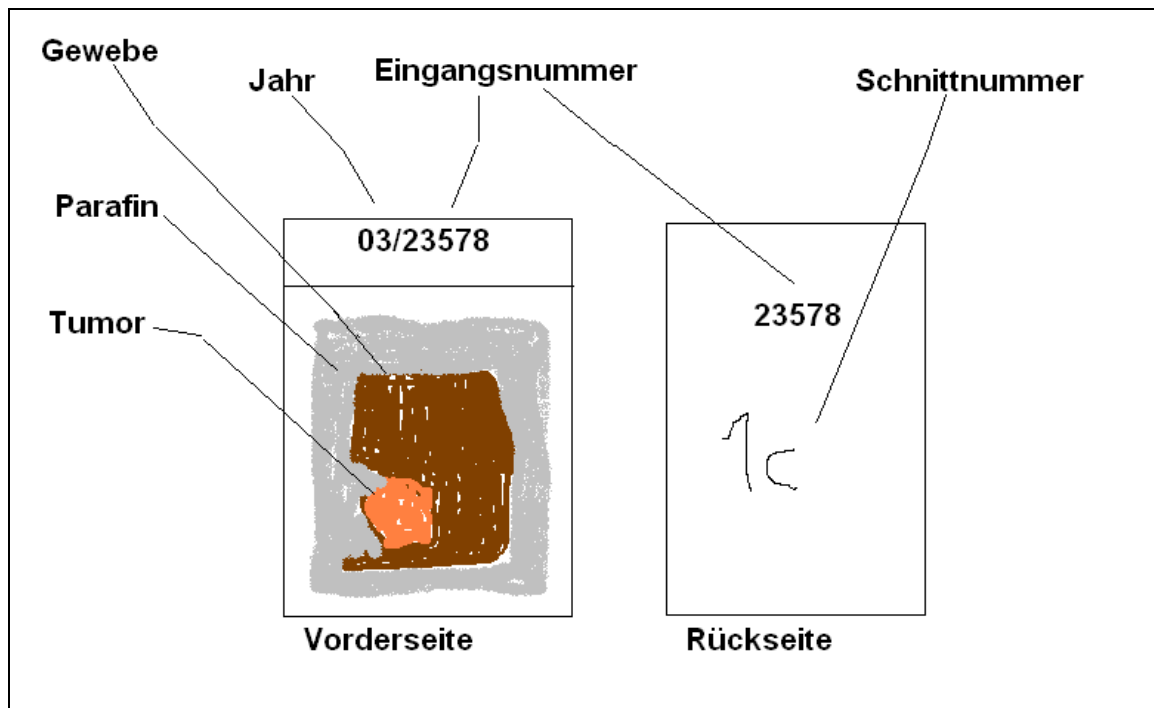
- Eingeteilt nach Tumorrestgewebe
- R0: weder makroskopischer noch mikroskopischer Tumorrest
- R1: mikroskopischer Tumorrest
- R2: makroskopischer Tumorrest

14. Lymphangiosis carcinomatosa

- Beurteilt wurde das Vorhandensein

2.2 Blöcke

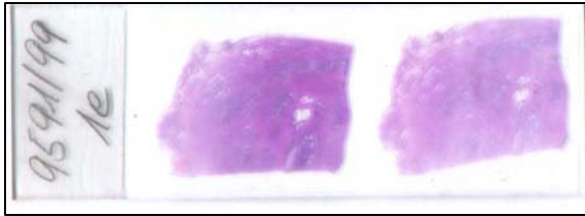
Die DNA, aus der die Genbank erstellt wurde, stammte aus in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitten. Diese wurden mit einer Eingangsnummer und dem dazugehörigem Datum versehen. Diese Kennzeichnung befand sich sowohl oben auf dem Block in Handschrift als auch auf Folie gedruckt auf der Hinterseite des Blockes. Des Weiteren wurde der zugehörige Schnitt handschriftlich vermerkt.



Diese Blöcke sind nach Jahr und Eingangsnummer geordnet.

2.3 Schnitte

Zu jedem eingebetteten Paraffinblock wurde ein Schnitt angefertigt. Die Schnitte wurden mit einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) angefärbt.



Um Schnitte anzufertigen zu können, muss Frischgewebe zuerst fixiert, dann eingebettet und geschnitten werden.

2.4 Vom Frischgewebe zum Präparat unter dem Mikroskop

2.4.1 Fixierung

Die Fixierung schließt zwei Vorgänge ein, nämlich die Konservierung und die Härtung. Bei der Konservierung werden alle Lebensvorgänge unterbrochen, so dass im Idealfall das konservierte Gewebe ein Momentanbild des Lebendigen darstellt.

Eine Härtung des Gewebes ist erforderlich, um die Anfertigung dünner Schnitte zu ermöglichen, die für Gewebeuntersuchungen sowohl im Licht- als auch im Elektronenmikroskop nötig sind.

2.4.2 Einbetten und Schneiden

Zur mikroskopischen Untersuchung muss das Gewebe in dünne Schnitte zerlegt werden. Für die Lichtmikroskopie sind Schnittstärken von 5-10 µm besonders geeignet. Als Einbettmittel hat sich vor allem Paraffin bewährt.

Zur Paraffineinbettung muss das Gewebe einer längeren Behandlung unterzogen werden, da Paraffin nicht wasserlöslich ist. Zunächst wird aus dem Gewebekblock das Fixierungsmittel mit Leitungswasser herausgewaschen. Paraffin ist in Alkohol nicht löslich. Deswegen wird der Alkohol durch Methylbenzoat und anschließend Benzol ausgewaschen, die das Gewebe auch gleichzeitig aufhellen. Anschließend kommt das Gewebe in einem Thermostaten in flüssiges Paraffin (Schmelzpunkt 58-60 °C). Dabei werden alle Lösungsmittel durch Paraffin ersetzt und alle Spalten durchtränkt. Das


Schneiden der Gewebelöcke erfolgte mit Präzisionsschneidegeräten, sogenannten Mikrotomen, die nach dem Prinzip eines Feinhobels arbeiten. Die Fälle dieser Arbeit wurden mit einem Mikrotom der Firma JUNG AG Heidelberg geschnitten. Bei diesem Modell handelte es sich um ein Schlittenmikrotom.

2.4.3 Färbung

Die meisten Zellen und Gewebe sind farblos. Zur lichtmikroskopischen Untersuchung muss das Gewebe daher histologisch gefärbt werden. Erst dadurch können verschiedene Gewebestandteile differenziert und beschrieben werden (Histologie, T. H. Schiebler; 4. Auflage; Springer Verlag).

2.5 Histologisches Grading nach Gleason

Gleason teilte das Prostatakarzinom nach dem Grad der Differenzierung und der Beziehung der Tumorzellverbände zum Stroma ein. Es gibt fünf verschiedene Gleason-Muster, wie folgende Zusammenstellung verdeutlicht:



| Muster | Drüsenform | Drüsengröße | Drüsenabstand | Herdgrenze | Stroma-invasion |
|--------|--|---|---|------------------------|--------------------------|
| 1 | Einzel, rund | Mittel | Dicht gepackt | Scharf | Minimal |
| 2 | Einzel, gerundet, variabler als in Muster 1 | Mittel | Bis zu 1 Drüsendurchmesser voneinander entfernt | Weniger scharf | Mild |
| 3 | Einzel, unregelmäßig oder papilläres oder kribriiformes Epithel | Klein, mittel, groß Mittel oder groß | Mehr als 1 Drüsendurchmesser voneinander entfernt Rundliche Massen mit glattem scharfem Rand | Schwer erkennbar | Mäßig Ausgedehnt |
| 4 | Verschmolzene glanduläre Massen oder "hypernephroid" | Klein | Verschmolzen | Unschärf infiltrierend | Stark |
| 5 | Einige winzige Drüsen oder Siegelringzellen oder wenige kleine Lumina in solidem Epithel, zentrale Nekrose | Klein | Anaplastische Epithelmassen Rundliche Massen und Stränge mit glatten scharfen Rändern | Unschärf infiltrierend | Sehr stark Ausgedehnt |

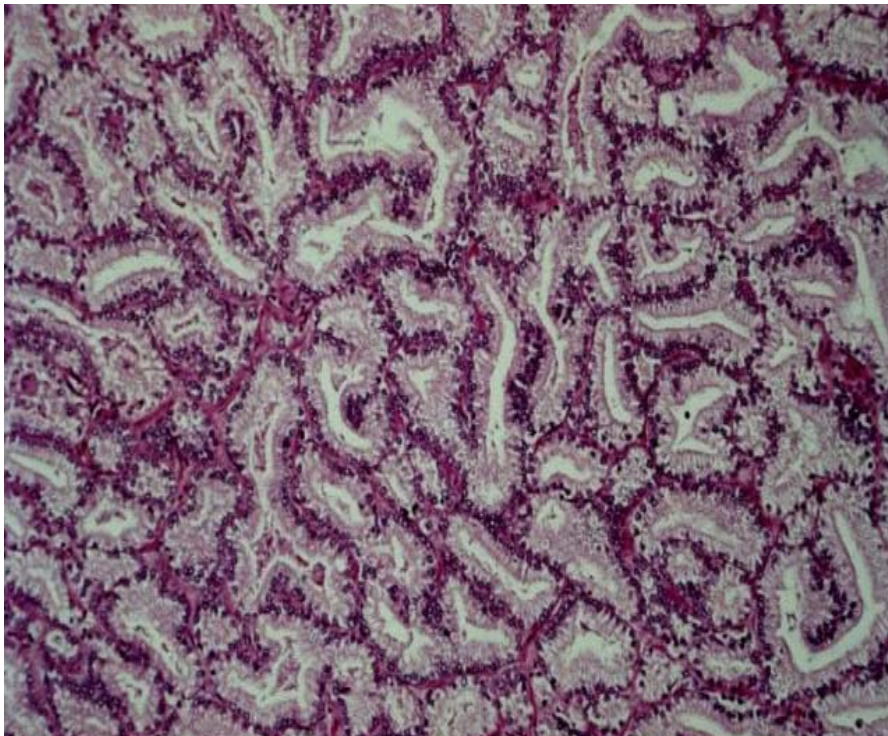
(Gleason DF, Mellinger GT and the Veterans Administration Cooperative Urological Research Group (1974); Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging; J Urol 111: 58-64)

Den Gleason-Score erhält man durch das Addieren des größten und des zweitgrößten Tumorareals mit Werten zwischen zwei und zehn.

Nachfolgend werden die Gleasongrundmuster mit Hilfe von histologischen Bildern einiger prägnanter Fälle verdeutlicht:

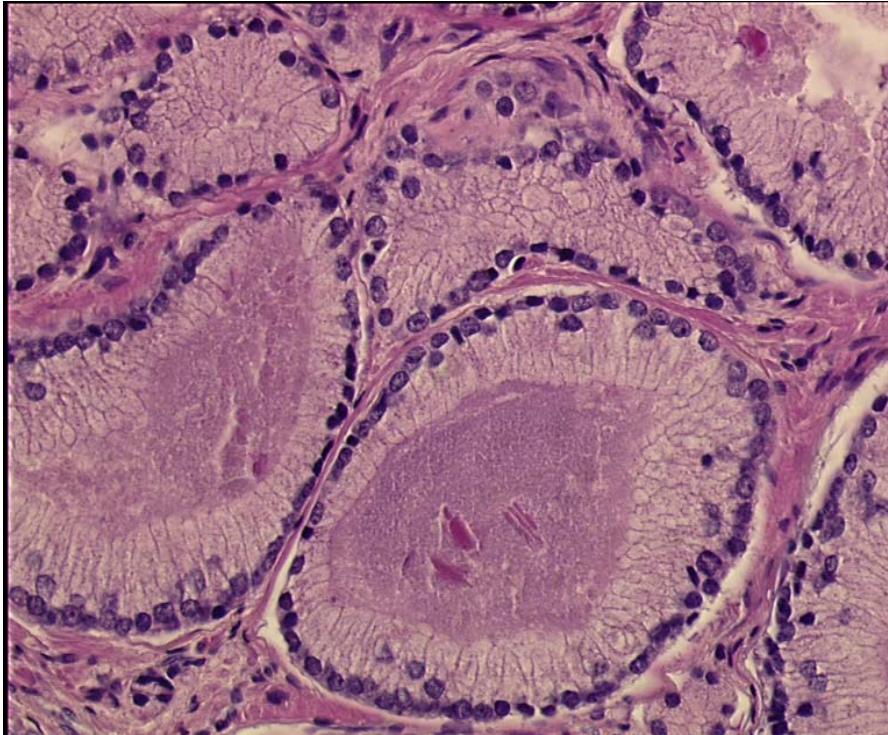
Gleason 1:

Dieses Grundmuster ähnelt noch stark der normalen Prostata. Es hat aber geringste Bedeutung, da es selten vorkommt und nur einen unbedeutenden prognostischen Nutzen hat. Es handelt sich um einzelne, runde, dichtgepackte, relativ scharf begrenzte Drüsenareale.



Gleason 2:

Hier sind die Drüsen etwas lockerer gelegen, teilweise ins umliegende Stroma einbrechend. Es handelt sich um relativ runde, jedoch im Vergleich zu Grundmuster 1 unruhigere Drüsen, die in locker begrenzten Arealen zu finden sind.



Gleason 3:

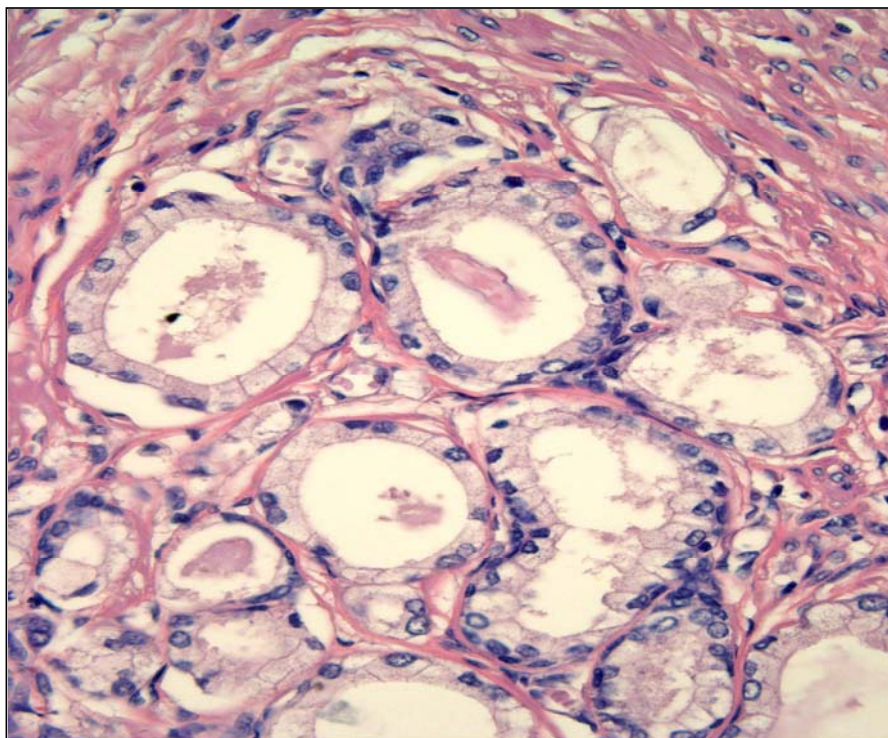
Dieses Grundmuster kommt am häufigsten vor und wird noch als gut differenziert eingestuft, da die Drüse noch eine normale Drüseneinheit darstellt, d.h. dass jede Zelle noch Teil einer rundlichen Drüse mit Lumen ist. Man sieht hier schon sehr deutlich, wie die Drüsen invasiv ins umgebende Stroma eindringen. Die Zellen sind dunkler und haben oft unterschiedliche Formen.

Man unterscheidet drei Unterformen dieses Grundmusters: 3A, 3B, 3C

3A: Es handelt sich um mittelgroße, einzelne Drüsen mit irregulärer Form, unterschiedlichem Abstand und infiltrierendem Saum

3B: Sehr ähnliches Wachstumsmuster wie 3a, doch kleine bis sehr kleine Drüsen, welche nicht gezwungenermaßen als Ketten oder schnurartig wachsen müssen.

3C: Papilläre und kribriforme Epithelien in glatten, runden Massen, teils zylinderförmig angeordnet. Keine Nekrosen.

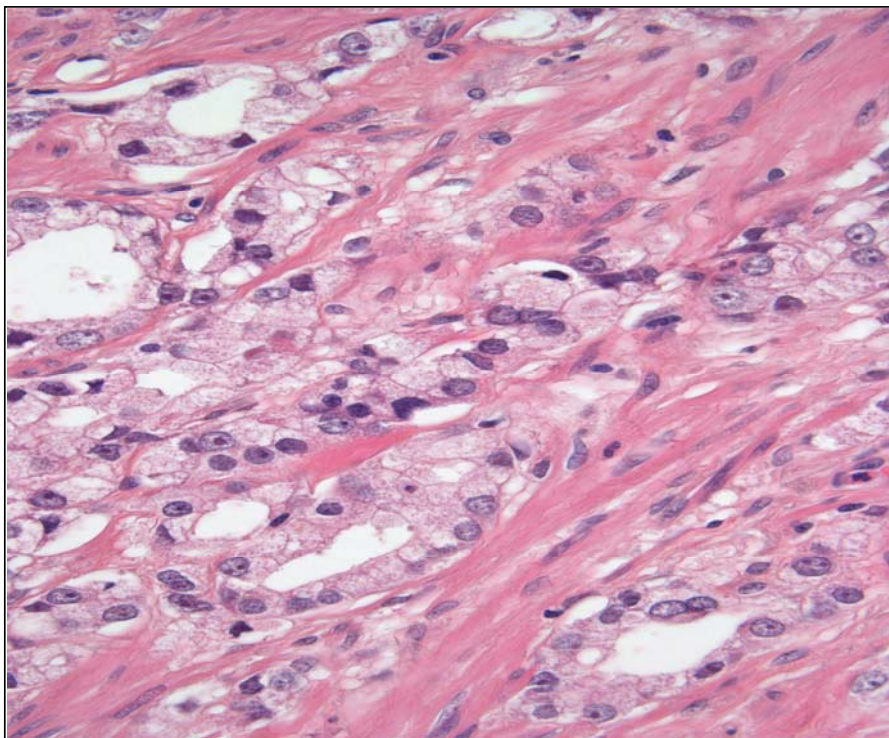


Gleason 4

Das ist wahrscheinlich der wichtigste Grundtyp, da er ziemlich oft vorkommt und sich die Patientenprognose normalerweise beträchtlich verschlechtert, wenn ein größerer Prozentsatz dieses Grundmusters vorhanden ist. Es ist hier ein großer Sprung zum Verlust der Zellarchitektur zu sehen. Das Karzinom ist kaum mehr differenziert. Zuerst sehen wir die Unterbrechung und sogar den Verlust der normalen Drüseneinheit. Meist wird dieses Grundmuster ausschließlich daran erkannt, dass es keine Fähigkeit mehr besitzt, eigenständige, separate Drüseneinheiten, jede mit einem Lumen, zu bilden. Jedes Karzinom hat seine eigene Art, ein Teil der normalen Prostata zu sein. Man kann sich dieses Grundstadium 4 als die Äste eines Baumes vorstellen, die vom Stamm, welcher aus den Grundstadien 1, 2, 3 besteht, in alle möglichen Richtungen ausstrahlen. Auch hier unterteilt man das Grundstadium noch mal in Unterstadien.

4A: Kleine, mittlere oder sogar große Drüsen, welche schnurartige, kettenartige oder zerstreute Massen bilden.

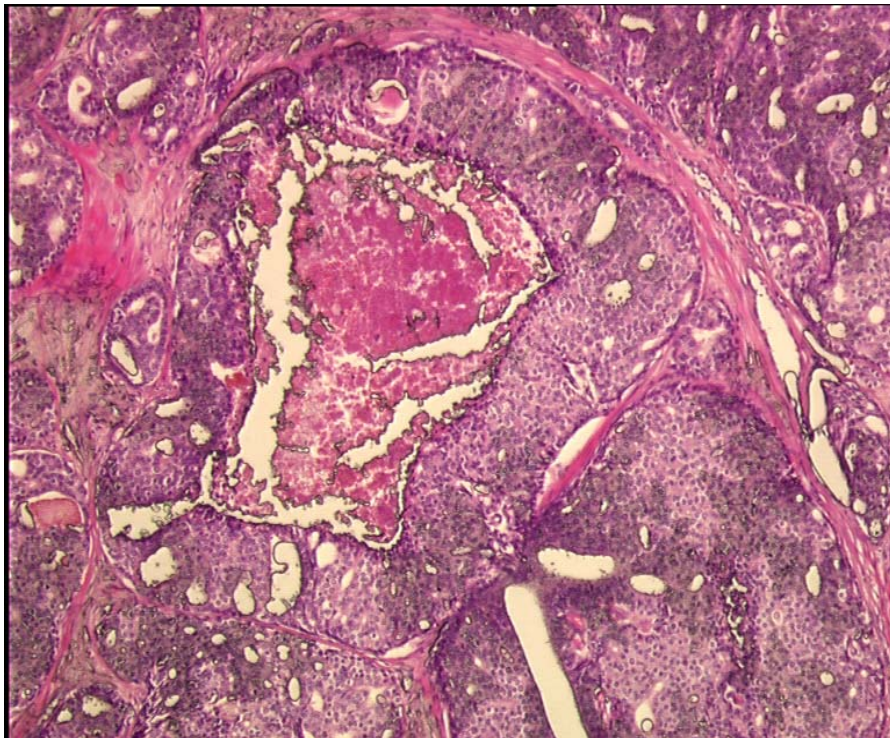
4B: Sehr ähnlich zu 4A, aber mit vielen klarzelligen, großen Zellen, welche manchmal an Nierenzellkarzinome erinnern.



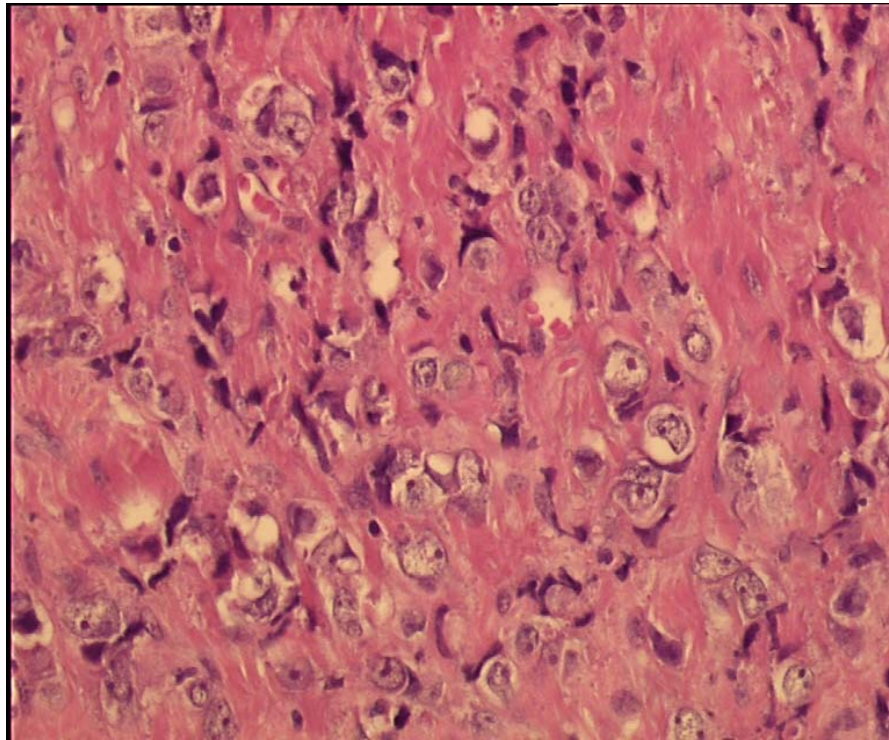
Gleason 5

Dieses Stadium ist bedeutsam, da es normalerweise einen weiteren wichtigen Schritt zur schlechteren Prognose darstellt. Seine Bedeutung wird dadurch eingeschränkt, dass es in der Bevölkerung weniger häufig vorkommt als Grundmuster 4. Es wird ganz selten in Frühstadien von Karzinomen gefunden. Die Drüsenarchitektur ist hier völlig verloren, die Zellen sind solide. Man sieht eine einzige Fläche schwarzer Zellkerne dicht an dicht. Man spricht hier oft von undifferenziert, da dieses Grundmuster sich nicht von undifferenzierten Karzinomen in anderen Organen unterscheidet.

5A: Papilläre und kribriforme Epithelien, welche in glatten, runden Massen wachsen, stärker solide sind als 3C und zentrale Nekrosen aufweisen.



5B: Anaplastisches Adenokarzinom, welches in zerstreuten Flächen wächst.



2.6 Histologisches Grading nach WHO und Mostofi

Im Vordergrund dieses Grading-Systems steht der histologische Differenzierungsgrad und der histologisch/zytologische Atypiegrad. Die Differenzierung entspricht der Bildung von Drüsen. Undifferenzierte Tumoren werden dem Verlust von Drüsen gleichgesetzt, wie dies z.B. bei kribriformen sowie soliden und trabekulären Tumoren der Fall ist. Der Begriff Anaplasie bzw. Atypie wird von Mostofi dahingehend charakterisiert, dass Variationen der Kerne und größere Formen sowie Veränderungen der Chromatinverteilung vorliegen. In einer Studie von Schroeder sind neben Form und Größe der Drüsen vor allem feinere Strukturen der Zellen bzw. Kerne wie z.B. Kernformen, Kerngrößen, Nukleolenhäufigkeit und Kern-Plasmarelation sowie Mitosehäufigkeiten berücksichtigt worden.

Das Grading nach Mostofi umfasst drei Grade:

Grad 1: Tumorbildende Drüsen: Die Tumorzellen weisen eine geringe Kernatypie auf.

Grad 2: Der Tumor bildet Drüsen, die in den Zellen eine mäßiggradige Kernatypie aufweisen. Die glandulären Strukturen sind wenig differenziert.

Grad 3: Der Tumor bildet Drüsen, jedoch mit einer deutlichen Kernatypie, z.T. sind keine Drüsen mehr vorhanden.

Hier entspricht der Grad 3-Tumor dem undifferenzierten Karzinom. Das Gradingssystem von Mostofi ist von der WHO übernommen worden. In der aktuellen TNM-Klassifikation gibt es zusätzlich einen Grad 3-4, als schlecht- bis undifferenzierten Tumor mit ausgeprägter Anaplasie.

Folgende Tabelle lässt noch eine feinere Graduierung zu:

| | | <u>Kernatypien</u> | | <u>Gleason-Muster</u> |
|-------------------|--------|--------------------|------|-----------------------|
| | gering | Mäßig | hoch | |
| <u>Wachstum</u> | | | | |
| Tubulär | 1b | 2a | 2b | 1-2 |
| Kribriform | 2a | 2b | | 3 |
| Vereinzelt/solide | | 3a | 3b | 4-5 |

2.7 Prostatistische intraepitheliale Neoplasie (PIN)

Definition:

Unter PIN versteht man dysplastische Veränderungen des sekretorischen Epithels in vorbestehenden Drüsen- und Gangstrukturen der Prostata. Ursprünglich wurde der Schweregrad der Dysplasie in drei Graden angegeben. Dies erwies sich aber als nicht reproduzierbar, so dass man heute zwischen low grade (Stadium 1 und 2) und high grade (Stadium 3) PIN unterscheidet. In der von mir geführten Tabelle sind HGPIN als prozentualer Anteil der GesamtPIN angegeben. Klinisch gesehen ist nur die HGPIN von Bedeutung, da sie häufig in Assoziation mit dem Prostatakarzinom auftritt. Definitionsgemäß zeigen HGPIN-Läsionen Kernveränderungen, wie sie gewöhnlich nur im gering differenzierten Prostatakarzinom beobachtet werden. Bei Tumoren, die aus HGPIN entstehen, dürfte es sich deshalb bereits schon initial um „high grade“ und klinisch relevante Karzinome handeln. Die klinische Bedeutung von HGPIN liegt in der hohen prädikativen Aussagekraft über das Vorliegen eines Karzinoms. Wird in einer tumorfreien Stanzbiopsie HGPIN diagnostiziert, dann findet man in mehr als 35 % der Fälle ein Prostatakarzinom in der nachfolgenden Biopsie.

Die HGPIN-Läsion zeigt gegenüber dem normalen Prostataepithel eine typische prämaligne Proliferationsstörung. Weniger als 10 % der proliferierenden Zellen finden sich im ehemaligen Proliferationskompartiment (Basalzellschicht). Die Proliferationszone verlagert sich nach luminal in das Differenzierungskompartiment (sekretorisches Epithel).

Folgende Gegenüberstellung zeigt die Korrelation zwischen PIN und Karzinom:

| | PIN | Prostatakarzinom |
|--------------------------|------------|-------------------------|
| Periphere Zone | 75 % | 70 % |
| Transitionalzone | 20 % | 25 % |
| Zentrale Zone | 5 % | 5 % |
| Stanzbiopsien | 1-30 % | Variabel |
| Transurethrale Resektion | <5 % | Bis 20 % |

Lokalisation

Die maligne Transformation des Prostataepithels kann in allen Abschnitten der Prostata auftreten, entsteht aber meistens in nicht-hyperplastischen duktuloazinären Strukturen der peripheren Zone. Nur 5 % bzw. 20 % der HGPIN-Läsionen finden sich in der zentralen Zone und in der Transitionalzone. Daher findet man die PIN entsprechend selten in TUR-Material (1-5 % der Fälle). (High grade prostatic intraepithelial neoplasia. The most likely precursor of prostate cancer; Bostwick DG; Cancer 75; 1823-1836; 1995).

Diagnostische Kriterien

Die Diagnose PIN stellt man in der Übersicht. Erst um seine Vermutung, dass es sich hier um HGPIN handelt, zu bestätigen, geht man in eine höhere Vergrößerung.

Bei stärkerer Vergrößerung betrachtet man die Basalzeldifferenzierung (einreihig: PIN oder intraduktales Prostatakarzinom, mehrreihig: Basalzellhyperplasie, keine: invasives Karzinom) und die Nukleolen (keine prominenten Nukleolen: LGPIN, prominente Nukleolen: HGPIN, invasives oder intraduktales Prostatakarzinom).

Um eine PIN als HGPIN zu klassifizieren, müssen folgende Kriterien erfüllt sein:

- Erhaltene Histoarchitektur

- ➔ Verschobene Kern-Plasma-Relation (basophileres Epithel im Vergleich zu benignen Drüsen)
- ➔ Kernpolymorphie (Anisonukleose, verschobene Kern-Plasma-Relation, kondensiertes und verklumptes Chromatin)
- ➔ Prominente Nukleolen
- ➔ Basalzellschicht strikt einreihig (lichtmikroskopisch oder immunhistochemisch)

2.8 Atypische adenomyomatöse Hyperplasie (AAH)

Die AAH umfasst mikroglanduläre Proliferationen, die eine gewisse Ähnlichkeit mit dem mikroazinären Prostatakarzinom aufweisen, aber stets innerhalb oder in Assoziation mit der adenomyomatösen Hyperplasie entstehen. Die Hauptlokalisation der AAH ist die Transitionalzone und die Apex-Region. Meist findet man die AAH daher bei der transurethralen Resektion (TUR) (bis zu 20 % der Fälle). In Stanzbiopsien wird die AAH selten diagnostiziert (<1 %). Falls die AAH tatsächlich eine prämaligne Potenz besitzt, dann ist sie ein möglicher Vorläufer des antero-zentralen Karzinoms der Transitionalzone. Für diese Hypothese spricht folgendes:

- ➔ Die AAH erfüllt einige diagnostische Kriterien des hellzelligen mikroazinären Prostatakarzinoms der Transitionalzone
- ➔ Die Inzidenz der AAH in tumorfreien Autopsie-Prostatae beträgt 15 % und ist doppelt so hoch in Autopsieprostatae mit latenten Prostatakarzinomen (30 %)
- ➔ Die AAH und das anterozentrale Prostatakarzinom entstehen in der gleichen Prostatazone
- ➔ Die Proliferationsindizes und AgNOR-Befunde in der AAH liegen quantitativ zwischen den Werten der glandulären Hyperplasie und des hochdifferenzierten Prostatakarzinoms

Im Gegensatz zur HGPIN-Läsion weist aber die AAH keine typische prämaligne Proliferationsstörung auf (Non-neoplastic diseases of the prostate; Epstein JI; Urologic surgical pathology; 1996); (Atypical adenomatous hyperplasia of the prostate: morphologic criteria for its distinction from well differentiated carcinoma; Bostwick DG; Hum Pathol 24;1993).

2.9 Prostatitis

Man unterscheidet zwischen bakterieller und nicht-bakterieller Prostatitis. Die bakterielle Prostatitis unterteilt man nochmals in akute und chronische Prostatitis.

Die akute bakterielle Prostatitis ist meist durch E.coli verursacht und führt zu einer geschwollenen und druckschmerzhaften Prostata.

Der chronisch-bakteriellen Prostatitis liegen oft rezidivierende Harnwegsinfekte zugrunde (Pathologie; Blümcke, S; Walter de Gruyter; Berlin; New York; 1995).

2.10 Adenomyomatöse Hyperplasie

Eine Zunahme androgen-rezeptiver Basalzellen führt daher zwangsläufig zu einer überschießenden Regeneration des sekretorischen Epithels und zur glandulären Hyperplasie. Die adenomyomatöse Hyperplasie entsteht durch ein hormonelles Ungleichgewicht zwischen zirkulierenden Androgenen und Östrogenen, das mit einem relativen Androgenmangel mit zunehmendem Alter einhergeht (Der Pathologe; Benigne mikroglanduläre Prostataläsionen, H. Bonkhoff, K. Remberger; 1998). Die erste Manifestation dieser hormonellen Dysregulation ist die Stromahyperplasie, die möglicherweise über stromale Wachstumsfaktoren die glanduläre Hyperplasie induziert. Im Tierexperiment wird die Höhe des Androgenspiegels durch die Androgenrezeptorexpression autoreguliert. Es ist daher anzunehmen, das auch beim Menschen der relative Androgenmangel zu einer Überexpression des Androgenrezeptors im Proliferationssystem (Basalzellschicht) führt und somit den Differenzierungswandel zum sekretorischen Zelltyp beschleunigt, was in der Hyperplasie des sekretorischen Epithels resultiert (Genetic Analysis of Prostatic Atypical Adenomatous Hyperplasia (Adenosis); Jennifer A. Doll; Xiaopei Zhu; American Journal of Pathology, Vol. 155, No. 3; September 1999).

2.11 Vorgehensweise für die Extraktion von DNA aus dem Gewebeblock

2.11.1 Mikroskopische Beurteilung und Kennzeichnung

Der zugehörige Schnitt des Gewebeblockes wurde unter dem Mikroskop nach oben genannten Kriterien betrachtet. Man suchte nun eine ausreichend große Karzinomfläche, die möglichst nur Karzinom enthielt und kennzeichnete sie mittels eines wasserfesten Stiftes auf dem Objektträger.

Im Vergleich dazu suchte man sich aus der gleichen Prostata einen Bereich mit nicht-neoplastischem Prostatagewebe und kennzeichnete auch diesen Bereich.

Durch Vergleich des Schnittes mit dem Gewebeblock lies sich die entsprechende Stelle des Karzinoms bzw. des nicht-neoplastischen Gewebes feststellen. Mittels eines Messers wurde nun auf dem Gewebeblock alles Gewebe um den gesuchten Bereich herum entfernt und der Block anschließend mittels Mikrotom in dünne Gewebescheiben geschnitten.

2.11.2 DNA-Extraktion aus Paraffinmaterial

Die per Mikrotom gefertigten dünnen Gewebeschnitte wurden nun in 1,5 ml Safelock-Caps gelegt und nach folgendem Schema extrahiert:

1. Man gab 600 μ l Xylol (Abzug!) auf das Gewebe, mindestens 45 sec., gut vortexen, anschließend 5 min. bei voller Drehzahl (14000/min.) zentrifugieren, danach Überstand abkippen.
2. Wiederholung der oberen Schritte.
3. Nochmalige Wiederholung der obigen Schritte, doch beim letzten Schritt muss der Überstand sorgfältig mit der Pipette entfernt werden.
4. 600 μ l 100 %igen Ethanol zugeben, mindestens 45 sec. vortexen, anschließend 5 min. bei voller Drehzahl zentrifugieren, nachher Überstand vollständig abnehmen.
5. Wiederholung von Schritt 4.
6. Offene Caps im Heizblock bei 53 °C solange trocknen lassen, bis sich das Gewebe von der Capwand löst oder beim Berühren mit einer sterilen Plastikpipettenspitze oder ähnlichem pulverig zerfällt.
7. Zugabe von 300 μ l Digestion-Verdaupuffer und 20 μ l Proteinase K, anschließend kurz vortexen
8. Caps bei 53 °C in einen Wärmeschrank oder, um den Verdauvorgang zu verkürzen, in einen Thermomixer stellen. Je nach Gewebe dauert der Verdau zwischen 12 Stunden und mehreren Tagen. Es muss eine homogene Lösung vorliegen. Sind nach 24 Stunden noch Gewebebrocken zu sehen, muss man nochmals 20 μ l Proteinase K zufügen.

9. 600 µl Phenol-Chloroform-Gemisch zufügen, 45 sec. gut vortexen, 5 min. bei voller Drehzahl zentrifugieren, anschließend obere Phase in ein neues beschriftetes Cap überführen.
10. Schritt 9 zwei Mal wiederholen.
11. 500µl Chloroform zugeben, 45 sec. gut vortexen, 5 min. bei voller Drehzahl zentrifugieren, anschließend obere Phase in ein neues, beschriftetes Cap.
12. Zugabe von 1/10 des Volumens 3M Natrium-Acetat.
13. Zugabe von 1 ml 100 %ig gekühltem Alkohol aus dem Kühlschrank, kurz vortexen.
14. Anschließend Cap bei -20 °C mindestens 2 Stunden in die Gefriertruhe, falls man Zeit hat auch länger, da dadurch die Ausbeute bei der Fällung verbessert wird.
15. 5 min. bei voller Drehzahl zentrifugieren.
16. Ethanol entfernen. Dabei aber nicht an das sich an der Seite abgesonderte, weißliche Pellet stoßen .
17. 1 ml 70 %iges gekühltes Ethanol zugeben. Cap leicht schütteln, nicht vortexen, anschließend 5 min. bei voller Drehzahl zentrifugieren.
18. Schritt 17 wiederholen.
19. 70 %iges Ethanol vollständig mittels Pipette entfernen, ohne an das Pellet zu stoßen.
20. Cap anschließend in den Wärmeblock bei 37 °C für 30 min mit offenem Deckel, dass der Alkohol verdampfen kann.
21. Zugabe von 50 bzw. 100 µl (je nach Größe des Pellets) destillierten Wassers, um die DNA zu lösen.
22. Cap kurz stehen lassen, dazwischen leicht schütteln, um DNA vollständig zu lösen.
23. Cap bei -20°C einfrieren.

2.11.3 Gelelektrophorese

Unter Elektrophorese versteht man die Wanderung von geladenen Molekülen im elektrischen Gleichstromfeld. Aufgrund unterschiedlicher Ladung und Masse bewegen sie sich mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten. Man trennt die DNA im Vergleich zu

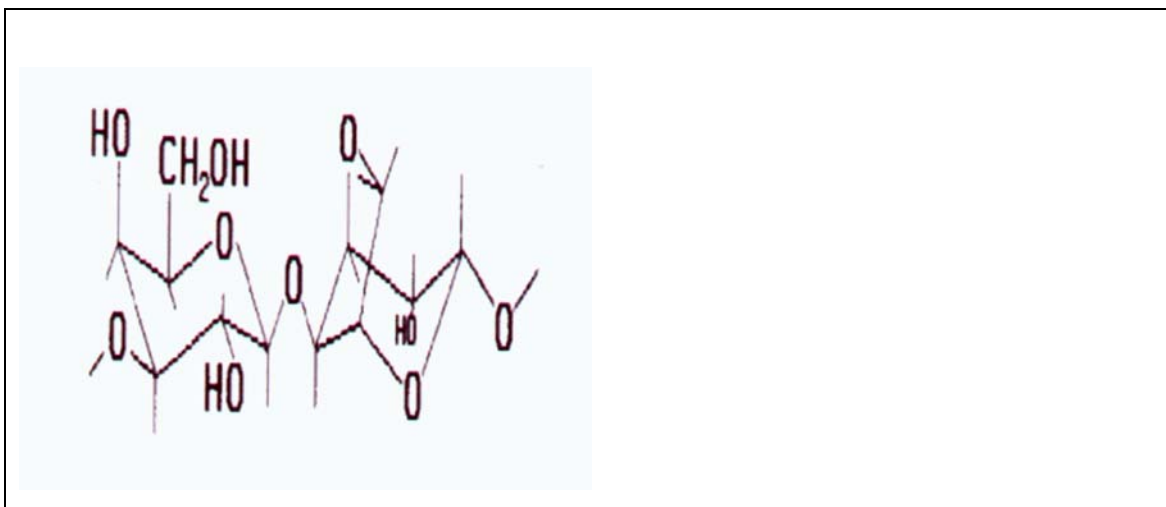
einem mitaufgetrenntem Standard. Die Elektrophorese wurde in diesem Fall in einem stabilisierendem Medium (Agarose-Gel) durchgeführt. Agarose ist ein Polysaccharid, das aus Meeresalgen gewonnen wird.



Bild:Meeresalgen

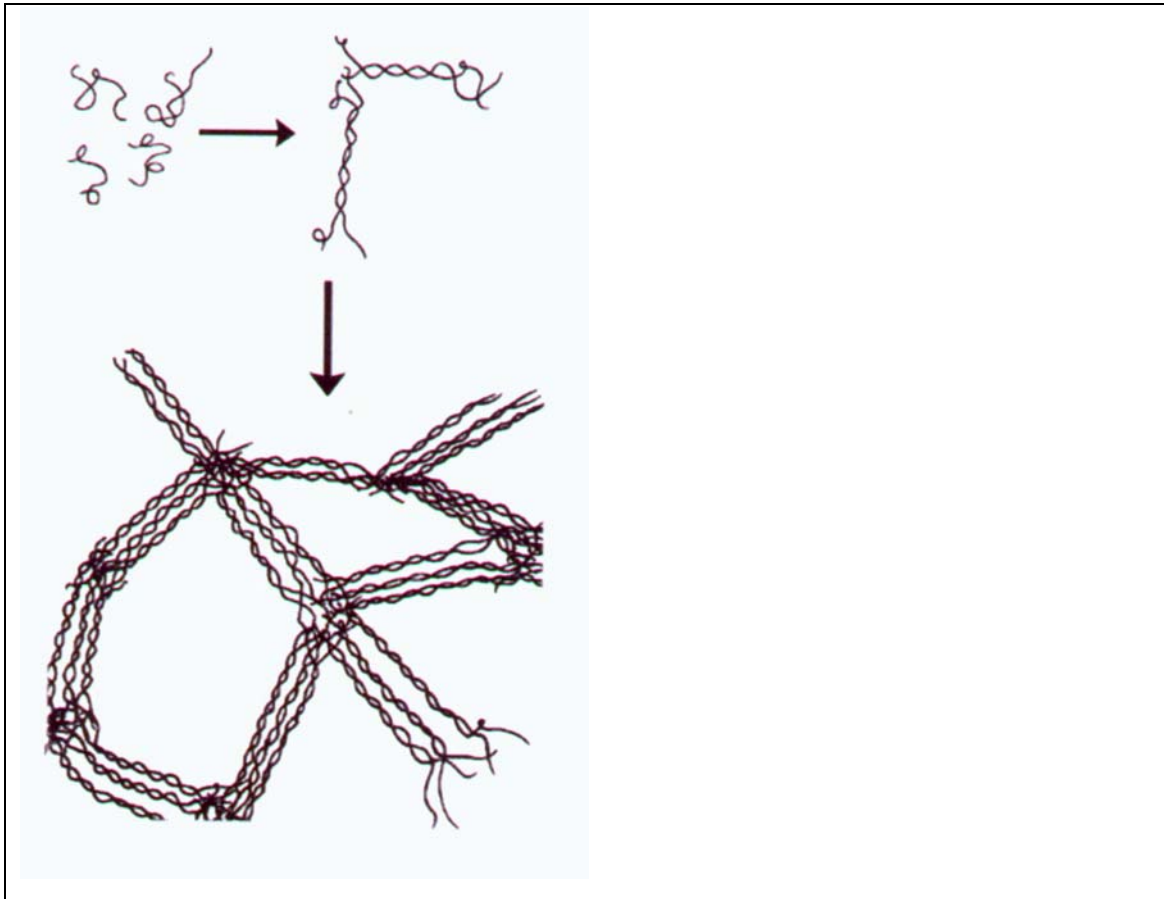
(aus:www.life.uiuc.edu/molbio/geldigest/agarose.html)

Seine Struktur zeigt viele Hydroxy-Gruppen (R-OH):



(aus:www.life.uiuc.edu/molbio/geldigest/agarose.html)

Es wird in den Elektrophoresepuffer aufgenommen und dann durch Erhitzen in Lösung gebracht. Die vielen Hydroxy-Gruppen ermöglichen die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen, wodurch die großporige Gelmatrix ihre Festigkeit erhält.



(aus: www.life.uiuc.edu/molbio/geldigest/agarose.html)

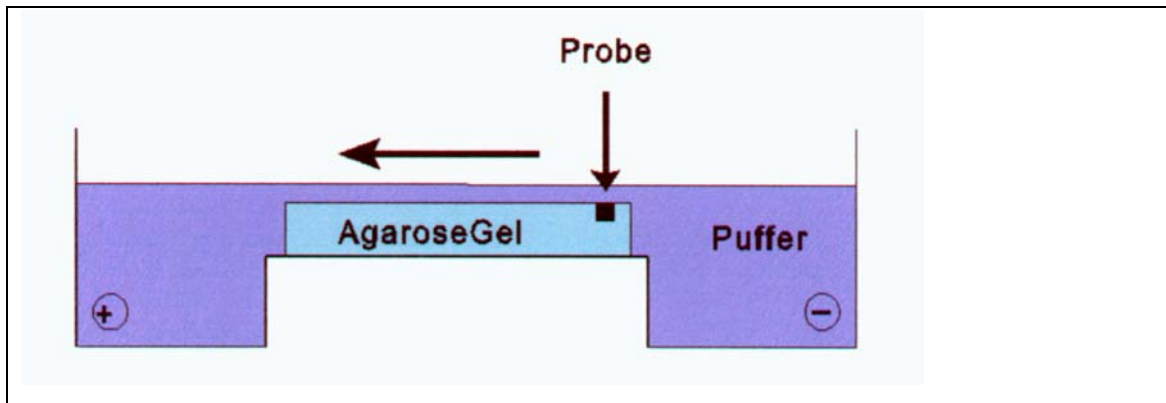
Während des Abkühlens lagern sich Doppelhelices parallel aneinander und binden dann an andere Helices.

Im elektrischen Feld wandern Nucleinsäuren zur Anode. Dies ist bedingt durch die negative Ladung. Die Agarosegelelektrophorese ist die gebräuchlichste Methode, um DNA-Fragmente von einer Größe von 0,1 bis 25 Kilobasen (kb) zu trennen. Eine Trennung durch einfache Elektrophorese ist aufgrund des annähernd gleichen Verhältnisses von Ladung und Masse nicht möglich. Man bestimmt nun über die Zusammensetzung des Gels die Größe der DNA-Moleküle, die sich damit trennen lassen.

In diesem Fall wurde ein etwa 0,5 cm dickes 1 %iges Agarosegel verwendet. Damit lassen sich DNA-Fragmente von etwa 0,5 bis 10 kb auftrennen.

Als Elektrophoresepuffer wurde 0,5x TBE (Tris-Borat-EDTA) verwendet. Man gibt für ein großes Gel 200 ml in einen Erlenmeyerkolben, dazu 2 g Agarose und erhitzt dieses Gemisch nun in der Mikrowelle, bis sich die Agarose vollständig gelöst hat. Man lässt

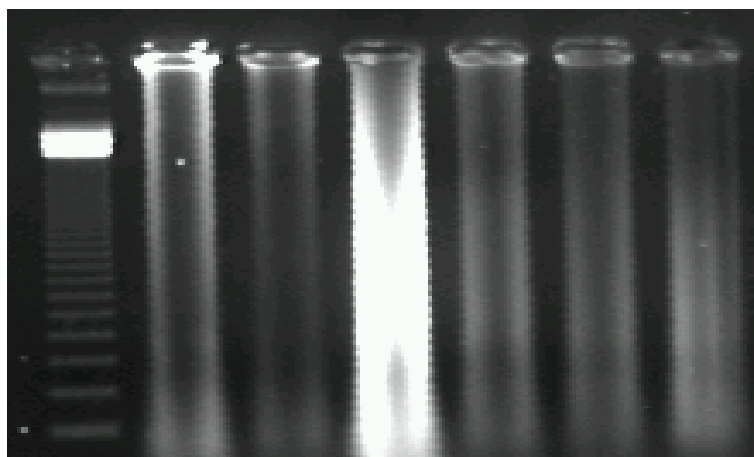
das Gemisch dann solange stehen, bis es auf 50 bis 60°C abgekühlt ist. Dann gibt man pro 100ml Gel 5 µg Ethidiumbromid dazu und achtet darauf, dass es gut gelöst ist. Nun kann man das Gel gießen und den Kamm sofort einhängen. Dadurch entstehen Taschen, in die man später, wenn das Gel fest ist, seine Proben aufträgt. Das gegossene und ausreichend gehärtete Gel wird nun in die Elektrophoresekammer gestellt.



(aus: <http://fachberatung-biologie.de/Themen/molgenetik/seitenprotbio/dnameth3gel.html>)

Die Pufferlösung in der Elektrophoresekammer sollte nicht mehr als 1mm über dem Gel stehen, da sonst die Spannung nicht durch das Gel geht. Das Gel wird bei einer konstanten Spannung von 120 V gefahren. Nach ca. 1,5 Stunden sind die Banden so weit getrennt, dass man das Gel auswerten kann. Unter UV-Licht kann das Gel fotografiert werden.

Hier nun so ein fotografiertes Gel:



2.12 Photometrische DNA – Messung

Zur Konzentrationsbestimmung der DNA wurde das Eluat auf eine Konzentration von 1:50 verdünnt. Davon wurde ein Volumen von 70 bis 100 µl entnommen und bei 260 nm photometrisch gemessen (Maßeinheit: OD). Vorher wurde zur Kontrolle eine Leerprobe mit Aqua bidest gemessen. 1 OD entsprach einer DNA-Konzentration von 50 µg / ml. Die resultierende DNA-Konzentration wurde nach folgender der Formel berechnet:

$$\text{OD} \times 2500 = \text{DNA-Konzentration in } \mu\text{g} / \mu\text{l}.$$

2.13 PCR

Die DNA wurde mittels PCR amplifiziert. Dafür wurden 1,5 µl der gelösten DNA benutzt. Pro Ansatz wurden 24 µl Mastermix, 0,5 µl von jedem Primer, 0,13 µl Taq Polymerase und 1,5 µl DNA pipettiert. Die erste PCR-Runde bestand aus einem initialen Denaturierungsschritt von 5 Minuten bei 94 °C, gefolgt von 40 PCR-Zyklen, wobei jeder Zyklus aus einem Denaturierungsschritt von 1 Minute bei 94° C, einem Annealingschritt von 1 Minute bei 60 °C und einem Elongationsschritt von 2 Minuten bei 72 °C bestand (5 min. beim letzten PCR-Zyklus).

2.14 Primer-Sequenzen für Mikrosatelliten-Analysen

| Marker | Chromosom | Gen | Primer-Sequenz |
|----------|--------------------------|------|---|
| D10s1765 | 10q23.31 | PTEN | CACTTACATAGTGCTTTCTGCG CAGCCTCCCAAAGTTGC |

D10S541PTEN_fw TTTTGAGTTTCTGTACCCATCCC 267 bp

D10S541PTEN_rv ATCCACAAGTAACAGAAAGCC

D8s1128 [8q24.12-q24.13](#) MYC_fw

AAACAATCAAAGGCCAGG 240-268 bp

D8s1128MYC_rv CCCATTGGAAACAGAGTTGA

D8s1720MYC_fw GTGCCACCTGCCTGAA 130-144 bp

D8S1720MYC_rv CCACTACCTATTTAGAGAGGCCA

D16S186 [16q22.1](#) CTCF_fw
GTTGGAGTCAAACAAGAGGAGAGC 130 bp
D16S186CTCF_rv AGGGTTACAATGCTAACCAGTGGTG
D16S496CTCF_fw GTTTGGCAGAAAGGCTACTT 216
D16S496CTCF_rv GCCCATCCTCCACTATCTAT

D20s740 [20q13.2](#) BORIS_fw GCAGAACCACAAAAAGTACTACTT
176 bp
D20S740BORIS_rv CTTCTTTCCCTCAGCATAAGG
D20s157BORIS_fw TAAACAATGCCAGTATGGCC 125 bp
D20s157BORIS_rv ATCAGGGACGGAACACTGA

- PTEN
- MYC
- CTCF
- BORIS

2.15 Statistik

Statistische Vergleiche zwischen nicht-abhängigen Gruppen wurden anhand des Mann-Whitney-U Tests durchgeführt. Korrelationen zwischen Variablen wurden mit dem Spearman's rank R Test durchgeführt und Assoziationen zwischen kategorischen Variablen wurden anhand des Yates korrigierten Chi-Square Tests durchgeführt (SPSS Software, Version 2000, SPSS Inc. Chicago, USA). Für alle Analysen wurde ein p-Wert von < 0.05 als signifikant angenommen.

2.16 Substanzen und Geräte

Substanzen:

- Xylol (Sigma, Deisenhofen)
- Ethanol (70 + 100 %) (Brüggemann alcohol)
- Proteinase K (Merck)

- Digestion-Verdaupuffer
- Phenol-Chloroform-Gemisch
- Chloroform
- Natrium-Acetat (3M)
- NaCl
- TrisCl
- EDTA
- SDS (0,5 %;10 %)
- bidestilliertes Wasser

Geräte:

- Eppendorf Caps (safe-lock, 1,5 ml)
- Pipette: GILSON PIPETMAN (1000 ml + 100 ml)
- Eppendorf Centrifuge 5415 C
- Biosan Thermoblock TDB -120
- Wärmeschrank oder
- Eppendorf Thermomixer compact
- Vortex: VORTEX-GENIE 2; Scientific Industries
- Tiefkühlschrank: PRIVILEG öko Energiesparer
- DNA-Konzentrationsmeßgerät

3. Ergebnisse

In der Einleitung erfuhr man allgemeine Informationen und interessante Zusammenhänge rund um das Prostatakarzinom. Der sich anschließende Material- und Methodenteil erklärte, was mit den Prostatektomiepräparaten geschieht, von der Operation über den Zuschnitt bis zu der Histologie und DNA- Gewinnung.

Der nun folgende Ergebnisteil zeigt und erläutert die sich aus Histologie und Molekularbiologie ergebenden Befunde.

Die Datenbank enthält 311 Fälle. Es wurden also Prostatektomiepräparate von 311 Personen betrachtet und ausgewertet. Leider sind nicht immer alle Daten, die man in die Datenbank aufnehmen wollte, erhebbbar gewesen. So kommt es vor, dass bei manchen Diagrammen und Tabellen die Gesamtzahl unter 311 Fällen liegt.

3.1 Altersverteilung

Das Prostatakarzinom zählt zu den häufigsten Krebserkrankungen des alternden Mannes. Es wurde daher untersucht, wie sich das Alter über die verschiedenen Tumorstadien verteilte. Man ermittelte für jedes pT-Stadium die Anzahl der Fälle, das Alter mit dem Minimum und Maximumwert, den Median und den Man-Whitney-U-Test.

Insgesamt waren bei 297 Fällen Altersangaben vorhanden, die ausgewertet werden konnten. Das Alter schwankte von 35 bis 78 Jahren mit einem Median von 65 Jahren.

Tab.3.1.1: Altersverteilung der untersuchten Karzinomfälle über alle pT – Stadien

| pT - Stadium | Anzahl (%) | Alter [Median] | Man-Whitney-U-Test |
|--------------|------------|----------------|---------------------------------|
| pT2a | 26 (9 %) | 35-75 [64] | p > 0,05 für alle Altersgruppen |
| pT2b | 12 (4 %) | 55-78 [64] | |
| pT2c | 99 (33 %) | 48-77 [65] | |
| pT3a | 112 (38 %) | 43-77 [64] | |
| pT3b | 48 (16 %) | 44-76 [67] | |

Auch für jeden Gleason-Score wurde die Anzahl der Fälle pro jeweiligen Gleason-Score, die Altersverteilung, der Median und der Man-Whitney-U-Test ermittelt.

Das Alter schwankte von 35 bis 78 Jahren mit einem Median von 66 Jahren.

Tab.3.1.2: Altersverteilung der untersuchten Karzinomfälle über alle Gleason-Scores

| Gleason-Score | Anzahl (%) | Alter [Median] | Man-Whitney-U-Test |
|---------------|------------|----------------|---------------------------------|
| 4 | 2 (1%) | 71+72[71,5] | p > 0,05 für alle Altersgruppen |
| 5 | 10 (3%) | 55-71 [62] | |
| 6 | 64 (22%) | 36-76 [64] | |
| 7 | 144 (49%) | 44-78 [65] | |
| 8 | 48 (16%) | 35-76 [65] | |
| 9 | 17 (6%) | 43-76 [65] | |
| 10 | 9 (3%) | 54-76 [67] | |

3.2 Histopathologische Befunde

In diesem Kapitel geht es darum zu zeigen, wie sich die untersuchten Fälle histopathologisch darstellten. Untersucht und dargestellt in Tabellen und Diagrammen wurden die Stadienverteilung, die Gleason-Score Verteilung, der Lymphknotenstatus, der Resektionsstatus, die High-Grade prostatiche intraepitheliale Neoplasie und die Prostatitis.

3.2.1 Stadienverteilung

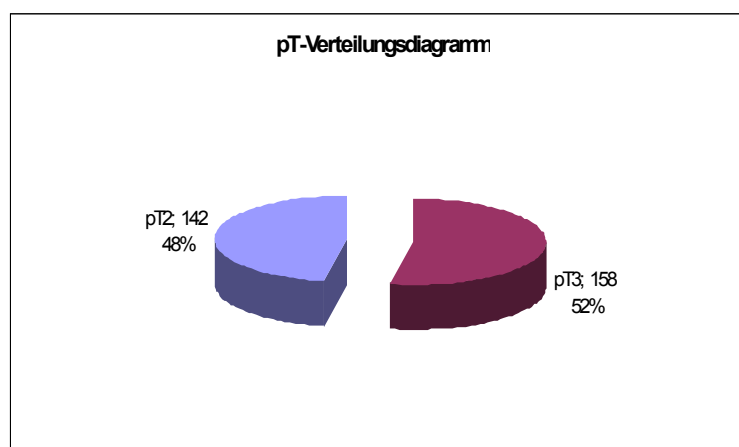
Je nachdem, wie weit ein Tumor wächst und sich ausdehnt, unterteilt man ihn in verschiedene Stadien (pT1 – pT4). Unser Kollektiv enthielt nur das pT2- und das pT3-Stadium. Die pT2-Stadien sind noch organbegrenzt und wachsen lokal infiltrierend in der Prostata. Die pT3-Fälle dagegen wachsen organüberschreitend und durchbrechen die Prostatakapsel.

Von 300 untersuchten Fällen lagen 142 im pT2- und 158 im pT3-Stadium. Die Fälle verteilten sich also ziemlich gleichmäßig auf die Stadien, so dass 48 % der Fälle im pT2-Stadium und 52 % im pT3-Stadium lagen. Der leichte Trend zu den pT3-Stadien lässt sich eventuell dadurch erklären, dass Patienten erst bei Symptomen im Urogenitaltrakt zum Arzt gingen und sich bei der folgenden Prostatektomie dann ausgedehntere Stadien zeigten.

Tab. und Abb.3.2.1.1: Darstellung der Aufteilung aller untersuchten Prostatakarzinome nach dem pT – Stadium

Anzahl der Fälle in % nach Stadien verteilt: Blau: pT2-Fälle,
Burgund: pT3-Fälle

| pT2 | pT3 |
|-----|-----|
| 142 | 158 |

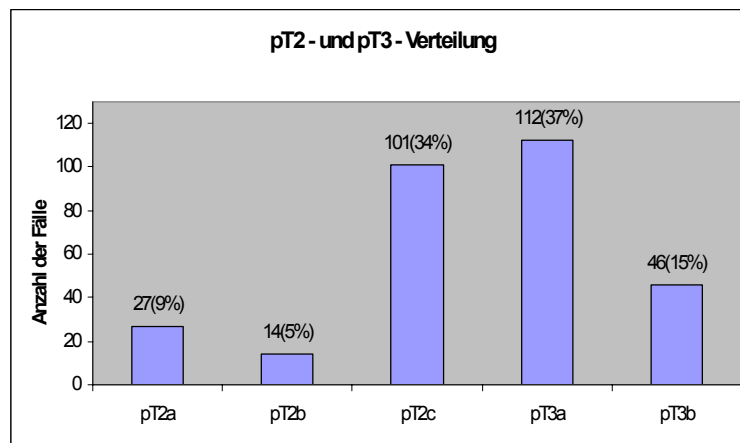


In der nun folgenden Darstellung wurden die Fälle der pT-Stadien nochmals in Unterstadien aufgeschlüsselt, um noch genauere Analysen über die Ausbreitung machen zu können. pT2a heißt, dass die Hälfte oder weniger als die Hälfte eines Prostatalappens vom Tumor befallen ist, bei pT2b ist mehr als die Hälfte eines Prostatalappens befallen und bei pT2c ist der Tumor in beiden Prostatalappen nachweisbar. Beim pT3a-Stadium breitet sich der Tumor extrakapsulär ein- oder beidseitig aus. pT3b bedeutet, dass der Tumor eine oder beide Samenblasen infiltriert. Die pT2-Fälle setzten sich zusammen aus 27 pT2a-, 14 pT2b- und 101 pT2c - Fällen. Hier sah man deutlich das Überwiegen der pT2c-Fälle mit 34%. Betrachtete man die Zahlen isoliert für die pT2-Fälle, so war bei fast drei viertel aller pT2-Fälle der Tumor in beiden Prostatalappen nachweisbar (pT2c).

Die pT3-Fälle setzten sich zusammen aus 112 pT3a- und 46 pT3b-Fällen. So breiteten sich mehr als ein Drittel extrakapsulär aus (pT3a) und mehr als ein Achtel aller Fälle infiltrierten die Samenblasen (pT3b).

Tab.und Abb.3.2.1.2: Darstellung der prozentualen Verteilung aller untersuchten Prostatakarzinome im pT2- und pT3-Stadium
Anzahl der Fälle (Prozent) für jedes pT-Stadium

| pT2a (%) | pT2b (%) | pT2c (%) | pT3a (%) | pT3b (%) |
|----------|----------|-----------|-----------|----------|
| 27 (9%) | 14 (5%) | 101 (34%) | 112 (37%) | 46 (15%) |



3.2.2 Gleason-Scores

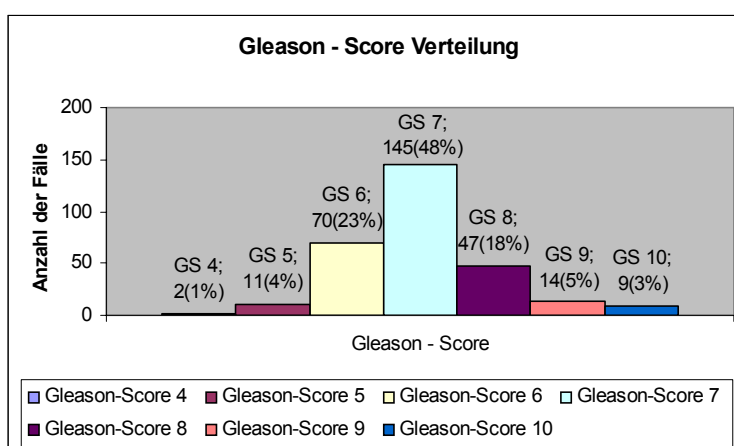
Der Gleason-Score ist ein wichtiger Prognosemarker für das Prostatakarzinom

Hier erfolgt eine Zusammenschau über die Häufigkeitsverteilung der verschiedenen Gleason-Scores in unserem Kollektiv. Es wurden Daten von 298 Fällen ermittelt, von denen Karzinome mit einem Gleason-Score 7 knapp 50 % aller Tumoren ausmachten, gefolgt von Gleason-Score 6 mit 23 %. Es kamen nur zwei Fälle mit Gleason-Score 4 vor. Insgesamt lagen 88 % der Fälle im Bereich zwischen Gleason-Score 6 und Gleason-Score 8.

Tab. und Abb. 3.2.2.1: Darstellung der Gleason-Score Verteilung aller untersuchten Prostatakarzinome

Darstellung von Anzahl und Prozent im jeweiligen Gleason-Score (GS).

| Gleason-Score 4 | Gleason-Score 5 | Gleason-Score 6 | Gleason-Score 7 | Gleason-Score 8 | Gleason-Score 9 | Gleason-Score 10 |
|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|
| 2 | 11 | 70 | 145 | 47 | 14 | 9 |



In der nachfolgenden Darstellung wurde untersucht, wie sich die jeweiligen Gleason-Scores über die Tumorstadien verteilten, um Aufschlüsse darüber zu erhalten, inwieweit der Gleason-Score mit der Tumorausdehnung korreliert.

Alle Fälle mit Gleason-Score 4 und 5 waren im Tumorstadium pT2 und somit zu 100 % organbeschränkt. Tumoren mit Gleason-Score 6 waren zu 2/3 der Fälle noch organbeschränkt. Unter den Tumoren mit Kapselüberschreitung war eine Infiltration der Samenblasen selten (5 %). Bei Tumoren mit Gleason-Score 7 überwog erstmals der Anteil von Tumoren mit Organüberschreitung (53,8 %) und 23 % der organüberschreitenden Karzinome zeigten eine Infiltration der Samenblasen. Tumoren mit einem Gleason-Score 8 waren in der weit überwiegenden Zahl der Fälle (79 %) organüberschreitend und zeigten in etwa 45 % eine Infiltration der Samenblasen. Der Trend zu höherer Tumorausdehnung zeigte sich auch bei Fällen mit Gleason-Score 9,

wobei nur noch 28,6 % der Fälle organbeschränkt (pT2c) waren und 71,4 % im Bereich pT3a und pT3b lagen, also kapselüberschreitend waren.

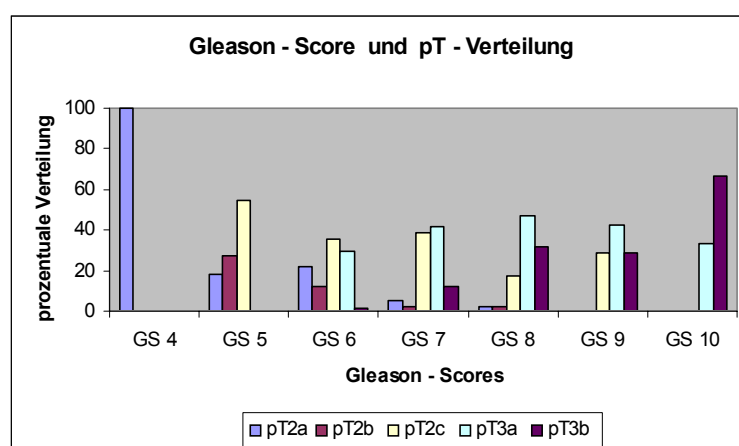
Alle Gleason-Score 10 Fälle waren kapselüberschreitend, wobei bei zwei Dritteln der Fälle die Samenblase befallen war (pT3b).

Statistisch korrelierten Tumorstadium und Gleason-Score hochsignifikant miteinander ($p < 0,0001$; Korrelationskoeffizient 0,467124; Spearman-Test).

Tab. und Abb.3.2.2.2: Zusammenschau über die Verteilung der pT-Stadien der untersuchten Prostatakarzinome in allen Gleason-Scores:

Blau: pT2a; rot: pT2b; gelb: pT2c; grün: pT3a; lila: pT3b; GS: Gleason-Score; Balken für jedes Stadium von GS 4 – GS 10 aufgetragen

| Gleason-Score | pT2a (%) | pT2b (%) | pT2c (%) | pT3a (%) | pT3b (%) |
|---------------|-----------|----------|-----------|-----------|-----------|
| 4 (n=2) | 2 (100,0) | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 0 (0,0) |
| 5 (n=9) | 2 (18,2) | 3 (27,3) | 6 (54,5) | 0 (0,0) | 0 (0,0) |
| 6 (n=68) | 15 (22,1) | 8 (11,8) | 24 (35,3) | 20 (29,4) | 1 (1,4) |
| 7 (n=145) | 8 (5,5) | 3 (2,1) | 56 (38,6) | 60 (41,4) | 18 (12,4) |
| 8 (n=47) | 1 (2,1) | 1 (2,1) | 8 (17,1) | 22 (46,8) | 15 (31,9) |
| 9 (n=14) | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 4 (28,6) | 6 (42,8) | 4 (28,6) |
| 10 (n=9) | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 3 (33,3) | 6 (66,7) |



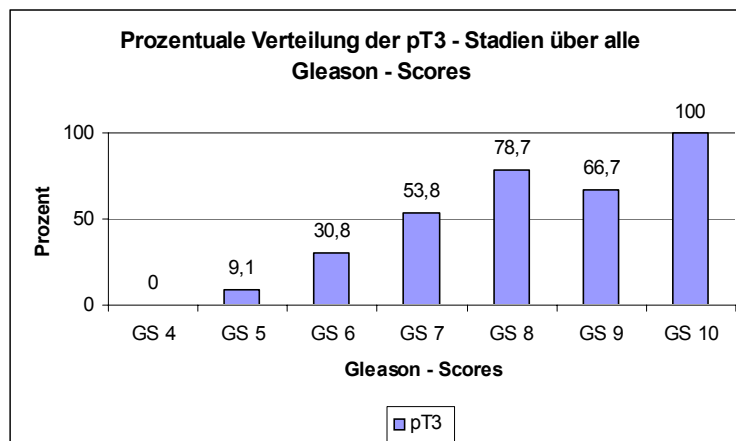
Bei der prozentualen Verteilung der pT3-Stadien über alle Gleason-Scores sah man deutlich den steigenden Anteil an pT3-Fällen mit zunehmendem Gleason-Score. Ab

Gleason-Score 7 lagen immer mehr als 50 % der Fälle im pT3-Bereich. Auch hier zeigte sich sehr schön die Korrelation zwischen Gleason-Score und Tumorstadium. Deutlich wird auch die prognostische Bedeutsamkeit des Gleason-Scores, da man ab Gleason-Score 7 in über 50 % mit einer Kapselüberschreitung rechnen kann.

Tab. und Abb.3.2.2.3: Prozentualer Anteil von Tumoren mit organüberschreitendem Wachstum

Blau: pT3-Fälle über alle Gleason-Scores mit Prozentangabe

| Gleason-Score | pT3 (%) |
|---------------|-----------|
| GS 4 | 0 (0,0) |
| GS 5 | 1 (9,1) |
| GS 6 | 21 (30,8) |
| GS 7 | 78 (53,8) |
| GS 8 | 37 (78,7) |
| GS 9 | 10 (66,7) |
| GS 10 | 9 (100,0) |



3.2.3 Lymphknotenstatus

Insgesamt waren bei 49 Fällen (15,8 %) zum Zeitpunkt der Operation Lymphknotenmetastasen nachweisbar (Lymphknotenstadium pN1). Der histologische Nachweis eines Lymphgefäßeinbruches im Bereich des Primärtumors korrelierte hierbei

hochsignifikant ($p < 0,00001$) mit dem simultanen Nachweis von Lymphknotenmetastasen zum Zeitpunkt der Operation.

Tab. und Abb. 3.2.3.1: Zusammenhang von Lymphangiosis und Lymphknotenstatus bei Prostatakarzinomen

Lymphangiosis (+): Lymphangiosis vorhanden; Lymphangiosis (-): keine Lymphangiosis vorhanden; pN0: keine Lymphknotenmetastasen; pN1: Lymphknotenmetastasen vorhanden

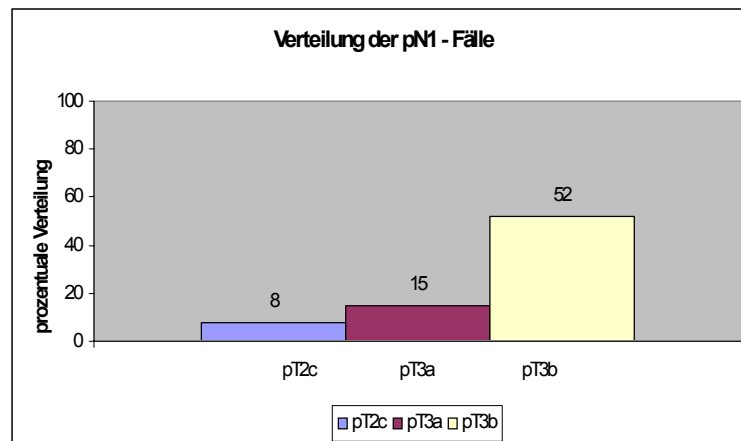
| | Lymphangiosis (+) | Lymphangiosis (-) |
|--------------------|---------------------|---------------------|
| pN0 (n=178) | 24 | 154 |
| pN1 (n=34) | 18 | 16 |
| Σ | 42 | 170 |

Die Häufigkeit von Lymphknotenmetastasen zum Zeitpunkt der Operation wurde außerdem auch hochsignifikant von der Ausdehnung des Primärtumors beeinflusst ($p < 0,00001$, $R = 0,42$, Spearman-Test). Die unten dargestellte Abbildung zeigte deutlich die Tendenz, dass mit zunehmender Tumorausdehnung auch die Zahl der Lymphknotenmetastasen zunimmt.

Tab. und Abb. 3.2.3.1: Stadienverteilung von Prostatakarzinomen mit Lymphknotenmetastasen zum Zeitpunkt der Operation (pN1)

| pT2c (%) * | pT3a (%) * | pT3b (%) * |
|------------|------------|------------|
| 8 (8 %) | 17 (15 %) | 24 (52 %) |

* Prozent von Fällen mit pN1 bezogen auf die Gesamtzahl aller Fälle mit dem jeweiligen pT - Stadium



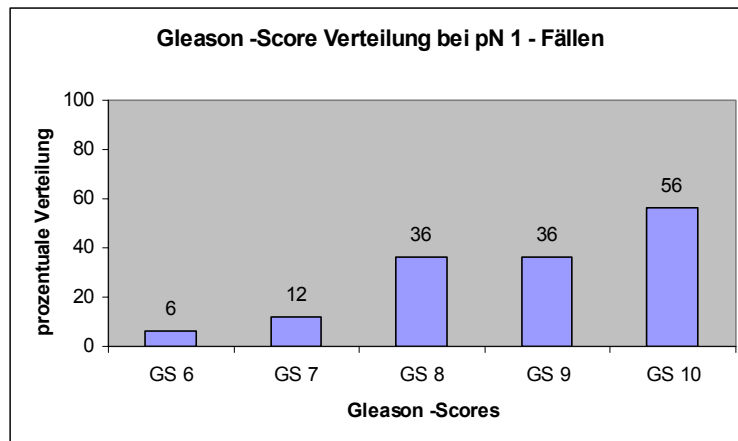
Um zu überprüfen, ob die Tumordifferenzierung (ausgedrückt durch den Gleason-Score) mit der Häufigkeit von Lymphknotenmetastasen korrelierte, wurde untersucht, wie sich die Lymphknotenmetastasen (pN1) über die verschiedenen Gleason-Scores verteilen. Auch hier zeigte sich eine hochsignifikante statistische Korrelation ($p < 0,0001$, $R = 0,36$, Spearman-Test), indem z.B. bei Tumoren mit einem Gleason-Score 6 nur in 6 % Lymphknotenmetastasen beobachtet wurden gegenüber 56 % bei Tumoren mit einem Gleason-Score von 10.

Tab. und Abb. 3.2.3.2: Verteilung der Gleason-Scores bei Prostatakarzinomen mit Lymphknotenmetastasen zum Zeitpunkt der Operation (pN1).

GS: Gleason-Score; Prozentuale Verteilung der pN1-Fälle bezogen auf den jeweiligen Gleason-Score

| Gleason-Score 6 (%)* | Gleason-Score 7 (%)* | Gleason-Score 8 (%)* | Gleason-Score 9 (%)* | Gleason-Score 10 (%)* |
|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|
| 4 (6 %) | 18 (12 %) | 17 (36 %) | 5 (36%) | 5 (56 %) |

* Prozent von Fällen mit pN1 bezogen auf die Gesamtzahl aller Fälle mit dem jeweiligen Gleason-Score



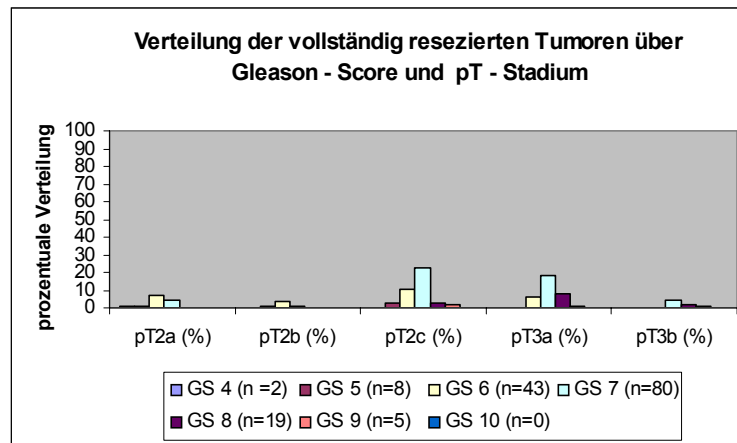
3.2.4 Resektionsstatus

In einem weiteren Schritt wurde untersucht, inwieweit Gleason-Score, Tumorstadium und der Nachweis extraprostatischer Perineuralscheideninfiltrate die Resezierbarkeit eines Tumors beeinflussen. Von 300 Fällen mit bekanntem Resektionsstatus waren 157 Fälle ohne histologischen Tumorrest (R0) und 63 Fälle mit histologischem Tumorrest (R1). Daneben war in 30 Fällen die vollständige Resektion wahrscheinlich, wenn auch histologisch nicht zu beweisen (fraglich R0), sowie in 50 Fällen die vollständige Resektion histologisch unwahrscheinlich, wenn auch nicht definitiv zu beweisen (fraglich R1). Sowohl der Gleason-Score ($p < 0,00001$, $R = 0,31$, Spearman-Test) als auch das Tumorstadium ($p < 0,00001$, $R = 0,40$, Spearman-Test) korrelierten hochsignifikant mit dem Resektionsstatus: Tumoren mit hohem Gleason-Score und hohem Tumorstadium wurden häufiger unvollständig (R1) reseziert als Tumoren mit niedrigem Score und Tumorstadium. Ein gleichartiger Trend zeigte sich auch bei den wahrscheinlich vollständig bzw. den fraglich unvollständig resezierten Tumoren.

Die 157 Fälle mit vollständiger Resektion teilten sich wie folgt auf (Prozentangaben bezogen auf alle 157 R0 resezierten Fälle):

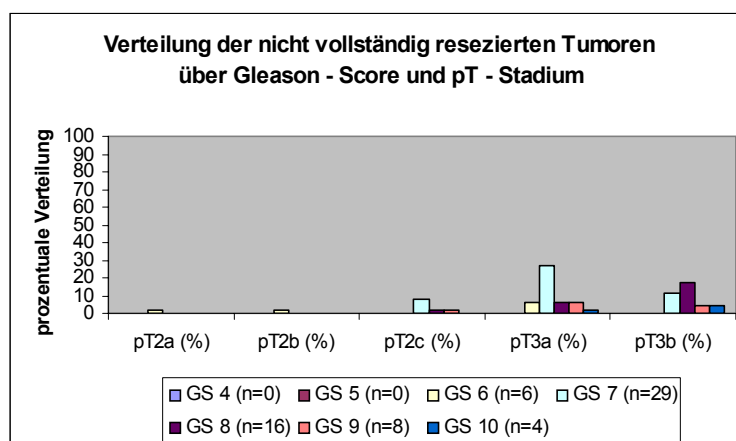
| Gleason-Score | pT2a (%) | pT2b (%) | pT2c (%) | pT3a (%) | pT3b (%) |
|-----------------|----------|----------|-----------|-----------|----------|
| 4 (n=2) | 2 (1,3) | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 5 (n=8) | 2 (1,3) | 2 (1,3) | 4 (2,5) | 0 | 0 |
| 6 (n=43) | 11 (7) | 5 (3,2) | 17 (10,8) | 10 (6,4) | 0 |
| 7 (n=80) | 7 (4,5) | 2 (1,3) | 36 (22,9) | 28 (17,9) | 7 (4,5) |
| 8 (n=19) | 0 | 0 | 4 (2,5) | 12 (7,6) | 3 (1,9) |

| | | | | | |
|------------------|---------|---------|-----------|-----------|---------|
| 9 (n=5) | 0 | 0 | 3 (1,9) | 1 (0,6) | 1 (0,6) |
| 10 (n=0) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Σ (n=157) | 22 (14) | 9 (5,7) | 64 (40,8) | 51 (32,5) | 11 (7) |



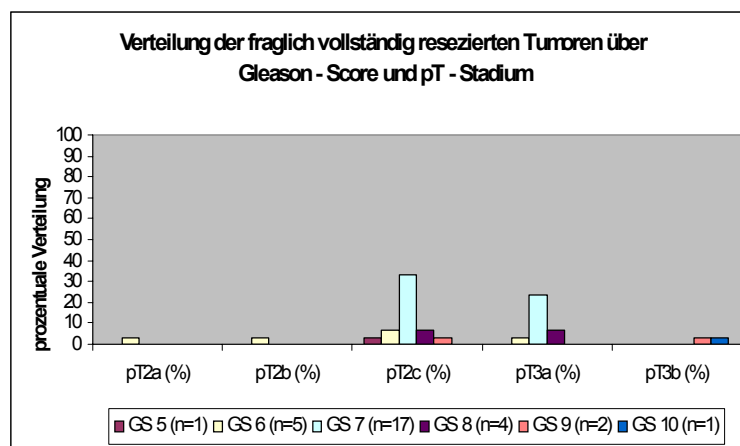
Die 63 Fälle mit unvollständiger Resektion teilten sich wie folgt auf (Prozentangaben bezogen auf alle 63 R1 resezierten Fälle):

| Gleason-Score | pT2a (%) | pT2b (%) | pT2c (%) | pT3a (%) | pT3b (%) |
|-----------------|----------|----------|----------|-----------|-----------|
| 4 (n=0) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 5 (n=0) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 6 (n=6) | 1 (1,6) | 1 (1,6) | 0 | 4 (6,3) | 0 |
| 7 (n=29) | 0 | 0 | 5 (7,9) | 17 (27) | 7 (11,1) |
| 8 (n=16) | 0 | 0 | 1 (1,6) | 4 (6,3) | 11 (17,5) |
| 9 (n=8) | 0 | 0 | 1 (1,6) | 4 (6,3) | 3 (4,8) |
| 10 (n=4) | 0 | 0 | 0 | 1 (1,6) | 3 (4,8) |
| Σ (n=63) | 1 (1,6) | 1 (1,6) | 7 (11,1) | 30 (47,6) | 24 (38,1) |



Die 30 Fälle mit fraglich vollständiger Resektion teilten sich wie folgt auf (Prozentangaben bezogen auf alle 30 fraglichen R0 resezierten Fälle):

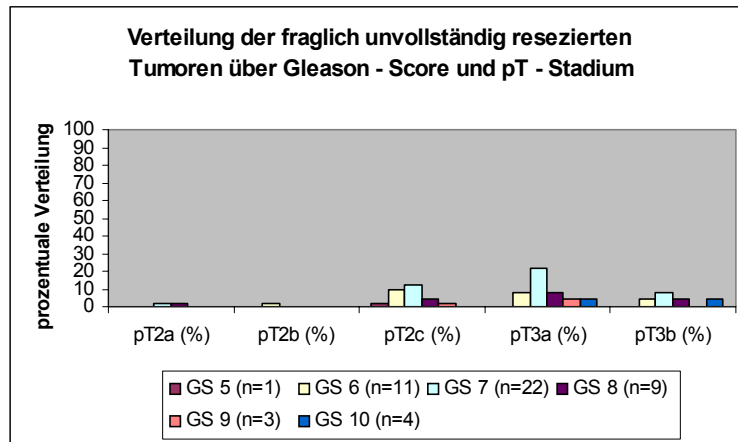
| Gleason-Score | pT2a (%) | pT2b (%) | pT2c (%) | pT3a (%) | pT3b (%) |
|-----------------|----------|----------|-----------|-----------|----------|
| 4 (n=0) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 5 (n=1) | 0 | 0 | 1 (3,3) | 0 | 0 |
| 6 (n=5) | 1 (3,3) | 1 (3,3) | 2 (6,7) | 1 (3,3) | 0 |
| 7 (n=17) | 0 | 0 | 10 (33,3) | 7 (23,3) | 0 |
| 8 (n=4) | 0 | 0 | 2 (6,7) | 2 (6,7) | 0 |
| 9 (n=2) | 0 | 0 | 1 (3,3) | 0 | 1 (3,3) |
| 10 (n=1) | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 (3,3) |
| Σ (n=30) | 1 (3,3) | 1 (3,3) | 16 (53,4) | 10 (33,3) | 2 (6,7) |



Die 50 Fälle mit fraglich unvollständiger Resektion teilten sich wie folgt auf (Prozentangaben bezogen auf alle 50 fraglichen R1 resezierten Fälle):

| Gleason-Score | pT2a (%) | pT2b (%) | pT2c (%) | pT3a (%) | pT3b (%) |
|---------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| 4 (n=9) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 5 (n=1) | 0 | 0 | 1 (2) | 0 | 0 |
| 6 (n=11) | 0 | 1 (2) | 5 (10) | 4 (8) | 1 (4) |
| 7 (n=22) | 1 (2) | 0 | 6 (12) | 11 (22) | 4 (8) |
| 8 (n=9) | 1 (2) | 0 | 2 (4) | 4 (8) | 2 (4) |
| 9 (n=3) | 0 | 0 | 1 (2) | 2 (4) | 0 |

| | | | | | |
|-----------------|-------|-------|---------|---------|--------|
| 10 (n=4) | 0 | 0 | 0 | 2 (4) | 2 (4) |
| Σ (n=50) | 2 (4) | 1 (2) | 15 (30) | 23 (46) | 9 (18) |



3.2.5 High-Grade Prostatistische interepitheliale Neoplasie (HGPIN)

Die HGPIN ist eine Vorläuferläsion des Prostatakarzinoms. Um Rückschlüsse zu erhalten, ob HGPIN mit bestimmten Subtypen von Karzinomen (etwa einem bestimmten Differenzierungsgrad) vorrangig assoziiert ist, wurde die Ausdehnung von HGPIN semiquantitativ analysiert. In etwa 40 % der Fälle (71 von 172 Fällen) belegte HGPIN mehr als 10 % der untersuchten Gewebsfläche. Solche ausgedehnten HGPIN-Areale kamen aber in allen Tumorstadien und bei allen Tumorgraduierungen in etwa gleicher Häufigkeit (jeweils etwa 50 % der Fälle) vor. Eine bevorzugte Assoziation zwischen HGPIN mit einem bestimmten Tumorstadium oder Malignitätsgrad fand sich daher nicht.

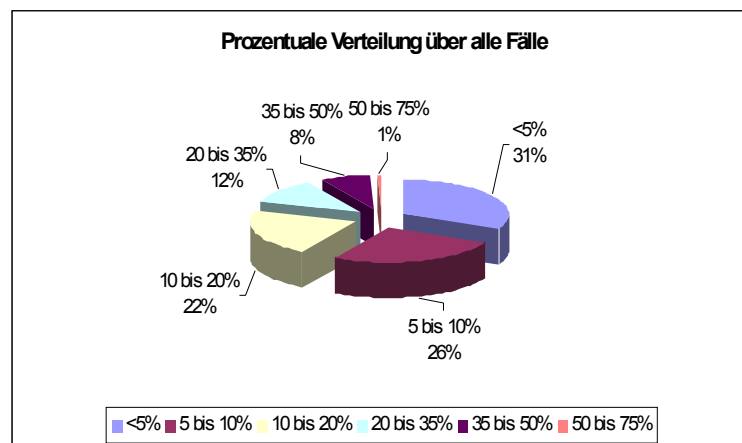
Folgende Zusammenschau zeigt, wie sich die HGPIN über alle Tumorstadien verteilte.

In der ersten Zeile der Tabelle stehen die abgestuften Prozentwerte, in der zweiten Zeile die Anzahl der Fälle je Prozentstufe.

Tab. und Abb. 3.2.5.1: Prozentuale HGPIN-Verteilung über alle Fälle

Hellblau: < 5 %; violett: 5 – 10 %; gelb: 10 – 20 %; grün: 20 – 35 %; violett: 35 – 50 %; rot: 50 – 75 %; dunkellbau: > 75 %

| HGPIN | <5% | 5 bis 10% | 10 bis 20% | 20 bis 35% | 35 bis 50% | 50 bis 75% | >75% |
|------------------|-----|-----------|------------|------------|------------|------------|------|
| Anzahl der Fälle | 55 | 46 | 37 | 20 | 13 | 1 | 0 |



Folgende Tabelle zeigte nochmals detaillierter den Zusammenhang zwischen Tumorstadien und HGPIN. Bei den Stadien 3a und 3b kamen allerdings sehr ausgedehnte Tumoren vor, so dass die Beurteilung der Ausdehnung der HGPIN in einigen Fällen nicht mehr sinnvoll möglich war. Gleichartige Befunde lagen auch bei wenig differenzierten (Gleason-Score 9 + 10) Tumoren vor, erklärbar durch die oben beschriebene starke Korrelation zwischen Tumorausdehnung und -differenzierung.

Tab. 3.2.5.2: Prozentuale HGPIN-Verteilung über alle Tumorstadien

Prozentuale Verteilung der HGPIN, aufgeteilt in < 5 %, 5 – 10 %, 10 – 20 %, 20 – 35 %, 35 – 50 %, 50 – 75 % und > 75 % über die Tumorstadien (pT2a, pT2b, pT2c, pT3a, pT3b)

| Tumorstadium | % HGPIN | | | | | | |
|--------------|---------|------|-------|-------|-------|-------|-----|
| | <5 | 5-10 | 10-20 | 20-35 | 35-50 | 50-75 | >75 |
| 2a (n =11) | 5 | 1 | 4 | | 1 | | |

| | | | | | | | |
|-------------------|----|----|----|---|---|---|---|
| 2b (n =11) | 4 | 1 | 4 | 1 | 1 | | |
| 2c (n =50) | 16 | 10 | 7 | 9 | 7 | 1 | |
| 3a (n =81) | 20 | 30 | 18 | 9 | 4 | 0 | 0 |
| 3b (n =19) | 10 | 4 | 4 | 1 | 0 | 0 | 0 |

Tab. 3.2.5.3: Prozentuale HGPIN – Verteilung über Gleason-Scores

Prozentuale Verteilung der HGPIN, aufgeteilt in < 5 %, 5 – 10 %, 10 – 20 %, 20 – 35 %, 35 – 50 %, 50 – 75 % und > 75 % über Gleason-Scores (4, 5, 6, 7, 8, 9, 10)

| Gleason-Score | % HPGIN | | | | | | |
|------------------|---------|------|-------|-------|-------|-------|-----|
| | <5 | 5-10 | 10-20 | 20-35 | 35-50 | 50-75 | >75 |
| 4 (n =1) | 1 | | | | | | |
| 5 (n =9) | 3 | 1 | 2 | 2 | 1 | | |
| 6 (n =44) | 11 | 9 | 15 | 5 | 3 | 1 | |
| 7 (n =81) | 31 | 27 | 9 | 7 | 7 | | |
| 8 (n =27) | 6 | 6 | 10 | 4 | 1 | | |
| 9 (n =6) | 3 | 0 | 1 | 1 | 1 | | |
| 10 (n =5) | 2 | 1 | 2 | 0 | 0 | | |

3.2.6 Prostatitis

Die Prostatitis ist eine Entzündungsreaktion der Prostata. Es gibt verschiedene Studien, die die Korrelation zwischen der Prostatitis und dem Prostatakarzinom untersuchten. Am ehesten besteht ein Zusammenhang zwischen der akuten Prostatitis und dem Prostatakarzinom. Andere Ansätze sehen die Grundlage der Prostatitis in einem Immundefekt. So traten nach Schädigung des MRS - 1 Gen's, welches Zelldetritus und geschädigte Zellen beseitigt, vermehrt Prostatakarzinome auf (Prostate cancer linked to infection; Gamble, Simon; Isaacs, William, Nature; 2002). Auch die Ribonuclease L (RNASEL) ist ein Gen, von dem vermutet wird, dass es als Tumor-Suppressor-Gen wirkt und so auf die Apoptose und die Zellregulation eingreift (Genetic analysis of the RNASEL gene in hereditary, familial, and sporadic prostate cancer; Wiklund, F; Jonsson, B. A.; Brookes, A. J.; Clin. Cancer Res.; 2004).

Daher war es von Interesse zu eruieren, ob es auch in diesem Kollektiv einen Zusammenhang gibt zwischen Prostatitis und Prostatakarzinom.

Von den 243 Fällen hatten 135 keine Anzeichen einer Prostatitis. 88 Fälle zeigten eine leichte und 20 Fälle eine schwere Prostatitis.

Es zeigte sich also, dass 44,4 % des gesamten Kollektivs an Prostatakarzinomfällen Prostatitis zeigte, wobei 36,2 % unter einer leichten und 8,2 % unter einer schweren Prostatitis litten.

Es konnte keine Tendenz festgestellt werden, dass die Prostatitis mit den besonders aggressiven Tumoren assoziiert ist. Auch ein Zusammenhang mit dem Stadium und der Tumorfläche konnte nicht gezeigt werden.

3.3 Einfluss histologischer Tumorparameter auf die Rezidivhäufigkeit

Da unter 203 Patienten mit bekannten klinischen Verläufen nur 2 Todesfälle zu beobachten waren, wurde ein postoperativer Wiederanstieg des PSA als Surrogatmarker für ein Tumorrezidiv verwendet, um Aussagen bezüglich der prognostischen Relevanz der untersuchten Parameter treffen zu können.

Untersucht wurden Einfluss des Tumorstadiums, der Tumorgraduierung (Gleason-Score), das Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen und der Resektionsstatus auf das Auftreten von Rezidiven.

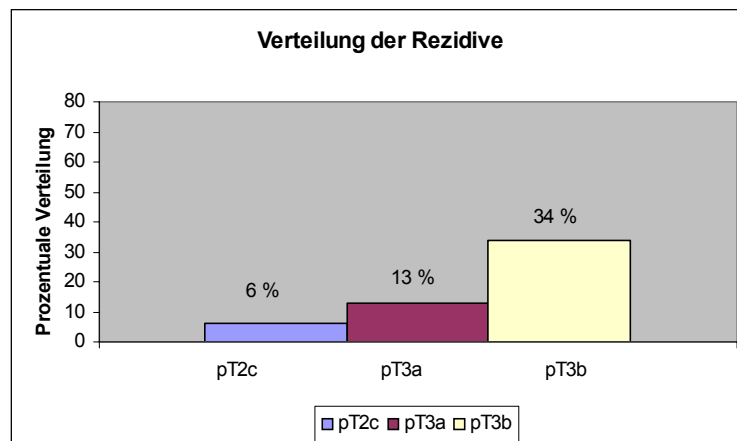
3.3.1 Einfluss des pT-Stadiums auf die Rezidivhäufigkeit

Unter 215 Fällen mit bekanntem Follow-up traten insgesamt 28 Rezidive auf. Diese setzten sich aus 4 pT2c-, 10 pT3a- und 14 pT3b-Fällen zusammen. Es überwogen mit 50 % die pT3b-Fälle im Kollektiv der Rezidive. 36 % lagen im Stadium pT3a und nur 14 % im Stadium pT2c. So rezidierten ca. ein Drittel aller pT3b –Fälle (34 %), ein Achtel aller pT3a – Fälle (13 %) und nur ein Sechszehntel aller pT2c – Fälle (6 %). Es zeigte sich der Trend, dass die Tumoren mit großer Tumorausdehnung auch häufiger zu Rezidiven neigten.

Abb. und Tab. 3.3.1.1: Verteilung der Rezidive über alle pT-Stadien.

Aufteilung aller Fälle nach pT-Stadium, Anzahl, mediane Nachbeobachtungsdauer und Anzahl von Rezidiven

| pT-Stadium | Anzahl (n) | Nachbeobachtungsdauer (mths) [Median] | Anzahl Rezidive (% Gesamtzahl Rezidive) |
|------------|------------|---------------------------------------|---|
| pT2a | 21 | 18-82 [61] | 0 |
| pT2b | 8 | 41-76 [64] | 0 |
| pT2c | 67 | 12-89 [60] | 4 (14) |
| pT3a | 78 | 12-95 [55] | 10 (36) |
| pT3b | 41 | 12-99 [50] | 14 (50) |



Die Abbildung 3.3.1.2 zeigt die zeitabhängige Rezidivhäufigkeit in Korrelation mit dem Tumorstadium. Wie zu erwarten war, stieg die Häufigkeit der Rezidive mit der Tumorausdehnung. Die Rezidivhäufigkeit von Tumoren mit Kapseldurchbruch lag zwischen der von organbeschränkten Tumoren (pT2c) und Karzinomen mit Infiltration der Samenblasen (pT3b). Der Unterschied zwischen Tumoren im Stadium pT2c und pT3a war hier allerdings statistisch nicht signifikant.

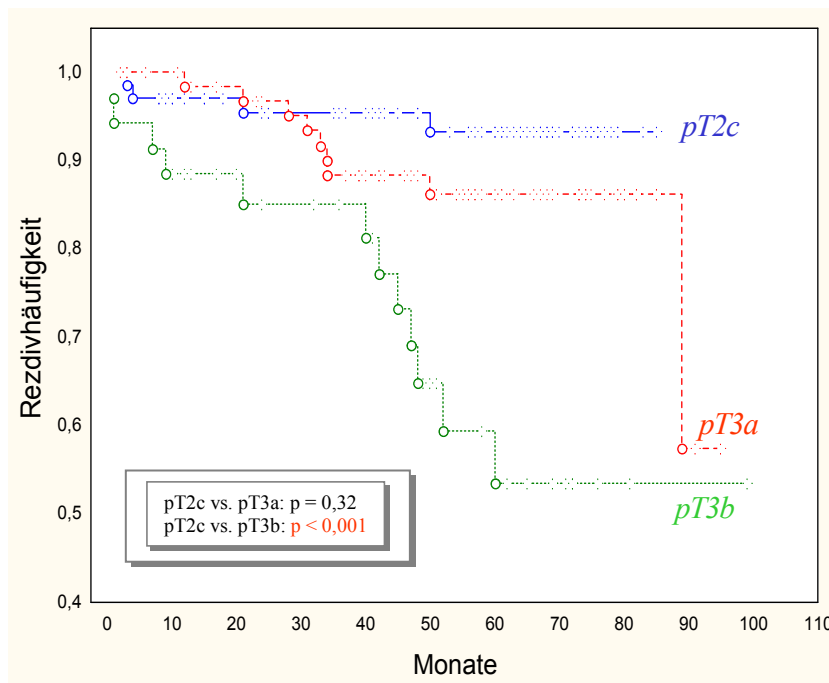
Abb. 3.3.1.2: Einfluss der Tumorausdehnung auf das Auftreten von Rezidiven

Legende: Darstellung nach Kaplan-Meier, Testung mit Cox-Mantel-Test,

Signifikanzniveau $p=0,05$

● vollständige Beobachtung;

○ zensierte Beobachtung



3.3.2 Einfluss des Gleason-Scores auf die Rezidivhäufigkeit

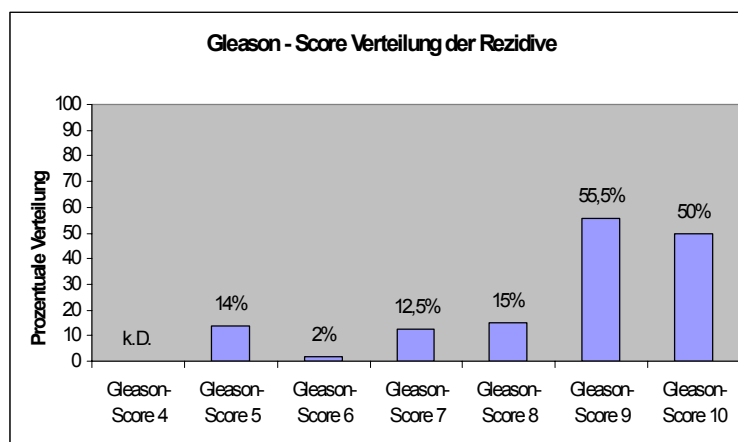
Wie oben bereits erläutert, ist der Gleason-Score ein wichtiger Parameter für die Tumordifferenzierung. Es wurde hier geschaut, wie der Gleason-Score mit der Rezidivwahrscheinlichkeit korrelierte. Es zeigte sich bei 213 Fällen, dass mit zunehmendem Gleason-Score auch die Rezidivfälle stiegen. Waren bei Gleason-Score 4 und 5 nur einzelne Fälle vorhanden, so stiegen die Rezidive bei Gleason-Score 7 immerhin auf ein Achtel aller Fälle. Bei Gleason-Score 8 zeigten sich bei 10 %, bei Gleason-Score 9 bei 56 % und bei Gleason-Score 10 bei 50 % aller Fälle Rezidive.

Abb. und Tab. 3.3.2.1: Verteilung der Rezidive über alle Gleason-Scores

Aufteilung aller Fälle nach Gleason-Score, Anzahl, mediane Nachbeobachtungsdauer und Anzahl von Rezidiven. Die Abbildung zeigt die prozentuale Verteilung der Rezidive bezogen auf die jeweilige Graduierung

| Gleason-Score | Anzahl (n) | Nachbeobachtungsdauer (mths) [Median] | Anzahl Rezidive (% bezogen auf jew. Graduierung) |
|---------------|------------|---------------------------------------|--|
| 4 | 2 | k.D. | k.D. |
| 5 | 7 | 12-87 [62] | 1 (14)* |
| 6 | 45 | 12-95 [54] | 1 (2) |
| 7 | 104 | 12-99 [52] | 12 (12,5) |
| 8 | 40 | 12-86 [59] | 6 (15) |
| 9 | 9 | 15-83 [48] | 5 (56) |
| 10 | 6 | 20-82 [60] | 3 (50) |

* bei diesem Fall handelte es sich um einen R1-resezierten Tumor



Hier nun eine Zusammenschau über die Gleason-Scores in den einzelnen Tumorstadien bei den Rezidiven.

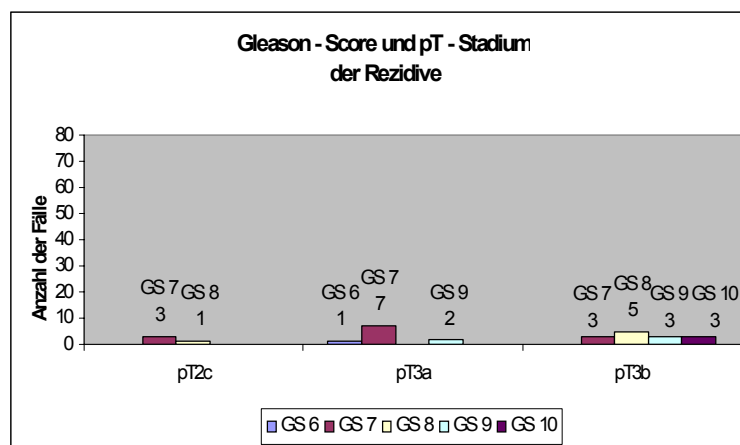
Während bei pT2c-Fällen nur ein Viertel aller Rezidive Gleason-Score 8 - 10 waren, waren es bei pT3b-Fällen 79 %. Auch hier zeigte sich, dass ein ausgedehnteres Tumorstadium mit höheren Gleason-Scores einher ging.

Tab. und Abb.3.3.2.2: Gleason-Score und pT-Stadium der Rezidive

GS: Gleason-Score; blau: GS 6; burgund: GS 7; gelb: GS 8; grün: GS 9 lila: GS 10;

Aufgetragen sind Anzahl der verschiedenen Gleason-Scores in den pT-Stadien

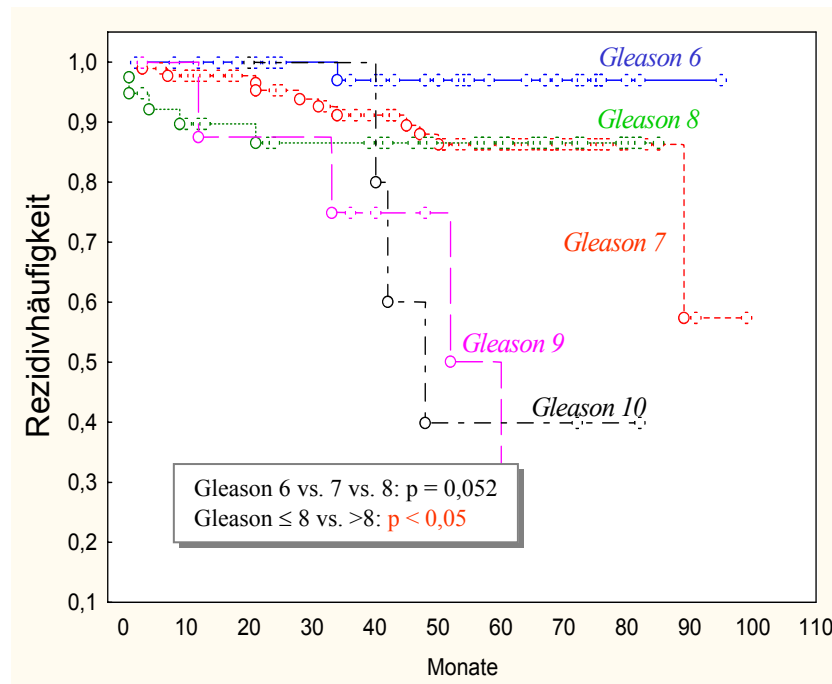
| pT/GS | GS 6 | GS 7 | GS 8 | GS 9 | GS 10 |
|-------|------|------|------|------|-------|
| pT2c | 0 | 3 | 1 | 0 | 0 |
| pT3a | 1 | 7 | 0 | 2 | 0 |
| pT3b | 0 | 3 | 5 | 3 | 3 |



Das Diagramm 3.3.2.3 zeigt deutlich, dass die Gleason-Scores 6, 7 und 8 gegenüber den Gleason-Scores 9 und 10 eine deutlich reduzierte Rezidivwahrscheinlichkeit aufwiesen. Obwohl zwischen einem Gleason-Score 7 und einem Score 8 keine statistisch signifikanten Unterschiede zu erkennen waren, traten Rezidive bei Gleason-Score 8-Tumoren innerhalb der ersten 5 Jahre etwas früher auf als bei Gleason-Score 7-Tumoren.

Abb. 3.3.2.3: Einfluss des Gleason-Scores auf das Auftreten von Rezidiven
 Darstellung nach Kaplan-Meier, Testung mit Cox-Mantel-Test, Signifikanzniveau $p=0,05$

○ vollständige Beobachtung; ◻ zensierte Beobachtung



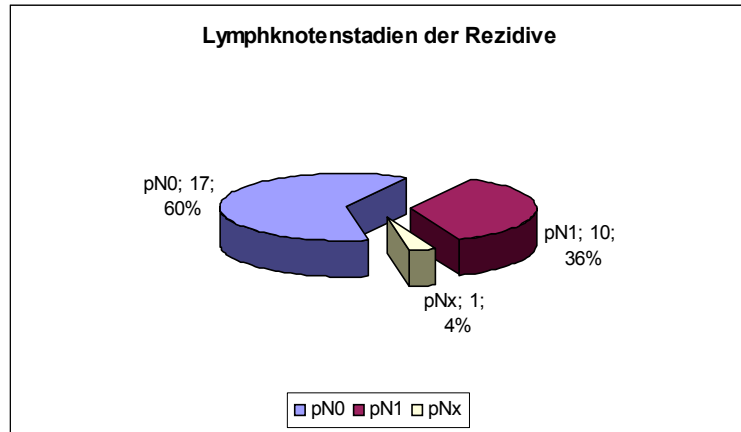
3.3.3 Einfluss des Lymphknotenstatus auf die Rezidivhäufigkeit

Da Patienten mit einem Prostatakarzinom regelmäßig in ärztlicher Kontrolle sind, um eventuelle Rezidive früh zu erkennen, waren unter den 28 Rezidiven bei ca. 61 % keine Lymphknotenmetastasen vorhanden. Doch noch bei fast 36 % der Rezidive lagen Lymphknotenmetastasen vor. Das lag aber in erster Linie daran, dass diese Fälle eine schlechte Tumordifferenzierung (Gleason-Score) hatten. So lagen 80 % der Fälle mit Lymphknotenmetastasen (pN1) im Bereich von Gleason-Score 8-10.

Tab. und Abb.3.3.3.1: Lymphknotenstadien der Rezidive

pN0 (keine Lymphknotenmetastasen): blau; pN1 (Lymphknotenmetastasen): burgund;
 pNx (unbekannter Lymphknotenstatus): gelb; Darstellung von Anzahl und Prozent der Fälle in den verschiedenen Lymphknotenstadien

| pN0 | pN1 | pNx |
|-----|-----|-----|
| 17 | 10 | 1 |



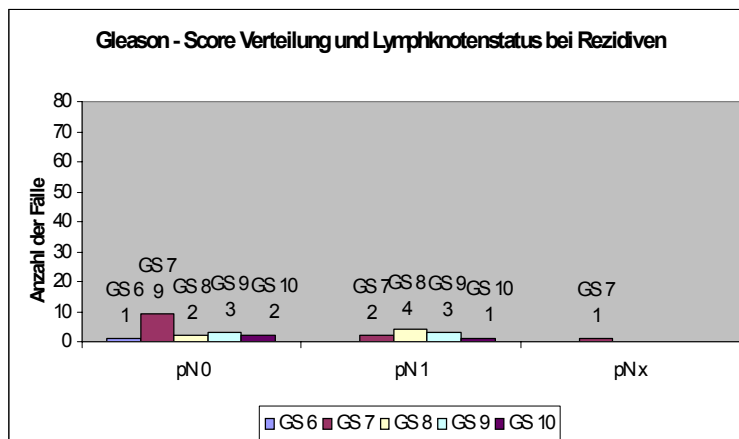
Tab. und Abb. 3.3.3.2: Gleason-Score Verteilung und Lymphknotenstatus bei Rezidiven

GS: Gleason-Score; pN0 (keine Lymphknotenmetastasen);

pN1 (Lymphknotenmetastasen); pNx (unbekannter Lymphknotenstatus);

Darstellung von Anzahl der verschiedenen Gleason-Scores in den verschiedenen Lymphknotenstadien

| pN/GS | GS 6 | GS 7 | GS 8 | GS 9 | GS 10 |
|-------|------|------|------|------|-------|
| pN 0 | 1 | 9 | 2 | 3 | 2 |
| pN 1 | 0 | 2 | 4 | 3 | 1 |
| pN x | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |



Der Vergleich des Lymphknotenstatus im Hinblick auf das Überleben zeigte, dass Patienten ohne Lymphknotenbeteiligung (pN0) tendenziell eine längere rezidivfreie Überlebenszeit aufwiesen als Patienten mit Lymphknotenbeteiligung (pN1). Dieser Unterschied zeigte einen deutlichen statistisch, hier aber nicht signifikanten Trend ($p=0,08$).

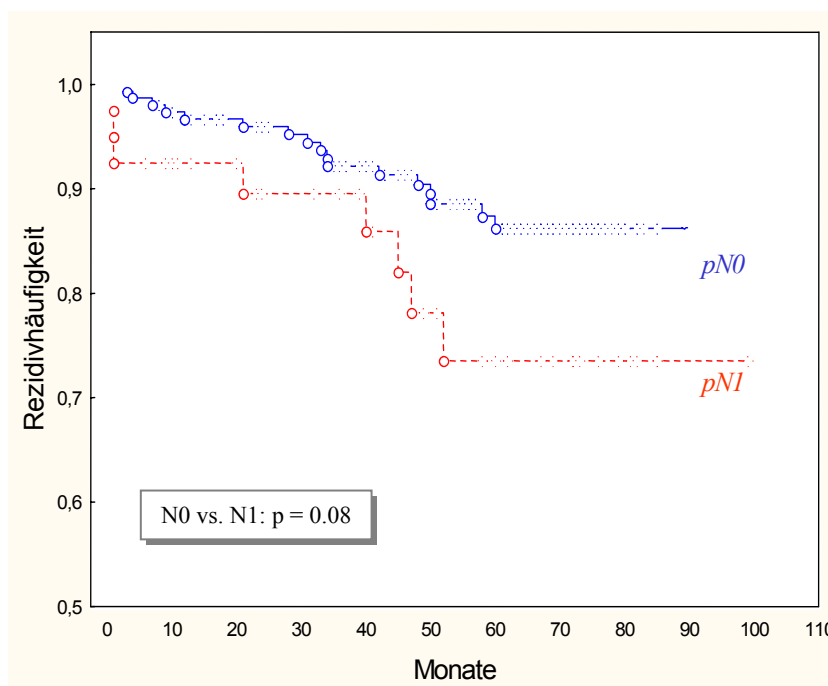
Ursache dieser fehlenden Korrelation waren wahrscheinlich zu wenige unzensurierte Ereignisse (d.h. Lymphknotenmetastasen) innerhalb des Nachbeobachtungszeitraumes.

Abb. 3.3.3.3: Einfluss des Lymphknotenstatus auf das Auftreten von Rezidiven

Darstellung nach Kaplan-Meier, Testung mit Cox-Mantel-Test,

Signifikanzniveau $p=0,05$

○ vollständige Beobachtung; ◊ zensierte Beobachtung



3.3.4 Einfluss des Resektionsstatus auf die Rezidivhäufigkeit

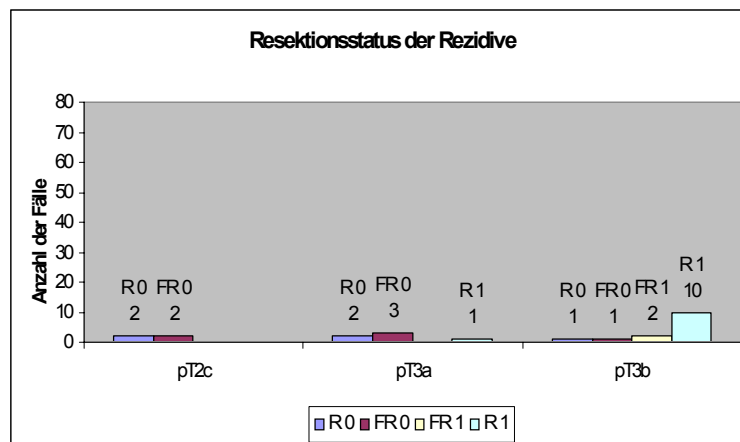
Hier nun eine Zusammenschau von Resektionsstatus über alle pT-Stadien der Rezidive. Auch hier sieht man, dass lokal beschränkte Tumoren (pT2c) keine sichtbaren Tumorreste hatten, während bei den kapselüberschreitenden Tumoren (pT3a) ein Fall und bei den organüberschreitenden Tumoren (pT3b) zehn Fälle nachweisbar waren.

Dies lag daran, dass die organbeschränkten Tumoren besser operativ entfernt werden konnten.

Abb. und Tab. 3.3.4.1: Resektionsstatus von Tumoren mit späterem Rezidiv in Abhängigkeit vom Tumorstadium bei Operation.

R0: Vollständige Resektion ohne histologischen Tumorrest; FR0: Fraglicher Befund, vollständige Resektion wahrscheinlich; FR1: Fraglicher Befund, vollständige Resektion unwahrscheinlich; R1: Histologisch unvollständige Resektion mit nachweisbarem Tumorrest an den Präparatoberflächen

| pT / R | R0 (n = 114) | FR 0 (n = 23) | FR 1 (n = 33) | R 1 (n = 44) |
|--------------|--------------|---------------|---------------|--------------|
| pT2c | 1 | 1 | 2 | 0 |
| pT3a | 2 | 1 | 2 | 5 |
| pT3b | 1 | 1 | 2 | 10 |
| Σ (%) | 4 (3,5) | 3 (13) | 6 (18) | 15 (34) |



Der Resektionsstatus war der histologische Parameter mit der höchsten prognostischen Aussagekraft bezüglich der Rezidivhäufigkeit. Patienten mit histologisch nur sehr knapp oder unvollständig (FR1 + R1) entfernten Karzinomen hatten gegenüber Patienten mit vollständig resezierten (R0) Karzinomen ein 8fach erhöhtes Risiko, ein Rezidiv zu entwickeln (4 Rezidive bei 113 R0 resezierten Tumoren vs. 21 Rezidive bei 77 FR1 + R1 resezierten Tumoren), wobei die meisten Rezidive innerhalb der ersten 5 Jahre nach Operation auftraten.

R0 ? vs. R1 ? nicht signifikant! (Cox-Mantel $p = 0,97$)

R0 ? vs. R0 signifikant (CM $p < 0,05$)

R0 ? vs. R1 Trend, aber nicht signifikant (CM $p = 0,11$)

R1 ? vs. R1 Trend, aber nicht signifikant (CM $p = 0,09$)

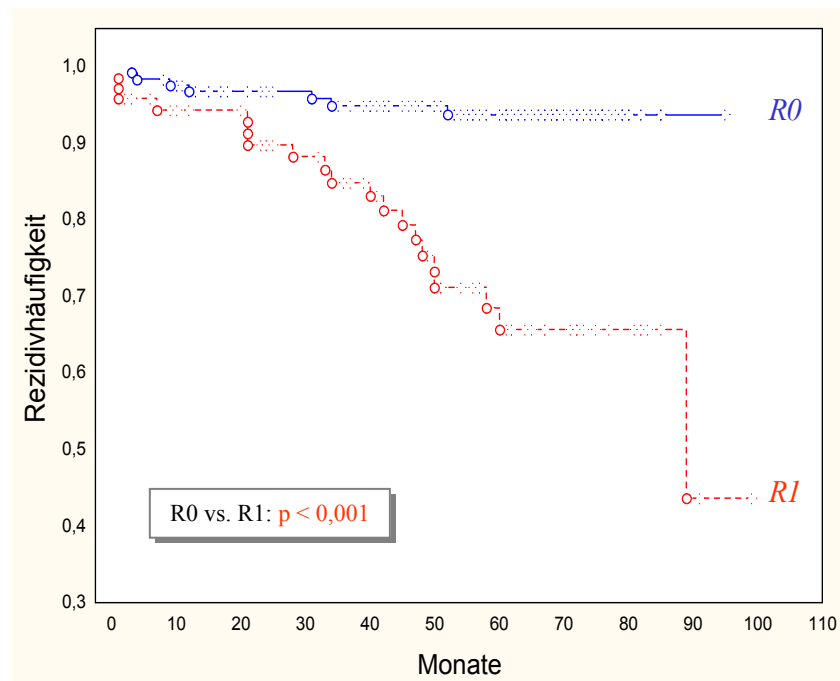
R1? vs. R0 signifikant (CM $< 0,05$)

Abb. 3.3.4.2: Einfluss des Resektionsstatus auf das Auftreten von Rezidiven

Darstellung nach Kaplan-Meier, Testung mit Cox-Mantel-Test,

Signifikanzniveau $p=0,05$

○ vollständige Beobachtung; ◊ zensierte Beobachtung

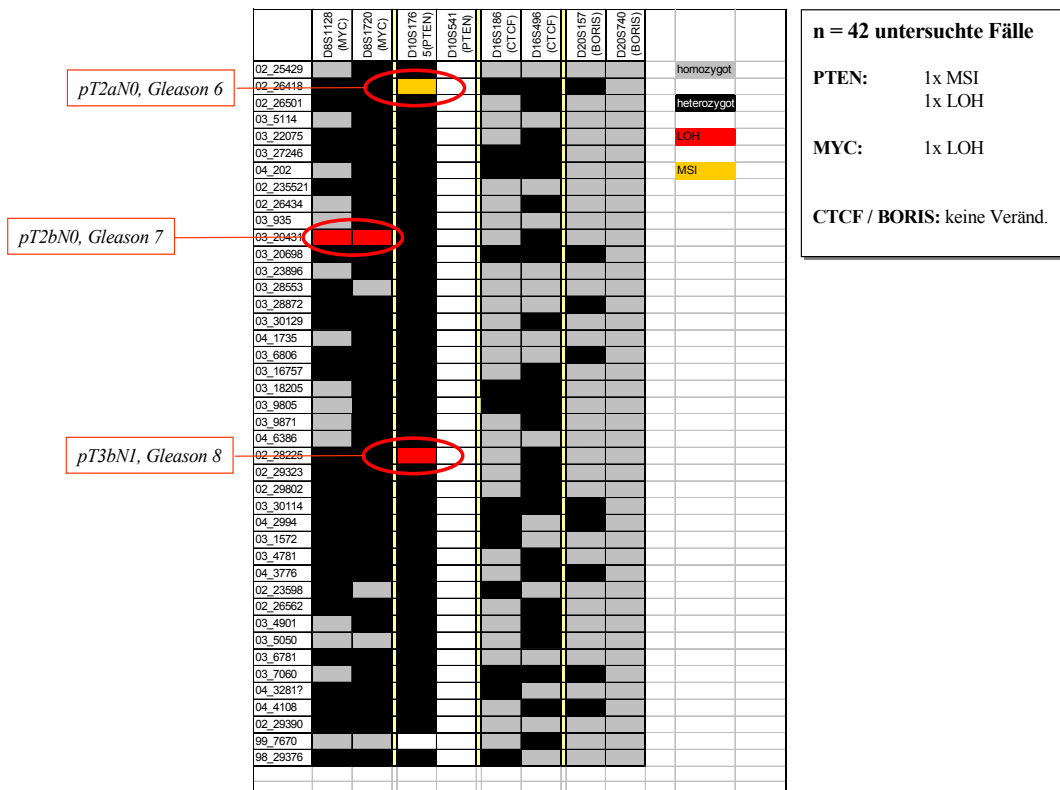


3.4 Molekularbiologische Mikrosatelliten-Analysen zum Nachweis einer LOH (loss of heterocytosity) an paraffin-extrahierter DNA

Schwerpunkt der vorgelegten Arbeit waren der Aufbau einer histologisch evaluierten Daten- und DNA-Bank, um Grundlagen für zukünftige Forschungsarbeiten zu legen. Die beschriebenen Mikrosatelliten-Analysen wurden daher lediglich als „Proof-of principle“ durchgeführt, um nachzuweisen, dass das so gewonnene Material für derartige Projekte geeignet war.

In einem Pilotprojekt wurden 42 Prostatakarzinome (10x Gleason 6, 21x Gleason 7, 9x Gleason 8, 2x Gleason 9) und nicht-neoplastische Prostatae der gleichen Patienten mittels 4 Markern (PTEN, MYC, BORIS, CTCF) auf LOH untersucht. Auffällige Befunde wurden nur in 3 der informativen Fälle festgestellt, eine Häufung in high-grade Karzinomen war mit diesen Markern nicht zu erkennen. Einer der beiden Marker zur Untersuchung von BORIS (D20S740) war nicht informativ, da 100 % der untersuchten Fälle homozygot für diesen Marker waren. Diese Befunde waren insofern überraschend, als Veränderungen von PTEN zu den am häufigsten zu beobachtenden genetischen Alterationen beim Prostatakarzinom zählen. Zur Absicherung wären also komplementäre weiterführende Untersuchungen erforderlich gewesen, die aber über den Umfang und die Zielsetzung der vorgelegten Arbeit hinausgingen.

Abb.3.4.1: Zusammenschau von molekularbiologischen Untersuchungsergebnissen
 Untersucht wurden PTEN, MYC, CTCF und BORIS; rot hervorgehoben die Fälle mit LOH (loss of heterozygosity), gelb die Fälle mit Mikrosatelliten-Instabilität (MSI), grau die Fälle, die homozygot (d.h. nicht informativ bezüglich des jeweiligen Markers) sind und schwarz heterozygote Fälle.



4. Diskussion

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der immer wichtiger werdenden Pathogenese des Prostatakarzinoms.

Dazu wurde eine DNA-Bank aus 241 Fällen erstellt, die sich pro Fall aus zwei Proben zusammensetzt, nämlich Normalgewebe und Karzinomgewebe. Dies ist sinnvoll, da so für weitere Untersuchungen immer der Vergleich des Karzinoms zum ursprünglichen Gewebe gezogen werden kann.

Des Weiteren wurde ein histologischer Mikroarray aus diesen Fällen erstellt. Hierzu eigneten sich nicht alle Fälle, da man fünf Karzinomstanzen und zwei vom Normalgewebe benötigte. Auch dieser Array ist hervorragend für weitere Untersuchungen zu gebrauchen, da man viele Spezialfärbungen anwenden kann.

Die Fälle wurden alle einzeln gesichtet, und auf Karzinomfläche, Stadium, Malignitätsgrad, Gleason-Score, Perineuralscheideninfiltration, Lymphangiosis, prozentualen PIN-Anteil, prozentualen Anteil an atypischer adenomyomatöser Hyperplasie, BPH-Stadium, Basalzellhypertrophie und Prostatitis hin beurteilt.

4.1 Prostatitis und Prostatakarzinom

Von den 243 Fällen hatten 135 keine Anzeichen einer Prostatitis. 88 Fälle zeigten eine leichte und 20 Fälle eine schwere Prostatitis.

Es zeigte sich also, dass 44,4 % des gesamten Kollektivs an Prostatakarzinomfällen Prostatitis zeigte, wobei 36,2 % unter einer leichten und 8,2 % unter einer schweren Prostatitis litten.

Es konnte keine Tendenz festgestellt werden, dass die Prostatitis mit den besonders aggressiven Tumoren assoziiert ist. Auch ein Zusammenhang mit dem Stadium und der Tumorfläche konnte nicht gezeigt werden.

4.2 Die Bedeutung von Gleason-Score 7

Die Beurteilung, in wie weit ein Prostatakarzinom die Prognose des Patienten betrifft, lässt sich mit dem Gleason-Score recht gut voraussagen. Doch wie Studien zeigten, ist die Unterteilung, wie sie meist vorgenommen wird, nämlich Gleason 2-4 (gute Prognose), 5-6 (mittlere Prognose), 7-10 (schlechte Prognose) nicht optimal. Gleason-Score 7 wird sehr häufig diagnostiziert, nimmt aber eine Mittelstellung zwischen den gut differenzierten Gleason 4-5 und den schlecht differenzierten Gleason 8-10 ein (Kris K. Rasiah et al.; Prognostic Significance of Gleason Pattern in Patients with Gleason Score 7 Prostate Carcinoma; Cancer 2003).

Es zeigte sich nämlich, dass aus dem Patientenkollektiv von denjenigen, die Gleason 4-5 haben, nur 4,5 % am Prostatakarzinom verstorben sind, wohingegen 23,6 % mit Gleason 6, 41,8 % mit Gleason 7 und 70 % mit Gleason 8-10 verstorben sind.

Die Einteilung sollte nach vier Grobkategorien geschehen, nämlich Gleason 4-5 (meist Transitionalzonentumoren, bessere Prognose), Gleason 6, Gleason 7 und Gleason 8-10 (L. Egevad et al.; Prognostic value of the Gleason score in prostate cancer; BJU International, 89,538-542; 2002).

Es ist nämlich schon ein Unterschied, ob man eine Überlebensrate von 15,6 (Gleason 6) oder 9,9 Jahren (Gleason 7) hat.

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Etablierung und Charakterisierung einer großen Daten-, Gewebe- und DNA-Bank an einem Kollektiv von 311 Patienten mit Prostatakarzinom und bekanntem klinischem Follow-up mit einem Beobachtungszeitraum von im Durchschnitt 5 Jahren beschrieben. Sämtliche Fälle wurden von einem Beobachter einheitlich nach einem standardisierten Katalog re-klassifiziert. Die erhobenen Daten konnten durch Korrelation mit den klinischen Verläufen auf Plausibilität überprüft und dadurch validiert werden. Die untersuchten Fälle entsprachen bezüglich Häufigkeitsverteilung in Tumorstadium und Gleason-Grading den aus Literaturangaben zu erwartenden Häufigkeiten. Statistisch signifikante Risikofaktoren bezüglich eines Tumorrezidivs, das hier als postoperativer Wiederanstieg des PSA im Serum definiert wurde, waren ein hohes Tumorstadium, hoher Gleason-Score, extraprostatatische Perineuralscheideninfiltrate und unvollständige Resektion, während der Nachweis von Lymphknotenmetastasen zum Zeitpunkt der Operation innerhalb des hier verfügbaren Nachbeobachtungszeitraums zwar einen Trend, jedoch keine statistische Signifikanz aufwies. In einer multivariaten Analyse war die unvollständige Tumorresektion der histologische Parameter mit der höchsten prädiktiven Aussagekraft bezüglich eines Rezidivs. Patienten mit fraglich knapp im Gesunden entfernten oder fraglich durchtrennten Karzinomen wiesen eine signifikant erhöhte Rezidivrate auf und sollten klinisch als Risikopatienten betrachtet werden.

Die beschriebene Daten- und Gewebebank legt eine wichtige und wertvolle Grundlage für zukünftige wissenschaftliche Untersuchungen mittels Immunhistochemie, Immunfluoreszenz, Molekulargenetik und andere DNA-basierte Methoden. Die in diesen Untersuchungen erhobenen Befunde können mit den in der Datenbank abgelegten histopathologischen Parametern korreliert und anhand der klinischen Verläufe auf prognostische Relevanz überprüft werden.

Literaturverzeichnis

1. Der Pathologe; S. 218-223; P. Hammerer, H. Huland; 1996
2. Der Pathologe; Benigne mikroglanduläre Prostataläsionen, H. Bonkhoff, K. Remberger; 1998
3. Histologie, T. H. Schiebler; 4.Auflage; Springer Verlag; 1996
4. Pathologie; Blümcke, S.; Walter de Gruyter; Berlin; New York; 1995
5. Bröcker, Denk, Heitz; Pathologie; Urban und Fischer; 2001
6. R. C. Curran, J. Crocker; Atlas der Histopathologie; Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2000
7. Ramzi S. Cotran, Vinay Kumar, Tucker Collins; Robbins Pathologic Basis of Disease; Saunders; 1998
8. TNM-Atlas, Wittekind, C; Klimpfinger, M; Sobin, L. H.; 5.Aufl.; 2005
9. AUO-Manual; Albrecht, W; Flamm, J; et al.; 1992; Ergänzung; 1994
10. Antiandrogens: selective androgen receptor modulators; Cor A. Berrevoets; Arzu Umar; Albert O. Brinkmann; Molecular und Cellular Endocrinology 198, 97-103; 2002
11. Molecular Pathology of Early Cancer; S. Srivastava et al. (Eds.); IOS Press; 1999
12. Abbildung verfügbar unter: www.life.uiuc.edu/molbio/geldigest/agarose.html; Zugriff 2003

13. Abbildung verfügbar unter: <http://fachberatung-biologie.de/Themen/molgenetik/seitenprotbio/dnameth3gel.html>; Zugriff 2003
14. Familial risk of cancer by site and histopathology; Hemminki, Kari; Li, Xinjun; Int. J. Cancer: 103, 105-109; 2003
15. Current status of the molecular genetics of human prostatic adenocarcinomas; Karan Dev; Lin, Ming-Fong; Johansson, Sonny L.; Batra, Surinder K.; Int. J. Cancer: 103, 285-293; 2003
16. Hereditäres Prostatakarzinom; Royer-Pokora, B.; Goecker, T.; Vogel, W.; Medizinische Genetik 10 (2), 283-286; 1998
17. Abbildung verfügbar unter: <http://privatewww.essex.ac.uk/ex-ctcf.htm> (Zinkfinger); Zugriff 2003
18. Molecular markers of prostate cancer outcome; Quinn, David I; Henshall, Susan M; Sutherland, Robert L; European Journal of cancer (41), 858-887; 2005
19. p53 and c-myc expression in stage A1 prostatic adenocarcinoma: useful prognostic determinants?; Fox, SB; Persad, RA; J Urol, 150; 1993
20. Molekulare Onkologie, Hermeking, Heiko; Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried; 2005
21. p53: puzzle and paradigm; Linda J. Ko; Carol Prives; Genes & Development 10: 1054-1072; 1996
22. Roche-Forscher entdecken Moleküle, die einen wichtigen Stoffwechselweg zur Tumorunterdrückung aktivieren; Lyubomir Vassilev ;Sciencexpress; 2004

23. In Vivo Activation of the p53 Pathway by Small-Molecule Antagonists of MDM2; Lyubomir T. Vassilev, Binh T. Vu, Bradford Graves, Daisy Carvajal, Frank Podlaski, Zoran Filipovic, Norman Kong, Ursula Kammlott, Christine Lukacs, Christian Klein, Nader Fotouhi, Emily A. Liu; *Science*, Vol 303, Issue 5659, 844-848, 6 February; 2004
24. PTEN and p27^{KIP1} cooperate in prostate cancer tumor suppression in the mouse; Di Cristofano, Antonio; De Acetis, Marika; Koff, Andrew et al.; *Nature*; 2001
25. Pten Dose Dictates Cancer Progression in the Prostate; Trotman, Lloyd C.; Niki, Masaru; *PLOS Biology*; 2003
26. Low p27 expression predicts poor disease-free survival in patients with prostate cancer; Yang, R. M.; Naitoh, J. et al.; *J Urol* 159:941-5; 1998
27. Role of p27 in prostate carcinogenesis; Macri, Ettore; Loda Massimo; *Cancer and Metastasis Reviews* 17: 337-344; 1999
28. Evidence of a p27 tumor suppressive function independent of its role regulating cell proliferation in the prostate; Shaffer, David R.; et al.; *PNAS*; vol.102; Januar 2005
29. A Variant of Alpha-Methyl-Acyl-CoA Racemase Gene Created by a Deletion in Exon 5 and its Expression in Prostate Cancer; Mubiru, James N.; Valente, Anthony J.; Troyer, Dean A.; *The Prostate* 65: 117-123; 2005
30. Diagnostic utility of immunohistochemistry in morphologically difficult prostate cancer: review of current literature; Varma, M; Jasani, B; *Histopathology* 47; 2005
31. Cell Growth Inhibition by the Multifunctional Multivalent Zinc-Finger Factor CTCF; Rasko, John E. J.; Klenova, Elena M.; *Cancer Research* 61, 6002-6007, August 15; 2001
32. Varambally, S; Dhanasekaran, S. M.; The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer; *Nature*, 419:624-629; 2002

33. Mutation Screen and Association Study of EZH2 as a Susceptibility Gene of Aggressive Prostate Cancer; Bachmann, Natascha; Hoegel, Josef; et al.; The Prostate 65: 252-259; 2005
34. HER-2/neu oncogene amplification in clinically localised prostate cancer; Oxley, J. D.; Winkler, M. H.; et al.; J Clin Pathol; 55; 2002
35. Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived $\gamma\delta$ T-cells of MICA and MICB; Groh, Veronica; Rhinehart, Rebecca, Proc. Natl. Acad. Sci.; USA; Vol. 96; 1999
36. Genetic Analysis of Prostatic Atypical Adenomatous Hyperplasia (Adenosis); Jennifer, A. Doll; Xiaopei Zhu; American Journal of Pathology, Vol. 155, No. 3; 1999
37. Prostatitis as a risk factor for prostate cancer; Roberts, Rosebud, O.; Bergstralh, Erik J.; Epidemiology; 15; 2004
38. Chronic prostatic inflammation may fuel carcinogenesis: study; Rauscher, Megan; Reuters Health; 2006
39. Prostate cancer linked to infection; Gamble, Simon; Isaacs, William, Nature; 2002
40. Propionibacterium acnes associated with inflammation in radical prostatectomy specimens: a possible link to cancer evolution?; Cohen, R. J ; Shannon, B. A.; J Urol.; 2005
41. The role of inflammation in the pathogenesis of prostate cancer; Nelson, William G.; De Marzo, Angelo M.; J Urology; 2004

42. Gleason DF, Mellinger GT and the Veterans Administration Cooperative Urological Research Group; Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging; J Urol 111:58-64; 1974
43. Genetic analysis of the RNASEL gene in hereditary, familial, and sporadic prostate cancer; Wiklund, F.; Jonsson, B. A.; Brookes, A. J.; Clin. Cancer Res.; 2004
44. High grade prostatic intraepithelial neoplasia. The most likely precursor of prostate cancer; Bostwick D. G.; Cancer 75; 1823-1836; 1995
45. Non-neoplastic diseases of the prostate; Epstein JI; Urologic surgical pathology; 1996
46. Atypical adenomatous hyperplasia of the prostate: morphologic criteria for its distinction from well differentiated carcinoma; Bostwick D. G.; Hum Pathol 24; 1993

Danksagung

Abschließend möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während der Doktorandenzeit mit Rat und Tat unterstützt und die Durchführung der vorliegenden Arbeit ermöglicht haben.

Mein besonderer Dank gilt dabei:

Herrn Prof. Dr. Philipp Ströbel für die Vergabe des Themas sowie die wertvollen Hinweise bei der Erstellung der Arbeit und die Geduld und Zeit, die er aufbrachte, sich mit mir in die Thematik dieser Arbeit einzulesen und diese histologisch basierte Prostata - DNA Bank aufzubauen.

Herrn Prof. Dr. Riedmiller für die Übernahme des Korreferates und die Überlassung von wichtigen Informationen zu den Prostatapräparaten als Grundlage dieser Arbeit.

Den Mitarbeitern des Institutes für Pathologie für die Einarbeitung und Erlernung von Extraktionsmethoden zur DNA-Gewinnung.

Meiner Frau und meiner Familie, die mich durch Höhen und Tiefen begleiteten und so zum Gelingen der Arbeit beitrugen.

Vielen herzlichen Dank

Florian Elflein