

Aus dem Institut für Pathologie
des Universitätsklinikums Hamburg – Eppendorf

Direktor Prof. Dr. med. Guido Sauter

Prognostische Bedeutung von EGFR Alterationen beim Prostatakarzinom

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin.
Dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Patrick Josef Kirstein
aus Gdingen (Polen)

Hamburg, 2008

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Universität Hamburg am: **16.02.2009**

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität Hamburg:

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: **Prof. Dr. A. Erbersdobler**

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: **Prof. Dr. H.-E. Laack**

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: **PD Dr. A. Haese**

WIDMUNG

**In Gedenken an meinen Großvater Josef Kirstein,
der sich mit mir gefreut hätte.**

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	6
1.1 Epidemiologie des Prostatakarzinoms	6
1.2 Diagnose des Prostatakarzinoms	7
1.3 Therapeutische Optionen.....	8
1.4 Prognostische Marker	9
1.5 EGFR.....	13
2. FRAGESTELLUNG	15
3. MATERIAL UND METHODEN	16
3.1 Patientenkollektiv	16
3.2 Vorbereitung	16
3.3 Prinzip des TMA.....	17
3.4 Einsatzmöglichkeiten der TMAs.....	18
3.5 Herstellung des PC-Arrays.....	19
3.6 Immunhistochemie	21
3.6.1 Auswertung der Immunhistochemie	21
3.7 Fluoreszenz-in-situ Hybridisierung (FISH)	22

3.8 EGFR Mutationen	23
3.9 Statistik	23
4. ERGEBNISSE	24
4.1 Technische Gegebenheiten	24
4.2 Immunhistochemie	24
4.3 FISH.....	27
4.4 Mutationen	31
4.5 Multivariate Analyse in Hinblick auf die prognostischen Marker.....	32
5. DISKUSSION	33
5.1 Methodendiskussion	33
5.2 Ergebnisdiskussion	35
6. ZUSAMMENFASSUNG	39
7. LITERATURVERZEICHNIS.....	40
DANKSAGUNG	48
LEBENS LAUF	49
EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	50

1. EINLEITUNG

1.1 Epidemiologie des Prostatakarzinoms

Beim Prostatakarzinom handelt es sich um die am häufigsten diagnostizierte und die am zweithäufigsten zum Tode führende Krebserkrankung bei Männern der westlichen Welt (Hsing et al. 2000, Parkin et al. 1997). Durch den zunehmenden Alterungsprozess der Bevölkerung und die immer besser werdenden Screeningmethoden, hat die Zahl der Prostatakarzinomneuerkrankungen im letzten Jahrzehnt stark zugenommen (Potosky et al. 1995). Dabei zeichnet sich eine altersspezifische Inzidenz ab. Sie steigt mit zunehmendem Alter linear an. Vor dem 45. Lebensjahr tritt das Prostatakarzinom praktisch nicht auf und mehr als 70 % aller am Karzinom erkrankten Patienten sind älter als 65 (American Cancer Society 2005). Das mittlere Erkrankungsalter bei der Diagnosestellung beträgt 71 Jahre und das mittlere Alter zum Zeitpunkt des Todes 78 Jahre (Scher et al. 2000).

Damit gehört das Prostatakarzinom ab dem 70. Lebensjahr zu den häufigsten bösartigen Tumoren beim Mann (Bertz et al. 2006).

Die Inzidenz des Prostatakarzinoms lag im Jahre 2005 in den USA bei ca. 232 000 Neuerkrankungen (American Cancer Society 2005). In der Europäischen Union erfasste man im Jahre 2004 ca. 202 000 Neuerkrankungen (Boyle&Ferlay 2004). Auf Deutschland entfielen dabei 58 500 Neuerkrankungen (Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 2008).

Größere Unterschiede als die Inzidenz wies die Mortalität zwischen den Kontinenten auf. So verstarben in den USA im Jahre 2005 ca. 30 000 Patienten (American Cancer Society 2005), während es in der Europäischen Union im Jahre 2004 ca. 68 000 Tote gab (Boyle&Ferlay 2004), darunter ca. 11 100 Sterbefälle in Deutschland (Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 2008).

Bemerkenswert war hierbei, dass die Höhe der Krebsneuerkrankungen, sowie die Sterblichkeitsrate ebenfalls von der ethnischen Zugehörigkeit einer Bevölkerungsgruppe abhing. Unter der farbigen Bevölkerung der USA lag die Inzidenz um etwa 50% und die Mortalität um etwa 100% höher, als die der weißen Bevölkerung (American Cancer Society 2005). Umgekehrt verhielt es sich in den asiatischen Ländern. So war die Inzidenz in asiatischen Ländern etwa halb so hoch, wie die in Amerika (Cook et al. 1999). Die Mortalität des Prostatakarzinoms in Japan betrug im Jahre 1994 ca. 15 Tote pro 100 000, während sie in den USA im gleichen Zeitraum bei etwa dem Vierfachen lag (Oliver et al. 2001).

1.2 Diagnose des Prostatakarzinoms

Das Prostatakarzinom wird erst in einem fortgeschrittenen Stadium symptomatisch. Mit der Größenzunahme des Tumors treten Miktionsbeschwerden auf. In einem solchen Fall spricht man von einem klinisch manifesten Prostatakarzinom.

Zur Primärdiagnostik des Prostatakarzinoms, ob im Rahmen der Vorsorge oder beim symptomatischen Patienten, gehört obligatorisch die digitale rektale Untersuchung (DRU). Sie wird konventionell zur Einschätzung der lokalen Ausdehnung eines Karzinoms verwendet. Für sich allein genommen, konnte für die DRU die prognostische Relevanz nicht gezeigt werden. So hat sich herausgestellt, dass das palpierbare Stadium nur in ca. 48% der Fälle auch dem klinischen Tumorstadium entsprach (O'Dowd et al. 1997).

Um die prognostische Aussagekraft weiter präzisieren zu können, bedient man sich eines weiteren Parameters, dem prostataspezifischen Antigen (PSA).

Das PSA ist eine Serinprotease, die für die Verflüssigung des Spermas und damit zu einer gesteigerten Motilität der Spermien beiträgt. Die Proteasefunktion ist im Serum durch die Bindung an das Alpha-1-Antichymotrypsin unterbunden. Für das PSA konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass ein hoher PSA-Wert mit einer schlechten Prognose einhergeht (Partin et al. 1993, Blute et al. 2001, Blute et al. 2000). Allerdings unterliegt dieser Parameter gewissen Schwankungen. So können neben dem Prostatakarzinom auch Katheteruntersuchungen, die benigne

Prostatahyperplasie und eine Prostatitis zu einer Erhöhung des PSA-Wertes führen. Die Krebs-Entdeckungsrate beträgt bei asymptomatischen Männern über 50 Jahren, durch die DRU 1,0-3,2%, durch den PSA 4,6% und durch beide Methoden kombiniert 5,8% (Catalona et al. 1994).

Weist der PSA-Wert und / oder der Palpationsbefund eine Auffälligkeit auf, so besteht der nächste Schritt in der Entnahme einer Biopsie. Die Biopsie wird heute zumeist ultraschallgesteuert als Sextantenbiopsie durchgeführt. Hierbei werden aus beiden Prostatalappen jeweils drei Biopsien, aus der Basis, Mitte und dem Apex, entnommen. Diese werden dem Pathologen zugeführt, der diese nach einem Grading-System beurteilt.

Die Anzahl der positiven Biopsien scheint ein wichtiger prognostischer Indikator in Bezug auf das pathologische Stadium und das Tumolvolumen zu sein, aus welchen sich dann die therapeutischen Optionen ableiten lassen (Peller et al. 1995). Bei bestimmten Fragestellungen oder palpatorisch auffälligen Befunden, kann zusätzlich gezielt biopsiert werden.

1.3 Therapeutische Optionen

Die Therapie des Prostatakarzinoms setzt sich hauptsächlich aus vier Strategien zusammen. Es handelt sich dabei um die Strahlentherapie, Hormontherapie, invasive Verfahren, wie vor allem die radikale Prostatektomie und die weniger bedeutsame Chemotherapie. Diese hat sich als therapeutische Primäroption, aufgrund der sich nur langsam teilenden Tumorzellen, nicht durchsetzen können.

Die Anwendung dieser Therapieformen kann einzeln, wie auch in Kombination und in unterschiedlicher Reihenfolge zur Verwendung kommen. Die Entscheidung richtet sich dabei nach dem Stadium und Ausmaß des Tumors. Dabei ergeben sich Therapiekonzepte mit kurativer, palliativer, sowie adjuvanter und neoadjuvanter Absicht. Die neoadjuvante Therapie geht einem kurativen Therapieansatz voraus, während die adjuvante Therapie nach einem bereits erfolgten Therapieversuch mit kurativer Absicht angewandt wird, mit dem Ziel ein Rezidiv zu verhindern und damit eine Lebensverlängerung zu erreichen. Kann eine Heilung nicht erreicht werden, wie

es beim fernmetastasierten Prostatakarzinom der Fall ist, besteht die Zielsetzung hauptsächlich in der Verbesserung der Lebensqualität und in der Überlebensverlängerung.

Im Bereich der Strahlentherapie stehen die Teletherapie -eine perkutane Bestrahlung der Prostata mit Photonen oder Neutronen in einem Abstand von ca. 100 cm von der Strahlenquelle- und die Brachytherapie, durch eine Seed-Implantation oder durch die Afterloadingtechnik, zur Verfügung (Schwarz R 2003).

Das Ziel der Hormontherapie besteht aus dem Entzug, der für das Wachstum nötigen Androgene. Dies geschieht durch Orchiektomie oder LHRH-Analoga. Sie kommt bei fortgeschrittenen oder metastasierten Erkrankungen zum Zuge.

In der operativen Therapie des lokal begrenzten Prostatakarzinoms, stellt die radikale Prostatektomie den Goldstandard dar (Damber et al. 2005). Wie jeder Eingriff, so ist auch dieser mit diversen Komplikationen behaftet. Die, die Lebensqualität am stärksten mindernden Komplikationen, sind die Impotenz und Inkontinenz. Ziel ist es, nur die Patienten der Therapie zuzuführen, bei denen das Verhältnis von Nutzen (rezidivfreie Überlebenszeit) und Komplikationen zu Gunsten des Ersteren überwiegt. Diese Informationen gewinnt man über eine Reihe von Markern, für die eine prognostische Relevanz gezeigt werden konnte.

1.4 Prognostische Marker

Für die Prognose eines Prostatakarzinompatienten, steht eine gewisse Anzahl an Markern zur Verfügung.

Für eine Reihe von Tumoren konnte gezeigt werden, dass der Grad der Differenzierung von prognostischer Relevanz ist. Der Differenzierungsgrad wird durch Grading-Systeme erfasst.

Das am weitesten verbreitete Grading – System, ist das nach Gleason. Es beurteilt ausschließlich die Wachstumsmuster des Prostatakarzinoms. Hierbei werden die Wachstumsmuster in einer Skala von 1 bis 5 unterteilt (Abb. 1, Tabelle1).

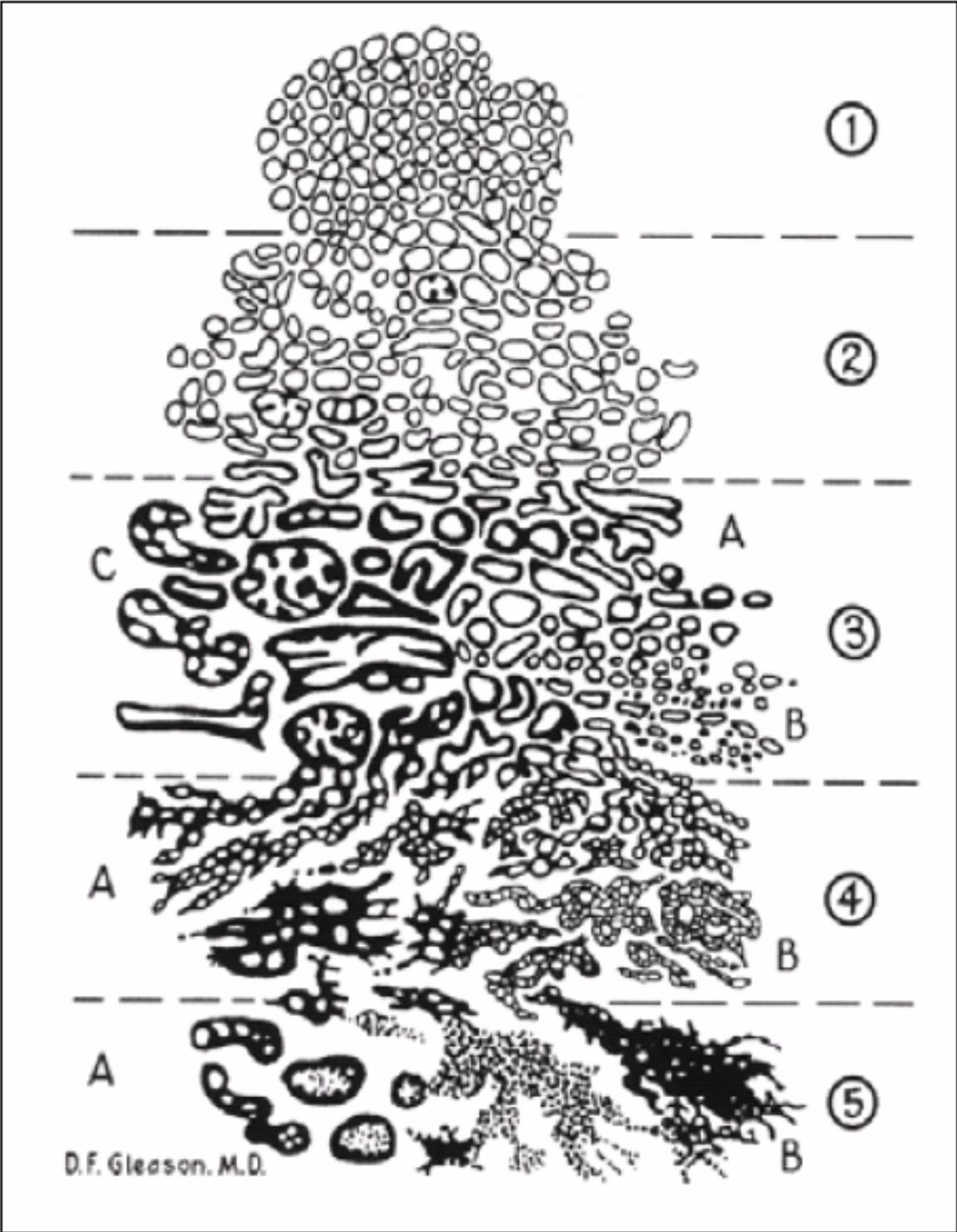
Tabelle 1: Grading des Prostatakarzinoms nach Gleason

Grad	Morphologische Kriterien
1	Runde bis ovale, gleich große Einzeldrüsen, dicht nebeneinander liegend, scharf gegen die Umgebung abgegrenzt
2	Etwas weniger uniforme Einzeldrüsen, getrennt durch geringe Mengen von Stroma, weniger scharf begrenzter Tumorrand
3	a) Unregelmäßig große und unregelmäßig gestaltete Drüsen mit gewöhnlich reichlicherem Stroma, gelegentlich auch dicht gelagert, unregelmäßig und unscharfe Tumorgrenze
	b) Papilläre oder kribriforme Strukturen, z.T. in großen, gangähnlichen Bildungen
4	a) Große unregelmäßige Epithelformationen durch Drüsenverschmelzung („fused glands“), sowie verzweigte Drüsen mit unregelmäßiger Infiltration in die Umgebung
	b) Adenokarzinom mit ausgeprägt klarem Zytoplasma, ähnlich hellzelligen Adenokarzinomen der Niere
5	a) Scharf begrenzte runde Epithelhaufen mit meist solidem und kribriformem Bau, gewöhnlich mit zentraler Nekrose (komedo-karzinomähnlich)
	b) Unregelmäßig begrenzte Formationen eines undifferenzierten Karzinoms, das nur durch gerade, noch erkennbare Drüsenbildung oder Vakuolen (siegelringähnlich) als Adenokarzinom zu identifizieren ist

Da im Prostatakarzinom mehrere Wachstumsmuster nebeneinander vorkommen können, findet auch diese Eigenart ihren Eingang in das Klassifikationssystem, in Form des Gleason-Scores. Dabei bilden die beiden am stärksten dominierenden Wachstumsmuster eine Summe. Der Score reicht somit von 2 (1+1=2), bis zu einem Score von 10 (5+5=10). Die erste Ziffer in der Gleichung, wird immer von dem vorherrschenden Muster gestellt und die zweite von dem sekundären Muster (Gleason et al. 1974).

Für den Gleason-Score konnte in einer Reihe von Studien gezeigt werden, dass es sich dabei um einen wichtigen prognostischen Faktor handelt (Epstein et al. 1996, Epstein et al. 1993, Peller et al. 1995, Stamey et al. 1999).

Abb. 1: Grading des Prostatakarzinoms nach Gleason



Für die Prognose des Prostatakarzinompatienten, hat sich die **T**umor-**N**odule-**M**etastasis (TNM)-Klassifikation ebenfalls bewährt (Catalona 1995). In ihr fließt die Ausdehnung, der Lymphknotenbefall und die Metastasen in die klinische Bewertung mit ein. Einzelheiten siehe Tabelle 2.

Tabelle 2: Klassifikation des Prostatakarzinoms nach der TNM – Klassifikation, 6. Aufl. UICC 2002

T Primärtumor	
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
T1	Klinisch nicht erkennbarer Tumor, der weder tastbar, noch in den bildgebenden Verfahren sichtbar ist
	a) zufälliger histologischer Befund („incidental carcinoma“) in 5 % oder weniger des resizierten Gewebes
	b) zufälliger histologischer Befund („incidental carcinoma“) in mehr als 5 % des resizierten Gewebes
	c) Tumor durch Nadelbiopsie diagnostiziert (z.B. wegen des erhöhten PSA)
T2	Tumor auf die Prostata begrenzt
	a) Tumor infiltriert die Hälfte eines Lappens oder weniger
	b) Tumor infiltriert mehr als die Hälfte eines Lappens
	c) Tumor infiltriert beide Lappen
T3	Tumor durchbricht die Prostatakapsel
	a) Extrakapsuläre Ausbreitung (ein- oder beidseitig)
	b) Tumor infiltriert Samenblase(n)
T4	Tumor infiltriert benachbarte Strukturen (Blasenhals, Sphincter externus, Rektum, Levator-Muskulatur, Beckenwand)
N Regionäre Lymphknoten	
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Kein Anhalt für regionäre Lymphknotenmetastasen
N1	Regionäre Lymphknotenmetastasen
M Fernmetastasen	
MX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	Kein Anhalt für Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen
	a) Nicht regionärer Lymphknotenbefall
	b) Knochenmetastasen
	c) Andere Manifestation

Weitere prognosebestimmende Faktoren sind die positiven Absetzungsränder nach radikaler Prostatektomie (Epstein et al. 1996). So konnte gezeigt werden, dass 50 % der Patienten mit positiven Absetzungsrändern einen Progress erleiden (Epstein et al. 1993). Desweiteren wurde gezeigt, dass die Wahrscheinlichkeit, ein Rezidiv zu erleiden, im Vergleich zu negativen Absetzungsrändern um das Zwei- bis Vierfache erhöht ist (Hull et al. 2002). Schließlich wurde in einer Studie von Blute et al. (2001) in einer multivarianten Analyse, der positive Absetzungsrand als unabhängiger prognostischer Faktor identifiziert.

Einer der wichtigsten molekularen Marker ist das Prostata-Spezifische-Antigen (PSA). Seit Beginn des PSA-Screenings ab Mitte der 80 Jahre, hat sich das PSA als Marker mit dem höchsten positiven, prädiktiven Wert unter den Screening -Methoden bewährt. Auch für diesen Marker konnte in zahlreichen Studien die präoperative prognostische Relevanz gezeigt werden (Partin et al. 1993, Blute et al. 2001, Blute et al. 2000).

1.5 EGFR

Beim Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) handelt es sich um eine 185 kD schwere, weit verbreitete, transmembranöse Tyrosinkinase, deren Gen auf dem Chromosom 7p12 lokalisiert ist (Yarden et al. 2001). Der Rezeptor setzt sich aus einer aminoendständigen, extrazellulären Ligandenbindungsstelle, einem hydrophoben, transmembranösen Anteil und der zytoplasmatischen Domäne, die die Tyrosinkinase enthält, zusammen. Bindet einer der Liganden (EGF, transforming growth factor alpha (TGF), amphiregulin, heparin-binding EGF, betacellulin, epiregulin) an der Bindungsstelle, so führt dies zur Dimerisation vom EGFR und zur Induktion der Autophosphorylierung der cytoplasmatisch gelegenen Anteile. Durch Bindung verschiedener Signaltransmitter und Adaptermoleküle wird eine Signalkaskade ausgelöst, die zur Zellproliferation, Differenzierung, Migration, Adhäsion, Schutz vor der Apoptose und Transformation führt.

Eine Überexpression des EGFR konnte für viele verschiedene Tumoren gezeigt werden. Als Beispiel wären hier zu nennen: Mammakarzinom, Bronchialkarzinom, Kopf-Hals-Tumoren, Harnblasenkarzinom, Kolonkarzinom, Ovarialkarzinom,

Glioblastom, (Hynes et al. 2005, Salomon et al. 1995). Neben der Überexpression des EGFR, konnte für einen Teil dieser Tumoren (Mammakarzinom, Bronchialkarzinom, Kopf-Hals-Tumoren) zusätzlich ein schlechterer Krankheitsverlauf / Prognose gezeigt werden (Grandis et al. 1998, Harris et al. 1992, Hynes et al. 2005, Mendolson 2002).

Im Prostatakarzinom wurde in einigen Studien, unter Verwendung der Immunhistochemie, eine Häufigkeit der Überexpression des EGFR von 1 bis 100% gezeigt (Di Lorenzo et al. 2002, Shuch et al. 2004, Zellweger et al. 2005). Zusätzlich konnte ein statistischer Zusammenhang zwischen der hohen EGFR- Expression und der Tumorprogression oder der Entwicklung einer Androgenunabhängigkeit in diversen Studien mit Prostatakarzinomen gezeigt werden (Di Lorenzo et al. 2002, Schafer et al. 2006, Visakorpi et al. 1992).

Mit dem Erscheinen von Medikamenten, die als Angriffsziel die Tyrosinkinase inhibieren oder als Antikörper den EGFR blockieren, wie es z.B. bereits bei der Therapie des Bronchialkarzinoms und des Kolonkarzinoms Verwendung findet, ist der EGFR in den Mittelpunkt der Aufmerksamkeit gerückt. Bemerkenswert ist auch, dass Mutationen in den Exons des EGFR-Gens zu einem besseren Ansprechen einer Therapie mit Tyrosinkinaseinhibitor beim Bronchialkarzinom führen. Über solche Mutationen beim Prostatakarzinom ist nichts bekannt.

2. FRAGESTELLUNG

Angeregt durch diese Entwicklung, war es das Ziel dieser Arbeit, diese Zusammenhänge auch für das Prostatakarzinom zu untersuchen, zumal es bis zum heutigen Zeitpunkt keine vergleichbare Untersuchung mit einem vergleichbar großen Patientenkollektiv im Hinblick auf den EGFR und seiner prognostischen Relevanz für das Prostatakarzinom gegeben hat. Die Untersuchung eines großen Kollektivs, ist mit Hilfe der Tissue-Micro-Array (TMA)-Technologie möglich gewesen. In einem weiteren Schritt wurde der EGFR auf Amplifikation und Mutationen untersucht.

Könnte ein Zusammenhang zwischen der Prognose und dem EGFR aufgezeigt werden, so böte sich an, auch in Zukunft diesen dann als prognostisch relevant anzuerkennenden Marker in weiteren Studien zu untersuchen und mit den mittlerweile zur Verfügung stehenden Medikamenten als therapeutischen Angriffspunkt in Betracht zu ziehen.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Patientenkollektiv

Das Untersuchungsmaterial umfasste bei dieser Arbeit 3261 radikal operierte Prostaten, die im Institut für Urologie zwischen den Jahren 1992 und 2005 entnommen wurden. Für 2385 Patienten lagen entsprechende Follow-up-Daten vor, die einen Beobachtungszeitraum von einem bis 144 Monaten umfassten (im Durchschnitt 34 Monate). Neben den Follow-up-Daten enthielt die Datenbank, die von der Klinik für Urologie des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf für diese Arbeit zur Verfügung gestellt wurde, zusätzlich noch Informationen über den präoperativen PSA-Wert, die TNM-Klassifikation, den Gleason-Score, das Tumolvolumen und den Status der Absetzungsränder. Alle in der Arbeit verwendeten Prostaten waren bereits in Paraffin eingebettet. Zudem standen eine Reihe, zu den jeweiligen Paraffinblöcken passende, hämatoxylin- und eosin gefärbte Schnitte zur Verfügung.

3.2 Vorbereitung

Der erste Schritt bestand zunächst einmal in dem Heraussuchen, der für die Arbeit in Frage kommenden hämatoxylin- und eosin gefärbten Schnitte aus den Archiven. Die geeigneten Gewebe wurden anhand der bereits erwähnten Datenbank ausgewählt. Von den mehreren, pro Tumor vorhandenen Schnitten, wurden die mit der größten auf dem Objektträger vorgezeichneten Tumorfäche ausgewählt. Die Größe spielte insofern eine Rolle, da zum einen mindestens drei 0.6 mm durchmessende Gewebeproben entnommen und damit das Spendergewebe nicht vollkommen aufgebraucht werden sollte, zum anderen würde ein entsprechend großer Tumor bei weiteren Fragestellungen genügend Material für weitere Forschungen zur Verfügung stellen. Die Schnitte wurden zur Sicherheit auf das Vorhandensein von Tumorgewebe nochmals einem Pathologen (PD Dr. Erbersdobler) vorgestellt, der die Schnitte unter mikroskopischer Sicht durchmusterte und die Tumorfäche mit einem

Filzstift erneut nachzeichnete. Erst nach diesem Vorgang folgte der nächste Schritt, der in dem Heraussuchen, der zu den Schnitten korrespondierenden Paraffinblöcke bestand. Die Schnitte und die dazu passenden Paraffinblöcke wurden anschließend in aufsteigender Reihenfolge nach dem Entnahmejahr sortiert. Mit der Vorbereitung konnte die Herstellung des **Tissue-Micro-Arrays** (TMA) beginnen.

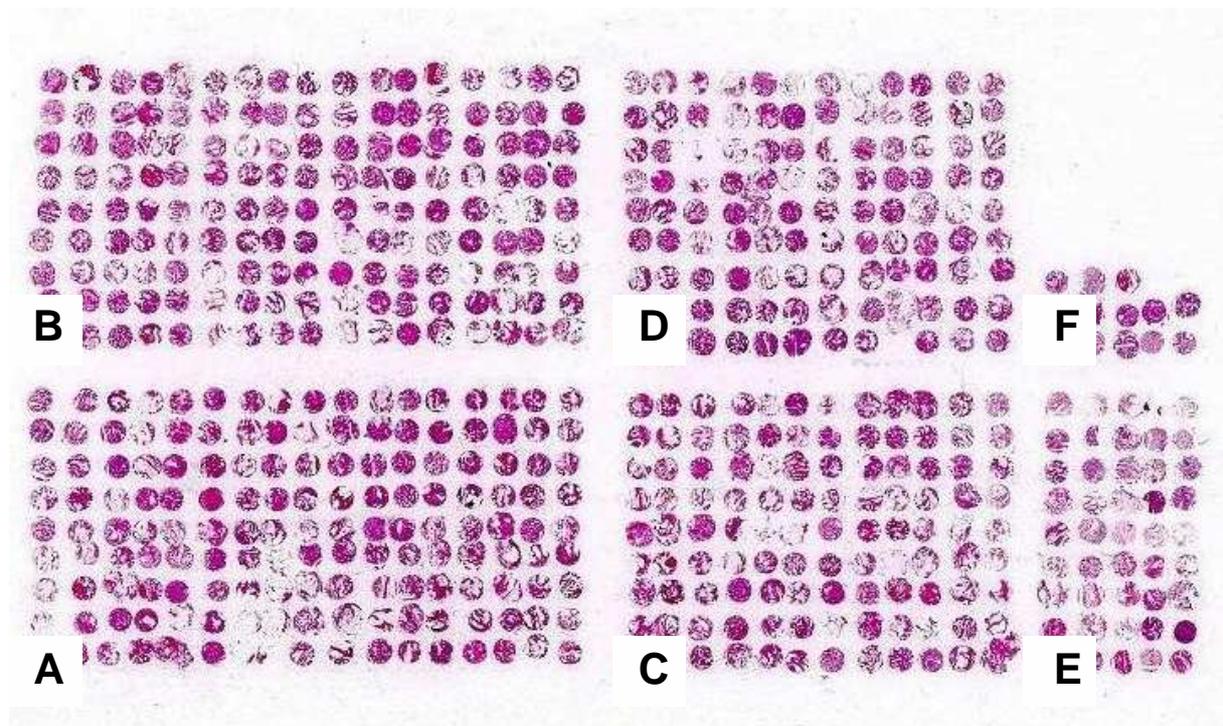
3.3 Prinzip des TMA

Die **Tissue-Micro-Array** (TMA)-Technologie stellt eine Technik dar, mit deren Hilfe eine große Vielzahl an Gewebe kostengünstig und schnell untersucht werden kann. Bei dieser Methode werden jeweils 0,6 mm durchmessende Zylinder, aus dem im Paraffin eingebetteten, zu untersuchenden Tumorgewebe entnommen und auf einen neuen Empfängerparaffinblock gegeben. Aufgrund des geringen Durchmessers der Stanzen (0,6 mm), finden auf einem Empfängerblock mehrere hundert Stanzen Platz. So wird es möglich, beispielsweise ein Kollektiv von mehreren hundert Präparaten auf einem Block zu erfassen. Dieses Kollektiv kann dann mit Hilfe von in situ-Techniken auf der DNA-, RNA- und Proteinebene gleichzeitig und kostengünstig untersucht werden (Kuefer et al. 2004).

Mit der TMA-Technik werden die Stanzen in einem Koordinatensystem angeordnet. Der Empfängerblock wird zunächst in verschiedene Quadranten geteilt. Jeder dieser Quadranten, der jeweils mit einem Großbuchstaben bezeichnet wird, hat wiederum zwei Achsen, die x- und y-Achse. Die x-Achse wird mit den Zahlen nummeriert, während die y-Achse durch klein geschriebene Buchstaben skaliert wird. Um eine exakte Zuordnung der Stanzen zu ermöglichen, wird eine Datei angelegt, in der jedem Präparat durch die Präparatnummer eine Koordinate zugeordnet wird. Die Verknüpfung eines bestimmten Tumors und seiner Lokalisation, ist ab diesem Zeitpunkt nur noch über diese Datei möglich. Desweiteren werden auch weitere relevante Informationen aufgenommen. Somit entsteht für eine Koordinate ein ganzer Datensatz (Bubendorf et al. 2001). Der in dieser Arbeit erstellte Array enthielt insgesamt sechs Quadranten, von denen die ersten vier (A – D) aus dem Prostatatumorgewebe bestanden, während die beiden kleineren Quadranten E und F

das Kontrollgewebe enthielten. Von den erstellten sieben Arrays enthielten alle bis auf den letzten 623 Stanzen pro Array (Abb. 2).

Abb. 2: Tissue-Micro-Array: Quadranten A-D mit Prostatatumorgewebe; Quadranten E und F mit Kontrollgewebe



3.4 Einsatzmöglichkeiten der TMAs

Durch die TMAs ergibt sich eine Vielzahl an Einsatzmöglichkeiten. Je nach Zielsetzung können sie konstruiert / zusammengestellt werden.

Besteht beispielsweise das Interesse des Untersuchers darin, ein bestimmtes Protein und seine Expression innerhalb unterschiedlicher Tumoren zu erforschen, bietet diese Technik die Möglichkeit, viele Stanzen unterschiedlicher Entitäten auf nur einem Objektträger zu platzieren. Diese können im sogenannten Multitumorarray gleichzeitig untersucht werden.

Eine weitere Variante stellt der Progressionsarray dar. Hier werden unterschiedliche Stadien, Vorstufen und Differenzierungsgrade eines Tumors in einem Array zusammengetragen. Anhand dieses Arrays wird dann die Veränderung der Expression eines bestimmten Proteins, in Abhängigkeit vom Stadium, untersucht.

Geeignet für einen solchen Progressionsarray wäre z.B. das Prostatakarzinom. So fänden sich auf einem solchen Array, neben Proben aus dem Karzinom, auch die aus Krebsvorstufen und Metastasen.

Die Möglichkeit zur Erstellung eines Prognosearrays, bietet sich dem Untersucher dann, wenn zusätzlich neben den Gewebeproben auch Langzeitbeobachtungsdaten zur Verfügung stehen, wie im Fall dieser Studie.

Bei dem, in dieser Arbeit erstellten Array, handelte es sich um einen solchen Prognosearray. Das Augenmerk lag auf der Expression des EGFR. Durch die zur Verfügung stehenden Follow-up-Daten konnte die Überexpression dieses Proteins auf seine prognostische Relevanz hin untersucht werden.

3.5 Herstellung des PC-Arrays

Zur Herstellung des PC-Arrays wurde der Arrayer verwendet. Dies ist ein Gerät, das hauptsächlich aus den zwei, aber entscheidenden, Komponenten besteht: dem Kopf und den beiden Mikrometerschrauben, die den Kopf in x und y Richtung verschieben. Die Mikrometerschrauben werden über ein Programm gesteuert, in das man die x und y Koordinaten eingibt.

Der Kopf enthält zwei Instrumente, den Bohrer und die Hohlzylinder. Zwischen beiden Instrumenten kann man über einen Schiebemechanismus hin- und herschalten.

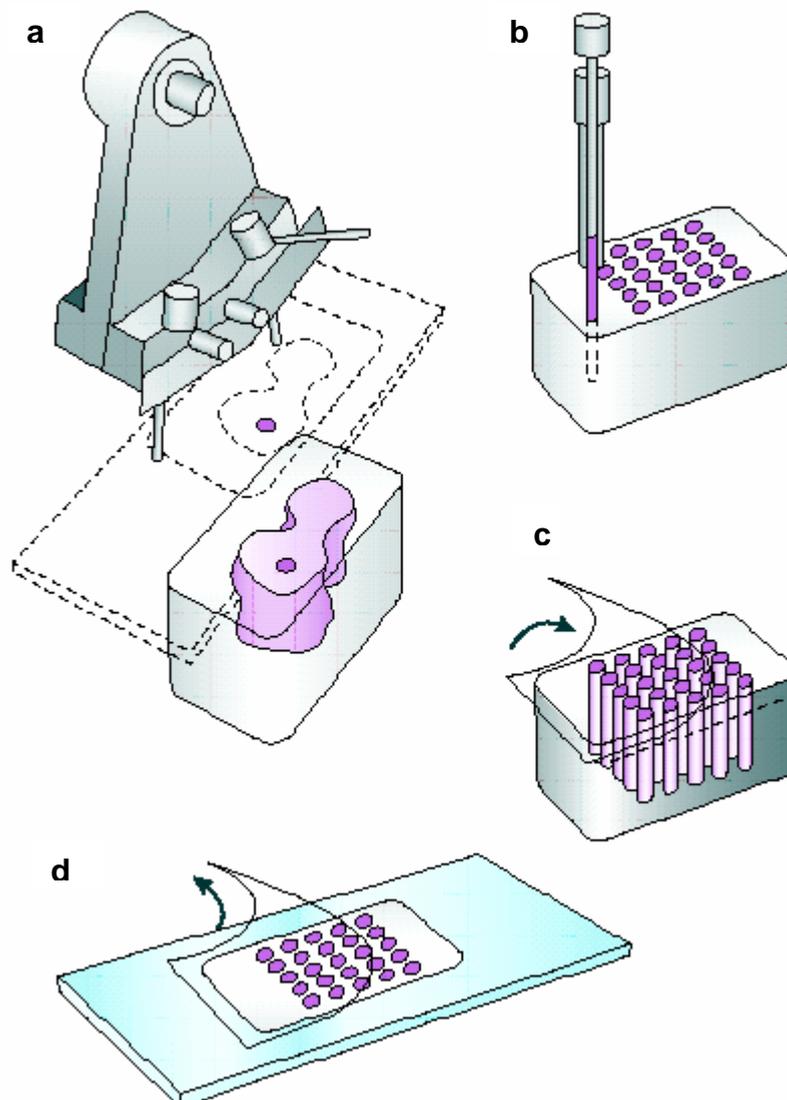
Mit dem 0,6 mm durchmessenden Bohrer, wird an einer vorher festgelegten Position ein Loch in den Empfängerparaffinblock gebohrt. Anschließend wird ein Tumorphinblock unter den Kopf platziert und unter Verwendung der Hohlzylinder, deren innerer Durchmesser 0,6 mm beträgt, ein Gewebezylinder gestanzt. Der Tumorphinblock wird entfernt. Der Gewebezylinder wird dann, durch einen genau in die Hohlzylinder passenden Stahldraht rausgedrückt und in das vorgefertigte Loch im Empfängerparaffinblock eingelassen. Ist dies erfolgt, wird der Kopf des Arrayers, mit Hilfe der Mikrometerschrauben, an die nächste Position gebracht. So verfährt man bis der Array vervollständigt ist (schematische Darstellung der TMA-Herstellung in Abb. 3).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden von jedem der sieben Arrays zwei Kopien erstellt, so dass im Ganzen 21 Arrays ($3 \cdot 7$) entstanden sind.

Um einen qualitativ hochwertigen Array herstellen zu können, bedarf es großer Erfahrung. Dies ist meist erst nach vielen Übungen, sprich hundert bis tausend erfolgten Stanzen, der Fall.

Abb. 3: Schematische Darstellung der TMA-Herstellung (Sauter et al. 2003)

a) Kopf des Arrayers mit Bohrer und Hohlzylinder, HE-Schnitt als Schablone und Tumorparaffinblock; b) Hohlzylinder mit Tumorgewebe, Array; c) und d) Übertragung eines TMA-Schnittes auf einen Objektträger



3.6 Immunhistochemie

Zur immunhistochemischen Färbung des EGFR wurden Schnitte der TMAs angefertigt. Diese wurden zunächst deparaffinisiert und mit der Pronase Typ XIV für 15 Minuten bei 37°C behandelt. Bei der Immunhistochemie wurde das Antikörper / Antigen Prinzip verwendet. Das zu detektierende Antigen war in diesem Fall EGFR Rezeptor. Dazu kam ein aus Hasen gewonnener Antikörper, der so genannte Primärantikörper, der an den EGFR bindet. Als primärer, gegen den EGFR gerichteter Antikörper, fungierte der im Hasen hergestellte Zymed® 20.005, verwendet in einer Verdünnung von 1:100. Der Nachweis dieses Primärantikörpers erfolgte mit der ABC (**A**vidin-**B**iotin-**C**omplex)-Technik (Hsu et al. 1981). Hierzu wurde das Vectastain Elite ABC kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA 94010) verwendet. Bei dem ABC-Kit handelte es sich zum einen um den sekundären, gegen den Primärantikörper gerichteten, aus einem Pferd hergestellten biotinylierten Antikörper und zum anderen um einen Avidin enthaltenden Peroxidasekomplex, in dem die hohe Affinität des Avidins zum Biotin ausgenutzt wird. Durch kovalente Bindung des Avidins am Biotin des Sekundärantikörpers, konnte so eine Kopplung des Enzymkomplexes bis hin zum EGFR nachvollzogen werden.

In einem letzten Schritt nun, in dem die Bindung der Antikörper und damit der EGFR selbst farblich dargestellt werden sollte, wurde ein chromogenes Substrat, das Diaminobenzidin, hinzugegeben, das durch die Peroxidase oxidiert und in dessen Folge farbig geworden ist.

Um sicher gehen zu können, dass auch nur der EGFR und der daran gebundene Komplex zur Farbentwicklung geführt hatte, wurde bei der Negativkontrolle die Applikation des Primärantikörpers ausgelassen.

3.6.1 Auswertung der Immunhistochemie

In die Bewertung wurden nur die, mit dem Antikörper angefärbten Membranen, miteinbezogen. Hierzu wurde ein aus der HER2-neu bekanntes Bewertungssystem, der so genannte DAKO-Score, verwendet. Das Ausmaß der Intensität wurde dabei mit einer Skala, die von 0, +, ++, bis +++ reichte, bewertet (Tabelle 3).

Tabelle 3: DAKO-Score

Score	Beschreibung
0	< 10 % der invasiven Tumorzellen überhaupt angefärbt
+	> 10 % der invasiven Tumorzellen mit inkompletter, membranständiger Färbereaktion
++	> 10 % der invasiven Tumorzellen mit kompletter, membranständiger Färbereaktion schwacher oder mäßiger Intensität
+++	> 10 % der invasiven Tumorzellen mit kompletter, membranständiger Färbereaktion starker Intensität

Die Ergebnisse wurden in drei Kollektive unterteilt. Tumoren mit dem Score 0 wurden als negativ gewertet. Die Scores ++ und +++ wurden als stark positiv gewertet. Wurden weder die einen, noch die anderen Kriterien erfüllt, so galt der Tumor als schwach positiv.

3.7 Fluoreszenz-in-situ Hybridisierung (FISH)

Für die FISH-Untersuchung wurde ein 4µm dünner Schnitt des TMAs verwendet. Die proteolytische Vorbehandlung wurde mit einem konventionellen Kit (Paraffin pretreatment reagent kit, Vysis, Downers Grove, IL) durchgeführt. Als Sonden wurden eine orangefarbene EGFR und eine grüne Centromer Sonde (PathVysis) verwendet. Vor der Hybridisierung wurden die TMAs entparaffinisiert, luftgetrocknet und dehydriert in 70%, 85% und 100% Ethanol. Die Denaturierung erfolgte für fünf Minuten bei 74° C in 70% Formamide-2 X SSC-Lösung. Nach der Hybridisierung über Nacht, bei 37° C in einer Feuchtkammer, wurden die Schnitte gewaschen und gegengefärbt mit µM DAPI in einer Antifade-Lösung. Für jeden Tumor wurde die durchschnittliche Kopienzahl der EGFR-Gene und die Anzahl der Centromere 7 ermittelt. Überstieg der Quotient aus den Genkopien und der Centromeranzahl 7 die 2.0, so galt das EGFR-Gen im Tumor als amplifiziert.

3.8 EGFR Mutationen

Nach der Untersuchung auf Amplifikation des EGFR-Gens, wurde eine kleine Anzahl von Tumoren auf Genmutationen untersucht. Dabei wurden alle Tumoren sequenziert, die in der Immunhistochemie stark angefärbt wurden, sowie die EGFR-Gen amplifizierten Prostatakarzinome. Insgesamt belief sich diese Gruppe der Tumoren auf 35 Exemplare. Die genomische DNA wurde, basierend auf Standardverfahren, gewonnen. Die „Macrodissection“ des Tumorgewebes erfolgte mit Hilfe eines Skalpells, um sicherzustellen, dass eine hohe Anzahl (>80%) von Tumorzellen mit der Probe gewonnen wurde. Für die Genanalysen des EGFR-Gens wurde die PCR genutzt. Das Augenmerk lag dabei auf der Amplifikation der Exons 18, 19, 20 und 21. Eine Mutation dieser Exons ist beim Bronchialkarzinom prädiktiv für das Ansprechen einer Therapie mit Tyrosinkinaseinhibitoren. Die mit der PCR amplifizierten Exons wurden mit aufeinander folgender Reihenfolge der PCR-Produkte angeordnet (Lynch et al. 2004)

3.9 Statistik

Die statistischen Berechnungen wurden mit der Software PRISM 2.01 (GraphPad, San Diego, USA) durchgeführt. Die Wahrscheinlichkeitstabellen wurden mit dem Chi²-Test und Fisher`s Exact Test berechnet. Die Überlebenskurven wurden mit Hilfe der Kaplan-Meier-Methode berechnet und mit dem Logranktest verglichen. Die Cox-Regression diente zur Abschätzung der Unabhängigkeit der präoperativen Faktoren und des EGFR-Status bei der Vorhersage des PSA – Wideranstiegs, nach radikaler Prostatektomie.

4. ERGEBNISSE

4.1 Technische Gegebenheiten

Nicht alle Stenzen konnten ausgewertet werden, wie in anderen TMA-Studien zuvor. Dies ist damit zu begründen, dass entweder die Stanze auf dem entsprechenden TMA-Schnitt an der entsprechenden Koordinate fehlte oder die Stanze kein eindeutiges Tumorgewebe in dem entsprechenden 34BE12 immungefärbten TMA-Abschnitt enthielt. Für die Immunhistochemie konnten 22,5% und für die FISH 28,1% der Stenzen nicht ausgewertet werden.

4.2 Immunhistochemie

Von den 2497 auswertbaren Stenzen waren 448 (18%) immunhistochemisch EGFR-positiv (Abb. 4). Nach den vordefinierten Kriterien, waren 415 (17%) dieser Stenzen nur schwach angefärbt, während 33 (1%) der Fälle stark angefärbt waren. Hierbei zeigte sich, dass das Ausmaß der immunhistochemischen Färbung stark mit dem Tumorstadium ($p < 0.0001$), der Höhe des Gleasongrades ($p < 0.0001$) und dem präoperativen PSA ($p = 0.0002$) zusammenhing. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Lymphknotenstatus ($p = 0.0563$) und positiven Absetzungsrändern ($p = 0.0867$) konnte nicht gezeigt werden (Tabelle 4).

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass das Ausmaß der EGFR-Expression signifikant mit der Prognose der Patienten zusammenhing (Abb. 5).

Abb. 4: Prostatakarzinom TMA, repräsentative Stanzen: a) EGFR negativer Tumor;
b) EGFR positiver Tumor

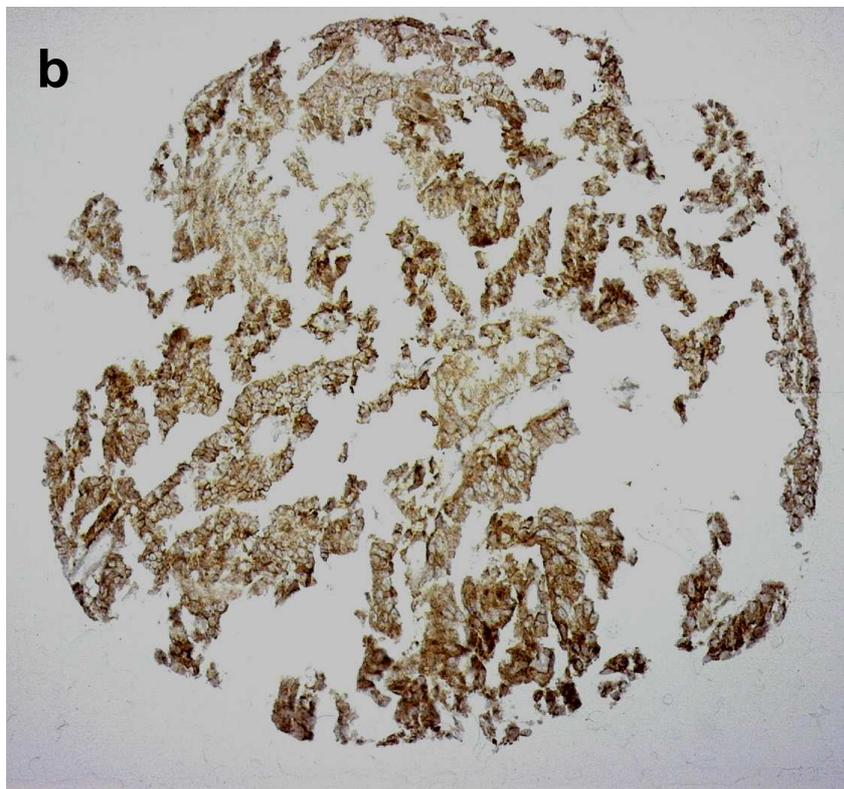
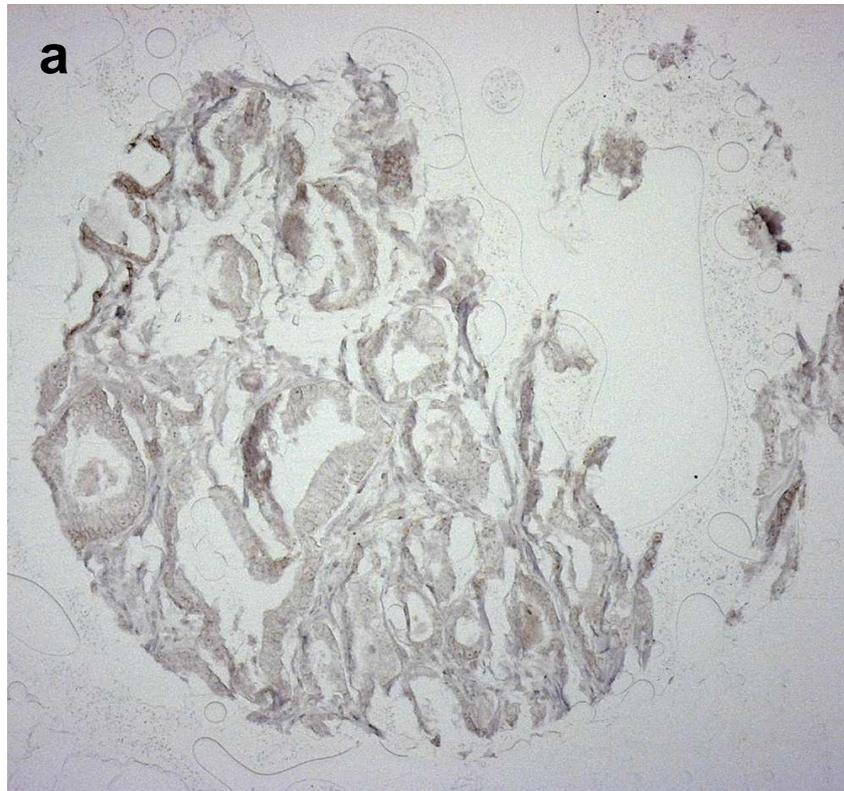
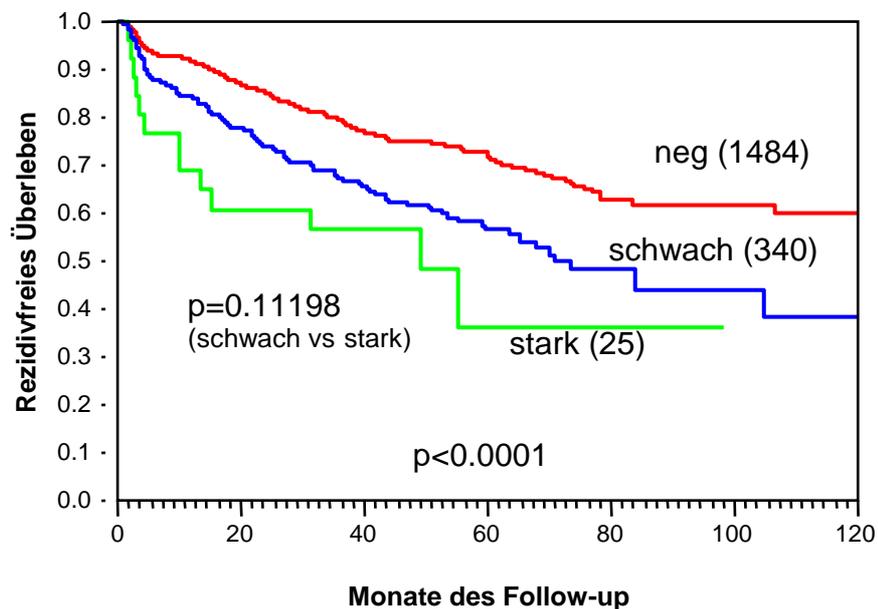


Tabelle 4: EGFR-Expression

		n	negativ (%)	schwach (%)	stark (%)	p-Wert
Alle Tumoren		2497	82.0	17.0	1.0	
Tumorstadium	pT2	1512	85.7	13.4	0.9	<0.0001
	pT3a	509	77.4	20.4	2.2	
	pT3b	310	73.5	24.8	1.6	
	pT4	38	63.2	34.2	2.6	
Gleasongrad	≤3+3	999	88.5	10.9	0.6	<0.0001
	3+4	1061	81.0	18.1	0.9	
	4+3	265	63.4	31.7	4.9	
	≥4+4	45	71.1	24.4	4.4	
Lymphknotenstatus	pN0	1275	78.4	19.8	1.9	0.0563
	pN+	82	72.0	28.0	0.0	
PSA	<4	365	86.0	13.4	0.5	0.0002
	4-10	1245	84.3	14.9	0.9	
	10-20	533	77.3	20.5	2.3	
	>20	196	75.5	21.4	3.1	
Absetzungsrand	neg	1870	82.8	16.0	1.2	0.0867
	pos	505	78.6	19.6	1.8	

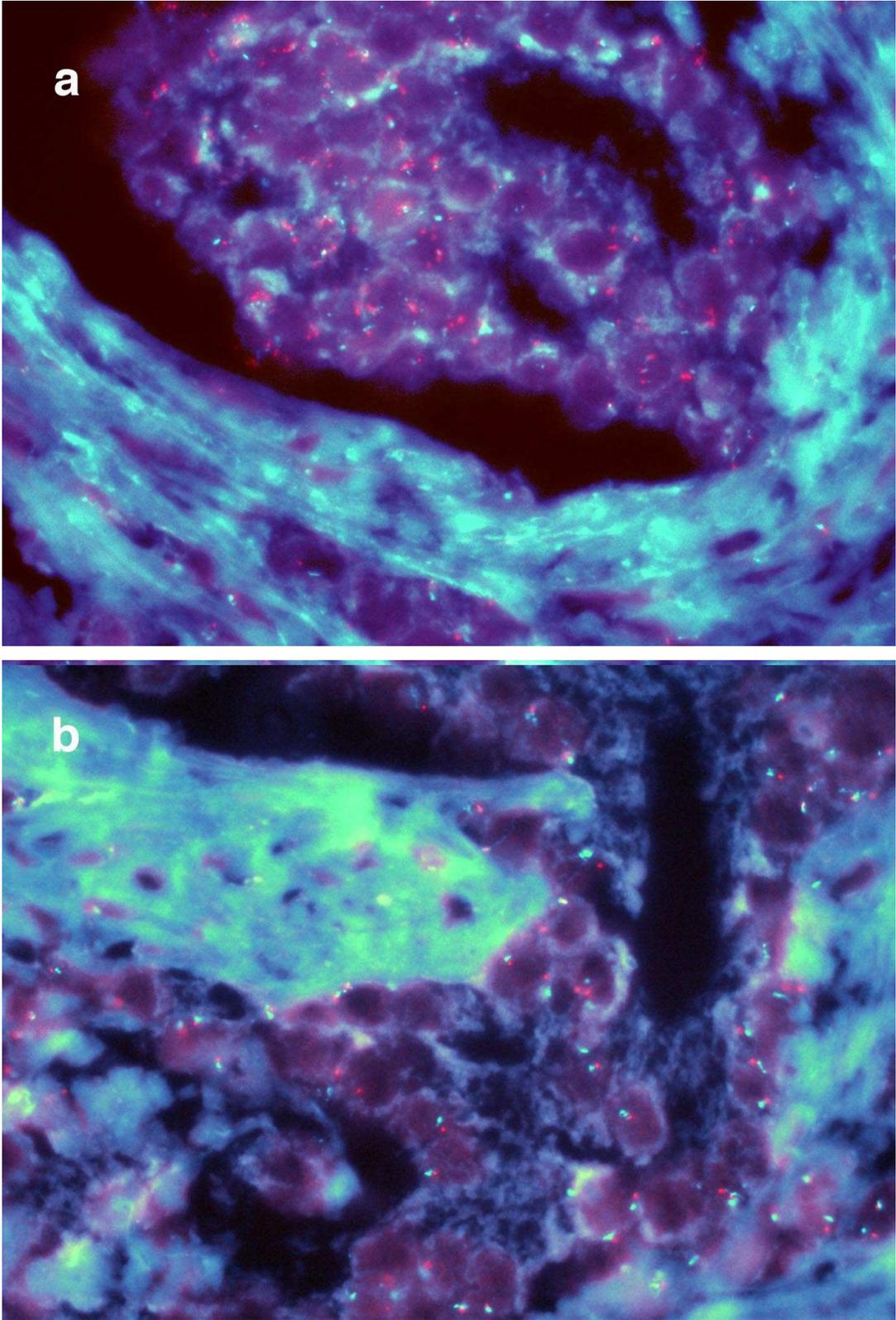
Abb. 5: EGFR-Expression und rezidivfreies Überleben bei Prostatakarzinompatienten



4.3 FISH

Für die FISH Untersuchung konnten 2446 Stenzen ausgewertet werden. Sie zeigten rote EGFR Signale und grüne Signale für die Centromere 7. Nach den vorher definierten Kriterien, zeigten sechs der 2446 Fälle (0.25%) eine Amplifikation. In einem dieser Tumoren, fand sich eine starke Amplifikation mit mehr als 20 Kopien des EGFR-Gens pro Zelle. Dieser Tumor wurde eingehender untersucht, um Aufschluss über die Heterogenität der Amplifikation in Erfahrung bringen zu können. Hierfür wurden alle verfügbaren Großflächenschnitte des Tumors ebenfalls auf eine Amplifikation untersucht. Dabei zeigte sich, dass nur etwa 30% des Tumors diese Amplifikation aufwies. Im restlichen Tumor wurden zwei bis vier Centromere 7 und zwei bis vier Kopien des EGFR pro Zelle gefunden (Abb. 6).

Abb. 6: Heterogenität der EGFR-Amplifikation im Prostatakarzinom. FISH Analyse, der EGFR (rote Signale) und Centromer 7 (grüne Signale)-Kopien, zeigt Bereiche mit EGFR-Amplifikation (a) und mit normaler EGFR Kopienzahl (b) beim gleichen Patienten.



Bei der Untersuchung stellte sich heraus, dass eine EGFR-Amplifikation gleichzeitig mit einer erhöhten Anzahl der Centromere 7 einherging. Dies deutete darauf hin, dass diese EGFR-Amplifikation ein Ergebnis einer Chromosomen 7-Polysomie war. Im Rahmen der FISH Untersuchung, konnten bei 2365 Tumoren zwei Kopien, bei 65 Tumoren drei bis vier Kopien, bei 15 Tumoren fünf bis sechs Kopien und bei einem einzigen Tumor im Durchschnitt mehr als sechs Kopien des Centromers 7 pro Zelle gefunden werden. Die Polysomie des Chromosoms 7 ging mit einem hohen präoperativen PSA ($p=0.0127$), einem fortgeschrittenem Tumorstadium ($p=0.0056$) und einem hohen Gleasongrad ($p<0.0001$) einher (Tabelle 5).

Tabelle 5: EGFR-FISH Ergebnisse

		Anzahl	Disomie (%)	Polysomie (%)	p-Wert
Alle Tumoren		2446	96.7	3.3	
Tumorstadium	pT2	1486	98.0	1.9	0.0056
	pT3a	494	96.6	3.4	
	pT3b	292	94.2	5.8	
	pT4	33	97.0	3.0	
Gleasongrad	≤3+3	983	99.0	1.0	<0.0001
	3+4	1028	97.0	3.0	
	4+3	253	91.7	8.3	
	≥4+4	42	95.2	4.8	
Lymphknotenstatus	pN0	1211	97.4	2.6	0.375
	pN+	78	95.5	4.5	
PSA	<4	360	98.6	1.4	0.0127
	4-10	1220	97.8	2.2	
	10-20	506	95.5	4.5	
	>20	191	95.8	4.2	
Absetzungsrand	negativ	1817	97.3	2.7	0.6512
	positiv	487	96.9	3.1	

Ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem erneuten Anstieg des PSA und der EGFR-Amplifikation konnte nicht gezeigt werden (Abb. 7).

Die Polysomie des Chromosoms 7 stand im starken Zusammenhang mit der EGFR-Expression ($p < 0.0001$) (Abb. 8). Eine EGFR-Anfärbung in der Immunhistochemie konnte in 16.6% der Tumoren mit zwei EGFR Signalen pro Zelle, in 41.3% der Tumoren mit drei bis vier Signalen, in 84.6% der Tumoren mit fünf bis sechs Signalen und in 50% der Tumoren mit mehr als sechs Signalen pro Tumor beobachtet werden ($p < 0.0001$).

Abb. 7: EGFR-FISH Ergebnisse und rezidivfreies Überleben

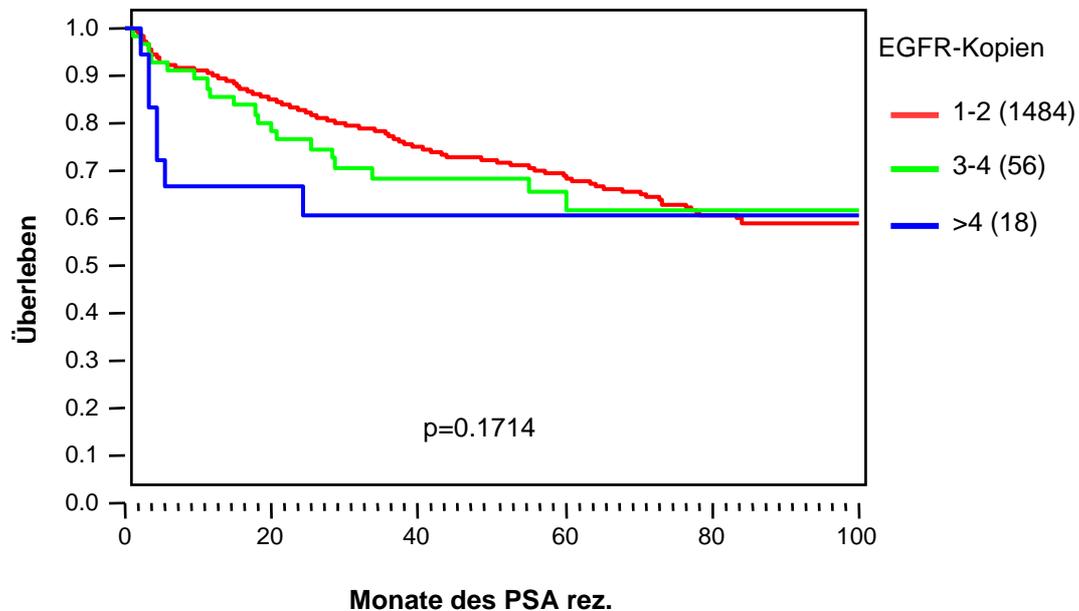
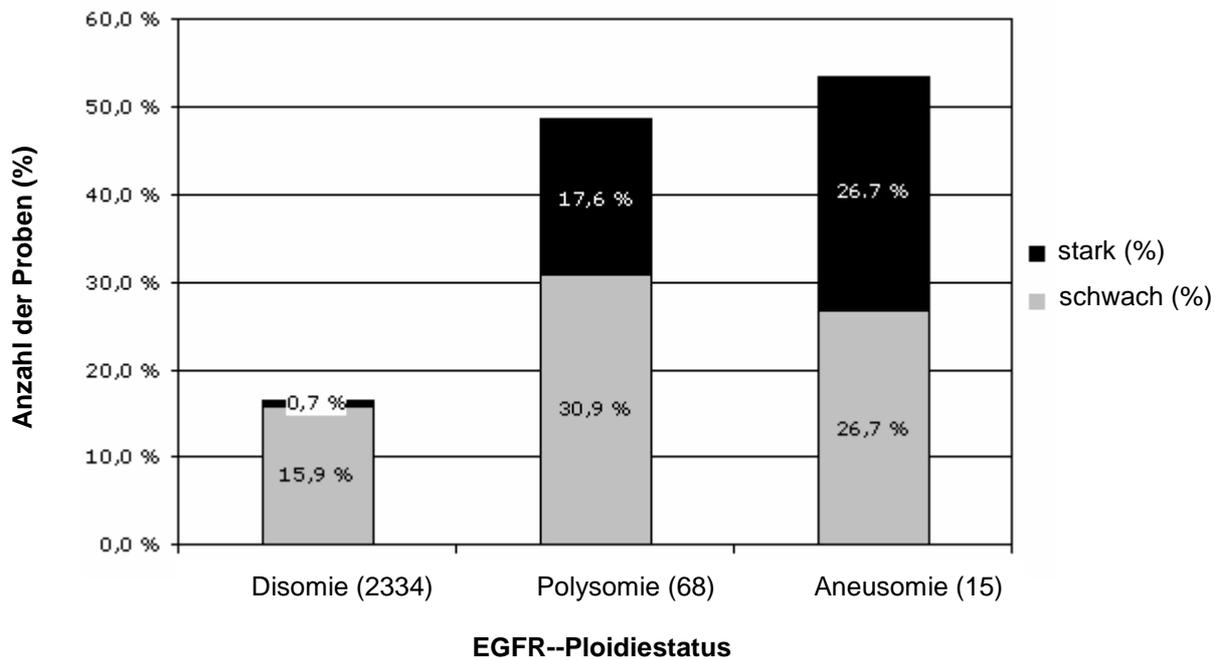


Abb. 8: Zusammenhang zw. der EGFR-Expression und Chromosom 7-Polysomie



4.4 Mutationen

Es konnten keine Mutationen in den Exons 18-21 der 35 sequenzierten Tumoren gefunden werden.

4.5 Multivariate Analyse in Hinblick auf die prognostischen Marker

Für 2397 Patienten bestanden Follow-up-Daten bezüglich des Wiederanstiegs des PSA als Ausdruck eines Rezidivs. Die Daten reichten von einem Monat bis zu 144 Monaten, wobei der Durchschnitt bei 34 Monaten lag. In dieser Patientensubgruppe, waren der hohe Gleasongrad, das fortgeschrittene Tumorstadium, die positive Absetzungsränder und ein hoher präoperativer PSA Wert jeweils stark mit dem Wiederanstieg des PSA assoziiert ($p < 0.0001$). In einer multivariaten Analyse unter Einbeziehung des Gleasongrades, des Tumorstadiums, der positiven Absetzungsränder und des präoperativen PSA Wertes, konnte weder für die EGFR – Expression, noch für die EGFR-Amplifikation ein unabhängiger Zusammenhang mit dem PSA Wiederanstieg gezeigt werden (Tabelle 6).

Tabelle 6: Multivariate Analyse (Cox regression model)

Parameter	Variable	RR	95% CI	p-Wert
Tumorstadium	pT2 vs pT3	1.07	0.90-1.26	<0.0001
	pT2 vs pT4	2.33	1.75-3.03	
Gleasongrad	≤3+3 vs 3+4	0.73	0.62-0.86	<0.0001
	≤3+3 vs 4+3	1.86	1.55-2.24	
	≤3+3 vs ≥4+4	2.36	1.71-3.17	
PSA	<4 vs 4-10	0.85	0.71-0.98	0.0027
	<4 vs 10-20	1.12	0.94-1.32	
	<4 vs >20	1.33	1.10-1.61	
Absetzungsrand	negativ vs positiv	1.23	1.10-1.36	0.0001
EGFR-Expression	negativ vs schwach	0.81	0.65-1.02	0.1098
	negativ vs stark	1.23	0.80-1.77	
EGFR-Amplifikation	2 vs 3-4	0.93	0.58-1.40	0.2329
	2 vs >4	0.86	0.57-1.26	

5. DISKUSSION

5.1 Methodendiskussion

Die Prostata wurde bereits in früheren Studien mit einer ähnlichen Fragestellung untersucht. Ein wesentlicher Unterschied dieser Arbeit im Vergleich zu den anderen Arbeiten, war aber das enorme Patientenkollektiv. So haben wir circa 2500 Prostaten auf EGFR-Expression und Amplifikation untersucht. Die Gewebekollektive in den anderen Arbeiten beinhalteten 74 bis 535 Fälle (Di Lorenzo et al. 2002, Hernes et al. 2004, Shuch et al. 2004, Visakorpi et al. 1992, Zellweger et al. 2005). In der Arbeit mit den 535 Fällen, sowie auch in den anderen Arbeiten, setzte sich das Gewebekollektiv jedoch im Gegensatz zu unserer Arbeit nicht nur aus lokal begrenzten, sondern auch aus weiter fortgeschrittenen Karzinomen zusammen. Dies erklärte die Unterschiede zwischen dieser und den anderen Arbeiten in der EGFR-Expression, die mit dem Fortschreiten des Karzinoms zunahm (Di Lorenzo et al. 2002).

Der Vorteil der TMA-Technik, gegenüber der konventionellen Großflächenschnittfärbung, bestand darin, dass die aus dem Spenderblock entnommenen Stenzen, bedingt durch ihre geringe Größe, weniger Schaden hinterlassen haben und an der Interpretierbarkeit des Tumorgewebes nichts geändert wurde. Des Weiteren könnte mit Hilfe der TMA – Technologie, die Anzahl der möglichen Untersuchungen an einem Tumor / Präparat, erheblich gesteigert werden. Ginge man beispielsweise von einem Tumor der Fläche 18 mm * 18 mm und einer durchschnittlichen Präparattiefe aus, so könnte man ca. 300 Schnitte anfertigen und untersuchen. Stanzte man diese Fläche gänzlich aus, ergäbe es ca. 300 Stenzen des Tumors, die auf 300 Empfängerblöcke gebracht werden könnten. Entspräche die Tiefe der Stanzzyylinder der des Tumors, so erhielte man circa 90 000 Untersuchungen (300 Stenzen * 300 Schnitte) (Bubendorf et al. 2001). In dieser erstaunlichen Ökonomisierung liegt ein großer Vorteil der TMA-Technik.

Dadurch, dass die Ergebnisse dieser Arbeit sich im Rahmen der Ergebnisse anderer Arbeiten, die sich mit der EGFR-Expression befassten, befanden, konnte ferner der Nutzen der TMA Technik bei der Untersuchung von molekularen Fragestellungen im Prostatakarzinom gezeigt werden. Unter Verwendung des gleichen TMAs wurden im Institut für Pathologie der Universitätsklinik Eppendorf die Zusammenhänge zwischen der Expression von p53, des HER2 und des Ki67 mit der Prognose des Prostatakarzinoms gezeigt.

Die Frage, die sich bei dieser Technik aufdrängte, war die nach der Repräsentierbarkeit der Stenzen. Dies ist besonders bei einem heterogenen Tumor, wie dem Prostatakarzinom von Bedeutung gewesen. In vielen Studien wurde die Verwendung von drei bis vier Stenzen pro Tumor empfohlen (Fernebro et al. 2002, Rubin et al. 2002). Diese Arbeiten untersuchten jedoch nur relativ kleine Gewebekollektive von 20 bis 600 Tumoren. In dieser Arbeit stand jedoch ein wesentlich größeres Kollektiv, von ca. 2500 Prostata, zur Verfügung. Unter diesen Bedingungen, ist es ausreichend gewesen, nur eine Stanze pro Tumor zu entnehmen. Diese Erkenntnis deckte sich mit den Ergebnissen anderer Studien (Nocito et al. 2001, Ruiz et al. 2006), die mit Hilfe der TMA-Technik ähnlich große Tumormengen, jeweils mit mehr als 2000 Tumoren, untersuchten. Die Arbeit von Nocito et al. 2001, ging zunächst der Frage nach der Repräsentierbarkeit der TMAs, unter Verwendung von 4 Stenzen, nach. Es stellte sich jedoch heraus, dass nicht nur die 4 Stenzen insgesamt repräsentativ gewesen sind, sondern auch jede einzelne für sich. Voraussetzung dafür, sei ein entsprechend großes Kollektiv (Torhorst et al. 2001). Zudem würde der Vorteil, der sich durch den sparsamen Materialgewinn aus dem Spenderblock / Präparat mit Hilfe der TMA-Technik ergibt, mit zunehmender Stanzzahl geschmälert. Je mehr Stenzen entnommen würden, umso mehr Material aus dem Spendertumor gehe verloren.

Eine weitere Frage, die sich stellte, war die nach der Antigenität der Präparate. Schließlich handelte es sich bei einigen Präparaten um Prostaten, die vor mehr als 10 Jahren in Paraffin eingebettet wurden. Nach dieser Zeit wären ein mechanischer und oxidativer Abbauprozess der DNA und andere Proteine im Laufe der Zeit nicht verwunderlich gewesen. Der Frage nach der Antigenität gingen mehrere Studien nach. So gab es bereits in früheren Studien Hinweise, auf ihren Erhalt in Paraffin eingebetteter Gewebe (Ibrahim et al. 1997, Shibata et al. 1988). Hier wurde nach dem Vorhandensein von Antigenen geforscht, es wurde jedoch kein Vergleich in der Quantität der Antigene zwischen älteren und neueren Geweben gezogen. Diese Lücke wurde im Jahre 2000, unter Verwendung eines TMAs, geschlossen (Camp et al. 2000). In dieser Arbeit wurden Gewebe aus sechs Dekaden miteinander verglichen. Dort fand man keinen wesentlichen Unterschied unter den unterschiedlich alten Geweben in der Expression der Antigene. Demzufolge hatte das Alter der hier verwendeten Gewebe, keinen Einfluss auf die Ergebnisse. Zumal das älteste Präparat nur 144 Monate alt gewesen ist.

5.2 Ergebnisdiskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden von den 2497 untersuchten Proben, 18% der Tumoren auf EGF-Rezeptorpositivität angefärbt. In elf vorangegangenen Studien, die sich mit der Expression des EGFR befassten, konnte im Durchschnitt eine EGFR-Expression von 35% gezeigt werden. Dabei reichte die Spanne der Expression von 1% (Zellweger et al. 2005) bis 86% (Visakorpi et al. 1992) der Fälle für lokalisierte Tumoren und von 16% (Zellweger et al. 2005) bis 100% (Di Lorenzo et al. 2002) der Fälle bei Metastasen. Die Ergebnisse dieser Arbeit, ließen einen Zusammenhang zwischen der Höhe der EGFR-Expression und der Prognose der Patienten vermuten. Diese Ergebnisse stimmten ebenfalls mit den Ergebnissen anderer Studien, die einen Zusammenhang zwischen der EGFR-Expression und dem Progresses des Prostatakarzinoms zeigen konnten, überein (Di Lorenzo et al. 2002, Hernes et al. 2004, Shuch et al. 2004, Visakorpi et al. 1992).

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die Amplifikation des EGFR-Gens beim Prostatakarzinom, zu untersuchen. In verschiedenen Studien, die sich mit der Amplifikation des EGFR-Gens in anderen Tumoren befassten, belief sich die Amplifikation auf drei bis vier Genkopien. In dem untersuchten Prostatakarzinomkollektiv wurde dieser Zustand in 65 (2,7%) der Tumoren gefunden. Der gleichzeitige Anstieg der Centromere des Chromosoms 7, mit der Zunahme der EGFR-Genanzahl, ließ den Schluss nahe, dass diese Genanzahl-Vermehrung auf eine Polysomie des Chromosoms 7 zurückzuführen war.

Der eindeutige Zusammenhang einer solchen geringen Genkopienanzahl-Erhöhung, mit einer EGFR-Proteinexpression, verdeutlichte die starken Auswirkungen von minimalen DNA Kopienanzahl-Vermehrungen auf die EGFR-Genexpression. Diese Ergebnisse stimmten ebenfalls mit den Daten einer rapide zunehmenden Anzahl von Studien überein, die CGH-Arrays mit den RNA-Expression-Screeningdaten verglichen (Wolf et al. 2004). In diesen Studien fand man regelmäßig eine signifikante RNA-Überexpression, im Zusammenhang mit einer leichten Erhöhung der entsprechenden Gene auf der DNA-Ebene (Dehan et al. 2007). Diese leichte Erhöhung der Genkopienanzahl schien es zu ermöglichen, wie bereits in einer wachsenden Anzahl von Studien gezeigt werden konnte, eine Prognose über das Ansprechen, auf Anti-EGFR basierenden Therapien, machen zu können.

So fand man diese Zusammenhänge zum Beispiel bei der Untersuchung von Lungen- und Gehirntumoren (Cappuzzo et al. 2005, Haas-Kogan et al. 2005, Hirsch et al. 2005, Takano et al. 2005). In diesen Tumoren fand man jedoch eine weitaus höhere Amplifikation, als in den hier untersuchten Prostatakarzinomen, bei denen die leichte Erhöhung der Genkopienanzahl auf der Chromosomenpolysomie beruhte. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass nur ca. 0,7% der Prostatakarzinome in $\geq 40\%$ der Zellen ≥ 4 EGFR Kopien hatten.

Zukünftig wird sich zeigen, ob Prostatakarzinome mit einer leichten Erhöhung der EGFR Genkopienanzahl von einer Anti-EGFR Therapie, wie es bereits für andere Tumoren gezeigt werden konnte, profitieren werden.

Die Bedeutung einer hochgradigen Genamplifikation, als Mechanismus für eine EGFR-Überexpression, variiert stark zwischen unterschiedlichen Karzinomtypen. So ist beispielsweise die Genamplifikation, in nahezu 100% aller EGFR positiven Glioblastome und der großen Mehrheit aller EGFR positiven ösophagalen Plattenepithelkarzinome (Hanawa et al. 2006, Shinojima et al. 2003), für die EGFR-Überexpression verantwortlich. In vielen anderen Tumoren, wie zum Beispiel dem Lungenkarzinom, spielt die EGFR-Amplifikation als Ursache für die EGFR-Überexpression, eine untergeordnete Rolle. So ist auch beim Prostatakarzinom die EGFR-Amplifikation offensichtlich selten und kommt in den meisten Fällen auf niedrigem Niveau vor. Bei nur einem von sechs Prostatakarzinomen, die nach unseren vordefinierten Kriterien als amplifiziert galten, konnte eine typische hochgradige Amplifikation, die mit einer hohen Anzahl mehrerer EGFR-Signale pro Chromosom einherging, gefunden werden. Aufgrund der bekannten, guten Ansprechrate von EGFR-amplifizierten Lungenkarzinomen auf eine Anti-EGFR-Therapie (Takano et al. 2005), könnten die EGFR-amplifizierten Prostatakarzinome, ebenfalls eine Indikation zur Evaluierung neuer Einsatzgebiete der Anti-EGFR Medikamente darstellen. Um weiterhin den potentiellen Nutzen dieser speziellen Therapie beim Prostatakarzinom abschätzen zu können, wurde die gesamte Tumormasse des Prostatakarzinoms, mit der höchsten Amplifikation, eingehender untersucht. Es stellte sich heraus, dass die Amplifikation des EGFRs nicht gleichmäßig im Tumor verteilt war und nur in ca. 30 % der Tumormasse gefunden werden konnte.

Diese heterogene Amplifikation im Tumor, könnte andererseits ein Hindernis für eine gezielte Krebstherapie darstellen. Eine ungleichmäßige Verteilung der Angriffsziele einer Therapie in einem Primärtumor, könnte zu unterschiedlichen Ergebnissen / Erfolgen bei entsprechender Therapie der dazugehörigen Metastasen, und folglich zu einem Therapieversagen führen. Die ungleichmäßige Verteilung von therapeutischen Targets, wurde in den letzten Jahren nur selten untersucht. Dies liegt wahrscheinlich daran, dass das zurzeit am besten untersuchte, therapeutische Angriffsziel, das HER2-neu beim Mammakarzinom ist. Dessen Amplifikation komplett homogenen ist. Es ist möglich, dass Heterogenität weitaus häufiger in anderen Genen und in anderen Organen zu finden ist. Dies könnte der Grund für unerwartete, aber bedeutsame Probleme, bei der zukünftigen, gezielten Krebstherapie sein.

Tatsächlich wurde kürzlich in unveröffentlichten Untersuchungen des Instituts für Pathologie, ebenfalls mehrere Fälle von heterogener EGFR-Amplifikation beim Lungenkarzinom beobachtet.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine Erhöhung der EGFR-Expression häufig im Prostatakarzinom zu finden ist und mit einem erhöhten Risiko des PSA-Wiederanstiegs einhergeht. Die hohe EGFR-Expression wird häufig durch eine Polysomie des EGFR verursacht, ein Umstand, der mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit zu einem hohen Ansprechen einer Therapie mit IRESSA® beim Prostatakarzinom führen könnte. Obwohl in den 35 untersuchten Karzinomen keine EGFR-Genmutationen gefunden worden ist und die einzige hohe Genamplifikation inhomogen war, könnten weitere Nachforschungen für den potentiellen Nutzen von Anti-EGFR-Medikamenten beim Prostatakarzinom von Wert sein.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Der Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) ist ein, am Progress vieler Tumoren beteiligtes, Protein und ein wichtiges therapeutisches Ziel. Um die Bedeutung des EGFR für das Prostatakarzinom zu erforschen, untersuchten wir ca. 2500 Prostatakarzinome mit den dazugehörigen Follow-up-Daten auf der Protein- und DNA-Ebene.

Die Untersuchung dieses großen Kollektivs ist mit Hilfe eines Tissue-Micro-Arrays möglich gewesen. Die Tumoren wurden mit Hilfe der Immunhistochemie und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) untersucht. Ein Teil der Karzinome wurde außerdem auf EGFR Exon 18-21 Mutationen sequenziert.

Von den 2497 auswertbaren Stenzen waren 448 (18%) immunhistochemisch EGFR-positiv. Hierbei zeigte sich, dass das Ausmaß der EGFR-Expression stark mit dem Tumorstadium ($p < 0.0001$), der Höhe des Gleasongrades ($p < 0.0001$) und dem präoperativen PSA ($p = 0.0002$) zusammenhing. Die Analyse mit der FISH, wurde mit zwei Sonden, eine für das Centromer 7, und eine für das EGFR-Gen, durchgeführt und zeigte eine EGFR-Amplifikation in 3.3 % der Fälle. Bei der Untersuchung stellte sich heraus, dass die EGFR-Amplifikation gleichzeitig mit einer erhöhten Anzahl der Centromere 7 einherging. Dies deutete darauf hin, dass diese EGFR-Amplifikation ein Ergebnis einer Chromosom-7-Polysomie war. Die Amplifikation stand im starken Zusammenhang mit der EGFR-Expression ($p < 0.0001$), einem hohen Gleasongrad ($p < 0.0001$) und einem fortgeschrittenem Tumorstadium ($p = 0.0056$). Nur in einem Tumor fand sich eine starke Amplifikation mit mehr als 20 Kopien des EGFR-Gens pro Zelle. Diese Amplifikation war heterogen und umfasste nur etwa 30% des Tumors. Es konnten keine Mutationen in den Exons 18-21 der 35 sequenzierten Tumoren gefunden werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass eine erhöhte EGFR-Expression häufig im Prostatakarzinom zu finden ist und mit einem erhöhten Risiko eines Rezidivs einhergeht ($p < 0.0001$). Der eindeutige Zusammenhang niedriger Genkopienanzahl-Erhöhung mit einer EGFR-Proteinexpression verdeutlichte die starken Auswirkungen von minimalen DNA-Kopienanzahl-Vermehrungen auf die Expression. Der mögliche Nutzen von Anti-EGFR-Medikamenten könnte weiterer Nachforschungen Wert sein.

7. LITERATURVERZEICHNIS

American Cancer Society. Cancer Facts and Figures 2005. Atlanta, Ga:
American Cancer Society; 2005.

Bertz J, Giersiepen K, Haberland J et al. (2006) Krebs in Deutschland – Häufigkeiten und Trends, 5. Auflage. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.

Blute M L, Bergstralh E J, Iocca A, Scherber B, Zincke H (2001) Use of Gleason Score, prostate specific antigen, seminal vesicle and margin status to predict biochemical failure after radical prostatectomy.
The Journal of Urology Vol. 165: 119-125

Blute M L, Bergstralh E J, Partin A W, et al. (2000) Validation of Partin tables for predicting pathological stage of clinically localized prostate cancer.
The Journal of Urology Vol. 164: 1591-1595.

Boyle P, Ferlay J (2004) Cancer incidence and mortality in Europe, 2004.
Annals of Oncology Vol. 16: 481-488

Bubendorf L, Nocito A, Moch H, Sauter G (2001) Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughput in situ studies.
Journal of Pathology Vol. 195: 72-79

Camp R L, Charette L A and Rimm D L (2000) Validation of Tissue Microarray Technology in Breast Carcinoma.
Laboratory Investigation Vol. 80: 1943-1949

Cappuzzo F, Hirsch FR, Rossi E, et al. (2005) Epidermal growth factor receptor gene and protein and gefitinib sensitivity in non-small-cell lung cancer.
J Natl Cancer Inst Vol. 97: 643-655

Catalona W J (1995) Surgical management of prostate cancer: contemporary results with anatomic radical prostatectomy.

Cancer Vol. 75: 1903-1908

Catalona W J, Smith D S (1994) 5-year tumor recurrence rates after anatomical radical retropubic prostatectomy for prostate cancer.

The Journal of Urology Vol. 152: 1837-1842

Cook L S, Goldoft M, Schwartz S M, Weiss N S (1999) Incidence of adenocarcinoma of the prostate in asian immigrants to the united states and their descendants.

The Journal of Urology Vol. 161: 152-155

Damber J E, Khatami A (2005) Surgical treatment of localized prostate cancer.

Acta Oncologica Vol. 44: 599-604

Dehan E, Ben-Dor A, Liao W, et al. (2007) Chromosomal aberrations and gene expression profiles in non-small cell lung cancer.

Lung Cancer Vol. 56: 175-184

Di Lorenzo G, Tortora G, D'Armiento FP, et al. (2002) Expression of epidermal growth factor receptor correlates with disease relapse and progression to androgen independence in human prostate cancer.

Clin Cancer Res Vol. 8: 3438-44

Epstein J I, Partin A W, Sauvageot J (1996) Prediction of Progression Following Radical Prostatectomy: A Multivariate Analysis of 721 Men with Long-term Follow-up.

The American Journal of Surgical Pathology Vol. 20: 286-292

Epstein J I, Pizov G, Walsh P C (1993) Correlation of pathologic findings with progression after radical retropubic prostatectomy.

Cancer Vol.71: 3582-3593

Fernebro E, Dictor M, Bendahl P O, Fernö M, Nilbert M (2002) Evaluation of the Tissue Microarray Technique for Immunohistochemical Analysis in Rectal Cancer. Arch Pathol Lab Med Vol. 126: 702-705

Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. Krebs in Deutschland 2003-2004 Häufigkeiten und Trends 6. überarbeitete Auflage, 2008
Gleason DF (1992) Histologic grading of prostate cancer: a perspective. Human Pathology Vol. 23: 273-279

Gleason D F, Mellinger G T (1974) Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. The Journal of Urology Vol. 111(1): 58-64

Grandis J R, Melhem M F, Gooding W E, et al. (1998) Levels of TGF- α and EGFR protein in head and neck squamous cell carcinoma and patient survival. J Natl Cancer Inst Vol. 90: 824-832

Haas-Kogan DA, Prados MD, Tihan T, et al. (2005) Epidermal growth factor receptor, protein kinase B/Akt, and glioma response to erlotinib. J Natl Cancer Inst Vol. 97: 880-887

Hanawa M, Suzuki S, Dobashi Y, et al. (2006) EGFR protein overexpression and gene amplification in squamous cell carcinomas of the esophagus. International Journal of Cancer Vol. 118: 1173-1180

Hankey B F, Feuer E J, Clegg L X et al. (1999) Cancer Surveillance Series: Interpreting Trends in Prostate Cancer-Part I: Evidence of the Effects of Screening in Recent Prostate Cancer Incidence, Mortality, and Survival Rates. J Natl Cancer Inst Vol. 91: 1017-1024

Harris A L, Nicholson S, Sainsbury R, Wright C, Farndon J (1992) Epidermal growth factor receptor and other oncogenes as prognostic markers. Journal of the National Cancer Institute. Monographs Vol. 11: 181-187

Helpap B. (1997) Männliches Genitale – Prostata In: Städtler F,
Springer-Verlag Berlin Heidelberg (Pathologie Band 5, 2.Auflage, S.68-91)

Hernes E, Fossa SD, Berner A, et al.(2004) Expression of the epidermal growth factor receptor family in prostate carcinoma before and during androgen independence.

Br J Cancer Vol. 90: 449-454

Hirsch FR, Varella-Garcia M, McCoy J, et al. (2005) Increased epidermal growth factor receptor gene copy number detected by fluorescence in situ hybridization associates with increased sensitivity to gefitinib in patients with bronchioloalveolar carcinoma subtypes: a Southwest Oncology Group Study.

J Clin Oncol Vol. 23: 6838-6845

Hsing A W, Tsao L, Devesa S S. (2000) International trends and patterns of prostate cancer incidence and mortality.

Int J Cancer Vol. 85: 60-67

Hsu S M, Raine L, Fanger H (1981) Use of Avidin-Biotin-Peroxidase Complex (ABC) in Immunoperoxidase Techniques: A Comparison between ABC and Unlabeled Antibody (PAP) Procedures.

J Histochem Cytochem Vol. 29: 577-580

Hull G W, Rabbani F, Abbas F, Wheeler T M, Kattan M W, Scardino P T (2002) Cancer control with radical prostatectomy alone in 1000 consecutive patients.

The Journal of Urology Vol. 167: 528-534

Hynes N E and Lane H A (2005) ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors.

Nat Rev Cancer Vol. 5: 341-354

Ibrahim S O, Johannessen A C, Vasstrand E N, Lillehaug J R and Nilsen R (1997) Immunohistochemical detection of p53 in archival formalin-fixed tissues of lip and intraoral squamous cell carcinomas from Norway.

APMIS Vol. 105: 757-764

Kuefer R, Hofer M D, Gschwend J E, Rubin M A (2004) Tissue-Microarrays: Ein Hochdurchsatzverfahren zur Verifizierung potentieller Biomarker.

Der Urologe [A] Vol. 43: 659-667

Lynch T J, Bell D W, Sordella R et al. (2004) Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib.

N Engl J Med Vol. 350: 2129-2139

Mendelsohn J (2002) Targeting the epidermal growth factor receptor for cancer therapy.

J Clin Oncol Vol. 20: 1-13

Nocito A, Bubendorf L, Tinner E M, Süess K, Wagner U, Forster T, Kononen J, Fijan A, Bruderer J, Schmid U, Ackermann D et al. (2001) Microarrays of bladder cancer tissue are highly representative of proliferation index and histological grade.

Journal of Pathology Vol. 194: 349–357

O'Dowd G J, Veltri R W, Orozco R et al. (1997) Update on the Appropriate Staging Evaluation for Newly Diagnosed Prostate Cancer.

The Journal of Urology Vol. 158: 687-698

Oliver S E, May M T, Gunnell D (2001) International trends in prostate-cancer mortality in the “psa era”.

Int J Cancer Vol. 92: 893-898

Parkin D M, Whelan S L, Ferlay J and Raymond L and Young J (1997)

Cancer Incidence in Five Continents, Vol. VII. IARC Scientific Publications No. 143, International Agency for Research on Cancer, Lyon

Partin A W, Yoo J, Carter H B, et al. (1993) The use of prostate specific antigen, clinical stage and Gleason score to predict pathological stage in men with localized prostate cancer.

The Journal of Urology Vol. 150: 110-114

Peller E A, Young D C, Marmaduke D P, Marsh W L, Badalament R A (1995) Sextant prostate biopsies: A histopathologic correlation with radical prostatectomy specimens.

Cancer Vol. 75: 530- 538

Potosky A L, Miller B A, Albertsen P C, Kramer B S (1995) The Role of Increasing Detection in the Rising Incidence of Prostate Cancer.

The Journal of the American Medical Association Vol. 273: 548-552

Rubin M A, Dunn R, Strawderman M, Pienta K J (2002) Tissue Microarray Sampling Strategy for Prostate Cancer Biomarker Analysis.

The American Journal of Surgical Pathology Vol. 26(3): 312–319

Ruiz C, Seibt S, Kuraya K A, Siraj A K, Mirlacher M, Schraml P, Maurer R, Spichtin H, Torhorst J, Popovska S, Simon R and Sauter G (2006) Tissue microarrays for Comparing molecular features with proliferation activity in breast cancer.

Int. J. Cancer Vol. 118: 2190-2194

Salomon D S, Brandt R, Ciardiello, Normanno N (1995) Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies.

Critical Review in Oncology/Hematology Vol. 19: 183-232

Sauter G, Simon R and Hillan K (2003) Tissue microarrays in drug discovery.

Nat Rev Drug Discov Vol. 2: 962-972

Schafer W, Funke PJ, Kunde D, et al. (2006) Intensity of androgen and epidermal growth factor receptor immunoreactivity in samples of radical prostatectomy as prognostic indicator: correlation with clinical data of long-term observations.

The Journal of Urology Vol. 176: 532-7.

Scher H I, Isaacs J T, Zelefsky M J, Scardino P T. Prostate cancer. In:
Abeloff M D, Armitage J O, Lichter A S, Niederhuber J E, eds. Clinical Oncology.
2nd ed. New York, NY: Churchill Livingstone; 2000:1823-1884

Schwarz R (2003) Kurative Radiotherapie des lokalisierten Prostatakarzinoms –
Behandlungsverfahren und Ergebnisse.
Urologe [A] Vol. 42: 1212-1220

Shibata D, Martin W J, and Arnheim N (1988) Analysis of DNA sequences in forty-
year-old paraffin-embedded thin-tissue sections: A bridge between molecular biology
and classical histology.
Cancer Res Vol. 48: 4564-4566

Shinojima N, Tada K, Shiraishi S, et al. (2003) Prognostic value of epidermal growth
factor receptor in patients with glioblastoma multiforme.
Cancer Res Vol. 63: 6962-6970

Shuch B, Mikhail M, Satagopan J, et al. (2004) Racial disparity of epidermal growth
factor receptor expression in prostate cancer.
J Clin Oncol Vol. 22: 4725-4729

Stamey T A, McNeal J E, Yemoto C M, Sigal B M, Johnstone I M (1999) Biological
determinants of cancer progression in men with prostate cancer.
JAMA Vol. 281(15): 1395-1400

Takano T, Ohe Y, Sakamoto H, et al. (2005) Epidermal growth factor receptor gene
mutations and increased copy numbers predict gefitinib sensitivity in patients with
recurrent non-small-cell lung cancer.
J Clin Oncol Vol. 23: 6829-6837

Torhorst J, Bucher C, Kononen J, Haas P, Zuber M, Köchli O R, Mross F, Dieterich
H, Moch H, Mihatsch M, Kallioniemi O P and Sauter G (2001)
Tissue Microarrays for Rapid linking of Molecular Changes to Clinical Endpoints.
American Journal of Pathology Vol. 159: 2249-2256

Visakorpi T, Kallioniemi OP, Koivula T, et al. (1992) Expression of epidermal growth factor receptor and ERBB2 (HER-2/Neu) oncoprotein in prostatic carcinomas. Mod Pathol Vol. 5: 643-8.

Wolf M, Mousses S, Hautaniemi S, et al. (2004) High-resolution analysis of gene copy number alterations in human prostate cancer using CGH on cDNA microarrays: impact of copy number on gene expression. Neoplasia Vol. 6: 240-247

Wullbrand A, Erbersdobler A, Henke R.-P. (2000) Pathomorphologie des Prostatakarzinoms. Onkologe Vol. 6: 97-104

Yarden Y and Sliwkowski M X (2001) Untangling the ErbB signalling network. Nat Rev Mol Cell Biol Vol. 2: 127-137

Zellweger T, Ninck C, Bloch M, Mirlacher M, Koivisto P A, Helin H J, Mihatsch M J, Gasser T C, Bubendorf L (2005) Expression patterns of potential therapeutic targets in prostate cancer. Int J Cancer Vol. 113: 619-28.

DANKSAGUNG

Als erstes möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Guido Sauter für die Möglichkeit der Promotion und die Überantwortung des Themas bedanken.

Ganz besonders herzlich möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Andreas Erbersdobler für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung und geduldige Unterstützung bedanken.

Frau Martina Mirlacher und allen Mitarbeitern des Labors danke ich für die Hilfe bei der praktischen Umsetzung.

Des Weiteren gilt mein Dank Herrn PD Dr. rer. nat. Ronald Simon für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung und Dr. med. Thorsten Schlomm für die inhaltlichen Anregungen.

Schließlich möchte ich mich ganz besonders bei meinen Eltern für ihre großartige Unterstützung bedanken.

LEBENS LAUF

Name Patrick Kirstein
*21. Juli 1982, in Gdingen, Polen

Anschrift St. Georgstr. 11
20099 Hamburg

Schul Ausbildung

1988 - 1992 Heinrich - Wolgast - Schule, Grundschule in Hamburg

1992 - 2001 Gymnasium Klosterschule in Hamburg

Hochschulausbildung

seit 10/2002 Studium der Humanmedizin am Universitätsklinikum Hamburg
Eppendorf

08/2004 1.Abschnitt der ärztlichen Prüfung 2004

seit 08/2007 Praktisches Jahr

Beginn der Dissertation

seit 2005 „Prognostische Bedeutung von EGFR Alterationen beim
Prostatakarzinom“, Institut für Pathologie,
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Hamburg, den 25.04.2008

Patrick Kirstein

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel, nicht benutzt und, die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen, einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes, kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt, oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Patrick Kirstein