Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Institute für Pathologie

Direktor: Professor Dr. med. Guido Sauter

Anwendung von MALDI (matrix-assisted laser desorption/ionization) Imaging zur Identifikation von relevanten biologischen Veränderungen auf TMA (Tissue Microarrays) und Großschnittflächen

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg vorgelegt von

Alia Rashed

aus Hamburg

Hamburg 2013

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 23.06.2014

Veröffentlicht mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am:

Prüfungsausschuss, Vorsitzender: Prof. Dr. med. G. Sauter

Prüfungsausschuss, 2.Gutachter: Prof. Dr. H. Schlüter

Prüfungsausschuss, 3.Gutachter: PD Dr. H.-J. Kreienkamp

Meiner Familie in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis und Fremdwörter	IV
1. Einleitung	1
1.1. Allgemeine Einleitung	1
1.2. Das Prostatakarzinom	4
1.2.1. Epidemiologie	4
1.2.2. Ätiologie	5
1.2.3. Pathogense	6
1.2.4. Einteilung	6
1.2.5. Klinik	11
1.2.6. Diagnose	11
1.2.7. Therapie	13
1.2.8. Prognose und prognostische Marker	16
1.3. Proteomics	18
1.4. ERG	19
1.5. Massenspektrometrie	21
1.5.1. Apparative Grundlagen	21
1.6. Zielsetzung	29
2. Materialien und Methoden	30
2.1. Identifikation von geeigneten Fällen aus dem Gefriergewebe Archiv	30
2.2. Gesamtprostaten	31
2.3. Anfertigung und Beurteilung von HE- Schnitten	32
2.4. Tissue Microarray (TMA)- Herstellung	33
2.5. MALDI (matrix-assisted laser desorption/ionization)	36
2.5.1. Probenvorbereitung	36
2.5.2. Schneidevorgang	37
2.5.3. Matrix-Auftragung mit dem ImagePrep	37
2.5.4. Robotergesteuertes Besprühen	38
2.5.5. Aufnahme des optischen Bildes	39
2.5.6. Histologische Färbung der Schnitte	39
2.6. Statistik	40
3. Resultate	40
3.1. Tissue Microarray Qualität	40

3.2. Immunhistochemie	44
3.3. MALDI Untersuchungen des ERG- TMAs	46
3.4. MALDI Untersuchungen am MALDI Prostata-Heterogenitäts-TMA	48
4.Diskussion	52
5. Zusammenfassung	62
6. Literaturverzeichnis	64
7.Danksagung	75
8. Eidesstattliche Versicherung	76

Abkürzungsverzeichnis und Fremdwörter

AMACR Alpha-Methylacyl CoA-Racemase

CGH Vergleichende Hybridisierung von Patienten-und Referenz-DNA an

Metaphase-Chromosomen

Da Dalton

DNA Desoxyribonukleinsäure

EGFR Epidermaler Wachstumsfaktor- (growth-factor) Rezeptor

ERG Ets related gene

ETS E-twenty-six

ESI MS Electrospray ionization mass spectrometry

FFPE Formalin-fixiertes paraffin eingebettetes Gewebe

FISH Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

fPSA freies PSA

G Grading

Gy Gray

HE Hämatoxylin-eosin-Färbung

keV kiloelektronen Volt

IR Infrarot

LWS Lendenwirbelsäule

LH-RH-Agonisten synthetische Analoga des Neurohormons Gonadotropin-Releasing-

Hormon

MEKK2 Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 2

MALDI Matrix-assisted laser desorption/ionization

MS Massenspektrometrie

nm Nanometer

NSCLC Non-small cell lung cancer

PAP Prostatic acid phosphatase

PIN Prostatische intraepitheliale Neoplasie

PSA Prostataspezifisches Antigen

PTEN Phosphatase and Tensin homolog

P53 Protein 53 (53 KDa)

TMA Tissue Microarray

TMPRSS2 transmembrane protease serine 2

TNM Tumor-Nodulus-Metastase (Klassifikation)

TOF Time of flight

tPSA Total-PSA

TRUS Transrektaler Ultraschall

UKE Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

UV Ultraviolett

WHO World Health Organisation

1. Einleitung

1.1. Allgemeine Einleitung

Das Prostatakarzinom ist der häufigste maligne Tumor des Mannes. Allein in Deutschland erkranken jährlich ca. 58 000 Männer an Prostatakarzinomen und ca. 11 000 versterben an dieser Erkrankung (Robert- Koch- Institut). Die Prognose von Prostatakarzinomen ist im Einzelfall schwierig vorauszusagen, sodass häufig Unsicherheiten darüber bestehen, ob und welche Therapie bei den Patienten durchgeführt werden soll. Autopsiestudien haben gezeigt, dass die überwiegende Mehrzahl der Prostatakarzinom-Patienten nicht an ihrem Prostatakarzinom versterben (Haag, Hanart, Müller, 2008). In den letzten Jahren wurden zahlreiche neue Erkenntnisse über die Biologie und Genetik von Prostatakarzinomen gewonnen. Von besonderer Bedeutung ist die Tatsache, dass ca. 50% der Prostatakarzinome durch Fusionen oder Translokationen charakterisiert sind, welche letztlich einen Vertreter der ETS Familie von Transkriptionsfaktoren in den Einfluss eines Promoters eines androgenabhängigen Gens bringen (Rahim, S., Üren, A. 2013). Paradebeispiel ist die TMPRSS2- ERG Fusion welche ca. bei 50% der Prostatakarzinome beschrieben wurde (Clark et al., 2009). Es wird von verschiedenen Autoren postuliert, dass fusionspositive Tumore anders auf eine antiandrogene Therapie ansprechen als fusionsnegative Tumoren (Attard et al., 2009; Karnes et al., 2010).

Da die existierenden Erkenntnisse zur molekularen Biologie des Prostatakarzinoms trotz allem immer noch nicht ausreichen, die klinischen Verläufe von Prostatakarzinomen hinlänglich zu verstehen, muss davon ausgegangen werden, dass zahlreiche relevante Veränderungen uns immer noch nicht bekannt sind. Zahlreiche verschiedene molekulare Screening Methoden wurden in der Vergangenheit beim Prostatakarzinom eingesetzt mit dem Ziel bisher nicht bekannte Aberrationen nachzuweisen. Mittels comparative genomic hybridisation (CGH) bzw. Array- CGH wurden zahlreiche chromosomale Deletionen identifiziert, welche beim Prostatakarzinom gehäuft vorkommen (Sun et al., 2007). Dazu gehören beispielsweise Deletionen von p10, 3p14, 5q,6q,8p, 12q, 16q, welche alle mit einer Häufigkeit von 10% der Fälle vorkommen (Tylor et al., 2010; Lapointe et al., 2007;El Gammal et al., 2010.) Interessenterweise kommen beim Prostatakarzinom Deletionen wesentlich

häufiger vor als Zugewinne von Chromosomenmaterial (Taylor et al., 2010; Sun et al., 2007; Mao et al., 2011; Huang et al., 2011; Krohn et al., 2013). Mittels Expressionscreening Methoden (cDNA- Arrays) wurden zahlreiche beim Prostatakarzinom über- bzw. unterexpremierte Gene gefunden. Derartige Untersuchungen waren die Basis für die Identifizierung von beispielsweise AMACR als weitgehend karzinomspezifisches Protein (Carter et al., 2004). Die AMACR Expressionsuntersuchung wird heute bei der Karzinomdiagnostik standardmäßig eingesetzt. Auch proteomische Screeining Methoden wurden beim Prostatakarzinom eingesetzt, wobei zwei und dreidimensionale Gelauftrennungsverfahren verwendet wurden oder auch massenspektrometrische Verfahren (Cazares et al., 2009; Schlomm et al., 2007). Derartige Studien hatten zum Nachweis von MEKK2 und Ki-67 als prostatakarzinomassoziierte Proteine geführt (Rubin et al., 2002). Der gemeinsame Nachteil aller genannten molekularen Screening Methoden ist, dass zwar sämtliche Moleküle eines bestimmten Typs in einer Untersuchung bestimmt werden können, sich die Untersuchung dennoch auf einen kleinen Teil eines Tumors reduziert. Aussagen über eine mögliche Heterogenität eines Tumors können somit nicht getroffen werden.

Die in diesem Projekt verwendete MALDI Technik umgeht diesen Nachteil. Bei diesem Verfahren werden Gewebeschnitte systematisch mit einem Abstand von 50 Mikrometer zwischen den Analyseorten mit einem Laser beschossen, wonach ionisierten/deionisierten Massen auf einer "Spot by Spot" Basis analysiert werden können. Erste Untersuchungen an Tumorgeweben deuten daraufhin, dass diese Methode in der Pathologie diagnostisch verwendet werden könnten (Caprioli et al., 2005; Schwamborn, Caprioli et al., 2010). Leider sind die bisher durchgeführten Studien zur klinischen Relevanz von MALDI Imaging Befunden relativ klein (Schwamborn, Caprioli et al., 2010). Dies ist dem Umstand geschuldet, dass sie nicht von Pathologiezentren sondern eher von Grundlagenforscher initiiert und durchgeführt wurden. Die Voraussetzung für eine umfassende Analyse der möglichen Nutzbarkeit der MALDI Technik in der pathologischen Diagnostik ist an einem großen pathologischen Institut wie dem Institut für Pathologie des UKE ungleich günstiger. An Tumorgeweben besteht an einem derartigen Institut kein Mangel und es liegt auch umfassende Expertise aus dem Bereich Tumorgewebe vor. Ein besonderer Vorteil für die Abklärung der klinischen Relevanz der MALDI Technik könnte auch die Verwendung der Tissue Microarray Technologie darstellen. Die Tissue Microarray (TMA) Technik erlaubt die gleichzeitige Untersuchung von hunderten von Gewebeproben auf einem einzigen Objektträger. Damit können in kurzer Zeit Studien mit großer Fallzahl absolviert werden.

Ziel der hier vorliegenden Untersuchung war es, einen Beitrag zu leisten zur Klärung der Frage, ob die MALDI Imaging Technologie für die diagnostische Pathologie von Bedeutung sein könnte. Zu diesem Zweck wurden zwei parallele Studien mit zwei verschiedenen Fragestellungen durchgeführt.

Die Daten der nachfolgenden Doktorarbeit zeigen, dass die MALDI Technologie beide Aufgabestellungen erfüllen kann.

1.2. Das Prostatakarzinom

1.2.1. Epidemiologie

Das Prostatakarzinom ist mit 20% der häufigste maligne Tumor des Mannes gefolgt vom Darm-und Lungenkrebs mit ca. 16% und 15% (Robert-Koch-Institut). Die Inzidenz des Prostatakarzinoms beträgt 120 pro 100 000 Männer über alle Altersklassen. Die Erkrankungsrate steigt bei über 75 Jährigen auf über 800 Fälle pro 100 000 Männer an (Robert Koch Institut, 2002).



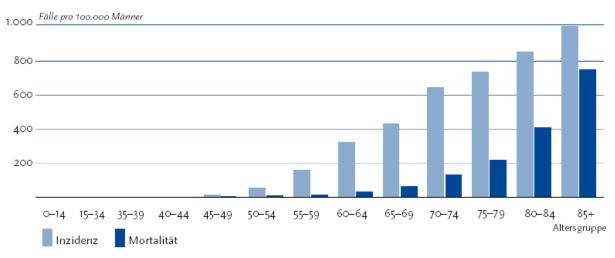


Abbildung 1: Inzidenz und Mortalität des Prostatakarzinoms in Deutschland

In Deutschland sterben jährlich 11000 Männer an Prostatakrebs und 58000 Prostatakarzinome werden neu diagnostiziert. Etwa 90% aller Erkrankten sind älter als 60 Jahre, wobei das mittlere Erkrankungsalter bei 70 Jahren liegt. Vor dem 50. Lebensjahr treten Erkrankungsfälle selten auf (Krebs in Deutschland, 2006). Das Prostatakarzinom macht 10% aller Krebstodesfälle bei Männern in Deutschland aus und liegt nach Lungen- und Darmkrebs an dritter Stelle. Die Inzidenz des Prostatakarzinoms hat in den letzten Jahren zugenommen, dies dürfte auf die intensivierte Diagnostik mittels PSA- Bestimmung zurück zuführen sein (Robert-Koch-Institut). Die Sterberate ist über die Jahre relativ konstant geblieben. Das Risiko für Männer in ihrem Leben an einem Prostatakarzinom zu erkranken beträgt 1:6 (Hayat et al., 2007). Mit zunehmendem Alter steigt die Prävalenz des

Prostatakarzinoms steil an (Breslow et al., 1977). Die 5- Jahres- Überlebensrate liegt in Deutschland bei 80% (Robert-Koch-Institut). Bei diesem Tumor handelt es sich mehr als 97% um ein Adenokarzinom, welches eine drüsige Differenzierung aufweist.

1.2.2. Ätiologie

Die Äthiopathogenese des Prostatakarzinoms ist multifaktoriell. Das ansteigende Alter stellt jedoch den bedeutendsten Risikofaktor dar (Aus et al., 2005). Dabei sind mehr als 90% der Erkrankten älter als 60 Jahre (Robert-Koch-Institut). Auch ethnische Abstammung sowie genetische Dispositionen spielen eine Rolle (Verhage et al., 2003; Hautmann, Huland et al., 2006). Das Risiko an einem Prostatakarzinom zu versterben ist doppelt so groß, wenn ein Verwandter ersten Grades erkrankt ist. Sind zwei oder mehr Verwandte ersten Grades vor dem 55. Lebensjahr erkrankt, so ist das Risiko fünf bis elffach erhöht (Rohde et al. 2007). Es finden sich jedoch auch Veränderungen der Inzidenzrate nach Migration. So ist Beispielsweise die Inzidenzrate in Asien deutlich geringer als in Europa und Nordamerika. Jedoch zeigten die in die USA ausgewanderten Asiaten in der 2. Generation eine Prostataerkrankung in der gleichen Häufigkeit wie die amerikanischen Männer. Diese Studien dass Umweltfaktoren (Abgase, Luftverschmutzung) zeigen, Lebensgewohnheiten wie Rauchen, Übergewicht, fettreiche Lebensmittel, Alkohol- und Kaffeekonsum einen auslösenden Einfluss auf die Tumorentstehung haben (Whittemore, Wu et al., 1995; Hautmann, Huland et al., 2006). Des Weiteren wird ein Zusammenhang mit den männlichen Sexualhormonen diskutiert. Die Entstehung des Prostatakarzinoms wird durch androgene Stimulation z.B. mit Testostern begünstigt (Klocker, Culing et al., 1994).

1.2.3. Pathogense

Mehr als 97% der Prostatakarzinome sind Adenokarzinome (Adamietz et al., 2007). Sehr selten können auch anaplastische Karzinome, Urothelkarzinome, Plattenepithelkarzinome oder kleinzelliges Prostatakarzinom vorkommen. Auch Sarkome und Lymphome können in sehr seltenen Fällen in Erscheinung treten.

Dreiviertel der Prostatakarzinome haben ihren Ursprung in der peripheren Zone und in den hinteren Anteilen (zentralen Zone) (Haag, Hanart, Müller 2008).

Im fortgeschrittenen Stadium der Tumorerkrankung kann die Prostatakapsel durchbrochen und die umliegenden Strukturen infiltriert werden. Dabei kann der Tumor in die Harnblase, Rektum, Samenblase und Beckenbodenmuskulatur hineinwachsen und die Struktur sowie Funktion der betroffenen Organe stören. Die Metastasierung erfolgt lymphogen und hämatogen. Bei der lymphogenen Metastasierung sind die iliakalen, retroperitonealen und die paraaortalen Lymphknoten betroffen. Das Prostatakarzinom metastasiert hämatogen in die Wirbelsäule, Femur und Beckenknochen sowie seltener in die Lunge und die Leber (Brössner et al., 2001).

1.2.4. Einteilung

Das Grundgerüst zur Beurteilung der Prognose einer Tumorerkrankung ist das TNM- System.

Es teilt den Tumor in folgende Kategorien ein:

- organbegrenzt, organüberschreitend, Nachbarorgane infiltrierend (T-Kategorie)
- ohne/mit Lymphknotenmetastasen (N-Kategorie)
- ohne/mit Fernmetastasen (M-Kategorie) (Hautmann et al., 2010).

TNM- Klassifikation

TNM	Erklärung
Tx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
TO	Kein Anhalt für Primärtumor
T1	Klinisch inapparenter Tumor, weder tastbar
	noch in bildgebendem Verfahren sichtbar
T1a	Inzidentes Karzinom in weniger als 5% des
	resezierten Gewebes
T1b	Inzidentes Karzinom in mehr als 5% des
	resezierten Gewebes
T1c	Tumor durch Nadelbiopsie identifiziert
T2	Tumor auf Prostata begrenzt
T2a	Tumor infiltriert die Hälfte eines
	Prostatalappens
T2b	Tumor in über der Hälfte eines
	Prostatalappens
T2c	Tumor befällt beide Lappen
Т3	Tumor durchbricht die Prostatakapsel
T3a	Uni- und bilaterale extrakapsuläre
	Ausdehnung
T3b	Tumor infiltriert Samenblase
T4	Tumor infiltriert benachbarte Strukturen
	außer den Samenblasen
Nx	Regionale Lymphknoten wurden nicht
	untersucht
NO	Kein Anhalt für regionäre
	Lymphknotenmetastasen
N1	Regionäre Lymphknotenmetastasen
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen
M1a	Nichtregionäre Lymphknotenmetastasen
M1b	Knochenmetastasen
M1c	Fernmetastasen anderer Lokalisation

Abbildung 2 : Klassifikation des Prostatakarzinoms nach der TNM- Klassifikation (Edge et al., 2010)

WHO-Grading

Grading von Tumoren ist ein Versuch seitens des Pathologen, um dem Kliniker eine Schätzung hinsichtlich des Wachstums und malignen Potential des Tumors zu ermöglichen (Mostofi et al., 1975).

Es werden die Gradingstufen G1, G2, G3 und G4 unterschieden:

GX	Differenzierungsgrad kann nicht bestimmt
	werden
G1	Gut differenziert (leichte Anaplasie)(Gleason
	2-4)
G2	Mäßig differenziert (mäßige Anaplasie)
	(Gleason 5-6)
G3-G4	Schlecht differenziert/undifferenziert
	(ausgeprägte Anaplasie) (Gleason 7-10)

Tabelle 1: frei erstellt nach Wittekind et al. ,2002

Das WHO- Grading wurde von Mostofi vorgestellt und 1980 von der WHO übernommen.

Gleason -Score

Die histologische Einteilung des Prostatakarzinoms erfolgt nach Donald F. Gleason (Gleason 1966). Die Gleason-Einteilung stützt sich auf das Drüsenmuster ohne Berücksichtigung der zytologischen Details. Hierbei werden fünf Wachstumsmuster von Gleason-Grad 1 (sehr gut differenziert) bis Gleason-Grad 5 (sehr niedrig differenziert) unterschieden (Humphrey et al., 2004).

Gleason beschrieb zudem eine positive Korrelation zwischen Entdifferenzierungsgrad der Drüsenarchitektur und Malignität der Erkrankung (Gleason und Mellinger 1974).

Die Gleason-Score berücksichtigt das gleichzeitige Auftreten verschiedener Wachstumsmuster in einem Prostatakarzinom. Dabei wird das am häufigsten vorkommende (primäre) Wachstumsmuster mit dem zweithäufigsten addiert (Bsp. 4+3=7). Die Summe der beiden Wachstumsmuster lässt Rückschlüsse auf den Malignitätsgrad des Tumors zu. Eine Gleason-Score von 2 (1+1) ist somit gleichbedeutend mit einer niedrigen Malignität bei sehr guter Differenzierung des Tumorgewebes und ein Gleason-Score von 10 (5+5) bei maximaler Entdifferenzierung, mit dem höchsten Malignitätsgrad.

Bei der Summe der beiden Wachstumsmuster muss darauf geachtet werden, dass sie aus verschiedenen Kombinationen von Primär- und Sekundärwerten zusammengesetzt sind (ausgenommen sind die Werte 2 und 10). Beispielsweise haben die Summen (3+4) und (4+3) den gleichen Gleason-Score (7), jedoch hat 4+3 eine ungünstigere Prognose, da hier der maligne Anteil des Gewebes überwiegt. Die Kombination der Werte aus denen sich der Gleason-Score zusammensetzt, sollte daher stets dokumentiert werden (Strauchbach et al., 2008).

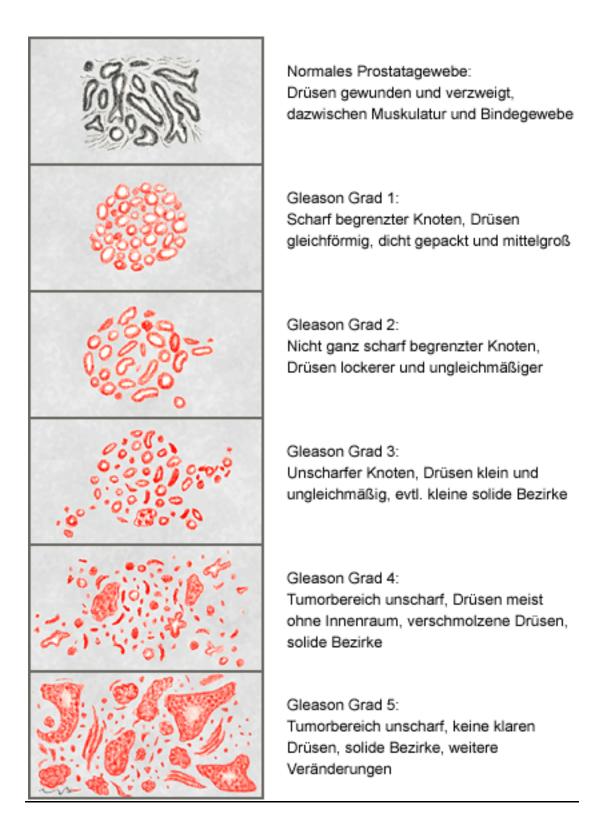


Abbildung 3: Die fünf Wachstumsmuster des Adenokarzinoms der Prostata nach dem modifizierten Gleason-Grading von 2005 (schematisiert nach D. F. Gleason, Human Pathology 1992 3: 273-279, J. I. Epstein et al., Am. J. Surg. Pathol. 2005 29: 1228-1242, und B. Helpap et al., Urologe 2007 46: 59-62)

1.2.5. Klinik

Im Frühstadium des Prostatakarzinoms haben die Patienten meist keine Symptome. Der Prostatakrebs ist somit häufig ein Zufallsbefund bei Obduktionen (latentes Prostatakarzinom).

Obstruktive Beschwerden sind selten, da über 70 % der Karzinome im peripheren dorsalen Anteil der Prostata lokalisiert sind. Obstruktive Beschwerden werden meistens durch benigne Prostatahyperplasien hervorgerufen (Eble et al., 2004; Eichenauer et al., 2003).

Im fortgeschrittenen Stadium kann es zu einer Beimengung von Blut im Urin sowie zu Blasenentleerungsstörungen (Dysurie, Pollakisurie) kommen.

Die ersten Symptome eines okkulten Prostatakarzinoms können Kreuz- oder Rückenschmerzen (ossäre Metastasierung durch Streuung über vertebrale Venen sein). Befallen sind vor allem LWS, Os Sakrum, Beckenknochen oder Femur (Haag, Hanart, Müller, 2008).

1.2.6. Diagnose

Die Diagnose kann auf verschiedene Art und Weisen erfolgen: Anamnese und urologische Untersuchung, durch abdominal und insbesondere transrektale Sonographie, laborchemisch durch Bestimmung von PAP und PSA sowie durch Biopsie. Die digital rektale Untersuchung und die Bestimmung des PSA-Wertes gehören zu den wichtigsten diagnostischen Methoden. Eine eindeutige Diagnose kann jedoch nur durch die Entnahme von Gewebeproben gestellt werden. Dabei erfolgt die Probenentnahme ultraschallgesteuert über den Mastdarm (transrektal). Es wird mindestens eine Sechsfach- Biopsie (rechter und linker Seitenlappen der Prostata je drei Proben) unter Antibiotikaschutz entnommen (Robert-Koch-Institut). Die transrektale Sonographie und die Ultraschall-gesteuerte transrektale Stanzung ermöglichten eine Verbesserung der Aufdeckrate des Prostatakarzinom bei Männern zwischen 55 und 70 Jahren von 0,8-1,7% auf 2,5% (Hautmann, Huland et al., 2006).

Ein Tumorstaging erfolgt durch Aufnahme eines Röntgen-Thoraxes, Sklettszintigraphie sowie MRT.

Stufendiagnostik

- ▶Anamnese inkl. Medikamentenanamnese
- Internationaler Prostata-Symptomscore (IPSS), mit welchem die bestehende Symptomatik mit einem Fragebogen klassifiziert werden kann (leicht-mittel-schwer), gut geeignet für eine Verlaufsbeurteilung
- ►Körperliche Untersuchung
- ►Abtasten der Prostata (digital-rektale Untersuchung)
- ▶Urinuntersuchungen inkl. Urinflussmessung
- ►Sonographie:
- Nieren: zum Ausschluss/Nachweis von Nierensteinen, Harnstau oder Tumor
- Prostata: zur Größenbestimmung, größere Genauigkeit durch transrektalen Schall
 (TRUS)
- Harnblase: wesentlich zur Restharnbestimmung
- ► Laboruntersuchungen (PSA-Bestimmung,

Infektionsdiagnostik, etc.)

Abbildung 4: Stufendiagnostik des Prostatakarzinoms (Robert-Koch-Institut)

1.2.7. Therapie

Die Therapie des Prostatakarzinoms ist abhängig vom klinischen Stadium, dem Gleason-Score und dem PSA-Wert (Eichenauer et al., 2003). Allgemein wird die Therapie des Prostatakarzinoms danach unterteilt ob es sich um einen organbegrenzten oder organüberschreitenden Tumor handelt.

<u>Therapie des lokal begrenzten Prostatakarzinoms:</u>

Operativ:

Voraussetzung für eine operative Therapie ist ein guter Allgemeinzustand sowie eine Lebenserwartung von mehr als 10 Jahren. Eine nervenschonende radikale Prostatektomie erfolgt im Stadium T1b, T2, T3, N0, M0. Dabei wird die gesamte Prostata inklusive Prostatakapsel, Endstücke der Samenleiter und Bläschendrüse entfernt (Prostatovesikuloektomie + regionäre Lymphadenektomie) (Haag, Hanart, Müller, 2008).

Die Komplikationen einer operativen Therapie sind Harninkontinenz, erektile Dysfunktion sowie Strikturen an der Harnröhrenanastomose.

Strahlentherapie:

Wenn bei schlechtem Allgemeinzustand eine operative Therapie nicht möglich ist oder durch den Patienten abgelehnt wird, kann eine strahlentherapeutische Behandlung durchgeführt werden. Dabei stehen zwei Verfahren zur Verfügung: die Bestrahlung von außen (externe 3-D-Konformationsbehandlung) und die Brachytherapie (Ultraschall-gesteuertes Einbringen von sog. Radioaktiven Seeds). Die Bestrahlung von außen erfolgt in einer Strahlendosis von 62 Gy und 74 Gy. Bei der Brachytherapie werden Ultraschall-gesteuert radioaktive Jod bzw. radioaktive Palladium-Seeds direkt in die Prostata eingeführt, die dort verbleiben (Hautmann, Huland et al., 2006).

Wenn die Lebenserwartung unter 10 Jahren liegt oder der Tumor sehr klein ist, bietet sich eine abwartende Strategie ("Watchful-Waiting") an.

Die Komplikationen bestehen darin, dass sich eine Strahlenzystitis,- Proktitis sowie eine Inkontinenz entwickeln können.

Therapie des organüberschreitenden und metastasierten Prostatakarzinoms:

Bei organüberschreitenden und metastasierten Prostatakarzinomen bietet sich als Therapiemöglichkeit die Hormonentzugstherapie, Strahlentherapie und die Chemotherapie.

Hormonentzugstherapie:

Dies ist ein palliativer Therapieansatz und kann auf verschiedene Weisen durchgeführt werden: Orchiektomie, antiandrogene Therapie, Östrogene, LH-RH-Agonisten oder eine komplette Androgenblockade durch Kombination aus Orchiektomie bzw. LH-RH-Agonisten und Antiandrogen (Eichenauer et al., 2003).

Als Nebenwirkungen der Hormontherapie sind erektile Impotenz, Libidoverlust, Hitzewallungen, Gynäkomastie und Mastodynie sowie Osteoporose zu nennen.

Bei ossärer Metastasierung wird eine lokale Radiatio durchgeführt sowie Bisphosphonate verabreicht.

Behandlung des hormonrefraktären Prostatakarzinoms:

Die meisten Patienten mit metastasiertem Prostatakarzinom sprechen Initial auf ein Androgen- Entzugstherapie an. Jedoch zeigt sich bei den meisten Patienten nach 18 bis 24 Monaten ein klinischer Progress. Diese klinische Gegebenheit bezeichnet man als hormonrefraktäres Prostatakarzinom (Se Joong Kim, Sun II Kim, 2011). Die therapeutischen Optionen bei der Behandlung des hormonrefraktären Prostatakarzinoms sind auf eine palliative Behandlung beschränkt. Die Lebensqualität der Patienten steht im Vordergrund der Behandlung. Dabei müssen tumorbedingte Symptome wie Knochenschmerzen, Lymphödeme, Harnstauungsnieren oder eine subvesikale Obstruktion behandelt werden. Die Behandlung konzentriert sich aus diesem Grund auf ein symptomorientiertes Vorgehen wie: palliative transurethrale Resektion der Prostata, die einseitige Harnableitung bei Harnstauungsnieren und die Schmerztherapie (Jager, Rubben et al., 2007). Eine suffiziente Schmerztherapie stellt vor allem bei älteren Patienten eine wichtige Therapieform dar, die

bei diesen Patienten als alleinige Therapieoption erwogen werden kann (Graefen, Hammerer et al., 2000). Bis in den 90er Jahren galt das Prostatakarzinom als Chemotherapie-resistent. Jedoch konnte durch die Einführung der Taxane bei der Therapie des Prostatakarzinoms Überlebensvorteile erreicht werden. Beim hormonrefraktären Prostatakarzinom wird Docetaxel als Chemotherapeutikum verwendet. Die Docetaxeltherapie hat jedoch ausschließlich palliativen Charakter (Miller, Borgermann et al., 2006)

1.2.8. Prognose und prognostische Marker

Die 5-Jahres-Überlebensrate aller Prostatakarzinome beträgt etwa 80%. Im T1 und T2 Stadium besteht eine 90%ige 5 JÜR, im T3 und T4 Stadium eine 40%ige 5 JÜR.

Um einen Prostatakarzinom rechtzeitig zu diagnostizieren wird ab dem 45. Lebensjahr eine digital-rektale Untersuchung und eine PSA-Bestimmung alle 2 Jahre empfohlen.

Das Prostata Spezifische Antigen (PSA) ist der wichtigste Parameter für die Früherkennung des Prostatakarzinoms, zur Beurteilung der Aktivität und Erkennung eines Rezidives nach Behandlung (Gasser, Rutishauser et al., 2006).

Beim Prostatakarzinom ist der präoperativ erfasste PSA- Wert der einzige Parameter mit prognostischer Bedeutung (Graefen, Hammerer et al., 2000).

Das Prostata Spezifische Antigen ist ein Glykoprotein, welches als physiologisches Sekretionsprodukt der prostatischen Ausführungsgänge dem Ejakulat beigemengt wird. Dieses Glykoprotein ist für die Verflüssigung des Ejakulats zuständig und trägt zu einer gesteigerten Motilität der Spermien bei. Die Produktion des PSA findet im Drüsenepithel der Prostata und in den periurethralen Drüsen statt. Der PSA-Wert ist ein empfindlicher Parameter in der Diagnostik des Prostatakarzinoms.

PSA liegt sowohl in freier (fPSA) als auch in gebundener Form vor (komplexiert an Chymotrypsin und Makroglobulin, cPSA). Beide werden zusammen als Gesamt-PSA (totales PSA oder tPSA) gemessen. Der Grenzwert für den PSA- Wert wird als 4 ng/ml definiert, unter dem 80-85 % aller Männer liegen (Hautmann, Huland et al., 2006). Dieser Wert kann beim Vorliegen eines Prostatakarzinoms um den Faktor 10 ansteigen.

Der PSA-Wert ist zwar heute ein entscheidendes diagnostisches Mittel im Rahmen der Tumornachsorge und einer Strahlentherapie oder einer operativen Behandlung. Als Verlaufsparameter spielt der PSA- Wert eine wichtige Rolle bei einer antiandrogenen Therapie des Prostatakarzinoms (Geary und Stamley 1996; Jager und Rubben et al., 2007). Jedoch ist die Spezifität des PSA-Wertes gering. Der PSA-Wert kann neben physiologischen Einflüssen wie Alter und ethnische Abstammung auch durch therapeutische und diagnostische Maßnahmen (z.B. Prostatabiopsien, Transurethrale Prostataresektion) sowie

bestimmte Erkrankungen (Prostatitis, akute Leberfunktionsstörungen) erheblich verändert werden (Fornara et al., 2004). Aus diesem Grund ist die heutige Forschung darauf ausgerichtet neue Tumormarker zu finden, die eine höhere Spezifität als der PSA-Wert aufweisen (Kollermann, Schlomm et al., 2008).

Massenspektrometische Untersuchungen von Proteinen sind geeignet um unbekannte Proteine zu identifizieren.

1.3. Proteomics

Als Proteom bezeichnet man die Gesamtheit aller innerhalb eines definierten Kompartiments (z.B. Serums) genetisch festgelegter Proteine. Die Begriffseinführung erfolgte 1994 durch Marc R. Wilkins (S. Fischer et al., 2008). Das Proteom enthält Enzyme, Signaltransduktoren und Rezeptoren sowie ubiquitäre Proteine. Im Gegensatz zum statischen Genom ist das Proteom dynamisch und kann sich daher verändern. Das Proteom besitzt im Vergleich zum Genom eine höhere Komplexität und Flexibilität und kann deshalb als sensitive Sonde für Veränderungen im Gesundheitszustand der Zelle verwendet werden (Celis et al., 2003; Hanash et al., 2003).

Die aktuelle Menge und zum anderen posttranslationale Modifikationen jedes Proteins können mittels Proteomics dargestellt werden (Lottspeich et al., 2006).

Der eigentlichen Proteinanalyse werden verschiedene Verfahren vorgeschaltet, um die vorhandene Komplexität und den erheblichen dynamischen Bereich der Proteinkonzentration zu erleichtern und das Proteom auf ein leichter zu analysierendes Subproteom zu reduzieren.

Zu den in den letzten Jahren und Jahrzehnten entwickelten Methoden, die die differenzielle Charakterisierung der Proteome ermöglichen, gehört die zweidimensionale Gelelektrophorese. Diese Methode wurde erstmalig 1975 von Klose und O'Farrel unabhängig voneinander beschrieben (Klose, 1975; O'Farrel, 1975).

Mittels Massenspektrometrie (MS) und vor allem der der MALDI-Technik (matrix assisted laser desorption ionization), die 1987 eingeführt wurde, können auch komplexe biologische Proben analysiert (Marvin et al., 2003).

1.4. ERG

Die ETS Transkriptions-Familie enthält 29 verschiedene Gene und wird in 5 Unterfamilien unterteilt (Laudet et al., 1999). Transkriptionsfaktoren sind Proteine, die an spezifische DNA Sequenzen binden, meistens an Promotorregionen, um die Expression dieser Gene hoch oder runter zu regulieren. Die ETS Transkriptionsfaktoren können die Expression von Proteinen verändern, die in verschiedenen Signalwegen involviert sind, Stammzellentwicklung, Proliferation, Zellalterung, Migration, Apoptose und Tumorentwicklung. Der Transkriptionsfaktor ERG gehört zu der Subgruppe dieser Familie. Das normale ERG Gen hat neun Spliceformen mit mehreren Transkriptionsaktivierungsseiten und Exons, die für fünf verschiedenen Proteine kodieren. Der erste Hinweis darauf, dass ETS Gene in der Entwicklung des Prostatakarzinoms involviert sind, ergab sich daraus, dass eine Überexpression von ERG in der Hälfte aller Prostatatumore gefunden wurde. Tomlines et al. (Tomlins et al., 2005) fanden heraus, dass die beiden ETS Gene, ERG und ETV1 in circa der Hälfte aller Prostatakarzinome überexprimiert waren. In circa 40% aller Prostatakarzinome fand man eine Fusion der Transkripte bestehend aus einem 5'-Sequenz aus dem Androgenregulierendem Gen TMPRSS2 und 3' Sequenz aus ERG (Tomlins et al., 2005). Der Androgen-ansprechende TMPRSS2 Gen ist meistens in der Prostata überexprimiert. Die TMPRSS2 Expression ist im Prostatakarzinom höher als in der normalen Prostata und in der Hyperplasie. ERG und TMPRESS befinden sich auf dem Chromosom 21 (Perner et al., 2006; Mertz et al., 2007).

Eine wichtige Frage stellt sich, ob ETS Gentranslokationen ein frühes oder spätes Ereignis in der Prostatakarzinomentwicklung sind. Viele Untersuchungen ergaben, dass eine TMPRSS2-ERG Formation als frühes Ereignis in der Prostatakarzinomentwicklung (in low grade PIN und high grade PIN) auftritt. Die meisten ETS Genveränderungen, die im Prostatakarzinom gefunden wurden, beinhalten eine Fusion mit Androgen-aktivierenden Genen oder chromosomalen Regionen, die durch Androgene reguliert werden. Das heißt, dass die Anwesenheit von Androgenen die Transkription von ETS Genfusionen stimuliert. Da angenommen wird, dass diese Fusionen die Prostatakarzinomentwicklung antreiben, erklärt ihre Androgenabhängigkeit die Androgenabhängigkeit des Prostatakarzinoms.

Für die Bedeutung der ETS Genfusionen für die Prognose des Prostatakarzinoms ergab sich folgendes:

Gopalan et al. (Gopalan et al., 2009) fanden heraus, dass ERG Neuordnungen alleine mit einem geringeren Prostatakarzinom Grad, aber nicht mit dem Krankheitsstatus, erneutes Auftreten, Metastasierung oder Mortalität zusammenhängen.

Somit ist die Frage, ob die Anwesenheit von ETS Genneuordnungen alleine prognostisch signifikant sind, noch kontrovers (Clark et al., 2009).

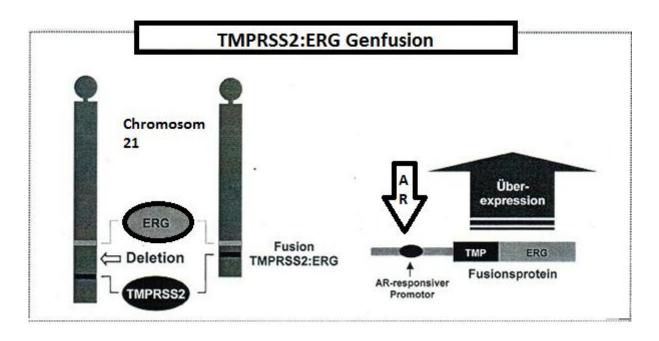


Abbildung 5: Entstehung der TMPRSS2:ERG Genfusion

1.5. Massenspektrometrie

Ein Massenspektrometer erzeugt aus einer Substanzprobe einen Strahl gasförmiger Ionen.

Die aus der Substanzprobe erzeugten Ionen werden mit Hilfe des Massenspektrometers (MS) nach ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z) getrennt und in einem Massenspektrum detektiert. Die Signalintensität entspricht dabei der Menge der Ionen, die den Detektor erreicht haben. In komplexen Gemischen können mit Hilfe der Massenspektren Rückschlüsse auf die qualitative und quantitative Zusammensetzung gezogen werden.

1.5.1. Apparative Grundlagen

Ein Massenspektrometer setzt sich aus verschiedenen Komponenten zusammen (Aebersold et al., 2003):

- 1. Ionenquelle zur Ionenerzeugung
- 2. Massenanalysator zur Ionentrennung nach m/z
- 3. Detektor zur Ionennachweis

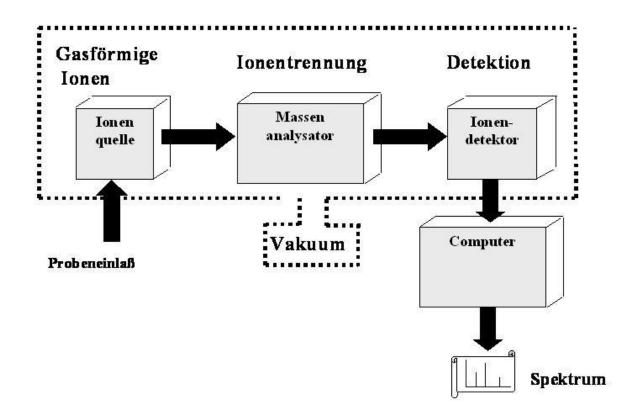


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Massenspektrometrie (Bahr, U., Karas, M. Massenspektrometrie Tutorial)

Je nach Ionenquelle können die Proben als Gas, Flüssigkeit oder Feststoff zugeführt werden. Flüssigkeiten oder Feststoffe müssen vor oder während der Ionisierung in die Gasphase überführt werden. Zur Verhinderung von Stößen der Ionen mit Restgas-Molekülen während ihres Fluges von der Ionenquelle zum Detektor werden Massenspektrometer immer unter reduziertem Druck (Vakuum) betrieben.

Häufig werden die Ionen durch ionenoptische Bauteile zu einem Ionenstrahl fokussiert und in einem Massenanalysator nach ihrem m/z-Wertes getrennt. Die getrennten Ionen gelangen dann nacheinander auf einen Detektor, der die Ladung bzw. den Strom der Ionen misst (Bahr, U., Karas, M. Massenspektrometrie Tutorial). Das Ergebnis der Analyse ist das Massenspektrum, in dem die relativen Häufigkeiten der Ionen auf der Y-Achse und die m/z-Verhältnisse auf der X-Achse aufgetragen sind (Lottspeich et al., 2006).

Es gibt verschiedene Ionisationsverfahren, darunter Elektronenstoßionisation, chemische Ionisation, chemische Ionisation bei Atmosphärendruck, Thermospray, Elektrospray-Ionisation sowie Laserdesorption (Wunderlin, M.).

Dalton (Da) und atomare Masseneinheiten (amu bzw. u:atomic mass units), die als 1/12 der Masse des Kohlenstoffisotops C12 festgelegt sind, werden als Masseneinheit verwendet (Bahr und Karas).

MALDI (Matrix-unterstützte Laserdesorption Ionisation)

Die Massenspektrometrie ist zu einem unverzichtbaren Werkzeug für Proteomstudien geworden (Lavoie und Paiment, 2008; Chaurand et al., 2004; Aebersold und Goodlett 2001; Godovac-Zimmermann und Brown 2001; Lahm und Langen 2000; McDonald und Yates 2000; Pandey und Mann 2000; Roepstorff 1997).

Desorption und Ionisationstechniken wie Matrix-Assited Laser Desorption Ionisation Mass Spectrometry (MALDI MS) (Karas und Hillenkamp 1988) und Electrospray Ionization Mass Spectrometry (ESI MS)(Fenn et al., 1989) haben die Analyse von Proteinen revolutioniert. Hierbei werden Ionen aus Molekülen freigesetzt. Mittels Laserimpulsen im UV-oder IR-Wellenlängenbereich können kleine organische Verbindungen mit hoher Absorption bei der Laserwellenlänge schlagartig und schonend in die Gasphase überführt und dabei teilweise ionisiert werden.

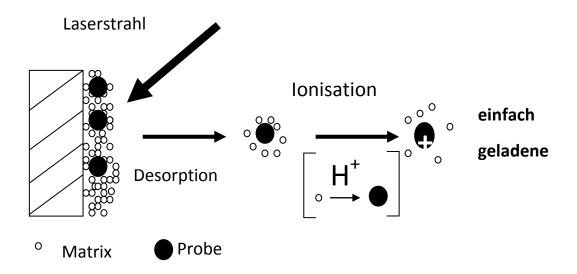


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Ionenbildung in einer MALDI-Ionenquelle (Bahr, U., Karas, M., Massenspektrometrie Tutorial)

Bei der MALDI- Technik wird die zu untersuchende Probe in eine Matrix eigebettet, die bei der Wellenlänge des Lasers eine hohe Absorption hat. Das heißt, dass die gelöste Probe mit einem Überschuss an gelöster Matrixsubstanz gemischt und ein Tropfen dieser Mischung auf einem metallischen Probenteller getrocknet wird. Die Analytmoleküle werden beim Trocknen in die kristallisierende Matrix eingebaut (gelöst) (Walch et al., 2008). Der Probenteller wird in die Ionenquelle eingeschleust. In der Ionenquelle wird die feste Matrix/Analyt-Mischung mit kurzen Pulsen (10ns) eines hochenergetischen (10⁸W/cm²) UV-Lasers (266 nm) bestrahlt, dabei werden gasförmige Ionen freigesetzt (Karas et al., 1988).

Als Matrix wird Siapinic acid (3,5-Dimethoxy-4-hydroxy cinnamic acid) für hochmolekulare Proteine und α -cyano-4-hydroxy cinnamic acid (HCCA) für niedermolekulare Proteine empfohlen (Schwartz et al., 2003).

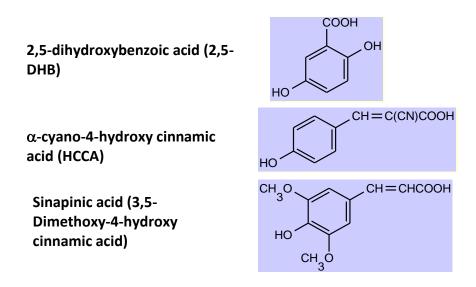


Abbildung 8: Häufig gebrauchte Matrizes für MALDI

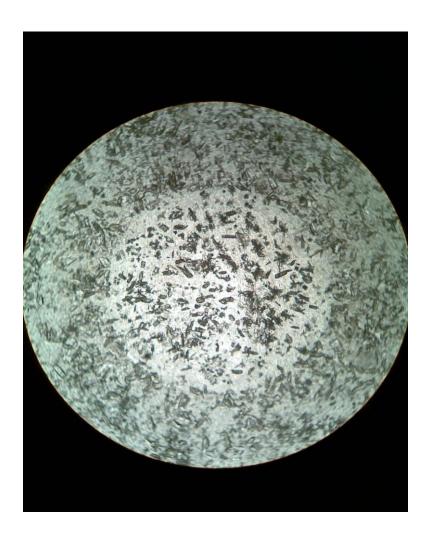


Abbildung 9: Mikroskopische Darstellung der Kristallbildung bei der Matrixauftragung Massenanalysatoren:

Flugzeit- Massenspektrometer:

Flugzeitmassenspektrometer (TOF-Analysator, engl. Time- of flight) sind
Massenanalysatoren, die für MALDI eingesetzt werden. Hier erfolgt im Hochvakuum die
Massenbestimmung, indem über eine sehr genaue elektronische Messung die Zeit, die
zwischen dem Start der Ionen in der Quelle bis zum Eintreffen am Detektor gemessen wird.

Die Ionen, die innerhalb des kurzen Laserimpulses gebildet werden, werden in der Quelle durch das elektrische Feld auf eine kinetische Energie von einigen keV beschleunigt. Dabei durchlaufen die Ionen nach Verlassen der Quelle eine feldfreie Driftstrecke und werden nach ihrem Masse/Ladungs- (m/z)- Verhältnis aufgetrennt. Die Auftrennung erfolgt, indem Ionen mit unterschiedlichen m/z-Werten- bei gleicher kinetischer Energie- in der

Beschleunigungsstrecke der Quelle auf unterschiedliche Geschwindigkeiten gebracht werden (Lottspeich et al., 1998).

Die Zeit, die die unterschiedlich schwere Ionen zum Durchfliegen des Flugrohrs brauchen, ist unterschiedlich lang: d.h. kleine Ionen erreichen den Detektor schneller als Große (Katz et al., 2005).

Ein wesentlicher Nachteil der klassischen Massenspektrometrie ist die Limitierung auf Anwendungen an dissoziierten Geweben, sodass biologisch relevante Zuordnungen zu morphologisch determinierten Krankheitskomponenten in der Regel nicht möglich sind.

Die kürzlich entwickelte Technologie des MALDI Imaging von Schnittpräparaten könnte hierbei zu ganz wesentlichen neuen Erkenntnissen führen.

Die erste MALDI Imaging Anwendung wurde 1997 von Richard Caprioli beschrieben (Cazares et al., 2009).

In dieser Publikation stellen Caprioli et al. (Caprioli et al., 1997) die Anwendung der MALDI Technik an frischen Gewebeschnitten der Ratte und menschlichem Speichel dar. Untersucht wurden hier Gebeschnitte vom Pankreas und Hypophyse der Ratte. Bei der massenspektrometrischen Untersuchung des Pankreasgewebes konnte m/z 5802 als Insulin identifiziert werden. Die MALDI MS Analyse der Hypophyse konnte 50 verschiedene Proteine und Peptide basierend auf die Molekulare Masse identifizieren. Untersuchungen der menschlichen Speichelproben mittels MALDI MS ergaben verschiedene Spektren. Ein Peak bei m/z 7605 war besonders stark exprimiert. Dieses konnte als ein Fragment von IB-1, welches ein Speichelprotein ist, identifiziert werden (Caprioli et al., 1997).

Die direkte Untersuchung von Gewebe in den ersten massenspektrometrischen Untersuchungen besaß mehrere Nachteile. Die Interferenz von Signalen von reichlich vorhandenen Molekülen wie Lipiden, die die Signale aus Peptiden mit niedrigem Molekulargewicht im Gewebe verschleiern war einer dieser Nachteile. Ein weiterer Nachteil ist das Leckagepotential von Gewebeflüssigkeit aus einem Gebiet in ein anderes Gebiet in der Gewebeschnittvorbereitung. Um das Problem der Flüssigkeitsleckage zu minimieren wurden verschiedene Prozesse der Gewebeschnittvorbereitung evaluiert. Eines der geeigneten Verfahren schien das Trocknen von Gewebeschnitten zu sein. Die danach

folgenden MALDI Studien verwendeten Formalin fixiertes und in Paraffin eingebettes Gewebe sowie eingefrorenes Gewebe. Obwohl die Morphologie von Formalin fixierten Proben besser ist als die von frisch gefrorenen Geweben, wird die Proteomanalyse durch die molekulare Vernetzung durch Formalin und die anschließende Paraffineinbettung erheblich beeinträchtigt. Dieses Problem wird durch tryptischen Verdau des Gewebes vor der Matrixanwendung gelöst. Hiermit werden die Peptiddomänen, die nicht vernetzt sind, freigesetzt (Groseclose et al., 2008). Es gibt auch viele Gewebefixierungsmethoden als Alternative zur Formlinfixierung, die ein besseres Nutzen in der Proteinanalyse vorweisen. Universal molecular fixative (UMFix), ist eines der meist genutzten auf Alkoholbasis beruhenden Fixierungsmethoden. Die Anwendung von eingefrorenem Gewebe (bei -80 C) sowie die UMFix Fixierungsmethode sind für die MALDI Untersuchung von Gewebe am besten geeignet (Cazares et al., 2011).

Auf der Basis der MALDI Technik wurden in den darauf folgenden Jahren zahlreiche Studien mit verschiedenen Geweben durchgeführt. Dabei werden drei verschiedene Studientypen unterschieden: diagnostische Studien, die verschiedene Gewebetypen (Tumor versus Normalgewebe) unterscheiden, prognostische Studien, die zwischen Patienten mit langer oder kurzer Überlebensrate unterscheiden und Studien über das Ansprechen von Medikamenten auf Patienten (Schwamborn et al., 2010).

Ziel der meisten Studien ist das Auffinden von prognostischen Markern. Ein Beispiel für eine derartige Studie ist die von Cazares et al., die das Protein MEKK2 als prostatakarzinomspezifisch identifizierten.

Insgesamt zeigen diese Studien, dass die MALDI Imaging Technologie für die Untersuchung von Geweben viel versprechend ist. Trotzdem haben die bisherigen Studien noch nicht zu Fortschritten geführt, möglicherweise deswegen weil die gewählten Untersuchungen zu wenig gut waren.

Am UKE besteht grundsätzlich eine hervorragende Situation um die MALDI Imaging Technologie auf ihre Leistungsfähigkeit zu überprüfen. Einerseits besitzt das UKE eine hervorragend ausgerüstete und qualifizierte Massenspektrometrie- Abteilung, geleitet von

Professor Dr. H. Schlüter. Darüber hinaus besitzt das Institut für Pathologie eine ausgedehnte Tumorbank, bestehend aus tief gefrorenen Tumoren aller Art.

Von besonderer Bedeutung für eine ausgedehnte Untersuchung von Geweben mit der Imaging Technologie könnte weiterhin die am Institut für Pathologie bestens etablierte Tissue Microarray Technik sein. Bei diesem Verfahren können bis zu 200 tiefgefrorene Tumore in einen einzigen Gewebeblock eingebracht werden, wonach Schnitte dieses Blockes die simultane Untersuchung von bis zu 200 Tumoren gleichzeitig erlauben.

1.6. Zielsetzung

Ziel der folgenden Arbeit war es anhand des bestehenden Kollektivs von tief gefrorenen Tumoren Fragestellungen zu entwickeln, welche mit der MALDI Imaging Technologie bearbeitet werden können und zweitens zu klären, ob die genannten Fragstellungen tatsächlich mit dem neuen MALDI Verfahren erfolgreich angegangen werden können.

Dabei sollten gleichzeitig zwei verschiedene Wege beschritten werden:

In Studie eins wurde ein Tissue Microarray aus Geweben von ausgewählten ERG positiven und ERG negativen Prostatakarzinomen hergestellt. Dies als Voraussetzung zur Beantwortung der Frage: Kann ein relevanter molekularer Befund (wie z.B. der ERG Status eines Prostatakarzinoms) mittels MALDI Imaging vorausgesagt bzw. diagnostiziert werden?

Für die zweite Studie wurde eine gesamte Prostata in gefrorenem Zustand eingebettet und histologisch untersucht. Bei diesem Fall sollte aus dem Primärtumor und den gleichzeitig vorhandenen Lymphknotenmetastasen ein Tissue Array, bestehend aus Gewebeproben aus allen tumortragenden Gewebeblöcken und allen Lymphknotenmetastasen hergestellt werden. Die Fragestellung dieser Studie lautete: Können metastasierungsassoziierte Subpopulationen mittels MALDI im Primärtumor nachgewiesen werden?

2. Materialien und Methoden

2.1. Identifikation von geeigneten Fällen aus dem Gefriergewebe Archiv

Das ganze Gefriergewebearchiv des Instituts für Pathologie des UKE wurde auf das Vorliegen von tiefgefrorenen Prostatagewebeproben überprüft. Dabei fanden sich 428 Gewebeproben von Prostatakarzinomen und 181 Gewebeproben von normalem Prostatagewebe. Aus den gesammelten Fällen wurden insgesamt 40 Tumore und 10 Normalgewebe mit besonders großen Tumoranteilen für die Studie ausgewählt. Die klinischen und pathologischanatomischen Daten der entsprechenden Fälle sind in Tabelle 1 dargestellt.

Alter	Pathologisches Stadium		Gleason score	
	рТ	Anzahl	GS	Anzahl
53-74 Jahre Durchschnitt:64,15	2a	0	3+3=6	0
	2b	0	3+4=7	26
	2c	23	4+3=7	12
	3a	10	3+5=8	2
	3b*	7	4+5=9	0
	4	0	5+4=9	0
	4b	0	5+5=10	0

Tabelle 2: Prostata-TMA: Tabelle für Prostatakarzinompatienten

^{*}Ein Patient hatte ein pT Stadium von ypT3b.

Die Anzahl der Patienten mit verfügbarem normalem Prostatagewebe betrug 10. Das Alter der Patienten reichte von 53 bis 74 Jahren mit einem durchschnittlichen Alter von 64,15 Jahren. Das Prostatakarzinom- TMA enthielt außerdem zwei normale Lymphknotengewebespots sowie zwei normale Nierengewebespots als Vergleichsgewebe.

2.2. Gesamtprostaten

Um die Heterogenität von molekularen Befunden in einem Prostatakarzinom und seinen Metastasen umfassend studieren zu können wurde von einem Patienten mit fortgeschrittenem Prostatakarzinom die gesamte eingesandte Prostata und auch die zum Patienten gehörenden Lymphknoten von links und rechts eingefroren und unter Schnellschnitt Bedingungen diagnostisch untersucht. Bei dem Patienten wurde die gesamte Prostata in insgesamt 50 Blöcke aufgeteilt und es wurden zusätzlich 47 Gewebeblöcke von 13 Lymphknotenmetastasen angefertigt. Die in Fragmente aufgeteilte Prostata des Patienten ist in Abbildung 10 dargestellt. Bei dem 71 Jährigen Patienten lag ein pT3a Prostatakarzinom Gleason 4+3=7 vor bei einem Lymphknotenstatus von pN1 (12/15).

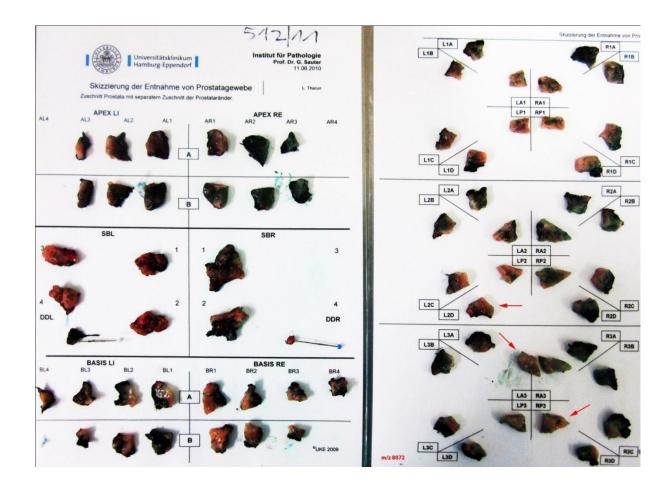


Abbildung 10: In Fragmenten aufgeteilte Prostata des Patienten mit dem metastasierenden Prostatakarzinom

2.3. Anfertigung und Beurteilung von HE- Schnitten

Von allen ausgewählten Gefriergewebeblöcken wurden 4 μ m dicke Schnitte hergestellt und H.E gefärbt. Alle Schnitte wurden von einem Pathologen (Dr. med. Eike Burandt) nach beurteilt und es wurden die Tumorareale mit roter Farbe markiert.

2.4. Tissue Microarray (TMA)- Herstellung

Von den gesammelten Geweben wurden zwei verschiedene Tissue Microarrays hergestellt. Zunächst wurde ein Tissue Array Hergestellt mit je einer Gewebeprobe von 40 verschiedenen Tumoren von 40 Patienten wobei von jedem Patienten eine Gewebeprobe vom Durchmesser 1,0 mm entnommen wurde. Dieser Tissue Microarray wurde komplettiert durch 10 verschiedene Normalprostatagewebe von denen auch jeweils eine Gewebeprobe auf dem Array gebracht wurde. Der zweite Tissue Microarray wurde ausschließlich aus Proben der komplett eingebetteten und tief gefrorenen Prostata gebildet. Dabei wurde von jedem tumorhaltigen Gewebeblock des Primärtumors (50 Gewebeblöcke) und von jeder Metastase (47 Gewebeblöcke) je eine Gewebestanze (Durchmesser 1,0 mm) entnommen und in einem Tissue Microarrayblock eingebracht. Die Tissue Microarray Empfängerblöcke bestanden aus gefrorenem OCT (Optimal cutting temperature polymers). Für die Array Herstellung wurde ein semiautomatischer Tissue Arrayer des Instituts für Pathologie verwendet. Zunächst wurden dabei aus dem Empfängerblock mit einem Bohrer Löcher heraus gestanzt, in welche dann mit Hilfe eines Hohlnadelsystems die entsprechenden Gewebestanzen aus dem tiefgefrorenen Blöcken entnommen und in die vorgefertigten Empfängerblocklöchern eingesetzt wurden. Entscheidend bei der Herstellung von Gefriertissue Microarrays ist dabei die permanente Kühlung von Empfängerblock, Gewebe und auch der Hohlnadel durch Trockeneis. Der Vorgang der Gefrierarray ist in Abbildung 11 bis 12 dargestellt. Von den fertig gestellten Tissue Microarray Blöcken wurde im Kryostaten mit Hilfe des "Cryostat Frozen Sectioning Aid Adhesive Coated Slides Tapesystems" 4 μm messende Schnitte hergestellt. Diese wurden zum Zweck der histochemischen Untersuchungen und für den Zweck der MALDI Analyse auf jeweils einen Objektträger aufgebracht.

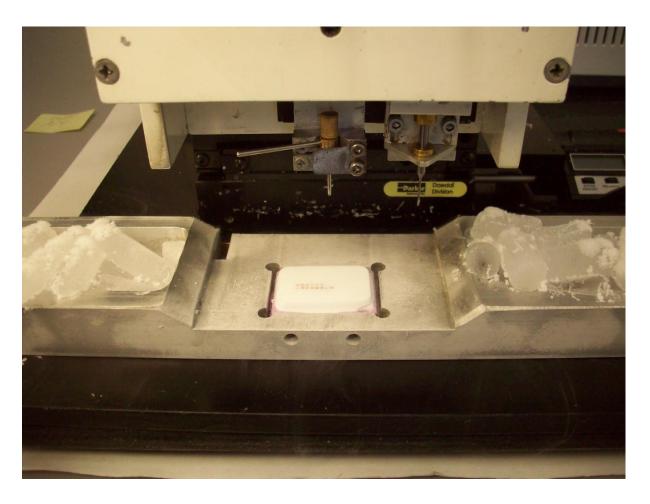


Abbildung 11: Herstellung des Prostata frozen TMA

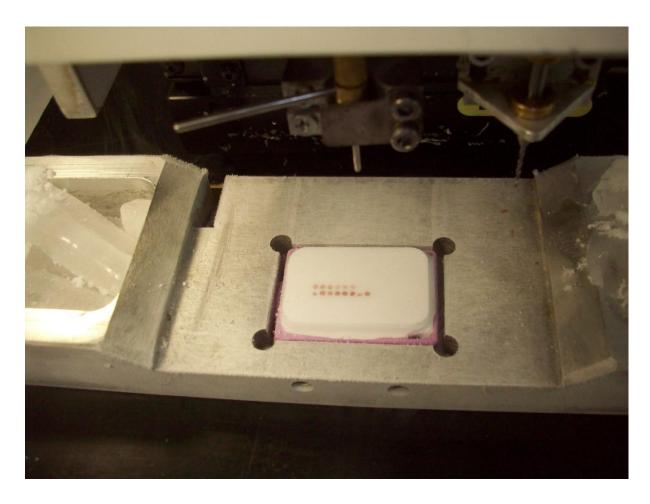


Abbildung 12: Herstellung des Prostata frozen TMA

2.5. MALDI (matrix-assisted laser desorption/ionization)

Für massenspektrometrische Untersuchungen von Geweben (Prostatagewebe) sind folgende Geräte notwendig:

- 1. Kryostat (ImagePrep sample preparation)
- 2. Massenspektrometer (Autoflex speed smart beam mass spectrometer)
- 3. Datenverarbeitungs- und Evaluationssoftware (flexImaging data acquisation and evaluation software)
- 4. Statistische Klassifizierungssoftware (classimaging statistical classification software)

2.5.1. Probenvorbereitung

Vorbereitung der Kryoschnitte für MALDI- Imaging

Für die MALDI-Imaging sind Kryoschnitte optimal geeignet. Die Schnitte werden auf leitfähige Objektträger aufgebracht (Bruker Daltonics Part Na 237001 "glass slides for MALDI imaging"). Die Verwendung von nicht-leitfähigen Objektträgern ist nicht möglich.

Für die Probenvorbereitung werden folgende Materialien benötigt:

- Kryostat
- Leitfähige Objektträger für MALDI
- 70%ige und 90%ige Ethanol
- Trockenapparat

Für die weiteren Untersuchungen müssen 4 µm dicke Schnitte hergestellt werden.

2.5.2. Schneidevorgang

Der leitfähige Objektträger wird in den Kryostat eingesetzt und es wird abgewartet bis er die Temperatur des Kryostaten erreicht hat. Nun wird das Gewebe im Kryostat geschnitten. Der Schnitt wird auf die gekühlte Seite des leitfähigen Objektträgers übertragen. Innerhalb des Kryostaten wird der Objektträger in die Hand gehalten bis der Schnitt völlig getrocknet ist. Der angewärmte Objektträger wird nun aus dem Kryostat genommen. Anschließend wird der Schnitt im Vakuum getrocknet. Nun wird der Schnitt zweimal für 60 sek. in 70%igem Ethanol und einmal für 60 sek. in 96%igem Ethanol gewaschen. Ein erneutes Trocknen der Objektträger in Vakuum folgt. Die Probe ist nun vorbereitet. Sie kann für ein paar Tage im Trockenapparat bei Raumtemperatur aufbewahrt werden oder auf -80 Grad für längeres Aufbewahren eingefroren werden.

2.5.3. Matrix-Auftragung mit dem ImagePrep

Der "Bruker Image Prep" ist der empfohlene Apparat für die Matrixbeschichtung. Dieses Gerät führt zu einer hochwertigen homogenen Beschichtung und ermöglicht eine hohe Qualität der Spektren. Vor der Matrixbeschichtung müssen die Objektträger mit "teach marks" versehen werden und ein digitales Bild muss erzeugt werden.

Der flexImaging benötigt ein optisches Bild der Probe, die mit der Probe auf dem Probenträger in das Innere des Gerätes ausgerichtet wird. Normalerweise ist es nicht möglich den Gewebeschnitt unter der Matrixbeschichtung zuerkennen. Um das optische Bild mit der Probe im Inneren des Gerätes zu vergleichen, ist es notwendig die Objektträger mit "teach marks" zu markieren, die sowohl auf das optische Bild, als auch unterhalb der Matrix-Schicht sichtbar sind.

Die einfachste Möglichkeit ist drei weiße Punkte um die Probe herum zusetzen bevor das optische Bild gemacht wird. Die weiße Markierung ist durch die Matrixschicht hindurch sichtbar und wird zur Orientierung genutzt.

Als Matrix wurde für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen folgende Lösung verwendet: 20 mg/ml Sinapinic Säure in 50%igem Acetonitril, 0,2%ige Trifluoressigsäure. Für einen normalen Gewebeschnitt von 2 cm² ist normalerweise 10 ml Matrixlösung notwendig. Der Sprühvorgang findet unter einem Rauchabzug statt.

Durch die Matrixlösung werden die Proteine und Peptide aus dem Gewebe herausgelöst (extrahiert) und in Matrixkristalle eingebettet. Aus diesem Grund spielt die Zeit, in der die Matrixlösung nass auf dem Gewebe liegt eine wichtige Rolle für die Qualität der Spektren, je länger desto besser. Wenn die Probe zu nass wird, wird die Lösung des Analyts verhindert. In FFPE Gewebe (formalin-fixiertes paraffin eingebettetes Gewebe) muss vor der Matrixauftragung eine tryptische Verdauung des Gewebes durchgeführt werden, um die Proteindomänen freizusetzen, die nicht vernetzt sind.

Sowohl die manuelle als auch die robotergesteuerte Auftragung der Matrices ist möglich. Für die Erhaltung von hochwertigen Massenspektren ist die robotergesteuerte Auftragung besser geeignet.

2.5.4. Robotergesteuertes Besprühen

Für die Auftragung von kleinen Matrixtropfen auf das Gewebe kann ein Roboter verwendet werden. Der Vorteil dieser Mikrotropfen für die Matrixauftragung ist ein höheres Signal- zu Rausch Verhältnis in der resultierenden Massensprektrum und ein höheres Punkt-zu Punkt Reproduzierbarkeit (spot -to spot reproducibility).

Allgemeine Hinweise für die robotergesteuerte Matrixbesprühung:

Für die Bildung von Matrix-Kristalle auf dem Gewebe und der Erfassung von MALDI-Spektren ist eine gewisse Menge Matrixlösung notwendig.

Der Sprühvorgang muss mehrmals wiederholt werden. Als Faustregel gilt: je kleiner die Matrixtropfen, desto häufiger muss die Probe besprüht werden. Da die Zeit, in der die

Tropfen nass sind, eine wichtige Rolle für die Qualität der Spektren spielen (je länger desto besser), ist es sinnvoll den zweiten Tropfen aufzutragen bevor der erste komplett trocken ist.

2.5.5. Aufnahme des optischen Bildes

Da der Gewebeschnitt unterhalb der Matrixbeschichtung nach dem Besprühen nicht sichtbar ist, wird es empfohlen das optische Bild vor der Matrixbeschichtung zumachen.

Eine histologische Färbung des Schnittes (HE- Färbung) wird nach dem MALDI Imaging Datenerhebung gemacht und der Schnitt mit Hilfe eines Scanners gescannt. Dies kann helfen, Merkmale aus den gefärbten Proben direkt mit dem MALDI Imaging Bild zu vergleichen.

2.5.6. Histologische Färbung der Schnitte

Für die HE- Färbung werden die Objektträger mit den Gefrierschnitten zunächst für 1 bis 2 Minuten in 70%igem Ethanol eingetaucht. Danach werden die Objektträger mit destilliertem Wasser gewaschen. Im weiteren Verlauf werden sie für 5 bis 15 Minuten mit Hämatoxylin-Lösung versetzt und erneut mit destilliertem Wasser gewaschen.

Anschließend wird der Objektträger mit Leitungswasser für 5 Minuten abgespült und erneut mit destilliertem Wasser für 1 Minute abgewaschen. Der Objektträger wird bis zur einer Minute in die Eosin-Lösung eingetaucht bis eine ausreichende Färbung erreicht wird. Danach wird nochmals mit destilliertem Wasser abgewaschen. Abschließend wird der Objektträger für jeweils 2 Minuten in 70%igem, 80%igem, 90%igem und 100%igen Ethanol und erneut in 100%igem Ethanol und Xylol eingetaucht.

2.6. Statistik

Die statistischen Analysen wurden mit Hilfe des Statistik-Programms JMP 8.0 (SAS Institute Inc, NC, USA) durchgeführt. Die Beziehungen zwischen ERG-Status und das Vorhandensein einer Masse wurde mittels Kreuztabelle über Chi-Quadrat-Test (Likelihood) ausgewertet.

3. Resultate

3.1. Tissue Microarray Qualität

Von beiden Tissue Microarrays wurden zunächst HE- Schnitte hergestellt und jede einzelne auf dem Tissue Array befindliche Gewebespot wurde auf das Vorhandensein von Tumorzellverbänden überprüft und gleichzeitig wurden die Normalgewebe auf das Vorhandensein von regelrechtem Prostatadrüsen evaluiert. Im ersten Tissue Microarray mit Proben verschiedener Patienten (Prostatakarzinom- TMA) waren letztlich 37 von 40 Tumoren auswertbar. Gleichzeitig enthielten 13 von 40 Tumoren ausreichend normales Epithel, um auf diesen Schnitten auch mittels MALDI/Immunhistochemie untersuchbar zu sein. Im Prostatakarzinom mit Geweben unseres Patienten mit metastasierendem Prostatakarzinom hatten letztlich 23 von 35 Spots eine ausreichend gute Qualität um eine zuverlässige Auswertung zu erlauben, 6 von 35 hatten eine eingeschränkt gute Qualität und 6 von 35 waren nicht auswertbar. Von den 10 untersuchten Metastasen waren 6 Gewebe auswertbar und enthielten Tumormaterial. Die HE- Schnitte der entsprechenden Arrays sind in Abbildungen 13 bis 14 dargestellt. Die Abbildungen A-D zeigen Beispiele von tumorhaltigen Gewebeproben.

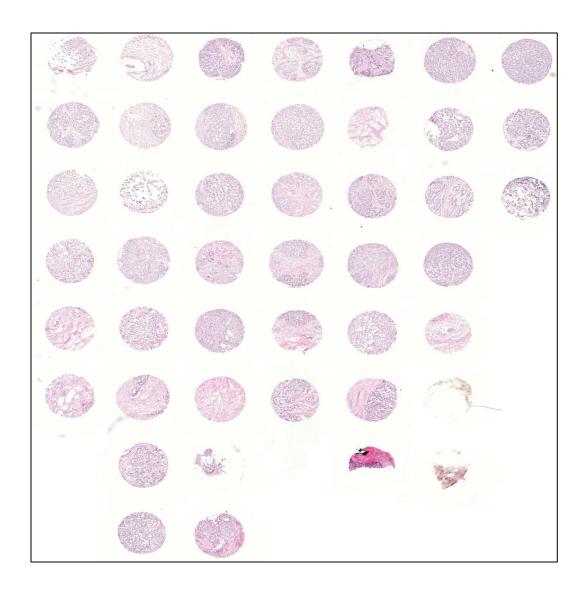


Abbildung 13: HE- Schnitt des Heterogenitäts-TMA

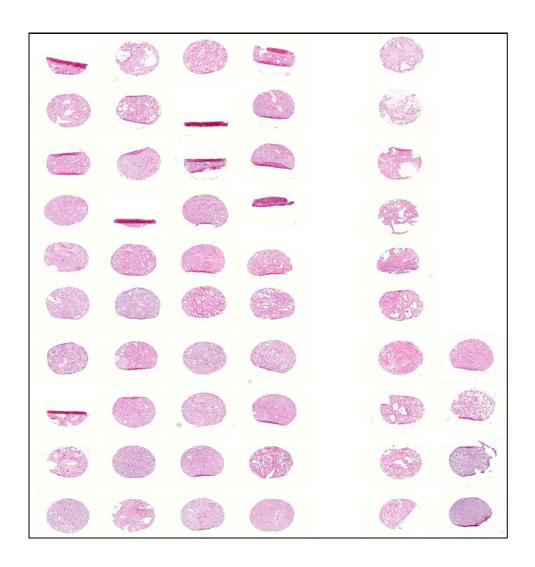
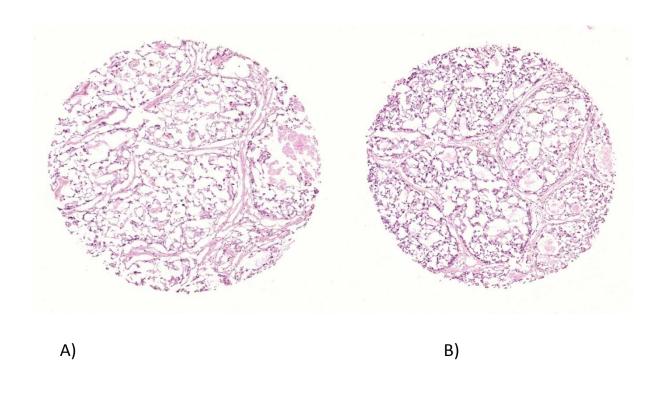
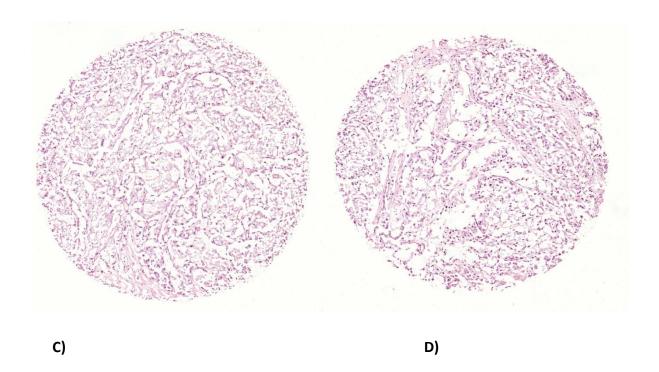


Abbildung 14: HE-Schnitt des Prostatakarzinom-TMA





Die Abbildungen 15 A-D: Tumorhaltige Gewebeproben aus dem Heterogenitäts-TMA

3.2. Immunhistochemie

Die immunhistochemische Untersuchung für das ERG-Protein ist am Gefriermaterial problematischer als an Formalin-fixiertem Gewebe, da entsprechende Antikörper für Formalin-fixiertes Gewebe optimiert worden waren. Aufgrund leichter zytoplasmatischer Hintergrundfärbung mit teilweise Überdeckung der Zellkerne und daher nicht eindeutiger Kernfärbung sind insgesamt 8 Tumore als nicht klassifizierbar beurteilt worden. Ein Beispiel eines derartigen Befundes ist in Abbildung 17 dargestellt. Bei 14 Tumoren hat sich hingegen eine eindeutige nukleäre ERG-Positivität in allen oder fast allen Tumorzellen nachgewiesen. Bei 17 anderen Tumoren war eine ERG-Färbung von Epithelien eindeutig auszuschließen. Insgesamt konnten auf dem Prostatakarzinom Tissue Microarray somit 31 Tumoren bezüglich ihres ERG Status eindeutig klassifiziert werden. Darunter fielen 45,2% ERG positive und 54,8% ERG negative Tumore.



Abbildung 16: Prostatakarzinom ERG-TMA

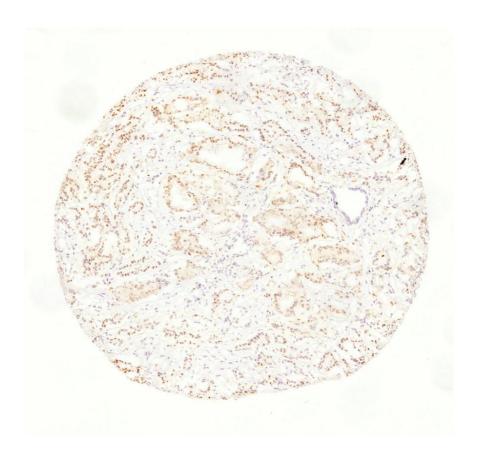


Abbildung 17: Darstellung eines ERG positiven Spots aus dem ERG-TMA

3.3. MALDI Untersuchungen des ERG-TMAs

Die MALDI Untersuchung des Prostatakarzinom- TMAs führte zur Identifikation von circa 136 verschiedenen Massen mit einem Molekulargewicht zwischen 2000 und 20 000 Dalton. Die verschiedenen Spektren sind in Abbildung 18 dargestellt. Jeder einzelne Peak wurde bezüglich seiner Beziehung zu ERG-positiven und ERG-negativen Tumoranteilen analysiert. Dabei fand sich ein Peak mit dem Molekulargewicht von 4355 Da, welcher eng mit dem ERG-Status assoziiert war. Dieses Peak war bei 8 von 14 ERG-positive Tumoren, aber bei 2 von 17 ERG-negativen Tumoren vorhanden (p=0,007). Der gleiche Peak war auch bei 3 von 10 Normalgeweben erkennbar. retrospektiv Auch fand sich keinem dieser Normalgewebespots Hinweis auf dysplastische Veränderungen ein immunhistochemisch waren die Normalgewebe ERG-negativ. Der Peak bei 4355 Da ist zusammen mit der Verteilung der entsprechenden Masse auf dem Prostatakarzinom Array in den Abbildungen 12 und 13 dargestellt. Dabei entsprechen die orange umkreisten Tumorgewebespots den ERG-positiven Tumoren. Kein anderer mittels MALDI nachgewiesener Peak korrelierte signifikant mit dem Vorliegen einer ERG-Positivität.

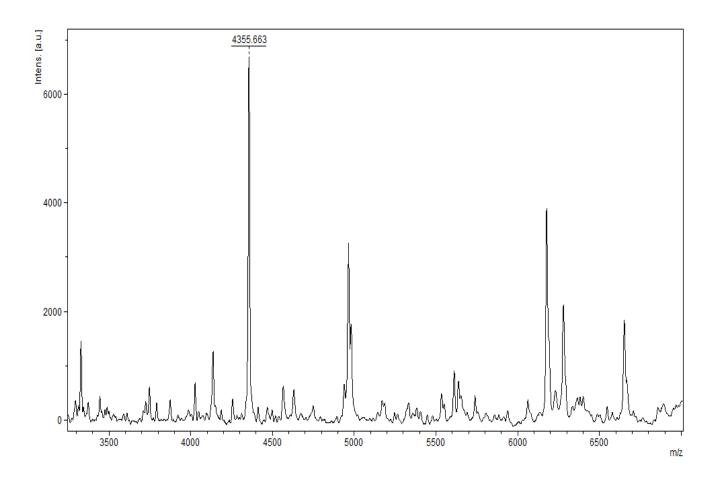


Abbildung 18: Graphische Darstellung der Spektren des ERG-TMAs

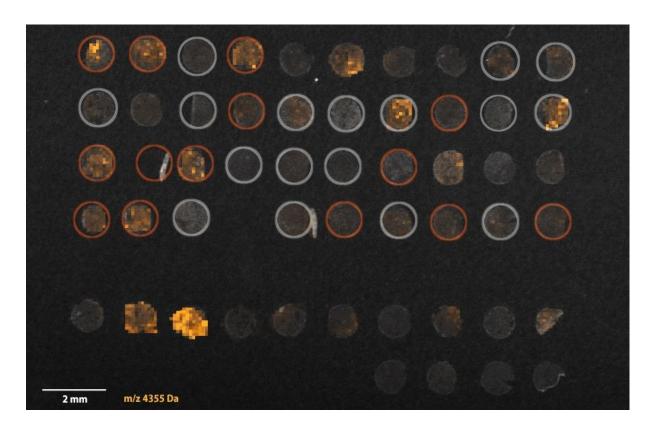


Abbildung 19: Verteilung der Masse 4355 Da auf dem Prostatakarzinom- Array (Die orange Farbe umkreist die ERG positiven Spots und die graue Farbe die ERG negativen Spots)

3.4. MALDI Untersuchungen am MALDI Prostata-Heterogenitäts-TMA

Dieser Tissue Microarray war hergestellt worden mit dem Ziel, die Heterogenität von Prostatakarzinomen zu quantifizieren. Darüber hinaus sollten Massen (Peaks) gefunden werden, welche in Metastasen vorhanden sind, aber nur in einer Teilmenge des Primärtumors. Es war unsere Hypothese, dass derartige Massen Hinweise darauf geben können, aus welchen Arealen des Primärtumors die untersuchten Lymphknotenmetastasen stammen. Die MALDI Untersuchung des Heterogenitäts- TMAs ergab insgesamt circa 129 verschiedene ionisierbare bzw. deionisierbare Massen mit einem Molekulargewicht zwischen 2000 und 20000 Dalton. Die meisten Massen waren in praktisch jedem tumorhaltigen Gewebespot nachweisbar. Ein Beispiel hierfür ist in Abbildung 20 dargestellt, wo alle Tumorgewebespots, welche die Masse 10387 Da enthalten, rot dargestellt sind. Multiple Massen waren aber auch nur in einem Teil der Gewebeproben darstellbar. Ein

Beispiel hierfür ist die Masse mit einem Molekulargewicht von 6044,879 Da, welche in Abbildung 21 dargestellt ist. Auf dieser Abbildung sind wieder diejenigen Gewebespots, welche die Massen enthalten, in rot markiert. Von besonderem Interesse war die Masse mit dem Molekulargewicht von 8072 Da. Diese Masse war bei 5 von 10 auswertbaren Metastasen eindeutig vorhanden, aber nur in drei von 35 Primärtumorspots. Die Nachbeurteilung der topographischen Lage der drei 8072 Da positiven Spots aus dem Primärtumor ergab, dass die drei Regionen im Primärtumor benachbart waren. Die entsprechenden Ursprungsblöcke sind in Abbildung 20 rot markiert. Dieses Makrobild des Primärtumors macht deutlich, dass die drei rot markierten Gewebeblöcke nahe bei einander liegen.

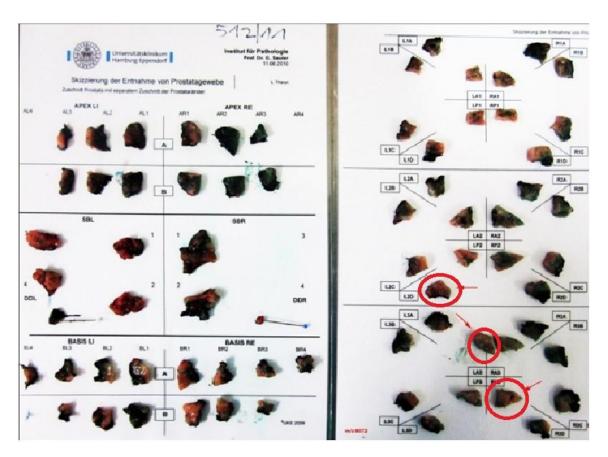


Abbildung 20: Ursprungsblöcke des Prostatakarzinoms mit rotmarkierten Gewebeblöcken

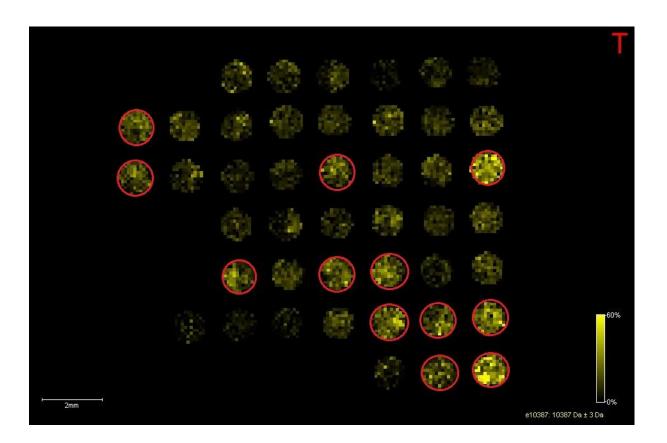


Abbildung 21: Die Masse 10387 Da war in fast alle Spots enthalten

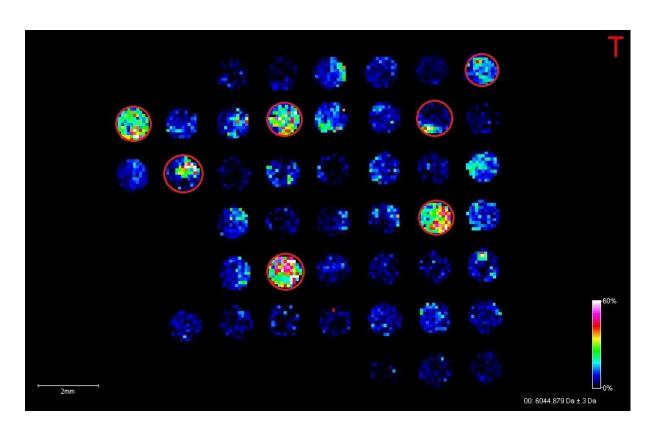


Abbildung 22: Darstellung der Masse 6044.879 Da in nur einigen Spots

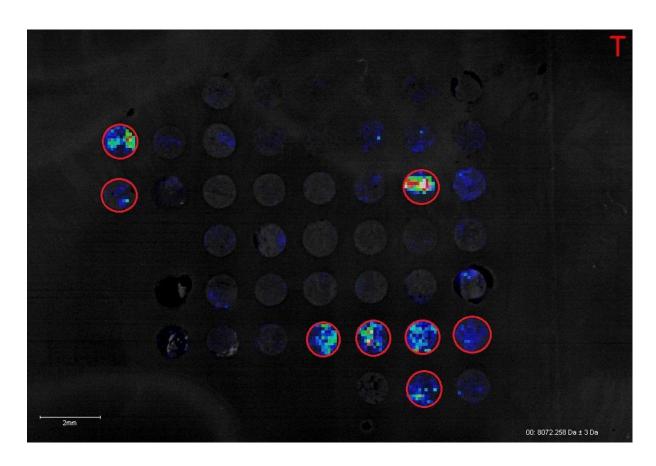


Abbildung 23: Darstellung der Masse 8072 Da im Heterogenitäts-TMA

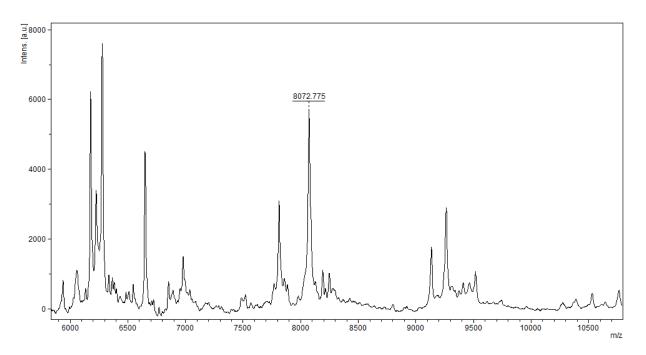


Abbildung 24:Darstellung des Spektrum 8072 Da im Heterogenitäts-TMA

4.Diskussion

In dieser Studie wurden zwei verschiedene Hochdurchsatz Verfahren (Tissue Microarray, MALDI Imaging) angewendet. Die Untersuchung zeigt, dass MALDI-Untersuchungen ein hohes Potenzial für diagnostische Anwendungen, insbesondere im Bereich der Pathologie haben. Die Hochdurchsatz Technologie Tissue Microarray erlaubt die gleichzeitige Untersuchung zahlreicher Gewebeproben auf einem Objektträger. Bis zu 600 Tumoren werden typischerweise auf einem einzigen Objektträger analysiert. Ein 0,6mm im Durchmesser messendes Gewebestück wird in einem klassischen TMA Studie pro Patient untersucht. Dieser Umstand wurde Initial als Problem der TMA Technologie kritisiert, da befürchtet wurde, dass derart kleine Gewebefragmente für einzelne Tumoren nicht ausreichend repräsentativ sein dürften. Zahlreiche Studien haben unterdessen aber gezeigt, dass Tissue Arrays unter Verwendung von auch nur einem Gewebefragment pro Tumor bzw. pro Patient hervorragende und repräsentative Forschungsergebnisse liefern. Beispielsweise wurden beim Mammakarzinom an Tissue Microarrays alle etablierten molekularen Prognosefaktoren wie Östrogenrezeptor, Progesteronrezeptor, p53, Her2 und Ki67 labeling index als Prognosemarker verifiziert (Munirah et al., 2011; Ruiz et al., 2006; Barlund et al., 2000). Beim Harnblasenkarzinom wurde der bekannte prognostische Effekt des histologischen Grades, des Ki67 labeling index und der p53 Expression an Tissue Microarrays erfolgreich bestätigt (Kapur et al., 2011; Nocito et al., 2001). Beim Nierenzellkarzinom konnte Vimentin als molekularer Prognosefaktor auch an Tissue Microarrays bestätigt werden (Moch et al., 1999). Auch beim Prostatakarzinom haben Tissue Microarray Studien unter Verwendung von nur einem einzigen Gewebespot pro Tumor zahlreiche prognostisch relevante Moleküle identifiziert bzw. als solche bestätigt. Dazu gehören aberrante Expressionen von Her2, p53, EGFR, CD10 und dem Ki67 labeling index (Minner et al., 2010; Schlomm et al., 2008; Schlomm et al., 2007; Fleischmann et al., 2008). Auch verschiedene chromosomale Aberrationen wie 8p-, 8q+, PTEN Deletion oder 5q Deletionen konnten an Prostatakarzinom Tissue Microarray als Prognosemarker identifiziert werden (El Gammal et al., 2010; Lapointe et al., 2007, Burkhardt et al., 2013; Kluth et al., 2013; Krohn et al., 2012; Krohn et al., 2013).

Nachteilig bei der Tissue Microarray Technik ist einzig die Tatsache, dass auf einem Schnitt nur ein einzelner Biomarker untersucht werden kann, so dass am TMA Gewebe keine "Screening Technologien" angewendet werden können.

Die MALDI Technik ist die einzige Methode, welche an einem unzerstörten Gewebeschnitt eine systematische Untersuchung von zahlreichen Molekülen einer bestimmten Kategorie erlaubt. Bei diesem Verfahren werden Gewebeschnitte systematisch in 50 Mikrometer Abständen mit einem Laser beschossen und für jeden einzelnen Gewebeabschnitt von 50 Mikrometer Größe wird das Spektrum der damit in ein Massenspekrtometer geschossenen Massen aufgezeichnet. Das Verfahren führt an jedem untersuchten Gewebeareal zur Identifikation von 20 bis 75 verschiedenen Massen mit einem Molekulargewicht zwischen 2 kDa bis 16 kDa. In diesem Auflösungsbereich finden sich vor allem Lipide und Peptide, die meisten Proteine sind zu groß um direkt durch MALDI gemessen zu werden. Proteine können allerdings nach tryptischer Verdauung so verkleinert werden, dass charakteristische, proteinspezifische Fragmente in der MALDI Untersuchung sichtbar werden (Schwamborn et al., 2010; Wisztorski et al., 2010).

Einige Studien haben bereits MALDI Imaging für die Bearbeitung verschiedener Fragestellungen verwendet. Bei diesen Studien wurden Großschnitte von Serien 10 bis 127 verschiedenen Tumoren verwendet (Deininger et al., 2008; Rauser et al., 2010; Cazares et al., 2009; Lemaire et al., 2007; Schwartz et al., 2005). Einzelne Studien sind von besonderem Interesse. Beispielsweise haben Yanagisawa et al., 2003 eine Studie mit dem Nichtkleinzelligen Lungenkarzinom (non-small cell lung cancer (NSCLC)) durchgeführt. In dieser Studie wurde Gefriergewebe von 79 Lungentumoren und 14 Lungennormalgewebe untersucht (Yanagisawa et al., 2003). In einem Versuch mit 42 Tumorproben einschließlich primären Lungentumoren und Lungenmetastasen und 8 Normalgeweben fand man 82 Spektren, die signifikant unterschiedlich zwischen beiden Gruppen exprimiert wurden. Die Unterscheidung zwischen verschiedenen Nicht-kleinzelligen Lungentumoren (Adenokarzinom, Plattenepithelkarzinom, Großzelligen Lungenkarzinom und primären NSCLC und Lungenmetastasen) konnte anhand ihrer Proteinmuster erreicht werden. Prognostische Proteinmarker wurden ermittelt, welche Lymphknotenstatus und die Überlebensrate (Patientenüberleben) prognostizieren können. Die Unterscheidung zwischen NSCLC- Patienten mit guter (n=41) und schlechter (n=25) Prognose war anhand der erhaltenen Peaks möglich. Zwei Proteine (m/z 10519 und m/z 4964), die in primären Nichtkleinzelligen Lungentumore hoch exprimiert waren, konnten als ubiquitin-related modifier-2 –protein (SUMO-2) und thymosin-β4 identifiziert werden.

Eine weitere IMS-Studie wurde mit Glioblastomgewebe durchgeführt. Hier war es möglich Proteinmuster zu ermitteln, die mit der Tumorhistologie korrelierten und unabhängig die Überlebensrate prognostizierten (Schwartz et al., 2005). Die Kombination von 24 Proteinsignalen ermöglichte die Differenzierung von Überlebenswahrscheinlichkeiten. Ein Prognose assoziiertes Protein war dabei das Calcyclin (S100-A6, m/z 10092).

Des Weiteren konnten Proteine identifiziert werden, die die Unterscheidung zwischen den einzelnen Tumorstadien ermöglichen z.B. war das Tubulin-spezifische Chaperon-A vor allem in Glioblastom Grad IV exprimiert, während in Grad II und Grad III das astrocytic phosphoprotein PEA 15 vermehrt vorhanden war.

Auch im Bereich der Brustkrebsforschung wurden IMS- Studien durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass ein Proteinmuster mit m/z von 8404, das in HER2 positiven Proben überexprimiert war, das cystein rich intestinal protein 1 ist (CRIP1) (Mackay et al.,2003; Wilson et al.,2002).

Im Bereich des Prostatakarzinoms wurden ebenfalls bereits massenspektrometrische Untersuchungen durchgeführt. In einer Studie wurden 31 gefrorene Prostatatumorgewebe und 41 Prostatanormalgewebe miteinander vergleichen. Ziel war es Peptide zu identifizieren, die in beiden Gruppen unterschiedlich exprimiert werden (Cazares et al., 2009). Zwei Peptide (m/z 4027 und m/z 4355) zeigten eine signifikante Überexpression im Tumorgewebe während ein anderes Peptid (m/z 4274) in gutartigen Bereichen vermehrt vorhanden war. Das Peptid mit m/z von 4355, welches im Tumorgewebe vermehrt vorhanden war, wurde als das mitogen-activated protein kinase/extracelluar signal – regulated kinase kinase 2 (MEKK2) identifiziert. Die Expression dieses Proteins steigt mit dem Gleason- Grad.

In einer ähnlichen Studie wurde gefrorenes Ovarialkarzinomgewebe (n=25) im Vergleich zu gutartigen Ovarialgewebe analysiert (Lemaire et al., 2007). Für das Ovarialkarzinom konnte ein Marker mit den m/z von 9744 und einer Prävalenz von 80 % identifiziert werden. Dieses

Proteinmuster konnte als ein Fragment des 11 S proteasom activator complex, Reg- alpha (m/z 9744) identifiziert werden.

Die gleichzeitige Verwendung der TMA und MALDI Technik ergibt nun die Kombination der Vorteile zweier verschiedener Hochdurchsatz Verfahren. Unter absolut identischen Bedingungen können bei der MALDI Untersuchung von TMA-Schnitten zahlreiche verschiedene Tumoren untersucht werden und die ermittelten Spektren können mit klinischen, pathologischen – anatomischen oder molekularen Parametern verglichen werden. Hauptfragestellung unserer jetzigen Studie war die Beziehung zwischen individuellen Massen, welche mittels MALDI Imaging identifiziert werden können und der immunhistochemischen ERG-Positivität. ERG-positive Tumoren sind auf der molekularen Ebene charakterisiert durch eine Fusion des Transkriptionfaktors ERG mit dem androgenabhängigen Gen TMPRSS2. Dabei kommt es zu einer unphysiologischen Überexpression von ERG und es wird vermutet, dass diese Läsion ursächlich für einen Teil der Prostatakarzinome ist. Tatsächlich weisen einige Studien darauf hin, dass knapp 50 % aller Prostatakarzinome ERG-positiv sein dürften (Clark und Cooper et al., 2009). Während sich die Daten mehren, dass bei ausschließlich chirurgisch behandelten Patienten ERGpositive Tumoren sich nicht von ERG-negativen bezüglich Aggressivitätspotenzial unterscheiden (Clark et al., 2009), gibt es auch Anhaltspunkte dafür, das ERG-positive Prostatakarzinome typischerweise besonders gut auf eine antiandrogene Therapie ansprechen. Der Identifikation ERG-positiver Tumoren kommt somit eine praktische Bedeutung zu. Der Vergleich zwischen mehr als 100 verschiedenen MALDI Peaks, welche bei mehreren Tumoren gefunden werden konnten und im ERG Status zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Vorliegen eines Peaks bei 4350 Da und einem positiven ERG Status. Diese Beziehung war hochsignifikant. 8 der 14 ERG positiven Tumoren wiesen den Peak auf, aber nur 2 der 17 ERG-negativen Karzinome (p=0,007). Ein Nachteil der MALDI Technologie ist die Tatsache, dass die Identifikation der einen Peak verursachenden Masse nicht selten schwierig ist und ausgedehnte zusätzliche Experimente bedarf. In diesem Fall konnten wir aber auf Befunde einer früheren Publikation zurückgreifen. Cazares et al. hatten 2009 einen Peak bei 4355 Da bei einer Serie von Prostatakarzinomen beschrieben und postulierten, dass dieser Peak für Prostatakarzinome spezifisch sei. Die nachfolgende Identifizierung des zugrunde liegenden Proteins ergab MEKK2 als Protein, welches dem 4355 Da Peak zugrunde liegt. Die Autoren beschrieben MEKK2 in ihrer Studie als ein Protein, welches mit malignem Prostataepithel assoziiert ist und eventuell als Prostatakarzinom spezifisch interpretiert werden könnte. Unsere Daten zeigen nun, dass MEKK2 mit einem positiven ERG Status assoziiert ist und dass das Protein nicht spezifisch ist für malignes Prostataepithel. Immerhin konnten wir den 4355 Da Peak auch bei drei Normalgeweben nachweisen.

Mitogen-aktivierte Protein Kinase-Kinase-Kinasen (MAP3Ks) sind Teil einer zellulären Signalstransduktionskaskade, bei der ein Signal von der Zelloberfläche in den Zellkern geleitet wird. Signalwege nutzen überwiegend Protein-Proteinphosphorylierung und – Dephosphorylierung als Mechanismen, um Informationen weiterzuleiten und bestimmte physiologische Ereignisse zu steuern (Hunter et al., 1995; Whitmarsh et al., 1996). Das Kern-Modul der MAPK-Signalwege besteht aus 3 Kinasen, die durch Phosphorylierung aktiviert werden.

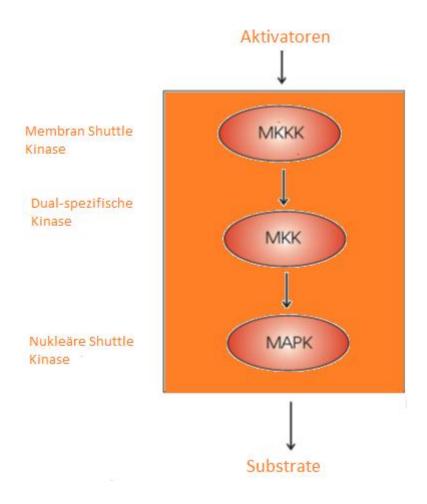


Abbildung 25: MAPK- Signal-Modul

Die fünf bekannten Gruppen von MAP- Kinasen sind ERK (extracellular- signal regulated kinase 2)1/2, p38, JNK (C-Jun-N-terminal Kinase) 1,2,3 und ERK5. Die Aktivierung der MAP- Kinasen erfolgt über Wachstumsfaktoren, Zytokine, G-Protein- gekoppelte Rezeptoren oder Stress-Signale, wie z.B. UV-Strahlung. Unterhalb der MAPK-Kaskade stehen in der Regel Transkriptionsfaktoren, die aktiviert werden und in den Zellkern wandern, um dort die Transkription ihrer Zielgene auszulösen. Eine typische Signalkaskade ist am Beispiel des EGFR- Signalweges in der Abbildung 26 dargestellt.

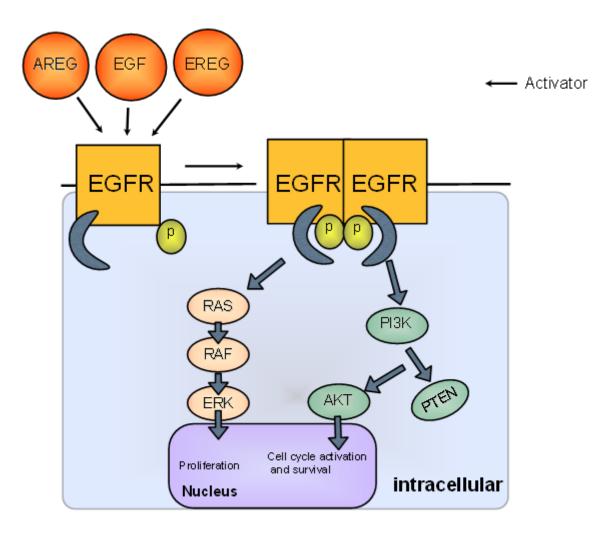


Abbildung 26: Darstellung des EGFR- Signalweges: Abkürzungszeichen: EGF, epidermal growth factor; AREG, amphiregulin; EREG, epiregulin EGFR-epidermal growth factor receptor; P, phosphor; RAS, rat sarcoma; ERK, extracellular signal regulated kinase; PI3K, phosphatidyl inositol 3-kinase; PTEN, phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 (Yarom et al., 2011)

Auf jeder der 3 Ebenen der MAP-Kinasen gibt es mehrere unterschiedliche Gene. So finden sich z.B. auf der Ebene der MAP3-Kinasen insgesamt 15 Gene (MAP3K1-MAP3K15). Von besonderer Bedeutung ist das MAP3K2 (Synonym MEKK2) im Zusammenhang mit dem Prostatakarzinom.

MEKK2 ist Bestandteil des ERK5-Signalweges. Das dreistufige ERK5 Kinase- Modul besteht aus MEKK2/3, MEK5 und ERK5. Die Aktivierung des ERK5- Signalweges erfolgt über Wachstumsfaktoren und oxidativen/osmotischen Stress (Cazares et al., 2009). Hierbei erfolgt zunächst eine Phosphorylierung und somit Aktivierung von MEK5 durch MEKK2/3. MEK5 phosphorylisiert danach ERK5, welches nun nukleäre Prozesse beeinflussen kann (Sun et al., 2001; Chao et al., 1999; Zhou et al., 1995). Wenn sich ERK5 im Zellkern befindet, phosphorylisiert und aktiviert der C-Terminus verschiedene Transkriptionsfaktoren (Kasler et al., 2000; Terasawa et al., 2003). Der ERK5 Signalweg vermittelt normale Zell-Zell-Interaktionen während der Immunabwehr und ist ein entscheidender Regulator von Zell-Invasion während der Metastasierung.

Außerdem steht der ERK5 Signalweg in Zusammenhang mit High-grade Prostatakarzinomen. Ein Anstieg der Expression von MEK5 ist besonders mit metastasierendem Prostatakarzinom, Zellproliferation, Matrixmetalloproteinase-9-Expression und Zellinvasion assoziiert (Mehta et al., 2003). In einer Studie konnte gezeigt werden, dass eine starke MEK5 Expression mit der Anwesenheit von Knochenmetastasen und ungünstigem krankheitsspezifischen Überleben korreliert.

Eine weitere Studie fand eine signifikante Korrelation zwischen zytoplasmatischer ERK5-Überexpression, dem Gleason-Summenscore und einem ungünstigen krankheitsspezifischen Überleben heraus (McCracken et al., 2008). Die Autoren haben weiter herausgefunden, dass ERK5-Kernexpression signifikant mit dem Übergang von Hormon-empfindlichen in Hormonrefraktären Erkrankungen assoziiert ist (Cazares et al., 2009).

Insgesamt zeigt dieser Untersuchungsteil, dass molekulare Befunde in Prostatakarzinomen möglicherweise indirekt über bestimmte Massen, welche sich im MALDI Imaging zuerkennen geben, diagnostiziert werden können. Weitere Studien sind nun notwendig, um die Ursachen für eine erhöhte Anwesenheit von MEKK2 bei ERG-positiven Prostatakarzinomen

zu klären. Immerhin zeigen die vorliegenden Befunde aber deutlich, dass es offenbar zumindest in Einzelfällen möglich ist, molekulare Klassen eines Tumors indirekt über im MALDI nachweisbare Massen zu diagnostizieren.

Zahlreiche genomische Veränderungen wurden beim Prostatakarzinom zuletzt als potenziell klinisch relevant identifiziert. So sind Deletionen von 3p14 und PTEN bei Prostatakarzinomen mit ungünstiger Prognose und einem positiven ERG Status assoziiert. Es ist denkbar, dass diese Alterationen wichtige Unterklassen des ERG-positiven Prostatakarzinoms definieren. Auf der anderen Seite wurde kürzlich von den Prostataforschern des UKE gezeigt, dass Deletionen von 6q und 5q hochsignifikant mit einem ERG negativen Tumorstatus assoziiert sind und in dieser Gruppe ebenfalls mit einer ungünstigen Prognose vergesellschaftet. Auch diese Deletionen könnten klinisch relevante Subgruppen ausmachen. Gerade an kleinen Biopsien ist es schwierig bis unmöglich zahlreiche genomische Veränderungen mittels direkter Messung wie Beispielsweise durch FISH zu bestimmen. Und möglicherweise wäre es einfacher, derartige Läsionen indirekt über MALDI messbare Veränderungen zu bestimmen.

Ein wesentliches Problem bei der molekularen Untersuchung von Prostatakarzinomen ist die große Heterogenität dieser Tumoren. Nicht selten finden sich in einer Prostata zwei oder mehrere verschiedene voneinander abgrenzbare Tumorknoten. Auch innerhalb eines Tumorknotens bestehen stellenweise unterschiedliche morphologische Veränderungen. Die besonders ausgeprägte Heterogenität von Prostatakarzinomen wird auch in der 1966 von Gleason eingeführten Gleasongradierung von Prostatakarzinomen deutlich. Bei diesem Verfahren werden gezielt morphologisch unterschiedliche Tumorareale gesucht und quantifiziert und dementsprechend wird eine Score vergeben (Delahunt et al., 2012). Wegen der großen Heterogenität von Prostatatumoren wurde von einigen Autoren vorgeschlagen, Tissue Microarrays von Prostatakarzinomen anders herzustellen als dies bei anderen Tumoren üblich ist. Speziell wurde vorgeschlagen von Gewebeblöcken, welche für die TMA-Herstellung ausgewählt wurden, mindestens drei bis vier verschiedene Gewebeproben zu entnehmen. Damit soll der Heterogenität von Prostatakarzinomen Rechnung getragen werden. Gegen diese Vorgehensweise gibt es aber substantielle Gegenargumente. Das Wichtigste liegt wohl darin, dass Prostatakarzinome typischerweise sehr groß sind und auf verschiedenen Gewebeblöcken abgebildet werden. Am UKE enthalten im Mittel mehr als zehn verschiedene Gewebeblöcke Tumormaterial. Eine

Entnahme von vier verschiedenen Stanzen aus einem dieser zehn Gewebeblöcke garantiert somit in keinem Fall eine repräsentative Abbildung der Verhältnisse in einer bestimmten Prostata. Tatsächlich haben auch die am UKE durchgeführten TMA Studien unter Verwendung von nur einem Gewebespot pro Tumor mehrfach hochsignifikante Zusammenhänge zwischen am TMA erhobenen molekularen Befunden und klinischen bzw. pathologischen Daten ergeben.

Um die individuelle Heterogenität in Prostatakarzinomen besser abschätzen zu können wurde am UKE kürzlich ein Heterogenitäts-Tissue Microarray hergestellt wobei von 190 verschiedenen Tumoren jeweils zehn verschiedene Gewebeproben aus zehn verschiedenen Gewebeblöcken entnommen wurden. Die erste Studie unter Verwendung dieses TMAs hatte ergeben, dass der ERG-Status in Prostatakarzinomen weit heterogener ist als ursprünglich angenommen. Nur circa ein Drittel der ERG-positiven Tumoren zeigten eine homogene ERG-Positivität in allen Stanzen eines Tumors. Zweidrittel der ERG-positiven Tumoren zeigten eine ERG-Positivität nur in einem Anteil der tumorenthaltenden Prostatastanzen (heterogene Tumoren).

Während die ERG-Heterogenitätsstudie von Minner et al. (Minner et al., 2012) deutlich macht, dass bei umfassender Untersuchung von Prostatakarzinomen erheblich mehr Heterogenitäten gefunden werden können als bei der standardmäßig durchgeführten Untersuchung von nur einem Großschnitt pro Tumor, wurde die Untersuchung von Gewebe in der Studie von Minner immerhin auf 10 Proben pro Patient limitiert (Minner et al., 2012).

Dieses Manko wurde in der nun vorgelegten Doktorarbeit insofern überwunden als in dieser Studie von jedem einzelnen Gewebeblock eines Tumors auch eine Stanze entnommen und letztlich untersucht wurde. Dies erlaubt eine einzigartige Repräsentativität der Untersuchung eines Tumors. Wie erwartet zeigen die MALDI Befunde an unserem Prostatakarzinom Heterogenitäts- TMA sowohl Moleküle, welche überall im Tumor nachweisbar sind wie auch Moleküle, welche nur fokal im Tumor anzutreffen waren. Von besonderem Interesse ist allerdings der Befund, dass eine Masse in fünf Lymphknotenmetastasen ausgeprägt vorhanden zu sein scheint, während dem die gleiche Masse in nur drei Spots aus dem Primärtumors zu finden ist. Die Masse mit einem Gewicht von 8072 Da ist nicht mit einem bekannten Molekül assoziiert. Unabhängig davon was der biologische Hintergrund dieser

Masse ist, lässt dieser Befund vermuten, dass die Metastasen möglicherweise von der entsprechenden Stelle des Primärtumors ausgegangen sind.

Die systematische dreidimensionale MALDI Untersuchung eines Prostatakarzinoms hat uns somit erlaubt, die Metastasierungsquelle für ausgedehnte Lymphknotenmetastasen im Tumor aufzufinden. Diese Hypothese wird derzeit unter Verwendung von next generation sequencing weiter untersucht. In diesem Projekt (Zusammenarbeit mit Dr. Jan Korpel, EMBL, Heidelberg und Institut für Pathologie, Martiniklinik, UKE, Hamburg) wird untersucht, ob die Lymphknotenmetastasen gleiche genetische Veränderungen tragen wie die für die Masse 8072 Da positiven Primärtumorareale und ob sich diese von den nicht 8072 Da positiven Arealen im Primärtumor unterscheiden.

Insgesamt erlauben die durchgeführten Untersuchungen eine sehr positive Beurteilung der potenziellen Anwendungsmöglichkeiten von MALDI Imaging in der Pathologie. Unsere Daten zumindest in Einzelfällen möglich ist, zeigen, dass es wichtige Molekulare Klassifikationsfaktoren mittels MALDI Imaging weitgehend zu reproduzieren. Es durfte also möglich sein, klinisch relevante molekulare Diagnosen mittels MALDI Imaging zu stellen. Die diagnostischen Potenziale der Methode dürften dann noch größer werden, wenn Software-Hilfen verwendet werden können, welche die gleichzeitige Verwendung multipler Parameter (Massen) für die molekulare Charakterisierung eines Tumors erlauben. Von besonderem Interesse ist die Möglichkeit einen Tumor systematisch zu untersuchen und dabei die gesamte Tumormenge über zahlreiche Schnitte aus prognostisch relevanten/aggressiven Subklonen zu untersuchen. Beispielsweise könnte es möglich sein eine gesamte Prostata diagnostisch mittels MALDI zu untersuchen, um zu klären, ob kleine metastasierungsfähige Klone vorliegen und dementsprechend ob eine frühzeitig adjuvante Behandlung sinnvoll ist.

5. Zusammenfassung

Ziel der Studie war es erste Hinweise dafür zu gewinnen, ob die MALDI Imaging Technologie für die Pathologie diagnostische Relevanz erlangen könnte. Zu diesem Zweck wurden unter zwei verschiedenen Fragestellungen zwei verschiedene Tissue Microarrays (TMA) hergestellt. Zunächst wurde ein TMA bestehend aus 40 Prostatakarzinomen und 10 Normalgeweben hergestellt, von denen der ERG-Status immunhistochemisch bestimmt wurde. Bei diesem TMA sollte geklärt werden, ob MALDI Befunde es erlauben, den ERG Status von Prostatakarzinomen vorauszusagen. Ein zweiter Tissue Array wurde gebildet aus 35 Primärgewebeblöcken und zehn verschiedenen je einer Gewebeprobe von Lymphknotenmetastasen eines Patienten. Hier war die Fragestellung, ob es mittels MALDI möglich wäre Subpopulationen zu identifizieren, welche mit Metastasierung assoziiert sein könnten. Untersucht wurde durchweg unfixiertes Gewebe. Beide TMAs wurden mittels MALDI Imaging untersucht. Der Prostatakarzinom-ERG-TMA ergab immunhistochemisch bezüglich ERG-Status in 14 Fällen eine ERG-Positivität, in 17 Fällen eine ERG-Negativität und in 8 Fällen ein nicht zu bewertendes Resultat. Letzte Gruppe ist besonders groß, weil die zur Verfügung stehenden Antikörper nicht für unfixiertes Gewebe optimiert waren. Auf dem TMA konnte mindestens 136 verschiedene Massen (Peaks) identifiziert werden, darunter eine Masse bei 4355 Da, welche hochsignifikant mit einem positiven ERG-Status assoziiert war. 8 von 14 ERG-positiven aber nur 2 von 17 ERG-negativen (p=0.007) enthielten diese Masse.

Die 4355 Da Masse wurde in einer früheren Studie als MEKK 2 identifiziert und als prostatakarzinomspezisch beschrieben. Der gleichzeitige Nachweis von MEKK2 in drei Tumorfreien Prostatageweben spricht allerdings gegen die Spezifität für Krebs. Unsere Daten zeigen nun, dass die Masse nicht prostatakarzinomspezifisch ist, sondern ein Parameter, der für ein ERG-positives Karzinom spricht. Die Prostatakarzinom Heterogenitätsstudie ergab 129 verschiedene Massen, welche zu mindestens in einzelnen Gewebeproben nachweisbar waren. Zahlreiche Peaks waren in allen Tumorgeweben nachweisbar, einzelne aber auch nur in einem Teil der Prostata Tumoren. Von besonderem Interesse war eine Masse von 8072 Da, welche in fünf von zehn Lymphkontenmetastasen aber nur in drei von 35 Primärtumorarealen nachweisbar waren. Alle drei positiven

Primärtumorareale lagen in unmittelbarer Nachbarschaft, so dass spekuliert werden kann, dass diese Zone Ursprungsort der Lymphknotenmetastasen sein könnte.

Insgesamt zeigt unsere Pilotstudie, dass die MALDI Imaging Technologie in der Pathologie hohes diagnostisches Potenzial aufweisen dürfte. Einerseits erlauben MALDI Untersuchungen zumindest in Einzelfällen die indirekte Identifizierung von klinisch relevanten molekularen Befunden. Andererseits erlaubt die MALDI Technik auch eine relativ einfache komplette Durchmusterung eines gesamten Tumors mit dem Ziel kleine biologisch relevante Subpopulationen (z.B. metastasierende Tumorareale) zu identifizieren.

6. Literaturverzeichnis

- 1. Adamietz, I.A., Noldus, J., Feyer, P., Böttcher, H.D.(2007). Natürliche Entwicklung und Klinik des Prostatakarzinoms. In: Prostatakarzinomrezidiv. Alles, was Sie wissen müssen. W. Zuckerschwedt Verlag, München
- 2. Aebersold, R., Goodlett, D.R. (2001). Mass spectrometry in proteomics. Chem Rev 10(2):269-295
- 3. Aebersold, R., Mann, M. (2003). Mass spectrometry based proteomics. Nature 422:198-207
- 4. Attard, G., et al. (2009). Characterization of ERG, AR and PTEN gene status in circulatin tumor cells from patients with castration-resistent prostate cancer. Cancer Res. 69, 2912-2918
- 5. Aus, G., Abbou, C.C., Bolla, M. et al. (2005). EAU guidelines on prostate cancer. Eur Urol 48:546-551
- 6. Bahr, U., Karas, M. Massenspektrometrie Tutorial . Institut für pharmazeutische Chemie Universität Frankfurt. (Online im Internet). http://www.umm.uni-heidelberg.de/inst/ikc/proteomics/downloads/mstutorialkaras.doc. (Letzter Zugriff 24.11.2013, um 20:00 Uhr)
- 7. Barlund, M., Forozan, F., Kononen, J., Bubendorf, L., Chen, Y., Bittner, M.L., Torhorst, J., Haas, P.Bucher, C., Sauter, G. (2000). Detecting activation of ribosomal protein S6 kinase by complementary DNA and tissue microarray analysis. J Nat Cancer Inst; 15:1252-9
- 8. Breslow, N., Chan, C.W., Dhom, G., et al. (1977). Latent carcinoma of prostate at autopsy in seven areas. Int J Cancer 20:680-688
- 9. Brössner, C., Ringhofer, H., Hernady, T., Kuber, W., Madersbacher, S., Pycha A.(2001). Lymphatic drainage of Prostatic transition and peripheral zones visualized on a three-dimensional workstation. Urology 57(2): 389-93

- 10. Burkhardt, L., Fuchs, S., Krohn, A., Masser, S., Mader, M., Kluth, M., Bachmann, F., Huland, H., Steuber, T., Graefen, M., Schlomm, T., Minner, S., Sauter, G., Sirma, H., Simon, R. (2013). CHD1 Is a 5q21 Tumor Suppressor Required for ERG Rearrangement in Prostate Cancer. Cancer Research 73(9):2795-2805
- 11. Caprioli, R.M., Farmer, T.B., Gile, J.(1997). Molecular Imaging of Biological Samples: Localization of Peptides and Proteins Using MALDI-TOF MS. Anal. Chem.69:4751-4760
- 12. Caprioli, R.M. (2005). Deciphering protein molecular signatures in cancer tissue to aid in diagnosis, prognosis and therapy. Cancer Res 65, 10642- 10645
- 13. Carter, H.B., Isaacs, W.B.(2004). Improved Biomarkers for Prostate Cancer: A Definite Need. Journal of the National Cancer Institute 96(11)
- 14. Cazares, L.H., Troyer, D., Wang, B., Drake, R.R., Semmes, O.J.(2011). MALDI tissue imaging: from biomarker discovery to clinical applications. Anal Bioanal Chem, DOI 10.1007/s00216-011-5003-6
- 15. Cazares, L.H., Troyer, D., Mendrinos, S., Lance, R.A., Nyalwidhe, J.O., Beydoun, H.A., Clements, M.A., Drake, R.R., Semmes, O.J. (2009). Imaging Mass Spectrometry of a Specific Fragment of Mitogen-Activated Protein Kinase/ExtracellularSignal-RegulatedKinaseKinaseKinase 2 Discriminates Cancer from Uninvolved Prostate Tissue. ClinCancer Res 15(17):5541-5551
- 16. Celis, J.E., Gromoy, P. (2003). Proteomics in translational cancer research: Towards an integrated approach. Cancer Cell 3(1):9-15
- 17. Chao, T., Hayashi, M., Tapping, R., Kato, Y. und Lee, J. (1999). MEKK3 directly regulates MEK5 activity as part of the big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1) signalling pathway. J Biol Chem *274*(51):36035-36038
- 18. Chaurand, P., Sanders, M.E., Jensen, R.A., Caprioli, R.M. (2004). Proteomics in diagnostic pathology: profiling and imaging proteins directly in tissue sections. Am J Pathol; 165(4):1057-1068
- 19. Clark, J. P., Cooper, C.S. (2009). ETS gene fusions in prostate cancer. Nat .Rev.Urol;.6: 429-439

- 20. Delahunt, B., Miller, R.J., Srigley, J.R., Evans, A.J. & Samaratunga H. (2012). Gleason grading: past, present and future. Histopathology 6: 75-86
- 21. Deiniger, S.-O., Ebert, M.P., Fütterer A., Gerhardt M., Röcken, C. (2008). MALDI Imaging Combined with Hierarchical Clustering as a New Tool for the Interpretation of Complex Human Cancers. Journal of Proteome Research
- 22. Eble, J.N., Sauter, G., Epstein J.I., Sesterhenni, A. (2004). Pathology and genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs.(Eds.): World Health Organization Classification of Tumours." IARC Press.Lyon:159-214
- 23. Edge, S.B., Byrd, D.R., Compton, C.C., Fritz, A.G., Green, F.L., Trotti, A. AJCC Cancer Staging Manual. /.Aufl.2010. Springer. New York
- 24. Eichenauer, R., Sandmann, J., Vanherpe, H., Klinikleitfaden Urologie. Urban & Fischer Verlag München, 2003.
- 25. El Gammal, A.T., Bruchmann, M., Zustin, J. et al. (2010). Chromosome 8p deletions and 8q gains are associated with tumor progression and poor prognosis in prostate cancer. Clin Cancer Res 16(1):56-64
- 26. Fenn, J.B., Mann, M., Meng, C.K., Won,g S.F., Whitehouse, C.M.(1989). Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. Science 246(4926):64-71
- 27. Fischer, S. (2008). Funktionelle Proteomik. Elesevier GmbH München, 1. Auflage
- 28. Fleischmann, A., Schlomm, T., Huland, H. et al. (2008). Distinct subcellular expression patterns of neutral endopeptidase (CD 10) in prostate cancer predict diverging clinical courses in surgically treated patients. Clin Cancer Res 14(23):7838-42
- 29. Fornara, P. et al, Fischer, K., Lubold, H.J. et al. (2004). Einfluss von Präanalytik und Analytik auf die Aussagekraft des prostataspezifischen Antigens. Deutsches Ärzteblatt 101(25A):1820-1822
- 30. Gasser, T., Rutishauser, G. et al. (2006). Basiswissen Urologie: mit 8 Tabellen. Heidelberg, Springer Medizin, 3. Vollständig überarbeitete Auflage

- 31. Geary, E.S., Stamly T.A. (1996). Pathological characteristics and prognosis of non palpable and palpable prostate cancers with a Hybritech prostate specific antigen of 4 to 10 ng./ml. J Urol 156(3):1056-8
- 32. Gleason, D.F. (1966). Classification of prostatic carcinomas. Cancer Chemother Rep 50(3):125-8
- 33. Gleason, D.F., Mellinger G.T. (1974). Prediction of prognosis for prostatic factors adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. J Urol 111(1): 58-64
- 34. Godovac-Zimmermann, J., Brown, L.R. (2001). Perspectives for mass spectrometry and functional proteomics. Mass Spectrom Rev 20(1):1-57
- 35. Goplan, A. et al. (2009). TMPRSS2-ERG gen fusion is not associated with outcome in patients treated by prostatectomy. Cancer Res 69, 1400-1406
- 36. Graefen, M., Hammerer, P. et al. (2000). Prognostic markers for prostate cancer. Urologe A 39(1):14-21
- 37. Graefen, M., Hammerer, P. et al.(2000). Therapeutic options in hormone refractory prostate carcinoma. Urologe A 39(3):267-73
- 38. Groseclose, M.R., Massion, P.P., Chaurand, P., Caprioli, R.M. (2008). High-throughput proteomic analysis of formalin-fixed paraffin-embedded tissue microarrays using MALDI imaging mass spectrometry. Proteomics 8:3715-3724
- 39. Haag, Hanhart, Müller . Gynäkologie und Urologie 2008/2009. 4. Aufl. 2008, Medizinische Verlags- und Informationsdienste, Breisach
- 40. Hanash, S. et al. (2003). Disease proteomics. Nature 422:226-232
- 41. Hayat, M.J., Howlander, N., Reichman M.E., Edwards, B.K. (2007). Cancer statistics, trends and multiple primary cancer analysis from the surveillance, epidemiology, and results (SEER)program. Oncologist 12:20-37
- 42. Hautmann, R., Huland, H. et al. (2006). Urologie mit 176 Tabellen Heidelberg Springer Medizin 3. Überarbeitete Auflage

- 43. Hautmann, R., et al.(2010). Urologie mit 143 Tabellen Heidelberg Springer Medizin 4. Überarbeitete und aktualisierte Auflage
- 44. Huang, S., Gulzar, Z.G., Salari, K., Lapointe, J., Brooks, J.D., Pollack, J.R. (2011). Recurrent deletion of CHD1 in prostate cancer with relevance to cell invasiveness. Oncogene. doi:10.1038/onc.2011.590
- 45. Humphrey, P.A. (2004). Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of prostate. Mod Pathol 17(3): 292-306
- 46. Hunter, T. (1995). Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. Cell 80:225-236
- 47. Jager, T., Rubben, H. et al.(2007). Differential therapy of prostate cancer. Internist (Berl) 48(12): 1382-7
- 48. Kapur, P., Cotan, Y., King E. (2011). Primary Adenocarcinoma of the Urinary Bladder, Value of Cell Cycle Biomarkers. Am J Clin Pathol 135:822-830
- 49. Karas, M., Hillenkamp, F. (1988). Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. Anal Chem 60(20):2299-2301
- 50. Karnes, R.J., Cheville, J.C., Ida, C.M. et al. The ability of biomarkers to predict systemic progression in men with high-risk prostate cancer treated surgically is dependent on ERG status. Cancer Res 2010; 70:8994-9002
- 51. Kasler, H., Victoria, J., Duramad, O. und Winoto, A. (2000). ERK5 is a novel type of mitogen-activated protein kinase containing a transcriptional activation domain. Mol Cell Biol *20*(22: 8382-8389
- 52. Katz, J.E., Mallick, P., Agus, D.B.(2005). A perspective on protein profiling of blood. BJU Int 96:477-482
- 53. Klocker, H., Culing, Z. et al. (1994). Androgen receptor alterations in prostatic carcinoma. Prostate 25(5): 266-73
- 54. Klose, J.(1975). Protein mapping by combined isoelectric focussing and electrophoresis of mouse tissue. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. Humangenetik 26(3): 231-243

- 55. Kluth, M., Hesse, J., Heinl, H., Krohn, A., Steurer, S., Sirma, H., Simon, R., Mayer, P.S., Schumacher, U., Grupp, K., Izbicki, J.R., Pantel, K., Dikomey, E., Korbel, J.O., Plass, C., Sauter G., Schlomm, T., Minner, S. (2013). Genomic deletion of MAP3K7 at 6q12-22 is associated with early PSA recurrence in prostate cancer and absence of TMPRSS2: ERG fusions. Modern Pathology 26(7):975-983
- 56. Kollermann, J.T., Schlomm et al.(2008). Expression and prognostic relevance of annexin A3 in prostate cancer. Eur Urol 54(6):1314-23
- 57. Krebs in Deutschland, 2006, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. und das RKI (2006) Krebs in Deutschland. 5. Überarbeitete, aktualisierte Auflage, Saarbrücken
- 58. Lahm, H.W., Langen, H. (2000). Mass spectrometry: a tool for the identification of proteins separated by gels. Electrophoresis 21(11):2105-2114
- 59. Lapointe, J., Li, C., Giacomini, C.P., Salasi, K., Huang, S., Wang, P., Ferrari, M., Hernandez-Boussard, T., Brooks, J.P., Pollack, J.R.(2007). Genomic profiling reveals alternative genetic pathways of prostate tumorgenesis. Cancer Res 67(18):8540-10
- 60. Laudet, V., Hanni, C., Stehelin, D., Duterque-Coquillaud, M. (1999). Molecular phylogeny of the ETS gene family. Oncogene 18, 1351-1359
- 61. Lavoie, C., Paiment, J. (2008). Topology of molecular machines of the endoplasmatic reticulum: a compilation of proteomics and cytological data. Histochem Cell Biol 129(2):117-128.
- 62. Lemaire, R., Ait Menguellet, S., Stauber, J., Marchaudon, V., Lucot, J.-P., Collinet, P., Farine, M.-O., Vinatier, D., Day, R., Ducoroy, P., Salzet, M., Fournier, I. (2007). Specific MALDI imaging and profiling for biomarker hunting and validation: fragment of the 11S proteasome activator complex, reg alpha fragment, as a new potential ovary cancer biomarker. J. Proteome Res. 6:4127-4134
- 63. Lottspeich, F., Engels, J.W. (2006). Bioanalytik. Elsevier GmbH München, 2. Auflage
- 64. Lottspeich, F., Zorbas, H. (1998). Bioanalytik. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg- Berlin.

- 65. Mackay, A., Jones, C., Dexter, T., Silva, R.L., Bulmer, K., Jones, A., Simpson, P., Harris, R.A., Jat, P.S., Neville, A.M., Reis, L.F., Lakhani, S.R., O'Hare, M.J.(2003). cDNA microarray analysis of genes associated with ERBB2(HER2/neu) over expression in human mammary luminal epithelial cells. Oncogene 22:2680-2688
- 66. Mao, X., Boyd, L.K., Yanez-Munoz, R.J., Chaplin, T., Xue, L., Lin, D. et al. (2011). Chromosome rearrangement associated inactivation of tumour suppressor genes in prostate cancer. American journal of cancer research, 1(5), 604-617
- 67. McCracken, S.R., Ramsay, A., Heer, R. et al. (2008). Aberrant expression of extracellular signal-regulated kinase 5 in human prostate cancer. Oncogene 27:2978-88
- 68. McDonald, W.H., Yates, J.R. (2000). Proteomic tools for cell biology. Traffic; 1(10):747-754
- 69. Marvin, L.F., Roberts, M.A., Fay, L.B. (2003). Matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical chemistry. Clin Chem Acta. 337 (1-2):11-21
- 70. Mehta, P.B., Jenkins, B.L., McCarthy, L. et al. (2008). MEK5 overexpression is associated with metastatic prostate cancer, and stimulates proliferation, MMP-9 expression and invasion. Oncogene 22:1381-9
- 71. Mertz, K.D. et al. (2007). Molecular characterization of TMPRSS2-ERG gene fusion in the NCI-H660 prostate cancer cell line: a new perspective for an old model. Neoplasia 9, 200-206
- 72. Miller, K., Borgermann, C. et al. (2000). Therapeutic options for hormone-refractory prostate carcinoma. Urolge A 45(5):580, 582-5
- 73. Minner, S., Gärtner, M. et al. (2012). Marked heterogeneity of ERG expression in large primary prostate cancers. Modern Pathology 1-11
- 74. Minner, S., Jessen, B., Stiedenroth, L. et al. (2010). Low level HER2 overexpression is associated with rapid tumor cell proliferation and poor prognosis in prostate cancer. Clin Cancer Res 16(5):1553-60

- 75. Moch, H., Schraml, P., Bubendorf, L., Mirlacher, M., Kononen, J., Gasser, T., Mihatsch, M.J., Kallioniemi, O.P., Sauter, G. (1999). High-Throughput Tissue Microarray Analysis to Evaluate Genes Uncovered by cDNA Microarray Screening in Renal Cell Carcinoma. American Journal of Pathology, Vol.154, 104
- 76. Mostofi, F.K. (1975). Grading of prostate carcinoma. Cancer Chemother Rep 59(1):111-117
- 77. Munirah, M.A., Siti-Aisha, M.A. et al. (2011). Identification of different subtypes of breast cancer using tissue microarray. Rom J Morphol Embryol, 52(2):669-677
- 78. Nocito, A., Bubendorf, L., Tinner, E.M., Suess, K., Wagner, U., Forster, T., Kononen, J., Fijan, A., Bruderer, J., Schmid, U., Ackermann, D., Maurer, R., Alund, Sauter, G., (2001). Microarrays of bladder cancer tissue are highly representative of proliferation index and histological grade. J Pathol; 3:349-57
- 79. O'Farrel, P.H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J Biol Chem 250: 4007-4021
- 80. Pandey, A., Mann, M. (2000). Proteomics to study genes and genomes. Nature 405(6788):837-846
- 81. Perner, S. et al. (2006). TMPRSS2: ERG fusion-associated deletions provide insight into the Heterogenity of Prostate cancer. Cancer Res 66, 8337-8341
- 82. Rahim, S., Üren, A. (2013). Emergency of ETS transcription factors as diagnostic tools and therapeutic targets in prostate cancer. Am J Transl Res 5(3):254-268
- 83. Rauser, S., Marquardt, C., Balluff, B., Deninger, S.O., Albers, C., Belau, E., Hartmer, R., Suckau, D., Specht, K., Ebert, M.P., Schmitt, M., Aubele, M., Hofler, H., Walch, A. (2010). Classification of Her2 receptor status in breast cancer tissues by MALDI imaging mass spectrometry. J Proteome Res.
- 84. Robert Koch Institute, Gesundheitsberichterstattung des Bundes, Heft 36, Prostatakarzinom

- 85. Roepstorff, P. (1997). Mass spectrometry in protein studies from genome to function. Curr Opin Biotechnol 8(1):6-13
- 86. Rohde, V., Katalinic, A. et al. Prostataerkrankungen, Gesundheitsberichterstattung des Bundes 2007; Heft 36.Berlin, Robert Koch-Institute:7-21
- 87. Rubin, M.A., Dunn, R., Strawderman, M., Pienta, K.J. (2002). Tissue microarray sampling strategy for prostate cancer biomarker analysis. Am J Surg Pathol; 3:312-9
- 88. Ruiz, C., Seibt, S., Al Kuraya, K., Siraj, A.K., Mirlacher, M., Schraml, P., Maurer, R., Spichtin, H., Torhorst, J., Popovska, S., Simon, R., Sauter, G., (2006). Tissue microarrays for comparing molecular features with proliferation activity in breast cancer. Int J Cancer; 9:2190-4.
- 89. Schlomm T., Ebersdobler A., Mirlacher., Sauter G.(2007). Molecular staging of prostate cancer in the year 2007. World J. Urol 25:19-30
- 90. Schlomm, T., Iwers, L., Kirstein, P. et al. (2008). Clinical significance of p53 alterations in surgically treated prostate cancer. Mod Pathol 21(11):1371-79
- 91. Schlomm, T., Kirstein, P., Iwers, L. et al. (2007). Clinical significance of epidermal growth factor receptor protein over expression and gene copy number gains in prostate. Clin Cancer Res 13(22 Pt 1):6579-84
- 92. Schwamborn, K., Caprioli R.M. (2010). Maldi Imaging Mass Spectrometry- Painting Molecular Pictures. Molecular Oncology 4:529-538
- 93. Schwamborn, K., Caprioli R.M. (2010). Molecular imaging by mass spectrometry-looking beyond classical histology. Nature Reviews/Cancer. Vol. 10, 639-644
- 94. Schwartz, S.A., Weil, R.J., Thompson, R.C., Shyr, Y., Moore, J.H., Toms, S.A., Johnson, M.D., Caprioli R.M. (2005). Proteomic-based prognosis of brain tumor patients using direct-tissue matrix- assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. Cancer Res 65:7674-7681

- 95. Schwartz, S.A., Reyzer, M.L., Caprioli, R.M. (2003). Direct tissue analysis using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: practical aspects of sample preparation. J Mass Spectrom 38(7):699-708
- 96. Se Joong, Kim, Sun II, Kim. (2011). Current Treatment Strategies for Castration-Resistent Prostate Cancer. Korean J Urol 52:157-165
- 97. Staubach, K.-H. (2008). Vierband kleine operative Fächer: Kurzlehrbuch Urologie, Augenheilkunde, HNO, Orthopädie. München, Elsevier, Urban & Fischer
- 98. Sun, W., Kesavan, K., Schaefer, B., Garrington, T., Ware, M., Johnson, N., Gelfand, E., Johnson, G. (2001). MEKK2 associates with the adapter protein Lad/RIBP and regulates the MEK5-BMK1/ERK5 pathway. J Biol Chem *276*(7):5093-5100
- 99. Sun, J., Liu, W., Adams, T.S., Sun, J., Li, X., Turner, A.R. et al. (2007). DNA copy number alterations in prostate cancers: a combined analysis of published CGH studies. The Prostate, 67(7), 692-700
- 100. Taylor, B.S., Schultz N., Hieronymus H., et al. (2010). Integrative Genomic profiling of human prostate cancer. Cancer Cell 18(1):11-22
- 101. Terasawa, K., Okazaki, K. und Nishida, E. (2003). Regulation of c-Fos and Fra-1 by the MEK5-ERK5 pathway. Genes Cells 8(3):263-273
- 102. Tomlins, S.A. et al. (2005). Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. Science 310:644-648
- 103. Verhage, B.A., Kiemeney, L.A. (2003). Inherited predisposition to prostate cancer. Eur J Epidemiol 18(11):1027-36
- 104. Whitmarsh, A.J., Davis, R.J. (1996). Transcription factor AP-1 regulation by mitogenactivated protein kinasesignal transduction pathways. J. Mol. Med., 74:589-607
- 105. Whittemore, A.S., Wu, A.H. et al. (1995). Family history and prostate cancer risk in black, white, and asian men in the United States and Canada. Am J Epidemiol 141(8):732-40

- 106. Wilson, K.S., Roberts, H., Leek, R., Harris, A.L., Geradts, J. (2002). Differential gene expression patterns in HER2/neu positive and negative breast cancer cell lines and tissues. Am. J. Pathol. 161:1171-1185
- 107. Wisztorski, M., Franck, J., Salzet, M., Fournier, I. (2010). MALDI Direct Analysis and Imaging of Frozen Versus FFPE: What Strategy for Which Sample? Methods Mol Biol 656:303-22
- 108. Wittekind, C., Meyer, H. J., Bootz, F. (2005). TNM-Klassifikation maligner Tumoren. Heidelberg, Springer Medizin.
- 109. Wunderlin, M., Projekt Z4-MALDI-Einführung in die Massenspektrometrie, iZKF Ulm . (Online im Internet). http://www.yumpu.com/de/document/view/5789228/einfuhrung-in-die-maldi-massenspektrometrie (Letzter Zugriff 20. November 2013, 15:00Uhr)
- 110. Yanagisawa, K., Shyr, Y., Xu, B.J., Massion, P.P., Larsen, P.H., White, B.C., Roberts, J.R., Edgerton, M., Gonzalez, A., Nadaf, S., Moore, J.H., Caprioli R.M., Carbone D.P. (2003). Proteomic patterns of tumour subsets in non-s mall-cell-lung cancer. Lancet 362:433-439
- 111. Yarom, N., Jonker, D.J. (2011). The role of the epidermal growth factor receptor in the mechanism and treatment of colorectal cancer. Discov Med. 11 (57):95-105
- 112. Zhou, G., Bao, Z. und Dixon, J. (1995). Components of a new human protein kinase signal transduction pathway. J Biol Chem, *270*(21):12665-12669
- 113. Zentrum für Krebsregisterdaten am Robert-Koch-Institut. Verbreiterung von Krebserkrankungen in Deutschland, Entwicklung der Prävalenz zwischen 1990 und 2010.

7.Danksagung

Ich möchte mich zuerst bei meinem Doktorvater Herrn **Prof. Dr. med. Guido Sauter**, leitender Arzt des Institutes für Pathologie des Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf, für die Überlassung des Themas und der sehr guten Betreuung bedanken. Diese Arbeit hat mir den Weg zur wissenschaftlichen Denk- und Arbeitsweise eröffnet und mir viel Spaß bereitet.

Weiterhin möchte ich mich bei **Dr.med. Ronald Simon** und Frau **Dr.med. Sarah Minner** für die freundliche Unterstützung und der fachlichen Kompetenz bedanken.

Außerdem danke ich Marcus Wurlitzer für die Bereitstellung von Materialien und, dass er bei Problemen immer sehr hilfsbereit war.

Ein besonderer Dank gilt zudem meiner Betreuerin **Christina Koop und Inge Brandt** für die gute Betreuung während meiner Labortätigkeit.

8. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir eingegeben 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 benutzen 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 zum Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.