

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Pathologie

Prof. Dr. Sauter

**Die diagnostische Relevanz der DNA-Zytometrie zur Abschätzung der
Prognose beim Prostatakarzinom**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin /Zahnmedizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Katja Angermeier
aus Bonn

Hamburg 2014

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 12.02.2015**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. G. Sauter

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. T. Schlomm

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
2	MATERIAL UND METHODEN	4
2.1	PATIENTEN/TUMORE	4
2.2	ZELLVEREINZELUNG	6
2.3	DURCHFÜHRUNG DER FLOWZYTOMETRISCHEN MESSUNG.....	7
2.4	STATISTIK	8
3	ERGEBNISSE	9
3.1	FLOWZYTOMETRIE ERGEBNISSE.....	9
3.2	FLOWZYTOMETRIE- BEFUNDE VERSUS BIOLOGISCH/KLINISCHE ENDPUNKTE	15
3.3	MULTIVARIATE ANALYSE.....	18
4	DISKUSSION.....	20
5	ZUSAMMENFASSUNG	25
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	27
7	DANKSAGUNG	34
8	LEBENS LAUF	35
9	EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG	36

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Multivariate Analyse.....	19
Tabelle 2: ROC-Analyse.....	19
Tabelle 3: Übersicht über frühere Studien.....	22

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Klinisch/pathologische Befunde bei OP.....	4
Abbildung 2: Ploidie-Verteilung	9
Abbildung 3: Ploidiestatus vs. Gleason-Grad	10
Abbildung 4: Ploidiestatus vs. Tumorstadium.....	11
Abbildung 5: Ploidiestatus vs. Nodalstatus.....	11
Abbildung 6: Ploidiestatus und Rezidiv-freies Intervall	12
Abbildung 7: Gleason $\leq 3+3=6$ und Rezidiv-freies Intervall.....	13
Abbildung 8: Gleason $3+4=7$ und Rezidiv-freies Intervall.....	13
Abbildung 9: Gleason $4+3=7$ und Rezidiv freies Intervall	14
Abbildung 10: Gleason $\geq 4+4=8$ und Rezidiv-freies Intervall.....	14
Abbildung 11: Klinische Endpunkte vs. Ploidiestatus I	15
Abbildung 12: Klinische Endpunkte vs. Ploidiestatus II	16
Abbildung 13: Gleason $\leq 3+4=7$ -Tumoren.....	17
Abbildung 14: Gleason $\geq 4+3=7$ -Tumoren.....	17
Abbildung 15: Literaturvergleich Flowzytometrie	20

Abkürzungsverzeichnis:

A%:	Prozentualer Anteil aneuploider Tumoren
AUC:	Fläche unter der ROC-Kurve
BZ:	Bildzytometrie
cTNM	klinisches TNM-Stadium
D%:	Prozentualer Anteil diploider Tumoren
DNA:	Desoxyribonukleinsäure
FACS:	Fluorescence-Activated Cell Sorting
FZ:	Flowzytometrie
Ges.Ü.m:	Bezug des Ploidiestatus zum multivariaten Gesamtüberleben
Ges.Ü.u:	Bezug des Ploidiestatus zum univariaten Gesamtüberleben
Gl.:	Bezug des Ploidiestatus zum Gleasonscore
HCL:	Chlorwasserstoff
Krankh.Ü.m:	Bezug des Ploidiestatus zum multivariaten krankheitsspezifischen Überleben
Krankh.Ü.u:	Bezug des Ploidiestatus zum univariaten krankheitsspezifischen Überleben
LP:	Longpass Filter
M:	Methode
n.s.:	nicht signifikant
p-Wert:	Signifikanzwert
PBS:	Phosphatgepufferte Salzlösung
PMT:	Photomultiplier Tube
Progr. u:	Bezug des Ploidiestatus zum univariaten progressionsfreien Überleben
Progr. m:	Bezug des Ploidiestatus zum multivariaten progressionsfreien Überleben
PSA:	Prostata-spezifisches Antigen
pTNM	pathologisches TNM-Stadium
RNA-se:	Ribonuklease A
ROC:	Grenzwertoptimierungskurve
RPM:	engl. revolutions per minute; „Umdrehungen pro Minute“
s.:	signifikant
T%:	Prozentualer Anteil tetraploider Tumoren

TNM-Klassifikation des Prostatakarzinoms

(nach Wittekind und Meyer 2010)

T- Primärtumor	
T1	Inzidentaltumor, nicht tastbar oder durch Bildgebung erkennbar
T1a	Zufälliger histologischer Befund in < 5% des resezierten Gewebes
T1b	Zufälliger histologischer Befund in > 5% des resezierten Gewebes
T1c	Tumor mittels Stanzbiopsie diagnostiziert
T2	Der Tumor ist auf die Prostata begrenzt.
T2a	Der Tumor nimmt weniger als die Hälfte eines Prostatalappens ein.
T2b	Der Tumor nimmt mehr als die Hälfte eines Prostatalappens ein.
T2c	Der Tumor ist in beide Prostatalappen eingewachsen.
T3	Der Tumor hat die Kapsel durchbrochen.
T3a	Der Tumor hat die Kapsel ein- oder beidseitig durchbrochen.
T3b	Der Tumor ist in die Samenblase eingewachsen.
T4	Der Tumor wächst in die umliegenden Organe ein.
N- Nodalstatus	
N0	Es sind keine Lymphknoten befallen
N1	Es sind Lymphknoten befallen
Nx	Regionale Lymphknoten nicht beurteilbar
M- Fernmetastasen	
M0	Es sind keine Metastasen vorhanden
M1	Es sind Metastasen vorhanden
Mx	Mögliche Metastasierung nicht beurteilbar

Gleason-Score

(nach Egevad 2005)

Gleasonscore	
1	Scharf begrenzter Knoten
	Drüsen gleichförmig
	Dicht gepackt und mittelgroß
2	Nicht ganz scharf begrenzter Knoten
	Drüsen lockerer und ungleichmäßiger
3	Unschärfer Knoten
	Drüsen klein und ungleichmäßig
	Evtl. kleine solide Bezirke
4	Tumorbereich unscharf
	Drüsen meist ohne Innenraum
	Verschmolzene Drüsen
	Solide Bezirke
5	Tumorbereich unscharf
	Keine klaren Drüsen
	Solide Bezirke
	Weitere Veränderungen

1 Einleitung

Das Prostatakarzinom ist nach dem Lungenkarzinom der zweithäufigste Tumor bei Männern weltweit (Baade et al. 2009) und der häufigste maligne Tumor bei Männern in den westlichen Ländern (Jemal et al. 2011).

Autopsiestudien haben gezeigt, dass die Wahrscheinlichkeit für Männer, mindestens einen Karzinomherd in ihrer Prostata zu tragen, mit zunehmendem Alter ansteigt (Franks 1954, Breslow et al. 1977, Bubendorf et al. 2000, Zlotta et al. 2013). In Organen von über 50-jährigen wurde in mehr als 30% der Fälle mindestens ein Tumorareal gefunden (Franks 1954, Mcneal et al. 1986, Scardino et al. 1992). Franks postulierte in einer der ersten diesbezüglichen Autopsie- Studien eine altersabhängige Steigerung, wonach nahezu jeder 100-jährige Mann ein Prostatakarzinom in sich trägt (Franks 1954).

Überwiegend bleiben diese Tumoren jedoch ein Leben lang latent (Sandhu und Andriole 2012). Nichtsdestotrotz wird auch in Deutschland die Diagnose „Prostatakarzinom“ immer häufiger gestellt (Bertz et al. 2010). Diese Tendenz kann außer auf das steigende Alter der Gesamtbevölkerung vor allem auf den erhöhten Einsatz des PSA- Tests zurückgeführt werden (Catalona et al. 1993). Im Gegensatz hierzu steht die krankheitsbezogenen Sterberate, welche gleichbleibend bis sogar leicht rückläufig ist (Kraywinkel et al. 2012). In Deutschland wurde 2010 bei 65.830 Männern ein Prostatakarzinom diagnostiziert, wobei einer von 30 Männern hieran verstirbt (Kaatsch et al. 2013).

Bedingt durch die hohe Prävalenz und den überwiegend gutartigen Krankheitsverlauf liegt das Ziel der Früherkennung nicht in der Diagnosestellung an sich, sondern in der Reduzierung von Morbidität und Mortalität.

Ein besonderer Bedarf besteht daher an sicheren Prognosefaktoren: Durch sie soll es mehr Patienten als bisher ermöglicht werden, ohne aggressive Behandlung auszukommen. Nach derartigen „Hoffnungsträgern“ wurde in den vergangenen Jahrzehnten viel geforscht.

Die Erkenntnis, dass quantitative DNA-Störungen in Prostatakarzinomen häufig vorkommen, ließ in den 80er und 90er Jahren hoffen, dass diese, gemessen über die Gesamt-DNA-Menge mittels Zytometrie, möglicherweise als klinisch relevanter Prognosefaktor in Frage käme.

Mehrere Studien, welche allerdings nur wenige hundert Tumoren untersuchten, hatten eine Beziehung zwischen einem aneuploiden oder tetraploiden DNA-Gehalt und einem ungünstigen histologischen Phänotyp, oder gar einer ungünstigen Prognose, beschrieben (Fordham et al. 1986, Blute et al. 1989, Al-Abadi und Nagel 1990, Montgomery et al. 1990, Badalament et al. 1991, Nativ et al. 1989, Nagel und Al-Abadi 1991, Tribukait 1992, Gauwitz et al. 1994, Pollack et al. 1997, Ahlgren et al. 1999, Pretorius et al. 2009). Andere Studien hatten an ähnlich großen Kollektiven von Prostatakarzinomen allerdings keine signifikanten Assoziationen zur Patientenprognose gefunden (Haugen und Mjølnørød 1990, Jones et al. 1990, Visakorpi et al. 1995, Centeno et al. 1994, Egawa et al. 1996, Martínez-Jabaloyas et al. 2002, Silverman et al. 2004).

Trotz dieser unklaren Datenlage empfehlen verschiedene Institutionen bis heute die DNA-Zytometrie als Entscheidungshilfe bei der Frage, ob ein Prostatakarzinom behandlungsbedürftig ist, oder nicht (z.B. www.stiftung-maennergesundheit.de, www.prostatakrebsonline.de, www.barmer-gek.de, www.prostata-shg-bretten.de).

Innerhalb der letzten 20 Jahre gab es einen erheblichen Zugewinn an Wissen über die genomischen Veränderungen beim Prostatakarzinom.

Prostatakarzinome weisen auf chromosomaler Ebene oft zahlreiche Rearrangements, insbesondere Translokationen, auf (Tomlins et al. 2005, Berger et al. 2011, Weischenfeldt et al. 2013).

Häufig kommen auch Verluste von Chromosomenabschnitten (Deletionen) vor (Taylor et al. 2010). Interessanterweise ist es beim Prostatakarzinom offenbar eine Besonderheit, dass Zugewinne von DNA-Material und Amplifikationen selektierter Chromosomen seltener vorkommen (Taylor et al. 2010).

Mutationen von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen sind beim Prostatakarzinom ebenfalls eher selten (Taylor et al. 2010). Das bei vielen Tumorarten am häufigsten mutierte Tumorsuppressorgen ist p53, welches in bis zu 50% der Fälle mutiert ist (Harris und Hollstein 1993). Dieses Gen ist beim Prostatakarzinom aber nur bei ca. 2,5% der Tumoren mutiert (Schlomm et al. 2008).

Die Zahl der verschiedenen Translokationen von Chromosomenmaterial ist groß. Rekurrent sind vor allem die Rearrangements, welche zu Fusionen von Androgen-abhängigen Genen und Transkriptionsfaktoren der ETS-Gruppe führen (Kumar-Sinha et al. 2008). Es sind viele verschiedene Rearrangements bekannt. Am häufigsten ist

die TMPRSS2-ERG-Fusion, welche in über 50% der Prostatakarzinome vorkommt (Tomlins et al. 2005). Auch andere ETS-Transkriptionsfaktor-Fusionen sind häufig. Sie betreffen u.a. ETV1, ETV4, ETV5 und ELK4. Diese Fusionen kommen immerhin noch in ca. 1-5% der Prostatakarzinome vor (Tomlins et al. 2005, Tomlins et al. 2006, Helgeson et al. 2008, Rickman et al. 2009).

Mehr als 100 andere Translokationen sind in Studien, welche „Next Generation Sequencing“ (NGS) verwendet haben, gefunden worden. Die meisten von ihnen betreffen aber nur Einzelfälle (Weischenfeldt et al. 2013). In einer vor kurzem am Institut für Pathologie des UKE durchgeführten Studie wurden an 300-500 Tumoren 27 bisher nicht bekannte Translokationen des Prostatakarzinoms untersucht. Dabei wurde bei keinem dieser Translokationen eine Häufigkeit gefunden, die 1 % erreichte (persönliche Kommunikation, Prof. G. Sauter).

Chromosomale Deletionen sind beim Prostatakarzinom häufiger rekurrent als Translokationen (Saramaki und Visakorpi 2006). Deletionen von 8p11-p21, 6q12-q22, 12p12-p13, 13q14, 16q23-q24, 10q23 (PTEN), 2q12-q32, 5q13-q14, 5q21 und von 3p13 sind in jeweils mehr als 10-30% der Prostatakarzinome beschrieben (Saric et al. 1999, Saramaki und Visakorpi 2006, Sun et al. 2007, Lapointe et al. 2007, Taylor et al. 2010, Krohn et al. 2012, El Gammal et al. 2010, Krohn et al. 2012, Kluth et al. 2013, Beltran et al. 2013, Burkhardt et al. 2013).

Tatsächlich haben sich inzwischen mehrere der bekannten DNA-Veränderungen zumindest in einzelnen Studien als potentiell brauchbare Prognoseparameter angeboten. Insbesondere Deletionen von PTEN, 8p, 3p, 6q und 5q (El Gammal et al. 2010, Krohn et al. 2012, Burkhardt et al. 2013, Kluth et al. 2013, Krohn et al. 2013) haben sich hierbei als relevant erwiesen.

Angesichts der fortgesetzten Diskussion über die DNA-Zytometrie beim Prostatakarzinom soll die Relevanz dessen als Prognosemarker im Rahmen dieser Arbeit geklärt werden. An der Martini-Klinik werden jährlich mehr als 2.000 Prostatakarzinom-Patienten behandelt. Von mehr als 10.000 Patienten liegen detaillierte klinische Verlaufsdaten vor. Daher ist das UKE in Hamburg in besonderer Weise geeignet, diese Frage zu klären.

Dazu wurde an einem größeren Kollektiv eine DNA-zytometrische Untersuchung durchgeführt und die Befunde mit den klinischen Verlaufsdaten verglichen.

2 Material und Methoden

2.1 Patienten/Tumore

In die Studie eingeschlossen wurden 1.038 Patienten welche im Jahr 1998, 1999 und 2008 am UKE aufgrund eines Prostatakarzinoms operiert wurden. Das Alter der Patienten reichte von 40 bis 77 Jahren, der Durchschnitt lag bei 63,6 Jahren (Median 64 Jahre).

Die klinisch/ pathologischen Befunde der Patienten sind in Abbildung 1 dargestellt.

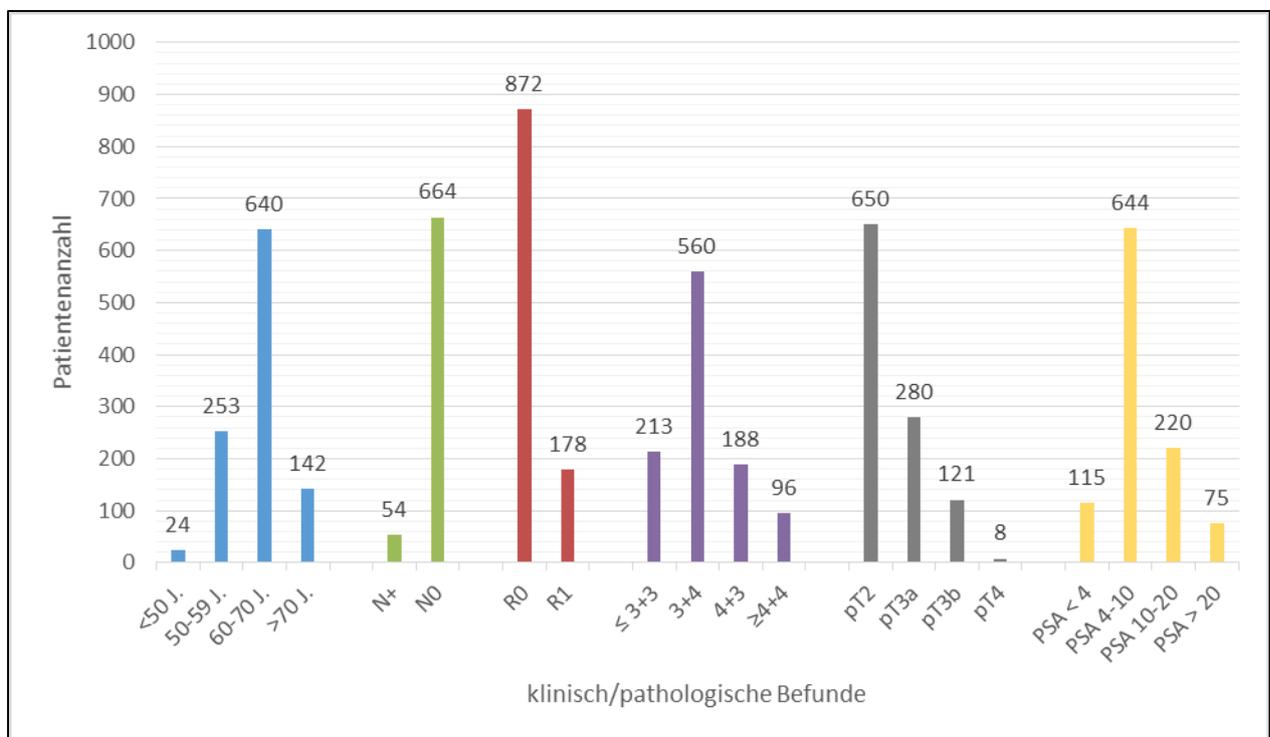


Abbildung 1: Klinisch/pathologische Befunde bei OP (blau: Patientenalter (n=1059); grün: Nodal-Status (N+= befallene Lymphknoten nachweisbar, N0= keine befallenen Lymphknoten nachweisbar; n=718); rot: Residual-Status (R+= Tumorrest nach Operation vorhanden, R0= kein Tumorrest nach Operation vorhanden; n=1050); lila: Gleason-Score (n=1057); grau: pathologisches Tumor-Stadium (pT; n=1059); gelb: präop. PSA-Wert (ng/ml) (PSA; n=1054))

Das Prostataspezifische Antigen (PSA) wurde nach der Prostataresektion im ersten Jahr quartalsweise, im zweiten Jahr halbjährlich und ab dem dritten Jahr jährlich serologisch kontrolliert.

Es wurden verschiedene klinische Endpunkte für die Studie definiert.

Als Zeit bis zum Tumorrezidiv wurde die Zeitspanne definiert, welche zwischen Operation und dem ersten Auftreten von postoperativen PSA-Werten von mehr als 0,2 ng/ml im Serum lag. Patienten ohne Anhaltspunkte für Tumorrezidive zum Zeitpunkt ihrer letzten unauffälligen Follow-ups wurden zensuriert.

Zusätzlich wurden Patienten nach folgenden Kriterien in klinische Verlaufsgruppen eingeteilt:

- **Gruppe 1** beinhaltet 553 Patienten mit organbegrenzten pT2 Karzinomen, welche über mindestens 3 Jahre kein biochemisches Rezidiv erlitten hatten.
- **Gruppe 2** beinhaltet 233 Patienten mit lokaler Invasion (pT3) ohne biochemisches Rezidiv über 3 Jahre.
- **Gruppe 3** beinhaltet 49 Karzinome, welche nicht auf eine Strahlentherapie angesprochen hatten, die nach einem biochemischen Rezidiv erfolgt war.
- **Gruppe 4** beinhaltet 29 Patienten mit metastatischer Erkrankung (pN+/pM+) im Verlauf.

174 Patienten konnten in keine der vier Gruppen eingeteilt werden, da die nötigen klinischen Informationen fehlten.

2.2 Zellvereinzelung

Alle Prostataresektate wurden nach einem standardisierten Verfahren verarbeitet, die Zellaufbereitung erfolgte modifiziert nach Hedley (Hedley et al. 1983). Dies beinhaltet die Einbeziehung der gesamten, in Formalin fixierten und in Paraffin gebetteten Prostata für die histologische Untersuchung.

Für die flowzytometrische Untersuchung wurde in einem repräsentativen Gewebeblock mikroskopisch der karzinomhaltige Gewebebereich markiert. Aus dem definierten Bereich wurden zwei Stenzen, die bis zu max. vier mm lang waren sowie einen Durchmesser von 0,6 mm hatten, mit einer Hohlnadel entnommen. Die Stenzen wurden wiederum in Paraffin eingebettet, um anschließend mit einem Mikrotom 50µ Schnitte anzufertigen, die das Tumormaterial enthielten. Die Schnitte wurden in manuell angefertigte Nylongazebeutel mit einer Maschenweite von 50µ gegeben, in Biopsiekassetten verschlossen und in Xylol (2*30 min) entparaffiniert. Die Rehydrierung erfolgte in einer absteigenden Alkoholreihe (jeweils 30 min. in 100% Ethanol, 96% Ethanol, 70% Ethanol), abschließend wurde das Zellmaterial in 2* 30 min. Aqua dest. gewaschen.

Die Entparaffinierung und Rehydrierung erfolgte auf einem Schüttler.

Zur enzymatischen Zellvereinzelung wurde 1N HCL auf 0,07 M/L verdünnt. Zu 25 mg Schweine-Pepsin wurde 5 ml 0,07 M HCL zugefügt und im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Die Gazebeutel wurden in 15 ml Tubes überführt und mit je 5 ml warmer Pepsinlösung (5mg/ml) im Wasserbad (37°C) inkubiert. Die Reaktion wurde nach 30 min. durch Zugabe von je 5 ml kaltem PBS-Puffer gestoppt.

Die sich nun in Lösung befindlichen Zellkerne wurden 10 min. bei 2.500 RPM zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf ca. 1 ml abpipettiert und die Gazebeutel verworfen.

Das Pellet wurde nun resuspendiert, anschließend wurde 450 µl der Zelllösung in 5ml-FACS-Röhrchen überführt. Diese wurde mit 500 µl RNase-A (0,05 mg/ml, justiert bei pH 7.4) im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Nach 30 min. wurden die Zellkerne mit 100 µl eines DNA/RNA-Interkalators (Propidiumiodid, 1mg/ml) im Dunkeln bei 4°C 5 min. gefärbt.

Hiernach konnte die flowzytometrische Messung erfolgen.

2.3 Durchführung der flowzytometrischen Messung

Die Untersuchung wurde an einem BD FACS Canto II-Flowzytometer durchgeführt, welches einen 488nm Laserstrahl emittiert (Filterkonfiguration PMT D: LP 665, BP 585/42). Vor Gebrauch wurde es durch benigne Prostatazellen kalibriert.

Der Flowzytometrie liegt das Prinzip der Erfassung und Auswertung von Lichtstreuung zugrunde, die entsteht, wenn die durch Vibration vereinzelt Zellkerne den Laserstrahl des Gerätes passieren. Die Lichtsignale korrelieren hierbei mit der Granularität und dem Volumen der Tumorzellkerne, die auf diese Weise in Gruppen selektioniert werden können (www.bdbiosciences.com).

Es wurden jeweils bis zu 20.000 Prostatakarzinomzellkerne gezählt, mindestens jedoch 1.000 pro Tube.

Die Ergebnisse der Messung wurden in einem Histogramm der FACS Software dargestellt und, angelehnt an zuvor beschriebene Empfehlungen (Shankey et al. 1993), ausgewertet.

Um artifizielle Signale (Peaks) der FACS-Analyse auszuschließen, die z.B. durch Verklumpen von Zellkernen oder zufälliges Signalrauschen entstehen können, wurden nur solche Peaks als „relevant“ bezeichnet und in die weitere Analyse eingeschlossen, die mehr als 10% der analysierten Zellkerne enthielten.

Die Klassifizierung der relevanten Peaks erfolgte in drei Grade: Diploid, Tetraploid und Aneuploid. Die Lage des Peaks ist direkt proportional zu dem DNA-Gehalt der Zellkerne. Dem ersten relevanten Peak (mit dem geringsten DNA-Gehalt) wird der DNA-Index 1.0 zugeordnet. Dieser „Referenz“-Peak steht für den normalen (diploiden) Chromosomensatz. Für alle weiteren relevanten Peaks wird der DNA-Index relativ zum Referenz-Peak ermittelt. Tumoren mit einem zweiten Peak im Indexbereich zwischen 1.8-2.2 wurden als tetraploid, Proben mit einem oder mehreren zusätzlichen Peaks außerhalb dieses Bereichs als aneuploid bezeichnet.

2.4 Statistik

Die statistischen Berechnungen wurden mit der JPM 11 Software (SAS Institute Inc. NC, USA) durchgeführt. Dabei wurden Kontingenz-Tabellen angefertigt und der Chi-Quadrat-Test angewandt, um die Beziehung zwischen den flowzytometrischen Kategorien und dem Tumorphänotyp zu bestimmen. Überlebenskurven wurden nach Kaplan-Meier berechnet. Der Logrank-Test wurde angewandt, um statistische Unterschiede aufzudecken. Eine „Cox Proportional Hazards Regression Analysis“ wurde durchgeführt, um die statistische Bedeutung und Unabhängigkeit von verschiedenen Prognose-Parametern zu testen. Die Tests auf Unabhängigkeit wurden mit Variablen, welche postoperativ oder präoperativ zur Verfügung standen, berechnet.

3 Ergebnisse

3.1 Flowzytometrie Ergebnisse

Die Befunde von 1.038 auswertbaren Fällen sind in Abbildung 2 dargestellt.

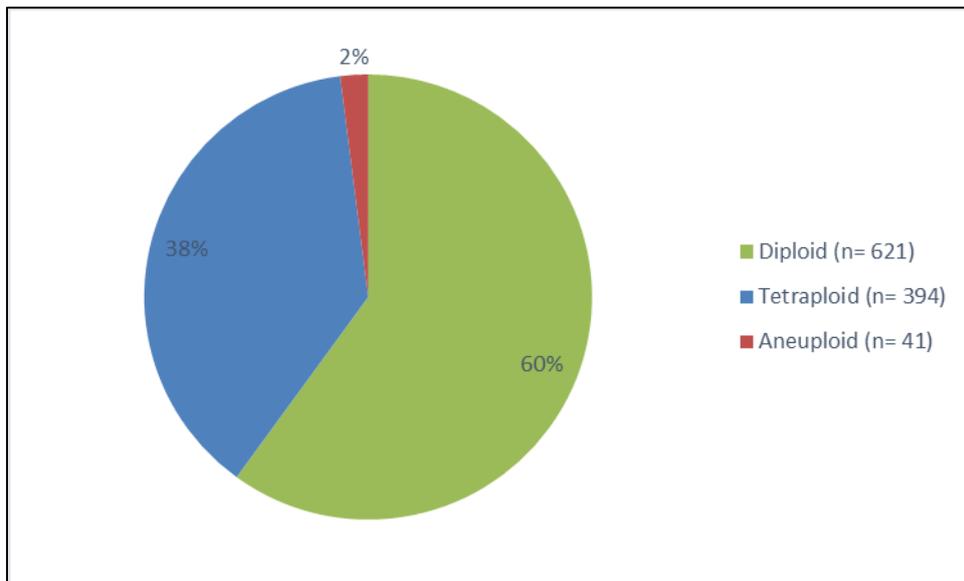


Abbildung 2: Ploidie Verteilung

Ein diploider Befund fand sich in 60%, 38% unserer Fälle waren tetraploid, 2% aneuploid.

Ergebnisse

Die Beziehung zum Gleason-Grad ist in Abbildung 3 dargestellt.

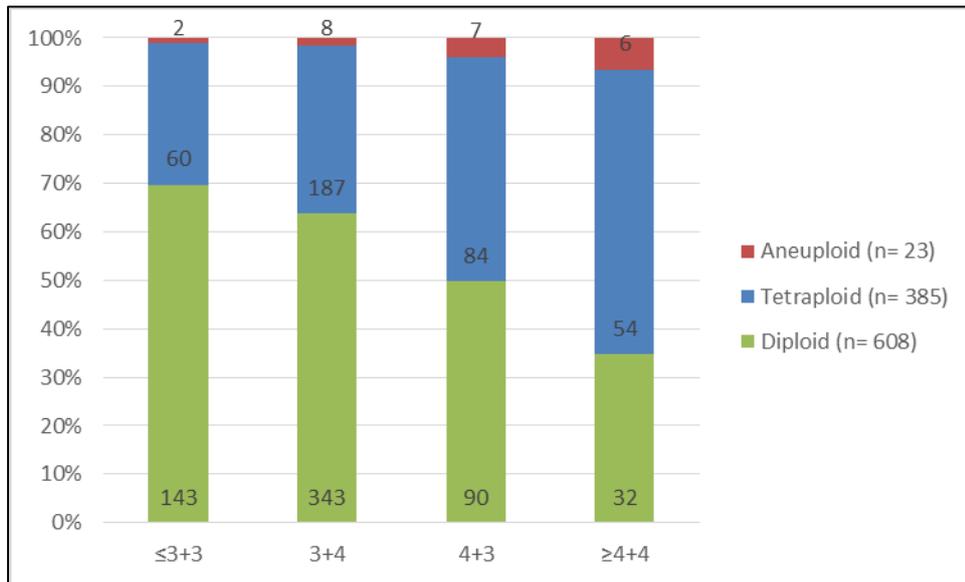


Abbildung 3: Ploidiestatus vs. Gleason-Grad, $p < 0.0001$

Insgesamt zeigt sich eine Zunahme tetraploider und aneuploider Befunde mit zunehmendem Gleason-Grad ($p < 0.0001$).

70% der Gleason 3+3 Karzinome, aber nur knapp über 30% der Karzinome mit einem Gleason von $\geq 4+4=8$ waren diploid.

Ergebnisse

Der Zusammenhang zwischen den Flowzytometrie-Befunden und dem Tumorstadium ist in Abbildung 4 dargestellt.

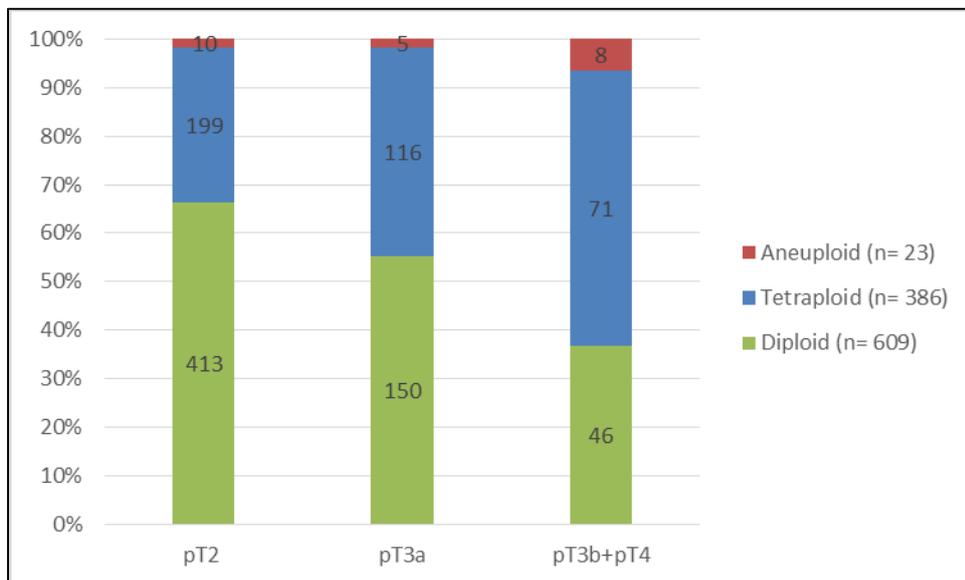


Abbildung 4: Ploidiestatus vs. Tumorstadium, $p < 0.0001$

Hier zeigt sich ein diploider Befund in mehr als 65% der pT2- Tumoren, aber nur in weniger als 40% der pT3b und pT4 Karzinome ($p < 0.0001$).

Es zeigt sich auch eine signifikante Beziehung zwischen der Ploidie und dem pN-Status. Während ca. 55% unserer pN0-Tumoren diploid waren, war dies nur bei weniger als 40% der pN+-Tumore der Fall ($p = 0.0196$, Abbildung 5).

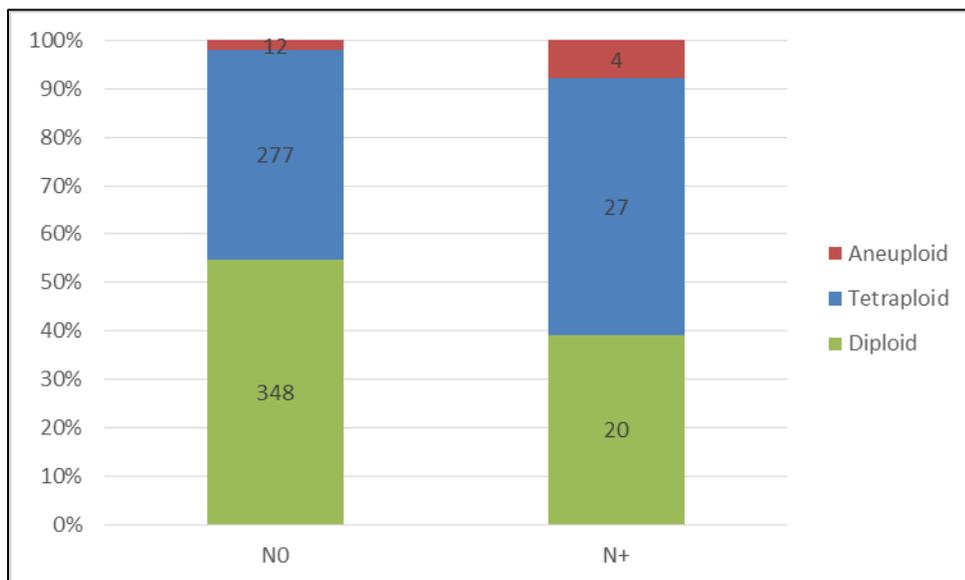


Abbildung 5: Ploidiestatus vs. Nodalstatus, $p = 0.0196$

3.2 Flowzytometrie und Überleben

Die Befunde waren signifikant mit der Prognose assoziiert. Die Prognose war am besten bei diploiden Tumoren, signifikant weniger günstig bei tetraploiden Tumoren und am schlechtesten bei aneuploiden Tumoren ($p=0.002$, Abbildung 6).

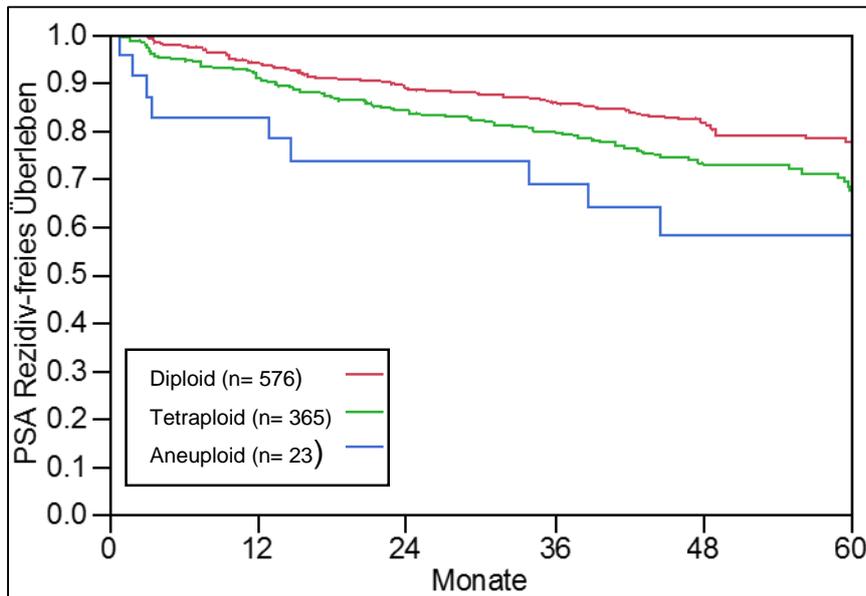


Abbildung 6: Ploidiestatus und Rezidiv-freies Intervall, $p=0.002$

Die prognostische Bedeutung der Ploidie reduzierte sich bei separater Betrachtung von Tumoren mit identischem Gleason-Grad.

Ergebnisse

In Abbildung 7 bis 10 sind die separierten Befunde für die Gleason $\leq 3+3=6$ ($p = 0.8667$) und Gleason $3+4=7$ ($p= 0.9918$), Gleason $4+3=7$ ($p= 0.1250$) und Gleason $\geq 4+4=8$ ($p= 0.7876$) dargestellt.

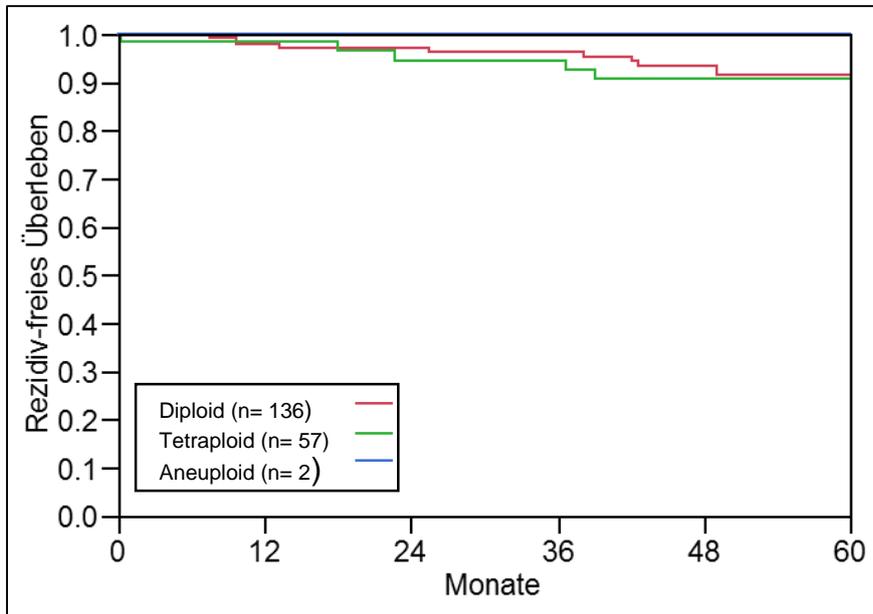


Abbildung 7: Gleason $\leq 3+3=6$ und Rezidiv-freies Intervall, $p=0.8667$

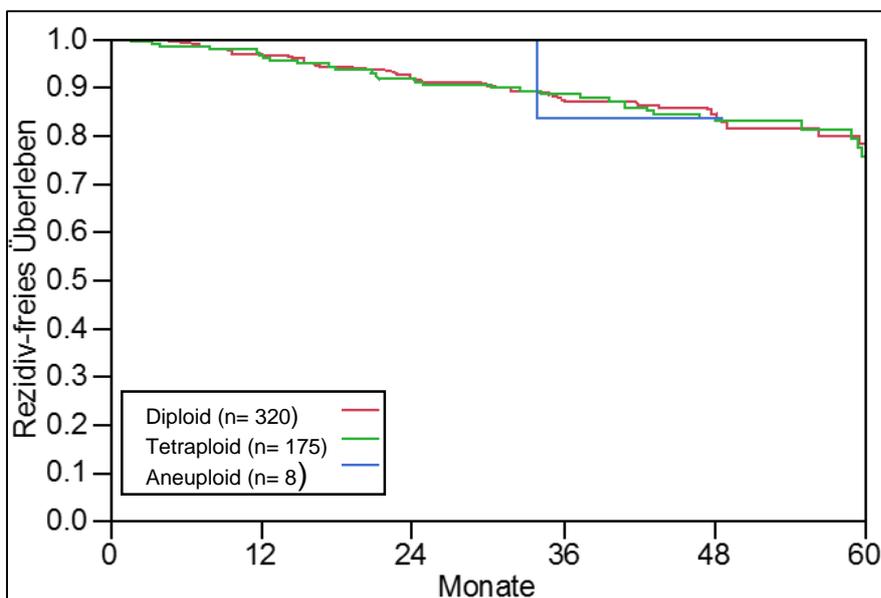


Abbildung 8: Gleason $3+4=7$ und Rezidiv-freies Intervall, $p=0.9918$

Ergebnisse

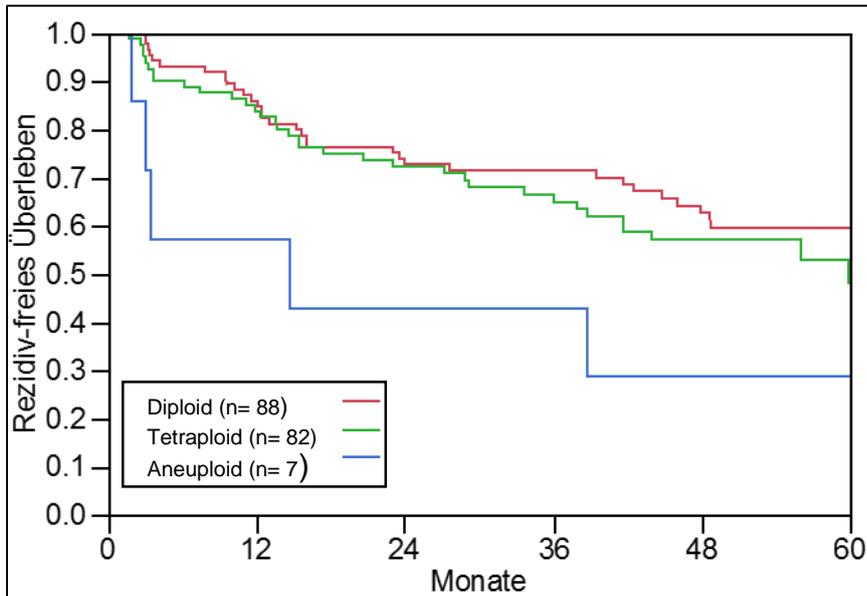


Abbildung 9: Gleason 4+3=7 und Rezidiv freies Intervall, $p=0.1250$

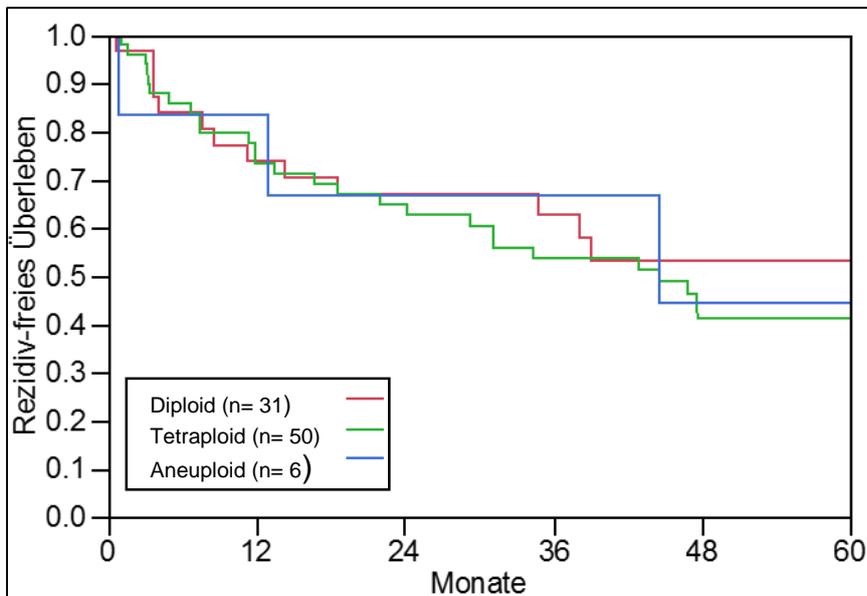


Abbildung 10: Gleason $\geq 4+4=8$ und Rezidiv-freies Intervall, $P=0.7876$

Auch wenn die Gruppengrößen hier klein sind machen die Ergebnisse deutlich, dass es keine sehr kräftige prognostische Bedeutung der Ploidie in diesen Untergruppen gibt. Am deutlichsten waren die Unterschiede zwischen Tumoren mit unterschiedlichem Ploidie-Status in der Gruppe 4+3=7.

3.2 Flowzytometrie- Befunde versus biologisch/klinische Endpunkte

Die Beziehung zwischen dem Flowzytometrie- Befund und unseren neu definierten klinischen Endpunkten ist in Abbildung 11 dargestellt.

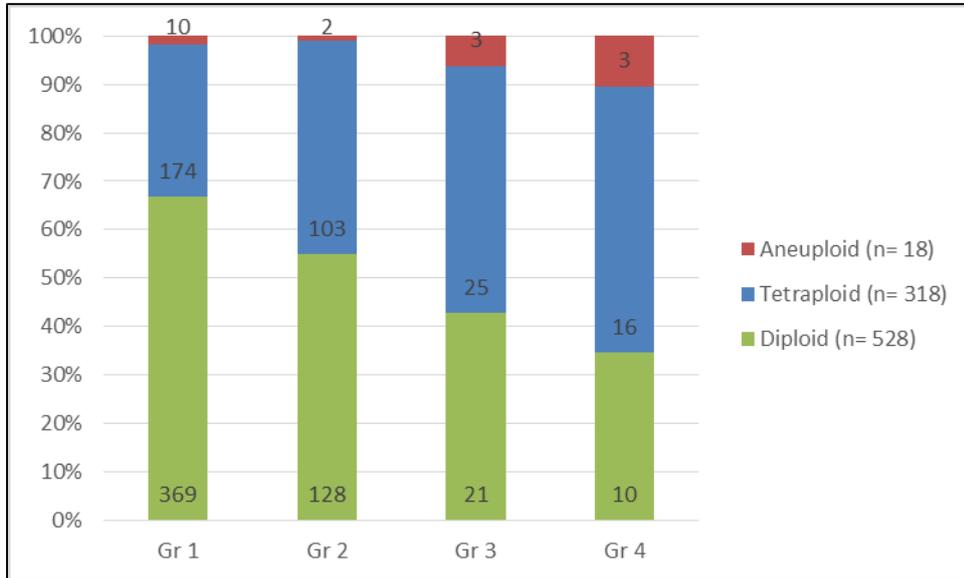


Abbildung 11: Klinische Endpunkte vs. Ploidiestatus I, $p < 0.0001$

Die Darstellung macht deutlich, dass bei Zusammenstellung aller Tumoren ein signifikanter Zuwachs ungünstiger Ploidie-Befunde mit ungünstigen klinischen Gruppen entsteht ($p < 0.0001$).

Ergebnisse

Die signifikante Beziehung wird auch in Abbildung 12 deutlich.

Es zeigt sich, dass die Wahrscheinlichkeit für Patienten mit nicht-diploidem Ploidiestatus in einer ungünstigen Gruppe zu sein größer ist, als bei Patienten mit diploidem Ploidiestatus. Diese Unterschiede sind statistisch signifikant ($p < 0.0001$).

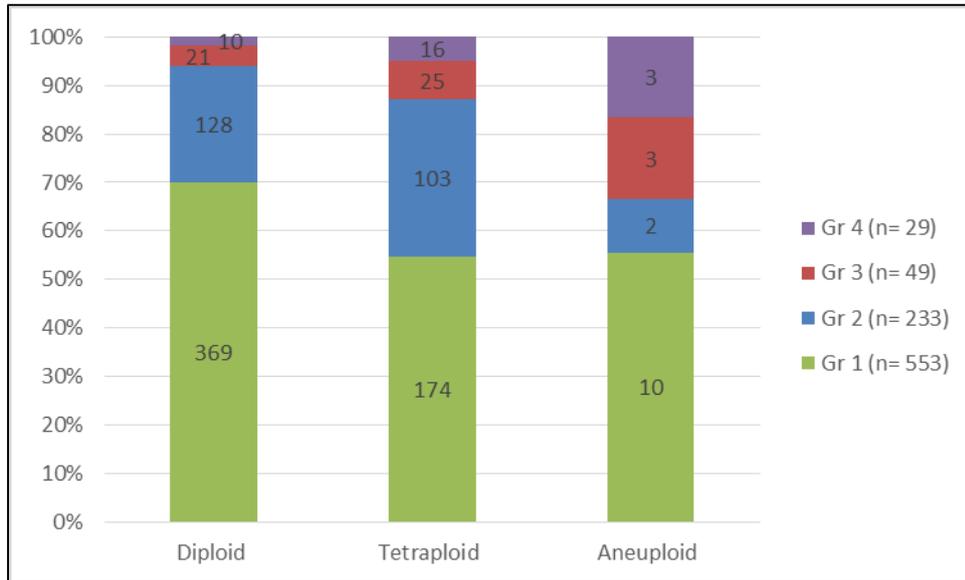


Abbildung 12: Klinische Endpunkte vs. Ploidiestatus II, $p < 0.0001$

Ergebnisse

Die separate Betrachtung von Tumoren mit maximal einem Gleason Grad 3+4=7 im Befund zeigt, dass in dieser Untergruppe die klinische Bedeutung der Flowzytometrie weniger relevant wird. Hier sind die Unterschiede zwischen diploiden und nicht diploiden Tumoren deutlich geringer (Abbildung 13, $p=0.1375$).

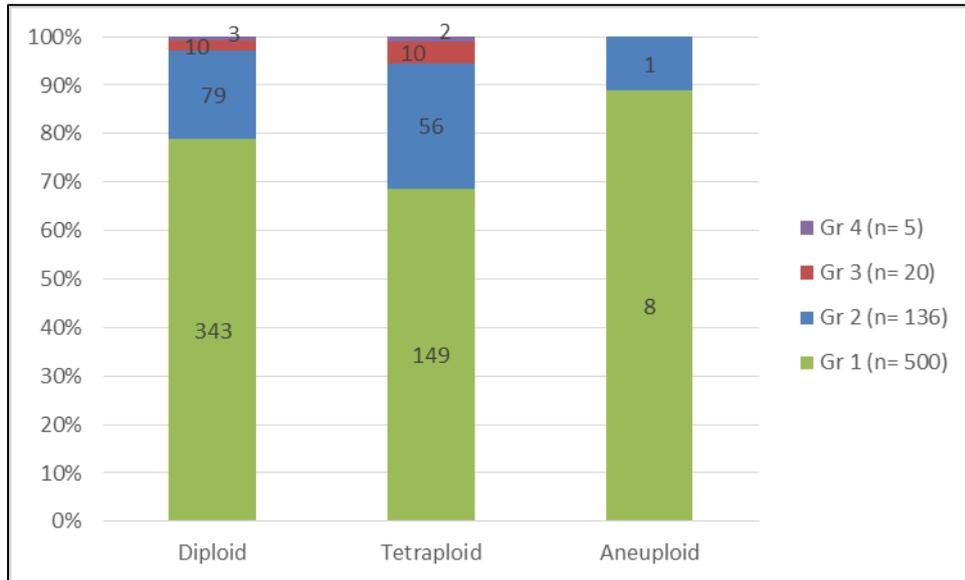


Abbildung 13: Gleason $\leq 3+4=7$, $p=0.1375$

Für Tumoren mit einem Gleasongrad 4+3 und höher (Abbildung 14) sind die Befundunterschiede etwas größer, jedoch nicht signifikant ($p=0.0825$).

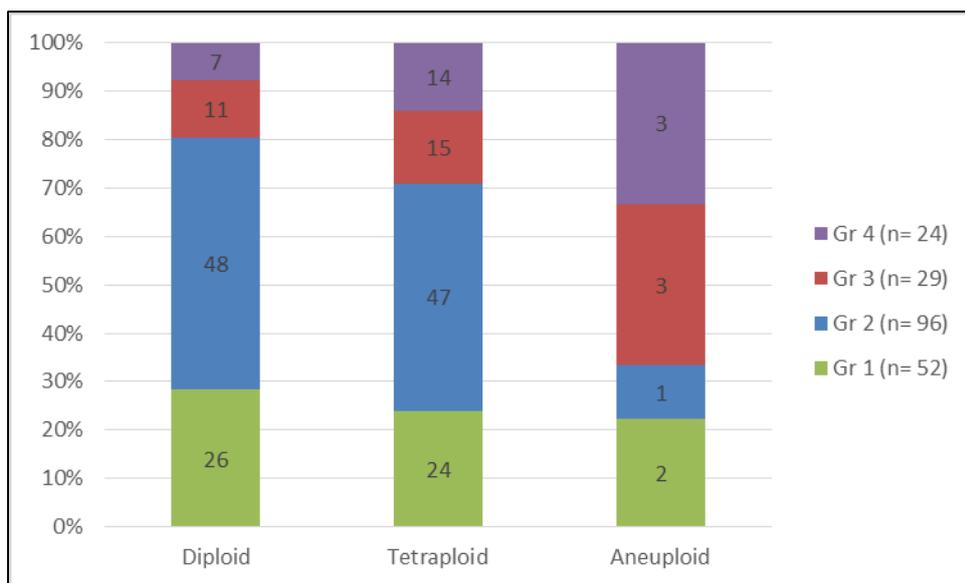


Abbildung 14: Gleason $\geq 4+3=7$, $p=0.0825$

3.3 Multivariate Analyse

Vier verschiedene multivariate Analysen wurden durchgeführt, um die Frage zu klären, ob der Ploidie-Status prognostische Informationen liefern kann, welche über die Bedeutung des Gleason-Grades und anderer klinisch/serologischer Parameter hinausgehen:

Im **Modell 1** wurden alle postoperativ erhältlichen Parameter einschließlich pT, pN, R-Status, präoperativem PSA-Wert und dem Gleason-Grad, der an der Prostata erhoben wurde, verwendet.

Modell 2 verwendet alle postoperativen Parameter, mit Ausnahme des Nodalstatus, da die Lymphadenektomie bei der Prostatektomie kein Routineverfahren darstellt. Somit sind die pN Befunde auch nur in einem Teil unserer Patientendaten vorhanden.

Die beiden weiteren Modelle (Modell 3 und 4) sollen dem besonderen Umstand Rechnung tragen, dass präoperativ nur der PSA-Wert, das klinische T-Stadium und der Gleason-Grad, der an der Biopsie erhoben wurde, zur Verfügung stehen.

Modell 3 beinhaltet deswegen in der multivariaten Analyse außer dem Ploidie-Status lediglich das präoperative PSA, das klinische Tumor-Stadium und den Gleason-Grad, der am Prostatektomie-Präparat erhoben worden war.

Da der postoperative Gleason-Grad teilweise vom präoperativen an der Stanzbiopsie erhobenen Gleason-Grad abweicht, wurde in **Modell 4** der Gleason-Grad der Prostatektomie durch denjenigen ersetzt, der an der vorrangegangenen Biopsie erhoben wurde. In diesem Szenario wurden dementsprechend das präoperative PSA, das klinische Stadium und der Gleason-Grad der Originalbiopsie neben dem Ploidiestatus eingeschlossen.

Ergebnisse

Das Resultat dieser Analyse ist in Tabelle 1 und 2 dargestellt.

Modell	n	p-Wert							
		präop. PSA-Wert	PT Stadium	cT Stadium	Gleason Grad (Prostatektomie)	Gleason Grad (Biopsie)	N- Status	R- Status	Ploidie
1	637	0,0027	<0,0001		0,0099		0,7198	0,0899	0,6049
2	948	0,0002	<0,0001		0,0001			0,0146	0,9191
3	928	<0,0001		0,0016	<0,0001				0,2421
4	919	<0,0001		0,0002		<0,0001			0,2505

Tabelle 1: In der multivariaten Analyse erhalten nur das Tumor-Stadium, der Gleason-Score und das präoperative PSA statistisch relevante Werte in Bezug auf das Überleben.

	Modell 1		Modell 2		Modell 3		Modell 4	
	AUC	gain%	AUC	gain%	AUC	gain%	AUC	gain%
		0,7224		0,73399		0,70256		0,69273
+Ploidy	0,72436	0,196	0,7337	-0,029	0,70256	0	0,70099	0,826

Tabelle 2: ROC-Analyse, kein relevanter Zugewinn prognostischer Aussagekraft der Ploidie-Bestimmung.

Zusammengefasst zeigen alle vier Modelle, dass der Ploidie-Status keine unabhängige prognostische Aussagekraft besitzt.

4 Diskussion

Die Ergebnisse unserer Untersuchung ergaben einen nicht-diploiden Befund in ca. 40% der Fälle. Diese Häufigkeit stimmt mit Studien aus der Literatur überein, welche ebenfalls Flowzytometrie verwendet haben (Abbildung 15).

Damit liegen die Ploidiedaten dieser Studie ungefähr im Mittelfeld. Deshalb dürften sie nicht durch methodologische Probleme kompromittiert sein.

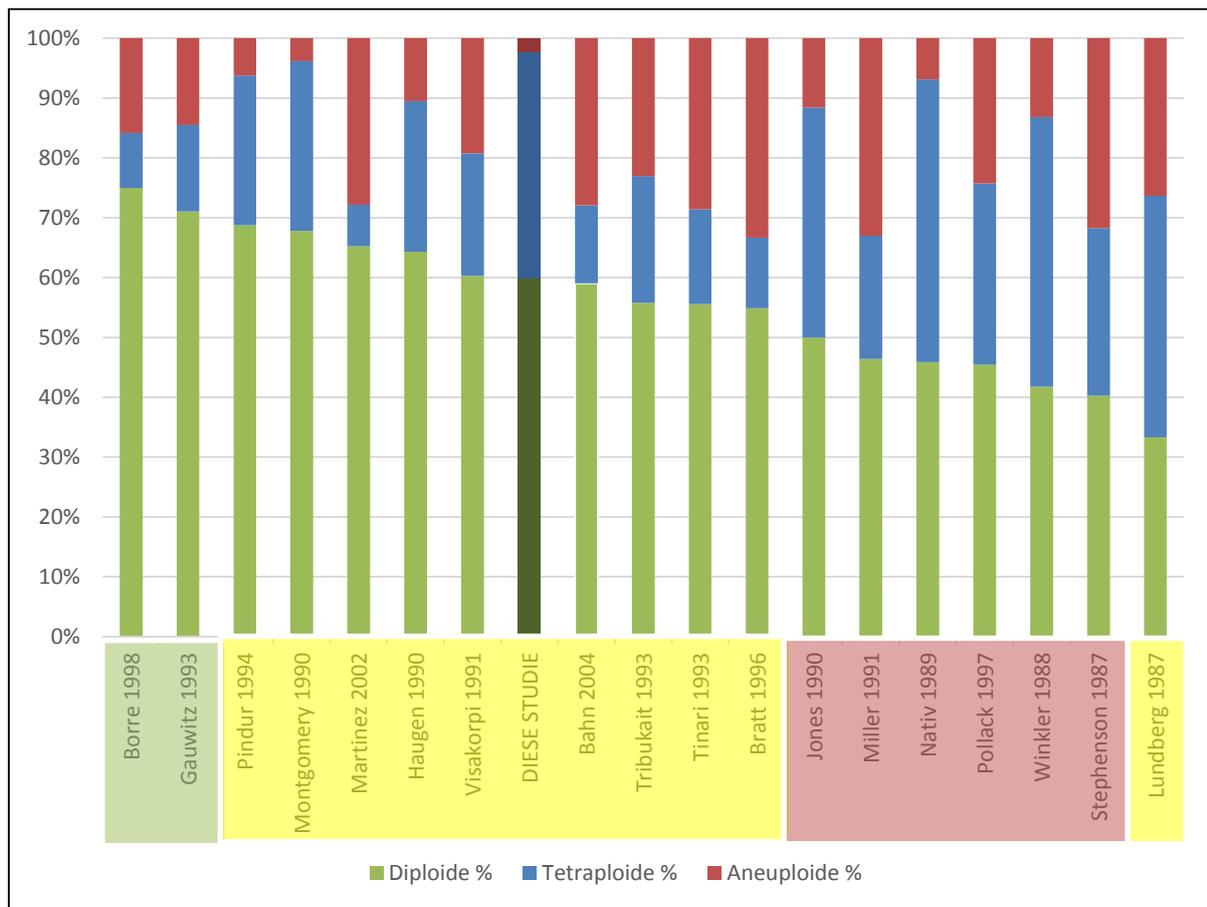


Abbildung 15: Literaturvergleich Flowzytometrie. Prozentuale Verteilung der Ploidiestaten, wobei nur Studien mit einer Klassifizierung in drei Grade verwendet wurden (diploid, tetraploid, aneuploid). Grün-markierte Studien untersuchten Tumore im Frühstadium, gelb markierte Studien untersuchten nicht selektierte Tumorphypothesen oder Populationen ohne Nachweis von Metastasen oder befallenen Lymphknoten, rot markierte Studien untersuchten fortgeschrittene Tumorstadien.

Diejenigen Studien, welche eine Anhäufung von potenziell ungünstigen Fällen untersuchten, sind speziell farblich gekennzeichnet. Es zeigt sich eine Variabilität der Befunde, die Häufigkeit nicht-diploider Befunde schwankt zwischen 25% und 67%.

Die von uns durchgeführte Untersuchung ist die mit Abstand größte ihrer Art. Die erhobenen Befunde sind bezüglich ihrer Beziehung zu Tumorphänotyp und Prognose plausibel.

Insgesamt zeigt der Vergleich der Ergebnisse dieser Studie mit den Patienten-Daten zwar durchaus, dass ein aberranter Status der DNA-Zytometrie eine signifikante Beziehung von ungünstigem Phänotyp und schlechter Prognose beinhaltet. Dass die Prognose bei aneuploiden Befunden noch etwas ungünstiger ist als bei tetraploiden, passt gut zu Modellen, die postulieren, dass im Rahmen der Tumorprogression primär eine Tetraploidisierung mit Verdopplung des gesamten Chromosomensatzes eintritt, und es erst sekundär durch Verluste einiger Chromosomen- bzw. Chromosomenanteile zu einem aneuploiden Befund kommt (Boveri 1914, Nigg 2002, Storchova und Pellman 2004).

Letztlich wird jedoch deutlich, dass der Ploidie-Status nicht besonders bedeutsam ist, da er keine Unabhängigkeit besitzt, wie multivariate Analysen unter Berücksichtigung der klinischen und pathologischen Parameter zeigen.

Dass vorherige Studien teilweise zu anderen Resultaten gekommen sind kann möglicherweise auch daran liegen, dass neben unterschiedlicher Patientenselektion auch verschiedene andere Faktoren die Ergebnisse beeinflusst haben könnten.

Alle bisherigen Studien mit dem Thema DNA-Zytometrie beim Prostatakarzinom haben nur wenige 100 oder unter 100 Fälle untersucht. Es erstaunt nicht, dass in manchen dieser kleinen Studien zwar hochsignifikante, aber nicht besonders substantielle absolute Prognoseunterschiede gefunden wurden (Tavares et al. 1966), und in anderen nicht (Jones et al. 1990).

Auch gibt es Hinweise darauf, dass mit Bildzytometrie weniger häufig nicht-diploide Befunde festgestellt werden als mit der Flowzytometrie. Bildzytometrische Untersuchungen von einigen der zur Verfügung stehenden Tumoren der Martiniklinik ergaben beispielsweise einen nicht-diploiden Befund in 23% der Fälle (n= 794), mit Flowzytometrie waren es jedoch 40% (n= 1038).

Die Tabelle 3 zeigt eine Übersicht über frühere Studien mit den jeweils geringen Untersuchungszahlen. Nicht alle konnten signifikante Zusammenhänge zu Gleason-Grad, pT-Stadium und Prognose finden.

Diskussion

Studie	Jahr	Tumor	n	D %	T %	A %	N %	M.	Gl.	pT	PSA	Progr.u.	Progr.m.	Krankh.Ü.u.	Krankh.Ü.m	Ges.Ü.u.	Ges.Ü.m.
Abaza	2006	T1a	44	0,95			0,05	FZ				n.s.	n.s.				
Badalament	1991	Prostatektomie	112	0,83			0,17	FZ	0.034	0.006	n.s.						
Bahn	2004	Kryoablation	447	0,59	0,13	0,28		FZ	n.s.		n.s.						
Blute	1989	Prostatektomie	38	0,37			0,63	FZ	0.002	n.s.				0.011	n.s.	n.s.	
Borre	1998	T1-2,Nx,M0	120	0,75	0,09	0,16		FZ		0.05		0.009	n.s.				
Bratt	1996	unselektiert	51	0,55	0,12	0,33		FZ				n.s.	n.s.			0.07	n.s.
Centeno	1994	präop. Bestrahlung	70	0,57			0,43	FZ								<0.001	
Fordham	1986	unselektiert	72	0,49			0,51	FZ			0.0004	<0.001				n.s.	
Frankfurt	1985	unselektiert	45	0,56			0,44	FZ	0.02								
Haugen	1990	unselektiert	143	0,64	0,25	0,10		FZ									
Jones	1990	Gleason 4+5	52	0,50	0,38	0,12		FZ	n.s.	0.18							n.s.
Lee	1988	unselektiert	88	0,42			0,58	FZ								<0.001	0.031
Lundberg	1987	Prostatektomie	57	0,33	0,40	0,26		FZ		<0.02		<0.0001	s.	0.0001	s.	n.s.	n.s.
Martinez	2002	Hormonbehandlung	115	0,65	0,07	0,28		FZ		<0.01		<0.01					
McIntire	1988	Stadium A	33	0,70			0,30	FZ	<0.001								0.001
Miller	1991	Stadium D2	97	0,46	0,21	0,33		FZ	<0.002			<0.006	0.02	<0.01		n.s.	
Nativ	1989	Stadium C	146	0,46	0,47	0,07		FZ				n.s.	n.s.			0.031	0.03
Pindur	1994	Prostatektomie	48	0,69	0,25	0,06		FZ				<0.05					
Pollack	1997	N1	33	0,45	0,30	0,24		FZ						<0.0001	s.		
Diese Studie		unselektiert	1038	0,60	0,38	0,02		FZ	<0.0001	<0.0001		0.002	n.s.				
Shockley	1996	Prostatektomie	100	0,71			0,29	FZ	s.		0.018						
Silverio	1996	Stadium C-D1	57	0,65			0,35	FZ	<0.001			0.01		0.002		0.004	
Stephenson	1987	Stadium D1	82	0,40	0,28	0,32		FZ		n.s.		<0.001					
Tinari	1993	unselektiert	63	0,56	0,16	0,29		FZ	n.s.	0.51						0.0109	n.s.
Tribukait	1993	unbeh./Hormonbeh.	586	0,56	0,21	0,23		FZ								0.002	
Visakorpi	1991	unselektiert	78	0,60	0,21	0,19		FZ				<0.0004					
Winkler	1988	Stadium D1	91	0,42	0,45	0,13		FZ								<0.001	n.s.
Ahlgren	1999	unselektiert	61	0,48	0,39	0,13		BZ	<0.0001		n.s.	<0.0001		0.008			
Carmichael	1995	T2	112	0,43	0,09	0,48		BZ	n.s.	n.s.							
Egawa	1996	Prostatektomie	103	0,38			0,62	BZ	<0.001							<0.001	<0.001
Forsslund	1996	Hormonbehandlung	334	0,37	0,09	0,54		BZ	<0.0001	n.s.							
Greene	1991	Frühstadium	63	0,60			0,40	BZ	<0.001	n.s.						<0.01	n.s.
Greene	1994	Stadium A oder B	141	0,58			0,42	BZ	>0.1								
Lorenzato	2004	Gleason 3+3, T1-4	74	0,69	0,07	0,24		BZ								<0.001	
Nagel	1991	Lokal fortgeschritten	271	0,25	0,23	0,52		BZ	0.04	0.856	n.s.	n.s.		n.s.		0.008	
Pindur	1994	Prostatektomie	48	0,42	0,52	0,06		BZ				<0.05					
		Bestrahlung mit/ohne															
Pollack	2003	Hormonbehandlung	149	0,63			0,37	BZ	<0.04	0.2369						<0.0002	
Song	1992	Bestrahlung	65	0,48			0,52	BZ				<0.0001		<0.001		<0.002	
Venkataram	2007	unselektiert	169	0,49			0,51	BZ	n.s.		n.s.						

Tabelle 3: Übersicht über frühere Studien. (Prozentualer Anteil diploider (D%), tetraploider (T%), aneuploider (A%) und nondiploider (N%) Tumoren; M= Methode; FZ= Flowzytometrie; BZ= Bildzytometrie; Bezug des Ploidiestatus zum Gleasonscore (Gl.), zum pT-Stadium (pT), zum PSA-Wert (PSA), zum univariaten progressionsfreien Überleben (Progr. u), zum multivariaten progressionsfreien Überleben (Progr. m), zum univariaten krankheitsspezifischen Überleben (Krankh.Ü.u), zum multivariaten krankheitsspezifischen Überleben, (Krankh.Ü.m) sowie zum univariaten Gesamtüberleben (Ges.Ü.u) und zum multivariaten Gesamtüberleben (Ges.Ü.m)). s.= signifikant; n.s.= nicht signifikant.)

Die DNA-Zytometrie war eine hochaktuelle Forschungsmethode in den 80er und 90er-Jahren des letzten Jahrhunderts. Zuletzt konnte nur mit dieser Methode an größeren Tumorzahlen die Gesamt-DNA-Menge gemessen werden. Die Erkenntnis, dass einzelne Tumoren ausgedehnte quantitative DNA-Störungen aufwiesen und andere eine relativ unveränderte DNA-Menge, ließen die Forscher damals postulieren, dass derartig massive DNA-Störungen klinische Relevanz besitzen müssten. Beziehungen, die in dieser Zeit regelmäßig zwischen Differenzierungsgrad, Tumorstadium und manchmal auch Prognose und einem aberranten Ploidie-Status gefunden wurden, bestätigten die Forscher in ihrer Ansicht, die Erhebung des DNA-Status sei eine revolutionäre und klinisch relevante Methodik. Dies betraf nicht nur das Prostatakarzinom (Tavares et al. 1966), sondern auch viele andere Tumore wie beispielsweise Karzinome von Mammae (Atkin 1972), Kolon (Wolley et al. 1982) und Lunge (Blöndal und Bengtsson 1980).

20 Jahre später und mit deutlich erweiterten Kenntnissen über die genomischen Veränderungen in neoplastischen Zellen wissen wir, dass sich die Bestimmung der Gesamt-DNA bei keinem einzigen der genannten Tumortypen in die klinische Routine durchgesetzt hat. Heute ist bekannt, dass sich relevante Veränderungen in der DNA des Prostatakarzinoms nicht durch DNA-Zytometrie erkennbar machen lassen. Deletionen von PTEN oder Mutationen von p53 führen beispielsweise zu keinen oder nur minimalen quantitativen DNA-Veränderungen, da die PTEN-Deletion oft nur ein bis zwei Megabasen beinhaltet (Li et al. 1997).

In Deutschland wird die DNA-Zytometrie beim Prostatakarzinom jedoch weiterhin von verschiedenen Institutionen und Patientenforen empfohlen (z.B. www.stiftung-maennergesundheit.de, www.prostatakrebsonline.de, www.barmer-gek.de, www.prostata-shg-bretten.de), obwohl eine klinische Relevanz nicht eindeutig durch Studien belegt werden konnte. Erst kürzlich wurde eine klinische Studie gestartet, welche die DNA-Zytometrie als klinischen Entscheidungshelfer darstellt (ProKo-Studie, siehe www.prostatakrebs-bps.de, www.harow.de).

Gegen die Verwendung von DNA-Zytometrie-Befunden als Entscheidungshilfe sprechen nicht nur die objektiven Daten dieser Studie, welche keinerlei unabhängige prognostische Bedeutung der DNA-Zytometrie erkennen lassen, sondern auch die Erkenntnis, dass beispielsweise mehr als 30% der Tumoren mit einem desaströsen Gleason-Grad (4+4 =8 oder höher) einen „benignen“ diploiden DNA-Zytometrie-Befund haben.

Zusammengefasst zeigen die Daten unserer Untersuchung, dass der DNA-Gehalt von Tumorzellen beim Prostatakarzinom mit einem ungünstigen Phänotyp und mit einer ungünstigen Prognose assoziiert ist. Dieser Zusammenhang ist aber wenig bedeutsam, er ist nicht unabhängig von den klassischen Prognoseparametern wie Gleason-Grad und pT-Stadium.

5 Zusammenfassung

Der Gesamt-DNA-Gehalt von Prostatakarzinomzellen (Ploidiestatus) wurde in den 80er und 90er Jahren des letzten Jahrhunderts als revolutionärer diagnostischer Prognosemarker diskutiert.

Die Studienlage hierzu ist jedoch bis heute unklar.

Nichtsdestotrotz gibt es weiterhin Gesellschaften, welche die Anwendung der DNA-Zytometrie für die Wahl der Therapie propagieren (z.B. www.stiftung-maennergesundheit.de, www.prostatakrebsonline.de, www.barmer-gek.de, www.prostata-shg-bretten.de).

Ziel dieser Arbeit war es, das große Patientenkollektiv des UKE/Martiniklinik dazu zu nutzen, die mögliche klinische Relevanz der DNA-Zytometrie endgültig zu klären.

Untersucht wurden 1.038 Prostatakarzinome mittels Flowzytometrie. In 60% wurde ein diploider, in 38% ein tetraploider und in 2% ein aneuploider Befund festgestellt.

Der Ploidie-Status korreliert signifikant mit dem Gleason-Grad und dem pT-Stadium. Ein diploider Ploidie-Status fand sich in 70% der Gleason $\leq 3+3=6$, in 64% der Gleason $3+4=7$, in 50% der Gleason $4+3=7$ und in 35% der Gleason $\geq 4+4=8$ Tumoren ($p < 0.0001$). Ein diploider Ploidie-Status fand sich in 66% der pT2, 55% der pT3a und 37% der pT3b/pT4 Karzinome ($p < 0.0001$). Der Ploidie-Status war auch signifikant mit dem pN-Status vergesellschaftet ($p = 0.0196$).

Die Untersuchung der Beziehung zwischen Ploidie-Status und dem PSA-freien Überleben ergab ein signifikant schlechteres Überleben bei tetraploiden und aneuploiden Tumoren als bei diploiden, wenn alle Tumoren gemeinsam analysiert wurden ($p = 0.0020$). Die separate Untersuchung von 195 Gleason $\leq 3+3=6$ ($p = 0.8667$), 503 Gleason $3+4=7$ ($p = 0.9918$), 177 Gleason $4+3=7$ ($p = 0.1250$) und 87 Gleason $\geq 4+4=8$ ($p = 0.7876$) ergab jeweils keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Ploidiestatus und der Prognose. Dementsprechend ergab die multivariate Analyse keine unabhängige prognostische Bedeutung der Ploidie.

Zusammengefasst ergeben die Untersuchungen unserer Studie, dass ein aberranter Ploidiestatus eine signifikante, aber insgesamt dennoch geringe prognostische Bedeutung aufweist, welche in multivariaten Untersuchungen bzw. Untersuchungen von Tumoren mit identischem Gleason-Grad keine unabhängige prognostische bzw. zusätzliche prognostische Relevanz besitzt.

Eine klinische Anwendung der Ploidie-Messung beim Prostatakarzinom ist daher nicht indiziert.

6 Literaturverzeichnis

Abaza et al. 2006. *Prognostic value of DNA ploidy, bcl-2 and p53 in localized prostate adenocarcinoma incidentally discovered at transurethral prostatectomy*. The Journal of urology. 6: 2701-2705.

Ahlgren et al. 1999. *Evaluation of DNA ploidy combined with a cytometric proliferation index of imprints from core needle biopsies in prostate cancer*. European urology. 4: 314–319.

Al-Abadi und Nagel 1990. *Nuclear DNA analysis: the relevance of ploidy, DNA heterogeneity and phases of the cell cycle in 329 patients with prostatic carcinoma*. Urologia internationalis. 6: 350–355.

Atkin 1972. *Modal deoxyribonucleic acid value and survival in carcinoma of the breast*. British medical journal. 5795: 271.

Baade et al. 2009. *International epidemiology of prostate cancer: geographical distribution and secular trends*. Molecular nutrition & food research. 2: 171–184.

Badalament et al. 1991. *DNA ploidy and prostate-specific antigen as prognostic factors in clinically resectable prostate cancer*. Cancer. 12: 3014–3023.

Bahn et al. 2004. *In treating localized prostate cancer the efficacy of cryoablation is independent of DNA ploidy type*. Technology in Cancer Research & Treatment. 3: 253-257.

Beltran et al. 2013. *Targeted next-generation sequencing of advanced prostate cancer identifies potential therapeutic targets and disease heterogeneity*. European urology. 5: 920–926.

Berger et al. 2011. *The genomic complexity of primary human prostate cancer*. Nature. 7333: 214–220.

Bertz et al. 2010. *Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland*. 98-102.

Blöndal und Bengtsson 1980. *Nuclear DNA measurements in squamous cell carcinoma of the lung: a guide for prognostic evaluation*. Anticancer research. 2: 79–86.

- Blute et al. 1989. *Pattern of failure after radical retropubic prostatectomy for clinically and pathologically localized adenocarcinoma of the prostate: influence of tumor deoxyribonucleic acid ploidy*. J urol. 5: 1262–1265.
- Borre et al. 1998. *DNA ploidy and survival of patients with clinically localized prostate cancer treated without intent to cure*. The Prostate. 4: 244-249.
- Boveri 1914. *Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren*. Gustav Fischer.1-64.
- Bratt et al. 1996. *Metaphase cytogenetics and DNA flow cytometry with analysis of S-phase fraction in prostate cancer: influence on prognosis*. Urology. 2: 218-224.
- Breslow et al. 1977. *Latent carcinoma of prostate at autopsy in seven areas. Collaborative study organized by the International Agency for Research on Cancer, Lyons, France*. International journal of cancer. 5: 680–688.
- Bubendorf et al. 2000. *Metastatic patterns of prostate cancer: an autopsy study of 1,589 patients*. Human pathology. 5: 578–583.
- Burkhardt et al. 2013. *CHD1 is a 5q21 tumor suppressor required for ERG rearrangement in prostate cancer*. Cancer research. 9: 2795–2805.
- Catalona et al. 1993. *Detection of organ-confined prostate cancer is increased through prostate-specific antigen-based screening*. Jama. 8: 948–954.
- Carmichael et al. 1995. *Deoxyribonucleic acid ploidy analysis as a predictor of recurrence following radical prostatectomy for stage T2 disease*. The Journal of urology. 3 Pt 2: 1015-1019.
- Centeno et al. 1994. *Flow cytometric analysis of DNA ploidy, percent S-phase fraction, and total proliferative fraction as prognostic indicators of local control and survival following radiation therapy for prostate carcinoma*. International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics. 2: 309–315.
- Di Silverio et al. 1995. *DNA ploidy, Gleason score, pathological stage and serum PSA levels as predictors of disease-free survival in C-D1 prostatic cancer patients submitted to radical retropubic prostatectomy*. European urology. 3: 316-321.
- Egawa et al. 1996. *Deoxyribonucleic acid ploidy status as no basis for pathologic stage prediction in clinically resectable prostate cancer*. Urology. 4: 548–552.

- El Gammal et al. 2010. *Chromosome 8p deletions and 8q gains are associated with tumor progression and poor prognosis in prostate cancer*. *Clinical Cancer Research*. 1: 56–64.
- Epstein et al. 2005. *The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) consensus conference on Gleason grading of prostatic carcinoma*. *The American journal of surgical pathology* 29.9: 1228-1242.
- Fordham et al. 1986. *Prostatic carcinoma cell DNA content measured by flow cytometry and its relation to clinical outcome*. *British journal of surgery*. 5: 400–403.
- Forslund et al. 1996. *Near tetraploid prostate carcinoma*. *Cancer*: 1748-1755.
- Frankfurt et al. 1985. *Relationship between DNA ploidy, glandular differentiation, and tumor spread in human prostate cancer*. *Cancer research*. 3: 1418-1423.
- Franks 1954. *Latent carcinoma*. *Ann R Coll Surg Engl*. 4: 236–249.
- Gauwitz et al. 1994. *The prognostic significance of DNA ploidy in clinically localized prostate cancer treated with radiation therapy*. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*. 4: 821–828.
- Greene et al. 1991. *DNA ploidy by image analysis of individual foci of prostate cancer: a preliminary report*. *Cancer research*. 15: 4084-4089.
- Harris und Hollstein 1993. *Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene*. *New England Journal of Medicine*. 18: 1318–1327.
- Haugen und Mjølnerød 1990. *DNA-ploidy as prognostic factor in prostatic carcinoma*. *International journal of cancer*. 2: 224–228.
- Hedley et al. 1983. *Method for analysis of cellular DNA content of paraffin-embedded pathological material using flow cytometry*. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 11: 1333–1335.
- Helgeson et al. 2008. *Characterization of TMPRSS2: ETV5 and SLC45A3: ETV5 gene fusions in prostate cancer*. *Cancer research*. 1: 73–80.
- Jemal et al. 2011. *Global cancer statistics*. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2: 69–90.

Jones et al. 1990. *DNA content in prostatic adenocarcinoma. A flow cytometry study of the predictive value of aneuploidy for tumor volume, percentage Gleason grade 4 and 5, and lymph node metastases.* Cancer. 4: 752–757.

Kaatsch et al. 2013. *Krebs in Deutschland 2009/2010.* 88-91.

Kluth et al. 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. 26:975–983.

Kraywinkel et al. 2012. *Epidemiologie und Früherkennung häufiger Krebserkrankungen in Deutschland.* 5-6.

Krohn et al. 2012. *Genomic Deletion of *PTEN* Is Associated with Tumor Progression and Early PSA Recurrence in ERG Fusion-Positive and Fusion-Negative Prostate Cancer.* The American journal of pathology. 2: 401–412.

Krohn et al. 2013. *Recurrent deletion of 3p13 targets multiple tumour suppressor genes and defines a distinct subgroup of aggressive ERG fusion-positive prostate cancers.* The Journal of pathology. 1: 130–141.

Kumar-Sinha et al. 2008. *Recurrent gene fusions in prostate cancer.* Nature Reviews Cancer. 7: 497–511.

Lapointe et al. 2007. *Genomic profiling reveals alternative genetic pathways of prostate tumorigenesis.* Cancer research. 18: 8504–8510.

Lee et al. 1988. *Flow cytometric determination of ploidy in prostatic adenocarcinoma: a comparison with seminal vesicle involvement and histopathological grading as a predictor of clinical recurrence.* The Journal of Urology. 4: 769-774.

Li et al. 1997. *PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer.* Science. 5308: 1943–1947.

Lorenzato et al. 2004. *DNA image cytometry on biopsies can help the detection of localized Gleason 3+ 3 prostate cancers.* The Journal of urology. 4: 1311-1313.

Lundberg et al. 1987. *DNA flow cytometry and histopathological grading of paraffin-embedded prostate biopsy specimens in a survival study.* Cancer research. 7: 1973-1977.

- Martínez-Jabaloyas et al. 2002. *Prognostic value of DNA ploidy and nuclear morphometry in prostate cancer treated with androgen deprivation*. *Urology*. 5: 715–720.
- McIntire et al. 1988. *The prognostic value of DNA ploidy combined with histologic substaging for incidental carcinoma of the prostate gland*. *American journal of clinical pathology*. 3: 370-373.
- Mcneal et al. 1986. *Patterns of progression in prostate cancer*. *The Lancet*. 8472: 60–63.
- Miller et al. 1991. *The prognostic value of deoxyribonucleic acid flow cytometric analysis in stage D2 prostatic carcinoma*. *The Journal of urology*. 6: 1192.
- Montgomery et al. 1990. *Stage B prostate adenocarcinoma: flow cytometric nuclear DNA ploidy analysis*. *Archives of Surgery*. 3: 327.
- Nativ et al. 1989. *Stage C prostatic adenocarcinoma: flow cytometric nuclear DNA ploidy analysis*. *Mayo Clinic Proceedings*. 64:911-919.
- Nagel und Al-Abadi 1991. *The prognostic significance of ploidy and DNA-heterogeneity in the primary diagnosis and monitoring of patients with locally advanced prostatic carcinoma*. *Scand J Urol Nephrol Suppl*: 83–92.
- Nigg 2002. *Centrosome aberrations: cause or consequence of cancer progression?* *Nature Reviews Cancer*. 11: 815–825.
- Pindur et al. 1994. *DNA ploidy measurements in prostate cancer: differences between image analysis and flow cytometry and clinical implications*. *The Prostate*. 4: 189-198.
- Pollack et al. 1997. *The significance of DNA-ploidy and S-phase fraction in node-positive (stage D1) prostate cancer treated with androgen ablation*. *The Prostate*. 1: 21–28.
- Pretorius et al. 2009. *Large scale genomic instability as an additive prognostic marker in early prostate cancer*. *Analytical Cellular Pathology*. 4: 251–259.
- Rickman et al. 2009. *SLC45A3-ELK4 is a novel and frequent erythroblast transformation-specific fusion transcript in prostate cancer*. *Cancer research*. 7: 2734–2738.

Sandhu und Andriole 2012. *Overdiagnosis of prostate cancer*. JNCI Monographs. 45: 146–151.

Saramaki und Visakorpi 2006. *Chromosomal aberrations in prostate cancer*. Frontiers in bioscience: a journal and virtual library: 3287–3301.

Saric et al. 1999. *Genetic pattern of prostate cancer progression*. International journal of cancer. 2: 219–224.

Scardino et al. 1992. *Early detection of prostate cancer*. Human pathology. 3: 211–222.

Schlomm et al. 2008. *Clinical significance of p53 alterations in surgically treated prostate cancers*. Modern Pathology. 11: 1371–1378.

Shankey et al. 1993. *Guidelines for implementation of clinical DNA cytometry*. Cytometry. 5: 472–477.

Shockley et al. 1996. *Comparative analysis of prognostic factors in men undergoing radical prostatectomy for adenocarcinoma of the prostate, including DNA ploidy, surgical tumor stage, prostatic specific antigen, Gleason grade, and age*. The Prostate. 1: 46-50.

Song et al. 1992. *Nuclear deoxyribonucleic acid content measured by static cytometry: important prognostic association for patients with clinically localized prostate carcinoma treated by external beam radiotherapy*. The Journal of urology. 3 Pt 2: 794-797.

Stephenson et al. 1987. *Flow cytometry of prostate cancer: relationship of DNA content to survival*. Cancer research. 9: 2504-2507.

Storchova und Pellman 2004. *From polyploidy to aneuploidy, genome instability and cancer*. Nature reviews Molecular cell biology. 1: 45–54.

Sun et al. 2007. *DNA copy number alterations in prostate cancers: a combined analysis of published CGH studies*. The Prostate. 7: 692–700.

Tavares et al. 1966. *Tumour ploidy and prognosis in carcinomas of the bladder and prostate*. British journal of cancer. 3: 438.

Taylor et al. 2010. *Integrative genomic profiling of human prostate cancer*. Cancer cell. 1: 11–22.

- Tinari et al. 1993. *DNA and S-Phase fraction analysis by flow cytometry in prostate cancer. Clinicopathologic implications.* Cancer. 4: 1289-1296.
- Tomlins et al. 2005. *Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer.* Science. 5748: 644–648.
- Tomlins et al. 2006. *TMPRSS2: ETV4 gene fusions define a third molecular subtype of prostate cancer.* Cancer research. 7: 3396–3400.
- Tribukait 1992. *Nuclear deoxyribonucleic acid determination in patients with prostate carcinomas: clinical research and application.* European urology: 64–76.
- Venkataraman et al. 2007. *Identification of patients with low-risk for aneuploidy: Comparative discriminatory models using linear and machine-learning classifiers in prostate cancer.* The Prostate. 14: 1524-1536.
- Visakorpi et al. 1991. *Flow cytometric analysis of DNA ploidy and S-phase fraction from prostatic carcinomas: implications for prognosis and response to endocrine therapy.* British journal of cancer. 3: 578.
- Visakorpi et al. 1995. *Genetic changes in primary and recurrent prostate cancer by comparative genomic hybridization.* Cancer research. 2: 342–347.
- Weischenfeldt et al. 2013. *Integrative genomic analyses reveal an androgen-driven somatic alteration landscape in early-onset prostate cancer.* Cancer cell. 2: 159–170.
- Wittekind und Meyer. 2010 *TNM Klassifikation maligner Tumoren.* UICC. Wiley-VCH Verlag, Weinheim. 7: 229-234
- Wolley et al. 1982. *DNA distribution in human colon carcinomas and its relationship to clinical behavior.* Journal of the National Cancer Institute. 1: 15–22.
- Zlotta et al. 2013. *Prevalence of prostate cancer on autopsy: cross-sectional study on unscreened Caucasian and Asian men.* Journal of the National Cancer Institute. 105: 1050-1058.

7 Danksagung

Diese Arbeit möchte ich meinen beiden ärztlichen Vorbildern, meinem Großvater Heinz Ditscheid und meinem Vater Bernhard Ditscheid widmen.

Ich danke meinem Doktorvater Herrn Guido Sauter sowie meinem Betreuer Herrn Ronald Simon für die großartige Betreuung und die spannende Zeit.

Außerdem danke ich den Mitarbeitern des TMA-Labors des Instituts für Pathologie für deren Hilfe.

Mein großer Dank gilt meinem Mann Marco. Ohne seine Unterstützung und Geduld wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.

8 Lebenslauf

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

9 Eidesstattliche Erklärung

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

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

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