

**Prognostische Relevanz von Glykoprotein 2  
bei Prostata-Tumoren**  
Eine immunhistochemische Tissue Microarray-Studie  
an über 17.000 Tumoren

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Medizin (Dr. med.)

an der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Karin Günther

aus

Pinneberg

2025

Betreuer:in / Gutachter:in der Dissertation:

Prof. Dr. Guido Sauter

Gutachter:in der Dissertation:

Prof. Dr. Walter Fiedler

Vorsitz der Prüfungskommission:

Prof. Dr. Walter Fiedler

Mitglied der Prüfungskommission:

Prof. Dr. Sarah Minner

Mitglied der Prüfungskommission:

PD Dr. Tim Ludwig

Datum der mündlichen Prüfung:

12.01.2026

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Tumorerkrankungen im Allgemeinen.....	1
1.1.1 Prostatakarzinom .....	5
1.2 Glykoprotein 2 .....	12
1.2.1 Aufbau und Struktur .....	14
1.2.2 Funktion .....	18
1.2.3 Klinische Bedeutung .....	20
1.2.4 Bedeutung in Tumoren .....	22
1.3 Ziel dieser Arbeit.....	23
2. Material und Methoden.....	24
2.1 TMA .....	24
2.2 Für die Studie verwendete TMAs .....	31
2.3 Immunhistochemie .....	32
2.4 GP2 Immunhistochemie .....	35
2.5 Statistik.....	36
3. Ergebnisse.....	37
3.1 Prognostische Bedeutung klinisch pathologischer Parameter .....	37
3.2 Technische Aspekte.....	40
3.3 GP2-Positivität .....	40
3.4 GP2-Expression beim Prostatakarzinom, Tumorphänotyp und Prognose .....	45
3.5 GP2-Expression und ERG-Status.....	47
3.6 GP2-Expression, Phänotyp und Patientenprognose in ERG-positiven und ERG-negativen Tumoren .....	48
3.7 Multivariate Analyse.....	52
3.8 GP2-Expression vs. Deletionsstatus .....	53

4. Diskussion .....	56
5. Zusammenfassung .....	63
6. Abstract .....	64
7. Abkürzungsverzeichnis .....	65
8. Literaturverzeichnis .....	68
9. Abbildungsverzeichnis.....	85
10. Tabellenverzeichnis.....	87
11. Erklärung des Eigenanteils an der Publikation.....	88
12. Eidesstattliche Versicherung .....	89
13. Danksagung .....	90



# 1. Einleitung

## 1.1 Tumorerkrankungen im Allgemeinen

Maligne Tumorerkrankungen zählen zu den gefürchtetsten Erkrankungen weltweit. Laut Robert Koch-Institut (RKI) erkrankt fast jeder Zweite in seinem Leben an mindestens einer malignen Neoplasie. Das Risiko der Frauen liegt bei 42,6% und bei Männern bei 47,5% (Koch-Institut, 2019).

Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) prognostiziert eine Verdopplung der Neuerkrankungen bis 2040. Grund dafür seien die steigende Lebenserwartung, da Krebs vor allem im höheren Lebensalter auftritt. Neben dem unveränderbaren Risiko ‚Lebensalter‘ gibt es aber auch veränderbare Risiken. Zu den wichtigsten Krebsrisikofaktoren in den Industrienationen zählen laut WHO Tabak- und Alkoholkonsum, Übergewicht, Bewegungsmangel und mangelhafte Ernährung (Weltgesundheitsorganisation, 2020).

Laut des Krebsberichtes 2019/2020 des Robert-Koch-Institutes werden allein dem Tabakkonsum etwa 19% aller Krebserkrankungen in Deutschland pro Jahr zugeschrieben. Demnach ergibt sich: je mehr ungesunde Verhaltensweisen zusammenkommen, desto höher steigt das Risiko an Krebs zu erkranken. Daraus resultiert die Berechnung, dass mindestens 37% aller Krebsneuerkrankungen in Deutschland vermeidbar oder durch die genannten Risikofaktoren erklärbar wären (Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ), 2021, Ronckers et al., 2023).

Die Übersicht der epidemiologischen Maßzahlen des Robert-Koch-Instituts (Abbildung 1) zeigt in den aktuell ausgewerteten Krebsdaten 2019/2020 insgesamt 493.200 Neuerkrankungen für Deutschland 2020. Diese Summe ergibt sich aus 261.800 Neuerkrankungen bei Männern und 231.400 Neuerkrankungen bei Frauen. Die absolute 5-Jahres-Überlebensrate (2019/2020) liegt bei 58% bei Frauen und 52% bei Männern über alle Tumoren. Dies bedeutet, dass bei mehr als 50% der Krebserkrankten die tumorspezifische Therapie zu einer Heilung oder zu einer deutlichen Lebensverlängerung und Verbesserung der Lebensqualität geführt haben, auch bei Patienten/innen, die nicht geheilt werden konnten und die an den Folgen ihrer Krebserkrankung verstarben. Die relativen Überlebenschancen hängen dabei ausschlaggebend vom Tumortyp ab und reichen von Ergebnissen unter 20% bei malignen Tumoren der Leber, Lunge und Bauchspeicheldrüse bis hin zu Werten über 90% bei Hodentumoren, malignen Melanomen der Haut und Prostatatumoren (Abbildung 2) (Ronckers et al., 2023).

Inzidenz	2019		2020			
	Frauen	Männer	Frauen	Männer		
Neuerkrankungen	244.000	279.700	231.400	261.800		
rohe Neuerkrankungsrate <sup>1</sup>	579,7	682,1	549,3	638,2		
standardisierte Neuerkrankungsrate <sup>1, 2</sup>	356,5	437,6	337,4	406,0		
mittleres Erkrankungsalter <sup>3</sup>	69	70	69	70		
Mortalität	2019		2020		2021	
	Frauen	Männer	Frauen	Männer	Frauen	Männer
Sterbefälle	105.682	124.560	104.949	125.274	104.598	123.292
rohe Sterberate <sup>1</sup>	251,0	303,8	249,1	305,3	248,2	300,4
standardisierte Sterberate <sup>1, 2</sup>	121,3	177,1	118,7	174,9	117,2	169,8
mittleres Sterbealter <sup>3</sup>	77	75	77	75	78	75
Prävalenz und Überlebensraten	5 Jahre		10 Jahre		25 Jahre	
	Frauen	Männer	Frauen	Männer	Frauen	Männer
Prävalenz	801.700	835.000	1.384.600	1.379.200	2.365.800	2.172.100
absolute Überlebensrate (2019 – 2020) <sup>4</sup>	58	52	47	39		
relative Überlebensrate (2019 – 2020) <sup>4</sup>	66	62	61	57		

<sup>1</sup> je 100.000 Personen <sup>2</sup> altersstandardisiert nach alter Europabevölkerung <sup>3</sup> Median <sup>4</sup> in Prozent

*Abbildung 1 – Übersicht über die wichtigsten epidemiologischen Maßzahlen in Deutschland 2020. Gemeinsame Publikation des Zentrums für Krebsregisterdaten und der Gesellschaft der Epidemiologischen Krebsregister in Deutschland E.V. Krebs in Deutschland für 2019/2020, 14.Ausgabe, Robert-Koch Institut, Berlin 2023 (Ronckers et al., 2023)*

Die Heilungschancen und Therapien von Tumoren sind maßgeblich vom Ursprungsgewebe, sowie der Größe und der Lage im Körper, der Infiltration ins Gewebe und dem Vorhandensein von Metastasen abhängig. Aber auch das Alter, die körpereigene Abwehr und der allgemeine Gesundheitszustand des/der Patienten/in spielen eine zentrale Rolle, sowie der Zeitpunkt der Entdeckung einer Neoplasie. Je früher ein Tumor diagnostiziert und behandelt werden kann, desto therapierbarer und heilbarer könnte er möglicherweise sein (Aigner et al., 2016).

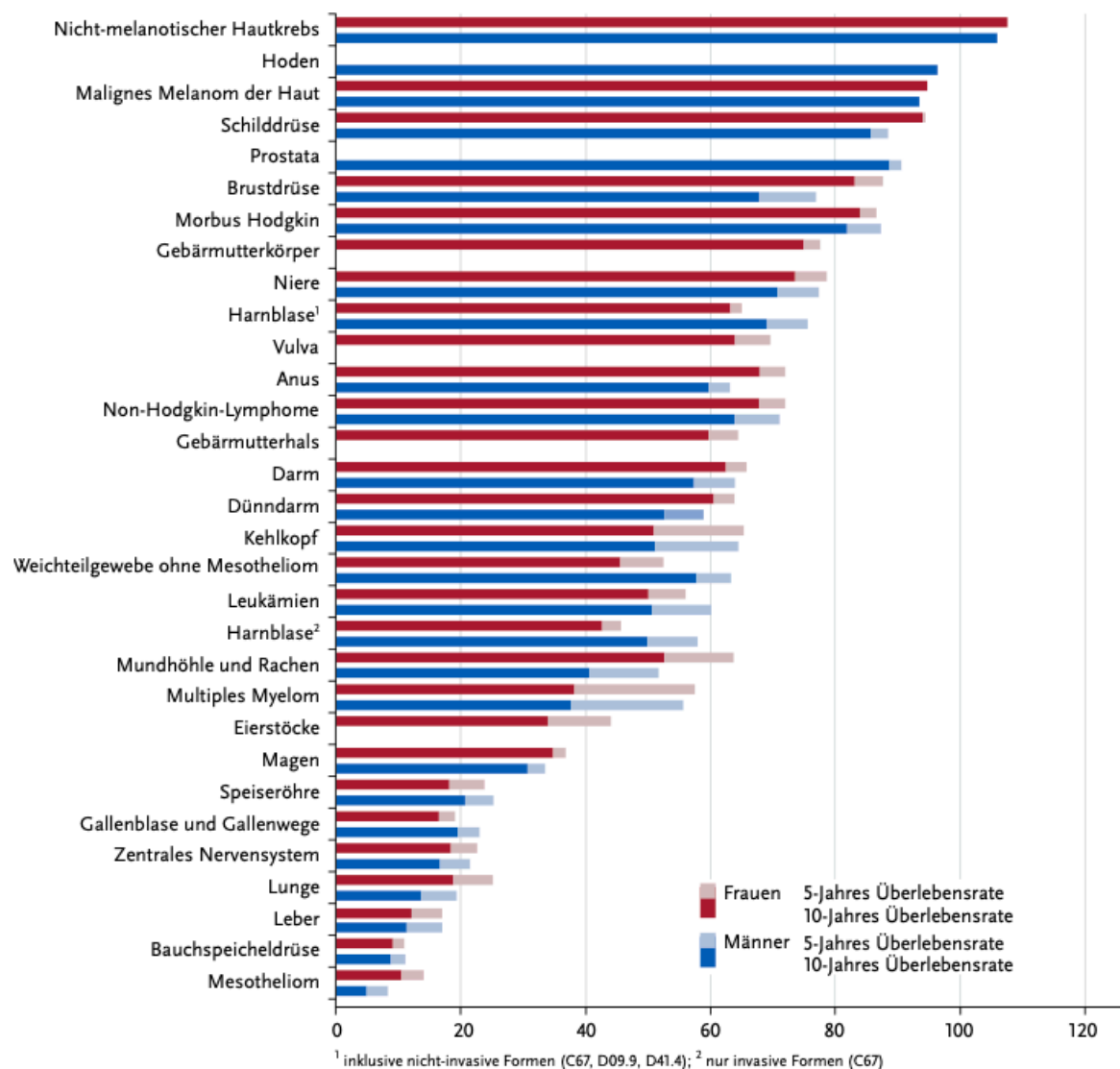


Abbildung 2 – Vergleich der relativen 5-/10-Jahres-Überlebensraten nach Lokalisation und Geschlecht, Deutschland 2019-2020 (Periodenanalyse). Gemeinsame Publikation des Zentrums für Krebsregisterdaten und der Gesellschaft der Epidemiologischen Krebsregister in Deutschland E.V. Krebs in Deutschland für 2019/2020, 14.Ausgabe, Robert-Koch Institut, Berlin 2023 (Ronckers et al., 2023)

Der überwiegende Anteil der Krebserkrankungen geht von den inneren und äußeren Epithelien aus. Den größten Anteil der Tumoren mit etwa 70% machen die Adenokarzinome, die dem Drüsengewebe entspringen, aus. Weitere etwa 15% ergeben sich aus Plattenepithelkarzinomen, Tumoren des Übergangsepithels (Urothelkarzinome) und kleinzelligen Karzinomen. Der Rest wird aus Leukämien und Lymphomen, ausgehend vom blutbildenden Knochenmark und lymphatischen Geweben, Tumoren des Binde- und Stützgewebes (Sarkome), Stützzellen des Nervengewebes (Gliome) und pigmentbildende Zellen (Melanome) gebildet (Ronckers et al., 2023).

Die zentralen Säulen der onkologischen Therapie bestehen aus Chirurgie sowie neoadjuvanter oder adjuvanter Chemo- und Strahlentherapie und erfolgt über die sichtbaren

Tumorgrenzen hinaus, um den möglichst größten Benefit für den/die Patienten/in zu erzielen. Nach einer erfolglosen Behandlung eines Primärtumors gestaltet sich die Therapie eines Tumorrezidives sehr schwierig und die Heilungsaussichten sinken (Aigner et al., 2016).

Das Robert Koch-Institut stellt in seinem aktuellen Krebsbericht den prozentualen Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen bei allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2020 vor (Abbildung 3) (Ronckers et al., 2023). Dem ist zu entnehmen, dass die drei häufigsten Tumorlokalisationen bei Frauen die Brustdrüse (30,5%), der Darm (10,5%) und die Lunge (9,8%) sind und bei Männern die Prostata (25,1%), die Lunge (13,0%) und der Darm (11,7%). An erster Stelle stehen demnach geschlechtsspezifische Organe, gefolgt von nicht geschlechtsspezifischen Tumorlokalisationen in ähnlicher Reihenfolge.

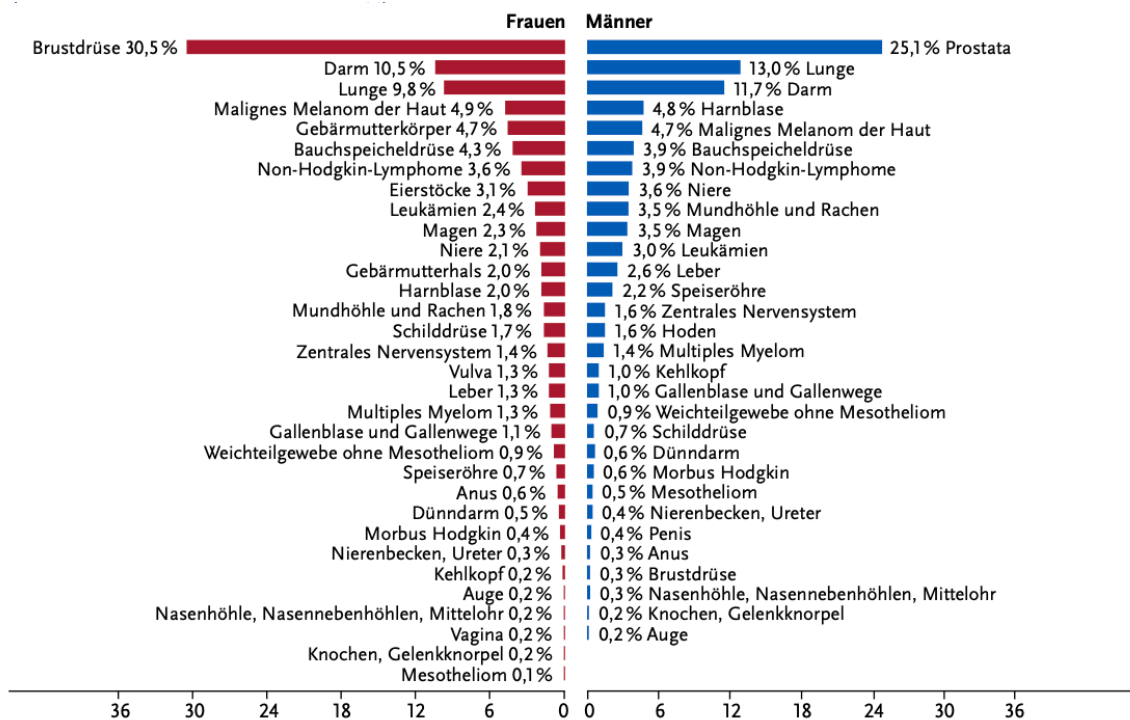


Abbildung 3 – Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2020. Gemeinsame Publikation des Zentrums für Krebsregisterdaten und der Gesellschaft der Epidemiologischen Krebsregister in Deutschland E.V. Krebs in Deutschland für 2019/2020, 14.Ausgabe, Robert-Koch Institut, Berlin 2023 (Ronckers et al., 2023)

### 1.1.1 Prostatakarzinom

Das Prostatakarzinom (PCA) ist der am häufigsten diagnostizierte Krebs des Mannes mit steigender Inzidenz. Tief im kleinen Becken befindet sich diese akzessorische Geschlechtsdrüse unterhalb der Harnblase zirkulär um die Urethra umgeben von Fett, Bindegewebe, Beckenbodenmuskeln, Blutgefäßen und Nerven. Anatomisch lässt sich die Prostata in zwei laterale Lobi (dexter und sinister), die sowohl ventral über den Isthmus prostatae als auch dorsal über den Lobus medius miteinander verbunden sind. Die ganze Drüse wird von einer derben bindegewebigen Pseudokapsel zusammengehalten und unterteilt sich intrakapsulär weiter in fünf Zonen: anteriore, periphere, zentrale, periurethrale und transitionale Zone (McNeal, 1981). Die Zonen unterscheiden sich anhand ihres Drüsengehaltes und der Hormonsensitivität und damit verbunden den unterschiedlichen Erkrankungslokalisationen der Prostata (Kellner et al., 2019).

Histologisch besteht die Prostata aus 30-50 tubuloalveolären Drüsen, die in ein fibromuskuläres Stroma eingebettet sind und über ca. 20 Ausführungsgängen in die Pars prostatica urethrae münden. Das Prostatasekret macht ca. 30% des Ejakulats aus. Es enthält wichtige Enzyme wie z.B. das prostataspezifische Antigen (PSA), welches zur Verflüssigung des Ejakulats und zur Unterstützung der Spermienmotilität beiträgt. Das Sekret ist farblos, dünnflüssig und mit einem pH von 6,4 leicht sauer (Schünke et al., 2018).

Etwa 70% der Prostatakarzinome befinden sich in der peripheren Zone subkapsulär. Im Gegensatz dazu sind die benignen Prostatahyperplasien (BPH) meist in der Transitionszone lokalisiert, welche zu einer deutlichen Volumenzunahme mit resultierender Kompression der Urethra und anschließender Harnabflussstörung führen (Schünke et al., 2018).

Das Risiko eines 35 Jahre alten Mannes in den nächsten 10 Jahren an einem Prostatatumor zu erkranken, liegt unter 0,1%. Im Gegensatz dazu hat der 75-jährige Mann ein Risiko von 6,7%. (Abbildung 4) Laut RKI ergibt sich ein statistischer Median von 71 Jahren für das mittlere Erkrankungsalter, sowie von 81 Jahren für das mittlere Sterbealter bei 65.820 Neuerkrankungen 2020 (Abbildung 5)(Ronckers et al., 2023).

Erkrankungsrisiko					Sterberisiko				
Männer im Alter von	in den nächsten 10 Jahren		jemals		in den nächsten 10 Jahren		jemals		
35 Jahren	< 0,1 %	(1 von 4.800)	13,7 %	(1 von 7)	< 0,1 %	(1 von 152.200)	3,4 %	(1 von 30)	
45 Jahren	0,4 %	(1 von 240)	13,9 %	(1 von 7)	< 0,1 %	(1 von 5.500)	3,4 %	(1 von 29)	
55 Jahren	2,5 %	(1 von 40)	14,0 %	(1 von 7)	0,1 %	(1 von 700)	3,5 %	(1 von 28)	
65 Jahren	6,2 %	(1 von 16)	12,9 %	(1 von 8)	0,7 %	(1 von 150)	3,7 %	(1 von 27)	
75 Jahren	6,7 %	(1 von 15)	9,0 %	(1 von 11)	1,8 %	(1 von 54)	3,8 %	(1 von 26)	
Lebenszeitrisiko			13,5 %	(1 von 7)			3,3 %	(1 von 30)	

Abbildung 4 – Erkrankungs- und Sterberisiko nach Alter in Deutschland 2020 – bezogen auf die Prostata. Gemeinsame Publikation des Zentrums für Krebsregisterdaten und der Gesellschaft der Epidemiologischen Krebsregister in Deutschland E.V. Krebs in Deutschland für 2019/2020, 14.Ausgabe, Robert-Koch Institut, Berlin 2023 (Ronckers et al., 2023)

Inzidenz	2019	2020	
	Männer	Männer	
Neuerkrankungen	72.620	65.820	
rohe Neuerkrankungsrate <sup>1</sup>	177,1	160,4	
standardisierte Neuerkrankungsrate <sup>1, 2</sup>	108,7	97,4	
mittleres Erkrankungsalter <sup>3</sup>	72	71	
Mortalität	2019	2020	2021
	Männer	Männer	Männer
Sterbefälle	15.040	15.403	15.379
rohe Sterberate <sup>1</sup>	36,7	37,5	37,5
standardisierte Sterberate <sup>1, 2</sup>	18,7	18,6	18,1
mittleres Sterbealter <sup>3</sup>	81	81	81
Prävalenz und Überlebensraten	5 Jahre	10 Jahre	25 Jahre
	Männer	Männer	Männer
Prävalenz	286.600	490.500	786.900
absolute Überlebensrate (2019 – 2020) <sup>4</sup>	75 (73 – 76)	57 (54 – 60)	
relative Überlebensrate (2019 – 2020) <sup>4</sup>	91 (89 – 91)	89 (85 – 91)	

<sup>1</sup> je 100.000 Personen <sup>2</sup> altersstandardisiert nach alter Europabevölkerung <sup>3</sup> Median <sup>4</sup> in Prozent (niedrigster und höchster Wert der einbezogenen Bundesländer)

Abbildung 5 – Übersicht über die wichtigsten epidemiologischen Maßzahlen in Deutschland 2020 – bezogen auf die Prostata. Gemeinsame Publikation des Zentrums für Krebsregisterdaten und der Gesellschaft der Epidemiologischen Krebsregister in Deutschland E.V. Krebs in Deutschland für 2019/2020, 14.Ausgabe, Robert-Koch Institut, Berlin 2023 (Ronckers et al., 2023)

Die Risikofaktoren für die Entstehung des Prostatakarzinoms sind im Wesentlichen unbekannt. Das Alter, aber auch die Häufung der Erkrankung unter Familienangehörigen, scheinen eine Rolle zu spielen. Paiss et al. publizierten 2002 in ihrer epidemiologischen Studie, dass ca. 10% aller Prostatakarzinome hereditären Ursprungs sein sollen. Beschrieben sind zahlreiche Suszeptibilitätsloci, die prädisponierte Gene enthalten, welche auf eine genetische Heterogenität des Prostatakarzinoms hinweisen. Diese Suszeptibilitätsgene weisen per se keinen Krankheitswert auf, aber die Kombination aus genetischer Grundausstattung und Umwelteinflüssen erhöht multifaktoriell die Erkrankungswahrscheinlichkeit (Paiss et al., 2002). Aufgrund der peripheren Lokalisation einer malignen Neoplasie treten typische Symptome erst auf, wenn der Tumor lokal bereits fortgeschritten ist, die Kapsel durchbrochen hat und sich Metastasen in den pelvinen Lymphknoten und im Skelett gebildet haben. Das Prostatakarzinom wird damit zunehmend inkurabel. Daher ist die Früherkennung zur Verbesserung des Überlebens bedeutend. Routinemäßig wird im Prostata-Screening der PSA bestimmt, eine digital rektale Untersuchung (DRU), sowie ein transrektaler Ultraschall (TRUS) durchgeführt (Schünke et al., 2018).

Bereits 1970 wurde das prostataspezifische Antigen als spezifischer Organmarker entdeckt. Papsidero et al. fanden in einem aufwendigen Verfahren zur Messung des PSA heraus, dass das prostataspezifische Antigen nicht nur im normalen Prostatagewebe vorkommt, sondern auch im Serum vom Patienten mit PCA nachgewiesen werden kann (Papsidero et al., 1980). Der Einsatz des PSA zur Früherkennung nahm seit den 1990ern deutlich zu. Durch den vermehrten Einsatz der serologischen PSA Bestimmung konnten die meisten Prostatakarzinome frühzeitig entdeckt werden (Draisma et al., 2003). In einer europaweiten randomisierten Studie konnte gezeigt werden, dass eine erhebliche Verringerung der Prostatakrebssterblichkeit auf die PSA Bestimmung zurückzuführen sei (Schröder et al., 2014).

Der Großteil der Prostatakarzinome sind azinäre Adenokarzinome. Sie entstehen aus dem sekretorischen Endstück der Drüse. Zu den Malignitätskennzeichen zählen das Fehlen der Basalzellschicht, vergrößerte Nukleoli und kristallines Sekret im Drüsenlumen. Die Varianz des Prostatakarzinoms ist breit gefächert von kribiformen Tumoren, bei denen die Drüse mit Lumen noch zu erkennen ist, bis hin zu anaplastischen Tumoren, bei denen keinerlei Drüsenarchitektur erkennbar ist. Innerhalb eines Tumors kann die Entartung in verschiedenen Mustern verlaufen. Um eine Prognose über den meist heterogenen Tumor abgeben zu können, wird nach dem Gleason-Grad differenziert und ein Gleason-Score ermittelt (Kellner et al., 2019). Das ursprüngliche Grading von Donald F. Gleason 1966 mit seinen fünf Kategorien, welches ausschließlich auf dem architektonischen Muster des Tumors basiert und zytologische Atypien vollständig vernachlässigt, wurde zuletzt 2019 von einem

Konsensuskomitee der International Society for Urologic Pathology (ISUP) überarbeitet und erweitert (Epstein, 2018, van Leenders et al., 2020).

Der Gleason-Score ist neben dem PSA das wichtigste Hilfsmittel bei der Ermittlung der Tumormalignität, aber es ist auch der am schwierigsten zu ermittelnde Parameter. Im Prinzip verläuft jedes Grading identisch, indem der/die Pathologe/in nach vorher festgelegten Kriterien das Tumorgewebe prüft und schaut, wie weit dieses Tumorgewebe morphologisch von seinem Ursprung entfernt ist. Wenn das Tumorgewebe dem Normalgewebe gleicht oder ähnelt, besteht ein niedriger Malignitätsgrad aufgrund guter Gewebedifferenzierung. Gleicht es dem Normalgewebe nicht und scheint in sich undifferenziert zu sein, spricht das für einen hohen Malignitätsgrad (Schlomm and Sauter, 2016).

Der Gleason-Score ergibt sich aus zwei Ziffern, dem häufigsten und zweithäufigsten Gleason-Muster, und summiert sich zu maximal 10 Punkten. (Abbildung 6) Dazu kann allerdings noch das selten vorkommende Gleason-Muster 5 als dritthäufigstes Muster hinzukommen. Beispielsweise könnte das dann wie folgt aussehen: 3+4 Tertiärgrad 5.

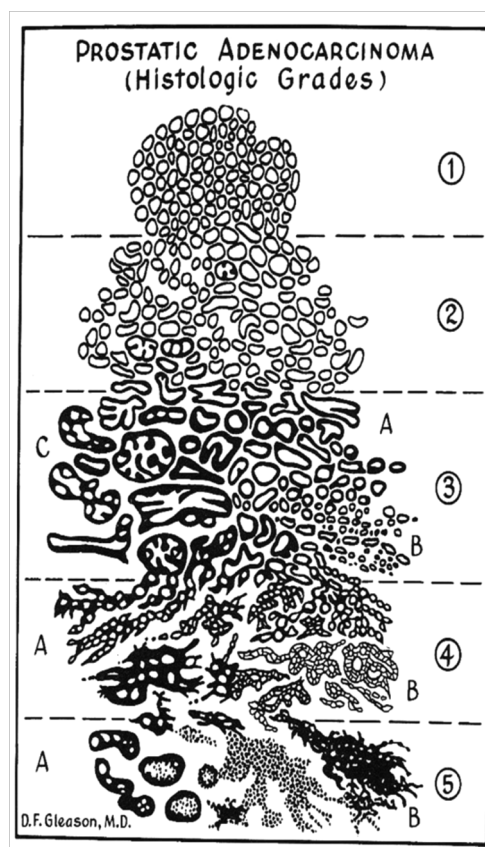
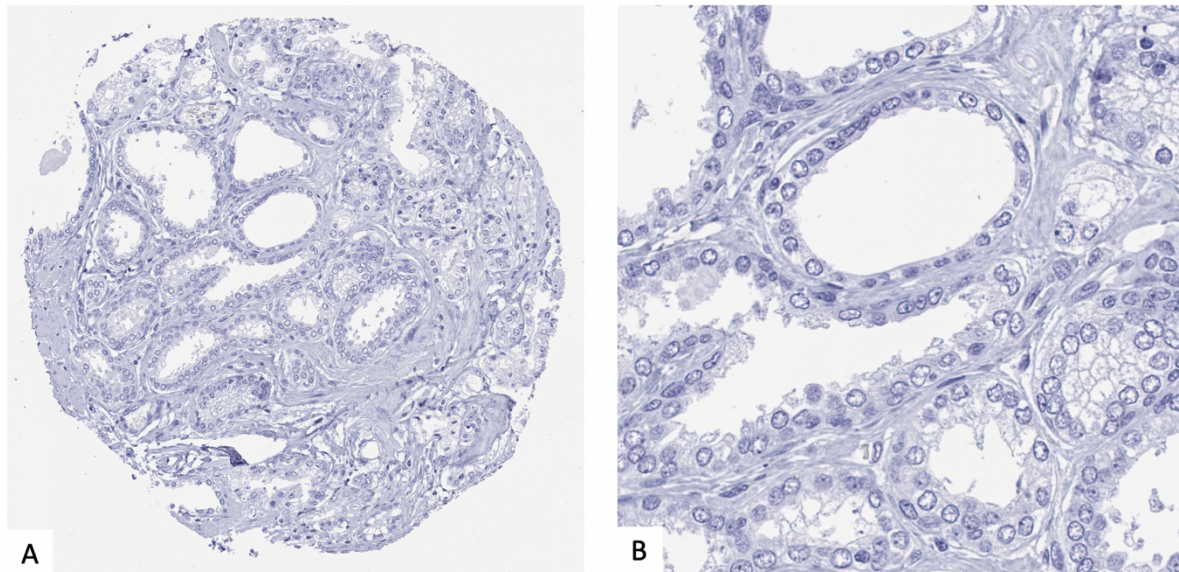


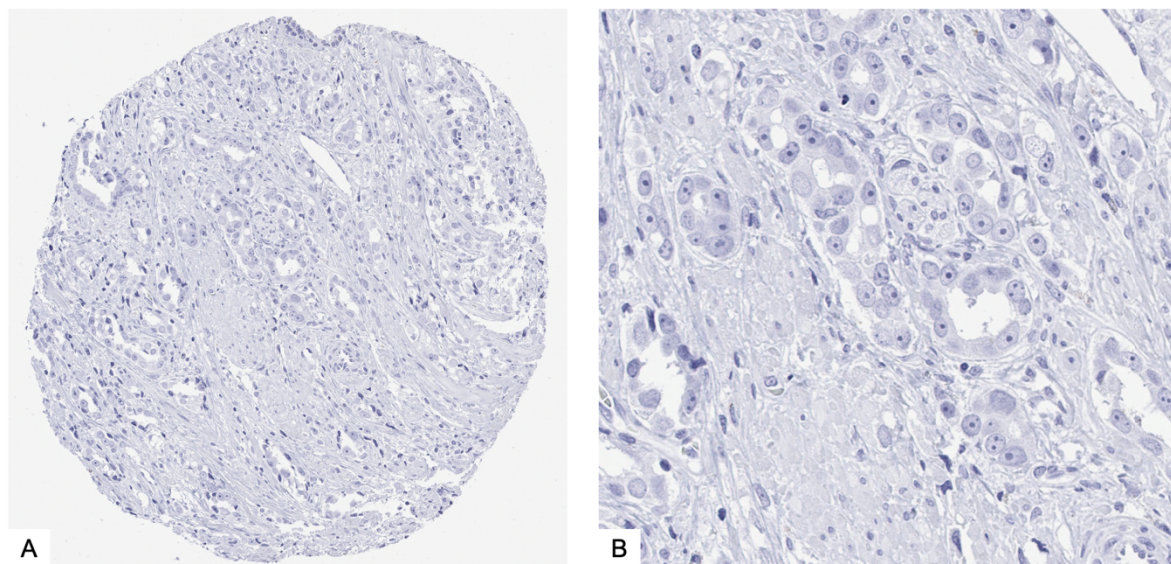
Abbildung 6 – original Gleason-Grading 1966 von Donald F. Gleason - die heutige Variante basiert darauf (Gleason, 1992)



Zum besseren Verständnis und optischen Vergleich ist in Abbildung 7 Prostata Normalgewebe mit seiner typischen Drüsenarchitektur abgebildet und in Abbildung 8 ein Prostata Adenokarzinom bei Vorhandensein der Malignitätskennzeichen.



*Abbildung 7 – Prostata Normalgewebe, HE A) azinäre Drüsenelemente umgeben vom fibromuskulären Stroma B) Drüsenwand in der Vergrößerung mit Basalzellen und sekretorischen Zellen*



*Abbildung 8 – Prostata Adenokarzinom A) Der Tumor zeigt mikroskopisch eindeutige Malignitätskennzeichen (fehlen von Basalzellen, vergrößerte Nukleoli)*

Diese einheitliche Anwendung des Grading-Systems stellt weltweit eine Grundvoraussetzung für die Durchführung von Therapien dar. Die richtige Einschätzung gilt als stärkster prognostischer Biomarker für das Überleben des Patienten mit lokalem als auch metastasierten Tumor (Egevad et al., 2002, Rusthoven et al., 2014).

Um eine Diagnose stellen zu können, schaut sich der/die Pathologe/in das Gesamtpräparat lichtmikroskopisch an und beurteilt jedes Areal. Jedes Gesichtsfeld erhält damit eine eigene Bewertung mit prozentualen Gleason-Grad 3,4 oder 5 (Sauter, 2019) (Abbildung 9).

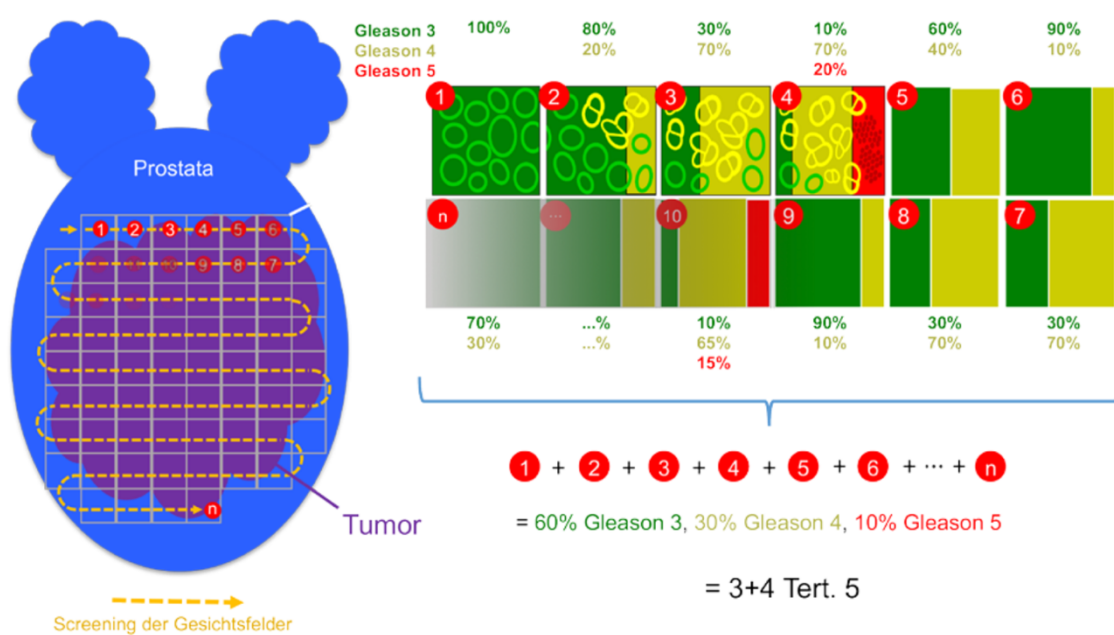


Abbildung 9 – Vorgehensweise der Pathologen zur Bestimmung des Gleason-Scores nach mikroskopischen Gesichtsfeldern (Sauter, 2019)

Die Rohdaten des gesamten Tumors ergeben sich aus der Zusammenführung aller Gesichtsfeld-Bewertungen. Darauf basierend kann der Gleason-Score gebildet werden (Schlomm and Sauter, 2016). Tabelle 1 gibt Aufschluss über die Bedeutung der einzelnen Gleason-Grade.

*Tabelle 1 – Bedeutung der einzelnen Gleason-Grade, die addiert den Gleason-Score ergeben mit max. 10 Punkten (Helpap and Egevad, 2006)*

Gleason-Grad	Bedeutung
1	kleine, gleichförmige Drüsen dicht zusammengepackt ähneln dem Prostata Normalgewebe
2	locker gepackte Drüsen etwas ungleichmäßiger, aber immernoch dem Prostata Normalgewebe ähnelnd
3	unregelmäßige Drüsenform und -größe evtl. kleine solide Bezirke
4	große, abnormale Drüsen teilweise miteinander verschmolzen Drüsen meist ohne Lumen Tumorbereich unscharf begrenzt solide Bezirke
5	große, unregelmäßige Drüsen miteinander verschmolzen beginnen in das umliegende Bindegewebe einzudringen keine klare Drüse zu erkennen Tumorbereich unscharf begrenzt solide Bezirke

Beurteilt werden sowohl Gesamtpräparate nach radikaler Prostatektomie (RPE) als auch Stanzbiopsien. Die Kriterien sind hierbei die gleichen, es gibt aber einen Unterschied in der Diagnose. Generell wird in primäres (häufigstes) und sekundäres (zweithäufiges) Muster unterteilt. So ergeben sich Diagnosen 3+4 (3= häufigstes Muster; 4= zweithäufigstes Muster). Bei Stanzbiopsien wird das sekundäre Muster als erstes in der Diagnose beschrieben (4+3). Da bei der Diagnosestellung einer Stanzbiopsie viel weniger Gewebe vorhanden ist und nicht klar ist, ob man den schlimmsten Teil des Tumors getroffen hat, wird dem sekundären bzw. prognostisch schwerwiegenderen Teil Priorität zugeordnet.

In der Praxis werden heute die Muster 1 und 2 vernachlässigt und nur die Muster 3, 4 und 5 für das PCA verwendet. Die Grade 3 und 4 sind dabei am schwierigsten klar voneinander zu trennen, da nur kleinste Abweichungen zu einem höheren Grad führen und damit in Folge der Gleason-Score steigt.

Beispiel: Bei einem 3+3=6 Tumor werden voneinander abgrenzbare Drüsen erwartet. Finden sich aber vereinzelt verschmolzene Drüsen, so wäre das ein Gleason-Grad 4 und die Diagnose wäre 3+4=7 PCA. Daher ist die zusätzliche Nutzung von prozentualen Angaben anzuraten. Wenn zu der Diagnose 3+4 ein prozentualer Anteil von z.B. 5% Gleason-Grad 4



stehen würde, wüsste der/die Urologe/in, dass es sich hierbei eher um ein von vielen diagnostiziertes 3+3=6 PCA handeln wird (Schlomm and Sauter, 2016).

Um klinisch von Nutzen zu sein, muss ein Grading-System reproduzierbar sein, sowie eine angemessene Übereinstimmung zwischen Biopsien und chirurgischen Proben bestehen (Glaessgen et al., 2002). Aber genau hier liegt das eigentliche Problem. Die Interobservervariabilität ist groß und es ergeben sich schwer reproduzierbare Gradings. Es wäre klinisch daher sehr wichtig, wenn die modifizierte Gleason-Bewertung zu einer besseren Übereinstimmung beitragen könnte, da der Gleason-Score einer der wichtigsten prognostischen Parameter für Prostatakarzinom ist (Hølpap and Egevad, 2006).

Eine geeignete Therapie hängt von mehreren Faktoren ab. An sich stellt die Diagnose ‚Prostatakrebs‘ keinen Notfall dar. Die aktive Behandlung muss aber gut überlegt sein, da sie zu Veränderungen in der Lebensqualität führen kann. Die Kombination aus erwarteter verbliebener Lebenszeit, Tumortyp und dessen Malignität (bestimmt über den Gleason-Score), die Ausbreitung und eventuelle Metastasierung des Tumors (TNM-Klassifikation) entscheiden maßgeblich über den Therapieplan. Meist erfolgt eine chirurgische radikale Prostatektomie. Aber auch nicht-chirurgische Behandlungen wie Strahlentherapie, Chemotherapie, Androgenentzugstherapie mittels GnRH-Antagonisten und Immuntherapien stehen dem Behandler und Patienten allein oder in Kombination mit der RPE zur Verfügung. Bei risikoarmen PCA besteht auch die Möglichkeit des aktiven Überwachens mittels TRUS, MRT, DRU, PSA-Bestimmung und Biopsien (Evans, 2018).

## 1.2 Glykoprotein 2

Glykoprotein 2 (GP2) ist ein Membranprotein in den Sekretionsgranula des exokrinen Teils des Pankreas, das aktiv per Exozytose aus den Azinuszellen sezerniert wird. Humanes GP2 weist eine Molekülmasse von ca. 97 kDa auf (MacDonald and Ronzio, 1972, Wong and Lowe, 1996). Es kommt in löslicher Form im Lumen der Azini und in gebundener Form über Glykosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker) an der Membran vor (Ronzio et al., 1978, Fukuoka et al., 1991).

Dem ‚Human Protein Atlas‘ ist zu entnehmen, dass eine Expression von GP2 in Normalgewebe hauptsächlich im Pankreas besteht (Abbildung 10 und 11). In der Zusammensetzung der Zymogengranula bildet GP2 den Hauptbestandteil der Membranproteine. Die Zymogengranula konzentrieren und speichern Verdauungsenzyme, die in Folge in den Darm abgegeben werden. GP2 ist das wichtigste Membranprotein der Zymogengranula mit einem Gesamtanteil von ca. 35% der Proteinmasse (Fritz et al., 2002).

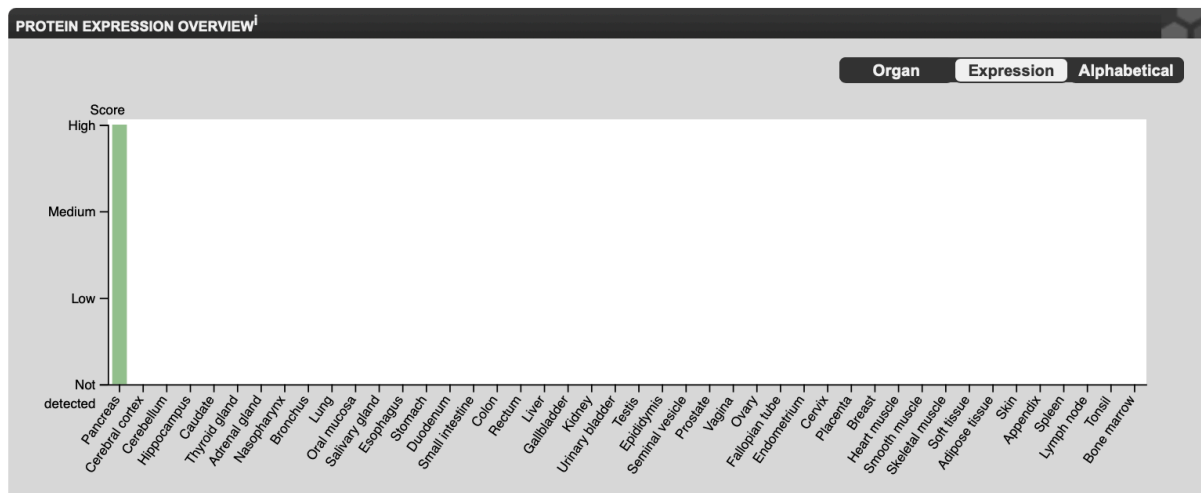


Abbildung 10 – GP2 Protein-Expression im Normalgewebe

Grafik entnommen aus dem Human Protein Atlas - Normalgewebe

<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000169347-GP2/tissue> [Stand: 03.12.24; 18:06]

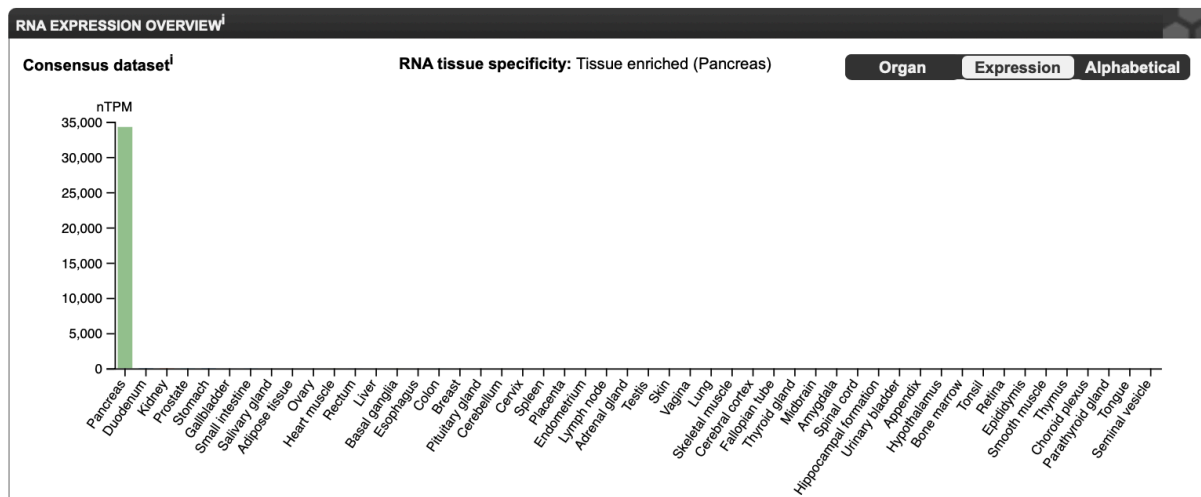


Abbildung 11 – GP2 RNA-Expression im Normalgewebe

Grafik entnommen aus dem Human Protein Atlas - Normalgewebe

<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000169347-GP2/tissue> [Stand: 03.12.24; 18:07]

Die genaue Funktion von GP2 ist nicht klar. An Knock-out Mäusen konnte gezeigt werden, dass GP2 an einer antikörpervermittelter Immunantwort beteiligt zu sein scheint (Werner et al., 2012). Es wurde festgestellt, dass GP2 auf der apikalen Oberfläche von M-Zellen in den Peyer-Plaques des Darms exprimiert wird und dort als transzytotischer Rezeptor für Schleimhautantigene fungiert (Kusunose et al., 2020).

Deletionen im Tumorsuppressorgen PTEN zeigten sich mit einer hohen Frequenz in Prostatakarzinomen und werden mit einem ungünstigen klinischen Verlauf und einem gesteigerten Metastasierungspotential in Verbindung gebracht (McCall et al., 2008, Yoshimoto et al., 2012). PTEN-Deletionen werden als Auslöser für Intratumorheterogenität in Prostatakarzinomen vermutet. Yun et al. untersuchten diese Hypothese und fanden heraus, dass Prostatakarzinome mit PTEN-Deletion hauptsächlich Mehrklontumore sind und dies eine Schlüsselfunktion bei der Entstehung von heterogenen Tumoren der Prostata sein könnte. Bei der Untersuchung von mehrklonigen Tumoren mit PTEN-Deletion fiel die vermehrte Expression einer Reihe von Proteinen (unter anderem GP2) an Prostatatumoren mit PTEN-Deletion auf (Yun et al., 2019).

Lima et al. untersuchten das Harnproteom auf mögliche PCA-Biomarker und beobachteten einen konsistenten Anstieg von GP2 im Tumorgewebe und Urin bei PCA-Patienten. Angesichts der Tatsache, dass Urin als menschliches Biofluid größtenteils aus Proteinen der harnableitenden Wege besteht, stellt das im Urin nachgewiesene GP2 einen möglichen PCA-Biomarker dar (Lima et al., 2021).

### 1.2.1 Aufbau und Struktur

GP2 wurde als das am häufigsten vorkommende Protein in der Membran der sekretorischen Granula des Pankreas entdeckt (Ronzio et al., 1978). Es ist ein Glykoprotein, welches ein N-terminales Signalpeptid, eine epidermale Wachstumsfaktor (EGF)-Domäne, eine Zona pellucida (ZP)-Domäne und eine C-terminale Transmembrandomäne mit GPI-Anker enthält (Jovine et al., 2005). Über die ZP-Domänen können sich mehrere GP2 Moleküle zu einem größeren löslichen Proteinkomplex zusammenschließen (Rindler and Hoops, 1990) (Abbildung 12).



Abbildung 12 – GP2 Grundgerüst (schematisch modifiziert nach (Jovine et al., 2005))

Der GPI-Anker wird posttranslational im endoplasmatischen Retikulum kovalent mit dem Proteingerüst an der C-terminalen Transmembrandomäne gebunden (Fukuoka, 2000). Im trans-Golgi-Netzwerk scheint GP2 zu aggregieren und sich während und nach der Exozytose pH-abhängig aus der Plasmamembran freizusetzen, die dann abgespalten von den Zymogengranula im Darm identifiziert werden können (Scheele et al., 1996). Die EGF-Domäne scheint eine Protein-Protein Interaktionsdomäne zu sein (Fukuoka, 2000).

Bisher wurden vier Isoformen von GP2 beschrieben, die sich in der Länge der Aminosäurekette unterscheiden. Diese vier Isoformen besitzen alle einen GPI-Anker an der C-terminalen Transmembrandomäne, eine ZP-Domäne und eine N-terminale Signalsequenz. (Roggenbuck et al., 2016, Cummings et al., 2018, Sowa et al., 2018, Lin et al., 2020).

Isoform 1 (NCBI Reference Sequence: NP\_001007241.2) ist mit 537 Aminosäuren (aa) das längste Molekül und stellt die häufigste Variante unter den Isoformen dar. Sie wird auch als kanonisches Makromolekül bezeichnet. Isoform 2 (NCBI Reference Sequence: NP\_001493.2) ist nur zwei Aminosäuren kürzer. Ihr fehlen die Aminosäuren 176-178 und die Gesamtlänge verkürzt sich auf 535 aa. Isoform 3 (NCBI Reference Sequence: NP\_001007242.2) ist um einiges kürzer, denn hier fehlen die Aminosäuren 31 bis 178. Isoform 4 (NCBI Reference Sequence: NP\_001007243.2) fehlt genau der gleiche Abschnitt wie Isoform 3, jedoch ist Isoform 3 um 3 aa länger aufgrund eines Ersatzes der fehlenden Valin-Prolin-Arginin Sequenz. Die Gesamtlänge beläuft sich bei Isoform 3 auf 390 und bei Isoform 4 auf 387 aa (Roggenbuck et al., 2016) (Abbildung 13).

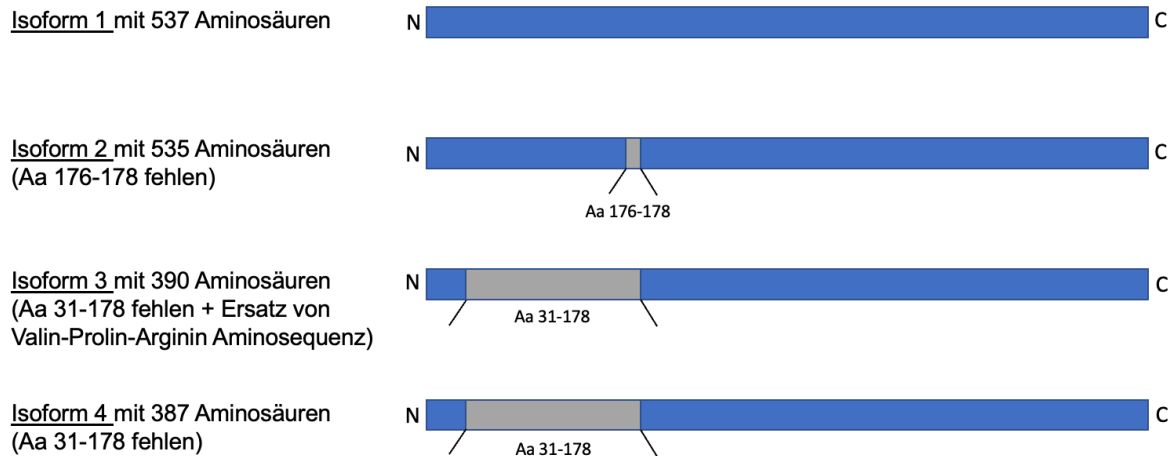


Abbildung 13 – GP2 Isoformen 1-4 (schematisch modifiziert nach (Roggenbuck et al., 2016))

Fukuoka bestätigt in seinen Untersuchungen das Bestehen von Isoformen. Er teilt GP2 in eine lange Isoform alpha und eine kurze Isoform beta ein, die den Isoformen 2 und 4 Roggenbucks in etwa entsprechen (Fukuoka, 2000). Der beta Isoform fehlt die 147 Aminosäuredomäne, welche 441 Nukleotide beinhaltet und mit dem Bereich 25-171 der alpha Isoform übereinstimmt. Mit dem Fehlen der Domäne fallen zwei mögliche N-Glykosylierungsstellen weg. Es wird nicht davon ausgegangen, dass es sich um ein Artefakt handelt, sondern dass sich bei der beta Form ein alternativer Splicingvorgang äußert. Als Grund wird einerseits das offene Leseraster von 380 aa bei unabhängigen Klonen aufgeführt, andererseits weisen die flankierten Regionen einen verkürzten Exon-Intron-Konsens auf. Seine Analyse ergab, dass die kurze Isoform beta im menschlichen Pankreasgewebe am häufigsten exprimiert wird. Der Einfluss von GP2-Splicingvariationen auf die physiologische Rolle des Proteins wurde bisher nicht untersucht. (Fukuoka, 2000) (Abbildung 14).



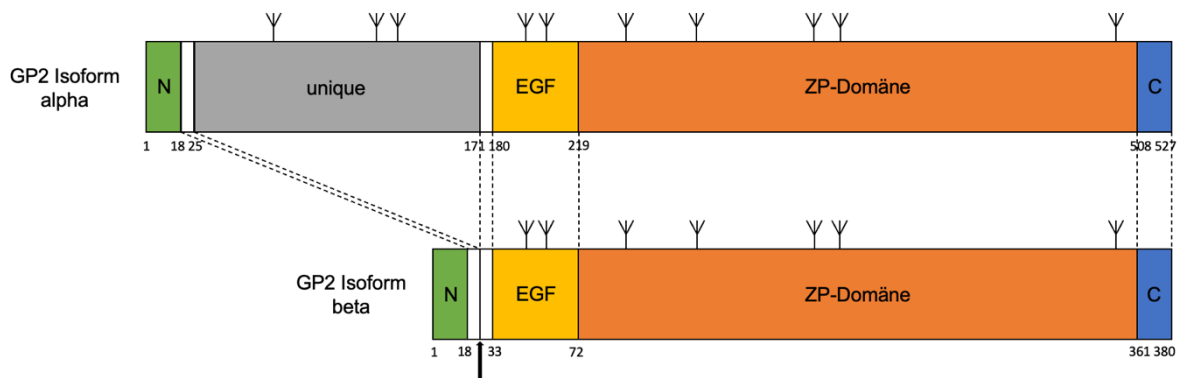


Abbildung 14 – GP2 Isoform alpha und beta (schematisch modifiziert nach (Fukuoka, 2000))

Diese schematische Darstellung zeigt die alpha und beta Form von GP2 im Grundaufbau. Alpha entspricht in etwa der langen Isoform und Beta der kurzen Isoform Roggenbuck's. Der beta Form fehlt durch das alternative Splicing die individuelle Sequenz (unique) der alpha Form. Die EGF-Domäne scheint an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt zu sein. Der Pfeil steht für die zusammengeführte Stelle nach Splicing und die kleinen Ziffern geben die Aminosäuresequenz an.

Die meisten exokrinen Proteine des Pankreassekrets werden nach der Sekretion im Darm prozessiert, anders sieht es bei GP2 aus. Innerhalb der Zelle lässt sich GP2 in mehreren Formen nachweisen. Extrazellulär können diese Formen nicht nachgewiesen werden. Dies spricht für eine intrazelluläre proteolytische Spaltung des Proteins. Es muss keine Aktivierung mittels Proteolyse im Darmlumen erfolgen. Es zeigte sich auch, dass die Spaltung temperaturabhängig ist und so die einzelnen Stadien in Laufbanden im Western Blot dokumentiert werden können (Fritz et al., 2002).

Der letzte Schritt der GP2-Verarbeitung ist die Freisetzung von der mittels GPI-Anker gebundenen Form an der apikalen Plasmamembran. Gebundenes GP2 wird enzymatisch freigesetzt durch eine Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C sowie über pH-Änderungen und gelangt so über den Ductus pancreaticus ins Duodenum. (Rindler and Hoops, 1990). In elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnte aufgezeigt werden, dass GP2 Bestandteil des fibrillären Netzwerks im Pankreassekret ist (Beaudoin et al., 1991).

Die physiologische Rolle von GP2 im Pankreas ist bisher nicht bekannt. Es wird vermutet, dass GP2 eine Rolle bei der Sortierung von Proteinen in den Zymogengranula oder bei der Regulierung des Membranrecyclings nach der Sekretion aus der Membran, sowie bei der Sekretion von Verdauungsenzymen spielt (Schmidt et al., 2001, Fritz et al., 2002). Gestützt wird diese Vermutung anhand der Untersuchung bei unterdrückter GPI-Anker-Biosynthese. Die Granulabildung wird beeinträchtigt und sie führt zu Akkumulation der Zymogenenzyme in den vorherigen Kompartimenten wie dem Golgi-Apparat und dem rauen endoplasmatischen Retikulum, was im Folgenden zu Synthesestörungen innerhalb der Kompartimente führen kann (Schmidt et al., 2001).

### 1.2.2 Funktion

Die genaue Funktion von Glykoprotein 2 ist unbekannt. Es wird eine Beteiligung an der Formation und Sekretion von Zymogengranula aus den Azinuszellen des Pankreas diskutiert (Schmidt et al., 2000, Schmidt et al., 2001, Yu et al., 2004). Allerdings untersuchten Yu et al. in ihrer Studie das Fehlen von GP2 an Knock-out-Mäusen und dessen Einfluss auf die Pankreasfunktion. Mäuse, bei denen GP2 ausgeschaltet wurde, wiesen keine Veränderungen der Bauchspeicheldrüse und der Zymogengranulasekretion auf und waren gesund. Es zeigte sich bei Abwesenheit von GP2 keine Malabsorption- oder Wachstumsstörung. Licht- und elektronenmikroskopisch fanden sich im Vergleich zwischen den Knock-out-Mäusen und den Wild-Typ Mäusen keine Unterschiede in den Zymogengranula, was veranschaulicht, dass GP2 bei der Bildung der Zymogengranula keine essenzielle Bedeutung hat (Yu et al., 2004). GP2 lagert sich mit anderen Proteoglykanen innerhalb der Zymogengranula zu einer submembranösen Matrix an der luminalen Membran zusammen (Scheele et al., 1994, Schmidt et al., 2000). Durch Aufreinigung der submembranösen Matrix konnten weitere Proteine wie Lektin ZG16p, Serpin ZG46p, Syncollin und eine Reihe nicht identifizierter Proteoglykane nachgewiesen werden (Schmidt et al., 2000, Yu et al., 2004).

Dem GP2 nächstverwandtes Homologon ist das Tamm-Horsfall-Protein (THP) / Uromodulin, welches ausschließlich im Urogenitaltrakt exprimiert wird. Es weist eine 85%ige Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz auf und ist zu 52% identisch mit GP2. Diese Übereinstimmung könnte aus einer Genduplikation entstanden sein (Hoops and Rindler, 1991, Kobayashi et al., 2004). THP ist ein Glykoprotein, welches selektiv von Epithelzellen des dicken aufsteigenden Teils der Henle-Schleife in der Niere exprimiert wird. Die Synthese erfolgt intrazellulär identisch dem GP2 über die Translokation im endoplasmatischen Retikulum und trans-Golgi-Apparat mit Glykosylierung und anschließender GPI-Anker Anreicherung bis zur Sekretion und Verankerung an der apikalen tubulären Zellmembran (Rindler et al., 1990, Kreft et al., 2002). Von dort wird THP über eine spezifische noch nicht bekannte Protease freigesetzt und mit dem Urin ausgeschieden. Es ist das am häufigsten vorkommende Protein im Urin eines gesunden Menschen (Kumar and Muchmore, 1990, Fukuoka and Kobayashi, 2001).

Beide Proteine verfügen über eine ZP-Domäne, eine EGF-Domäne, eine N-terminale Signalsequenz und eine C-terminale Transmembrandomäne mit GPI-Verankerung an der apikalen Zellmembran (Rindler et al., 1990, Jovine et al., 2002, Wolf et al., 2003, Serafini-Cessi et al., 2003, Vyletal et al., 2010). THP ist so wie GP2 in der Lage über die ZP-Domäne unter bestimmten pH-Bedingungen Aggregate zu bilden und steht in Korrelation mit Urolithiasis und daraus resultierenden Nephropatien (Marengo et al., 2002, Wolf et al., 2003). Freedman et al. fanden in einer Studie heraus, dass GP2 beteiligt ist an intraduktalen Pfropfen bei alkoholinduzierter als auch idiopathischer chronischer Pankreatitis (Freedman et al., 1993).

Es wurde nachgewiesen, dass membrangebundenes GP2 in der Lage ist Pathogene wie *Escherichia coli* (*E. coli*) zu binden. Es kommt durch die Endozytose der Pathogene zur Bildung von IgA-Antikörpern und damit zu einer mukosalen Immunität gegenüber dieser Pathogene. Bei GP2-defizienten Mäusen fehlte eine angemessene Immunantwort (Hase et al., 2009, Ohno and Hase, 2010). Die bakterienbindende Eigenschaft von THP und GP2 zeigte weitere Übereinstimmungen. GP2 ist in der Lage Fimbrien Typ 1 (FimH) tragende Bakterien wie *E. coli* oder *Salmonella typhimurium* zu binden, die bei Erkrankung urogenitale und gastrointestinale Infektionen beim Menschen verursachen können. Abhängig ist das Binden vom Glykosylierungsstatus und dem Vorhandensein von Mannoseresten. Lösliches THP fungiert als Decoy-Rezeptor, bindet mit hoher Affinität an die uropathogenen Keime und verhindert auf diesem Wege urologische Infektionen (Pak et al., 2001, Yu and Lowe, 2009). Eine weitere mögliche Funktion von GP2 scheint die Immunmodulation zu sein, die sich aus Analogien ableiten lassen. Säemann et al. stellte die Hypothese auf, dass THP einen erheblichen Einfluss auf die Wirtsimmunität im Harntrakt haben könnte durch die Aktivierung von myeloischen dendritischen Zellen (DC) über den Toll-like-Rezeptor 4 (TLR4). Diese aktivierten DCs können weitere Funktionen des Immunsystems erfüllen. Damit unterstützt THP als regulatorischer Faktor die angeborene und adaptive Immunantwort (Säemann et al., 2005). In weiteren Studien zeigte sich, dass analog zu THP GP2 ein Interaktionspartner von Scavenger-Rezeptoren von Endothelzellen (SREC-1) ist und dass GP2 von SREC-1 exprimierenden Zellen internalisiert wird (Hözl et al., 2011). Rekombinantes GP2 kann periphere T-Zellen in der Aktivierung und Proliferation einschränken, sowie deren Apoptose hemmen. Zusätzlich kann es an der Verringerung der proinflammatorischen Zytokine wie Tumornekrosefaktor alpha (TNF- $\alpha$ ) und Interleukin 17 (IL-17) beitragen und sich entzündungshemmend auswirken (Werner et al., 2012).

Darüber hinaus wird GP2 intestinal an der apikalen Seite der M-Zellen des Darmes exprimiert und scheint bei Morbus Crohn Patienten überexprimiert zu sein (Roggenbuck et al., 2016). Die mukosale Immunität von GP2 könnte auch aus der Tatsache abgeleitet werden, dass GP2-Antikörper in Seren von Morbus-Crohn-Patienten gefunden wurden (Roggenbuck et al., 2009, De Beéck et al., 2012). In einer proteomischen Studie von Juste et al. wurde das Mikrobiom von Gesunden und an Morbus Crohn erkrankten Patienten analysiert und es fand sich an Bakterien gebundenes GP2 (Juste et al., 2014).

### 1.2.3 Klinische Bedeutung

Bereits Freedman et al. fanden heraus, dass GP2 an der Bildung von intraduktalen Pfropfen und einer damit einhergehenden Obstruktion des Ductus pancreaticus beteiligt ist, was durch den Rückstau des Pankreassekrets zum Selbstverdau und daraus folgend zur chronischen Pankreatitis führen kann (Freedman et al., 1993). Studien an Nagetieren lieferten die erste Korrelation des GP2-Serumspiegels mit dem Schweregrad einer akuten Pankreatitis (Lowe et al., 1994). Hao et al. nahmen weitere GP2-Studien in Bezug auf Pankreatitiden und Pankreaskarzinome auf. Es gab bereits andere Glykosylphosphatidylinositol-verankerte Proteine mit zellulärer Polarität, die sich als nützliche klinische Marker für gastrointestinale Erkrankungen erwiesen wie zum Beispiel die alkalische Phosphatase (APA). Bei gestörter Polarität der Proenzymsekretion kann es zu vermehrter Freisetzung der Zymogengranula-Inhalte kommen. Sie untersuchten den Serumspiegel von erkrankten Patienten und stellten fest, dass sich GP2 signifikant als Biomarker für akute und chronische Pankreatitis hervorhebt und besser geeignet scheint als die routinemäßige Bestimmung von Amylase und Lipase im Serum (Hao et al., 2004). Jüngst untersuchten auch Roggenbuck et al. mittels ELISA-Assay den Serumspiegel der GP2 alpha Isoform und bestätigten anhand der signifikanten Resultate GP2 alpha als Marker für den schweren Verlauf einer akuten Pankreatitis. Neben dem C-reaktiven Protein (CRP) und Procalcitonin (PCT) könnte GP2 als prognostischer sowie auch diagnostischer Marker zur Schweregradbestimmung verwendet werden (Roggenbuck et al., 2017).

Wie bereits beschrieben, wird GP2 auf der apikalen Oberfläche von M-Zellen in den Peyer-Plaques des Darms exprimiert und fungiert dort als transzytotischer Rezeptor für Schleimhautantigene (Terahara et al., 2008, Kusunose et al., 2020). GP2 bindet Fimbrien Typ 1 positive Bakterien und internalisiert diese mit anschließender Übertragung an die antigenpräsentierende Zelle, wie dendritische Zellen, die Antigene aufnehmen und damit die Produktion von Autoantikörpern in den Gang setzen (Nakamura et al., 2018). M-Zellen agieren somit als Aufnahmerezeptoren für Bakterien wie E.coli und Salmonella typhimurium und stellen ein wichtiges Element des Immunsystems und der Darmimmunität dar (Hase et al., 2009, Ohno and Hase, 2010).

Studien bestätigten die Überexpression von GP2 im Darm bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wie Morbus Crohn (Roggenbuck et al., 2016). In ELISA-Tests konnten GP2 Antikörper IgA und IgG als spezifischer Marker für Morbus Crohn identifiziert werden. Bei bis zu 30% der Patienten sind diese Autoantikörper nachweisbar. Anti-GP2 scheint mit bestimmten Krankheitsphänotypen in Verbindung zu stehen und dessen Nachweis könnte von klinischer Bedeutung sein (Bogdanos et al., 2011, Roggenbuck et al., 2013). Laass et al. untersuchten außerdem die Korrelation von Anti-Gp2 in Bezug auf die aktive Zöliakie. Sie

konnten zeigen, dass sich der Immunglobulinspiegel mit dem Grad der villösen Darmepithelatrophy vereinbaren lässt und dieser als Indikator für den Schweregrad der Atrophie und der Erkrankung dienen kann (Laass et al., 2015) (Abbildung 15).

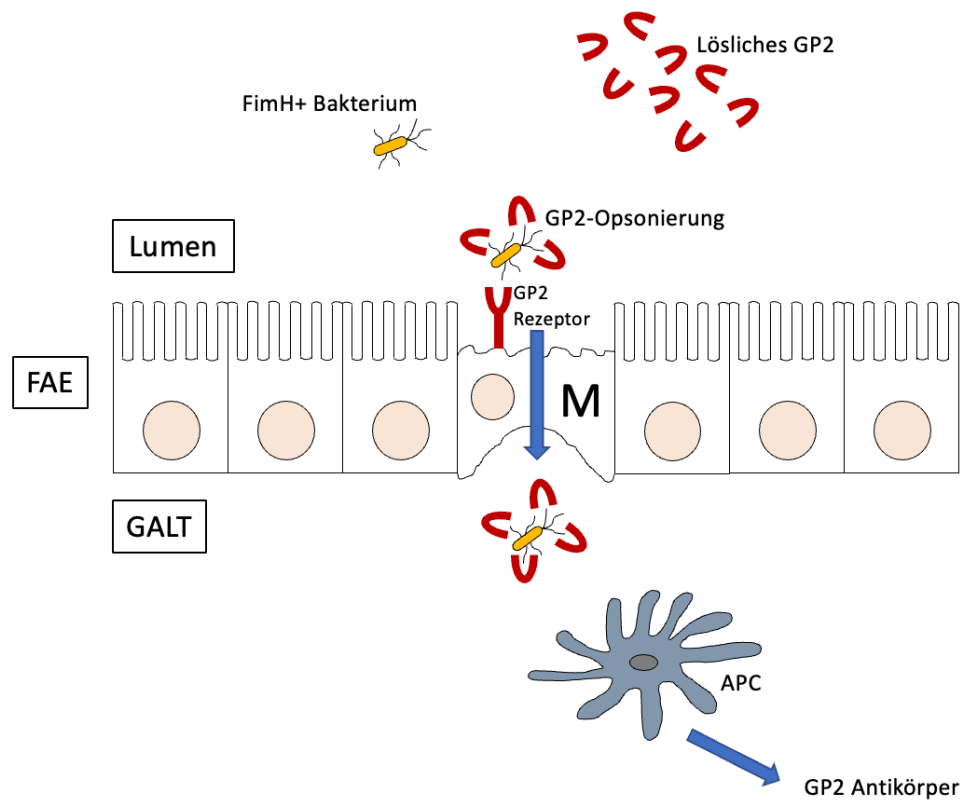


Abbildung 15 – Darstellung der Darmimmunität nach Bindung mit FimH+ Bakterien (schematisch modifiziert nach (Kobayashi et al., 2019))

Hypothetisches Model der durch M-Zellen (M) vermittelten Antikörperproduktion. Lösliches GP2 bindet FimH+ Bakterien im Lumen, welche über den GP2 Rezeptor von der M-Zelle aufgenommen werden. Antigenpräsentierende Zellen (APC) erkennen GP2 an der Oberfläche der Bakterien und beginnen die Produktion von Anti-GP2-Autoantikörpern, die sich in Folge gegen die GP2-exprimierenden Azinuszellen des Pankreas richten und eine Pankreatitis verursachen. FAE = Follikel-assoziiertes Epithel; GALT = Darm-assoziiertes lymphatisches Gewebe

## 1.2.4 Bedeutung in Tumoren

Die Bedeutung von GP2 in Tumoren kann als Übersicht im Human Protein Atlas nachgeschlagen werden. Dieser Atlas fasst RNA-Daten unterschiedlicher Tumorentitäten zusammen und veranschaulicht grafisch die gesamte Datenlage zu dem jeweiligen Gen.

Abbildung 16 zeigt eine deutliche Dominanz der RNA-Expression von GP2 im Tumorgewebe des Pankreas. Darüber hinaus findet auch eine geringgradige RNA-Expression im Tumorgewebe der Brust, der Prostata, des Magens, der Leber, der Lunge, des Rektums und des Endometriums statt. Immunhistochemische Daten bezüglich der Expression in menschlichen Tumoren sind bisher nicht vorhanden.

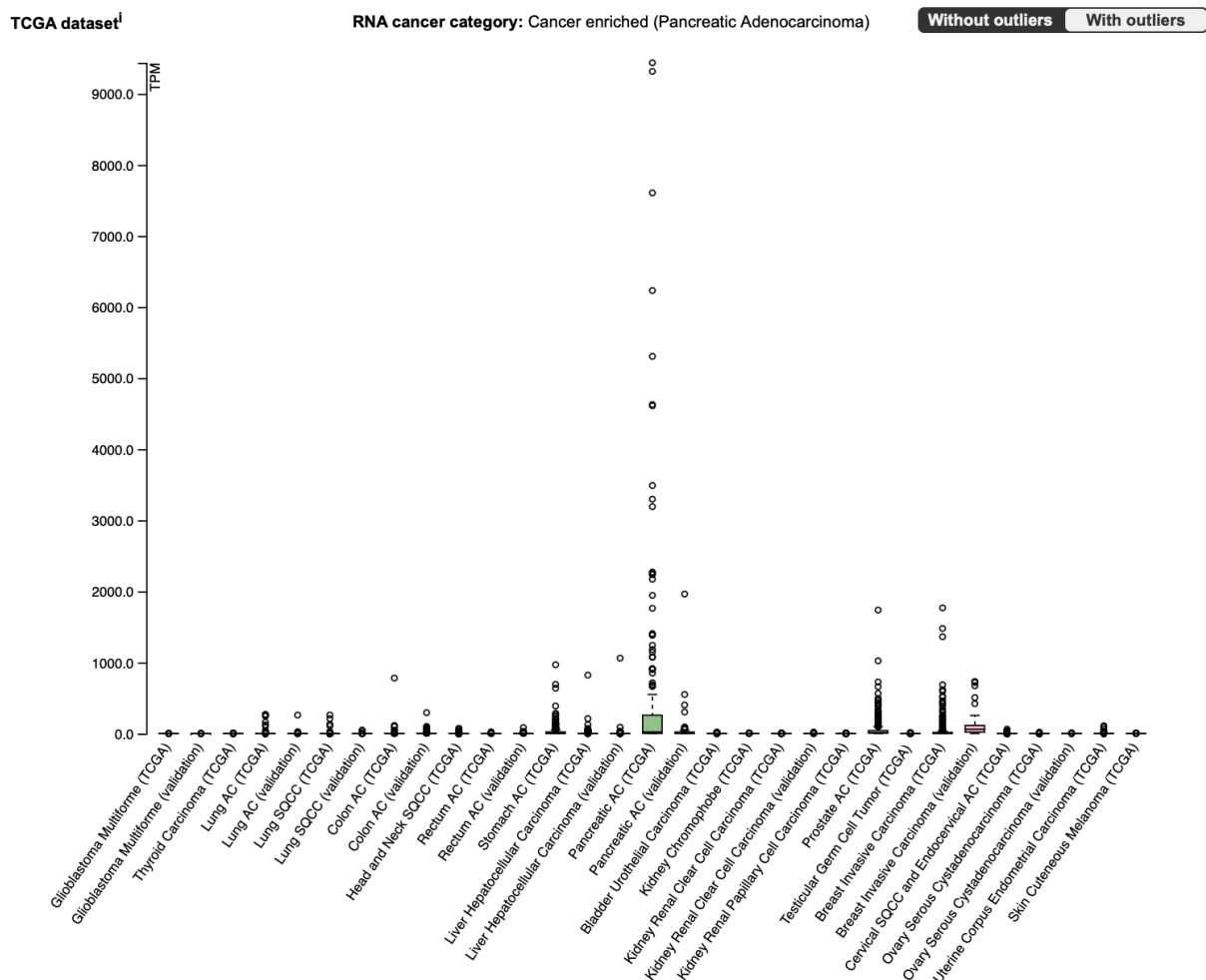


Abbildung 16 – GP2 RNA-Expression im Tumorgewebe

Grafik entnommen aus dem Human Protein Atlas – Pathologie

<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000169347-GP2/pathology> [Stand: 28.11.24; 18:46]

Auch Lima et al. untersuchten eine Reihe von Proteinen (auch GP2), um über das menschliche Harnproteom einen potenziellen Harnbiomarker spezifisch für das Prostatakarzinom zu finden. Urin besteht zu etwa 70% aus Proteinen der Niere und der unteren Harnwegen (Harnleiter, Blase, Schließmuskeln, Harnröhre und Prostata) (Pieper et al., 2004). Angesichts des Vorhandenseins der Proteine aus der Prostatasekretion versteht sich Urin als wertvolle Quelle für einen spezifischen PCA-Biomarker. Ein konsistenter Anstieg der Häufigkeit von GP2 wurde in der Studie von Lima et al. im Tumorgewebe und Urin beobachtet und mit gesunden Kontrollen verglichen. Die Untersuchungen zielten darauf ab, dass Harnproteom als Spiegelbild der molekularen Veränderungen im Prostatatumorgewebe und als vielversprechenden PCA-Biomarker zu platzieren. GP2 zeichnete sich dabei als möglicher Harnbiomarker aus (Lima et al., 2021).

### 1.3 Ziel dieser Arbeit

Aufgrund der offensichtlich in einem Teil der Fälle vorkommenden Expression von GP2 im Prostatakarzinom soll in dieser Dissertation die prognostische Relevanz der GP2 Expression im Prostatakarzinom untersucht werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 TMA

Das Tissue Microarray (TMA) Verfahren ist die zentrale Methode, welche für diese Doktorarbeit verwendet wurde. Die TMA Technik wurde 1998 von Kononen et al. erstmalig beschrieben (Kononen et al., 1998). Das Verfahren ermöglicht die gleichzeitige Untersuchung von mehr als 600 Gewebeproben von 600 verschiedenen Patienten auf einem einzigen Objektträger. Das Vorliegen einer Tumorkohorte in einem Tissue Microarray Format erlaubt die Durchführung von Großstudien in sehr kurzer Zeit und mit sehr geringen Kosten. Durch die Möglichkeit 600 Tumoren auf einem Objektträger zu untersuchen, verkürzt sich nicht nur die Herstellungszeit der zu färbenden Schnitte massiv, auch die Reagenzienkosten können um einen Faktor von 600 reduziert werden. Da in einer TMA Studie nur sehr kleine Gewebemengen pro Patient untersucht werden (Durchmesser 0,6 mm) wurde anfänglich intensiv über die mangelnde Repräsentativität einer TMA-Probe für einen Gesamttumor diskutiert (Camp et al., 2000, Rimm et al., 2001, Gancberg et al., 2002), allerdings wurden alle klinisch etablierten molekularen Prognosemarker in Tissue Microarray Studien reproduziert (Torhorst et al., 2001, Nocito et al., 2001, Ruiz et al., 2006), so dass dieser wahrgenommene Nachteil offenbar keinen negativen Einfluss auf die mittels TMA erzielten Forschungsergebnisse ausübt. Tatsächlich hat sich gezeigt, dass das TMA Verfahren gegenüber der klassischen Großschnittmethode zahlreiche Vorteile aufweist, welche möglicherweise für die guten Ergebnisse von TMA Studien verantwortlich sind. Der zentrale Vorteil ist die maximale Standardisierung der Untersuchung, die weit über das in einem normalen Großschnittformat mögliche Ausmaß hinaus geht. Die verhältnismäßig kleine Zahl von für eine Studie benötigten Schnittpräparate erlaubt die Durchführung einer manuellen immunhistochemischen Färbung an einem Tag in einem Satz von Reagenzien, wobei alle Untersuchungsschritte bis hin zur Raumtemperatur, der färbenden Person und die Temperatur und Zusammensetzung der Reagenzien komplett identisch sind. Ebenfalls komplett standardisiert ist das Schnittalter, die Zeit zwischen der Herstellung eines Schnittes und seiner immunhistochemischen Färbung. Studien haben gezeigt, dass bereits Schnittlagerungszeiten von 2 Wochen zu einer deutlichen Reduzierung der Färbeintensität für einzelne Antikörper ergeben (Mirlacher et al., 2004). Bei einer Großschnittuntersuchung mit 17.000 Tumoren wäre es praktisch unmöglich sicherzustellen, dass alle Schnitte vor ihrer Färbung gleich lang gelagert werden. Die Standardisierung der Lagerungsbedingungen, welche ebenfalls eine Rolle spielen könnten, wäre schwierig. Auch die Standardisierung der pro Patient/in



untersuchten Tumormenge ist ein Faktor, der an Großschnittuntersuchungen nicht standardisierbar ist. Die meisten molekularen Tumormarker-Studien an Großschnitten beinhalten teilweise kleine Biopsien, sowie Schnittpräparate von Resektaten mit unterschiedlich großer Tumormenge. Erwartungsgemäß nimmt die Chance einer positiven Beurteilung einer immunhistochemischen Färbung mit der untersuchten Gewebemenge zu. Auch die Standardisierung der Auswertung immunhistochemischer Befunde durch eine semiquantitative Quantifizierung der Färbeergebnisse durch einen Pathologen/in dürften in einer TMA Studie leichter zu erzielen sein als in einer Großschnittstudie (Prof. G. Sauter persönliche Mitteilung), da der/die Pathologe/in auf dem TMA hunderte von Proben mit unterschiedlicher Färbeintensität in einem Gesichtsfeld vergleichend beurteilen kann und es so leichter fällt, einzelne Proben korrekt bzw. reproduzierbar einzuordnen. Der einzige wirkliche Nachteil der TMA-Methode ist der hohe Aufwand bei der Herstellung der TMA-Blöcke (Abbildung 17). Der Großteil der hierfür benötigten Arbeit liegt in der Identifikation geeigneter Tumorblöcke, wobei zunächst geeignete Fälle aus der Datenbank des Pathologie Informationssystems identifiziert werden. Von jedem so gefundenen Prostatakarzinom müssen danach die Schnittpräparate herausgesucht werden und von den ca. 60 Schnittpräparaten aus der Prostata muss ein Schnitt identifiziert werden, welcher möglichst viel Tumorgewebe enthält. Auf einem solchen ausgewählten Schnitt wird das Tumorgewebe mit einem Filzstift eingezeichnet und danach der korrespondierende Paraffinblock aus einem anderen Archiv herausgesucht. Wenn der Block die Qualitätskontrollkriterien (genügende Dicke zur Entnahme einer ausreichend langen Stanze) besteht, wird der Block für die Herstellung des TMAs ausgewählt. Nach Identifikation einer ausreichenden Anzahl an Tumoren wird die Konstruktion des TMAs geplant, wobei für jeden einzelnen Tumor eine entsprechende Position auf dem herzustellenden TMA vorbestimmt wird.

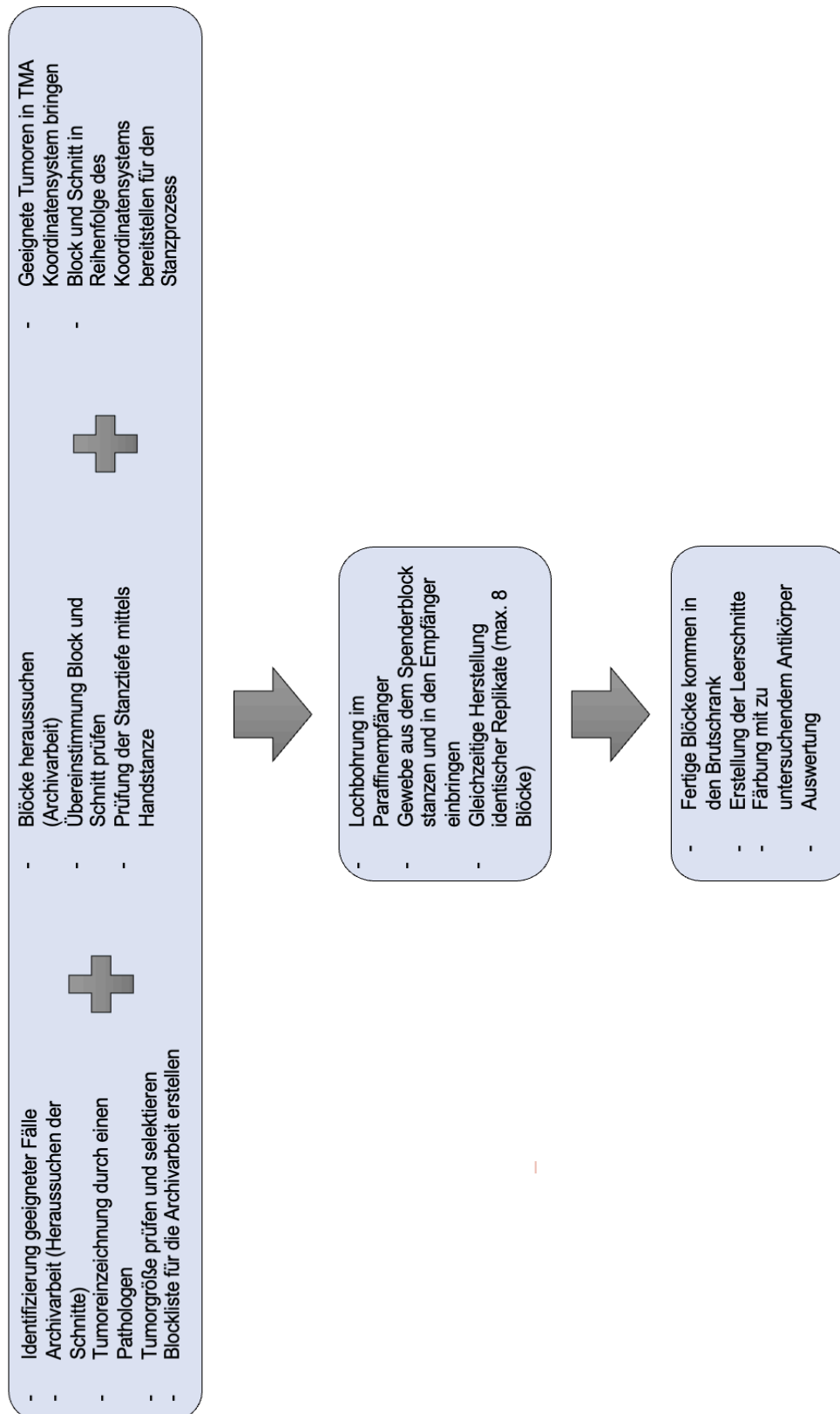


Abbildung 17 – Arbeitsschritte der TMA-Herstellung

Der Aufbau der TMAs ist am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE) standardisiert. Die TMAs bestehen typischerweise aus 6 Sektoren, welche mit Großbuchstaben gekennzeichnet sind (A-F). Diese Sektoren sind asymmetrisch angeordnet und ungleich groß, um eine Orientierung am Schnitt zu ermöglichen. In jedem Sektor werden die Zeilen mit Zahlen von 1 bis 9 und die Spalten mit Kleinbuchstaben von a bis maximal r gekennzeichnet. Der typische TMA-Aufbau des UKEs ist in Abbildung 18 dargestellt. Die Schnitte und Blöcke werden dann in der entsprechenden Reihenfolge zusammen sortiert und von einem von Mitarbeitern des Instituts für Pathologie entwickelten semiautomatischen Gewebearray zu einem Tissue Microarray verarbeitet. Für die TMA-Herstellung wurde zunächst in einem leeren Paraffinempfängerblock mit einem Bohrer ein Loch mit einem Durchmesser von 0,6 mm angefertigt, danach wird mit einer Hohlneedle mit einem inneren Durchmesser von ebenfalls 0,6 mm ein Gewebezylinder aus einem ausgewählten tumorhaltigen Gewebeblock entnommen. Der Gewebezylinder wird danach in das vorgefertigte Loch eingeführt. Der Prozess wird mehrfach (bis zu 600-mal) wiederholt, bis die gesamte Tumorkohorte in einem TMA-Block eingebaut ist. Ein Beispiel eines fertiggestellten TMA-Blocks inkl. aller Zwischenschritte ist in Abbildung 19 und 20 dargestellt.

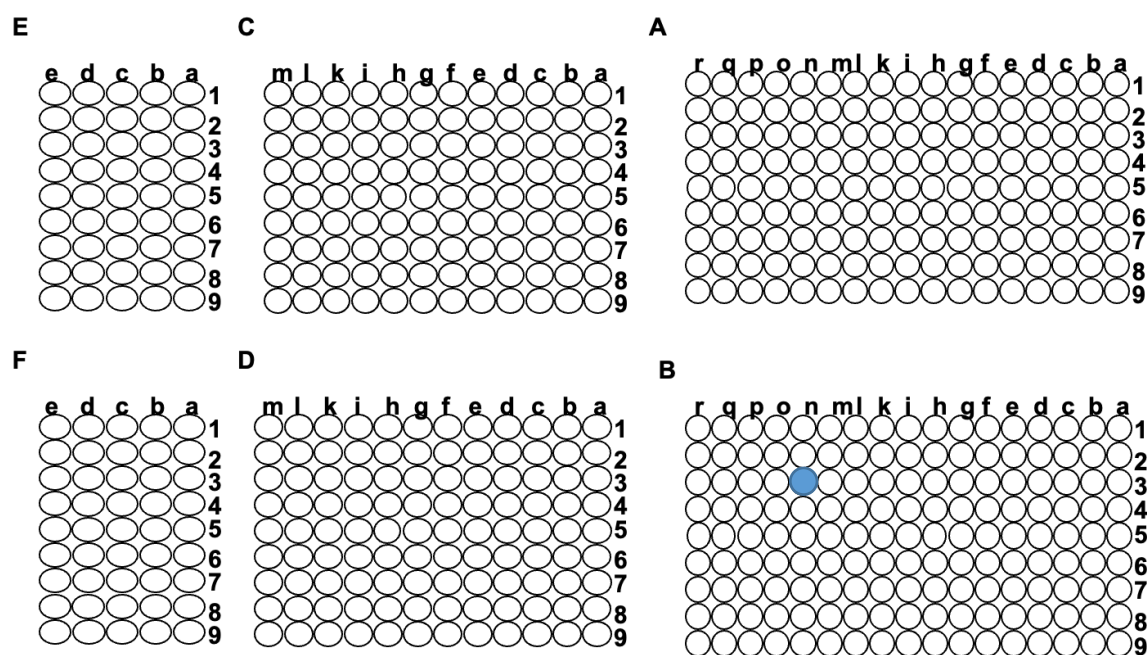


Abbildung 18 – Aufbau eines TMAs nach UKE Standard, ● markiert Koordinate B3n

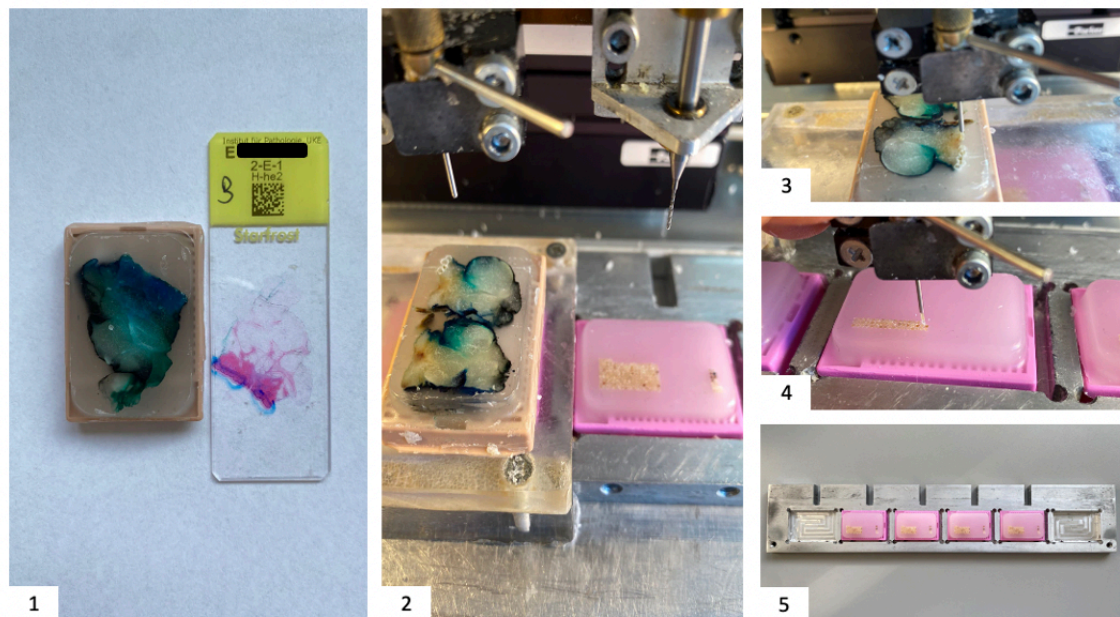


Abbildung 19 – Herstellung eines TMA Blocks

1) Objektträger mit Tumoreinzeichnung und korrespondierendem Paraffinblock werden herausgesucht; 2) vorgebohrter leerer Paraffinempfängerblock wird mit Stanzen des Tumorgewebes gefüllt; 3) Stanze des Tumors; 4) Einfügen der Tumorstanze in den leeren Paraffinempfängerblock; 5) 4 identisch hergestellte TMA Blöcke

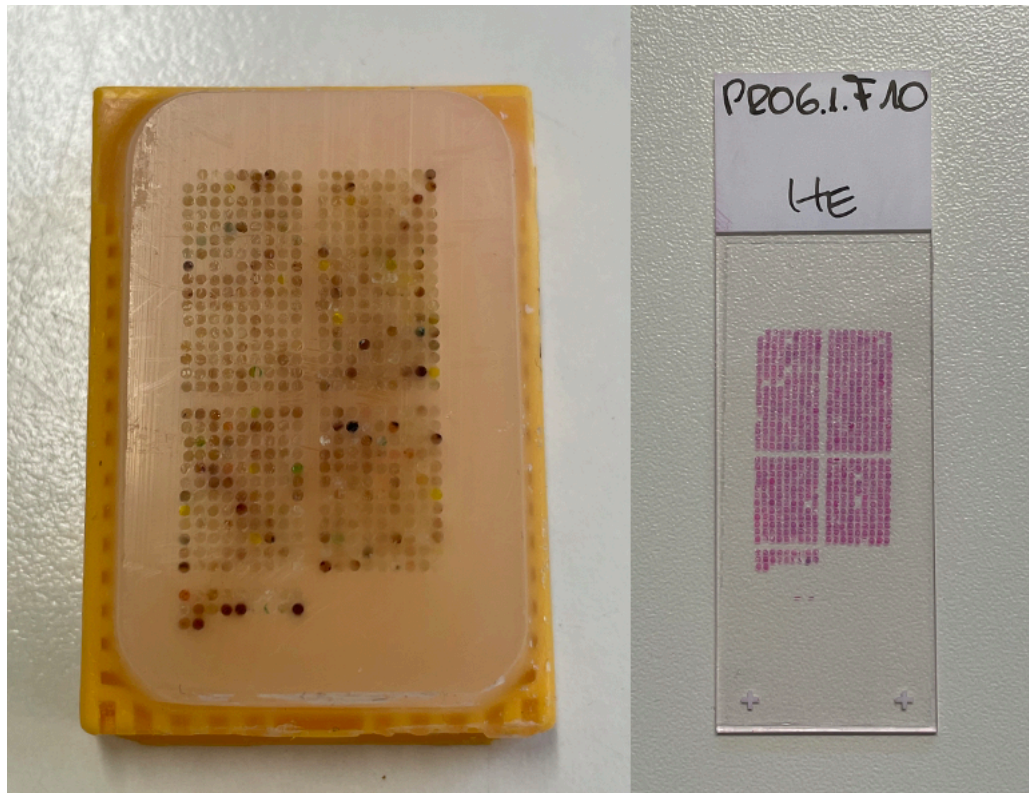


Abbildung 20 – Fertiggestellter Prostata TMA Block und daraus entstandener Schnitt (HE gefärbt)

Ein weiterer wesentlicher Vorteil der TMA-Methode liegt in seiner maximalen Vereinbarkeit mit Datenschutzrichtlinien. Die für die TMA-Herstellung benötigten Biopsienummern sind nur während der Herstellungsphase des TMAs notwendig. Die Biopsienummern könnten, wenn es gelänge, widerrechtlich in das Pathologie Informationssystem einzudringen, für die Identifizierung von Klarnamen einzelner Patienten genutzt werden. Ist der TMA aber fertiggestellt, können diese Biopsienummer aus der Herstellungsdatei entweder ausgeblendet (Pseudonymisierung) oder dauerhaft gelöscht werden (Anonymisierung) werden, ohne dass der wissenschaftliche Wert eines TMA vermindert wird. Die vorhandenen klinischen oder molekularen Parameter sind nun über eine genau definierte Koordinate auf dem TMA mit einem individuellen Tumor / Patienten verbunden. Tabelle 2 zeigt ein Beispiel einer zu einem TMA gehörenden Datei mit klinischen Daten.



*Tabelle 2 – Auszug des Patientenkollektivs für die Herstellung des Prostata TMAs inkl. Koordinaten und individuellen Patientendaten (anonymisiert ohne E-Nummern)*

PaId	TMA	TMAblocknr	localisat	AlterbeiOP	AlterbeiOP groups	PSA präOP	PSA präOP group	pGleason	pGleason group	path.T	path.T group	path.N	R	Status	präOP Hormone
1	Pro 6.1	1	A 1a	68,6	60-70	52,7	>20	3+3	≤3+3	pT3a	pT3a	N0	R1	n	n
2	Pro 6.1	1	A 1b	61,1	60-70	11	10-20	3+4	3+4	pT3a	pT3a	N0	R0	n	n
3	Pro 6.1	1	A 1c	54,5	50-59	35,8	>20	3+4	3+4	pT3a	pT3a	N0	R0	n	n
4	Pro 6.1	1	A 1d	56,3	50-59	11,33	10-20	3+4	3+4	pT3a	pT3a	N0	R0	n	n
5	Pro 6.1	1	A 1e	72,5	>70	10,06	10-20	3+4	3+4	pT3a	pT3a	N0	R1	n	n
6	Pro 6.1	1	A 1f	66,3	60-70	3,3	<4	5+3	≥4+4	pT3b	pT3b	N0	R0	n	n
7	Pro 6.1	1	A 1g	54,8	50-59	4,14	4-10	3+4	3+4	pT3a	pT3a	N0	R0	n	n
8	Pro 6.1	1	A 1h	72,1	>70			3+3	≤3+3	pT2	pT2	N0	R0	n	n
9	Pro 6.1	1	A 1i	69,3	60-70	15,4	10-20	3+4	3+4	pT3b	pT3b	N0	R0	n	n
10	Pro 6.1	1	A 1k	65,6	60-70	14	10-20	3+2	≤3+3	pT3a	pT3a	N0	R0	ja	ja
11	Pro 6.1	1	A 1l	72	>70	5	4-10	2+3	≤3+3	pT2	pT2	N0	R0	n	n
12	Pro 6.1	1	A 1m	63,2	60-70	50	>20	3+4	3+4	pT3b	pT3b	N0	R1	ja	ja
13	Pro 6.1	1	A 1n	70,2	>70	3,85	<4	4+3	4+3	pT3a	pT3a	N0	R1	n	n
14	Pro 6.1	1	A 1o	53,1	50-59	7,48	4-10	3+4	3+4	pT3a	pT3a	N0	R0	n	n
15	Pro 6.1	1	A 1p	60,3	60-70	20,61	>20	3+4	3+4	pT3a	pT3a	N0	R1	n	n
16	Pro 6.1	1	A 1q	54,4	50-59	6,4	4-10	3+2	≤3+3	pT2	pT2	N0	R0	n	n
17	Pro 6.1	1	A 1r	56,4	50-59	12,26	10-20	4+5	≥4+4	pT3b	pT3b	N0	R1	n	n
18	Pro 6.1	1	A 2a	72	>70	15,4	10-20	3+3	≤3+3	pT2	pT2	N0	R0	n	n
19	Pro 6.1	1	A 2b	67,4	60-70			4+3	4+3	pT3a	pT3a	N0	R1	n	n
20	Pro 6.1	1	A 2c	65,8	60-70	34	>20	4+3	4+3	pT3b	pT3b	N0	R0	n	n
21	Pro 6.1	1	A 2d	48,7	<50	120	>20	4+5	≥4+4	pT3b	pT3b	N2	R1	n	n
22	Pro 6.1	1	A 2e	70	60-70	19,54	10-20	3+4	3+4	pT3b	pT3b	N0	R1	n	n
23	Pro 6.1	1	A 2f	65,8	60-70	6,5	4-10	4+3	4+3	pT3b	pT3b	N0	R1	n	n
24	Pro 6.1	1	A 2g	68,3	60-70			3+4	3+4	pT3b	pT3b	N0	R1	n	n
25	Pro 6.1	1	A 2h	52	50-59			4+3	4+3	pT3b	pT3b	N0	R0	n	n
26	Pro 6.1	1	A 2i	72,3	>70	22	>20	3+4	3+4	pT3b	pT3b	N0	R0	n	n
27	Pro 6.1	1	A 2k					2+3	≤3+3	pT2	pT2	N0	R0	n	n
28	Pro 6.1	1	A 2l	65,8	60-70	22,8	>20	5+4	≥4+4	pT3b	pT3b	N0	R0	n	n
29	Pro 6.1	1	A 2m	63,4	60-70	15,7	10-20	4+3	4+3	pT3a	pT3a	N0	R0	n	n
30	Pro 6.1	1	A 2n	60,8	60-70	8,6	4-10	3+4	3+4	pT3a	pT3a	N0	R1	n	n
31	Pro 6.1	1	A 2o	53,5	50-59	11,6	10-20	4+3	4+3	pT2	pT2	N0	R0	n	n
32	Pro 6.1	1	A 2p	54,8	50-59	38,9	>20	3+4	3+4	pT3a	pT3a	N0	R0	n	n
33	Pro 6.1	1	A 2q	65,1	60-70			3+4	3+4	pT3b	pT3b	N0	R1	n	n
34	Pro 6.1	1	A 2r	52,8	50-59	5,1	4-10	3+2	≤3+3	pT2	pT2	N0	R0	ja	ja
35	Pro 6.1	1	A 3a	61,9	60-70	6,5	4-10	3+4	3+4	pT3a	pT3a	N0	R0	n	n
36	Pro 6.1	1	A 3b	69,3	60-70	9,31	4-10	3+4	3+4	pT2	pT2	N0	R0	n	n
37	Pro 6.1	1	A 3c	58,2	50-59	4,62	4-10	3+4	3+4	pT2	pT2	N0	R0	n	n
38	Pro 6.1	1	A 3d	45	<50	14,64	10-20	3+4	3+4	pT3a	pT3a	N0	R0	n	n
39	Pro 6.1	1	A 3e	66,8	60-70	7,89	4-10	3+3	≤3+3	pT2	pT2	N0	R1	n	n
40	Pro 6.1	1	A 3f	60,6	60-70	7,76	4-10	3+3	≤3+3	pT3a	pT3a	N0	R1	n	n
...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...

## 2.2 Für die Studie verwendete TMAs

Der Prostatakarzinom TMA, welcher für die folgende Studie zur Verfügung stand, beinhaltet Proben von 17.747 Tumoren von 17.752 verschiedenen Patienten. Die genaue Zusammensetzung des Patientenkollektivs, sowie die zur Verfügung stehenden pathologischen und klinischen Daten, sind in Tabelle 3 dargestellt. Der Prostatakarzinom TMA verteilt sich auf 39 verschiedene TMA-Gewebeblöcke, welche 129 bis 522 Tumorproben aufwiesen. Die untersuchten Proben stammen aus Prostatektomiepräparaten von Patienten, welche in den Jahren 1992 bis 2014 entweder an der urologischen Klinik des UKE oder der Martini Klinik des UKE prostatektomiert worden waren. Alle Prostatakarzinome waren in 4%igem gepufferten Formalin fixiert worden und nach einem standardisierten Verfahren komplett eingebettet und histologisch untersucht worden. Daten zum klinischen Verlauf lagen bei 14.464 Patienten vor. Als klinischer Endpunkt wurde das PSA Rezidiv verwendet. Ein PSA Rezidiv wurde diagnostiziert bei einem Anstieg auf einen Wert von 0,2 ng/ml, welcher mindestens einmal in einer späteren Untersuchung bestätigt wurde.

*Tabelle 3 – TMA Verlaufsdaten und Rezidive nach Kriterien in Beziehung gesetzt*

	<b>Anzahl der Patienten (%)</b>	
	<b>Studie TMA-Kohorte (n = 17.747)</b>	<b>Rezidive</b>
<b>Verlaufsdaten</b>		
n	14464 (81.5%)	3612 (25%)
Mittelwert	56.3	-
Medianwert	48	-
Alter (Jahre)		
≤ 50	433 (2.4%)	66 (15.2%)
51 – 59	4341 (24.5%)	839 (19.3%)
60 – 69	9977 (56.4%)	2073 (20.8%)
≥ 70	2936 (16.6%)	634 (21.6%)
<b>Präoperatives PSA (ng/ml)</b>		
< 4	2225 (12.6%)	313 (14.1%)
4 – 10	10520 (59.6%)	1696 (16.1%)
10 – 20	3662 (20.8%)	1043 (28.5%)
> 20	1231 (7%)	545 (44.3%)
<b>pT-Status (AJCC 2002)</b>		
pT2	11518 (65.2%)	1212 (10.5%)
pT3a	3842 (21.7%)	1121 (29.2%)
pT3b	2233 (12.6%)	1213 (54.3%)
pT4	85 (0.5%)	63 (74.1%)
<b>Gleason-Grad</b>		
≤ 3+3	3570 (20.3%)	264 (7.4%)
3+4	9336 (53%)	1436 (15.4%)
3+4 Tert. 5	798 (4.5%)	165 (20.7%)
4+3	1733 (9.8%)	683 (39.4%)
4+3 Tert. 5	1187 (6.7%)	487 (41%)
≥ 4+4	999 (5.7%)	531 (53.2%)
<b>pN-Status</b>		
pN0	10636 (89.4%)	2243 (21.1%)
pN+	1255 (10.6%)	700 (55.8%)
<b>Resektionsrand</b>		
Negativ	14297 (80.8%)	2307 (16.1%)
Positiv	3388 (19.2%)	1304 (38.5%)

## 2.3 Immunhistochemie

Das immunhistochemische Verfahren wird zur Visualisierung ausgewählter Proteine auf Gewebeschnitten verwendet (Sternberger et al., 1970). Um eine Visualisierung zu ermöglichen, wird ein Antikörper gegen das zu untersuchende Protein auf dem Gewebeschnitt benötigt. Der Antikörper bindet an ein Epitop des Zielproteins und löst eine Antigen-Antikörper-Reaktion aus. Typischerweise entstammen diese Antikörper aus Mäusen, Ratten, Kaninchen oder Hamstern. Den Tieren wird das ausgewählte Protein geimpft und nach einer bestimmten Zeit Serum bei maximaler Antikörperproduktion entnommen (Kurosawa et al., 2012). In diesem Prozess entstandene polyklonale Antikörper werden an fixiertem und eingebettetem Gewebe bevorzugt für die Immunhistochemie eingesetzt, da eine stärkere Markierung durch mehr Antikörper-Antigen-Bindungen resultiert. Sie sind toleranter auf kleine Veränderungen der Epitope, die im Verarbeitungsprozess durch Fixierung, Entwässerung und hohe Temperatur entstehen können. Monoklonale Antikörper könnten auch genutzt werden, da sie den Vorteil der hohen Spezifität für ein Epitop haben. Sie entstehen durch die Entnahme der Milz eines immunisierten Tieres und die Zusammenführung der antikörperproduzierenden Plasmazellen mit Tumorzellen. Diese künstliche Verschmelzung bringt unsterbliche, antikörperproduzierende Hybridomazellen hervor, die im Anschluss beliebig in Zellkulturen oder im Tier vermehrt werden können. Die Immunmarkierung fällt dann sehr eindeutig aus. Da sie aber nur ein bestimmtes Epitop erkennen, binden sie in kleinerer Anzahl als ein polyklonaler Antikörper, womit die gesamte Markierung schwächer ausfällt. Verstärkungstechniken können dies ausgleichen (Ramos-Vara and Miller, 2014).

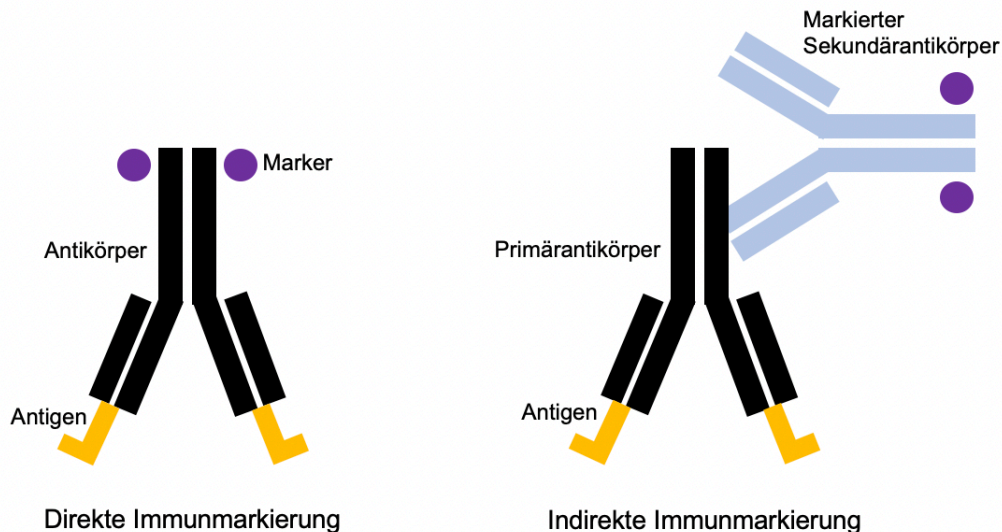
Jedes Immunsystem reagiert unterschiedlich auf ein Protein und bildet damit eine Vielzahl an Antikörpern. Bei dem Prozess der Antikörperherstellung entstehen viele verschiedene Antikörper, die sich in ihrer Bindungsaffinität und Spezifität unterscheiden (Saper, 2009, Lu et al., 2020). Dies führt unter den vielen kommerziell erhältlichen Antikörpern zu erheblichen Unterschieden in ihren Färbeeigenschaften. Eine umfangreiche Validierung ist daher obligat, um diese Antikörper für wissenschaftliche Experimente oder zur Diagnostik nutzen zu können. Um eine immunhistochemische Färbung sichtbar zu machen, bedarf es vieler Teilschritte, die in Tabelle 4 am zu untersuchenden Protein GP2 dargestellt sind.



*Tabelle 4 – Arbeitsschritte im Färbeprozess eines TMA zum untersuchten Protein GP2*

Schritt	Ziel	Arbeitsschritt	Dauer/Bedingung
1	Vorbereitung des Objektträgers	von jedem TMA-Block wird ein 2,5 µm dicker Schnitt geschnitten	
2	Entparaffinierung	Xylol-Behandlung	3 x 5 min
		Rehydrierung mittels einer absteigenden Alkoholreihe	
		Spülung mit destilliertem Wasser	
3	Demaskierung der Antigene	Inkubation mit Tris-EDTA-Citrat-Puffer im Autoclav bei pH 7,8 - Target Retrieval Solution Buffer, DAKO	5 min bei 121 Grad
		Spülung mit destilliertem Wasser	2 x
		Inkubation im Brutschrank und Spülung mit TBS-T-Puffer	2 x 5 min
4	Peroxidaseblock	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Behandlung (Peroxidase Blocking Solution) - Vermeidung der nicht spezifischen Antikörperbindung	10 min
		Inkubation im Brutschrank und Spülung mit TBS-T-Puffer	2 x 5 min
5	Inkubation mit Primärantikörper	Inkubation mit Primärantikörper: GP2 = MSVA-475M - 1:150 Verdünnung	60 min bei 37 Grad
		Inkubation im Brutschrank und Spülung mit TBS-T-Puffer	2 x 5 min
6	Inkubation mit Sekundärantikörper	Zugabe des Sekundärantikörpers (DAKO Real EnVision Detection System)	30 min bei 37 Grad
		Inkubation im Brutschrank und Spülung mit TBS-T-Puffer	2 x 5 min
7	Chromogenprozess	Zugabe des Chromogens (DAB-Chromogen, DAKO)	10 min
		Spülung mit destilliertem Wasser	1 x
8	Gegenfärbung	Hämatoxylin	3 min
		Bläuen mit Leitungswasser	5 min
9	Einbettung	Dehydrierung mittels aufsteigender Alkoholreihe bis Xylol	
		Deckelung jedes Objektträgers	

Um die Bindung des Primärantikörpers darstellen zu können, werden farblich konjugierte Sekundärantikörper verwendet. Sekundärantikörper sind auch tierisch hergestellte Antikörper, jedoch muss sich die Entnahme-Spezies von der Primärantikörper-Spezies unterscheiden. Sie richten sich gegen den Fc-Teil des Antikörpers der Primärantikörper-Spezies. Durch die Bindung des Sekundärantikörpers an den Primärantikörper, kann die Antikörperreaktion durch das Färbesystem visualisiert werden. Hierbei wird in direkte und indirekte Immunmarkierung unterschieden (Abbildung 21).



*Abbildung 21 – Schematische Darstellung der direkten und indirekten Immunmarkierung (schematisch modifiziert nach (Mulisch, 2014))*

Bei der direkten Methode handelt es sich um eine Einschrittmethode. Der Antikörper ist direkt markiert und kann bei Antigen-Antikörper-Bindung licht- oder elektronenmikroskopisch oder über eine Farbreaktion sichtbar gemacht werden (Ramos-Vara, 2005, Im et al., 2019). Der Antikörper ist dafür mit z.B. Fluorchrom, Gold oder einem Enzym konjugiert. Bei der indirekten Methode wird der Sekundärantikörper konjugiert, der nicht direkt, sondern über den Fc-Teil des Primärantikörpers bindet und so die Antigen-Antikörper-Reaktion sichtbar macht. Vorteil der indirekten Methode ist, dass mehrere Sekundärantikörper an einen Primärantikörper binden können, was zu einer Signalverstärkung führt (Ramos-Vara, 2005, Im et al., 2019).

Ein nicht unwichtiger Aspekt in der Immunhistochemie ist die Tatsache, dass das Zielprotein im formalinfixierten Gewebe im Rahmen der immunhistochemischen Reaktion verändert wird. Die Fixierung führt zu Vernetzungen (eng.: Cross-linking) von Proteinen. Folglich finden sich Veränderungen an den Epitopen, an denen die Antikörper binden sollen. Diese Konformationsänderung bewirkt, dass die Proteine nicht mehr zugänglich sind und keine Bindung stattfinden kann (Shi et al., 1991). Viele Antikörper funktionieren deswegen schlecht oder gar nicht an formalinfixiertem Gewebe. Dieser Prozess kann teilweise mit der Methode der hitzeinduzierten Epitop-Demaskierung (Heat induced Epitop Retrieval, HIER) umgangen werden (Ramos-Vara, 2005, Ramos-Vara and Miller, 2014). Die für die Immunhistochemie vorgesehenen Schnitte werden in dem HIER-Verfahren in einer flüssigen Lösung stark erhitzt bei 90-120 °C. Je nach Protein muss ein leicht saurer (pH 6) oder ein basischer pH-Wert (pH 9) zur optimalen Antigendemaskierung gewählt werden (Shi et al., 1991).

## 2.4 GP2 Immunhistochemie

Frisch geschnittene TMA-Schnitte wurden an einem Tag und in einem Versuch immungefärbt. Die Objektträger wurden mit Xylol entparaffiniert, durch eine abgestufte Alkoholreihe rehydriert und 5 Minuten lang in einem Autoklav bei 121 °C in DAKO Target Retrieval Solution (Agilent, CA, USA; #S2367) mit pH 7,8 Puffer behandelt. Die endogene Peroxidase-Aktivität wurde 10 Minuten lang mit DAKO Peroxidase Blocking Solution (Agilent, CA, USA; #52023) blockiert. Der für GP2 spezifische primäre Antikörper (rekombinanter Maus-Antikörper, MSVA-475M, MS Validated Antibodies, Hamburg, Deutschland) wurde bei 37 °C für 60 Minuten in einer Verdünnung von 1:150 aufgetragen. Der gebundene Antikörper wurde dann mit dem EnVision Kit (Agilent, CA, USA; #K5007) gemäß den Anweisungen des Herstellers visualisiert. Die Schnitte wurden mit Hämatoxylin gegengefärbt. Bei normalem Gewebe wurde die Färbeintensität der positiven Zellen semiquantitativ erfasst (+, ++, +++). Im Tumorgewebe wurde der prozentuale Anteil positiver neoplastischer Zellen geschätzt und die Färbeintensität semiquantitativ erfasst (0, 1+, 2+, 3+). Für die statistischen Analysen wurden die Färbeergebnisse in vier Gruppen eingeteilt. Tumoren ohne jegliche Färbung wurden als negativ eingestuft (0). Tumoren mit einer Färbeintensität von 1+ in ≤70 % der Zellen und einer Intensität von 2+ in ≤30 % der Zellen wurden als schwach positiv eingestuft. Tumoren mit einer Färbeintensität von 1+ in >70% der Zellen, einer Intensität von 2+ in 31-70% oder einer Intensität von 3+ in ≤30% galten als mäßig positiv. Tumoren mit einer Intensität von 2+ in >70% oder 3+ in >30% der Zellen wurden als stark positiv eingestuft (Tabelle 5).

*Tabelle 5 – Klassifikation der Färbeergebnisse*

Kategorie	%-Anteil gefärbter Tumorzellen	Intensität der Färbung
negativ	0%	0
schwach positiv	≤ 70%	1
	≤ 30%	2
mäßig positiv	> 70%	1
	31% bis 70%	2
	≤ 30%	3
stark positiv	> 70%	2
	> 30%	3

## 2.5 Statistik

Für die statistischen Berechnungen wurde die Software JMP® 14 (SAS Institute Inc., NC, USA) verwendet. Chi<sup>2</sup>-Tests und Kontingenztabellen wurden verwendet, um Zusammenhänge zwischen molekularen Parametern und Tumorphänotyp darzustellen. Die Überlebenskurven wurden nach dem Kaplan-Meier-Verfahren berechnet (Ziegler et al., 2007c). Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mit dem Log-Rank-Test ermittelt (Ziegler et al., 2007a). Die Cox-Proportional-Hazards-Regressionsanalyse wurde durchgeführt, um die statistische Unabhängigkeit und Signifikanz zwischen pathologischen, molekularen und klinischen Variablen zu testen (Ziegler et al., 2007b).

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Prognostische Bedeutung klinisch pathologischer Parameter

Klinische Verlaufsdaten lagen von 14.464 Patienten vor, wobei es bei 3.612 (25%) im Verlauf zu einem PSA-Rezidiv gekommen war. Die Beziehung zwischen pT-Stadium ( $p < 0,0001$ ), pN-Status ( $p < 0,0001$ ), Gleason-Grad ( $p < 0,0001$ ), quantitativen Gleason-Grad ( $p < 0,0001$ ), IQ-Gleason ( $p < 0,0001$ ) und Resektionsrändern ( $p < 0,0001$ ) mit der Wahrscheinlichkeit eines PSA-Rezidives ist in den Abbildungen 22a bis 22f gezeigt. Die signifikante Beziehung aller untersuchter Parameter mit dem rezidivfreien Überleben ist ein Beleg für die Validität der vorhandenen klinischen Daten.

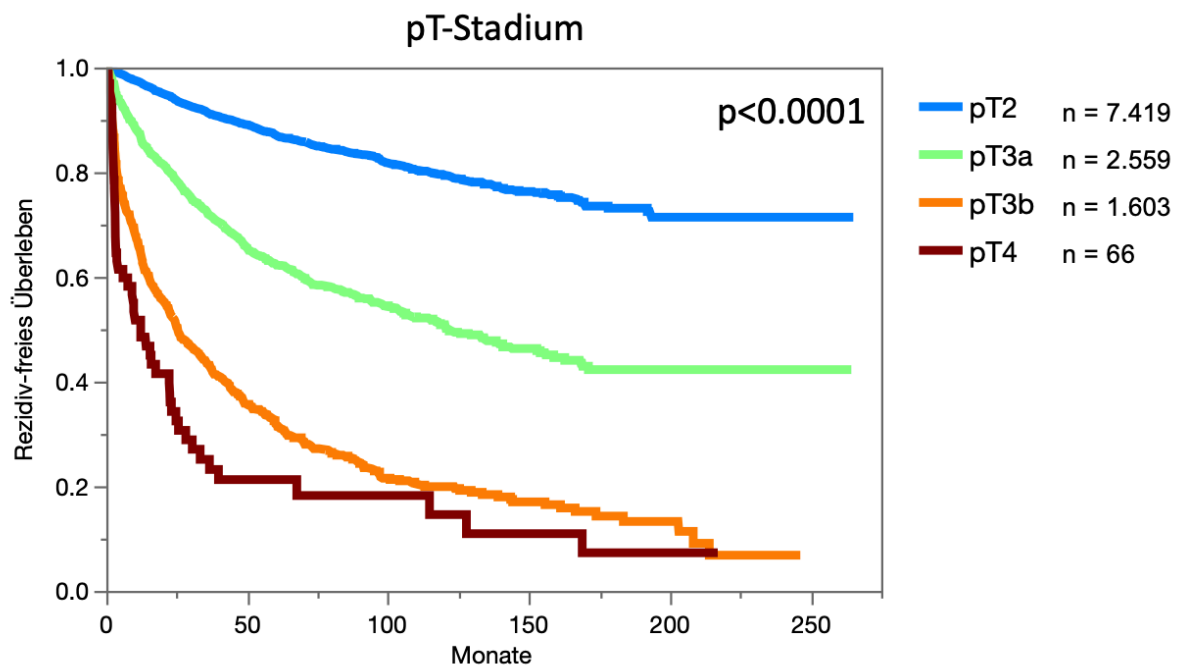


Abbildung 22a – pT-Stadium und PSA Rezidiv

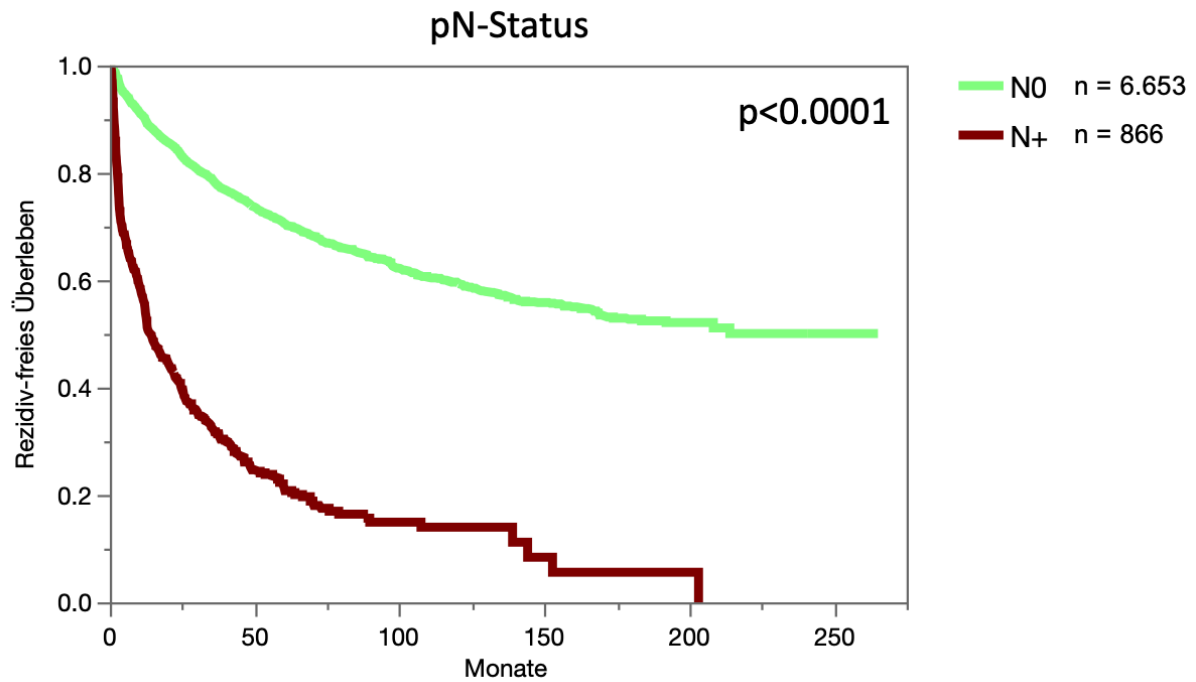


Abbildung 22b – pN-Status und PSA Rezidiv

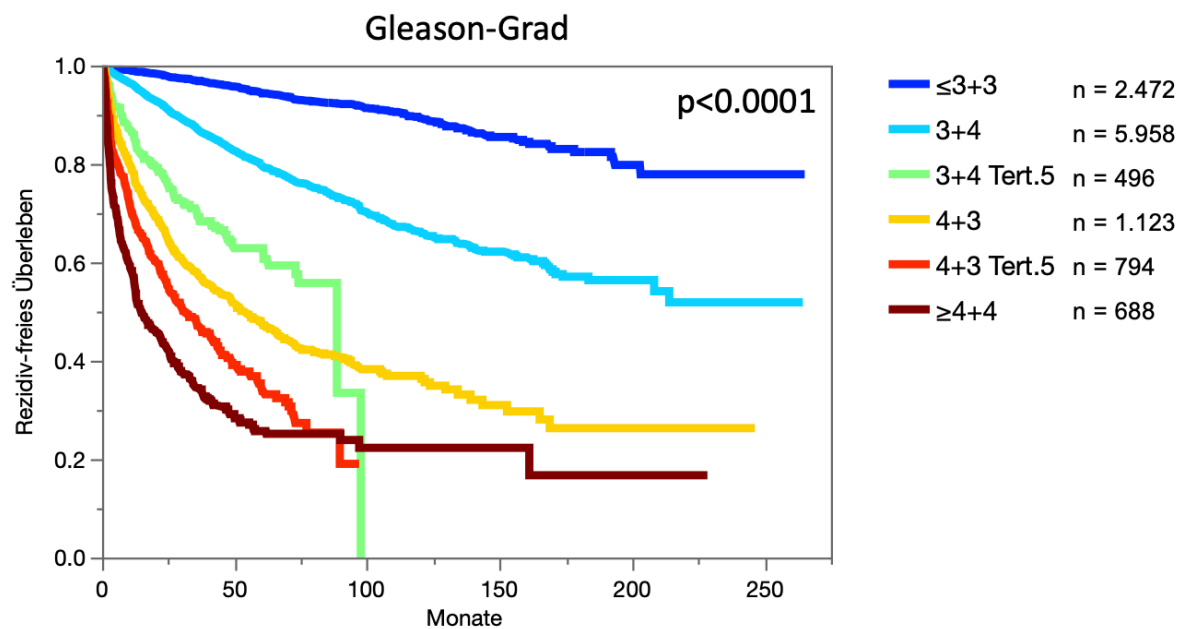


Abbildung 22c – Gleason-Grad und PSA Rezidiv

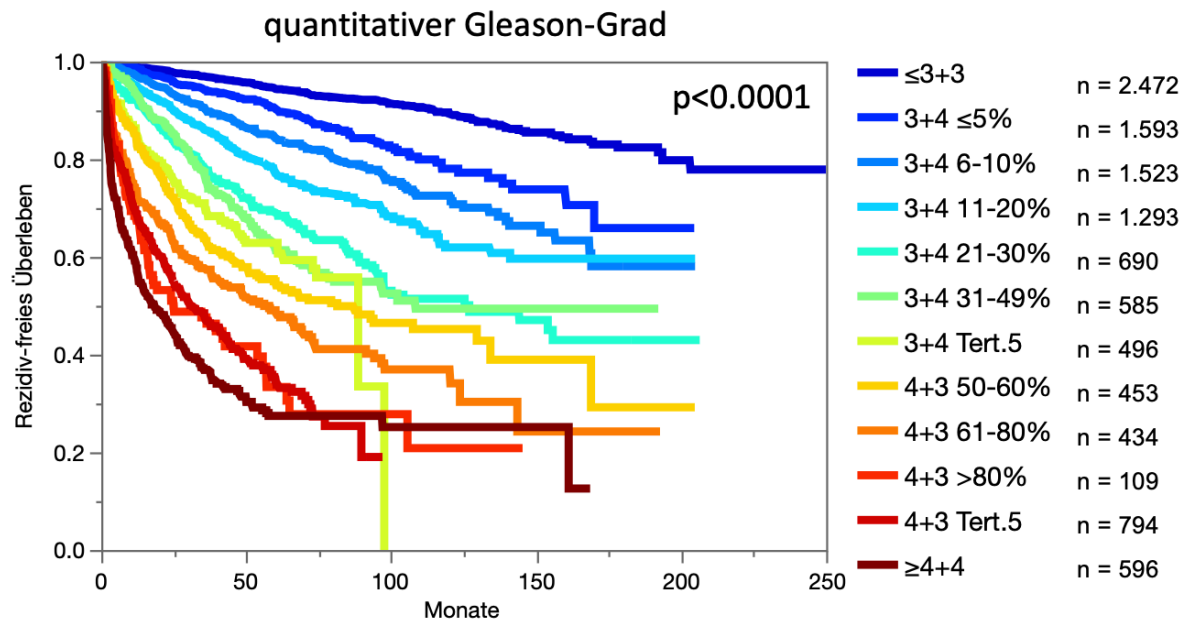


Abbildung 22d – quantitativer Gleason-Grad und PSA Rezidiv

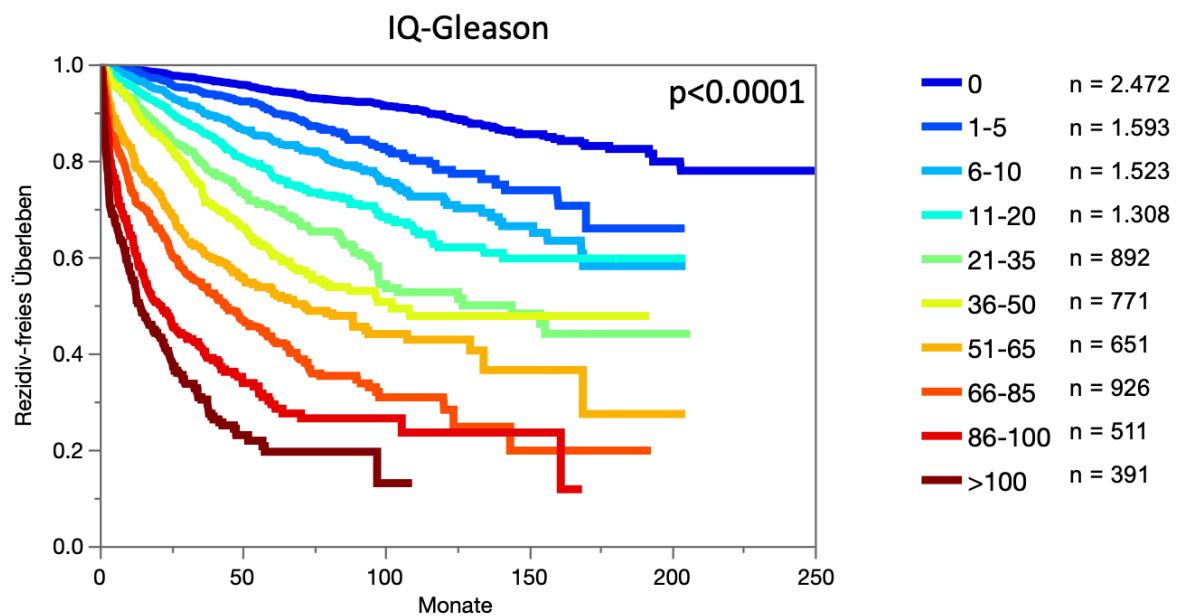


Abbildung 22e – IQ-Gleason und PSA Rezidiv

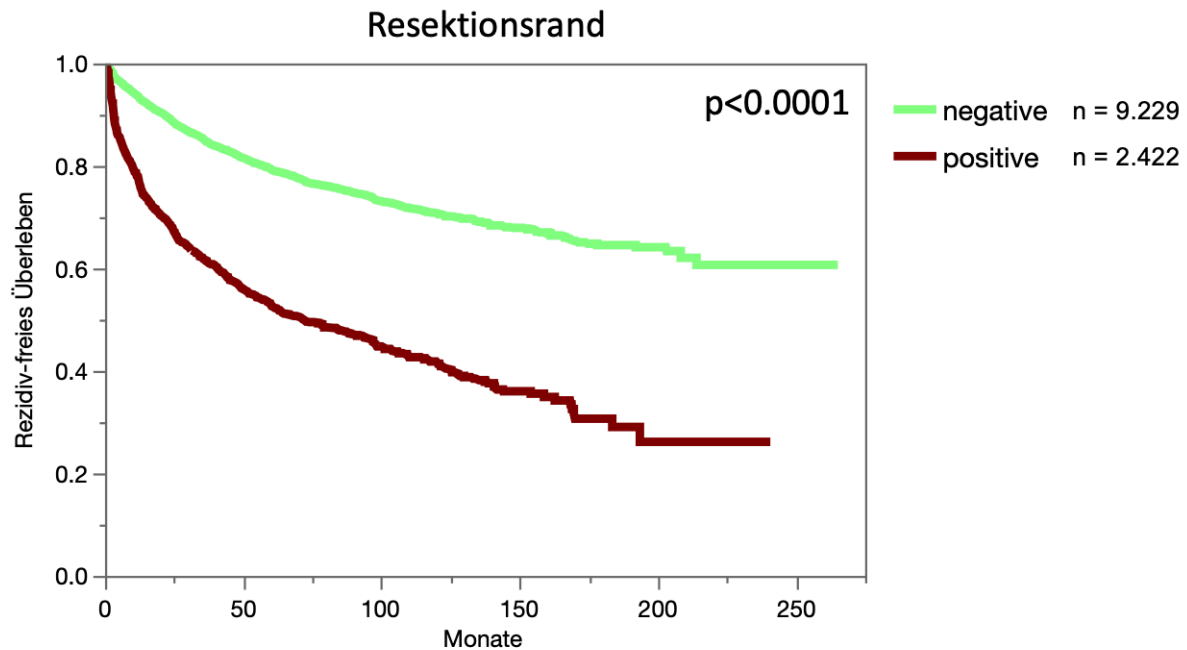


Abbildung 22f – Resektionsrand und PSA Rezidiv

### 3.2 Technische Aspekte

Von 17.747 in den Prostata Prognose TMA eingebrachten Patientenproben erwiesen sich 14.611 (82,3%) als auswertbar. Gründe für nicht auswertbare Tumorproben waren das Fehlen von Tumorzellen in den eingebrachten Gewebestanden oder aber das vollständige Fehlen von Gewebe an einzelnen TMA Positionen.

### 3.3 GP2-Positivität

Eine GP2-Positivität fand sich in 1.059 (7,2%) von 14.611 auswertbaren Tumorproben, wobei die Färbung überwiegend zytoplasmatisch, teilweise auch membranös akzentuiert war. Obwohl morphologische Aspekte der positiven und negativen Prostatakarzinomproben nicht systematisch erfasst worden waren, schien eine GP2-Positivität gehäuft bei Tumoren mit muzinöser Komponente aufzutreten. Beispiele von GP2 positiven Adenokarzinomen der Prostata sind in Abbildung 23 bis 28 dargestellt. Normales Prostataepithel, wenn auf den Präparaten vorhanden, war typischerweise GP2 negativ (Abbildung 29).



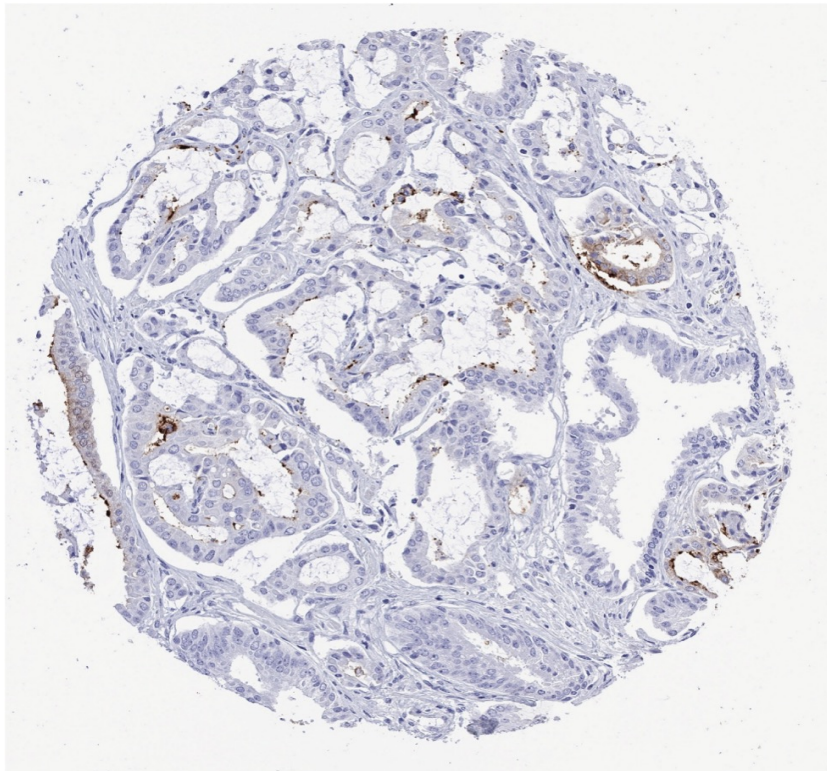


Abbildung 23 – muzinöses Adenokarzinom der Prostata, schwach positiv gefärbt (1+) in 30% der Tumorzellen (Koordinate: Pro24.1 A3 D2d)

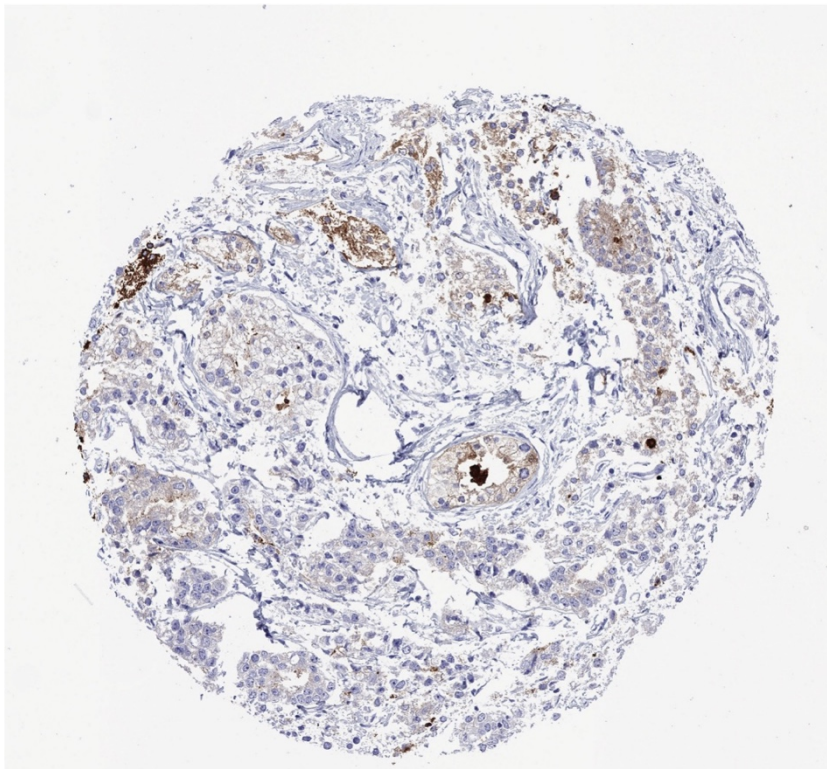


Abbildung 24 – Adenokarzinom der Prostata, schwach positiv gefärbt (1+) in 70% der Tumorzellen (Koordinate: Pro6.1 B8 C9I)

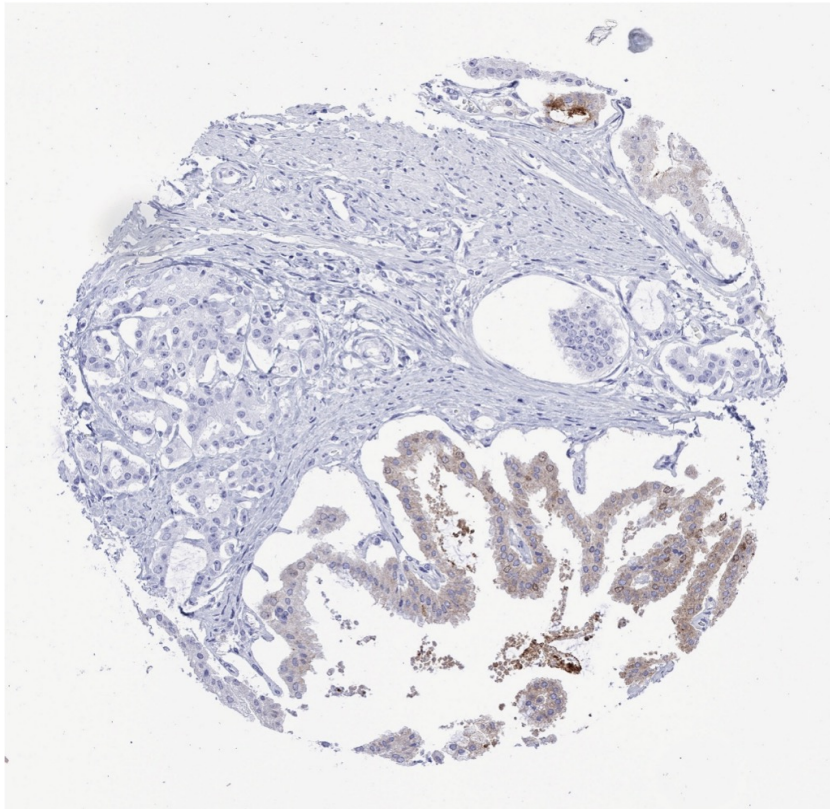


Abbildung 25 – Adenokarzinom der Prostata, mäßig stark gefärbt (2+) in 30% der Tumorzellen (Koordinate: Pro24.1 A3 C5a)

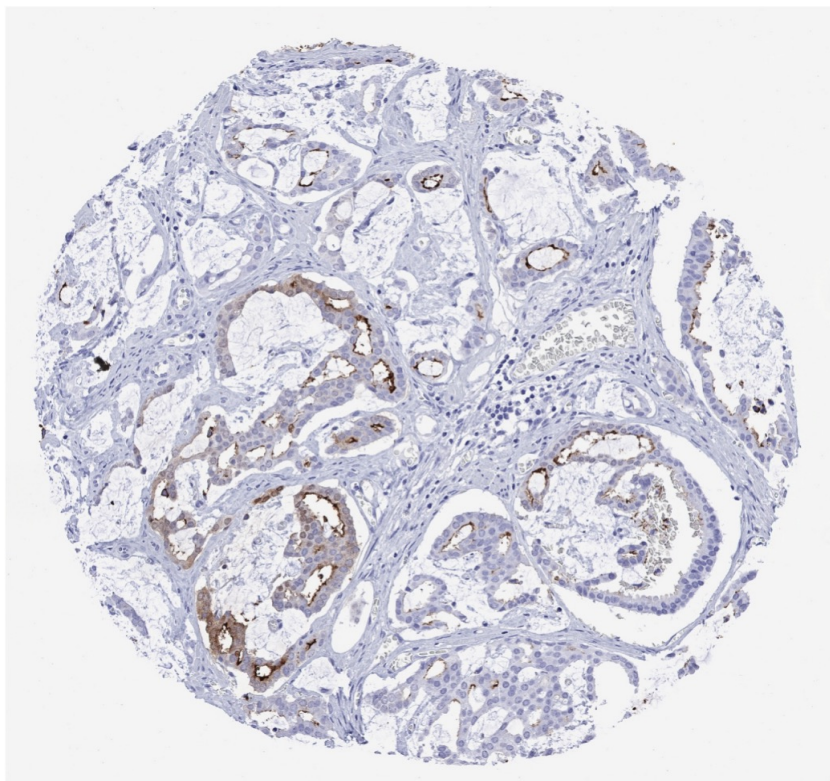


Abbildung 26 – muzinöses Adenokarzinom der Prostata, mäßig stark gefärbt (2+) in 60% der Tumorzellen (Koordinate: Pro24.1 B3 B3p)



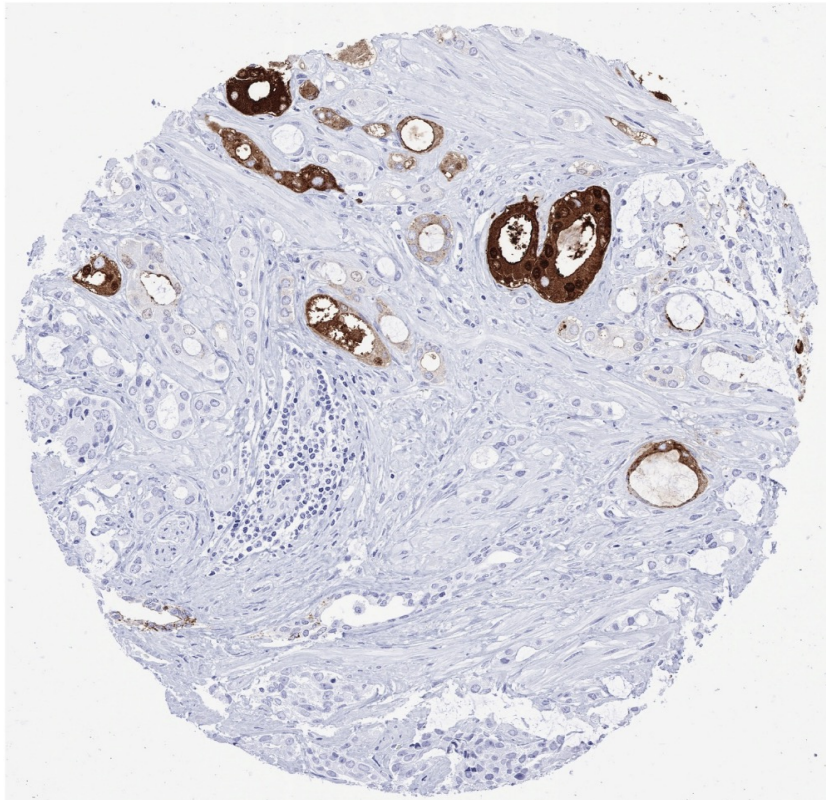


Abbildung 27 – Adenokarzinom der Prostata, stark gefärbt (3+) in 20% der Tumorzellen (Koordinate: Pro14.1 A7 B5n)

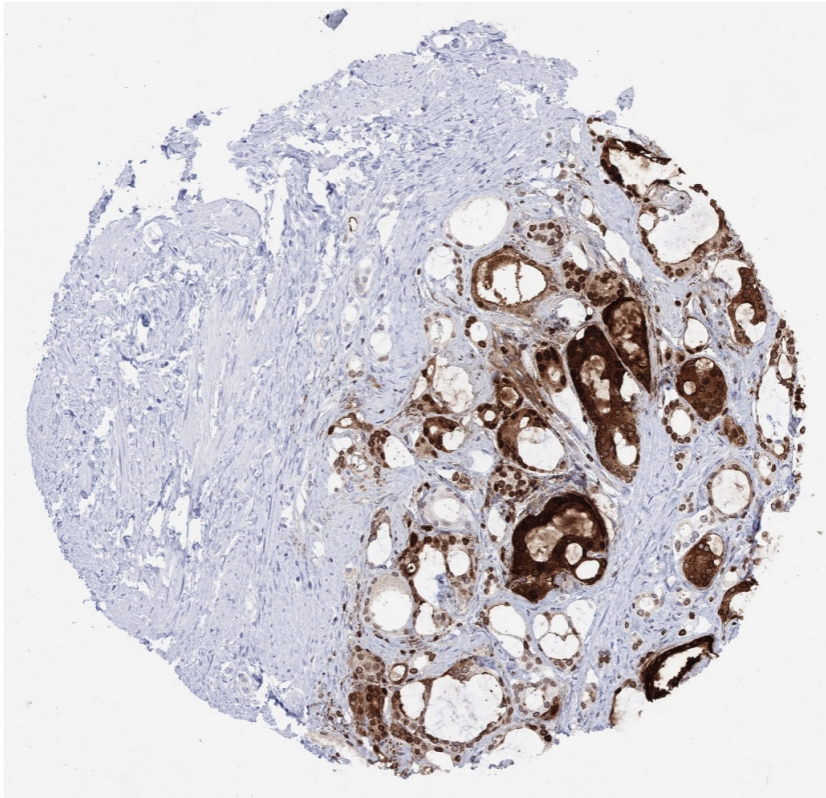
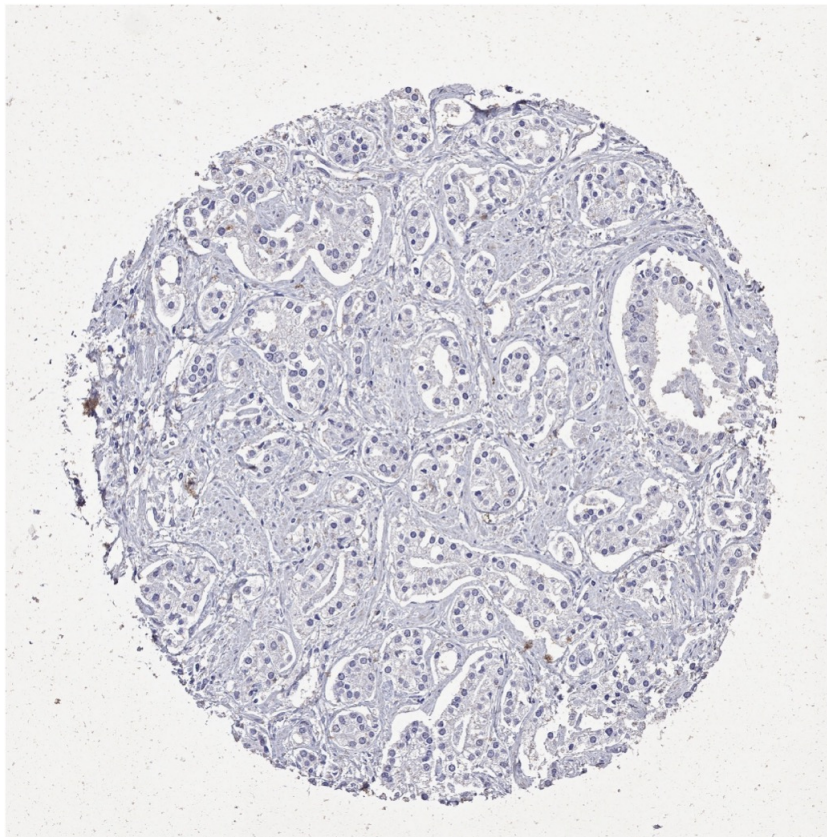


Abbildung 28 – Adenokarzinom der Prostata, stark gefärbt (3+) in 100% der Tumorzellen (Koordinate: Pro23.1 A3 A4i)



*Abbildung 29 – Adenokarzinom der Prostata, negativ - nicht gefärbt (Koordinate: Pro6.1 A6 A3a)*

### 3.4 GP2-Expression beim Prostatakarzinom, Tumorphänotyp und Prognose

Die Beziehung zwischen der GP2-Expression und phänotypischen Tumormerkmalen ist in Tabelle 6 dargestellt. Dabei zeigt sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen einer GP2-Positivität und einem ungünstigen pT-Stadium ( $p < 0,0001$ ), einem hohen Gleason-Grad ( $p < 0,0001$ ), einem hohen quantitativen Gleason-Grad ( $p < 0,0001$ ), dem präoperativen serologischen PSA-Level ( $p < 0,0001$ ) und einem positiven Resektionsrand ab der entfernten Prostatektomie ( $p = 0,0589$ ).

Dementsprechend fand sich auch ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Nachweis einer GP2 Immunfärbung und einer ungünstigen Patientenprognose ( $p < 0,0001$ ). Dies zeigte sich sowohl bei Untersuchungen von vier GP2 Färbekategorien (negativ, schwach, mäßig stark, stark) und nach Zusammenfassung der kleinsten Gruppen „mäßig stark“ und „stark“ in die Gruppe „stark“ (Abbildung 30).

Tabelle 6 – GP2 und Tumor Phänotyp

		GP2 IHC Resultate					p Wert
		n evaluiert	negativ (%)	schwach (%)	mäßig stark (%)	stark (%)	
<b>Alle Tumoren</b>		14202	92.1	4.6	2.7	0.6	
<b>pT-Status</b>	pT2	9057	94.2	3.6	1.8	0.4	<0.0001
	pT3a	3145	89.3	6.1	4	0.7	
	pT3b-4	1938	87.2	7	4.9	1	
<b>Gleason-Grad</b>	≤3+3	2710	95.2	3.2	1.1	0.4	<0.0001
	3+4	7494	92.2	4.5	2.8	0.5	
	3+4 Tert.5	672	93.6	4	2.1	0.3	
	4+3	1371	88.7	6.6	3.7	1	
	4+3 Tert.5	998	89.6	6	3.5	0.9	
	≥4+4	819	88.8	6.1	4.5	0.6	
<b>quantitativer Gleason</b>	3+4 ≤5%	1918	94.2	3.1	2.3	0.4	<0.0001
	3+4 6-10%	1857	93.3	4.2	1.8	0.6	
	3+4 11-20%	1620	91.7	5	2.9	0.4	
	3+4 21-30%	844	90.8	5.8	3.1	0.4	
	3+4 31-49%	694	88.9	5.9	4.8	0.4	
	4+3 50-60%	551	93.6	4	2.1	0.3	
	4+3 61-80%	498	88.7	7.1	3.6	0.5	
	4+3 >80%	122	88.8	6	4	1.2	
<b>Lymphknotenmetastasen</b>	N0	8426	92	4.5	2.9	0.5	0.1463
	N+	1073	85.5	8.3	4.9	1.3	
<b>Präoperativer PSA (ng/ml)</b>	<4	1732	92.4	4.6	2.5	0.5	<0.0001
	4-10	8359	92.5	4.7	2.4	0.4	
	11-20	2969	92.2	4.4	2.6	0.7	
	>20	1056	88.9	4.7	4.9	1.4	
<b>Resektionsränder</b>	negative	11298	92.9	4.3	2.4	0.5	0.0589
	positive	2853	89.3	6.1	3.9	0.8	



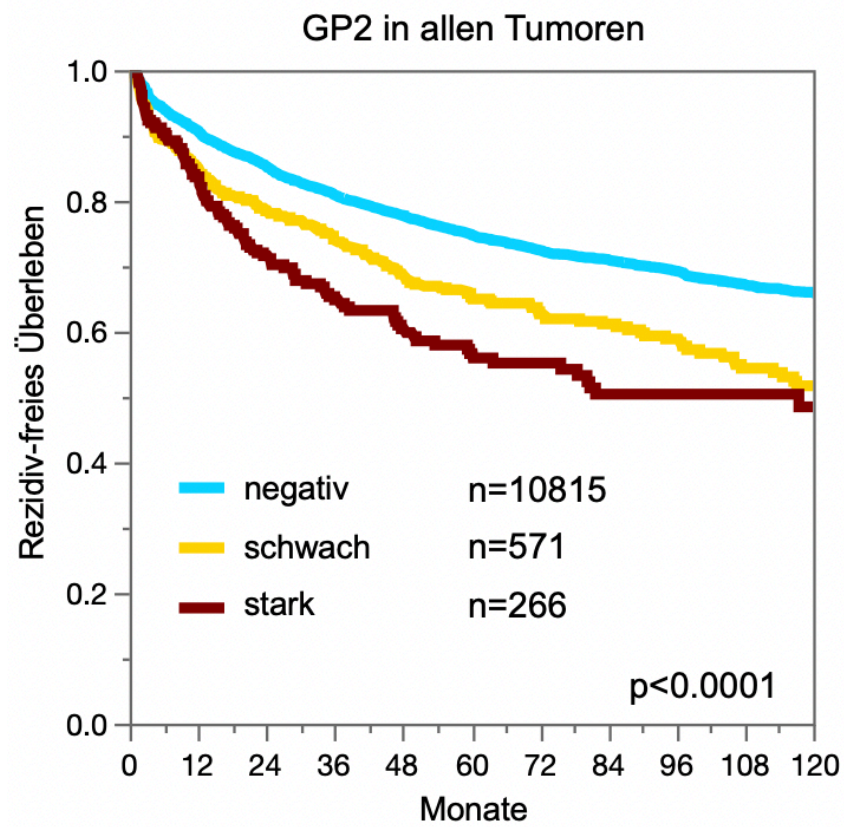


Abbildung 30 – GP2 und PSA Rezidiv (alle Tumoren)

### 3.5 GP2-Expression und ERG-Status

Informationen zum ERG-Status waren in früheren Untersuchungen sowohl mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) ( $n=5.809$ ) als auch immunhistochemisch ( $n=10.933$ ) gesammelt worden (Minner et al., 2011). Der Vergleich von ERG-Status und GP2-Expression ergab eine deutlich größere Wahrscheinlichkeit einer GP2-Positivität und einer starken GP2-Positivität in ERG-positiven bzw. TMPRSS2-ERG fusionierten Tumoren im Vergleich zu Tumoren mit einem normalen ERG-Status. Tumoren mit einem aberranten ERG-Status zeigten eine GP2-Positivität in mindestens 12% der Fälle. Tumoren mit normalem ERG-Status zeigten eine GP2-Positivität in kleiner 4% der Fälle (Abbildung 31, jeweils  $p < 0,0001$ ).

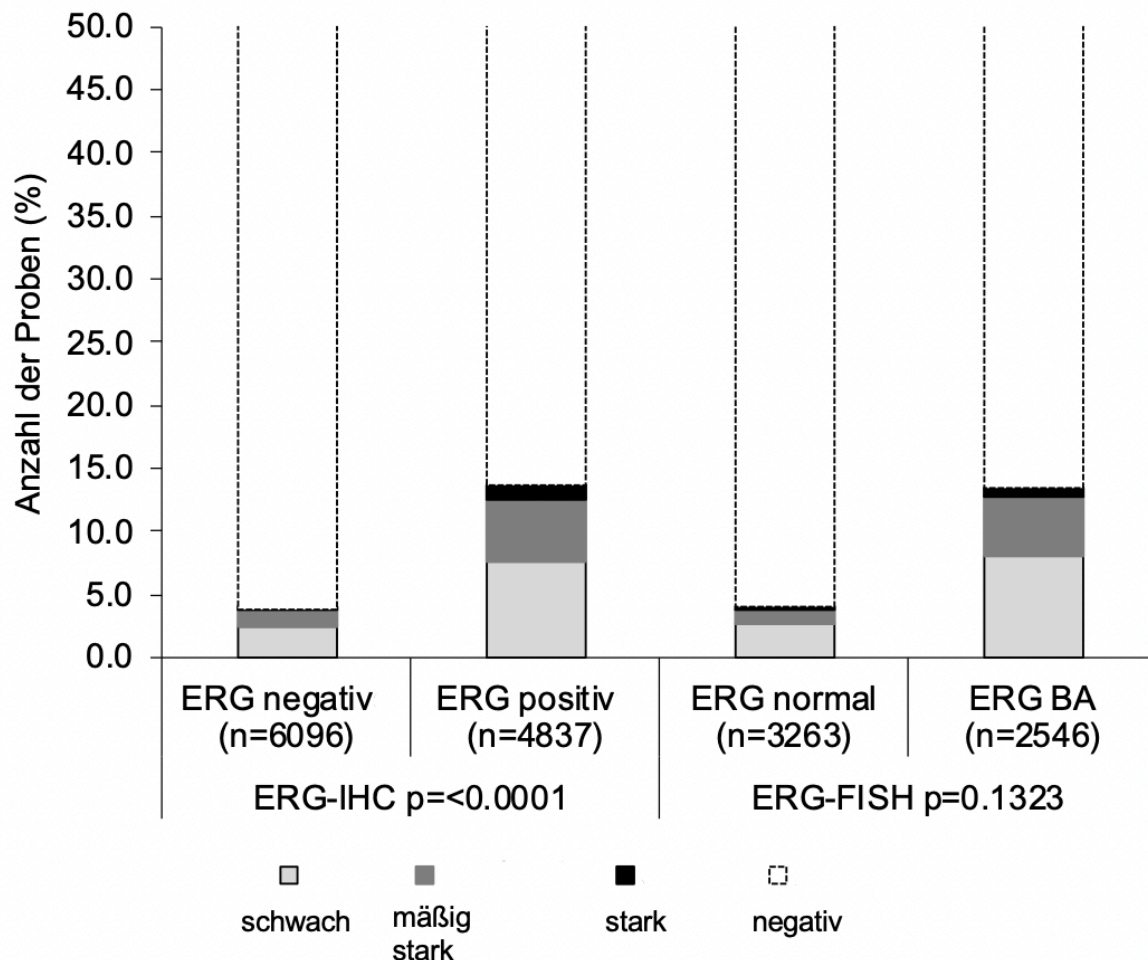


Abbildung 31 – GP2 und TMPRSS2-ERG Genfusion (nachgewiesen mittels IHC und FISH)



### 3.6 GP2-Expression, Phänotyp und Patientenprognose in ERG-positiven und ERG-negativen Tumoren

Angesichts der deutlichen Unterschiede in der GP2-Positivitätsrate zwischen ERG-positiven und ERG-negativen Tumoren wurde die Beziehung zwischen GP2-Expression und Tumormalignitätsparametern bzw. klinischen Verlaufsdaten in den ERG-positiven und ERG-negativen Tumoren noch einmal separat berechnet. Die Beziehung zwischen GP2-Expression und histopathologischen Malignitätsparametern ist in Tabelle 7 dargestellt. Dabei zeigt sich, wie im Gesamtkollektiv eine signifikante Beziehung zwischen GP2-Positivität und pT-Stadium ( $p < 0,0001$ ), Gleason-Grad ( $p < 0,0001$ ), quantitativen Gleason-Grad ( $p < 0,0001$ ), präoperativen PSA ( $p < 0,0001$ ) und dem chirurgischen Resektionsrand ( $p = 0,018$ ). Zudem findet sich sowohl für die klassische Einteilung der GP2 Befunde in vier Kategorien (Abbildung 32) wie auch in drei Kategorien (Abbildung 33) ein signifikanter Zusammenhang zwischen GP2-Positivität und einer ungünstigen Prognose (jeweils  $p < 0,0001$ ).

Tabelle 7 – Phänotyp bei TMPRSS2-ERG-positiven Tumoren

		GP2 IHC Resultate					p Wert
		n evaluiert	negativ (%)	schwach (%)	mäßig stark (%)	stark (%)	
<b>Alle Tumoren</b>		4837	86.3	7.5	5.1	1.1	
<b>pT-Status</b>	pT2	2760	89.5	6.2	3.5	0.9	<0.0001
	pT3a	1304	81.9	9.7	7.1	1.3	
	pT3b-4	749	82.4	9.1	6.9	1.6	
<b>Gleason-Grad</b>	≤3+3	888	91.3	5.6	2.1	0.9	<0.0001
	3+4	2628	86.4	7.2	5.3	1.1	
	3+4 Tert.5	190	89.5	5.3	4.2	1.1	
	4+3	482	78.6	12.4	7.9	1	
	4+3 Tert.5	343	84	8.7	5.2	2	
	≥4+4	242	81.8	9.5	7.4	1.2	
<b>quantitativer Gleason</b>	3+4 ≤5%	625	89.4	5.6	4.2	0.8	<0.0001
	3+4 6-10%	657	88.1	6.5	4	1.4	
	3+4 11-20%	562	86.1	7.8	5.3	0.7	
	3+4 21-30%	312	82.7	9.9	6.4	1	
	3+4 31-49%	242	82.6	8.7	8.3	0.4	
	4+3 50-60%	202	89.5	5.3	4.2	1.1	
	4+3 61-80%	166	79.7	12.9	7.4	0	
	4+3 >80%	29	78.9	10.2	9	1.8	
<b>Lymphknotenmetastasen</b>	N0	2790	85.7	7.5	5.6	1.1	0.0243
	N+	429	80.2	11	6.8	2.1	
<b>Präoperativer PSA (ng/ml)</b>	<4	626	87.1	8.3	4.3	0.3	<0.0001
	4-10	2897	87.2	7.5	4.4	0.9	
	11-20	945	85.6	7.5	5.7	1.2	
	>20	330	79.7	7.3	9.4	3.6	
<b>Resektionsränder</b>	negative	3737	87.1	7.3	4.6	1	0.018
	positive	1077	83.6	8.5	6.3	1.6	

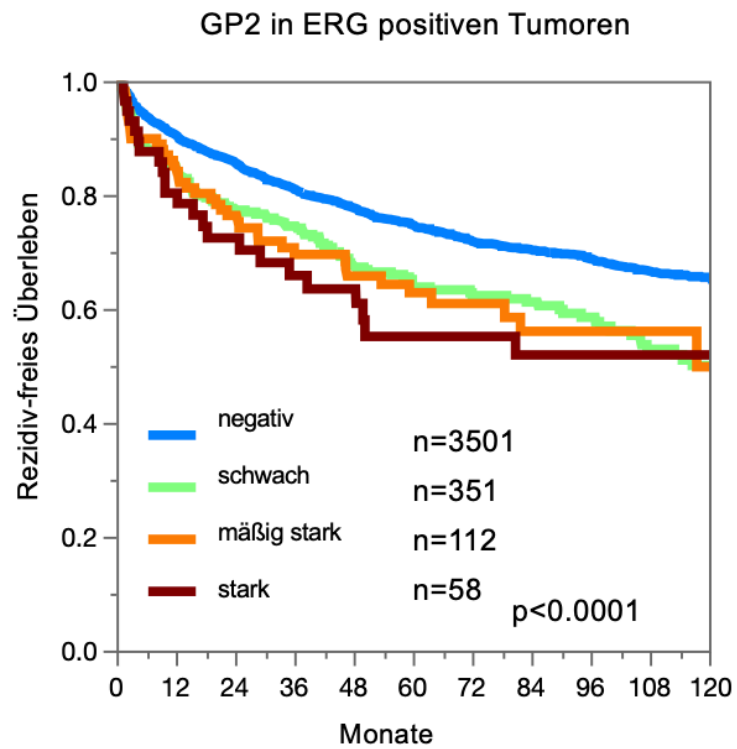


Abbildung 32 – GP2 und PSA Rezidiv in ERG positiven Tumoren (4 Kategorien)

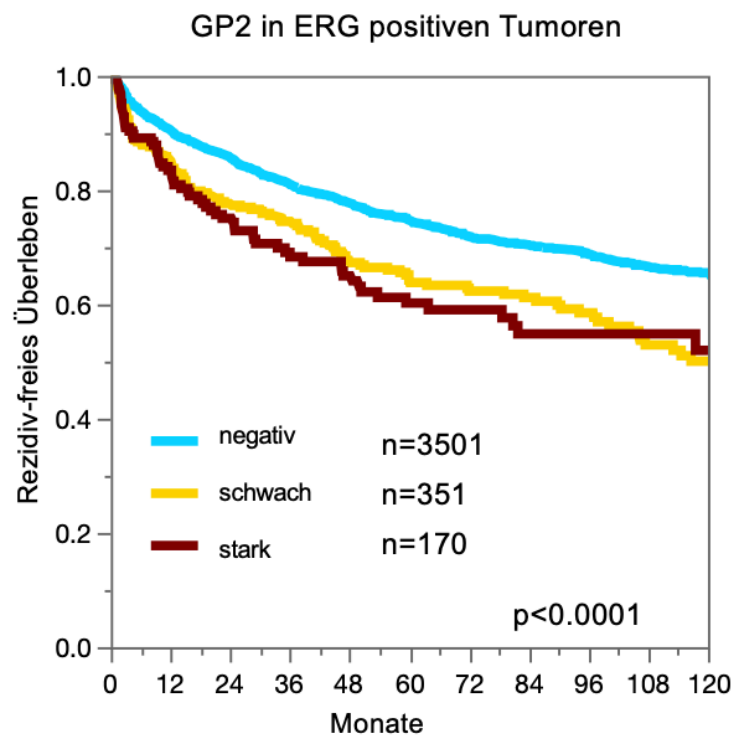


Abbildung 33 – GP2 und PSA Rezidiv in ERG positiven Tumoren (3 Kategorien)

Die Beziehung zwischen GP2 IHC-Befunden und histologischen und klinischen Malignitätsparametern ist für ERG-negative Tumoren in Tabelle 8 gezeigt. Obwohl die Zahl der GP2-positiven Tumoren in dieser Gruppe deutlich geringer war, fand sich ein klarer statistischer Zusammenhang zwischen den wichtigsten histopathologischen Malignitätsparametern pT-Stadium ( $p < 0,0001$ ), Gleason-Grad ( $p < 0,0001$ ), quantitativer Gleason-Grad ( $p < 0,0001$ ) und Lymphknotenmetastasierung ( $p < 0,0001$ ). Der letzte Befund unterscheidet sich deutlich von den ERG-positiven Tumoren, bei denen kein signifikanter Zusammenhang zur Lymphknotenmetastasierung gefunden werden konnte (Tabelle 7). Dementsprechend zeigte sich auch für die Beziehung zwischen GP2-Immunfärbung und der Patientenprognose in der Gruppe der ERG-negativen Tumoren ein noch eindeutigeres Bild als in den ERG-positiven Tumoren. Sowohl bei Einteilung der GP2-Befunde in vier Kategorien ( $p < 0,0001$ , Abbildung 34) als auch in drei Kategorien ( $p < 0,0001$ , Abbildung 35) bestanden hochsignifikante Assoziationen zur Patientenprognose.

*Tabelle 8 – Phänotyp bei TMPRSS2-ERG-negativen Tumoren*

		GP2 IHC Resultate					p Wert
		n evaluiert	negativ (%)	schwach (%)	mäßig stark (%)	stark (%)	
<b>Alle Tumoren</b>		6096	96.1	2.5	1.2	0.2	
<b>pT-Status</b>	pT2	4063	97.2	1.7	0.9	0.2	<0.0001
	pT3a	1216	96.1	2.7	1.2	0.1	
	pT3b-4	791	90.6	5.9	3	0.4	
<b>Gleason-Grad</b>	≤3+3	1084	98	1.4	0.6	0.1	<0.0001
	3+4	3212	96.6	2.1	1.1	0.1	
	3+4 Tert.5	314	95.5	3.2	1.3	0	
	4+3	628	94.9	3.2	1.3	0.6	
	4+3 Tert.5	420	93.3	4.8	1.7	0.2	
	≥4+4	385	91.9	4.7	3.1	0.3	
<b>quantitativer Gleason</b>	3+4 ≤5%	824	97.9	0.8	1	0.2	<0.0001
	3+4 6-10%	795	97.1	2	0.9	0	
	3+4 11-20%	687	96.4	2.5	1	0.1	
	3+4 21-30%	361	97	1.9	1.1	0	
	3+4 31-49%	311	92.9	4.5	2.3	0.3	
	4+3 50-60%	251	95.5	3.2	1.3	0	
	4+3 61-80%	228	95.2	3.2	0.8	0.8	
	4+3 >80%	64	93.9	3.9	1.8	0.4	
<b>Lymphknotenmetastasen</b>	N0	3708	96.2	2.5	1.2	0.2	<0.0001
	N+	427	89.9	6.3	3.5	0.2	
<b>Präoperativer PSA (ng/ml)</b>	<4	629	95.2	2.5	1.7	0.5	0.0879
	4-10	3524	96.5	2.4	0.9	0.1	
	11-20	1404	95.9	2.7	1.1	0.3	
	>20	507	94.9	2.4	2.6	0.2	
<b>Resektionsränder</b>	negative	4852	96.7	2.2	0.9	0.2	0.2175
	positive	1225	93.8	3.8	2.3	0.2	

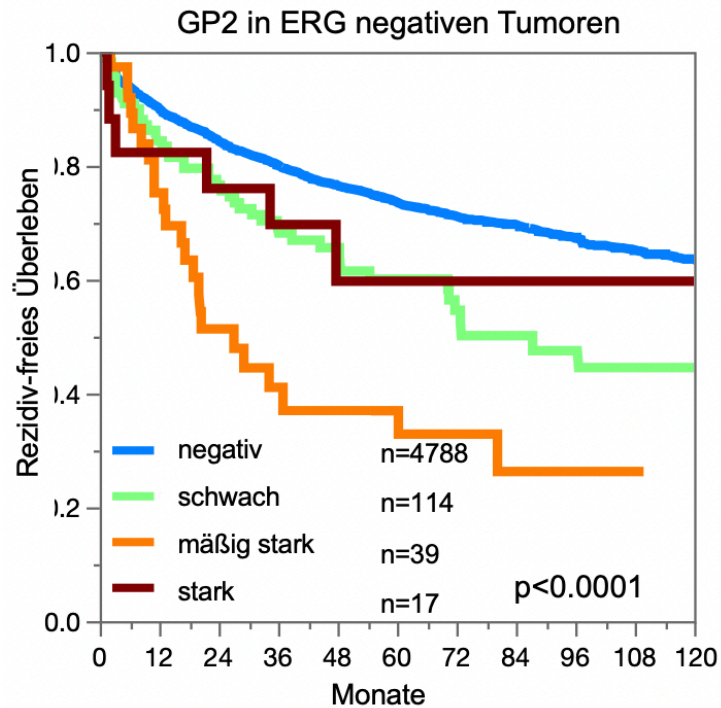


Abbildung 34 – GP2 und PSA Rezidiv in ERG negativen Tumoren (4 Kategorien)

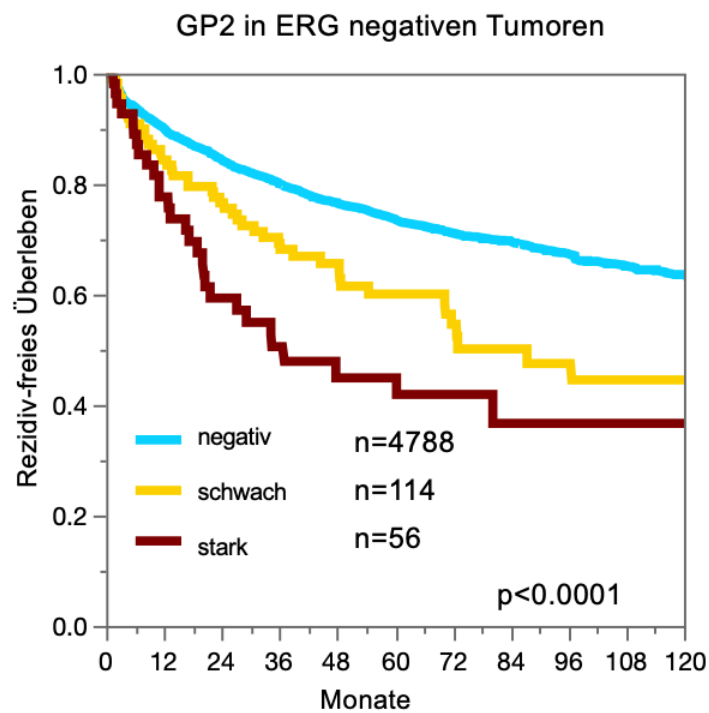


Abbildung 35 – GP2 und PSA Rezidiv in ERG negativen Tumoren (3 Kategorien)

### 3.7 Multivariate Analyse

Die relative Bedeutung einzelner Prognosefaktoren für die Prognose unserer Prostatakarzinompatienten wurde für vier verschiedene Szenarien ermittelt. Die Verwendung verschiedener Szenarien hatte das Ziel, sowohl die prognostische Bedeutung von GP2 bei Untersuchung an Prostatektomiepräparaten als auch an präoperativ verfügbaren Biopsien zu ermitteln. Szenario 1 beinhaltet sämtliche postoperativ zur Verfügung stehenden Prognoseparameter wie präoperatives PSA, pT-Stadium, Gleason-Grad bei der Prostatektomie, pN-Status und R-Status. Diese Parameter umfassen sämtliche prognostische Faktoren, welche nach Prostatektomie im Optimalfall zu Verfügung stehen. Szenario 2 enthält die gleichen Parameter mit Ausnahme des N-Status. Eine Lymphknotendisektion wird in erster Linie bei Tumoren durchgeführt, die im Vorfeld eine erhöhte Risikosituation vorweisen (hohes PSA, hoher Gleason-Grad in der Biopsie). Die Reduktion des Kollektivs auf Patienten mit Daten zum Lymphknotenstatus führt möglicherweise zu einem statistischen Bias zugunsten von Hochrisikopatienten. Die Szenarien 3 und 4 wurden verwendet, um die präoperative Situation zu modellieren. Dies ist allerdings nur eingeschränkt möglich, weil die präoperativ entnommenen Originalbiopsien von dutzenden bzw. hunderten verschiedenen Pathologen/innen nach wahrscheinlich unterschiedlichen Kriterien beurteilt wurden und das Gleason-Grading dementsprechend wahrscheinlich von der Qualität insgesamt „schlechter“ ist als in einem Prostatazentrum von einer kleinen Gruppe speziell ausgebildeten Pathologen/innen erhobenen Befunde. Um dies zu kompensieren, wurde in Szenario 4 anstelle des präoperativen Biopsie Gleason-Grades das Prostatektomie Gleason-Grading verwendet. Allerdings ist davon auszugehen, dass dieses Gleason-Grading wegen der besseren Repräsentativität an der Prostatektomiegewebemenge „besser“ ist, als es an Biopsien zu erwarten gewesen wäre. Eine weitere Limitierung der Szenarien 3 und 4 ist die Untersuchung der GP2-Expression an einem Gewebefragment aus der Prostatektomie und nicht an der originalen Stanze. Die Befunde der multivariaten Analyse sind in Tabelle 9 dargestellt. Die Analyse zeigt, dass der GP2-Expression teilweise eine statistisch unabhängige prognostische Bedeutung zukommt. Dies gilt insbesondere für die präoperativen Szenarien 3 und 4, wobei die prognostische Bedeutung insbesondere bei den ERG-negativen Tumoren und bei der gesamten Kohorte ohne Berücksichtigung des ERG-Status deutlich wird. In der Untergruppe der ERG-positiven Tumoren kam der GP2-Expression keine unabhängige prognostische Bedeutung zu.

Tabelle 9 – Multivariate Analyse (4 Szenarien)

Tumor Teilmengen	Szenario	n analysierbar	P Wert							
			präoperativer PSA	pT Status	cT Status	Gleason-Grad Prostatektomiepräparat	Gleason-Grad Biopsie	pN Status	R Status	GP2- Expression
Alle Tumoren	1	7412	<.0001	<.0001	-	<.0001	-	<.0001	<.0001	0.223
	2	11485	<.0001	<.0001	-	<.0001	-	-	<.0001	0.0953
	3	11303	<.0001	-	<.0001	<.0001	-	-	-	<b>0.0023</b>
	4	9476	<.0001	-	<.0001	-	<.0001	-	-	<b>&lt;.0001</b>
ERG-negative Tumoren	1	3191	<.0001	<.0001	-	<.0001	-	<.0001	<.0001	<b>0.0092</b>
	2	4886	<.0001	<.0001	-	<.0001	-	-	0.0033	<b>0.0066</b>
	3	4819	<.0001	-	<.0001	<.0001	-	-	-	<b>0.0005</b>
	4	4015	<.0001	-	<.0001	-	<.0001	-	-	<b>&lt;.0001</b>
ERG-positive Tumoren	1	2546	<.0001	<.0001	-	<.0001	-	<.0001	0.0003	0.4943
	2	3950	<.0001	<.0001	-	<.0001	-	-	<.0001	0.3447
	3	3873	<.0001	-	<.0001	<.0001	-	-	-	0.2817
	4	3299	<.0001	-	<.0001	-	<.0001	-	-	0.0516

### 3.8 GP2-Expression vs. Deletionsstatus

Die Beziehung der GP2-Expression zu elf an dem Kollektiv früher untersuchten chromosomalen Deletionen ist in den Abbildung 36 bis 38 dargestellt. Dabei fanden sich im Gesamtkollektiv signifikante Beziehung zwischen der GP2-Expression und den Deletionsstatus für acht der elf untersuchten Loci (Abbildung 36). Bei separater Betrachtung der ERG-positiven Tumoren reduzierte sich die Zahl der Loci mit signifikanter Beziehung zum GP2-Status auf fünf von elf (Abbildung 37). Bei isolierter Betrachtung der ERG-negativen Tumoren reduzierte sich die Zahl ebenfalls auf fünf von elf Deletionen (Abbildung 38). Signifikant mit einer erhöhten GP2-Expression assoziiert waren dabei sowohl in den ERG-positiven wie auch in den ERG-negativen Tumoren Deletionen von 8p21 ( $p < 0,0001$ ), 10q23 (PTEN) ( $p < 0,0001$ ), 12p13 ( $p < 0,0001$ ) und 17p13 ( $p = 0,0076$ ).



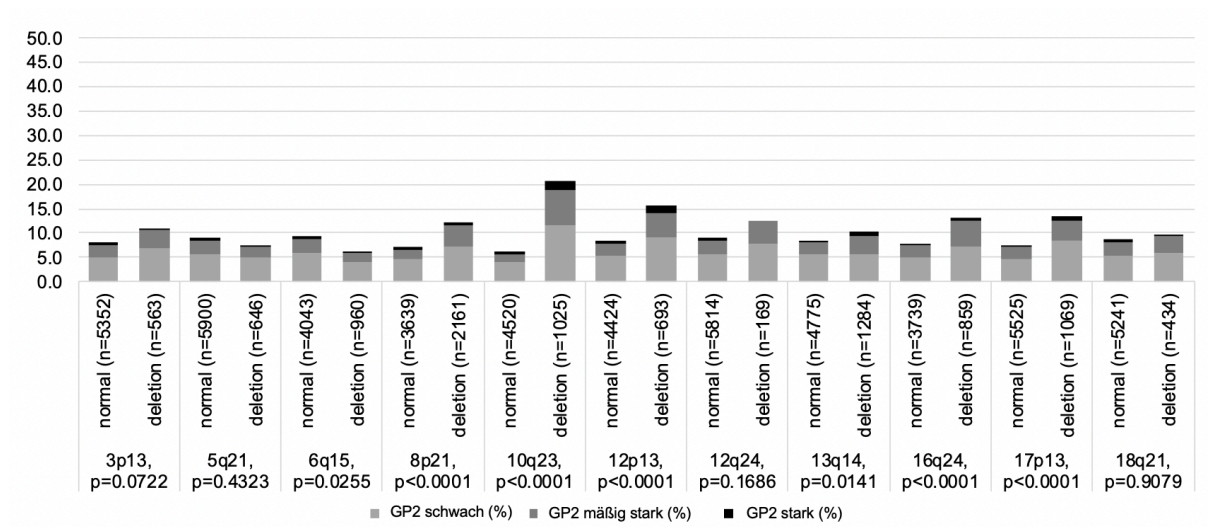


Abbildung 36 – GP2-Expression und Deletionen

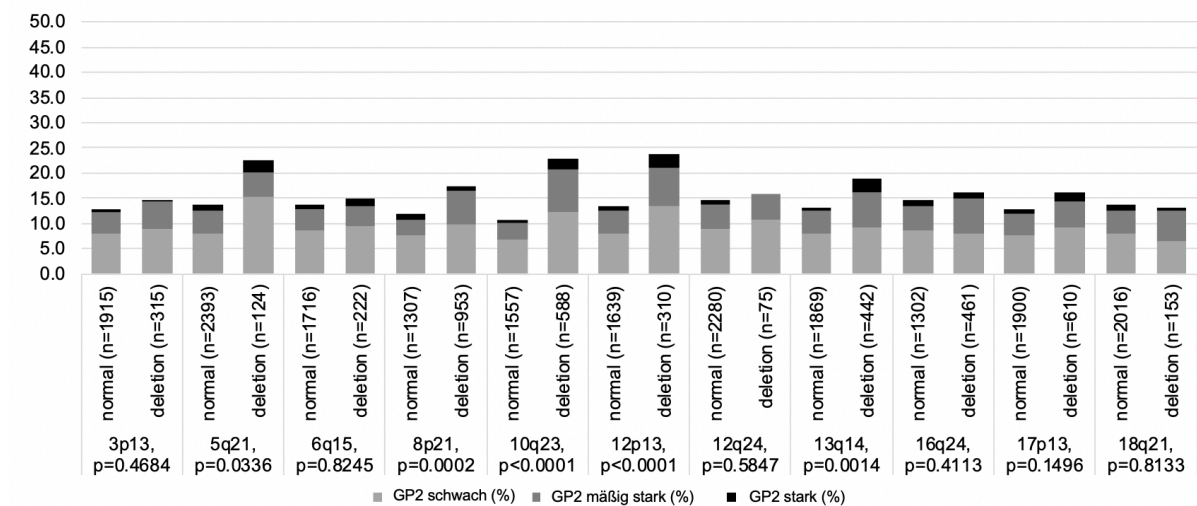


Abbildung 37 – GP2-Expression und Deletionen (ERG positive Tumoren)



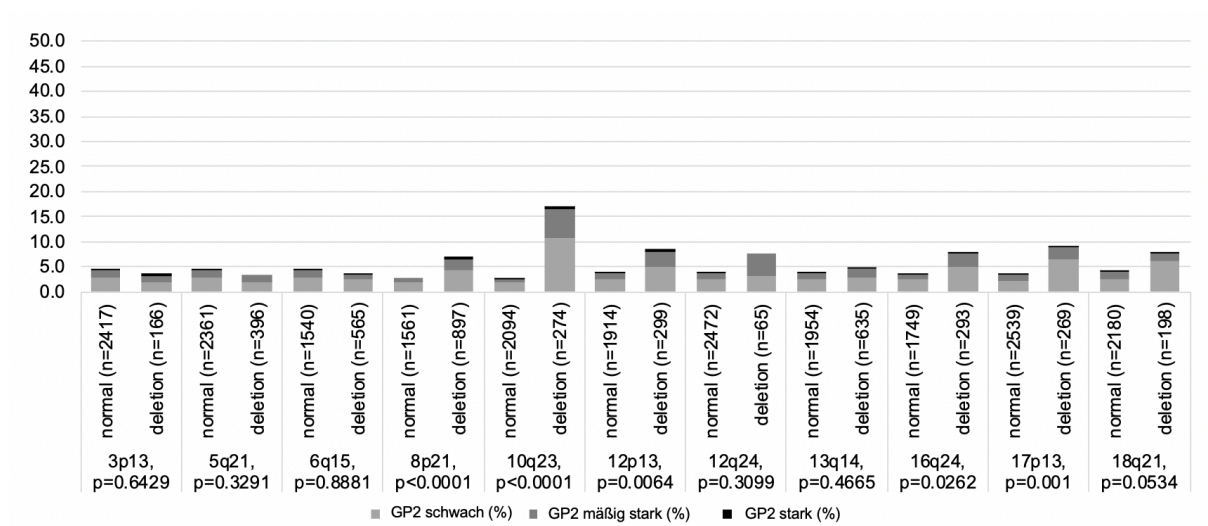
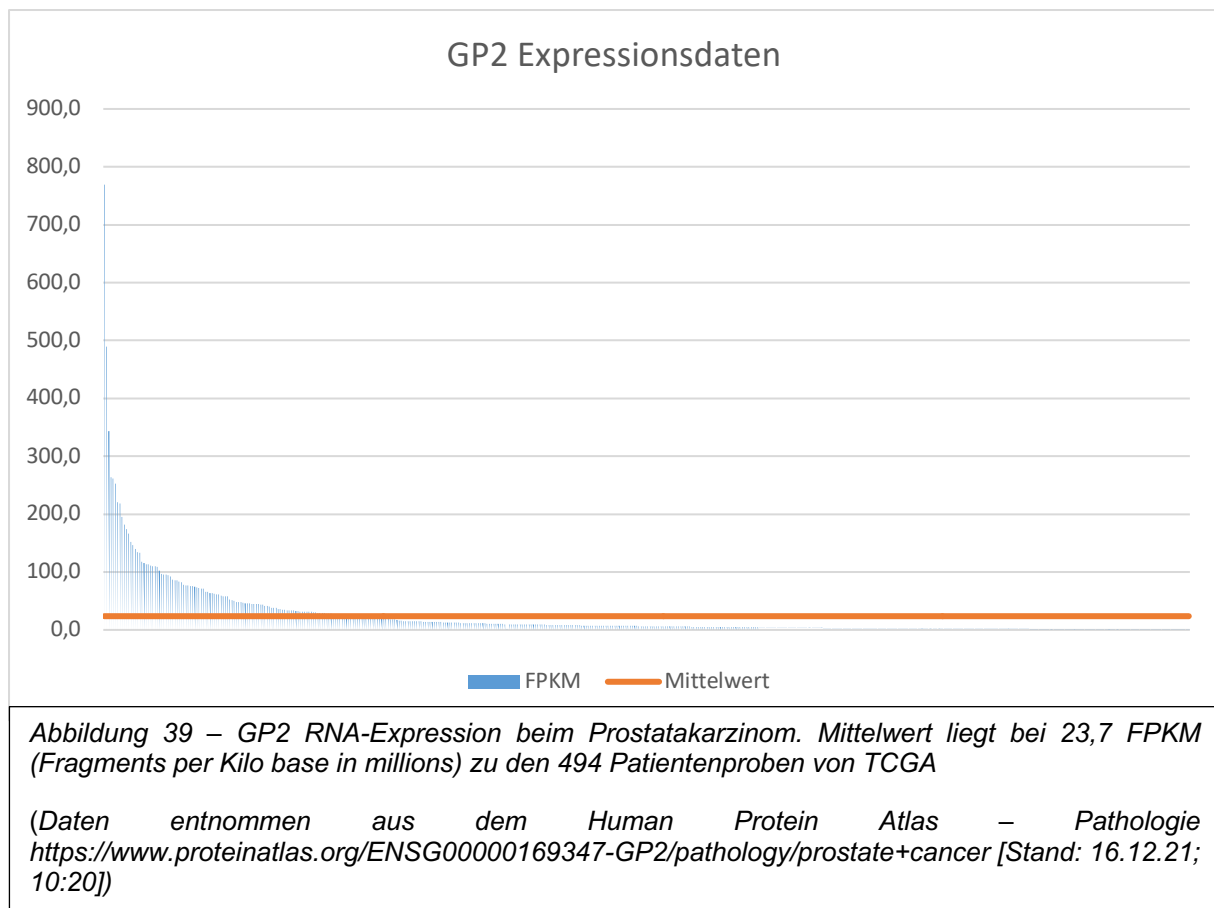


Abbildung 38 – GP2-Expression und Deletionen (ERG negative Tumoren)

## 4. Diskussion

Die erfolgreiche Untersuchung von mehr als 14.000 Adenokarzinomen der Prostata ergab eine GP2-Positivität in 837 von 11.652 Tumoren (7,2%). Da unsere Studie die erste immunhistochemische Analyse von GP2 bei Prostatakarzinomen darstellt, kann dieser Befund nicht mit Daten früherer Analysen verglichen werden. Unsere Ergebnisse passen aber zu publizierten RNA-Expressionsdaten. In der Datenbank von TCGA (The Cancer Genom Atlas) bzw. ICGC (Internation Cancer Genom Consortium) war die Expression von GP2 bei insgesamt 494 Adenokarzinomen der Prostata auf der RNA-Ebene untersucht worden. Von diesen Tumoren wiesen mindestens 6 % eine nachweisbare RNA-Expression auf. Die Expressionsdaten dieser Tumoren sind in Abbildung 39 sortiert nach dem Expressionsniveau dargestellt.

Die große Zahl, der in unserer Studie untersuchten Tumoren, erlaubte trotz der relativen Seltenheit der GP2-Expression, eine Analyse der prognostischen Bedeutung der GP2-Proteinexpression. Als mögliche Ursache für die ungünstige prognostische Bedeutung einer GP2-Expression könnte ein Zusammenhang zwischen GP2-Expression und einer muzinösen Differenzierung (Schleimbildung) im Tumor in Frage kommen. Ein solcher Zusammenhang war bei der Auswertung der Proben tatsächlich vermutet worden. Eine muzinöse Differenzierung ist beim Grading der Prostatakarzinome ein Phänomen, welches einem Gleason-Muster 4 zugeordnet wird. Ein Gleason-Muster 4 ist bei Prostatakarzinomen ein Anzeichen für eine ungünstige Patientenprognose (Sauter et al., 2016). Obwohl die genaue Funktion von GP2 weiterhin ungeklärt ist, wäre eine Beziehung der GP2-Expression zur muzinösen Differenzierung beim Prostatakarzinom denkbar, da GP2 im Pankreas ein Hauptbestandteil der Sekretionsgranula ist (Fritz et al., 2002). Diese Sekretionsgranula beinhalten neben der Hauptkomponente GP2 auch Verdauungsenzyme. Sie werden per Exozytose aus den Azinuszellen des Pankreas abgegeben und legen sich als Muzin per GPI-Anker an das Schleimhautepithel des Gastrointestinaltraktes (Scheele et al., 1994, Kobayashi et al., 2004).



Das Vorliegen einer molekularen Datenbank zu den in diesem Projekt untersuchten Tumoren ist eine wesentliche Stärke des Hamburger Prostatakarzinomkollektivs. In früheren Studien waren zu den Tumoren unserer Patienten bereits Dutzende andere molekulare Parameter untersucht worden (Minner et al., 2012, Grupp et al., 2013, Grupp et al., 2014, Kluth et al., 2015, Burdelski et al., 2016a, Burdelski et al., 2017, Kluth et al., 2018, Weidemann et al., 2019, Freytag et al., 2020, Marx et al., 2021). Diese Parameter können bei Bedarf und Interesse mit neu untersuchten Markern verglichen werden. Für das vorliegende Projekt wurden der ERG-Status und elf verschiedene chromosomale Deletionen (3p13, 5q21, 6q15, 8p21, 10q23, 12p13, 12q24, 13q14, 16q24, 17p13 und 18q21) für vergleichende Untersuchungen ausgewählt. Der ERG-Status ist beim Prostatakarzinom von besonderem Interesse, weil eine aberrante Expression von ERG die häufigste molekulare Alteration bei Prostatakarzinomen darstellt (Hessels et al., 2007, Park et al., 2010, Furusato et al., 2010, Rosen et al., 2012). Normalerweise ist ERG als Transkriptionsfaktor nur im Embryonalstadium aktiv und bei Erwachsenen inaktiv (Wasylyk et al., 1993, Nikolova-Krstevski et al., 2009). Bedingt durch eine kleine Deletion auf einem Chromosom kommt es in ca. 50% der Prostatakarzinome zu einer Fusion der Gene TMPRSS2 und ERG. Durch diese Fusion kommt der Transkriptionsfaktor ERG in den Einflussbereich von TMPRSS2 (Perner et al., 2006, Tomlins et al., 2008, Carver

et al., 2009). Dadurch kommt es zur dauerhaften Aktivierung des Transkriptionsfaktors ERG im Prostataepithel. In den von dieser Fusion betroffenen Zellen kommt es zu einer permanenten Expression von ERG. Diese aberrante ERG-Expression führt in den betroffenen Tumorzellen zu einer veränderten Expression von mehr als 1.500 verschiedenen Genen (Demichelis and Rubin, 2007, Pettersson et al., 2012). Eine TMPRSS2-ERG Fusion lässt sich entweder mit der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung oder immunhistochemisch nachweisen. Bei der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung wird mit einer sogenannten Breakapart-Probe das Zusammenrücken der Gene ERG und TMPRSS2 nachgewiesen (Abbildung 40) (Qi et al., 2014). Immunhistochemisch kann der Nachweis der Proteinexpression dargestellt werden (Abbildung 41). Dass in unserer Studie eine GP2-Expression sowohl mit dem Nachweis einer ERG-Fusion als auch mit der ERG-Überexpression eng korreliert, belegt einen biologischen Zusammenhang zwischen den Parametern ERG und TMPRSS2 mit zwei unabhängigen Methoden. GP2 gehört nicht zu den Genen, deren Expression direkt durch den Transkriptionsfaktor ERG reguliert werden (Yin et al., 1994), sodass angenommen werden muss, dass diese Interaktion indirekt durch ein anderes ERG reguliertes Gen bedingt sein muss.

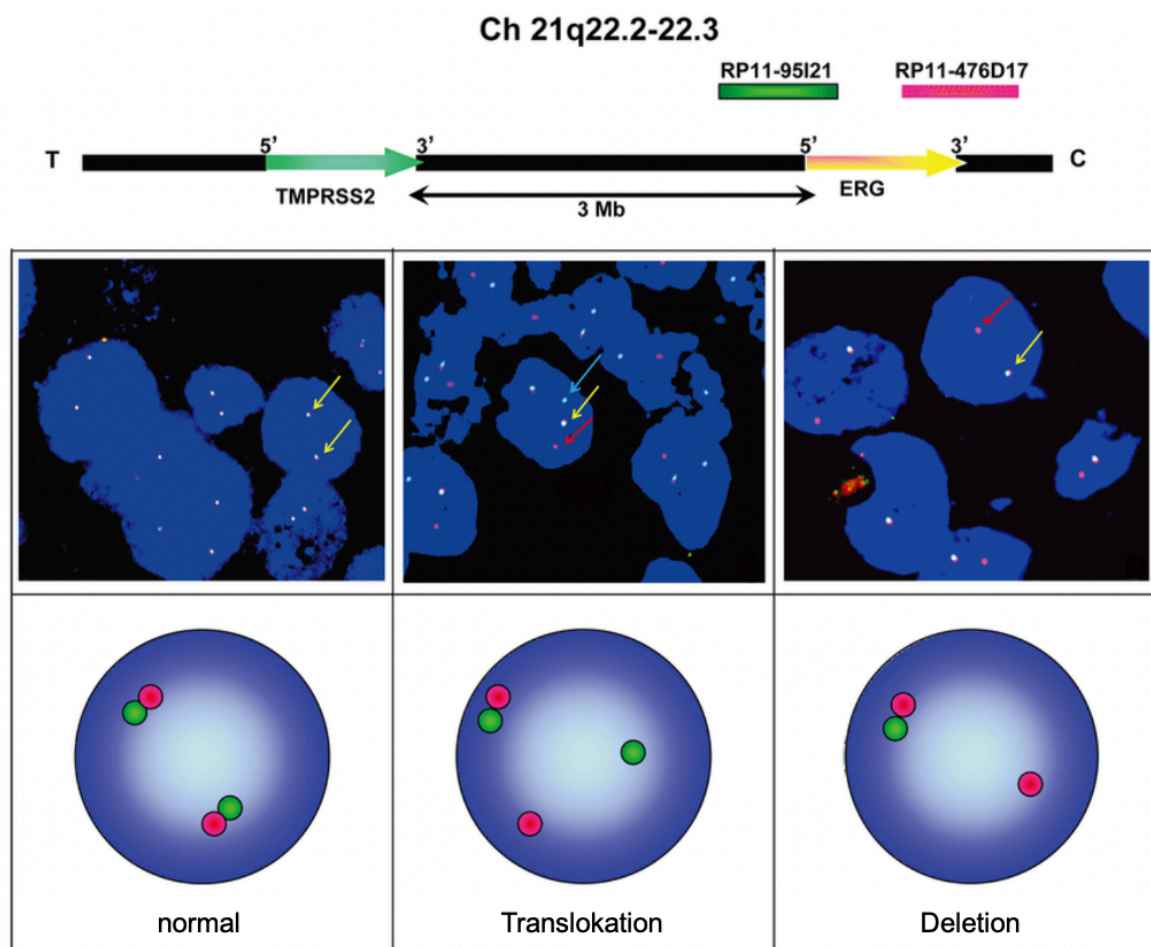
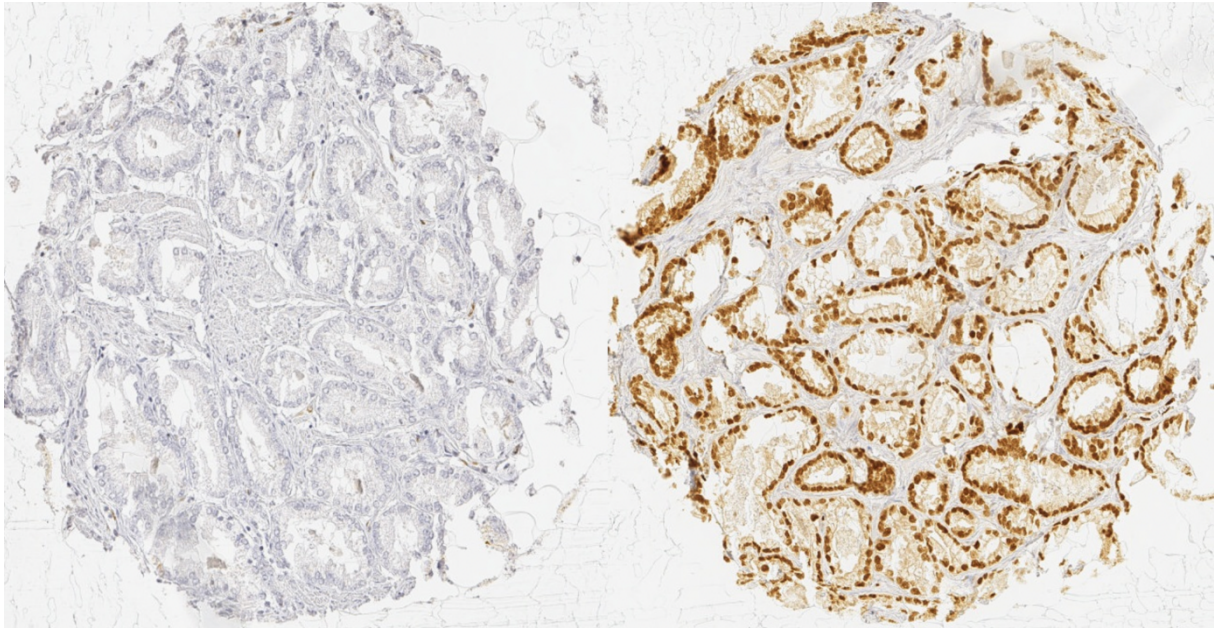


Abbildung 40 – FISH Breakapart-Probe zum Nachweis der ERG und TMPRSS2 Gene auf Chromosom 21 (Qi et al., 2014)





*Abbildung 41 – IHC Nachweis einer negativen und positiven ERG-Färbung eines Prostatakarzinoms (Mähl, 2020)*

TMPRSS2-ERG Genfusionen kommen insbesondere bei jüngeren Patienten vor (Steurer et al., 2014). Dieser Umstand ist möglicherweise dadurch bedingt, dass höhere Testosteronserumwerte und ein dementsprechend höherer Aktivierungszustand des TMPRSS2-Gens vermehrt zu der Entstehung von Chromosomenbrüchen im Bereich des TMPRSS2-Gens führen (Mani et al., 2009). Die TMPRSS2 Fusion wurde als möglicherweise initiales Ereignis in Prostatakarzinomen diskutiert (Perner et al., 2006, Clark and Cooper, 2009). Allerdings spricht die immer wieder anzutreffende Heterogenität des ERG-Status innerhalb von Tumoren dafür, dass eine TMPRSS2-ERG Fusion auch im späteren Verlauf der Tumorprogression auftreten kann (Minner et al., 2013). Initial hatten verschiedene Studien auf eine mögliche prognostische Bedeutung des ERG-Status hingewiesen (Yoshimoto et al., 2008, Reid et al., 2010). Eine Untersuchung am UKE Tumorkollektiv hat später aber gezeigt, dass sich die Prognose von ERG-positiven und ERG-negativen Prostatakarzinomen nicht unterscheidet (Minner et al., 2011). Allerdings haben andere Tumormarkerstudien der UKE-Forschungsgruppe gezeigt, dass die prognostische Bedeutung anderer Marker sich zwischen ERG-positiven und ERG-negativen Tumoren unterscheiden kann. So fand sich für die Marker Claudin-1 und AZGP1 eine prognostische Relevanz in ERG-positiven aber nicht in ERG-negativen Karzinomen (Burdelski et al., 2016b, Kind et al., 2019). Für die Marker KLK2, CHK2, P16, FOXA1 und BCAR1 fand sich eine prognostische Bedeutung, welche entweder nur in ERG-negativen oder stark bevorzugt in ERG-negativen Karzinomen auftrat (Burdelski et al.,

2016a, Tsourlakis et al., 2017, Heumann et al., 2018, Eichenauer et al., 2020, Bonk et al., 2020). Die aufgrund dieser Daten durchgeführte separate Untersuchung der prognostischen Bedeutung bzw. Assoziationen mit klinisch pathologischen Malignitätsparametern in ERG-positiven und ERG-negativen Tumoren hatte für GP2 eine prognostische Bedeutung in beiden Gruppen ergeben, wobei diese aber in ERG-negativen Tumoren stärker ausgeprägt war als in ERG-positiven Tumoren. Dieser Umstand ist angesichts der deutlich geringeren Positivitätsrate in ERG-negativen Tumoren erstaunlich. Da die Expression von ERG zu einer direkten oder indirekten Veränderung des Expressionslevels von ca. 1.600 Genen führt, unterscheidet sich das zelluläre Mikromilieu zwischen ERG-positiven und ERG-negativen Prostatakarzinomzellen offensichtlich signifikant (Tomlins et al., 2005b, Brase et al., 2011, Barbieri et al., 2012, Weischenfeldt et al., 2013). Es muss davon ausgegangen werden, dass die Summe der Veränderung in ERG-positiven Tumoren dazu führt, dass die GP2 assoziierte gesteigerte Tumoraggressivität in einem ERG-positiven Mikromilieu mitligiert wird. Die genauen molekularen Mechanismen hierfür bleiben unklar.

Ein Vergleich des GP2-Status mit dem Vorliegen von chromosomalen Deletionen erfolgte deswegen, weil Deletionen nach der TMPRSS2-ERG Fusion die häufigsten molekularen Veränderungen in Prostatakarzinomen darstellen (Kissick et al., 2015, Wang et al., 2017). Im Gegensatz zu den meisten anderen häufigen Tumorarten gibt es bei Prostatakarzinomen kein einziges Gen, welches bei mehr als 10% der Patienten mutiert ist (Tomlins et al., 2005a). Da die meisten Deletionen nicht von rekurrenten Mutationen von Genen im verbleibenden Allel begleitet werden, wird heute allgemein davon ausgegangen, dass die Deletionen ihren pathogenen Effekt beim Prostatakarzinom nicht durch die vollständige Inaktivierung eines bereits durch einen anderen Mechanismus auf dem anderen Allel inaktivierten Gens ausüben. Viel mehr wird heute angenommen, dass der wesentliche Effekt chromosomaler Deletionen beim Prostatakarzinom in einer sogenannten haploiden Insuffizienz von typischerweise mehreren auf einem chromosomalen Locus gelegenen Genen bedingt ist (Dong, 2001, Kwabi-Addo et al., 2001, Freedman et al., 2005). Dabei wird angenommen, dass die Reduktion der Gendosis von zwei auf eine Kopie bereits die Tumorentstehung bzw. die Progression begünstigt und dass dieser Effekt insbesondere dann auftritt, wenn mehrere Gene gleichzeitig in ihrer Aktivität eingeschränkt sind (Hyytinen et al., 1999, Annala et al., 2017). Die für die Biologie des Prostatakarzinoms relevanten Gene sind für die meisten häufig deletierten Regionen nicht eindeutig bekannt. Zwar gibt es auf den Chromosomen 8, 10, 12, 13, 16 und 17 jeweils Gene, deren reduzierte Funktion mit gesteigerten Zellwachstum und/oder Metastasierung in Zusammenhang gebracht worden sind, doch ist die relative Bedeutung der in die häufigen Deletionen eingeschlossenen potenziellen Tumorsuppressorgene nach wie vor unklar (Dong, 2001). Eine Assoziation eines molekularen Markers (z. B. GP2) mit spezifischen

chromosomalen Deletionen könnte auf eine funktionelle Interaktion zwischen dem untersuchten Gen und einem unbekannten Gen im entsprechenden deletierten Bereich hindeuten. Eine Assoziation eines molekularen Markers mit allen oder fast allen chromosomalen Deletionen würde indessen mehr auf eine Rolle des untersuchten Gens bei einem Mechanismus der genetischen Instabilität oder dem Versuch die Folgen von Chromosomenbrüche zu reparieren hindeuten (Sieber et al., 2003, Fan et al., 2004, Venkatesan et al., 2015).

Bei der Betrachtung von Deletionen beim Prostatakarzinom muss beachtet werden, dass viele Deletionen eng mit dem ERG-Status assoziiert sind. Gehäuft bei ERG-positiven Karzinomen finden sich Deletionen von 3p13 (FOXP1), 8p21 (LPL), 10q23 (PTEN) und 16q24 und bei ERG-negativen Tumoren vor allem Deletionen von 5q21 (CHD1), 6q15 (MAP3K7), 13q14 (FNOX1) und 18q21 (Krohn et al., 2012, Krohn et al., 2013, Burkhardt et al., 2013, Kluth et al., 2013, Kluth et al., 2016, Kluth et al., 2017b, Kluth et al., 2017a, Kluth et al., 2018). Tatsächlich sind nur wenige Deletionen beim Prostatakarzinom vom ERG-Status unabhängig (12p13 (CDKN1B), 12q24 und 17p13 (Weischenfeldt et al., 2013, Kluth et al., 2014, Kluth et al., 2015). Da auch die GP2-Expression mit dem ERG-Status assoziiert ist, ist es somit nicht erstaunlich, dass viele Deletionen bei gleichzeitiger Betrachtung aller Tumoren mit der Expression von GP2 in einem statistischen Zusammenhang stehen. Um echte funktionelle Interaktionen zu identifizieren, musste somit eine separate Analyse ERG-negativer und ERG-positiver Tumoren erfolgen. Die besonders enge Beziehung zwischen der Expression von GP2 und Deletionen von PTEN (10q23) und 8p21 ( $p < 0,0001$ ) in den Untergruppen der ERG-negativen und ERG-positiven Tumoren bzw. 12p13 (0,233 in ERG-negativen,  $p < 0,0001$  in ERG-positiven Tumoren) wäre somit mit einer funktionellen Interaktion von GP2 mit Genen dieser Region vereinbar. Im Falle der Deletion 10q23, welche typischerweise sehr klein ist und v.a. das Tumorsuppressorgen PTEN beinhaltet, wäre ein wesentlicher Interaktionskandidat gefunden. Allerdings gibt es bisher keine Berichte über eine mögliche Interaktion von PTEN bzw. des PI3K-AKT/PKB-Signalweges und der Expression von GP2. Weitere Untersuchungen wären hier notwendig, um die für die Assoziationen mit GP2 verantwortlichen Gene auf 8p21 oder 12p13 zu identifizieren.

Unabhängig von den zugrunde liegenden Mechanismen deutet die von den etablierten prä- und postoperativ zur Verfügung stehenden Prognosemarkern unabhängige prognostische Bedeutung der GP2-Expression in ERG-negativen Tumoren, wie auch die unabhängige Prognoserelevanz in präoperativen Szenarien bei gleichzeitiger Betrachtung aller Tumoren, auf eine praktische Nützlichkeit der GP2-Expression zur Prognosevoraussage bei Prostatakarzinomen hin. Bei der Interpretation von multivariaten Analysen zur Prognosevoraussage beim Prostatakarzinomen ist allerdings zu beachten, dass die etablierten



Prognoseparameter zwar statistisch einen großen Einfluss auf die Prognose ausüben, im Einzelfall aber nur ungenau zu bestimmen sind. Sowohl das pT- als auch das pN-Stadium kann nur nach Aufarbeitung eines Operationspräparates bestimmt werden, so dass diese Parameter bei der Entscheidung, ob eine Therapie nötig ist oder nicht, nicht herangezogen werden können. Zudem hängt der Nachweis von Lymphknotenmetastasen davon ab, wie viele Lymphknoten chirurgisch entfernt wurden und wie genau die entfernten Lymphknoten vom Pathologen/in untersucht werden (Wilczak et al., 2018). Der Gleason-Grad kann zwar präoperativ an Biopsien bestimmt werden, doch besteht bei der Festlegung des Gleason-Scores eine Interobserverschwankung von ca. 40%, für den Fall, dass verschiedene Pathologen/innen die gleiche Biopsie beurteilen sollen (Glaessgen et al., 2002, Lutz, 2016). Aus diesen Gründen sind nicht nur statistisch unabhängige molekulare Prognoseparameter, sondern vor allem besser reproduzierbare und damit zuverlässigere Parameter gesucht.

Zusammengefasst zeigen die Daten dieser Untersuchung, dass GP2 bei ca. 7,2% der Prostatakarzinome vermehrt exprimiert wird und dass diese Expression insbesondere bei ERG-negativen Tumoren mit einer ungünstigen Prognose assoziiert ist. Aufgrund der statistischen Unabhängigkeit der prognostischen Aussage von GP2, sowohl von präoperativ wie auch postoperativ verfügbaren etablierten klinisch pathologischen Prognosemarkern wäre es denkbar, dass die Untersuchung der GP2-Expression beim Prostatakarzinom diagnostisch genutzt werden kann. Insbesondere wäre es möglich, dass die GP2 Analyse in Kombination mit anderen Prognosemarkern eine relevante Ergänzung zu den bisher routinemäßig untersuchten klinischen und histologischen Prognoseparametern darstellen könnte.

## 5. Zusammenfassung

GP2 ist ein mit der Sekretion von Muzinen im Zusammenhang stehendes Protein, welches bei Prostatakarzinomen gelegentlich exprimiert gefunden wird. Zur Klärung der möglichen prognostischen Bedeutung der GP2-Expression beim Prostatakarzinom wurde ein Tissue Microarray bestehend aus 17.747 Prostatakarzinomen immunhistochemisch auf die Expression von GP2 untersucht. Eine GP2-Expression fand sich bei 1.059 (7,2%) von 14.611 auswertbaren Tumoren. Die GP2-Expression war in 4,9% schwach, in 1,5% mäßig stark und in 0,8% stark ausgeprägt. Die Expression von GP2 war signifikant assoziiert mit einem positiven ERG-Status ( $p < 0,0001$ ), einem fortgeschrittenen pT-Stadium ( $p < 0,0001$ ), Lymphknotenmetastasen ( $p < 0,0001$ ), einem hohen Gleason-Score ( $p < 0,0001$ ) und einer erhöhten Wahrscheinlichkeit eines PSA-Rezidives ( $p < 0,0001$ ). Eine separate Untersuchung von ERG-positiven und ERG-negativen Karzinomen ergab für beide Gruppen eine signifikante Beziehung zwischen der GP2-Expression und pT-Stadium, hohem Gleason-Score und ungünstiger Patientenprognose, doch waren diese Beziehungen bei ERG-negativen Tumoren etwas stärker ausgeprägt als bei ERG-positiven Tumoren. In der multivariaten Analyse war die GP2-Expression ( $p = 0,0092$ ) in ERG-negativen Tumoren unabhängig von allen prä- oder postoperativ verfügbaren etablierten Prognoseparametern (pT, pN, R-Status, Gleason-Grad). Der Vergleich des GP2-Status mit elf verschiedenen chromosomalen Deletionen ergab eine vermehrte GP2-Expression insbesondere in Tumoren mit 8p21 oder PTEN Deletionen, wobei diese Unterschiede sowohl in ERG-positiven als auch ERG-negativen Tumoren ähnlich deutlich waren ( $p < 0,0001$ ). Zusammengefasst zeigen die Daten unserer Studie, dass eine nachweisbare GP2-Expression in ca. 7,2% der Prostatakarzinome auftritt und mit einer ungünstigen Prognose assoziiert ist. Angesichts der statistischen Unabhängigkeit der Prognoserelevanz von GP2, insbesondere in ERG-negativen Tumoren und im Vergleich zu präoperativ verfügbaren anderen Prognosemarkern erscheint es möglich, dass die GP2-Expressionsanalyse in die Routinediagnostik einfließen könnte, entweder als isolierter Parameter oder als Teil eines prognostisch relevanten Cocktails bestehend aus mehreren Antikörpern.

## 6. Abstract

GP2 is a mucin secretion-related protein that is occasionally found expressed in prostate carcinomas. To clarify the possible prognostic significance of GP2 expression in prostate carcinoma, a tissue microarray consisting of 17.747 prostate carcinomas was examined for GP2 expression by immunohistochemistry. GP2 expression was found in 1.059 (7,2%) of 14.611 evaluable tumors. GP2 expression was weak in 4,9%, moderately strong in 1,5%, and strong in 0,8%. GP2 expression was significantly associated with positive ERG status ( $p < 0,0001$ ), advanced pT stage ( $p < 0,0001$ ), lymph node metastases ( $p < 0,0001$ ), high Gleason score ( $p < 0,0001$ ) and likelihood of PSA recurrence ( $p < 0,0001$ ). Separate examination of ERG-positive and ERG-negative carcinomas revealed a significant relationship between GP2 expression and pT stage, high Gleason score, and unfavorable patient prognosis for both groups, but these relationships were somewhat stronger ( $p = 0,0092$ ) in ERG-negative tumors than in ERG-positive tumors. In multivariate analysis, GP2 expression in ERG-negative tumors was independent of all established prognostic parameters (pT, pN, R status, Gleason grade) available pre- or postoperatively. Comparison of GP2 status with eleven different chromosomal deletions revealed increased GP2 expression particularly in tumors with 8p21 or PTEN deletions, and these differences were similarly significant in both ERG-positive and ERG-negative tumors ( $p < 0,0001$ ). In summary, the data from our study show that detectable GP2 expression occurs in approximately 7,2% of prostate cancers and is associated with an unfavorable prognosis. Given the statistical independence of the prognostic relevance of GP2, particularly in ERG-negative tumors and in comparison to preoperative available parameters, it seems possible that GP2 expression analysis could be incorporated, either as an isolated parameter or as part of a prognostically relevant cocktail consisting of multiple antibodies.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
aa	Aminosäuren
AKT	Serin/Threonin-Kinase
APA	Alkalische Phosphatase
APC	Antigenpräsentierende Zelle
AZGP1	Zink-Alpha2-Glykoprotein
BA	Breakage
BCAR1	Breast cancer anti-estrogen resistance protein 1
BCL2	B-Cell Lymphoma 2 = Regulatorprotein für die Apoptose
BPH	Benigne Prostatahyperplasie
bzw.	beziehungsweise
C	Kohlenstoff
CA	Karzinom
ca.	circa
CHD1	Chromatin Helikase DNA-Bindeprotein 1
CHK2	Checkpoint Kinase 2 (Tumorsuppressorgen)
CRP	C-reaktives Protein
cT	klinischer Tumor
DC	Dendritische Zellen
DGU	Digital rektale Untersuchung
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DOI	Digital Object Identifier
E-Nummer	Eingangsnummer
E. coli	Escherichia coli
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent Assay
ERG	Gen und Protein (Transkriptionsfaktor und Transkriptionsregulator)
FAE	Follikel-assoziiertes Epithel
FimH	Fimbrien Typ1
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FOXA1	Forkhead-Box-A1 (Transkriptionsfaktor)
FOXP1	Forkhead-Box-P1 (Transkriptionsfaktor)
FPKM	Fragments per Kilo base in millions
GALT	Darm-assoziiertes lymphatisches Gewebe
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
GP2	Glykoprotein 2
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
H2O2	Wasserstoffperoxid
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIER	Heat induced Epitop Retrieval
ICGC	International Cancer Genom Consortium

IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
IL17	Interleukin 17
ISUP	International Society for Urologic Pathology
KLK2	Kallikrein-2
MAP3K7	Mitogen aktivierte Proteinkinase Kinase Kinase 7
max.	maximal
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MRT	Magnetresonanztomographie
MTA	Multitissue Array
N	Stickstoff
n	Anzahl
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogramm
NKX3-1	Prostataspezifisches Tumorsuppressorgen
p	kurzer Arm eines Chromosoms
p-Wert	Prüfgröße für die Statistik
P16	Tumorsuppressorgen und Protein der zellulären Stressantwort
PCA	Prostatakarzinom
PCT	Procalcitonin
pH	pondus Hydrogenii
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKB	Proteinkinase B
pN	pathologische Lymphknoten
PSA	Prostataspezifisches Antigen
pT	Tumor-Stadium (p = pathologisch; T = Tumor)
pT	pathologischer Tumor
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
q	langer Arm eines Chromosoms
R	Resektionsrand
RKI	Robert-Koch-Institut
RPE	radikale Prostatektomie
SREC-1	Scavenger-Rezeptor von Epithelzellen
TBS-T-Puffer	Tris-buffered saline with Tween20
TCGA	The Cancer Genom Atlas
THP	Tamm-Horsfall-Protein
TLR4	Toll-like-Rezeptor 4
TMA	Tissue Microarray
TMPRSS2	Transmembrane Serinprotease 2 (Enzym und Gen)
TNF	Tumornekrosefaktor

TNM	Tumor Nodes Metastasen
TP53	Tumorsuppressorgen
TRUS	Transrektaler Ultraschall
u. a.	unter anderem
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
vs.	versus
WHO	World Health Organization
z. B.	zum Beispiel
ZP	Zona pellucida

## 8. Literaturverzeichnis

- AIGNER, K. R., STEPHENS, F. O., ALLEN-MERSH, T., HORTOBAGYI, G., KHAYAT, D., PICKSLEY, S. M., SUGARBAKER, P., TAGUCHI, T. & THOMPSON, J. F. 2016. Krebstherapie. In: AIGNER, K. R. & STEPHENS, F. O. (eds.) *Onkologie Basiswissen*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- ANNALA, M., STRUSS, W. J., WARNER, E. W., BEJA, K., VANDEKERKHOVE, G., WONG, A., KHALAF, D., SEPPÄLÄ, I.-L., SO, A., LO, G., AGGARWAL, R., SMALL, E. J., NYKTER, M., GLEAVE, M. E., CHI, K. N. & WYATT, A. W. 2017. Treatment Outcomes and Tumor Loss of Heterozygosity in Germline DNA Repair-deficient Prostate Cancer. *European Urology*, 72, 34-42.
- BARBIERI, C. E., BACA, S. C., LAWRENCE, M. S., DEMICHELIS, F., BLATTNER, M., THEURILLAT, J.-P., WHITE, T. A., STOJANOV, P., VAN ALLEN, E., STRANSKY, N., NICKERSON, E., CHAE, S.-S., BOYSEN, G., AUCLAIR, D., ONOFRIO, R. C., PARK, K., KITABAYASHI, N., MACDONALD, T. Y., SHEIKH, K., VUONG, T., GUIDUCCI, C., CIBULSKIS, K., SIVACHENKO, A., CARTER, S. L., SAKSENA, G., VOET, D., HUSSAIN, W. M., RAMOS, A. H., WINCKLER, W., REDMAN, M. C., ARDLIE, K., TEWARI, A. K., MOSQUERA, J. M., RUPP, N., WILD, P. J., MOCH, H., MORRISSEY, C., NELSON, P. S., KANTOFF, P. W., GABRIEL, S. B., GOLUB, T. R., MEYERSON, M., LANDER, E. S., GETZ, G., RUBIN, M. A. & GARRAWAY, L. A. 2012. Exome sequencing identifies recurrent SPOP, FOXA1 and MED12 mutations in prostate cancer. *Nature Genetics*, 44, 685-689.
- BEAUDOIN, A. R., ST-JEAN, P. & GRONDIN, G. 1991. Ultrastructural localization of GP2 in acinar cells of pancreas: presence of GP2 in endocytic and exocytic compartments. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 39, 575-588.
- BOGDANOS, D. P., RIGOPOULOU, E. I., SMYK, D. S., ROGGENBUCK, D., REINHOLD, D., FORBES, A., LAASS, M. W. & CONRAD, K. 2011. Diagnostic value, clinical utility and pathogenic significance of reactivity to the molecular targets of Crohn's disease specific-pancreatic autoantibodies. *Autoimmunity reviews*, 11, 143-148.
- BONK, S., KLUTH, M., JANSEN, K., HUBE-MAGG, C., MAKRYPIDI-FRAUNE, G., HÖFLMAYER, D., WEIDEMANN, S., MÖLLER, K., UHLIG, R. & BÜSCHECK, F. 2020. Reduced KLK2 expression is a strong and independent predictor of poor prognosis in ERG-negative prostate cancer. *The Prostate*, 80, 1097-1107.
- BRASE, J. C., JOHANNES, M., MANNSPERGER, H., FÄLTH, M., METZGER, J., KACPRZYK, L. A., ANDRASIUK, T., GADE, S., MEISTER, M., SIRMA, H., SAUTER, G., SIMON, R., SCHLOMM, T., BEISSBART, T., KORF, U., KUNER, R. & SÜLTSMANN, H. 2011. TMPRSS2-ERG -specific transcriptional modulation is



- associated with prostate cancer biomarkers and TGF- $\beta$  signaling. *BMC Cancer*, 11, 507.
- BURDELSKI, C., DIECKMANN, T., HEUMANN, A., HUBE-MAGG, C., KLUTH, M., BEYER, B., STEUBER, T., POMPE, R., GRAEFEN, M. & SIMON, R. 2016a. p16 upregulation is linked to poor prognosis in ERG negative prostate cancer. *Tumor Biology*, 37, 12655-12663.
- BURDELSKI, C., KLEINHANS, S., KLUTH, M., HUBE-MAGG, C., MINNER, S., KOOP, C., GRAEFEN, M., HEINZER, H., TSOURLAKIS, M. C. & WILCZAK, W. 2016b. Reduced AZGP1 expression is an independent predictor of early PSA recurrence and associated with ERG-fusion positive and PTEN deleted prostate cancers. *International journal of cancer*, 138, 1199-1206.
- BURDELSKI, C., SHIHADA, R., HINSCH, A., ANGERER, A., GOEBEL, C., FRIEDRICH, E., HUBE-MAGG, C., BURDAK-ROTHKAMM, S., KLUTH, M. & SIMON, R. 2017. High-level glyoxalase 1 (GLO1) expression is linked to poor prognosis in prostate cancer. *The Prostate*, 77, 1528-1538.
- BURKHARDT, L., FUCHS, S., KROHN, A., MASSER, S., MADER, M., KLUTH, M., BACHMANN, F., HULAND, H., STEUBER, T. & GRAEFEN, M. 2013. CHD1 Is a 5q21 Tumor Suppressor Required for ERG Rearrangement in Prostate Cancer CHD1 Deletion in Prostate Cancer. *Cancer research*, 73, 2795-2805.
- CAMP, R. L., CHARETTE, L. A. & RIMM, D. L. 2000. Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma. *Laboratory investigation*, 80, 1943-1949.
- CARVER, B. S., TRAN, J., CHEN, Z., CARRACEDO-PEREZ, A., ALIMONTI, A., NARDELLA, C., GOPALAN, A., SCARDINO, P. T., CORDON-CARDO, C. & GERALD, W. 2009. ETS rearrangements and prostate cancer initiation. *Nature*, 457, E1-E1.
- CLARK, J. P. & COOPER, C. S. 2009. ETS gene fusions in prostate cancer. *Nature Reviews Urology*, 6, 429-439.
- CUMMINGS, D., CRUISE, M., LOPEZ, R., ROGGENBUCK, D., JAIRATH, V., WANG, Y., SHEN, B. & RIEDER, F. 2018. Loss of tolerance to glycoprotein 2 isoforms 1 and 4 is associated with Crohn's disease of the pouch. *Aliment Pharmacol Ther*, 48, 1251-1259.
- DE BEÉCK, K. O., VERMEIRE, S., RUTGEERTS, P. & BOSSUYT, X. 2012. Antibodies to GP2, the major zymogen granule membrane glycoprotein, in inflammatory bowel diseases. *Gut*, 61, 162-164.
- DEMICHELI, F. & RUBIN, M. A. 2007. TMPRSS2-ETS fusion prostate cancer: biological and clinical implications. *Journal of clinical pathology*, 60, 1185-1186.
- DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM (DKFZ), S. K. 2021.

- DONG, J.-T. 2001. Chromosomal Deletions and Tumor Suppressor Genes in Prostate Cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, 20, 173-193.
- DRAISMA, G., BOER, R., OTTO, S. J., VAN DER CRUIJSEN, I. W., DAMHUIS, R. A., SCHRÖDER, F. H. & DE KONING, H. J. 2003. Lead times and overdetection due to prostate-specific antigen screening: estimates from the European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer. *J Natl Cancer Inst*, 95, 868-78.
- EGEVAD, L., GRANFORS, T., KARLBERG, L., BERGH, A. & STATIN, P. 2002. Prognostic value of the Gleason score in prostate cancer. *BJU international*, 89, 538-542.
- EICHENAUER, T., FEDERLEIN, F., MÖLLER, K., CHIRICO, V., KIND, S., LENNARTZ, M., LUTZ, F., HUBE-MAGG, C., HÖFLMAYER, D. & FISCH, M. 2020. High CHK2 protein expression is a strong and independent prognostic feature in ERG negative prostate cancer. *Pathology*, 52, 421-430.
- EPSTEIN, J. I. 2018. Prostate cancer grading: a decade after the 2005 modified system. *Modern Pathology*, 31, 47-63.
- EVANS, A. J. 2018. Treatment effects in prostate cancer. *Modern Pathology*, 31, 110-121.
- FAN, R., KUMARAVEL, T. S., JALALI, F., MARRANO, P., SQUIRE, J. A. & BRISTOW, R. G. 2004. Defective DNA strand break repair after DNA damage in prostate cancer cells: implications for genetic instability and prostate cancer progression. *Cancer research*, 64, 8526-8533.
- FREEDMAN, M. L., PEARCE, C. L., PENNEY, K. L., HIRSCHHORN, J. N., KOLONEL, L. N., HENDERSON, B. E. & ALTSHULER, D. 2005. Systematic evaluation of genetic variation at the androgen receptor locus and risk of prostate cancer in a multiethnic cohort study. *The American Journal of Human Genetics*, 76, 82-90.
- FREEDMAN, S. D., SAKAMOTO, K. & VENU, R. P. 1993. GP2, the homologue to the renal cast protein uromodulin, is a major component of intraductal plugs in chronic pancreatitis. *The Journal of clinical investigation*, 92, 83-90.
- FREYTAG, M., KLUTH, M., BADY, E., HUBE-MAGG, C., MAKRYPIDI-FRAUNE, G., HEINZER, H., HÖFLMAYER, D., WEIDEMANN, S., UHLIG, R., HULAND, H., GRAEFEN, M., BERNREUTHER, C., WITTMER, C., TSOURLAKIS, M. C., MINNER, S., DUM, D., HINSCH, A., LUEBKE, A. M., SIMON, R., SAUTER, G., SCHLOMM, T. & MÖLLER, K. 2020. Epithelial splicing regulatory protein 1 and 2 (ESRP1 and ESRP2) upregulation predicts poor prognosis in prostate cancer. *BMC Cancer*, 20, 1220.
- FRITZ, B. A., POPPEL, C. S., FEI, M. W. & LOWE, A. W. 2002. Processing of the Major Pancreatic Zymogen Granule Membrane Protein, GP2. *Pancreas*, 24, 336-343.
- FUKUOKA, S., FREEDMAN, S. D. & SCHEELE, G. A. 1991. A single gene encodes membrane-bound and free forms of GP-2, the major glycoprotein in pancreatic

- secretory (zymogen) granule membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88, 2898-2902.
- FUKUOKA, S.-I. 2000. Molecular cloning and sequences of cDNAs encoding  $\alpha$  (large) and  $\beta$  (small) isoforms of human pancreatic zymogen granule membrane-associated protein GP2. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1491, 376-380.
- FUKUOKA, S.-I. & KOBAYASHI, K.-I. 2001. Analysis of the C-terminal structure of urinary Tamm–Horsfall protein reveals that the release of the glycosyl phosphatidylinositol-anchored counterpart from the kidney occurs by phenylalanine-specific proteolysis. *Biochemical and biophysical research communications*, 289, 1044-1048.
- FURUSATO, B., TAN, S., YOUNG, D., DOBI, A., SUN, C., MOHAMED, A., THANGAPAZHAM, R., CHEN, Y., MCMASTER, G. & SREENATH, T. 2010. ERG oncoprotein expression in prostate cancer: clonal progression of ERG-positive tumor cells and potential for ERG-based stratification. *Prostate cancer and prostatic diseases*, 13, 228-237.
- GANCBERG, D., DI LEO, A., ROUAS, G., JÄRVINEN, T., VERHEST, A., ISOLA, J., PICCART, M. & LARSIMONT, D. 2002. Reliability of the tissue microarray based FISH for evaluation of the HER-2 oncogene in breast carcinoma. *Journal of clinical pathology*, 55, 315-317.
- GLAESSGEN, A., HAMBERG, H., PIHL, C. G., SUNDELIN, B., NILSSON, B. & EGEVAD, L. 2002. Interobserver reproducibility of percent Gleason grade 4/5 in total prostatectomy specimens. *J Urol*, 168, 2006-10.
- GLEASON, D. F. 1992. Histologic grading of prostate cancer: a perspective. *Human pathology*, 23, 273-279.
- GRUPP, K., HABERMANN, M., SIRMA, H., SIMON, R., STEURER, S., HUBE-MAGG, C., PRIEN, K., BURKHARDT, L., JEDRZEJEWSKA, K. & SALOMON, G. 2014. High nuclear karyopherin  $\alpha$  2 expression is a strong and independent predictor of biochemical recurrence in prostate cancer patients treated by radical prostatectomy. *Modern Pathology*, 27, 96-106.
- GRUPP, K., SANADER, S., SIRMA, H., SIMON, R., KOOP, C., PRIEN, K., HUBE-MAGG, C., SALOMON, G., GRAEFEN, M. & HEINZER, H. 2013. High lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 expression independently predicts high risk for biochemical recurrence in prostate cancers. *Molecular oncology*, 7, 1001-1011.
- HAO, Y., WANG, J., FENG, N. & LOWE, A. W. 2004. Determination of plasma glycoprotein 2 levels in patients with pancreatic disease. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 128, 668-674.

- HASE, K., KAWANO, K., NOCHI, T., PONTES, G. S., FUKUDA, S., EBISAWA, M., KADOKURA, K., TOBE, T., FUJIMURA, Y. & KAWANO, S. 2009. Uptake through glycoprotein 2 of FimH<sup>+</sup> bacteria by M cells initiates mucosal immune response. *Nature*, 462, 226-230.
- HELPAP, B. & EGEVAD, L. 2006. The significance of modified Gleason grading of prostatic carcinoma in biopsy and radical prostatectomy specimens. *Virchows Archiv*, 449, 622-627.
- HESSSELS, D., SMIT, F. P., VERHAEGH, G. W., WITJES, J. A., CORNEL, E. B. & SCHALKEN, J. A. 2007. Detection of TMPRSS2-ERG fusion transcripts and prostate cancer antigen 3 in urinary sediments may improve diagnosis of prostate cancer. *Clinical Cancer Research*, 13, 5103-5108.
- HEUMANN, A., HEINEMANN, N., HUBE-MAGG, C., LANG, D. S., GRUPP, K., KLUTH, M., MINNER, S., MÖLLER-KOOP, C., GRAEFEN, M. & HEINZER, H. 2018. High BCAR1 expression is associated with early PSA recurrence in ERG negative prostate cancer. *BMC cancer*, 18, 1-10.
- HÖLZL, M. A., HOFER, J., KOVARIK, J. J., ROGGENBUCK, D., REINHOLD, D., GOIHL, A., GÄRTNER, M., STEINBERGER, P. & ZLABINGER, G. J. 2011. The zymogen granule protein 2 (GP2) binds to scavenger receptor expressed on endothelial cells I (SREC-I). *Cellular immunology*, 267, 88-93.
- HOOPS, T. & RINDLER, M. 1991. Isolation of the cDNA encoding glycoprotein-2 (GP-2), the major zymogen granule membrane protein: homology to uromodulin/Tamm-Horsfall protein. *Journal of Biological Chemistry*, 266, 4257-4263.
- HYYTINEN, E. R., FRIERSON, H. F., JR., SIPE, T. W., LI, C. L., DEGEORGES, A., SIKES, R. A., CHUNG, L. W. & DONG, J. T. 1999. Loss of heterozygosity and lack of mutations of the XPG/ERCC5 DNA repair gene at 13q33 in prostate cancer. *Prostate*, 41, 190-5.
- IM, K., MARENINOV, S., DIAZ, M. F. P. & YONG, W. H. 2019. *An introduction to performing immunofluorescence staining*, Springer.
- JOVINE, L., DARIE, C. C., LITSCHER, E. S. & WASSARMAN, P. M. 2005. Zona pellucida domain proteins. *Annu. Rev. Biochem.*, 74, 83-114.
- JOVINE, L., QI, H., WILLIAMS, Z., LITSCHER, E. & WASSARMAN, P. M. 2002. The ZP domain is a conserved module for polymerization of extracellular proteins. *Nature cell biology*, 4, 457-461.
- JUSTE, C., KREIL, D. P., BEAUVALLET, C., GUILLOT, A., VACA, S., CARAPITO, C., MONDOT, S., SYKACEK, P., SOKOL, H. & BLON, F. 2014. Bacterial protein signals are associated with Crohn's disease. *Gut*, 63, 1566-1577.

- KELLNER, U., FRAHM, S. O., MAWRIN, C. & KRAMS, M. 2019. *Kurzlehrbuch Pathologie*, Georg Thieme Verlag.
- KIND, S., BÜSCHECK, F., HÖFLMAYER, D., HUBE-MAGG, C., KLUTH, M., TSOURLAKIS, M. C., STEURER, S., CLAUDITZ, T. S., LUEBKE, A. M. & BURANDT, E. 2019. Claudin-1 upregulation is associated with favorable tumor features and a reduced risk for biochemical recurrence in ERG-positive prostate cancer. *World journal of urology*, 1-12.
- KISSICK, H. T., ON, S. T., DUNN, L. K., SANDA, M. G., ASARA, J. M., PELLEGRINI, K. L., NOEL, J. K. & ARREDOUANI, M. S. 2015. The transcription factor ERG increases expression of neurotransmitter receptors on prostate cancer cells. *BMC Cancer*, 15, 604.
- KLUTH, M., AMSCHLER, N. N., GALAL, R., MOELLER-KOOP, C., BARROW, P., TSOURLAKIS, M. C., JACOBSEN, F., HINSCH, A., WITTMER, C. & STEURER, S. 2017a. Deletion of 8p is an independent prognostic parameter in prostate cancer. *Oncotarget*, 8, 379.
- KLUTH, M., GRAUNKE, M., MÖLLER-KOOP, C., HUBE-MAGG, C., MINNER, S., MICHL, U., GRAEFEN, M., HULAND, H., POMPE, R. & JACOBSEN, F. 2016. Deletion of 18q is a strong and independent prognostic feature in prostate cancer. *Oncotarget*, 7, 86339.
- KLUTH, M., HARASIMOWICZ, S., BURKHARDT, L., GRUPP, K., KROHN, A., PRIEN, K., GJONI, J., HAS, T., GALAL, R. & GRAEFEN, M. 2014. Clinical significance of different types of p53 gene alteration in surgically treated prostate cancer. *International journal of cancer*, 135, 1369-1380.
- KLUTH, M., HESSE, J., HEINL, A., KROHN, A., STEURER, S., SIRMA, H., SIMON, R., MAYER, P.-S., SCHUMACHER, U. & GRUPP, K. 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.
- KLUTH, M., JUNG, S., HABIB, O., ESHAGZAIY, M., HEINL, A., AMSCHLER, N., MASSER, S., MADER, M., RUNTE, F. & BAROW, P. 2017b. Deletion lengthening at chromosomes 6q and 16q targets multiple tumor suppressor genes and is associated with an increasingly poor prognosis in prostate cancer. *Oncotarget*, 8, 108923.
- KLUTH, M., RUNTE, F., BAROW, P., OMARI, J., ABDELAZIZ, Z. M., PAUSTIAN, L., STEURER, S., CHRISTINA TSOURLAKIS, M., FISCH, M. & GRAEFEN, M. 2015. Concurrent deletion of 16q23 and PTEN is an independent prognostic feature in prostate cancer. *International journal of cancer*, 137, 2354-2363.
- KLUTH, M., SCHERZAI, S., BÜSCHEK, F., FRAUNE, C., MÖLLER, K., HÖFLMAYER, D., MINNER, S., GÖBEL, C., MÖLLER-KOOP, C. & HINSCH, A. 2018. 13q deletion is

- linked to an adverse phenotype and poor prognosis in prostate cancer. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 57, 504-512.
- KOBAYASHI, K., YANAGIHARA, K., ISHIGURO, K. & FUKUOKA, S. 2004. GP2/THP gene family of self-binding, GPI-anchored proteins forms a cluster at chromosome 7F1 region in mouse genome. *Biochemical and biophysical research communications*, 322, 659-664.
- KOBAYASHI, N., TAKAHASHI, D., TAKANO, S., KIMURA, S. & HASE, K. 2019. The roles of Peyer's patches and microfold cells in the gut immune system: relevance to autoimmune diseases. *Frontiers in immunology*, 10, 2345.
- KOCH-INSTITUT, R. G. D. E. K. I. D. E. V. 2019. Krebs in Deutschland für 2015/2016 12. Ausgabe.
- KONONEN, J., BUBENDORF, L., KALLIONIMENI, A., BÄRLUND, M., SCHRAML, P., LEIGHTON, S., TORHORST, J., MIHATSCH, M. J., SAUTER, G. & KALLIONIMENI, O.-P. 1998. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nature medicine*, 4, 844-847.
- KREFT, B., JABS, W., LASKAY, T., KLINGER, M., SOLBACH, W., KUMAR, S. & VAN ZANDBERGEN, G. 2002. Polarized expression of Tamm-Horsfall protein by renal tubular epithelial cells activates human granulocytes. *Infection and immunity*, 70, 2650-2656.
- KROHN, A., DIEDLER, T., BURKHARDT, L., MAYER, P.-S., DE SILVA, C., MEYER-KORNBLUM, M., KÖTSCHAU, D., TENNSTEDT, P., HUANG, J., GERHÄUSER, C., MADER, M., KURTZ, S., SIRMA, H., SAAD, F., STEUBER, T., GRAEFEN, M., PLASS, C., SAUTER, G., SIMON, R., MINNER, S. & SCHLOMM, T. 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*, 181, 401-412.
- KROHN, A., SEIDEL, A., BURKHARDT, L., BACHMANN, F., MADER, M., GRUPP, K., EICHENAUER, T., BECKER, A., ADAM, M. & GRAEFEN, M. 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*, 231, 130-141.
- KUMAR, S. & MUCHMORE, A. 1990. Tamm-Horsfall protein-uromodulin (1950-1990). *Kidney international*, 37, 1395-1401.
- KUROSAWA, N., YOSHIOKA, M., FUJIMOTO, R., YAMAGISHI, F. & ISOBE, M. 2012. Rapid production of antigen-specific monoclonal antibodies from a variety of animals. *BMC biology*, 10, 1-15.



- KUSUNOSE, N., TSURUTA, A., HAMAMURA, K., TSURUDOME, Y., YOSHIDA, Y., AKAMINE, T., MATSUNAGA, N., KOYANAGI, S. & OHDO, S. 2020. Circadian expression of Glycoprotein 2 (Gp2) gene is controlled by a molecular clock in mouse Peyer's patches. *Genes Cells*, 25, 270-278.
- KWABI-ADDU, B., GIRI, D., SCHMIDT, K., PODSYPANINA, K., PARSONS, R., GREENBERG, N. & ITTMANN, M. 2001. Haploinsufficiency of the Pten tumor suppressor gene promotes prostate cancer progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98, 11563-11568.
- LAASS, M. W., RÖBER, N., RANGE, U., NOS, L., ROGGENBUCK, D. & CONRAD, K. 2015. Loss and gain of tolerance to pancreatic glycoprotein 2 in celiac disease. *PLoS One*, 10, e0128104.
- LIMA, T., HENRIQUE, R., VITORINO, R. & FARDILHA, M. 2021. Bioinformatic analysis of dysregulated proteins in prostate cancer patients reveals putative urinary biomarkers and key biological pathways. *Med Oncol*, 38, 9.
- LIN, Y., NAKATOCHI, M., HOSONO, Y., ITO, H., KAMATANI, Y., INOKO, A., SAKAMOTO, H., KINOSHITA, F., KOBAYASHI, Y., ISHII, H., OZAKA, M., SASAKI, T., MATSUYAMA, M., SASAHIRA, N., MORIMOTO, M., KOBAYASHI, S., FUKUSHIMA, T., UENO, M., OHKAWA, S., EGAWA, N., KURUMA, S., MORI, M., NAKAO, H., ADACHI, Y., OKUDA, M., OSAKI, T., KAMIYA, S., WANG, C., HARA, K., SHIMIZU, Y., MIYAMOTO, T., HAYASHI, Y., EBI, H., KOHMOTO, T., IMOTO, I., KASUGAI, Y., MURAKAMI, Y., AKIYAMA, M., ISHIGAKI, K., MATSUDA, K., HIRATA, M., SHIMADA, K., OKUSAKA, T., KAWAGUCHI, T., TAKAHASHI, M., WATANABE, Y., KURIKI, K., KADOTA, A., OKADA, R., MIKAMI, H., TAKEZAKI, T., SUZUKI, S., YAMAJI, T., IWASAKI, M., SAWADA, N., GOTO, A., KINOSHITA, K., FUSE, N., KATSUOKA, F., SHIMIZU, A., NISHIZUKA, S. S., TANNO, K., SUZUKI, K., OKADA, Y., HORIKOSHI, M., YAMAUCHI, T., KADOWAKI, T., YU, H., ZHONG, J., AMUNDADOTTIR, L. T., DOKI, Y., ISHII, H., EGUCHI, H., BOGUMIL, D., HAIMAN, C. A., LE MARCHAND, L., MORI, M., RISCH, H., SETIAWAN, V. W., TSUGANE, S., WAKAI, K., YOSHIDA, T., MATSUDA, F., KUBO, M., KIKUCHI, S. & MATSUO, K. 2020. Genome-wide association meta-analysis identifies GP2 gene risk variants for pancreatic cancer. *Nat Commun*, 11, 3175.
- LOWE, A. W., LUTHER, R. E., WONG, S. M. & GRENDALL, J. H. 1994. The level of the zymogen granule protein GP2 is elevated in a rat model for acute pancreatitis. *Gastroenterology*, 107, 1819-1827.
- LU, R.-M., HWANG, Y.-C., LIU, I.-J., LEE, C.-C., TSAI, H.-Z., LI, H.-J. & WU, H.-C. 2020. Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. *Journal of biomedical science*, 27, 1-30.

- LUTZ, F. 2016. *Der Einfluss quantitativer Befunde auf die klinische Relevanz der Interobserver-Variabilität des Gleason Grades*. Universität Hamburg.
- MACDONALD, R. J. & RONZIO, R. A. 1972. Comparative analysis of zymogen granule membrane polypeptides. *Biochemical and biophysical research communications*, 49, 377-382.
- MÄHL, M. 2020. *Heterogenität und Abfolge der ERG, CRISP3 und SPINK1 Expression beim Prostatakarzinom*. Staats-und Universitätsbibliothek Hamburg Carl von Ossietzky.
- MANI, R.-S., TOMLINS, S. A., CALLAHAN, K., GHOSH, A., NYATI, M. K., VARAMBALLY, S., PALANISAMY, N. & CHINNAIYAN, A. M. 2009. Induced Chromosomal Proximity and Gene Fusions in Prostate Cancer. *Science*, 326, 1230-1230.
- MARENGO, S. R., CHEN, D. H.-C., KAUNG, H.-L. C., RESNICK, M. I. & YANG, L. 2002. Decreased renal expression of the putative calcium oxalate inhibitor Tamm-Horsfall protein in the ethylene glycol rat model of calcium oxalate urolithiasis. *The Journal of urology*, 167, 2192-2197.
- MARX, A., KOOPMANN, L., HÖFLMAYER, D., BÜSCHECK, F., HUBE-MAGG, C., STEURER, S., EICHENAUER, T., CLAUDITZ, T. S., WILCZAK, W. & SIMON, R. 2021. Reduced anoctamin 7 (ANO7) expression is a strong and independent predictor of poor prognosis in prostate cancer. *Cancer Biology & Medicine*, 18, 245.
- MCCALL, P., WITTON, C., GRIMSLEY, S., NIELSEN, K. & EDWARDS, J. 2008. Is PTEN loss associated with clinical outcome measures in human prostate cancer? *British journal of cancer*, 99, 1296-1301.
- MCNEAL, J. E. 1981. The zonal anatomy of the prostate. *The prostate*, 2, 35-49.
- MINNER, S., ENODIEN, M., SIRMA, H., LUEBKE, A. M., KROHN, A., MAYER, P. S., SIMON, R., TENNSTEDT, P., MÜLLER, J. & SCHOLZ, L. 2011. ERG status is unrelated to PSA recurrence in radically operated prostate cancer in the absence of antihormonal therapy. *Clinical cancer research*, 17, 5878-5888.
- MINNER, S., GÄRTNER, M., FREUDENTHALER, F., BAUER, M., KLUTH, M., SALOMON, G., HEINZER, H., GRAEFEN, M., BOKEMEYER, C. & SIMON, R. 2013. Marked heterogeneity of ERG expression in large primary prostate cancers. *Modern pathology*, 26, 106-116.
- MINNER, S., LUEBKE, A. M., KLUTH, M., BOKEMEYER, C., JÄNICKE, F., IZBICKI, J., SCHLOMM, T., SAUTER, G. & WILCZAK, W. 2012. High level of Ets-related gene expression has high specificity for prostate cancer: a tissue microarray study of 11 483 cancers. *Histopathology*, 61, 445-453.
- MIRLACHER, M., KASPER, M., STORZ, M., KNECHT, Y., DÜRMÜLLER, U., SIMON, R., MIHATSCH, M. J. & SAUTER, G. 2004. Influence of slide aging on results of

- translational research studies using immunohistochemistry. *Modern pathology*, 17, 1414-1420.
- MULISCH, M. 2014. Nachweisverfahren und Detektion. *Verfahren der Immunlokalisation*. Springer.
- NAKAMURA, Y., KIMURA, S. & HASE, K. 2018. M cell-dependent antigen uptake on follicle-associated epithelium for mucosal immune surveillance. *Inflammation and regeneration*, 38, 1-9.
- NIKOLOVA-KRSTEVSKI, V., YUAN, L., LE BRAS, A., VIJAYARAJ, P., KONDO, M., GEBAUER, I., BHASIN, M., CARMAN, C. V. & OETTGEN, P. 2009. ERG is required for the differentiation of embryonic stem cells along the endothelial lineage. *BMC developmental biology*, 9, 72-72.
- NOCITO, A., BUBENDORF, L., TINNER, E. M., SÜESS, K., WAGNER, U., FORSTER, T., KONONEN, J., FIJAN, A., BRUDERER, J. & SCHMID, U. 2001. Microarrays of bladder cancer tissue are highly representative of proliferation index and histological grade. *The Journal of pathology*, 194, 349-357.
- OHNO, H. & HASE, K. 2010. Glycoprotein 2 (GP2) grabbing the fimH<sup>+</sup> bacteria into m cells for mucosal immunity. *Gut microbes*, 1, 407-410.
- PAISS, T., HERKOMMER, K., CHAB, A., HÄUSSLER, J., VOGEL, W., GSCHWEND, J. E. & HAUTMANN, R. E. 2002. Das familiäre Prostatakarzinom in Deutschland. *Der Urologe A*, 41, 38-43.
- PAK, J., PU, Y., ZHANG, Z.-T., HASTY, D. L. & WU, X.-R. 2001. Tamm-Horsfall protein binds to type 1 fimbriated Escherichia coli and prevents E. coli from binding to uroplakin Ia and Ib receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 9924-9930.
- PAPSIDERO, L. D., WANG, M. C., VALENZUELA, L. A., MURPHY, G. P. & CHU, T. M. 1980. A prostate antigen in sera of prostatic cancer patients. *Cancer research*, 40, 2428-2432.
- PARK, K., TOMLINS, S. A., MUDALIAR, K. M., CHIU, Y.-L., ESGUEVA, R., MEHRA, R., SULEMAN, K., VARAMBALLY, S., BRENNER, J. C. & MACDONALD, T. 2010. Antibody-based detection of ERG rearrangement-positive prostate cancer. *Neoplasia*, 12, 590-IN21.
- PERNER, S., DEMICHELIS, F., BEROUKHIM, R., SCHMIDT, F. H., MOSQUERA, J.-M., SETLUR, S., TCHINDA, J., TOMLINS, S. A., HOFER, M. D. & PIENTA, K. G. 2006. TMPRSS2: ERG fusion-associated deletions provide insight into the heterogeneity of prostate cancer. *Cancer research*, 66, 8337-8341.
- PETTERSSON, A., GRAFF, R. E., BAUER, S. R., PITT, M. J., LIS, R. T., STACK, E. C., MARTIN, N. E., KUNZ, L., PENNEY, K. L. & LIGON, A. H. 2012. The TMPRSS2:

- ERG rearrangement, ERG expression, and prostate cancer outcomes: a cohort study and meta-analysis. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention*, 21, 1497-1509.
- PIEPER, R., GATLIN, C. L., MCGRATH, A. M., MAKUSKY, A. J., MONDAL, M., SEONARAIN, M., FIELD, E., SCHATZ, C. R., ESTOCK, M. A. & AHMED, N. 2004. Characterization of the human urinary proteome: a method for high-resolution display of urinary proteins on two-dimensional electrophoresis gels with a yield of nearly 1400 distinct protein spots. *Proteomics*, 4, 1159-1174.
- QI, M., YANG, X., ZHANG, F., LIN, T., SUN, X., LI, Y., YUAN, H., REN, Y., ZHANG, J., QIN, X. & HAN, B. 2014. ERG Rearrangement Is Associated with Prostate Cancer-Related Death in Chinese Prostate Cancer Patients. *PLOS ONE*, 9, e84959.
- RAMOS-VARA, J. 2005. Technical aspects of immunohistochemistry. *Veterinary pathology*, 42, 405-426.
- RAMOS-VARA, J. & MILLER, M. 2014. When tissue antigens and antibodies get along: revisiting the technical aspects of immunohistochemistry—the red, brown, and blue technique. *Veterinary pathology*, 51, 42-87.
- REID, A. H. M., ATTARD, G., AMBROISINE, L., FISHER, G., KOVACS, G., BREWER, D., CLARK, J., FLOHR, P., EDWARDS, S., BERNEY, D. M., FOSTER, C. S., FLETCHER, A., GERALD, W. L., MØLLER, H., REUTER, V. E., SCARDINO, P. T., CUZICK, J., DE BONO, J. S., COOPER, C. S. & ON BEHALF OF THE TRANSATLANTIC PROSTATE, G. 2010. Molecular characterisation of ERG, ETV1 and PTEN gene loci identifies patients at low and high risk of death from prostate cancer. *British Journal of Cancer*, 102, 678-684.
- RIMM, D. L., CAMP, R. L., CHARETTE, L. A., COSTA, J., OLSEN, D. A. & REISS, M. 2001. Tissue microarray: a new technology for amplification of tissue resources. *Cancer journal (Sudbury, Mass.)*, 7, 24-31.
- RINDLER, M. J. & HOOPS, T. 1990. The pancreatic membrane protein GP-2 localizes specifically to secretory granules and is shed into the pancreatic juice as a protein aggregate. *European journal of cell biology*, 53, 154-163.
- RINDLER, M. J., NAIK, S., LI, N., HOOPS, T. & PERALDI, M. 1990. Uromodulin (Tamm-Horsfall glycoprotein/uromucoid) is a phosphatidylinositol-linked membrane protein. *Journal of Biological Chemistry*, 265, 20784-20789.
- ROGGENBUCK, D., GOIHL, A., HANACK, K., HOLZLÖHNER, P., HENTSCHEL, C., VEICZI, M., SCHIERACK, P., REINHOLD, D. & SCHULZ, H.-U. 2017. Serological diagnosis and prognosis of severe acute pancreatitis by analysis of serum glycoprotein 2. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 55, 854-864.
- ROGGENBUCK, D., HAUSDORF, G., MARTINEZ-GAMBOA, L., REINHOLD, D., BÜTTNER, T., JUNGBLUT, P. R., PORSTMANN, T., LAASS, M., HENKER, J. & BÜNING, C.

2009. Identification of GP2, the major zymogen granule membrane glycoprotein, as the autoantigen of pancreatic antibodies in Crohn's disease. *Gut*, 58, 1620-1628.
- ROGGENBUCK, D., REINHOLD, D., BAUMGART, D. C., SCHIERACK, P., CONRAD, K. & LAASS, M. W. 2016. Autoimmunity in Crohn's disease—a putative stratification factor of the clinical phenotype. *Advances in clinical chemistry*, 77, 77-101.
- ROGGENBUCK, D., REINHOLD, D., WERNER, L., SCHIERACK, P., BOGDANOS, D. P. & CONRAD, K. 2013. Glycoprotein 2 antibodies in Crohn's disease. *Advances in clinical chemistry*, 60, 187-208.
- RONCKERS, C., SPIX, C., TRÜBENBACH, C., KATALINIC, A., CHRIST, M., CICERO, A., FOLKERTS, J., HANSMANN, J., KRANZHÖFER, K. & KUNZ, B. 2023. Krebs in Deutschland für 2019/2020.
- RONZIO, R. A., KRONQUIST, K. E., LEWIS, D. S., MACDONALD, R. J., MOHRLOK, S. H. & O'DONNELL JR, J. J. 1978. Glycoprotein synthesis in the adult rat pancreas: IV. Subcellular distribution of membrane glycoproteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 508, 65-84.
- ROSEN, P., SESTERHENN, I. A., BRASSELL, S. A., MCLEOD, D. G., SRIVASTAVA, S. & DOBI, A. 2012. Clinical potential of the ERG oncoprotein in prostate cancer. *Nature reviews Urology*, 9, 131-137.
- RUIZ, C., SEIBT, S., KURAYA, K. A., SIRAJ, A. K., MIRLACHER, M., SCHRAML, P., MAURER, R., SPICHTIN, H., TORHORST, J. & POPOVSKA, S. 2006. Tissue microarrays for comparing molecular features with proliferation activity in breast cancer. *International journal of cancer*, 118, 2190-2194.
- RUSTHOVEN, C. G., CARLSON, J. A., WAXWEILER, T. V., YEH, N., RABEN, D., FLAIG, T. W. & KAVANAGH, B. D. The prognostic significance of Gleason scores in metastatic prostate cancer. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 2014. Elsevier, 707-713.
- SÄEMANN, M. D., WEICHHART, T., ZEYDA, M., STAFFLER, G., SCHUNN, M., STUHLMEIER, K. M., SOBANOV, Y., STULNIG, T. M., AKIRA, S. & VON GABAIN, A. 2005. Tamm-Horsfall glycoprotein links innate immune cell activation with adaptive immunity via a Toll-like receptor-4–dependent mechanism. *The Journal of clinical investigation*, 115, 468-475.
- SAPER, C. B. 2009. A guide to the perplexed on the specificity of antibodies. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 57, 1-5.
- SAUTER, G. 2019. Der aktuelle Stand beim Gleason-Score. *Uro-News*, 23, 40-45.
- SAUTER, G., STEURER, S., CLAUDITZ, T. S., KRECH, T., WITTMER, C., LUTZ, F., LENNARTZ, M., JANSSEN, T., HAKIMI, N. & SIMON, R. 2016. Clinical utility of

- quantitative Gleason grading in prostate biopsies and prostatectomy specimens. *European urology*, 69, 592-598.
- SCHEELE, G. A., FUKUOKA, S.-I. & FREEDMAN, S. D. 1994. Role of the GP2/THP Family of GPI-Anchored Proteins in Membrane Trafficking During Regulated Exocrine Secretion. *Pancreas*, 9, 139-149.
- SCHEELE, G. A., FUKUOKA, S.-I., KERN, H. F. & FREEDMAN, S. D. 1996. Pancreatic Dysfunction in Cystic Fibrosis Occurs as a Result of Impairments in Luminal pH, Apical Trafficking of Zymogen Granule Membranes, and Solubilization of Secretory Enzymes. *Pancreas*, 12, 1-9.
- SCHLOMM, T. & SAUTER, G. 2016. Beurteilung des Prostatakarzinoms: Gleason-Score–Status 2016. *Perspektiven der Urologie und Nephrologie*.
- SCHMIDT, K., DARTSCH, H., LINDER, D., KERN, H.-F. & KLEENE, R. 2000. A submembranous matrix of proteoglycans on zymogen granule membranes is involved in granule formation in rat pancreatic acinar cells. *Journal of Cell Science*, 113, 2233-2242.
- SCHMIDT, K., SCHRADER, M., KERN, H.-F. & KLEENE, R. 2001. Regulated Apical Secretion of Zymogens in Rat Pancreas: INVOLVEMENT OF THE GLYCOSYLPHOSPHATIDYLINOSITOL-ANCHORED GLYCOPROTEIN GP-2, THE LECTIN ZG16p, AND CHOLESTEROL-GLYCOSPHINGOLIPID-ENRICHED MICRODOMAINS. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 14315-14323.
- SCHRÖDER, F. H., HUGOSSON, J., ROOBOL, M. J., TAMMELA, T. L., ZAPPA, M., NELEN, V., KWIATKOWSKI, M., LUJAN, M., MÄÄTTÄNEN, L., LILJA, H., DENIS, L. J., RECKER, F., PAEZ, A., BANGMA, C. H., CARLSSON, S., PULITI, D., VILLERS, A., REBILLARD, X., HAKAMA, M., STENMAN, U. H., KUJALA, P., TAARI, K., AUS, G., HUBER, A., VAN DER KWAST, T. H., VAN SCHAIK, R. H., DE KONING, H. J., MOSS, S. M. & AUVINEN, A. 2014. Screening and prostate cancer mortality: results of the European Randomised Study of Screening for Prostate Cancer (ERSPC) at 13 years of follow-up. *Lancet*, 384, 2027-35.
- SCHÜNKE, M., SCHULTE, E. & SCHUMACHER, U. 2018. *PROMETHEUS Innere Organe: LernAtlas Anatomie*, Georg Thieme Verlag.
- SERAFINI-CESSI, F., MALAGOLINI, N. & CAVALLONE, D. 2003. Tamm-Horsfall glycoprotein: biology and clinical relevance. *American journal of kidney diseases*, 42, 658-676.
- SHI, S.-R., KEY, M. E. & KALRA, K. L. 1991. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 39, 741-748.



- SIEBER, O. M., HEINIMANN, K. & TOMLINSON, I. P. 2003. Genomic instability—the engine of tumorigenesis? *Nature reviews cancer*, 3, 701-708.
- SOWA, M., KOLENDA, R., BAUMGART, D. C., PRATSCHKE, J., PAPP, M., TORNAL, T., SUCHANSKI, J., BOGDANOS, D. P., MYTILINAIIOU, M. G., HAMMERMAN, J., LAASS, M. W., CONRAD, K., SCHRAMM, C., FRANKE, A., ROGGENBUCK, D. & SCHIERACK, P. 2018. Mucosal Autoimmunity to Cell-Bound GP2 Isoforms Is a Sensitive Marker in PSC and Associated With the Clinical Phenotype. *Front Immunol*, 9, 1959.
- STERNBERGER, L. A., HARDY JR, P. H., CUCULIS, J. J. & MEYER, H. G. 1970. The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 18, 315-333.
- STEURER, S., MAYER, P. S., ADAM, M., KROHN, A., KOOP, C., OSPINA-KLINCK, D., TEHRANI, A. A., SIMON, R., TENNSTEDT, P., GRAEFEN, M., WITTMER, C., BRORS, B., PLASS, C., KORBEL, J., WEISCHENFELDT, J., SAUTER, G., HULAND, H., TSOURLAKIS, M. C., MINNER, S. & SCHLOMM, T. 2014. TMPRSS2-ERG Fusions Are Strongly Linked to Young Patient Age in Low-grade Prostate Cancer. *European Urology*, 66, 978-981.
- TERAHARA, K., YOSHIDA, M., IGARASHI, O., NOCHI, T., PONTES, G. S., HASE, K., OHNO, H., KUOKAWA, S., MEJIMA, M. & TAKAYAMA, N. 2008. Comprehensive gene expression profiling of Peyer's patch M cells, villous M-like cells, and intestinal epithelial cells. *The Journal of Immunology*, 180, 7840-7846.
- TOMLINS, S. A., LAXMAN, B., VARAMBALLY, S., CAO, X., YU, J., HELGESON, B. E., CAO, Q., PRENSNER, J. R., RUBIN, M. A. & SHAH, R. B. 2008. Role of the TMPRSS2-ERG gene fusion in prostate cancer. *Neoplasia*, 10, 177-IN9.
- TOMLINS, S. A., RHODES, D. R., PERNER, S., DHANASEKARAN, S. M., MEHRA, R., SUN, X.-W., VARAMBALLY, S., CAO, X., TCHINDA, J. & KUEFER, R. 2005a. Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *science*, 310, 644-648.
- TOMLINS, S. A., RHODES, D. R., PERNER, S., DHANASEKARAN, S. M., MEHRA, R., SUN, X.-W., VARAMBALLY, S., CAO, X., TCHINDA, J., KUEFER, R., LEE, C., MONTIE, J. E., SHAH, R. B., PIENTA, K. J., RUBIN, M. A. & CHINNAIYAN, A. M. 2005b. Recurrent Fusion of *TMPPRSS2* and ETS Transcription Factor Genes in Prostate Cancer. *Science*, 310, 644-648.
- TORHORST, J., BUCHER, C., KONONEN, J., HAAS, P., ZUBER, M., KÖCHLI, O. R., MROSS, F., DIETERICH, H., MOCH, H. & MIHATSCH, M. 2001. Tissue microarrays

- for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints. *The American journal of pathology*, 159, 2249-2256.
- TSOURLAKIS, M. C., ELEFThERiADOU, A., STENDER, A., WEIGAND, P., GRUPP, K., HUBE-MAGG, C., KLUTH, M., SCHROEDER, C., STEURER, S. & HINSCH, A. 2017. FOXA1 expression is a strong independent predictor of early PSA recurrence in ERG negative prostate cancers treated by radical prostatectomy. *Carcinogenesis*, 38, 1180-1187.
- VAN LEENDERS, G. J. L. H., VAN DER KWAST, T. H., GRIGNON, D. J., EVANS, A. J., KRISTIANSEN, G., KWELDAM, C. F., LITJENS, G., MCKENNEY, J. K., MELAMED, J., MOTTET, N., PANER, G. P., SAMARATUNGA, H., SCHOOTS, I. G., SIMKO, J. P., TSUZUKI, T., VARMA, M., WARREN, A. Y., WHEELER, T. M., WILLIAMSON, S. R., ICZKOWSKI, K. A. & MEMBERS, I. G. W. P. 2020. The 2019 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Grading of Prostatic Carcinoma. *The American journal of surgical pathology*, 44, e87-e99.
- VENKATESAN, S., NATARAJAN, A. T. & HANDE, M. P. 2015. Chromosomal instability—mechanisms and consequences. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 793, 176-184.
- VYLETAL, P., BLEYER, A. J. & KMOCH, S. 2010. Uromodulin biology and pathophysiology—an update. *Kidney and Blood Pressure Research*, 33, 456-475.
- WANG, Z., WANG, Y., ZHANG, J., HU, Q., ZHI, F., ZHANG, S., MAO, D., ZHANG, Y. & LIANG, H. 2017. Significance of the TMPRSS2: ERG gene fusion in prostate cancer. *Molecular medicine reports*, 16, 5450-5458.
- WASYLYK, B., HAHN, S. L. & GIOVANE, A. 1993. The Ets family of transcription factors. *Eur J Biochem*, 211, 7-18.
- WEIDEMANN, S. A., SAUER, C., LUEBKE, A. M., MÖLLER-KOOP, C., STEURER, S., HUBE-MAGG, C., BÜSCHECK, F., HÖFLMAYER, D., TSOURLAKIS, M. C., CLAUDITZ, T. S., SIMON, R., SAUTER, G., GÖBEL, C., LEBOK, P., DUM, D., FRAUNE, C., KIND, S., MINNER, S., IZBICKI, J., SCHLOMM, T., HULAND, H., HEINZER, H., BURANDT, E., HAESE, A., GRAEFEN, M. & HEUMANN, A. 2019. High-level expression of protein tyrosine phosphatase non-receptor 12 is a strong and independent predictor of poor prognosis in prostate cancer. *BMC Cancer*, 19, 944.
- WEISCHENFELDT, J., SIMON, R., FEUERBACH, L., SCHLANGEN, K., WEICHENHAN, D., MINNER, S., WUTTIG, D., WARNATZ, H.-J., STEHR, H., RAUSCH, T., JÄGER, N., GU, L., BOGATYROVA, O., STÜTZ, ADRIAN M., CLAUS, R., EILS, J., EILS, R., GERHÄUSER, C., HUANG, P.-H., HUTTER, B., KABBE, R., LAWERENZ, C., RADOMSKI, S., BARTHOLOMAE, CYNTHIA C., FÄLTH, M., GADE, S., SCHMIDT,

- M., AMSCHLER, N., HAS, T., GALAL, R., GJONI, J., KUNER, R., BAER, C., MASSER, S., VON KALLE, C., ZICHNER, T., BENES, V., RAEDER, B., MADER, M., AMSTISLAVSKIY, V., AVCI, M., LEHRACH, H., PARKHOMCHUK, D., SULTAN, M., BURKHARDT, L., GRAEFEN, M., HULAND, H., KLUTH, M., KROHN, A., SIRMA, H., STUMM, L., STEURER, S., GRUPP, K., SÜLTSMANN, H., SAUTER, G., PLASS, C., BRORS, B., YASPO, M.-L., KORBEL, JAN O. & SCHLOMM, T. 2013. Integrative Genomic Analyses Reveal an Androgen-Driven Somatic Alteration Landscape in Early-Onset Prostate Cancer. *Cancer Cell*, 23, 159-170.
- WELTGESUNDHEITSORGANISATION 2020.
- WERNER, L., PACLIK, D., FRITZ, C., REINHOLD, D., ROGGENBUCK, D. & STURM, A. 2012. Identification of pancreatic glycoprotein 2 as an endogenous immunomodulator of innate and adaptive immune responses. *The Journal of Immunology*, 189, 2774-2783.
- WILCZAK, W., WITTMER, C., CLAUDITZ, T., MINNER, S., STEURER, S., BÜSCHECK, F., KRECH, T., LENNARTZ, M., HARMS, L., LELEU, D., AHRENS, M., INGWERTH, S., GÜNTHER, C. T., KOOP, C., SIMON, R., JACOBSEN, F., TSOURLAKIS, M. C., CHIRICO, V., HÖFLMAYER, D., VETTORAZZI, E., HAESE, A., STEUBER, T., SALOMON, G., MICHL, U., BUDÄUS, L., TILKI, D., THEDERAN, I., FRAUNE, C., GÖBEL, C., HENRICH, M.-C., JUHNKE, M., MÖLLER, K., BAWAHAB, A. A., UHLIG, R., ADAM, M., WEIDEMANN, S., BEYER, B., HULAND, H., GRAEFEN, M., SAUTER, G. & SCHLOMM, T. 2018. Marked Prognostic Impact of Minimal Lymphatic Tumor Spread in Prostate Cancer. *European Urology*, 74, 376-386.
- WOLF, M. T., MUCHA, B. E., ATTANASIO, M., ZALEWSKI, I., KARLE, S. M., NEUMANN, H. P., RAHMAN, N., BADER, B., BALDAMUS, C. A. & OTTO, E. 2003. Mutations of the Uromodulin gene in MCKD type 2 patients cluster in exon 4, which encodes three EGF-like domains. *Kidney international*, 64, 1580-1587.
- WONG, S. M. & LOWE, A. W. 1996. Sequence of the cDNA encoding human GP-2, the major membrane protein in the secretory granule of the exocrine pancreas. *Gene*, 171, 311-312.
- YIN, Y., ROGERS, P. V. & RUTHERFORD, C. L. 1994. Dual regulation of the glycogen phosphorylase 2 gene Dictyostelium discoideum: the effects of DIF-1, cAMP, NH<sub>3</sub> and adenosine. *Development*, 120, 1169-78.
- YOSHIMOTO, M., JOSHUA, A. M., CUNHA, I. W., COUDRY, R. A., FONSECA, F. P., LUDKOVSKI, O., ZIELENSKA, M., SOARES, F. A. & SQUIRE, J. A. 2008. Absence of TMPRSS2:ERG fusions and PTEN losses in prostate cancer is associated with a favorable outcome. *Modern Pathology*, 21, 1451-1460.

- YOSHIMOTO, M., LUDKOVSKI, O., DEGRACE, D., WILLIAMS, J. L., EVANS, A., SIRCAR, K., BISMAR, T. A., NUIN, P. & SQUIRE, J. A. 2012. PTEN genomic deletions that characterize aggressive prostate cancer originate close to segmental duplications. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 51, 149-160.
- YU, S. & LOWE, A. W. 2009. The pancreatic zymogen granule membrane protein, GP2, binds Escherichia coli Type 1 fimbriae. *BMC gastroenterology*, 9, 1-7.
- YU, S., MICHIE, S. A. & LOWE, A. W. 2004. Absence of the major zymogen granule membrane protein, GP2, does not affect pancreatic morphology or secretion. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 50274-50279.
- YUN, J. W., LEE, S., RYU, D., PARK, S., PARK, W. Y., JOUNG, J. G. & JEONG, J. 2019. Biomarkers Associated with Tumor Heterogeneity in Prostate Cancer. *Transl Oncol*, 12, 43-48.
- ZIEGLER, A., LANGE, S. & BENDER, R. 2007a. [Survival analysis: log rank test]. *Dtsch Med Wochenschr*, 132 Suppl 1, e39-41.
- ZIEGLER, A., LANGE, S. & BENDER, R. 2007b. Überlebenszeitanalyse: Die cox-regression. *DMW-Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 132, e42-e44.
- ZIEGLER, A., LANGE, S. & BENDER, R. 2007c. Überlebenszeitanalyse: Eigenschaften und Kaplan-Meier Methode. *DMW-Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 132, e36-e38.

## 9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersicht epidemiologischen Maßzahlen in Deutschland 2020.....	2
Abbildung 2: Vergleich 5-/10-Jahres-Überlebensraten nach Lokalisation 2019-2020.....	3
Abbildung 3: Häufigsten Tumorlokalisationen Krebsneuerkrankungen 2020.....	4
Abbildung 4: Erkrankungs- und Sterberisiko nach Alter in Deutschland 2020.....	6
Abbildung 5: Epidemiologische Maßzahlen Prostata in Deutschland 2020.....	6
Abbildung 6: original Gleason-Grading 1966.....	8
Abbildung 7: Prostata Normalgewebe.....	9
Abbildung 8: Prostata Adenokarzinom.....	9
Abbildung 9: Bestimmung Gleason-Score nach mikroskopischen Gesichtsfeldern.....	10
Abbildung 10: GP2 Protein-Expression im Normalgewebe.....	13
Abbildung 11: GP2 RNA-Expression im Normalgewebe.....	13
Abbildung 12: GP2 Grundgerüst.....	15
Abbildung 13: GP2 Isoformen 1-4.....	16
Abbildung 14: GP2 Isoform alpha und beta.....	17
Abbildung 15: Darstellung der Darmimmunität nach Bindung mit FimH+ Bakterien.....	21
Abbildung 16: GP2 RNA-Expression im Tumorgewebe.....	22
Abbildung 17: Arbeitsschritte der TMA-Herstellung.....	26
Abbildung 18: Aufbau eines TMAs nach UKE Standard.....	27
Abbildung 19: Herstellung eines TMA Blocks.....	28
Abbildung 20: Fertiggestellter Prostata TMA Block und entstandener Schnitt.....	28
Abbildung 21: Schematische Darstellung der direkten und indirekten Immunmarkierung.....	34
Abbildung 22a: pT-Stadium und PSA Rezidiv.....	37
Abbildung 22b: pN-Status und PSA Rezidiv.....	38
Abbildung 22c: Gleason-Grade und PSA Rezidiv.....	38
Abbildung 22d: quantitativer Gleason-Grad und PSA Rezidiv.....	39
Abbildung 22e: IQ-Gleason und PSA Rezidiv.....	39
Abbildung 22f: Resektionsrand und PSA Rezidiv.....	40
Abbildung 23: muzinöses Adenokarzinom der Prostata schwach positiv.....	41
Abbildung 24: Adenokarzinom der Prostata schwach positiv.....	41
Abbildung 25: Adenokarzinom der Prostata mäßig stark gefärbt.....	42
Abbildung 26: muzinöses Adenokarzinom der Prostata mäßig stark gefärbt.....	42
Abbildung 27: Adenokarzinom der Prostata stark gefärbt.....	43
Abbildung 28: Adenokarzinom der Prostata stark gefärbt.....	43
Abbildung 29: Adenokarzinom der Prostata nicht gefärbt.....	44
Abbildung 30: GP2 und PSA Rezidive (alle Tumoren).....	46

Abbildung 31: GP2 und TMPRSS2-ERG Genfusion (nachgewiesen mittels IHC und FISH)...	47
Abbildung 32: GP2 und PSA Rezidiv in ERG positiven Tumoren (4 Kategorien).....	49
Abbildung 33: GP2 und PSA Rezidiv in ERG positiven Tumoren (3 Kategorien).....	49
Abbildung 34: GP2 und PSA Rezidiv in ERG negativen Tumoren (4 Kategorien).....	51
Abbildung 35: GP2 und PSA Rezidiv in ERG negativen Tumoren (3 Kategorien).....	51
Abbildung 36: GP2-Expression und Deletionen.....	54
Abbildung 37: GP2-Expression und Deletionen (ERG positive Tumoren).....	54
Abbildung 38: GP2-Expression und Deletionen (ERG negative Tumoren).....	55
Abbildung 39: GP2 RNA-Expression beim Prostatakarzinom.....	57
Abbildung 40: FISH Breakapart-Probe zum Nachweis der ERG und TMPRSS2 Gene.....	58
Abbildung 41: IHC Nachweis einer negativen und positiven ERG-Färbung.....	59



## 10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Bedeutung der einzelnen Gleason-Grade.....	11
Tabelle 2: Auszug des Patientenkollektivs für die Herstellung des Prostata TMAs.....	30
Tabelle 3: TMA Verlaufsdaten und Rezidive.....	31
Tabelle 4: Arbeitsschritte im Färbeprozess eines TMAs.....	33
Tabelle 5: Klassifikation der Färbeergebnisse.....	35
Tabelle 6: GP2 und Tumor Phänotyp.....	45
Tabelle 7: Phänotyp bei TMPRSS2-ERG-positiven Tumoren.....	48
Tabelle 8: Phänotyp bei TMPRSS2-ERG-negativen Tumoren.....	50
Tabelle 9: Multivariate Analyse (4 Szenarien).....	53

## 11. Erklärung des Eigenanteils an der Publikation

Vorgeschlagen wurde mir das Thema dieser Publikation von Herrn Prof. Dr. Guido Sauter mit der Fragestellung nach der prognostischen Relevanz des Proteins GP2 bei Prostatatumoren. Die dazugehörige Literaturrecherche wurde von mir durchgeführt. Da die Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf über eine große Prostata-Datenbank verfügt, hatte ich ein großes Patientenkollektiv für diese Fragestellungen zur Verfügung. Über 17.000 Prostatakarzinome in Form von 39 TMA-Blöcken wurden immunhistochemisch mit GP2-Antikörpern vom TMA-Labor eingefärbt nach vorgegebenem Schema. Ich untersuchte die über 17.000 Stenzen unter dem Mikroskop und vergab an jede einzelne Prostatastanze einen Grad der Färbeintensität (0,1,2,3) mit dazugehörigem prozentualen Anteil des eingefärbten Tumors pro Stanze. Nach abschließender Validierung meiner Grade durch Herrn Prof. Dr. Guido Sauter erfolgt die eigenhändige Erstellung einer Datenbank für die statistische Weiterverarbeitung. Herr Prof. Dr. Ronald Simon unterstützte mich in der Statistik mit den dazugehörigen Abbildungen. Die Auswertung der Ergebnisse, die Verfassung und die Einreichung dieser Dissertation erfolgt unter Anleitung meines Doktorvaters.

## 12. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe, insbesondere ohne entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten, 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. Das gilt insbesondere auch für alle Informationen aus Internetquellen.

Soweit beim Verfassen der Dissertation KI-basierte Tools („Chatbots“) verwendet wurden, versichere ich ausdrücklich, den daraus generierten Anteil deutlich kenntlich gemacht zu haben. Die „Stellungnahme des Präsidiums der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) zum Einfluss generativer Modelle für die Text- und Bilderstellung auf die Wissenschaften und das Förderhandeln der DFG“ aus September 2023 wurde dabei beachtet.

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

Datum

Unterschrift

## 13. Danksagung

In erster Linie möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Guido Sauter und Herrn Prof. Dr. Ronald Simon sowohl für die Ermöglichung dieser Dissertation als auch für ihre wissenschaftliche Unterstützung in der Umsetzung dieser Dissertation danken. Ein großes Dankeschön gilt es auch an das ganze Team des TMA-Labors und an die Pathologen/innen, sowie die Doktoranden der Pathologie auszusprechen. Jeder Einzelne hat dazu beigetragen, dass diese Arbeit zustande gekommen ist und ich eine unvergessliche Zeit in Erinnerung behalte.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie. Ohne meinen Ehemann Michael-Gerit und dessen Unterstützung mit unseren Kindern Thea-Marlene und Emil-Maximilian wäre mir die Möglichkeit des Beginns und des Beendens dieser Dissertation nicht gegeben gewesen. Danke auch an meine Mutter Teresa, die mir das ganze Studium und in der Ausführung der Dissertation immer hilfsbereit zur Seite stand und sich wann immer es nötig war um die Kinder gekümmert hat.