

Aus dem Institut für Anatomie II: Experimentelle Morphologie
(Direktor: Prof. Dr. U. Schumacher)
im Zentrum für Experimentelle Medizin
am Universitätskrankenhaus Eppendorf der Universität Hamburg

**LEKTIN- UND IMMUNHISTOCHEMISCHE MARKERANALYSE ZUR
PROGNOSEBESTIMMUNG BEIM PROSTATAKARZINOM**

Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
im Fachbereich der Humanmedizin
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Steffi Hesselbach
aus Halle (Saale)

Hamburg 2008

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 09.03.2009

Veröffentlicht mit der Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, die/der Vorsitzende: Prof. Dr. U. Schumacher

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: Prof. Dr. A. Erbersdobler

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter/in: Prof. Dr. Gabriele Rune

Widmung

Diese Arbeit möchte ich meiner Mutter Heidrun Hesselbach widmen, die mir wie eine Freundin ist, mir meine akademische Ausbildung ermöglicht hat und mich jederzeit mit Liebe, Geduld und Verständnis unterstützt hat.

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. Zielstellung	1
2. Einleitung	2
2.1. Das Prostatakarzinom	2
2.1.1 Epidemiologie und Ätiologie	2
2.1.2 Tumorlokalisation und Tumorausbreitung	4
2.1.3 Staging	6
2.1.4 Grading	8
2.2. Metastasierungsabläufe	9
2.3. Aufbau und Funktion der Zellmembran	10
2.4. Charakterisierung der Zuckerreste von Membranglykokonjuganten durch Lektine	11
2.5. Bedeutung der Glykosylierung von Membranproteinen für die Metastasierung	12
2.5.1 Das Zelladhäsionsmolekül CAECAM1	13
3. Material und Methoden	14
3.1. Untersuchungsmaterial	14
3.2. Voruntersuchung	14
3.3. Aufarbeitung des Untersuchungsmaterials	15
3.4. Lektinhistochemische Nachweismethode mit HPA, SNA-I, LCA und UEA-I	16
3.5. Lektinhistochemische Nachweismethode mit anti-HPA	18
3.6. Immunhistochemische Nachweismethode mit dem Antikörper 4D1/C2	19
3.7. Hämatoxylin-Eosin Färbung	21
3.8. Kontrollen	21
3.9. Auswertung der Färbungen, Datenerfassung und Datenbearbeitung	21
3.10. Statistische Auswertung	22
3.10.1 Univariate Analyse	22
3.10.2 Multivariate Analyse	23
3.10.3 Korrelation der Metastasierungsmarker	23

4. Ergebnisse	24
4.1. Auswertung des Lektin-Bindungsverhaltens	24
4.1.1 biotinyliertes HPA (direkte Methode)	24
Kaplan-Meier Analyse	25
Multivariate Cox Regressionsanalyse	25
4.1.2 natives HPA (indirekte Methode)	27
Kaplan-Meier Analyse	27
Multivariate Cox Regressionsanalyse	28
4.1.3 SNA-I	30
Kaplan-Meier Analyse	30
Multivariate Cox Regressionsanalyse	31
4.1.4 LCA	33
Kaplan-Meier Analyse	33
Multivariate Cox Regressionsanalyse	34
4.1.5 UEA-I	36
Kaplan-Meier Analyse	36
Multivariate Cox Regressionsanalyse	37
4.2. Auswertung des Bindungsverhaltens des Antikörpers 4D1/C2	39
Kaplan-Meier Analyse	39
Multivariate Cox Regressionsanalyse	40
5. Diskussion	42
5.1 Bedeutung des Lektinbindungsverhaltens	42
5.2 Bedeutung des Zelladhäsionsmoleküls CEACAM1	44
6. Zusammenfassung	46
7. Literaturverzeichnis & Bildquellen	47
9. Danksagung	54
10. Lebenslauf	55
11. Erklärung	56

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
Aqua dest.	Aqua destillata
°C	Grad Celsius
CEACAM 1	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1
Con A	Concanavalin A (Schwertbohnen Agglutinin)
CRD	Carbohydrate Recognition Domain
DAB	3,3-Diaminobenzidine chromogen Lösung
et al.	et alii (und andere)
Gal	Galaktose
GalNAc	N-Azetylgalaktosamin
GlucNAc	N-Azetylglukosamin
GNA	Galanthus nivalis Agglutinin (Schneeglöckchen Agglutinin)
HE	Hämatoxylin-Eosin
HHA	Hippeastrum Hybrid Agglutinin (Amaryllis Agglutinin)
HPA	Helix pomatia Agglutinin (Weinbergschnecken Agglutinin)
ISUP	International Society of Urological Pathology
kD	Kilodalton
L	Liter
LCA	Lens culinaris Agglutinin (Linsen Agglutinin)
LDH	Laktatdehydrogenase
LOA	Listera ovata Agglutinin (Orchideen Agglutinin)
LP	Lektinpuffer
MAA	Maackia amurensis Agglutinin (Asiatisches Gelbholz Agglutinin)
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
PAS-Reaktion	Perjodsäure Schiff Reaktion
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PHA-L	Phaseolus vulgaris Leukoagglutinin (Gartenbohnen Agglutinin)

PSA	Prostata-spezifisches Antigen
PZ	Periphere Zone
Sek.	Sekunde
SNA-I	Sambucus nigra Agglutinin I (Schwarzer Holunder Agglutinin)
TBS	Tris Buffered Solution (Trisgepufferte Kochsalzlösung)
TUR	Transurethrale Resektion
UEA-I	Ulex europaeus Agglutinin I (Stechginster Agglutinin)
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
WGA	Wheat Germ Agglutinin (Weizenkeim Agglutinin)
ZZ	Zentrale Zone
µg	Mikrogramm

1. ZIELSTELLUNG

Über prognostische Gradingmethoden beim Prostatakarzinom gibt es zurzeit keinen allgemeinen Konsens, zudem ist die prognostische Aussagekraft der bisher angewandten Methoden für die Überlebenswahrscheinlichkeit gering. Wie bei anderen häufigen malignen Tumoren auch, ist die Tumormetastasierung beim Prostatakarzinom zumeist die zum Tode führende Manifestation der Erkrankung. Daher ist es notwendig, die der Metastasierung zugrunde liegenden Mechanismen zu verstehen, um aus diesen Erkenntnissen auf neue Therapieansätze schließen zu können. Diese Arbeit soll dazu beitragen, den metastatischen Phänotyp des Prostatakarzinoms näher zu charakterisieren und mögliche Frühindikatoren für eine Metastasierung zu ermitteln.

Folgende Fragen sollen in der vorliegenden Studie beantwortet werden:

1. Besteht für das Prostatakarzinom eine Korrelation zwischen der histochemischen Bindung verschiedener tierischer und pflanzlicher Lektine und dessen Prognose?
2. Besteht für das Prostatakarzinom eine Korrelation zwischen der immunhistochemischen Bindung des monoklonalen Antikörpers 4D1/C2 und dessen Prognose?
3. Bestehen Zusammenhänge zwischen Ligandenexpressionsmuster der untersuchten Gewebe einerseits, und den Tumorcharakteristika wie Staging, Grading, Metastasierung und PSA-Wert andererseits?
4. Sind diese Unterschiede zur Differenzierung verschiedener Tumorstadien verwertbar?
5. Lassen sich neue prognostische Faktoren hinsichtlich der Überlebenszeit der Patienten aus diesen histochemischen Daten ableiten?

2. EINLEITUNG

2.1 Das Prostatakarzinom

2.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Das Prostatakarzinom ist der häufigste maligne Tumor des Urogenitaltraktes des Mannes, der Häufigkeitsgipfel seiner Diagnosestellung liegt in der 7. und 8. Lebensdekade. Über 50% der Patienten mit diagnostiziertem Prostatakarzinom versterben innerhalb von 10 Jahren an diesem Karzinom [Tomschi, 1992]. Dabei zeigt die Inzidenz des Prostatakarzinoms starke rassische Unterschiede. Sie ist besonders niedrig bei Angehörigen der gelben Rasse und besonders hoch bei den in den USA lebenden Schwarzen (siehe Tabelle 1).

Rassenzugehörigkeit	Morbidität pro 100.000 EW
Kaukasier in Deutschland	28,5
Weißer Bevölkerung in den USA	41
Schwarze Bevölkerung in den USA	72
Japaner	3,4

Tabelle 1: Morbidität des klinisch manifesten Prostatakarzinoms in Abhängigkeit von der Rasse [nach Böcking und Riede 1995]

Sowohl Morbidität als auch Mortalität des Prostatakarzinoms zeigen in den letzten 10 Jahren eine ansteigende Tendenz. Folgende Manifestationsformen des Prostatakarzinoms lassen sich nach Weingärtner und Riedmiller [1998] unterscheiden:

- latentes Prostatakarzinom: Diese sind klinisch nicht manifest, symptomlos und werden nur zufällig anlässlich einer Autopsie entdeckt. Ihre Häufigkeit ist mit ca. 40% der über 50jährigen und 50% der über 80jährigen Männer erschreckend hoch. Histologisch handelt es sich um meist hoch differenzierte, niedrig maligne Tumoren.
- inzidentielles Prostatakarzinom: Tumoren, die zufällig histologisch entdeckt werden, wie in etwa 15% der wegen benignen Prostatahyperplasie durchgeführten transurethralen Resektionen. Histologisch zumeist hoch differenzierte Tumoren mit niedrigem Malignitätsgrad.

- klinisch manifestes Prostatakarzinom: rektal palpabler Tumor, mit oder ohne klinische Symptome. Histologisch handelt es sich meist um wenig differenzierte Tumoren mit hohem Malignitätsgrad. Metastasen können bereits vorliegen.
- okkultes Prostatakarzinom: Primärmanifestation des Tumors durch Metastasen, die anhand histologischer Untersuchungen als Prostatakarzinom identifiziert werden, ohne dass in der Prostata selbst der Primärtumor auffällig geworden wäre.

Die Prävalenz des Prostatakarzinoms ("Latentes Prostatakarzinom") ist um ein Vielfaches höher als die Inzidenz und steigt ebenso wie dieses mit zunehmendem Lebensalter an. Autopsiestudien zeigen, dass latente Prostatakarzinome bei etwa 30 bis 40% aller symptomlosen Männer über 50 Jahre nachweisbar sind [Stamey et al., 1982]. Für einen 50jährigen Mann mit latentem Prostatakarzinom beträgt das Risiko, dass das Karzinom zu einem späteren Zeitpunkt klinisch manifest wird, ungefähr 9,5%. Das Risiko, am Prostatakarzinom zu sterben liegt bei circa 2,9% [Scardino et al., 1992]. Der große Unterschied zwischen Inzidenz und Prävalenz ist für das Prostatakarzinom einzigartig und sonst bei keinem anderen humanen Malignom zu finden. Im Gegensatz zur Inzidenzrate, die regionale und ethnische Unterschiede aufweist, ist die Prävalenz bei allen Völkergruppen und Regionen nahezu gleich hoch.

Ätiologisch ist über das Prostatakarzinom wenig bekannt. Die Entdeckung von Steroidhormonrezeptoren im Prostatakarzinom läßt jedoch vermuten, dass Hormone bei der Entstehung des Tumors eine Rolle spielen. Der Einfluß von Hormonen auf das Wachstumsverhalten wird auch klinisch genutzt, wie zum Beispiel bei der erfolgreichen Behandlung des Karzinoms durch kontrase sexuelle Therapieformen. Ein weiterer Hinweis auf hormonelle Einflüsse ergibt sich aus der Tatsache, dass tierexperimentell Prostatakarzinome durch die Verabreichung von männlichen Hormonen induziert werden konnten [Klocker et al., 1994]. Epidemiologische und klinische Studien lassen jedoch vermuten, daß neben den hormonellen Faktoren auch andere Faktoren wie fettreiche Ernährung, Umwelteinflüsse und genetische Disposition eine Rolle spielen [Tumorzentrum Heidelberg/Mannheim, 1998]. Die Heritabilität des Prostatakarzinoms ist größer als beim Mammakarzinom, männliche Verwandte von Mammakarzinompatientinnen haben ebenfalls ein erhöhtes Prostatakarzinomrisiko [Steinberg et al., 1990].

Molekularpathologisch spielen bei der Prostatakarzinogenese folgende Faktoren zusammen: a) Überexpression des Proliferationsfaktors c-myc; b) Überexpression des für den Epithelwachstumsfaktor-Rezeptor kodierenden c-erbB-2, welches durch Androgene heraufreguliert wird; c) Allelverluste auf den Chromosomen 5q, 7q, 8p, 10q, 13q, 16q, 17p und 17q mit Beschädigung von Tumorsuppressor- und Differenzierungsgenen [Cher et al., 1996]; d) Prädispositionsgene mit Suszeptibilität für das Prostatakarzinom (HPC1) auf Chromosom 1 (1q24-25 und 1q42.12-43) [Smith et al., 1996; Berthon et al., 1998]; e) Veränderungen der Zytoskelettproteine mit Sekretionsstörung (z. B. saure Prostataphosphatase) werden ebenfalls vermutet.

2.1.2 Tumorlokalisierung und Tumorausbreitung

Die kastaniengroße Vorsteherdrüse (=Prostata) des gesunden Mannes mündet in die Urethra und umschließt den Harnblasengrund. Die Drüse läßt sich von außen nach innen in folgende drei Zonen gliedern: Außenzone (periphere Zone, PZ) --> Innenzone (zentrale Zone, ZZ) --> periurethrale Mantelzone (Übergangszone) (siehe Abbildung 1).

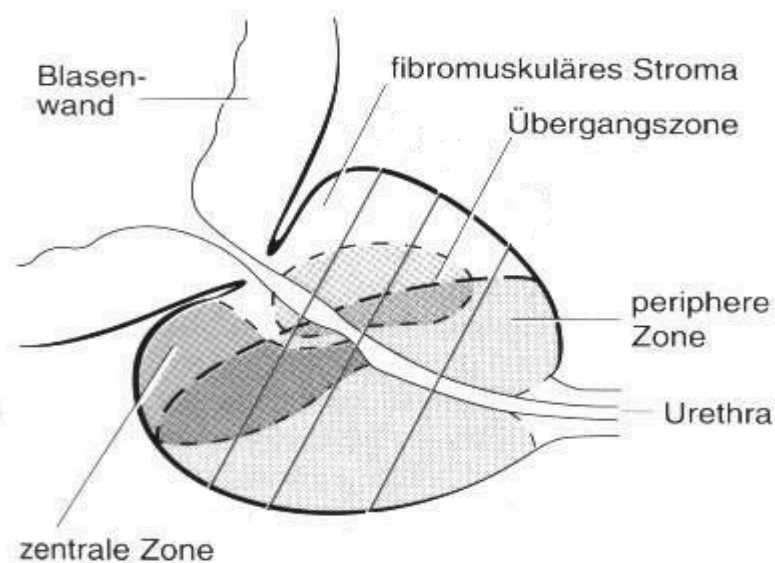


Abb.1: Zonale Gliederung der Prostata [nach Rutishauser und Gasser, 2002]

Diese Einteilung der Drüse in verschiedene Regionen ist für das Prostatakarzinom von Bedeutung, da die unterschiedlichen Anteile verschieden häufig Sitz der Prostatakarzinome sind. Die klinisch tastbaren Karzinome entstehen fast ausnahmslos in der PZ, die inzidentiellen (= zufällig histologisch entdeckten Karzinome), meist durch TUR diagnostizierten, hingegen in der ZZ. Karzinome der PZ sind aggressiver als die

der ZZ, allerdings können letztere schneller die prostatistische Urethra und den Blasen Hals infiltrieren. Im Bereich der Basis (zentrale Zone nach McNeal) entstehen Karzinome äußerst selten (< 4%). Prostatakarzinome entstehen zudem meist multizentrisch (4 bis 5 separate Herde) [Mostofi et al., 1993].

Histologisch handelt es sich bei 97% aller Prostatamalignome um Adenokarzinome. Diese bilden verschiedene Wachstumsmuster und kommen entweder in Form eines 1) hochdifferenzierten glandulären, 2) wenig differenzierten glandulären, 3) kribriformen, 4) soliden oder 5) endometrioiden Karzinoms vor (5 Malignitätsgrade) [Mostofi et al., 1993, Schmidt et al., 1994]. Dabei haben die hochdifferenzierten glandulären eine niedrige, die soliden Prostatakarzinome eine hohe Malignität. Bei den meisten Prostatakarzinomen findet man mehrere dieser Wachstumsmuster nebeneinander (= pluriforme Karzinome). Sowohl im histologischen Schnitt als auch am zytologischen Ausstrichpräparat ist eine dreistufige Malignitätsgradierung möglich. Der Tumor wird immer nach dem am wenigsten differenzierten Anteil benannt. Histologische Sonderformen des Prostatakarzinoms sind das Transitionalzellkarzinom, das Plattenepithelkarzinom, das schleimbildende Karzinom und das neuroendokrine Karzinom (siehe Tabelle 2).

I. Uniforme Karzinome	
1. Gewöhnliche Karzinome	2. Ungewöhnliche Karzinome
<ul style="list-style-type: none"> a) Adenokarzinom <ul style="list-style-type: none"> i) mikroglandulär ii) makroglandulär iii) kribriform iv) solide v) endometrioid 	<ul style="list-style-type: none"> a) Übergangszellkarzinom b) Plattenepithelkarzinom c) Schleimbildendes Karzinom <ul style="list-style-type: none"> i) papilläres ii) zystadenoides iii) Siegelringzellkarzinom d) Neuroendokrines (kleinzelliges anaplastisches Karzinom)
3. Undifferenzierte (nichtklassifizierbare) Karzinome	
II. Pluriforme Karzinome	
<ul style="list-style-type: none"> 1. Kombination verschiedener Subtypen des gewöhnlichen Karzinoms 2. Kombination von 1 und 2 	

Tabelle 2: Histologische Klassifikation des Prostatakarzinoms [Modifizierte WHO-Klassifikation, 1994]

2.1.3 Tumorstaging

Pathologische Vergleichsuntersuchungen an Präparaten radikaler Prostatektomien zeigten, dass die Tumorausbreitung zunächst intraprostatisch in der äußeren und mittleren Organzone (pT2) erfolgt. Der periurethrale, innere Drüsenbereich wird erst gegen Ende der intraprostatischen Ausbreitung infiltriert. Erst in diesem fortgeschrittenen Stadium kommt es deshalb zur Harnwegsobstruktion mit Behinderung der Miktion. Dieses Symptom ist somit für eine Frühdiagnose untauglich. Zu einer Invasion der Kapsel kann es schon in einem früheren Stadium des Tumors kommen, was prognostisch nicht von Bedeutung ist, da die Kapsel eine gewisse anatomische Barriere darstellt. Erst in einem späteren Stadium erfolgt eine Kapselpenetration mit Infiltration von Samenblase und Blasenboden. Dies bedeutet eine signifikante Verschlechterung der Prognose [Helpap und Weissbach 1984]. Die lymphogene Metastasierung erfolgt primär zu den internen iliakalen, später zu den extrapelvinen und retroperitonealen Lymphknoten. Typische Lokalisationen für Fernmetastasen sind Lendenwirbelsäule, Femur, Becken, Brustwirbelsäule und Rippen [Fischer et al., 1997].

Zum Staging hat sich das TNM-System, welches auch von der UICC übernommen wurde, bewährt [Hermanek et al., 1993].

T beschreibt die Größe des Primärtumors, **N** gibt die Zahl und die Lokalisation der befallenen Lymphknoten an, **M** beschreibt Auftreten und Lokalisation von Fernmetastasen.

TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
T1	Klinisch nicht erkennbarer Tumor, der weder tastbar noch in bildgebenden Verfahren sichtbar ist
T1a	Tumor zufälliger histologischer Befund ("incidental carcinoma") in 5% oder weniger des resezierten Gewebes
T1b	Tumor zufälliger histologischer Befund ("incidental carcinoma") in mehr als 5% des resezierten Gewebes
T1c	Tumor mittels Nadelbiopsie diagnostiziert (z. B. wegen PSA-Erhöhung)
T2	Tumor auf die Prostata begrenzt
T2a	Tumor befällt eine Hälfte eines Lappens oder weniger
T2b	Tumor befällt mehr als die Hälfte eines Lappens, aber nicht beide Lappen
T2c	Tumor befällt beide Lappen
T3	Tumor breitet sich durch die Prostatakapsel hindurch in extrakapsuläres Gewebe aus
T3a	Extraprostatische Ausbreitung, einseitig oder beidseitig
T3b	Tumor infiltriert die Samenblase
T4	Tumor ist fixiert oder infiltriert andere benachbarte Strukturen als Samenblasen Tumor infiltriert Blasen Hals, Sphincter externus und/oder Rektum Tumor infiltriert Levatormuskel und/oder ist an Beckenwand fixiert
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine Lymphknotenmetastasen
N1	Metastasen in solitärem Lymphknoten, 2 cm oder weniger in größter Ausdehnung
N2	Metastase(n) in solitärem Lymphknoten mehr als 2 cm aber nicht mehr als 5 cm in größter Ausdehnung
N3	Metastasen in Lymphknoten, mehr als 5 cm in größter Ausdehnung
MX	Organmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	Keine Organmetastasen
M1	Organmetastasen / Knochenmetastasen
M1a	Metastasen in nicht-regionären Lymphknoten
M1b	Metastasen im Knochen
M1c	Metastasen an anderen Stellen des Körpers

Tabelle 3: TNM-Klassifikation bei Prostatakarzinom (nach UICC, 6. Aufl. 2002)

2.1.4 Tumorgrading

Für die Beurteilung des Malignitätsgrades beim Prostatakarzinom existieren derzeit mehrere Gradingmethoden. Fest steht jedoch, dass alle gängigen Methoden schwer reproduzierbar und mit einer hohen inter- und intra-observer-Fehlerrate behaftet sind [Mostofi, Sesterhenn, Davis et al., 1993]. Die prognostische Aussagekraft aller Methoden ist für die Rezidivfreiheit gut, für die Überlebenswahrscheinlichkeit aber gering. Selbst das 1966 entworfene Grading nach Gleason ist eine fehlerbare Methode [Gallee et al., 1990], stellt jedoch nach Verfeinerungen [Gleason 1977, Mellinger 1977] sowie nach Überarbeitung durch die ISUP-Konferenz 2005 das akzeptierteste Grading-System weltweit dar [Epstein et al., 2005]. Die Einteilung nach Gleason umfasst 5 Grade, wobei Grad 1 die am besten differenzierten Tumoren und Grad 5 die am schlechtesten differenzierten Tumoren beschreibt. Der Gleason-Score wird aus den beiden vorherrschenden Wachstumsmustern gebildet.

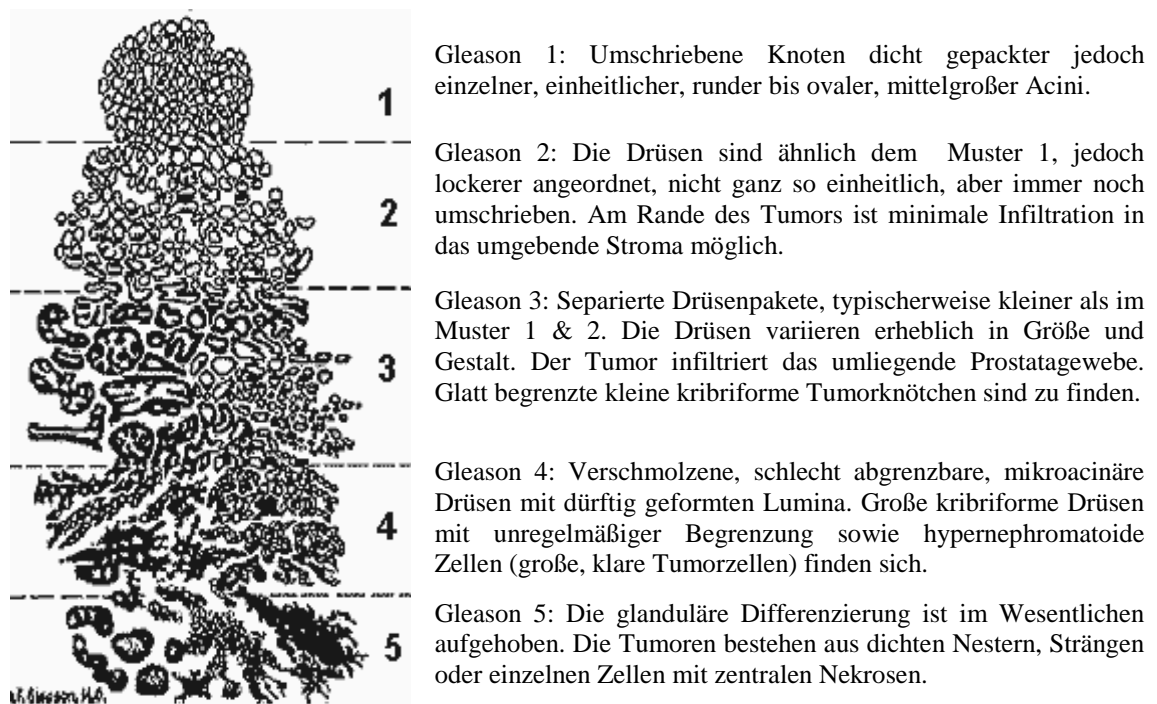


Abb. 2: Modifiziertes Gleason-Score-System der ISUP-Konferenz 2005

Eine ebenfalls gut reproduzierbare (90% Übereinstimmung) und international anerkannte Methode ist das histologische Grading des deutschen Arbeitskreises "Prostatakarzinom" [Helpap, 1989]. Jedoch auch bei Anwendung gut reproduzierbarer Methoden ist eine Übereinstimmung zwischen Beurteilung der Biopsie und des

endgültigen Resektates bestenfalls in 35% der Fälle gegeben. Eine ganze Reihe zusätzlicher prognostischer Merkmale können derzeit nur mit großem zeitlichem und technischem Aufwand bestimmt werden. So zum Beispiel:

- Das Tumolvolumen, welches entweder mit bildgebenden Verfahren oder morphometrisch bestimmt wird (beide Methoden sind allerdings sehr ungenau). Karzinome mit einem Vol < 4 ml haben eine gute, solche mit Vol > 12 ml eine besonders schlechte Prognose [Mostofi et al., 1993].
- DNA-Zytometrie: Diploide Karzinome haben eine allgemein bessere Prognose als aneuploide. Die Ploidie ist ein unabhängiger prognostisch-therapeutischer Parameter bei adjuvanter Hormontherapie [Zincke et al., 1992]
- Neoangiogenese: Histologisch werden in der Umgebung des Karzinoms Gefäße ausgezählt. Die Anzahl der Gefäße pro Flächeneinheit ist ein unabhängiger und sehr zuverlässiger Parameter der Tumorprogression. Stark vaskularisierte Karzinome neigen zur Progression und Metastasierung [Weidner et al., 1993].

2.2 Metastasierungsabläufe

Die Metastasierung erfolgt lymphogen in iliakale, retroperitoneale und paraaortale Lymphknoten, hämatogen vor allem retrograd über den prävertebralen Venenplexus in Wirbelsäule, Femur und Beckenknochen, fernen auch in Leber und Lunge. 90 % der Knochenmetastasen sind vom osteoblastischem Typ [Fitzpatrick und Krane, 1989].

Wie bei anderen häufigen malignen Tumoren auch, ist die Tumormetastasierung beim Prostatakarzinom die zum Tode führende Manifestation der Erkrankung. Die Tumormetastasierung gleicht einer Kaskade, bei welcher jeweils ein Schritt in genau definierter Reihenfolge von einem weiteren Schritt gefolgt wird, bis es schließlich zur klinisch manifesten Metastase kommt. Der erste Schritt dieser Metastasierungskaskade beginnt mit der Proliferation des malignen Klons am Ort des Primums. Ist eine bestimmte Tumormasse erreicht, bewirken angiogene Faktoren das Einwachsen von Blutgefäßen. Vitale Tumorzellen lösen sich dann aus dem Zellverband und dringen in die umgebende extrazelluläre Matrix ein. Im Folgenden penetrieren diese Tumorzellen die Basalmembran und das Endothel der Tumorblutgefäße und gelangen in den Blutkreislauf. Eine erfolgreiche Metastasierung erfolgt dann, wenn die Tumorzellen im Blutstrom überleben, sich an das Gefäßendothel des Zielorgans anheften und dieses

und die darunter liegende Basalmembran durchwandern. Kommt es zur Einnistung und Proliferation der Tumorzellen im Gewebe des Zielorgans entsteht eine klinisch manifeste Metastase [Hart und Saini 1992, Engers und Gabbert 1998, Hart et al., 1989]. Grundlage dieser beschriebenen Prozesse sind Zell-zu-Zell und Zell-zu-Matrix Interaktionen zwischen den Tumorzellen einerseits und dem umgebenden Gewebe andererseits. Deshalb spielen der Aufbau und die Zusammensetzung der Zellmembran, die diese Interaktionen vermittelt, bei der Metastasierung eine entscheidende Rolle.

2.3 Aufbau und Funktion der Zellmembran

Säugetierzellen, maligne Tumorzellen eingeschlossen, tragen auf ihrer Zelloberfläche eine Glykokalix, welche aus Kohlenhydraten besteht. Diese Kohlenhydrate sind kovalent an Lipide, Proteine und an die Proteincore von Glykosaminoglykanen gebunden, welche in die Zellmembran integriert sind. Die nahezu ausschließliche Lokalisation der Zucker an der Zelloberfläche legt die Vermutung nahe, dass diese Kohlenhydrate an Zell-zu-Zell und Zell-zu-Matrix Interaktionen beteiligt sind und eine Reihe von wichtigen biologischen Prozessen, darunter die Anheftung von Krebszellen im Gewebe während der Aussaat von bösartigen Tumoren im Körper, sowie die Haftung von Mikroorganismen an der Oberfläche von Haut und Schleimhäuten vermitteln.

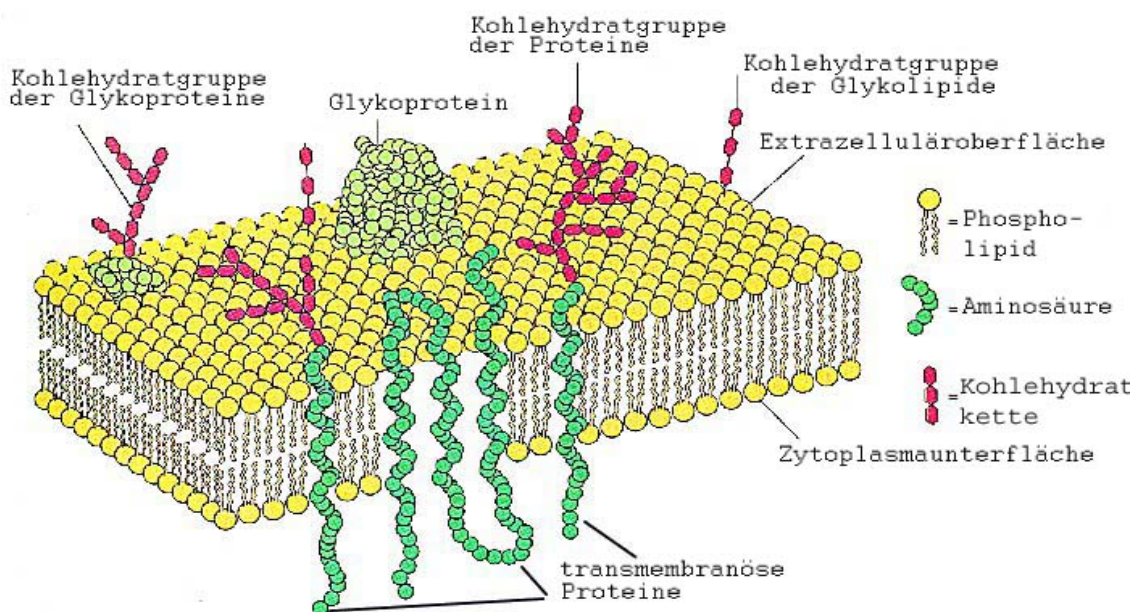


Abb.3: Aufbau der Zellmembran [nach Wolfe, 1993]

2.4 Charakterisierung der Zuckerreste von Membranglykokonjugaten durch Lektine

Die auf der Zelloberfläche vorkommenden und funktionell bedeutsamen Kohlenhydrate können durch das Bindungsverhalten von Lektinen charakterisiert werden. Lektine sind Proteine oder Glykoproteine, die sich an Zuckermoleküle binden, ohne diese chemisch zu verändern. Lektine sind nicht immunologischer Herkunft, und können Zellen agglutinieren und/oder Glykoproteine präzipitieren. Der Name Lektin leitet sich aus dem Lateinischen *legere* (auswählen, sortieren) ab und wurde von Boyd und Shapleigh [1954] geprägt. Lektine verfügen über Kohlenhydraterkennungsdomänen (CRDs = carbohydrate recognition domains), über die sie nicht-kovalente Bindungen mit den für sie spezifischen Kohlenhydraten eingehen können. Diese Eigenschaft der Lektine, definierte Kohlenhydrate zu binden, hat Bedeutung in der Tumorforschung gewonnen. Trotz gewisser Unsicherheiten bezüglich ihrer chemischen Charakterisierung werden Lektine in den letzten Jahrzehnten in steigendem Umfang in der medizinischen Grundlagenforschung eingesetzt. Sie eignen sich, um bestimmte Zelltypen oder Zellfragmente (z. B. Membrantypen) zu charakterisieren, Zellen in verschiedenen Entwicklungsstadien zu erkennen, normale von Tumorzellen zu unterscheiden, die verschiedenen Phasen des Zellzyklus zu markieren und verschiedene Zelltypen affinitätschromatographisch voneinander zu trennen. Durch die Anwendung von Lektinen konnten die mit der malignen Transformation einhergehenden Veränderungen der Zelloberflächenkohlenhydrate charakterisiert werden. Hierbei erwies sich vor allem das Lektin aus der Weinbergschnecke, *Helix pomatia* Agglutinin (HPA), als guter prognostischer Indikator bei verschiedenen malignen Erkrankungen. So konnte in einer Reihe von Untersuchungen eine positive Assoziation zwischen der Bindung von HPA an Primärtumorzellen des kolorektalen Karzinoms [Ikeda et al., 1994; Schumacher et al., 1994], des Prostatakarzinoms [Shiraishi et al., 1992], des Mammakarzinoms [Leathem und Brooks, 1987], des bronchialen Adenokarzinoms [Laack et al., 2002], sowie des Magenkarzinoms [Kakeji et al., 1991] und einer schlechten Prognose für die erkrankten Patienten gezeigt werden. Eine solche positive Assoziation zwischen Lektinbindung und schlechter Prognose konnte nicht nur für HPA, sondern auch für eine Reihe weiterer Lektine aufgezeigt werden. Für *Sambucus nigra* Agglutinin (SNA-I) und *Maackia amurensis* Agglutinin (MAA) zum Beispiel konnte ein Zusammenhang

zwischen Bindungsverhalten an den Primärtumor von kolorektalen Karzinomen und der Prognose gezeigt werden [Vierbuchen, Fruechtnicht, Brackrock et al., 1995]. Die Bindung des Lektins Phaseolus vulgaris Agglutinin (PHA-L) wies bei Mamma- und kolorektalen Karzinomen eine prognostische Relevanz auf [Fernandes et al., 1991]. Aus der europäischen Mistel (*Viscum album*) wurden drei verschiedene Lektine (ML-I,-III.-III) isoliert, die jeweils eine unterschiedliche Kohlenhydratspezifität aufweisen. In einer Untersuchung an Mammakarzinomen konnte gezeigt werden, dass Patientinnen, deren Tumoren ML-III-positiv waren, ein signifikant kürzeres rezidivfreies Intervall aufweisen als Patientinnen mit ML-III-negativen Primärtumoren. [Al-Alousi et al., 1990]. Der Nachweis der prognostischen Relevanz der Veränderungen der terminalen Kohlenhydrate wirft die Frage nach den dahinter stehenden molekularen Mechanismen auf, die bisher allerdings nur in Ansätzen geklärt sind [Dwek et al., 2001].

In allen Fällen kann der Nachweis der so entstandenen Konjugate durch Markierung des Lektins mit Biotinresten geführt werden, die dann über eine Avidin-Biotin-Reaktion sichtbar gemacht werden. Eine weitere Methode um die Träger der Glykostrukturen eines Gewebes darzustellen, besteht neben der Lektin histochemie in der Immunhistochemie.

2.5 Bedeutung der Glykosylierung von Membranproteinen für die Metastasierung

Grundsätzlich können Membranproteine und -lipide durch Glykosylierung in ihrer Funktion modifiziert werden. Bei der Metastasierung sind die membranständigen Zelladhäsionsmoleküle von besonderer Bedeutung, da ihre Modulation eine wichtige Rolle bei der Ablösung metastatischer Tumorzellen vom Primärtumor, bei der Bildung von Tumorzellaggregaten im Blutstrom, sowie bei der Anheftung an Gefäßendothelien des Zielorgans und bei der Bildung solider Metastasen spielt [Hart und Saini, 1992]. Im Hinblick auf die Zelladhäsionsmoleküle spielt die Glykosylierung der Membranproteine und der Glykolipide eine bedeutsame Rolle. So kann die Funktion der Zelladhäsionsmoleküle durch die Glykosylierung verändert werden. Damit hat die Glykosylierung einen direkten Einfluss auf die Funktion eines Zelladhäsionsmoleküls. Als Prototyp eines solchen glykosylierten Moleküls kann das CEACAM1, früher auch CD66a oder BGP genannt, gelten.

2.5.1 Das Zelladhäsionsmolekül CEACAM1

CEACAM1 ist ein Mitglied der CEA-Genfamilie des CD66 Clusters hochglykosylierter Adhäsionsmoleküle, die ihrerseits der Immunglobulin-Superfamilie angehören [Thompson et al., 1991]. Mindestens 35% des Molekulargewichtes von CEACAM1 (160 kD) wird durch die Glykosylierung bestimmt [Yoshimoto et al., 1989]. CEACAM1 weist ein breites Expressionsspektrum in humanen Epithelzellen auf. Seine Expression ist im Gastrointestinaltrakt, in der Niere, der Zervix uteri, im Endometrium und der Blase beschrieben worden [Prall et al., 1996]. In der myeloischen Reihe wird CEACAM1 hauptsächlich auf Granulozyten exprimiert, auf Lymphozyten konnte es bisher nur bei T-Zell-Leukämien und auf stimulierten T-Lymphozyten nachgewiesen werden [Hananberg et al., 1994; Kammerer et al., 1998]. Weiterhin wird CEACAM1 stark von invasiven Trophoblasten exprimiert [Bamberger et al., 1999] und weist bei Endothelzellen die Eigenschaft eines angiogenen Faktors auf [Ergün et al., 2000]. In einer Reihe von epithelialen Tumoren wird CEACAM1 hingegen eine tumorsuppressive Rolle zugeschrieben [Izzi et al., 1999]. Eine herunterregulierte Expression von CEACAM1 konnte beim Mammakarzinom [Riethdorf et al., 1997], beim kolorektalen Karzinom [Neumaier et al., 1993], sowie beim Prostatakarzinom [Luo et al., 1999] aufgezeigt werden. Eine Dysregulation von CEACAM1 ist für das Endometriumkarzinom beschrieben worden [Bamberger et al., 1998].

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Untersuchungsmaterial

Das Pathologische Institut des Universitätskrankenhauses Hamburg-Eppendorf verwahrt nach deren Staging und Grading in Paraffin eingebettete Blöcke von Prostatakarzinomen. Der Klinik für Urologie des Universitätskrankenhauses Hamburg-Eppendorf liegen Daten der klinischer Voruntersuchung sowie Nachuntersuchung über einen Zeitraum von 10 Jahren, oder bis zum Zeitpunkt des Versterbens der betroffenen Patienten vor. Aus diesen Blöcken wurden für Voruntersuchungen mit verschiedenen Lektinen und Antikörpern zunächst 10 und für die Hauptuntersuchung insgesamt 129 Blöcke für die Lektine SNA-I, LCA und UEA-I und insgesamt 157 Blöcke für die Lektine HPA und anti-HPA (siehe Tabelle 3) sowie für den Antikörper 4D1/C2 für lektinhistochemische und immunhistochemische Nachweise aufgearbeitet und gefärbt. Für fünf der untersuchten Präparate lagen im Pathologischen Institut keine vollständigen Daten zu Nachuntersuchungen vor, womit demnach 124 bzw. 152 Tumoren für die Auswertung zur Verfügung standen, welche alle von unterschiedlichen Patienten stammten. Für diese Prostatakarzinome konnte anhand vollständiger Krankenblätter der jeweiligen Patienten das Patientenalter beim Zeitpunkt der Operation, der präoperative PSA Wert, das Karzinomvolumen, das Volumen an niedrig differenziertem Tumor (Gleason 4), der Gleason-Score der Biopsie vor Operation, der postoperative Gleason-Score am Prostatektomiepräparat, das pathologische Stadium des Prostatektomiepräparates, der Lymphknotenstatus sowie das Auftreten von Metastasen ermittelt und daraufhin mit der Lektin- und Antikörperexpression verglichen werden.

3.2 Voruntersuchung

Es wurden zunächst zehn Prostatakarzinome, fünf mit guter und fünf mit schlechter Prognose, lektinhistochemisch mit den Lektinen LOA, ConA, LCA, UEA-I, MAA, GNA, SNA-I, HHA, PHA-L, HPA und anti-HPA sowie immunhistochemisch mit dem Antikörper Mab 4D1/C2 gegen CAECAM1 und einem Antikörper gegen den Zucker Sialyl-Lewis-X gefärbt. Eine lichtmikroskopische Auswertung sollte zeigen, ob sich Unterschiede im Bindungsverhalten der einzelnen Lektine und Antikörper in

Abhängigkeit von der Tumorprognose und Metastasierungsrate andeutungsweise erkennen lassen. Unterschiedliche Bindungsintensität zwischen Tumoren mit guter und Tumoren mit schlechter Prognose zeigte sich für die Lektine LCA, UEA-I, SNA-I, HPA und anti-HPA sowie den Antikörper 4D1/C2, worauf diese zur Hauptuntersuchung von insgesamt 124 Präparaten ausgewählt wurden. Nach Auswertung dieser 124 Färbungen ließ sich für die Lektine HPA und anti-HPA sowie für den Antikörper 4D1/C2 kein richtungsweisendes Ergebnis erkennen, so dass hierfür weitere 28 Färbungen angefertigt wurden und somit für HPA, a-HPA und 4D1/C2 152 Färbungen zur Auswertung zur Verfügung standen.

Herkunftsspezies	Lektin (Abkürzung)	Zuckerspezifität
<i>Helix pomatia</i> (Weinbergschnecke)	Helix pomatia- Agglutinin (HPA)	N-Azetylgalaktosamin /N- Azetylglukosamin
<i>Sambucus nigra</i> (Schwarzer Holunder)	Sambucus nigra-Agglutinin (SNA-I)	Neuraminsäure
<i>Lens culinaris</i> (Linse)	Lens culinaris-Agglutinin (LCA)	alpha-D-Glukose /alpha-D- Mannose
<i>Ulex europaeus</i> (Stechginster)	Ulex europaeus- Agglutinin (UEA-I)	alpha-L-Fukose

Tabelle 4: Herkunft und Kohlehydratspezifität der verwendeten Lektine

3.3 Aufarbeitung des Untersuchungsmaterials

Für die lektin- und immunhistochemischen Untersuchungen wurden histologische Schnitte mit einer Dicke von 6 µm angefertigt. Diese Schnitte wurden auf Ädhäsivobjektträger (Histobond, Firma Marienfeld, Bad Mergentheim, Deutschland) aufgebracht. Eine Vielzahl der Präparate war so groß, dass entsprechend größere Objektträger mit Silan selbst beschichtet werden mußten, da Histobond Objektträger in Übergrößen nicht käuflich zu erwerben sind. Die Trocknung der Schnitte erfolgte in einem Brutschrank bei 37° C über Nacht.

Im Anschluss daran wurden die Schnitte für zwei mal 5 min im Xylolbad (Xylol-Ersatz XEM-200, Vogel GmbH & Co KG, Gießen) geschwenkt und in einer absteigender Alkoholreihe entparaffiniert und rehydriert (siehe Tabelle 1). Somit standen die Schnitte für die folgenden Färbungen und Reaktionen bereit.

Schritt	Ethanol	Zeit
1	100 %	3 min
2	100 %	5 min
3	96 %	5 min
4	70 %	5 min
5	50 %	5 min
6	Aqua dest.	2 min

Tabelle 5: Entparaffinierung der Schnitte in absteigender Ethanolreihe

Zur lichtmikroskopischen Auswertung der lektin- und immunhistochemisch gefärbten Schnitte ist eine kontrastreiche Färbung der Gewebe erforderlich. Aus diesem Grund wurde die Gegenfärbung (Kernfärbungen) der Präparate mit Mayers Hämalaun /Eisenhämatoxylin durchgeführt, welche die Zellkerne unter Verstärkung des Kontrastes zwischen Drüsenanteilen und Bindegewebe blau färbte.

3.4 Lektin histochemische Nachweismethode mit HPA, SNA-I, LCA und UEA-I

Die Weiterbehandlung der Schnitte erfolgte nach dem Protokoll für Lektin histochemie mit alkalischer Phosphatase (alle Lektine stammen von der Fa. Sigma, Dreisenhofen, Deutschland):

- Vorbehandlung der Präparate mit 0,1% Trypsin (Sigma, St. Louis, Missouri, USA) (0,1 g Trypsin/100 ml Lektinpuffer) im Wasserbad bei 37° C für 15 min
- Stoppen der Reaktion in fließend kalten Leitungswasser für 10 min
- Spülen in Lektinpuffer für 2 x 5 min
- Inkubation mit Lektin-Biotin (Verdünnung 10 µg Lektin/ 1 ml Puffer) in feuchter Kammer bei Raumtemperatur für 1 Stunde

- Ansetzen des Alkalischen Phosphatase konjugiertem Avidin-Biotin-Komplexes (Vectastain, ABC-AP kit, Vektor, Burlingame, Kalifornien, USA)
20 µl Reagenz A in 5 ml Puffer + 20 µl Reagenz B (30 min vor Gebrauch ansetzen)
- Spülen der Schnitte in Lektinpuffer für 3 x 5 min
- Inkubation mit dem Alkalischen Phosphatase konjugiertem Avidin-Biotin-Komplex für 30 min
- Spülen in Lektinpuffer für 3 x 5 min
- Entwicklung der Alkalischen Phosphatase im Dunkeln (Ansatz der Reagenzien erst unmittelbar vorher) für 30 min
- Spülen der Schnitte in fließendem Leitungswasser für 5 min
- Gegenfärbung mit Mayer´s Hämalaun (1:1 in Aqua dest.) für 15 Sek
- Bläuen der Schnitte durch Spülen in fließendem Wasser für 5 min
- Objektträger um Präparat herum trocken tupfen und 2-3 Tropfen wasserhaltiges Einschlußmittel Crystal Mount (Fa. Biomed, Foster City, Kalifornien, USA) auf dem Schnitt verteilen
- Trocknen bei 70° C für 15 min
- Eindeckeln der abgekühlten Objektträger mit Clarion (Fa. Biomed, Foster City, Kalifornien, USA)

	für 10 Liter	mMol
Trizma Base	60,57 g	50
NaCl	87,09 g	150
MgCl ₂	2,032 g	1
CaCl ₂	1,01 g	1
HCl 2n bis pH 7,6	~200 ml	

Tabelle 6: Zusammensetzung des Lektinpuffers
(Reagenzien der Fa. Sigma, Dreisenhofen, Deutschland)

3.5 Indirekte lektinhistochemische Nachweismethode mit anti-HPA

Die Weiterbehandlung der Schnitte erfolgte hierfür nach dem Protokoll für Lektinhistochemie nach der indirekten Methode:

- Vorbehandlung der Präparate mit Protease XXIV (Sigma, St. Louis, Missouri, USA) (40 mg/ 100 ml Puffer) bei 37° C für 15 min
- Stoppen der Reaktion in fließend kalten Leitungswasser für 10 min
- Spülen in Lektinpuffer für 2 x 5 min
- Hemmung der endogenen Peroxidase mit 3% H₂O₂ in Methanol für 20 min
- Spülen in Lektinpuffer für 2 x 5 min
- Inkubation mit nativem HPA (Verdünnung 1:100) in feuchter Kammer bei Raumtemperatur für 1 Stunde
- Spülen der Schnitte in Lektinpuffer für 3 x 5 min
- Abdecken der Schnitte mit Schweine-Normalserum (Verdünnung 1:5) für 30 min
- Nach Abgießen des Serums Inkubation der Schnitte mit anti-HPA (Verdünnung 1:200) über Nacht
- Spülen in Lektinpuffer für 3 x 5 min
- Inkubation mit Schwein-Anti-Kaninchen-Ig (Verdünnung 1:200) für 30 min
- Ansetzen des Peroxidase konjugierten Avidin-Biotin-Komplexes (Vectastain, ABC-Elite kit, Vektor, Burlingame, Kalifornien, USA)
20 µl Reagenz A in 5 ml Puffer + 20 µl Reagenz B (30 min vor Gebrauch ansetzen)
- Spülen der Schnitte in Lektinpuffer für 3 x 5 min
- Behandlung der Schnitte mit dem Peroxidase konjugiertem Avidin-Biotin-Komplex für 30 min
- Spülen der Schnitte in Lektinpuffer für 2 x 5 min
- Darstellen der Peroxidase mit DAB (0,5 mg/ 1 ml Puffer + 6 µl H₂O₂) für 10 min
- Spülen in destilliertem Wasser für 5 min
- Gegenfärbung mit Mayer's Hämalaun (1:1 in Aqua dest.) für 15 Sek
- Bläuen der Schnitte durch Spülen in fließendem Wasser für 5 min
- Dehydrieren der Schnitte in aufsteigender Alkoholreihe
- Eindeckeln der Objektträger mit Eukit (Fa. Kindler, Freiburg, Deutschland)

3.6 Immunhistochemische Nachweismethode mit dem monoklonalen Antikörper 4D1/C2

Eine Methode um die Proteine der Glykostrukturen eines Gewebes darzustellen, besteht in der Immunhistochemie. Zu diesem Zwecke wurde der in Mäusen gezüchtete monoklonale Antikörper 4D1/C2 gegen das Zelladhäsionsmolekül CEACAM1 verwendet. Dieser Antikörper wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. C. Wagener aus der Abteilung für Klinische Chemie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf zur Verfügung gestellt. Der mononukleare Antikörper 4D1/C2 wurde gemäß etablierter Methoden hergestellt, aufgereinigt und auf seine Spezifität hin getestet [Ebrahimnejad et al., 2000].

Die Weiterbehandlung der Schnitte erfolgte nach dem Protokoll für Immunhistochemie:

- Vorbehandlung mit Protease XXIV (Fa. Sigma, St. Louis, Missouri, USA) (40 mg/ 100 ml Trispuffer) im Wasserbad bei 37° C für 10 min
- Spülen in Trispuffer für 3 x 5 min
- Hemmung der endogenen Peroxidase mit 0,3% H₂O₂ Methanol für 20 min (1 ml 30% H₂O₂/ 100 ml Methanol)
- Spülen in Trispuffer für 3 x 5 min
- Blockieren unspezifischer Bindungen durch Inkubation mit Kaninchen-Normalserum (Verdünnung 1:10) für 30 min in feuchter Kammer
- Durch Schrägstellung der Schnitte das Serum ablaufen lassen
- Inkubation mit monoklonalem Antikörper 4D1/C2 (8 µg/ 1 ml Dako-Reagenz) in feuchter Kammer bei 4° C im Kühlschrank über Nacht
- Am nächsten Tag: Spülen der Schnitte in Trispuffer für 3 x 5 min
- Inkubation mit sekundärem Antikörper (biotinyliert, Kaninchen-Anti-Maus, Verdünnung 1:40) für 20 min
- Ansetzen des Peroxidase konjugierten Avidin-Biotin-Komplexes (Vectastain, ABC-Elite kit, Vektor, Burlingame, Kalifornien, USA)
20 µl Reagenz A in 5 ml Puffer + 20 µl Reagenz B (30 min vor Gebrauch ansetzen)
- Spülen in Trispuffer für 3 x 5 min
- Inkubation mit dem Peroxidase konjugiertem Avidin-Biotin-Komplex für 20 min

- Spülen in Trispuffer für 3 x 5 min
- Darstellung der Peroxidase mit DAB für 10 min:
1 ml DAB als Stammlösung (5 mg/ 1 ml) + 9 ml Trispuffer + 60 µl H₂O₂
- Spülen in H₂O dest. zum Abstoppen der Farbreaktion für 5 min
- Gegenfärbung mit Mayer´s Hämalaun (1:1 in Aqua dest.) für 15 Sek
- Bläuen der Schnitte durch Spülen in fließendem Wasser für 5 min
- Dehydrieren in aufsteigender Ethanolreihe (siehe Tabelle 8)
- Eindeckeln der Schnitte mit Eukitt (Fa. Kindler, Freiburg, Deutschland)

	für 10 Liter	mMol
Trizma Base Sigma	60,57 g	50
NaCl	87,09 g	150
HCl 2n bis pH 7,6	~200 ml	

Tabelle 7: Zusammensetzung des Trispuffers für die Immunhistochemie
(Reagenzien der Fa. Sigma, Dreisenhofen, Deutschland)

Schritt	Ethanol	Zeit
1	70 %	15 Sek
2	96 %	30 Sek
3	96 %	30 Sek
4	100 %	5 min
5	100 %	5 min
6	Xylol	5 min
7	Xylol	5 min

Tabelle 8: Dehydrieren der Schnitte in der aufsteigenden Ethanolreihe

3.7 Hämatoxylin-Eosin Färbung

Die histologische Beurteilung der Prostatatumoren bezüglich ihrer Differenzierung (Grading nach Gleason) und die Bestimmung des Karzinomvolumens erfolgten an Hämatoxylin-Eosin gefärbten Schnitten (HE-Färbung). Diese wurde in einem Färbeautomaten (Varistain, Shandon, Frankfurt, Deutschland) nach einem Standardprotokoll durchgeführt. Die in Xylol entparaffinierten und über eine absteigende Alkoholreihe rehydrierten Schnitte wurden für drei Minuten in Hämatoxylin und nach Spülen in destilliertem Wasser für ebenfalls drei Minuten in Eosin inkubiert. Nach Spülung in destilliertem Wasser wurden die Schnitte über eine aufsteigende Alkoholreihe dehydriert, abschließend in Xylol gespült und mit Eukit (Kindler, Freiburg, Deutschland) eingedeckelt.

3.8 Kontrollen

Schnitte für positive und negative Kontrollen wurden gemeinsam mit den zu untersuchenden Präparaten mitgeführt, um die Zuverlässigkeit der Ergebnisse in jeder Serie zu sichern. In den vorliegenden Meßreihen dienten in vorherigen Serien als sicher lektin-positiv ermittelte Schnitte als Positivkontrolle, als Negativkontrolle wurden Prostataschnitte verwendet, bei denen anstatt des Primärantikörpers oder Lektins der Verdünnungspuffer TBS hinzugegeben wurde. Da alle verwendeten Prostatakarzinom-Präparate aus derselben Klinik stammten, sind Einflüsse auf die Lektinbindungsstellen durch verschiedenartige Fixierungs- und Einbettungsmethoden, wie sie zuvor von Schumacher et al. [1995] beschrieben worden sind, weitestgehend zu vernachlässigen.

3.9 Auswertung der Färbungen, Datenerfassung und Datenbearbeitung

Die histologische Auswertung der einzelnen Prostatatumoren wurde ohne Kenntnis der klinischen Daten der jeweiligen Patienten durchgeführt. Zur Kontrolle der Reproduzierbarkeit wurden alle Auswertungen zweimal, unabhängig voneinander vorgenommen und die Ergebnisse miteinander verglichen. Kam es zu Abweichungen zwischen erster und zweiter Beurteilung wurden die fraglichen Präparate von einem zweiten, unabhängigen Untersucher beurteilt, die Ergebnisse diskutiert und ein Konsens erzielt. Die lektin- und immunhistochemisch gefärbten Schnitte wurden unter einem

Axioplan Fotomikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) ausgewertet. Zur Befunddokumentation wurden die Präparate mit einem Farbfilm (Ektachrome 64T, Kodak, Stuttgart, Deutschland) fotografiert. Die entwickelten Dia-Bilder wurden gescannt und mittels Bildverarbeitungssoftware (Adobe Photo-Shop) verarbeitet.

Die untersuchten Prostatakarzinome wurden für jede Lektin- bzw. Antikörperfärbung mit negativ bewertet, wenn weniger als 5% der Karzinomzellen eine deutliche Farbreaktion zeigten. Farbreaktionen des Bindegewebes sowie Anfärbungen von Blutgefäßen, Erythrozyten oder supranukleäre Anfärbungen des Golgiapparates wurden ebenfalls als negativ bewertet. Als positiv gewertet wurden diejenigen Prostatatumoren, die eine deutliche Farbreaktion von mehr als 5% der malignen Zellen aufwiesen. Innerhalb der positiv bewerteten Gruppe erfolgte eine Abstufung der Farbtintensität von schwach (+), über mittelgradig (++) bis intensiv (+++). Diese Auswertungskriterien wurden in Anlehnung an mehrere vorangegangene Arbeiten zur Lektin- und Immunhistochemie wie zum Beispiel beim kolorektalem Karzinom [Schumacher et al., 1994], beim Mammakarzinom [Leathem et al., 1985] und beim Melanom [Thies 2002] gewählt.

3.10 Statistische Auswertung

3.10.1 Univariate Analyse

Für jeden Marker (Lektinbindung bzw. Antigenexpression) wurden Kaplan-Meier Kurven für das Patientenalter beim Zeitpunkt der Operation, für den präoperativen PSA Wert, für das Karzinomvolumen und das Volumen an niedrig differenziertem Tumor (Gleason 4), für den Gleason-Score der Biopsie vor Operation sowie den postoperativ erhobenen Gleason-Score am Prostatektomiepräparat, weiterhin für das pathologische Stadium des Prostatektomiepräparates, für den Lymphknotenstatus und letztlich für das Auftreten von Metastasen erstellt. Die Signifikanz einer Assoziation zwischen Lektinbindung oder Antigenexpression und den oben genannten Daten wurde mit Hilfe des Logrank Tests ermittelt. Als statistisch signifikant wurden Werte von $P < 0,05$ angesehen. Die Kaplan-Meier Analysen und die Logrank Tests wurden mittels Graph Pad Prism 2.0 (Intuitive Software for Science, San Diego, Kalifornien, USA) auf einem IBM-kompatiblen Personal Computer erstellt.

3.10.2 Multivariate Analyse

Die Unabhängigkeit als prognostischer Marker der aus der univariaten Analyse als signifikant hervorgegangenen Metastasierungsmarker wurde anschließend in einem multivariaten Cox Regressionsmodell zusammen mit dem Tumorstadium als Indikatorvariable überprüft. Als statistisch signifikant galten Werte von $P < 0,05$. In einer weiterführenden Analyse wurden die jeweils untersuchten Lektin- und Antikörperbindungsprofile, das Patientenalter beim Zeitpunkt der Operation, der präoperative PSA Wert, das Karzinomvolumen, das Volumen an niedrig differenziertem Tumor (Gleason 4), der Gleason-Score der Biopsie vor Operation sowie der postoperativ erhobene Gleason-Score am Prostatektomiepräparat, das pathologische Stadium des Prostatektomiepräparates sowie der Lymphknotenstatus in ein multivariates Cox Regressionsmodell aufgenommen und bezüglich ihrer prognostischen Wertigkeit, ihrer Unabhängigkeit (bezogen auf alle Marker) und ihre Interaktionen untersucht. Als statistisch signifikant wurden Werte von $P < 0,05$ angesehen. Diese Analysen wurden mit freundlicher Unterstützung von Prof. Dr. Jürgen Berger aus dem Institut für Medizinische Biometrie und Epidemiologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf durchgeführt.

3.10.3 Korrelation der Metastasierungsmarker

Die Metastasierungsmarker wurden mittels des Spearman Rang-Korrelationskoeffizienten (Rko) auf eine Korrelation hin untersucht. Diese Analysen wurden mit dem Programm Graph Pad Prism 2.0 (Intuitive Software for Science, San Diego, Kalifornien, USA) durchgeführt. Als statistisch signifikant wurde ein Wert von $P < 0,05$ angesehen.

4. ERGEBNISSE

4.1 Auswertung des Lektin-Bindungsverhaltens

Lichtmikroskopisch waren die Lektinfärbungen insgesamt eindeutig auszuwerten, da entweder der überwiegende Tumoranteil angefärbt (positiv), oder aber keine Anfärbung der malignen Zellen zu verzeichnen war (negativ). Hintergrundfärbungen waren bei den Lektinen LCA und UEA-I deutlicher ausgeprägt als bei den Lektine HPA, a-HPA und SNA-I, behinderten jedoch auch hier nicht die Beurteilung des Tumors. Die Negativkontrollen wiesen keine Anfärbung auf. Mitgeführte Kontrollschnitte zeigten in der Regel keine Schwankung der Farbintensität zwischen verschiedenen Färbeserien.

4.1.1 Biotinyliertes HPA (direkte Methode)

Die HPA gefärbten Prostatapräparate zeigten ein sehr homogenes HPA-Bindungsverhalten. Im einzelnen Prostatakarzinom waren die Tumorzellnester entweder zum überwiegenden Teil gefärbt (> 80%) oder sie waren ungefärbt (siehe Abbildung 4). Die Färbeintensität der Tumoranteile innerhalb eines Karzinoms war dabei konstant, wohingegen zwischen den verschiedenen Präparaten Unterschiede in der Färbeintensität von niedrig- (+), mittel- (++) oder hochgradig (+++) verzeichnet wurden. Die Lektinfärbung von 152 Präparaten mit HPA ergab 34 positiv gefärbte und 118 nicht gefärbte Karzinome.

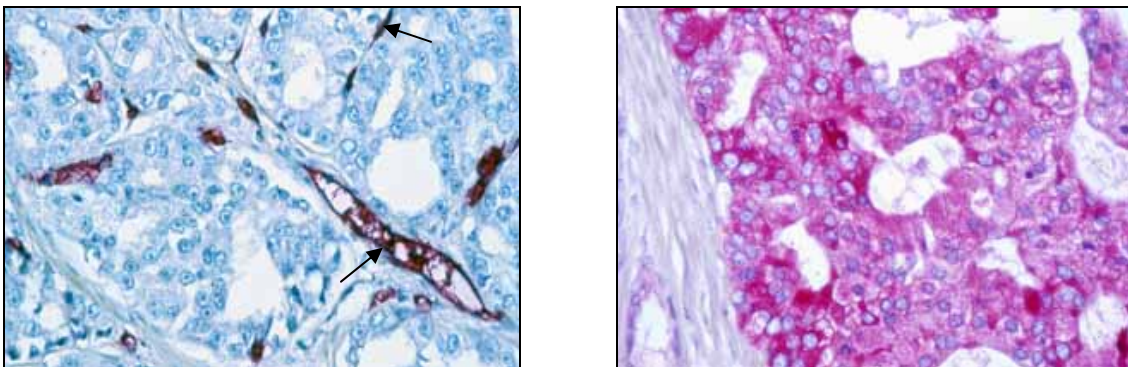


Abb. 4: HPA-Färbung an Prostatakarzinomen. Innerhalb eines Tumors zeigte sich die Anfärbung der malignen Zellen sehr homogen entweder negativ (links) oder positiv (rechts). Im linken Bild zeigte das Endothel der Blutgefäße eine positive Farbreaktion (Pfeile), diese Anfärbung konnte als interne positive Kontrolle dienen.

Unter den HPA gefärbten Prostatakarzinomen (n=34) trat bei 16 Patienten ein Rezidiv auf, was 47,06 Prozent des Patientengutes entspricht. Aus dem Patientengut mit nicht HPA angefärbten Karzinomen (n=118) erlitten 39 ein Rezidiv, was einem Prozentsatz von 33,05 % entspricht.

Kaplan-Meier Analyse der Bindung des biotinylierten HPA

Patienten mit HPA gefärbten Prostatakarzinomen hatten tendenziell eine etwas schlechtere Prognose als Patienten mit nicht HPA gefärbter Karzinomen, was statistisch jedoch nicht signifikant war. Der Logrank Test für den Vergleich der Kaplan-Meier Kurven des biotinylierten HPA zeigte keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Rezidivrisikos zwischen Patienten, deren Prostatakarzinome entweder HPA-positiv oder HPA-negativ waren. Aus den Kaplan-Meier Kurven für das HPA-Bindungsprofil gemeinsam mit dem Tumolvolumen als kombinierte Variable ergaben sich durch die Kombination dieser beiden Variablen keine verbesserten Aussagen über das Metastasierungsrisiko im Vergleich zur Prognose aufgrund des Tumolvolumens allein (siehe Abbildung 5).

Multivariate Cox Regressionsanalyse der HPA-Bindung

Die multivariate Cox Regressionsanalyse unter Einschluss des HPA-Bindungsstatus und des Tumorstadiums ergab, dass die Bindung von HPA an Tumorzellen der Prostatakarzinome nicht mit dem jeweiligen Tumorstadium korreliert.

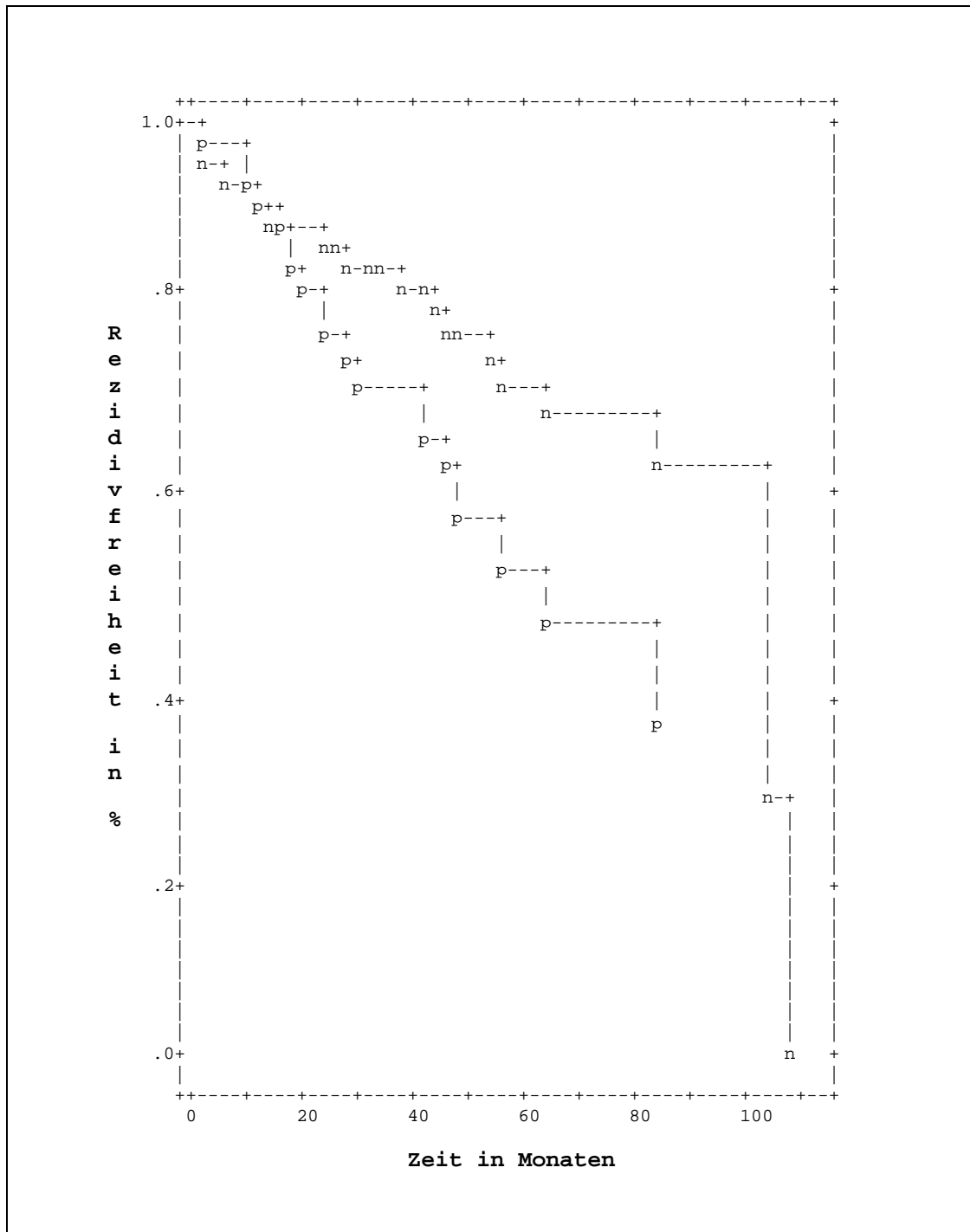


Abb. 5: Kaplan-Meier Kurven für das rezidivfreie Intervall von Patienten mit HPA-positiven (p) und HPA-negativen (n) primären Prostatakarzinomen. Anhand des HPA-Bindungsverhaltens war keine Unterscheidung bezüglich des Rezidivrisikos zwischen den einzelnen Patienten möglich.
 Log Rank 3.55 1 .0595

4.1.2 Natives HPA (indirekte Methode)

Auch bei der indirekten Färbemethode mittels anti-HPA zeigte sich ein homogenes Lektinbindungsverhalten. Innerhalb eines Prostatakarzinoms war entweder die Mehrheit der Tumorzellen gefärbt ($> 80\%$), oder es fand sich keine Anfärbung der Tumorzellen ($< 5\%$). Die Intensität der Färbung variierte ähnlich der Anfärbung mit HPA von schwach (+) über mittel (++) bis intensiv (+++). Die Lektinfärbung von 152 Präparaten mit anti-HPA ergab 99 gefärbte und 53 nicht gefärbte Karzinome.

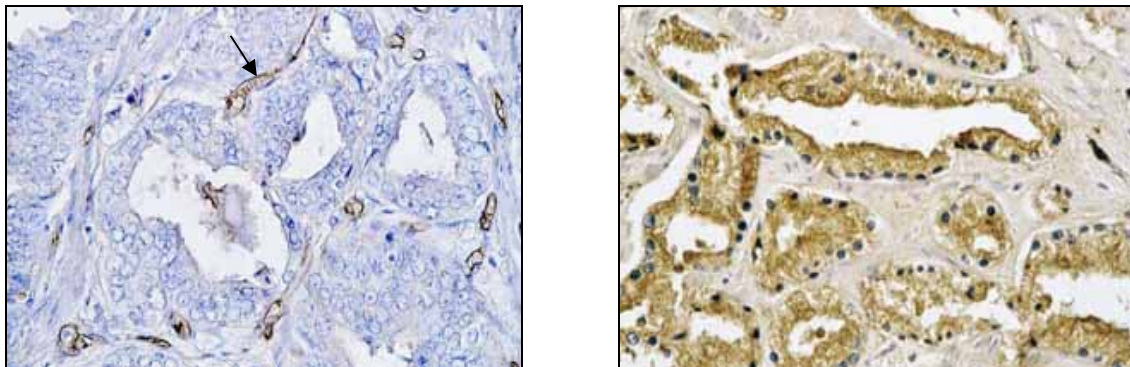


Abb. 6: Die anti-HPA-Färbung maligner Zellen innerhalb eines Prostatakarzinoms zeigte sich sehr homogen, entweder negativ (links) oder positiv (rechts). Im linken Bild zeigte das Endothel der Blutgefäße eine positive Farbreaktion (Pfeil), diese Anfärbung konnte als interne positive Kontrolle dienen.

In der Gruppe der anti-HPA gefärbten Prostatakarzinomen ($n=99$) fand sich bei 32 Patienten ein Rezidiv, was 32,32 Prozent des Patientengutes entspricht. Aus dem Patientengut mit nicht anti-HPA gefärbten Karzinomen ($n=53$) erlitten 23 ein Rezidiv, was einem Prozentsatz von 43,40 % entspricht.

Kaplan-Meier Analyse der Bindung des nativen HPA

Der Logrank Test für den Vergleich der Kaplan-Meier Kurven des nativen HPA zeigte keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Rezidivrisikos zwischen Patienten, deren Prostatakarzinome entweder anti-HPA-positiv oder aber anti-HPA-negativ waren. Aus den Kaplan-Meier Kurven für das anti-HPA-Bindungsprofil gemeinsam mit dem Tumolvolumen als kombinierte Variable ergaben sich durch die Kombination dieser beiden Variablen keine verbesserten Aussagen über das Metastasierungsrisiko gegenüber der Prognose aufgrund der Tumorgröße allein (siehe Abbildung 7).

Multivariate Cox Regressionsanalyse der anti-HPA-Bindung

Die multivariate Cox Regressionsanalyse unter Einschluss des anti-HPA-Bindungsstatus und des Tumorstadiums ergab, dass die Bindung von anti-HPA an Tumorzellen der Prostatakarzinome mit deutlich besseren Gleason-scores am Prostatektomiepräparat korrelieren.

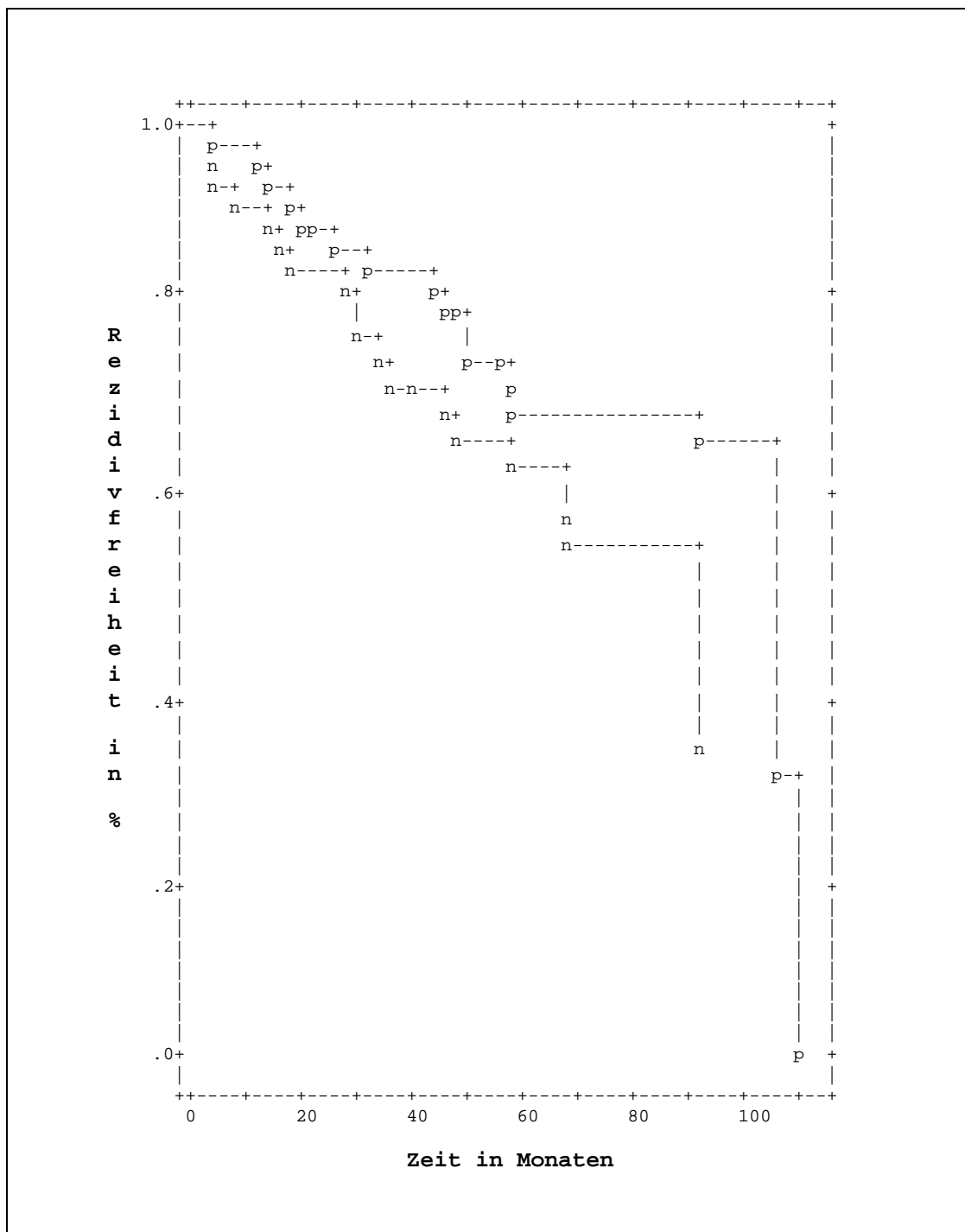


Abb. 7: Kaplan-Meier Kurven für das rezidivfreie Intervall von Patienten mit anti-HPA-positiven (p) und anti-HPA-negativen (n) primären Prostatakarzinomen. Anhand des anti-HPA-Bindungsverhaltens war keine Unterscheidung bezüglich des Rezidivrisikos zwischen den einzelnen Patienten möglich.
 Log Rank 2.32 1 .1280

4.1.3 SNA-I

Die SNA-I-Färbung der Prostatapräparate zeigte ein ebenso homogenes Bindungsmuster wie das zuvor beschriebene HPA. Im einzelnen Präparat färbten sich die Tumorzellnester entweder zum Großteil ($> 80\%$) oder aber gar nicht ($< 5\%$) an (siehe Abbildung 8). Die Färbeintensität der Tumorteile innerhalb eines Karzinoms war dabei konstant, entweder niedrig- (+), mittel- (++) oder hochgradig (+++). In der SNA-I-Lektinfärbung von 124 Präparaten fanden sich 90 gefärbte und 34 nicht gefärbte Karzinome.

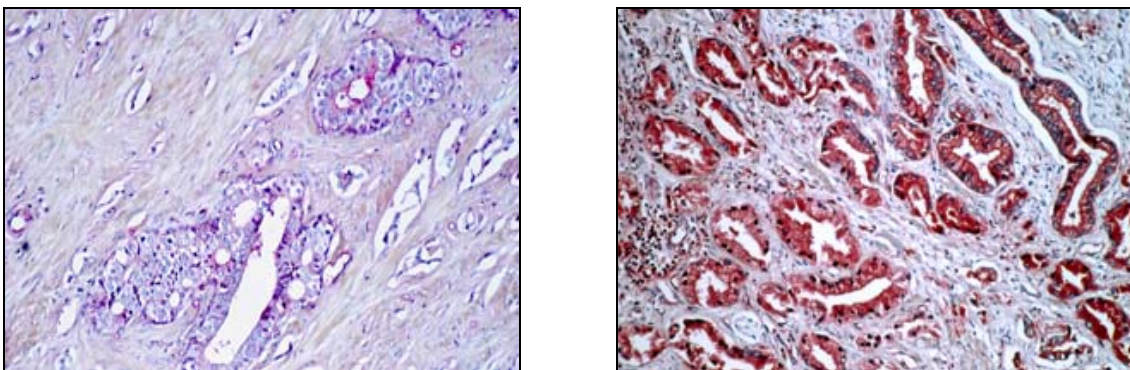


Abb. 8: Die SNA-Anfärbung maligner Zellen innerhalb eines Prostatakarzinoms zeigte sich sehr homogen, entweder negativ (links) oder positiv (rechts).

Unter den SNA-I gefärbten Prostatakarzinomen ($n=90$) trat bei 30 Patienten ein Rezidiv auf, was einem Anteil von 33,33 Prozent des Patientengutes entspricht. Aus dem Patientengut mit nicht SNA-I gefärbten Karzinomen ($n=34$) trat in 17 Fällen ein Rezidiv auf, was einem Prozentsatz von 50 Prozent entspricht.

Kaplan-Meier Analyse der SNA-I-Bindung

Patienten mit SNA-I gefärbten Prostatakarzinomen hatten tendenziell eine etwas bessere Prognose als Patienten mit nicht SNA-I gefärbten Karzinomen, was statistisch jedoch nicht signifikant war. Der Logrank Test für den Vergleich der Kaplan-Meier Kurven der SNA-I-Bindung zeigte keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Rezidivrisikos zwischen Patienten, deren Prostatakarzinome entweder SNA-I-positiv oder aber SNA-I-negativ waren. Aus den Kaplan-Meier Kurven für das SNA-I-Bindungsprofil gemeinsam mit dem Tumolvolumen als kombinierte Variable ergaben sich durch die Kombination dieser beiden Variablen keine verbesserten Aussagen über das

Metastasierungsrisiko im Vergleich zur Prognose aufgrund des Tumorzvolumens allein (siehe Abbildung 9).

Multivariate Cox Regressionsanalyse der SNA-I-Bindung

Die multivariate Cox Regressionsanalyse unter Einschluss des SNA-I-Bindungsstatus und des Tumorstadiums ergab, dass die Bindung von SNA-I an Tumorzellen der Prostatakarzinome mit deutlich besseren Gleason-scores am Prostatektomiepräparat assoziiert sind.

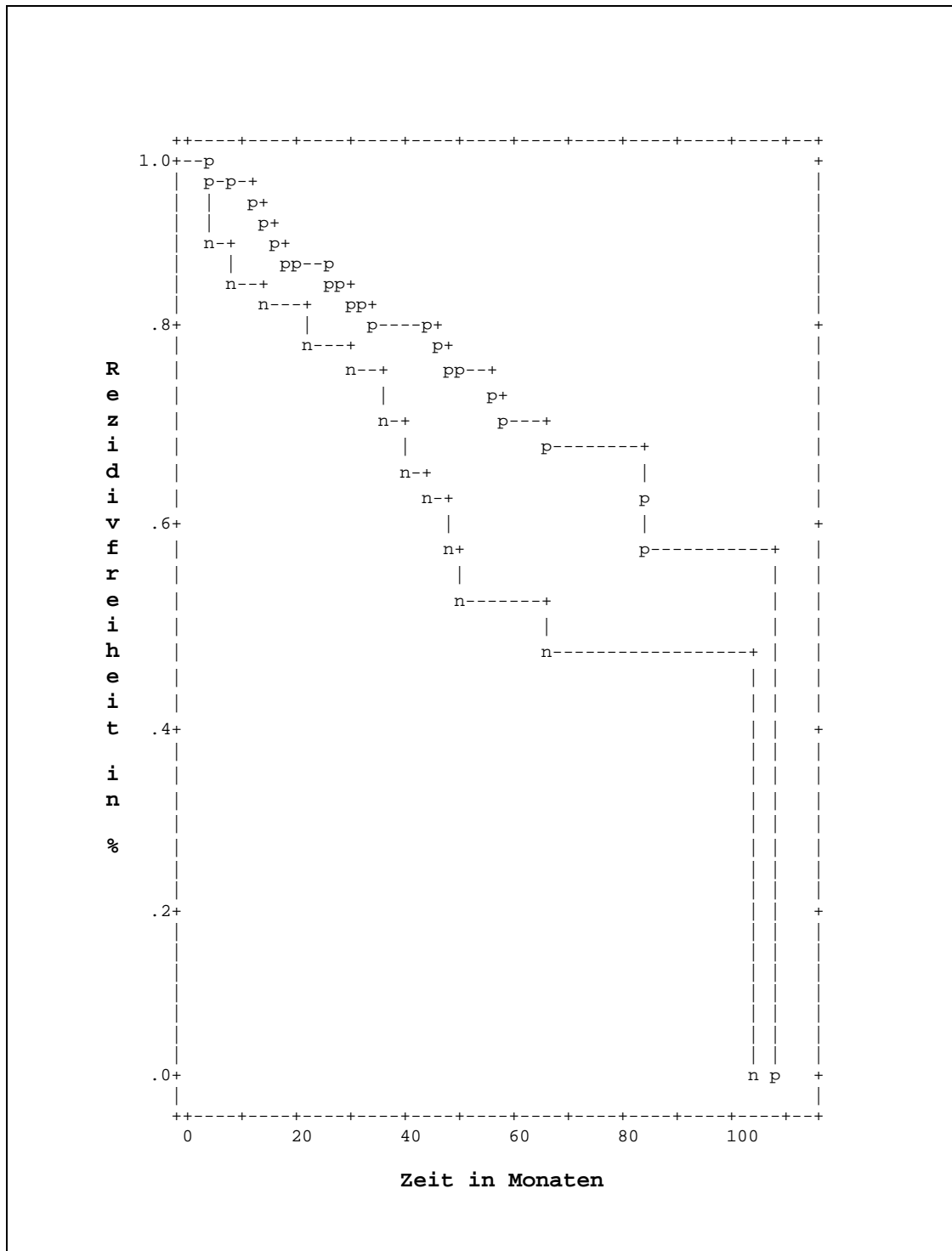


Abb. 9: Kaplan-Meier Kurven für das rezidivfreie Intervall von Patienten mit SNA-I gefärbten (p) und SNA-I ungefärbten (n) Prostatakarzinomen. Anhand des SNA-I-Bindungsmusters war keine Differenzierung bezüglich des Rezidivrisikos zwischen den einzelnen Patienten möglich.
 Log Rank 3.29 1 .0698

4.1.4 LCA

Die LCA-Färbung der Prostatapräparate zeigte ein ebenso homogenes Bindungsmuster wie die zuvor beschriebenen Lektine. Im einzelnen Präparat färbten sich die Tumorzellnester entweder zum Großteil ($> 80\%$) oder aber gar nicht ($< 5\%$) an (siehe Abbildung 10). Die Färbeintensität der Tumorteile innerhalb eines Karzinoms war dabei konstant, entweder niedrig- (+), mittel- (++) oder hochgradig (+++). In der LCA-Lektinfärbung von 124 Präparaten fanden sich 71 gefärbte und 53 nicht gefärbte Karzinome.

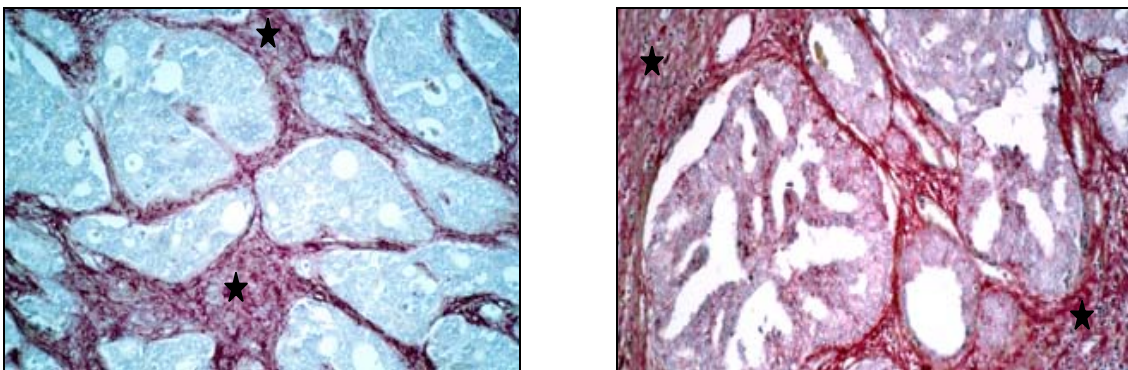


Abb. 10: LCA-Färbung an Prostatakarzinomen. Innerhalb eines Tumors war die Anfärbung der malignen Zellen sehr homogen, entweder negativ (links) oder positiv (rechts). Das umgebende Bindegewebe zeigte regelhaft eine positive Farbreaktion (Sterne).

Unter den LCA gefärbten Prostatakarzinomen ($n=71$) trat bei 24 Patienten ein Rezidiv auf, was 33,80 Prozent des Patientengutes entspricht. Aus der Gruppe mit nicht LCA gefärbten Karzinomen ($n=53$) erlitten 23 ein Rezidiv, was einem Anteil von 43,40 Prozent entspricht.

Kaplan-Meier Analyse der LCA-Bindung

Der Logrank Test für den Vergleich der Kaplan-Meier Kurven des LCA zeigte keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Rezidivrisikos zwischen Patienten, deren Prostatakarzinome entweder LCA-positiv oder aber LCA-negativ waren. Aus den Kaplan-Meier Kurven für das LCA-Bindungsprofil gemeinsam mit dem Tumorumfang als kombinierte Variable ergaben sich durch die Kombination dieser beiden Variablen keine verbesserten Aussagen über das Metastasierungsrisiko im Vergleich zur Prognose aufgrund des Tumorumfangs allein (siehe Abbildung 11).

Multivariate Cox Regressionsanalyse der LCA-Bindung

Die multivariate Cox Regressionsanalyse unter Einschluss des LCA-Bindungsstatus und des Tumorstadiums ergab, dass die Bindung von LCA an Tumorzellen der Prostatakarzinome nicht in Korrelation zum Tumorstadium steht.

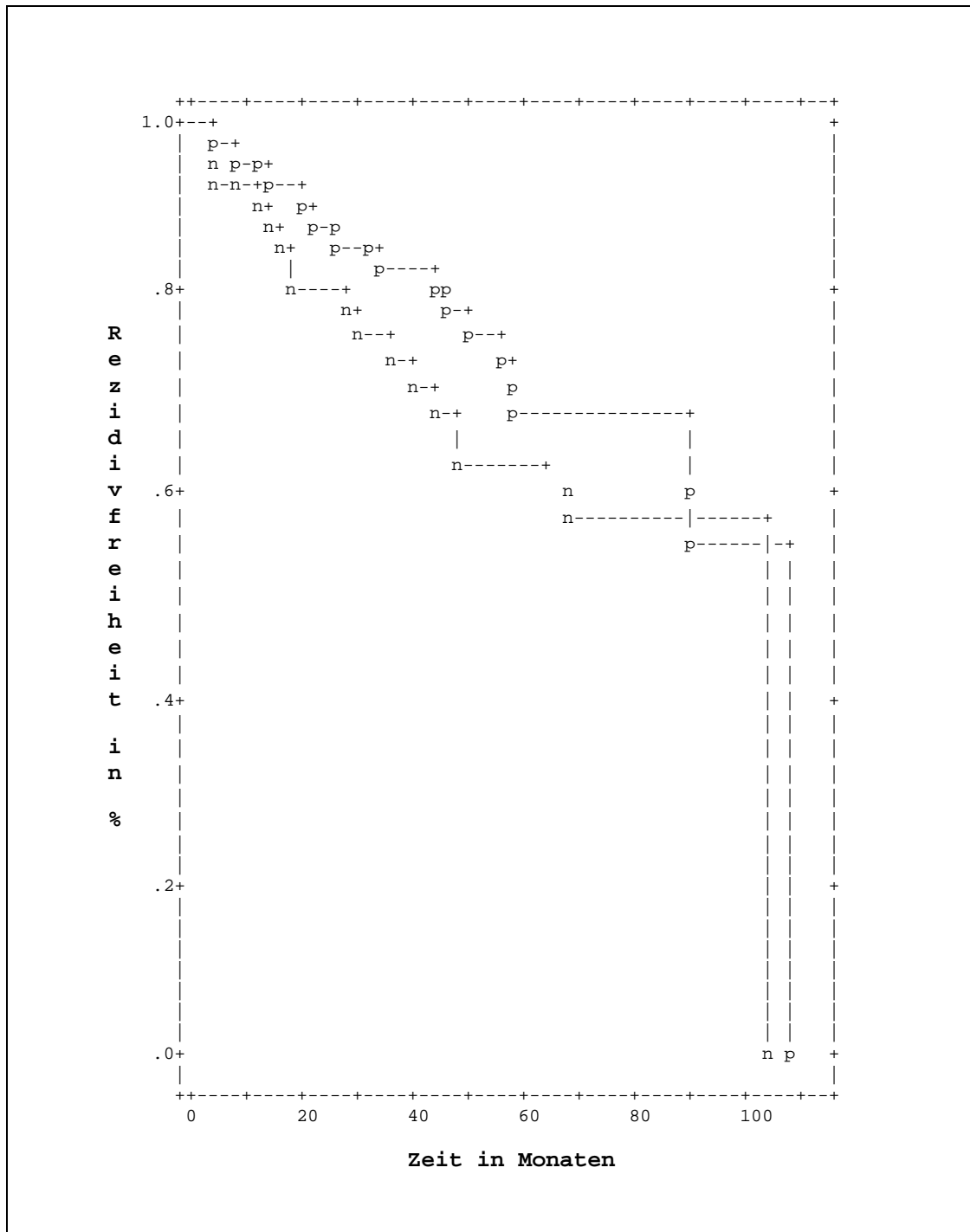


Abb. 11: Kaplan-Meier Kurven für das rezidivfreie Intervall von Patienten mit LCA-positiven (p) und LCA-negativen (n) primären Prostatakarzinomen. Anhand des LCA-Bindungsverhaltens war keine Unterscheidung bezüglich des Rezidivrisikos zwischen den einzelnen Patienten möglich.
 Log Rank 1.01 1 .3156

4.1.5 UEA-I

Die UEA-I-Färbung der Prostatapräparate zeigte ein ebenso homogenes Bindungsmuster wie all die zuvor beschriebenen Lektine. Im einzelnen Präparat färbten sich die Tumorzellnester entweder zum Großteil ($> 80\%$) oder aber gar nicht ($< 5\%$) an (siehe Abbildung 12). Die Färbeintensität der Tumorteile innerhalb eines jeden Karzinoms war dabei homogen, entweder niedrig- (+), mittel- (++) oder hochgradig (+++). In der UEA-I-Färbung von 124 Präparaten fanden sich 44 positiv gefärbte und 80 nicht angefärbte Karzinome.

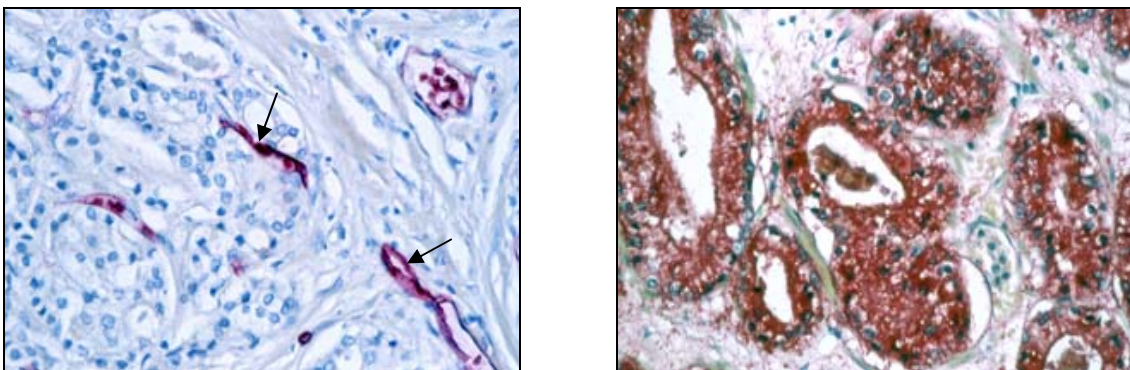


Abb. 12: UEA-I-Färbung. Innerhalb der Prostatakarzinome zeigte sich die Anfärbung der malignen Zellen sehr homogen entweder negativ (links) oder positiv (rechts). Im linken Bild zeigte das Endothel der Blutgefäße sowie die sich darin befindenden Erythrozyten eine positive Farbreaktion (Pfeile).

Unter den UEA-I gefärbten Prostatakarzinomen ($n=44$) trat bei 15 Patienten ein Rezidiv auf, was 34,09 Prozent des Patientengutes entspricht. Aus dem Patientengut mit nicht UEA-I gefärbten Karzinomen ($n=80$) erlitten 32 Patienten ein Rezidiv, was einem Prozentsatz von 40 % entspricht.

Kaplan-Meier Analyse der UEA-I-Bindung

Der Logrank Test für den Vergleich der Kaplan-Meier Kurven des UEA-I zeigte keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Rezidivrisikos zwischen Patienten, deren Prostatakarzinome entweder UEA-I gefärbt oder aber nicht UEA-I gefärbt waren. Aus den Kaplan-Meier Kurven des UEA-I-Bindungsprofils gemeinsam mit dem Tumolvolumen als kombinierte Variable ergaben sich durch die Kombination dieser beiden Variablen keine verbesserten Aussagen über das Metastasierungsrisiko im Vergleich zur Prognose aufgrund des Tumolvolumens allein (siehe Abbildung 13).

Multivariate Cox Regressionsanalyse der UEA-I-Bindung

Die multivariate Cox Regressionsanalyse unter Einschluss des UEA-I-Bindungsstatus und des Tumorstadiums ergab, dass die Bindung von UEA-I an Tumorzellen der Prostatakarzinome nicht mit dem jeweiligen Tumorstadium assoziiert ist.

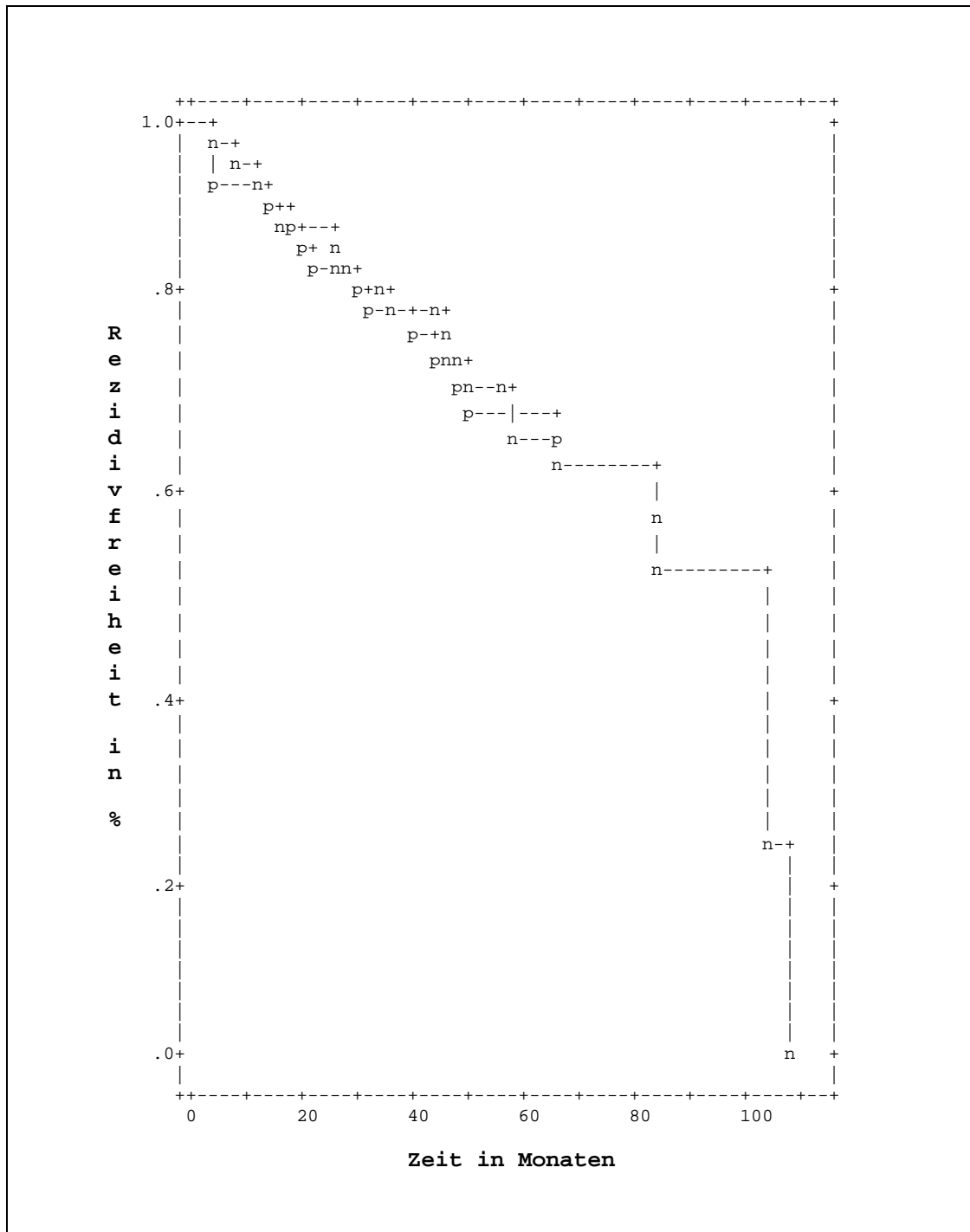


Abb. 13: Kaplan-Meier Kurven für das rezidivfreie Intervall von Patienten mit UEA-I-positiven (p) und UEA-I-negativen (n) primären Prostatakarzinomen. Anhand des UEA-I-Bindungsverhaltens war keine Unterscheidung bezüglich des Rezidivrisikos zwischen den einzelnen Patienten möglich.
 Log Rank .09 1 .7614

4.2. Auswertung des Bindungsverhaltens des Antikörpers 4D1/C2

Auch die lichtmikroskopische Auswertung des Bindungsverhaltens des Antikörpers 4D1/C2 war insgesamt eindeutig zu treffen. Die Tumoranteile färbten sich entweder zu über 80% (als positiv gewertet), oder aber zu weniger als 5% (als negativ gewertet) an (siehe Abbildung 14). Die Intensität der Anfärbung von Tumoranteilen innerhalb eines jeden Karzinoms war dabei homogen, entweder niedrig- (+), mittel- (++) oder hochgradig (+++). Die Negativkontrollen wiesen keine Anfärbung auf. Mitgeführte Kontrollschnitte zeigten in der Regel keine Schwankung der Farbintensität zwischen verschiedenen Färbeserien. In der 4D1/C2-Färbung von 152 Präparaten fanden sich 41 positiv gefärbte und 111 nicht angefärbte Karzinome.

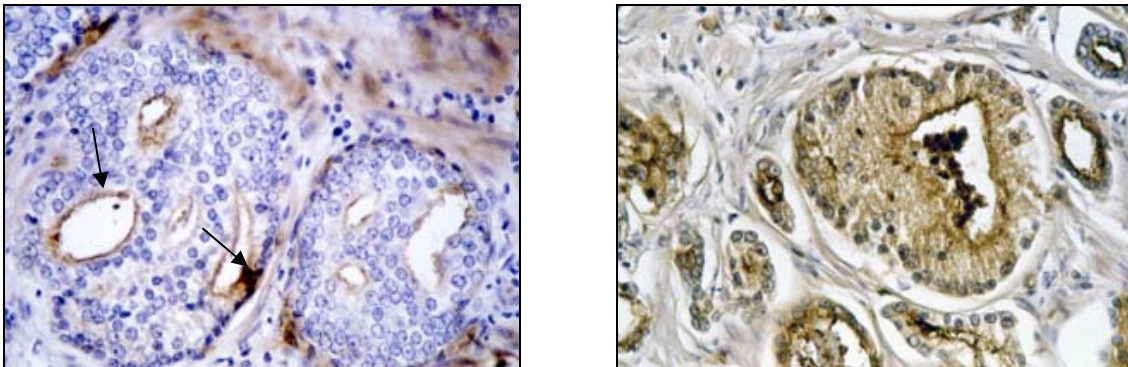


Abb. 14: CEACAM1-Färbung an Prostatakarzinomen. Innerhalb eines Tumors zeigte sich die 4D1/C2-Antikörper-Markierung der malignen Zellen sehr homogen entweder negativ (links) oder positiv (rechts). Im linken Bild zeigte das Endothel der Blutgefäße eine positive Farbreaktion (Pfeil), diese Anfärbung konnte als interne positive Kontrolle dienen.

Innerhalb der 4D1/C2-positiv markierten Prostatakarzinome (n=41) trat bei 8 Patienten ein Rezidiv auf. Dies entspricht einem Prozentsatz von 19,51 % des Patientengutes. Aus dem Patientengut mit nicht 4D1/C2 gefärbten Karzinomen (n=111) erlitten 47 ein Rezidiv, was einem Prozentsatz von 42,34 % entspricht.

Kaplan-Meier Analyse der 4D1/C2-Bindung

Patienten mit 4D1/C2-positiv markierten Prostatakarzinomen hatten tendenziell eine etwas bessere Prognose als Patienten mit nicht 4D1/C2 markierten Karzinomen, was statistisch jedoch nicht signifikant war. Der Logrank Test für den Vergleich der Kaplan-Meier Kurven des Antikörpers 4D1/C2 zeigte keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Rezidivrisikos zwischen Patienten, deren Prostatakarzinome entweder

4D1/C2-positiv oder aber nicht 4D1/C2 markiert waren. Aus den Kaplan-Meier Kurven für das 4D1/C2-Bindungsprofil gemeinsam mit dem Tumorzellvolumen als kombinierte Variable ergaben sich durch die Kombination dieser beiden Variablen keine verbesserten Aussagen über das Metastasierungsrisiko im Vergleich zur Prognose aufgrund des Tumorzellvolumens allein (siehe Abbildung 15).

Multivariate Cox Regressionsanalyse der 4D1/C2-Bindung

Die multivariate Cox Regressionsanalyse unter Einschluss des 4D1/C2-Bindungsstatus und des Tumorstadiums ergab, dass die Bindung von 4D1/C2 an Tumorzellen der Prostatakarzinome nicht mit dem jeweiligen Tumorstadium assoziiert ist.

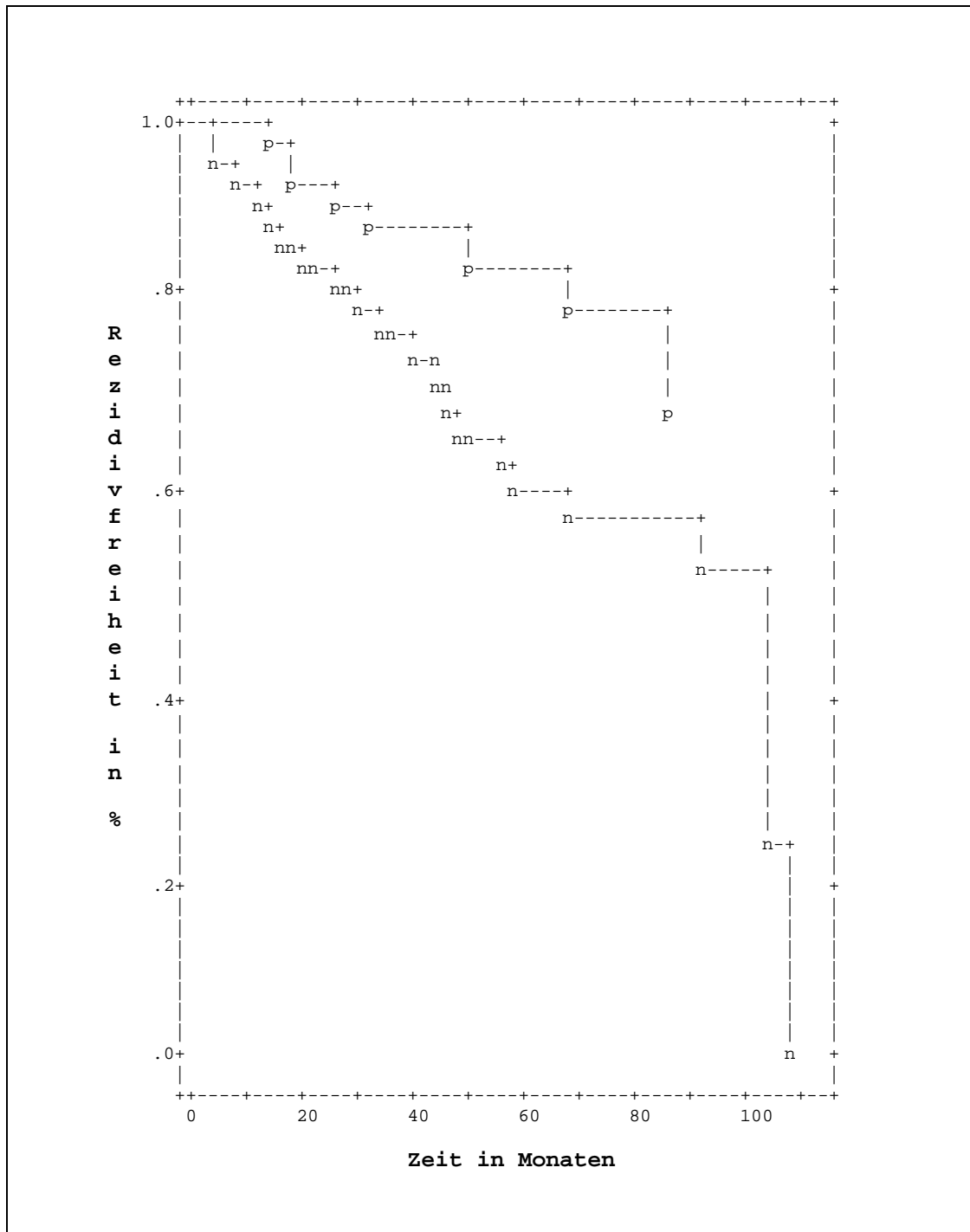


Abb. 15: Kaplan-Meier Kurven für das rezidivfreie Intervall von Patienten mit 4D1/C2-positiven (p) und 4D1/C2-negativen (n) primären Prostatakarzinomen. Anhand des Antikörper-Bindungsverhaltens war keine Unterscheidung bezüglich des Rezidivrisikos zwischen den einzelnen Patienten möglich.
 Log Rank 3.70 1 .0545

5. DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit wurde unternommen, um mögliche neue Marker zur Abschätzung der Prognose beim Prostatakarzinom zu identifizieren, da aussagekräftige und konsensfähige histochemische Marker zur Prognose beim Prostatakarzinom fehlen. Momentan stellt das Grading-System nach Gleason das gebräuchlichste Grading-System dar. Weitere prognostische Gradingmethoden wie zum Beispiel die Bestimmung des Tumolvolumens, DNA-Zytometrie oder Neoangiogenese werfen hingegen noch immer Streitigkeiten im Konsens auf, da sie sich als schwer reproduzierbar herausgestellt haben und mit einer hohen inter- und intra-observer-Fehlerrate behaftet sind. Daher ist es wichtig, neue Marker mit hoher diagnostischer Signifikanz zu identifizieren, die zukünftig einen möglichen therapeutischen Ansatz erlauben.

5.1 Bedeutung des Lektinbindungsverhaltens

Untersuchungen von Geweben auf vorhandene Saccharidstrukturen durch zuckerbindende Proteine, sogenannte Lektine, die per definitionem keine enzymatische Aktivität besitzen und keine Antikörper sind, verheißen möglichen diagnostischen und therapeutischen Nutzen und sind bereits bei einer Reihe anderer Tumoren erfolgreich angewendet worden.

Die vorliegenden Untersuchungen zum Bindungsverhalten bestimmter Lektine wurden durchgeführt, um einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Bindungsverhalten der Lektine an Prostatakarzinomzellen und dem Metastasierungsverhalten der jeweiligen Prostatakarzinome aufzuzeigen. Durch lektin histochemische Untersuchungen anderer Tumoren konnte bereits gezeigt werden, dass positive Korrelationen zwischen dem Lektinbindungsverhalten und dem Metastasierungsverhalten und damit der Prognose verschiedener Tumoren bestehen. So zum Beispiel ist HPA mit seiner N-Acetylgalaktosamin-Spezifität ein sehr nützlicher prognostischer Indikator beim Kolonkarzinom [Schumacher et al., 1994], darüber hinaus beim Mammakarzinom [Leathem und Brooks 1987, Brooks und Leathem 1991] sowie auch beim Magenkarzinom [Kakeji et al., 1991]. Für PHA-L, welches eine Bindungsspezifität für β 1-6-Oligosaccharide aufweist, konnte eine positive Korrelation

zwischen der Lektinbindung und dem Metastasierungsverhalten beim Kolon- und Mammakarzinom aufgezeigt werden [Fernandes et al., 1991].

In bereits vorausgegangenen Untersuchungen zum Lektinbindungsverhalten des Prostatakarzinoms konnte gezeigt werden, dass Patienten mit positiver HPA-Expression eine höhere Metastasierungsrate und damit eine schlechtere Prognose haben als Patienten mit negativer HPA-Expression [Shiraishi et al., 1992].

Die Gruppe um Shiraishi untersuchte in der 1992 veröffentlichten Studie allerdings eine deutlich geringere Fallzahl von Prostatakarzinompatienten als in der hier vorliegenden Arbeit untersucht wurde. Darüber hinaus begründet nicht allein nur die größere Fallzahl, sondern auch der umfangreiche und gut dokumentierte Nachbeobachtungszeitraum bezüglich des Patientenalters, des PSA-Wertes, des Karzinomvolumens, des Gleason-Scores, des Lymphknotenstatus sowie des Auftretens von Metastasen eine stärkere Aussagekraft der hier vorliegenden Arbeit.

So wurde die jeweilige Expression (high oder low) der fünf verwendeten Lektine mit dem Alter der Patienten beim Zeitpunkt der Operation, dem präoperativem PSA Wert, dem Karzinomvolumen, dem Volumen an niedrig differenziertem Tumor (Gleason 4), dem Gleason-Score der Biopsie vor Operation, dem postoperativem Gleason-Score am Prostatektomiepräparat, dem pathologischen Stadium des Prostatektomiepräparates, dem Lymphknotenstatus sowie dem Auftreten von Metastasen verglichen. Die meisten dieser Korrelationen waren nicht signifikant.

Patienten mit HPA positiv gefärbten Prostatakarzinomen hatten tendenziell eine etwas schlechtere Prognose als Patienten mit nicht HPA gefärbten Karzinomen.

Patienten mit SNA-I positiv gefärbten Prostatakarzinomen hingegen hatten tendenziell eine etwas bessere Prognose als Patienten mit nicht SNA-I gefärbten Karzinomen. Diese Feststellung zeigte jedoch keine statistische Signifikanz in den Kaplan-Meier-Kurven. Die multivariate Cox Regressionsanalyse unter Einschluss des Lektin-Bindungsstatus und des Tumorstadiums zeigte, dass die Bindung von anti-HPA sowie die Bindung von SNA-I an Tumorzellen der Prostatakarzinome mit deutlich besseren Gleason-scores am Prostatektomiepräparat korrelieren.

Eine zuverlässige Abschätzung des Metastasierungsrisikos eines Prostatakarzinoms anhand seiner positiven oder negativen Lektinbindung (bezogen auf die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Lektine) ist also nicht möglich. Durch diese Resultate konnte gezeigt werden, dass die lektinbindenden Glykostrukturen vom Kolon- und

Mammakarzinom sich von denen des Prostatakarzinoms unterscheiden. Diese Ergebnisse machen wiederholt die feinen Unterschiede in der Kohlenhydratzusammensetzung der Glykokalyx verschiedener Tumoren, welche bei Zell-zu-Zell-Interaktionen und damit unter Umständen beim Metastasierungsverhalten eine funktionelle Rolle spielen, deutlich.

5.2 Bedeutung des Zelladhäsionsmoleküls CEACAM1

Durch immunhistochemische Untersuchungen anderer Tumoren im Hinblick auf die Expression des Zelladhäsionsmoleküls CEACAM1 konnte bereits gezeigt werden, dass positive Korrelationen zwischen einer Expression und dem Metastasierungsverhalten und damit der Prognose verschiedener Tumoren bestehen. So zum Beispiel ist die CEACAM1-Expression ein sehr nützlicher prognostischer Indikator beim malignen Melanom. Bei dieser Entität konnte gezeigt werden, dass die Expression des Zell-Adhäsions-Moleküls CEACAM1 auf dem Primär-Tumor in enger Verbindung mit einer späteren Entwicklung von Metastasen steht. Diese Erkenntnis deutet auf die möglicherweise bedeutsame Rolle von CEACAM1 bei der Entstehung von Metastasen [Thies et al., 2002]. Auch beim Adenokarzinom der Lunge konnte gezeigt werden, dass die Expression von CEACAM1 einen unabhängigen prognostischen Faktor innerhalb des Patientengutes darstellt und damit eine Unterscheidung der Patienten mit Lungentumoren in je eine Hoch-Risiko-Gruppe und eine Niedrig-Risiko-Gruppe ermöglicht [Laack et al., 2002].

In der vorliegenden Untersuchung wurde das CEACAM1 mit dem monoklonalen Antikörper 4D1/C2 nachgewiesen, welcher auch in den Untersuchungen von Thies et al. [2002] und Laack et al. [2002] verwendet wurde; zudem wurde das gleiche Nachweisverfahren wie in den beiden zitierten Untersuchungen angewandt. Somit können methodisch bedingte Unterschiede als Ursache für die von der vorliegenden Untersuchung abweichenden Ergebnissen weitestgehend ausgeschlossen werden. In der vorliegenden Untersuchung hatten Patienten mit 4D1/C2-positiv markierten Prostatakarzinomen tendenziell eine etwas bessere Prognose als Patienten mit nicht 4D1/C2 markierten Karzinomen, was statistisch jedoch nicht relevant war. Damit gilt für die CEACAM1 Expression die gleiche Schlussfolgerung wie für die Ergebnisse der Lektin histochemie, nämlich dass die bei anderen Tumorentitäten erfolgreich

angewendeten Marker nicht auf das Prostatakarzinom zu übertragen sind. Klinisch aussagekräftige prognostische Marker für das biologische Verhalten des Prostatakarzinoms zu finden bleibt weiterhin eine Herausforderung.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die Größe und das Stadium des Primärtumors gelten beim Prostatakarzinom derzeit als die zuverlässigsten Indikatoren für eine Metastasierung. Aus diesen beiden Kriterien lassen sich jedoch nicht die weiterführenden Mechanismen der Metastasierung ableiten. Da durch Untersuchungen anderer Tumorentitäten bekannt ist, dass Kohlehydratreste der Glykokalyx maligner Zellen eine wichtige funktionelle Rolle bei der Metastasierung spielen, wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene Glykane des Prostatakarzinoms auf ihre prognostische Wertigkeit hin untersucht.

Terminale Kohlehydrate des primären Prostatakarzinoms wurden an 152 Präparaten durch das Bindungsprofil der Lektine HPA mit zwei verschiedenen Methoden und an 124 Präparaten durch das Bindungsprofil der Lektine SNA-I, LCA und UEA-I mit jeweils unterschiedlicher Kohlehydratspezifität charakterisiert. Darüber hinaus wurde an 152 Präparaten das Bindungsprofil des Antikörpers 4D1/C2, der sich an das glykosylierte Zelladhäsionsmolekül CEACAM1 bindet, untersucht. Die so ermittelten Bindungseigenschaften wurden mit den klinischen Daten der Prostatakarzinompatienten über einen Nachbeobachtungszeitraum von bis zu 10 Jahren korreliert.

Kaplan-Meier Kurven für das rezidivfreie Intervall zeigten weder für die verwendeten Lektine noch für den Antikörper signifikante Assoziationen zur Metastasierung.

Diese Erkenntnisse verweisen auf grundlegende Unterschiede in der Rolle von Kohlenhydraten der Glykokalyx der Prostatakarzinomzellen und derer von anderen Tumorentitäten. Während bei Mamma- und Kolonkarzinom, beim Adenokarzinom der Lunge und beim malignen Melanom Kohlenhydratreste der Tumorzellen einen prognostischen Marker darstellen, war diese beim Prostatakarzinom nicht der Fall. Das Prostatakarzinom verhält sich in Bezug auf die hier untersuchten Marker - wie allerdings bei vielen anderen Markern auch - anders als eine Vielzahl anderer Tumorentitäten. Die Suche nach neuen Markern muss also weiterhin fortgesetzt werden.

7. LITERATURVERZEICHNIS

Berthon P., Valeri A., Cohen-Akenine A., Drelon E., Paiss T., Wöhr G., Latil A., Millasseau P., Mellah I., Cohen N., Blanché H., Bellané-Chantelot C., Demenais F., Teillac P., Le Duc A., de Petriconi R., Hautmann R., Chumakov I., Bachner L., Maitland N.J., Lidereau R., Vogel W., Fournier G., Mangin P., Cussenot O.;; Predisposing gene for early-onset prostate cancer, localized on chromosome 1q42.2-43, *Am J Hum Genet.* 62:1416-1424, 1998

Böcking A., Riede U.-N.;; *Allgemeine und Spezielle Pathologie*, Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York, 1995

Brooks S.A., Leathem A.J.;; Prediction of lymph node involvement in breast cancer by detection of altered glycosylation in the primary tumour. *Lancet* 338:71-74, 1991
PMID: 1712062 [PubMed - indexed for MEDLINE]

Cher M.L., Bova G.S., Moore D.H., Small E.J., Carroll P.R., Pin S.S., Epstein J.I., Isaacs W.B., Jensen R.H.;; Genetic alterations in untreated metastases and androgen-independent prostate cancer detected by comparative genomic hybridization and allelotyping. *Cancer Res.* 56: 3091-3102, 1996

Ebrahimnejad A., Flayeh R., Unteregger G., Wagener C. and Brummer J.;; Cell adhesion molecule CEACAM1 associates with paxillin in granulocytes and epithelial and endothelial cells. *Exp Cell Res.* 260:365-373, 2000

Encke A., Hermanek P., Burg G.;; Report of the German-Speaking TNM Committee. *Zentralbl Chir.* 118:310, 1993

Engers R., Gabbert H.E.;; Mechanisms of tumor metastasis: cell biological aspects and clinical implications. *J Cancer Res Clin Oncol.* 126:682-692, 2000

Epstein J. I., Allsbrook W. C., Amin M. B., Egevad L. L. and the ISUP Grading Committee,: The International Society of Urological Pathology Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. 2005

Fernandes B., Sagman U., Auger M., Demetrio M., Dennis J.W.,: Beta 1-6 branched oligosaccharides as a marker of tumor progression in human breast and colon neoplasia. *Cancer Res.* 51:718-723, 1991

Fischer C.G., Wachter W., Fuentesilla Perez E., Miller J., Weidner W., Dudeck J.,: Urologic tumors in Germany, Initial data of 56,013 cases from clinical cancer registers. *Urologe A.* 36:143-150, 1997

Fitzpatrick J.M., Krane R.J.,: *The Prostate.* Churchill Livingstone, Edinburgh, 1989

Gallee M.P., Ten Kate F.J., Mulder P.G., Blom J.H., van der Heul R.O.,: Histological grading of prostatic carcinoma in prostatectomy specimens: a comparison of prognostic accuracy of five grading systems. *Br J Urol.* 65:368-375, 1990

Gleason D.F.,: Classification of prostatic carcinomas. *Cancer Chemother Rep.* 50:125-128, 1966

Gleason D.F.,: Histological grading and clinical staging of prostatic carcinoma. In: Tannenbaum M. ed. *Urologic Pathology: The Prostate.* Philadelphia: Lea & Feibiger 171-198, 1977

Gronberg H., Isaacs S.D., Smith J.R., Carpten J.D., Bova G.S., Freije D., Xu J., Meyers D.A., Collins F.S., Trent J.M., Walsh P.C., Isaacs W.B.,: Characteristics of prostate cancer in families potentially linked to the hereditary prostate cancer 1 (HPC1) locus. *JAMA* 278:1251-1255, 1997

Gronberg H., Xu J., Smith J.R., Carpten J.D., Isaacs S.D., Freije D., Bova G.S., Danber J.E., Bergh A., Walsh P.C., Collins F.S., Trent J.M., Meyers D.A., Isaacs W.B.;; Early age at diagnosis in families providing evidence of linkage to the hereditary prostate cancer locus (HPC1) on chromosome 1. *Cancer Res.* 57:4707-4709, 1997

Hart I.R., Saini A.;; Biology of tumour metastasis. *Lancet.* 339:1453-1457, 1992

Hart K.B., Wood D.P. Jr., Tekyi-Mensah S., Porter A.T., Pontes J.E., Forman J.D.;; The impact of race on biochemical disease-free survival in early-stage prostate cancer patients treated with surgery or radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 45:1235-1238, 1999

Henson D.E., Hutter R.V., Farrow G.;; Practice protocol for the examination of specimens removed from patients with carcinoma of the prostate gland. A publication of the cancer committee, college of american pathologists. Task Force on the Examination of Specimens Removed From Patients With Prostate Cancer. *Arch Pathol Lab Med.* 188:779-783, 1994

Hermanek P.;; tumor classification/developments. *Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd.* 40-45, 1992

Hermanek P., Henson D.E., Hutter R.V.P., Sobin L.H.;; TNM-Supplement. A commentary on uniform use. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1993

Helpap B., Weissbach L.;; Retrospektive Untersuchungen über Behandlung und Verlauf des Prostatakarzinoms auf der Basis eines histologisch-zytologischen Gradings. *Verh. Dtsch Pathol.* 68: 376, 1984

Helpap B.;; Pathologie der ableitenden Harnwege und der Prostata. Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York, 1989

Takeji Y., Tsujitani S., Mori M., Maehara Y., Sugimachi K.: Helix pomatia agglutinin binding activity is a predictor of survival time for patients with gastric carcinoma. *Cancer* 68:2438-2442, 1991

Kawai T., Greenberg S.D., Truong L.D., Mattioli C.A., Klima M., Titus J.L.: Differences in lectin binding of malignant pleural mesothelioma and adenocarcinoma of the lung. *Am J Pathol.* 130: 401-410, 1988

Kayser K., Heil M., Gabius H.J.: Is the profile of binding of a panel of neoglycoproteins useful as a diagnostic marker in human lung cancer? *Pathol Res Pract.* 184: 621-629, 1989

Klocker H., Culig Z., Hobisch A., Cato A.C., Bartsch G.: Androgen receptor alterations in prostatic carcinoma. *Prostate.* 25:266-273, 1994

Koivisto P., Hyytinen E., Palmberg C., Tammela T., Visakorpi T., Isola J., Kallioniemi O.P.: Analysis of genetic changes underlying local recurrence of prostate carcinoma during androgen deprivation therapy. *Am J Pathol.* 147:1608-1614, 1995

Laack E., Nikbakht H., Peters A., Kugler C., Jasiewicz Y., Edler L., Brummer J., Schumacher U., Hossfeld D.K.: Expression of CEACAM1 in adenocarcinoma of the lung: a factor of independent prognostic significance. *J Clin Oncol.* 20:4279-4284, 2002

Leathem A.J., Brooks S.A.: Predictive value of lectin binding on breast-cancer recurrence and survival. *Lancet* 1 (8541):1054-1056, 1987

Mellinger G.T.: Prognosis of prostatic carcinoma. *Recent Results Cancer Res.* 61-72, 1977

Mitchell B.S., Brooks S.A., Leathem A.J., Schumacher U.: Do HPA and PHA-L have the same binding pattern in metastasizing human breast and colon cancers? *Cancer Letters* 123:113-119, 1998

Mostofi F.K., Sesterhenn I.A., Davis C.J. Jr.: A pathologist's view of prostatic carcinoma. *Cancer* 71:906-932, 1993

Müller K.M., Theile A., 1994, Lungentumore, Pathologisch-anatomische Diagnostik. *Der Internist (Berlin)* 35:710-723, 1994

Noguchi M., Stamey T.A., McNeal J.E., Nolley R.: Prognostic factors for multifocal prostate cancer in radical prostatectomy specimens: lack of significance of secondary cancers. *J Urol.* 170:459-463, 2003

Rutishauser G., Gasser Th.: Gliederung der Prostata. *Basiswissen Urologie.* Springer Verlag Berlin-Heidelberg, 2002

Scardino P.T., Weaver R., Hudson M.A.: Early detection of prostate cancer. *Hum Pathol.* 23:211-222, 1992

Schmid K.W., Helpap B., Totsch M., Kirchmair R., Dockhorn-Dworniczak B., Bocker W., Fischer-Colbrie R.: Immunohistochemical localization of chromogranins A and B and secretogranin II in normal, hyperplastic and neoplastic prostate. *Histopathology* 24:233-239, 1994

Schumacher U., Higgs D., Loizidou M., Pickering R., Leathem A., Taylor I.: Helix pomatia agglutinin binding is a useful prognostic indicator in colorectal carcinoma. *Cancer* 74:3104-3107, 1994

Schumacher U., Adam E., Brooks S.A., Leathem A.J.: Lectin-binding properties of human breast cancer cell lines and human milk with particular reference to Helix pomatia agglutinin. *J Histochem Cytochem.* 43:275-281, 1995

Schumacher U., Adam E.: Lectin histochemical HPA-binding pattern of human breast and colon cancers is associated with metastases formation in severe combined immunodeficient mice. *Histochem J.* 29:677-684, 1997

Shiraishi T., Atsumi S., Yatani R.: Comparative study of prostatic carcinoma bone metastasis among Japanese in Japan and Japanese Americans and whites in Hawaii. *Adv Exp Med Biol.* 324:7-16, 1992

Smith J.R., Freije D., Carpten J.D., Gronberg H., Xu J., Isaacs S.D., Brownstein M.J., Bova G.S., Guo H., Bujnovszky P., Nusskern D.R., Damber J.E., Bergh A., Emanuelsson M., Kallioniemi O.P., Walker-Daniels J., Bailey-Wilson J.E., Beaty T.H., Meyers D.A., Walsh P.C., Collins F.S., Trent J.M., Isaacs W.B.: Major susceptibility locus for prostate cancer on chromosome 1 suggested by a genome-wide search. *Science* 274:1371-1374, 1996

Stamey T.A., McNeal J.E., Yemoto C.M., Sigal B.M., Johnstone I.M.: Biological determinants of cancer progression in men with prostate cancer. *JAMA* 281:1395-400, 1999

Steinberg G.D., Carter, B.S., Beaty, T.H., Childs, B., Walsh, P.C.: Family history and the risk of prostate cancer. *Prostate* 17:337-347, 1990

Thies A., Moll I., Berger J., Wagener C., Brummer J., Schulze H.J., Brunner G., Schumacher U.: CEACAM1 expression in cutaneous malignant melanoma predicts the development of metastatic disease. *J Clin Oncol.* 20:2530-2536, 2002

Tomschi, W.: Prostatakarzinom-Inzidenz-Ätiologie-Risikofaktoren. *Prostatakarzinom. Arbeitskreis für urologische Onkologie*, 1992/1994

Visakorpi T., Kallioniemi A.H., Syvänen A.C., Hyytinen E.R., Karhu R., Tammela T., Isola J.J., Kallioniemi O.P.: Genetic changes in primary and recurrent prostate cancer by comparative genomic hybridization. *Cancer Res.* 55: 342-347, 1995

Vierbuchen M.J., Fruechticht W., Brackrock S., Krause K.T., Zienkiewicz T.J.: Quantitative lectin-histochemical and immunohistochemical studies on the occurrence of alpha(2,3)- and alpha(2,6)-linked sialic acid residues in colorectal carcinomas. Relation to clinicopathologic features. *Cancer* 76:727-735, 1995

Weidner N., Carroll P.R., Flax J., Blumenfeld W., Folkman J.: Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. *Am J Pathol.* 143:401-409, 1993

Weingärtner K., Ben-Sasson S.A., Stewart R., Richie J.P., Riedmiller H., Folkman J.: Endothelial cell proliferation activity in benign prostatic hyperplasia and prostate cancer: an in vitro model for assessment. *J Urol.* 159:465-470, 1998

Wolfe S.L.: Aufbau der Zellmembran. *Molecular and Cellular Biology.* Wadsworth Publishing Company, 1993

Yoshimoto A., Sakajo S., Minagawa N., Komiyama T.: Possible role of a 36 kDa protein induced by respiratory inhibitors in cyanide-resistant respiration in *Hansenula anomala*. *J Biochem.* 105:864-866, 1989

Zincke H., Bergstralh E.J., Larson-Keller J.J., Farrow G.M., Myers R.P., Lieber M.M., Barrett D.M., Rife C.C., Gonchoroff N.J.: Stage D1 prostate cancer treated by radical prostatectomy and adjuvant hormonal treatment. Evidence for favorable survival in patients with DNA diploid tumors. *Cancer* 70: 311-323, 1992

9. DANKSAGUNG

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. U. Schumacher für die Überlassung des Themas und für die Erlaubnis, die Einrichtungen des Institutes für Anatomie zu nutzen, sowie für seine Betreuung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. R. Henke und Herrn Prof. Dr. A. Ebersdobler danke ich für die freundliche Erlaubnis, histologische Präparate aus der Klinik für Urologie zu verwenden, die archivierten Patientendaten für die Auswertung heranziehen zu dürfen, sowie für die Anregungen zur Diskussion der Ergebnisse.

Herrn Professor Dr. J. Berger danke ich für die statistische Auswertung mit Anfertigung der multivariaten Cox Regressionsanalysen.

Herrn Professor Dr. C. Wagener danke ich für die freundliche Überlassung des Antikörpers 4D1/C2.

Für die ausgezeichnete technische Unterstützung, die Hilfestellung bei der Durchführung von Laborarbeiten und die Einführung in lektin- und immunhistochemische Techniken danke ich Frau Susanne Feldhaus, Frau Maike Märker, Frau Renate Gehrcke und Herrn Klaus Siebert.

10. LEBENSLAUF

Angaben zur Person

Name: Steffi Hesselbach
 Geburtstag u. -ort: 07.11.1976 in Halle/Saale
 Wohnort: Simon-Dach-Strasse 28
 10245 Berlin
 Familienstand: ledig
 Nationalität: deutsch

Schulbildung

09/1983 – 06/1987 Grundschule in Wettin an der Saale
 09/1987 – 06/1991 Gesamtschule Wettin an der Saale
 09/1991 – 06/1995 Burg-Gymnasium Wettin an der Saale
 06/1995 Abitur

Berufsausbildung

04/1996 – 09/2001 Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg mit Ärztlicher Vorprüfung, 1. und 2. Staatsexamen
 10/2001 – 09/2002 Praktisches Jahr
 1. Terial: in der Klinik für Innere Medizin am Tribhuvan-Universitätskrankenhaus Kathmandu, Nepal
 2. Terial: in der Klinik für Orthopädie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
 3. Terial: in der Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie am Universitätsklinikum Bergmannstrost Halle
 11/2002 Drittes Staatsexamen Humanmedizin
 01/2003 – 06/2004 Tätig als Ärztin im Praktikum in der Klinik für Neurochirurgie am Krankenhaus Bergmannstrost Halle
 07/2004 – 03/2006 Tätig als Assistenzärztin in der Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie am Krankenhaus Bergmannstrost Halle
 04/2004 – 03/2006 Tätig als Assistenzärztin in der Klinik für Chirurgie und Unfallchirurgie am Krankenhaus Hedwigshöhe, Berlin
 Seit 04/2006 Tätig als Assistenzärztin in der Klinik für Endoprothetik am Krankenhaus Hedwigshöhe, Berlin

11. ERKLÄRUNG

Ich versichere ausdrücklich, dass ich diese Promotionsarbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst und andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt habe. Die von mir, wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen benutzter Werke, wurden nach Verfasser, Ausgabe (Jahr und Auflage des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht. Diese Dissertation wurde bisher weder einem Fachvertreter einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt, noch habe ich mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben.

Steffi Hesselbach