

Aus dem Institut für Pathologie des
Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
Direktor Prof. Dr. med. Guido Sauter

Arbeit unter der Leitung von Dr. rer. nat. Ronald Simon und
Prof. Dr. med. Guido Sauter

**Änderungen des physiologischen PSMA-
Expressionsusters sind beim Prostatakarzinom mit
einer schlechten Prognose assoziiert**

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg vorgelegt von
Anna Petersen, Hamburg 2008

Angenommen von der Medizinischen
Fakultät der Universität Hamburg am 11.06.2009

Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. G. Sauter
Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: PD Dr. R. Simon
Prüfungsausschuss, 3. Gutachter/in: Prof. Dr. M. Graefen

Mein bester Dank für die Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit gilt Herrn PD Dr. Ronald Simon und Herrn Professor Guido Sauter sowie den Mitarbeitern des Instituts für Pathologie des Uniklinikums Hamburg-Eppendorf, ganz besonders Incken Kramme für ihre Hilfe bei der Auswertung.

INHALT

1	EINLEITUNG	5
2	MATERIAL UND METHODEN	14
2.1	TMA-Herstellung	14
2.2	Patientenproben und Prostata-Array-Herstellung	16
2.3	Immunhistochemie (IHC)	18
2.4	Statistik	19
3	ERGEBNISSE	20
3.1	PSMA-Expression	20
3.2	Assoziation zu Ki67 LI und HER2-Expression	23
4	DISKUSSION	25
5	ZUSAMMENFASSUNG	28
6	LITERATUR	29

1 EINLEITUNG

Über 220.000 Männer sterben jährlich an Prostatakrebs [1], meist an den Folgen einer Metastasierung; das Prostatakarzinom steht damit bei den Krebserkrankungen des Mannes nach dem Bronchialkarzinom an zweiter Stelle der Häufigkeit.

Die Inzidenz des Prostatakarzinoms ist weltweit sehr unterschiedlich: Während die schwarze Bevölkerung der USA mit 21 % Prostatakarzinomen an der Spitze liegt, haben asiatische Völker mit 1-7 % deutlich niedrigere Inzidenzraten; die westeuropäischen Länder liegen im mittleren bis oberen Bereich, in Europa werden jährlich etwa 2,6 Mio. neue Fälle diagnostiziert. Nach dem 60. Lebensjahr steigt die altersspezifische Inzidenz des Prostatakarzinoms steil an und erreicht zwischen dem 70. und 75. Lebensjahr einen Häufigkeitsgipfel von 20-30 %. Vor dem 40. Lebensjahr werden unter 1 %, vor dem 60. Lebensjahr ungefähr 8 % bioptisch entdeckt. Die wenigen im Jugendalter festgestellten Karzinome entsprechen nicht den gewöhnlichen Karzinomtypen, sondern hochmalignen kleinzelligen, undifferenzierten Tumoren mit einer ausgeprägten Neigung zur Metastasenbildung. [2]

Ätiologie und Pathogenese des Prostatakarzinoms

Die kausale Pathogenese des Prostatakarzinoms ist bisher nicht geklärt. Eine selten auftretende familiäre Häufung lässt in diesen Fällen Rückschlüsse auf eine genetische Prädisposition zu. Bei Erkrankung eines erstgradigen Verwandten steigt das Risiko, an einem Prostatakarzinom zu erkranken, um das Doppelte [3]. Da die Inzidenz des Prostatakarzinoms bei Einwanderern aus Ländern mit niedrigem Krebsrisiko in Länder mit höherem Krebsrisiko ansteigt, scheinen exogene Faktoren bei der Krebsentstehung eine Rolle zu spielen [3]. Ebenso sind offensichtlich hormonelle Einflüsse von Bedeutung: Bei kastrierten Männern sind keine Fälle von Prostatakrebs bekannt, bei Zirrhotikern mit erhöhten Östrogenspiegeln ist die Karzinominzidenz deutlich erniedrigt [3]. Studien über die Plasma-Testosteronwerte von Patienten mit Prostatakarzinom lieferten diesbezüglich bisher allerdings keine schlüssigen Erklärungen zur Pathogenese [2].

Eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung des Prostatakarzinoms spielen Onkogene. Ein signifikanter Einfluss auf Progression und Entwicklung maligner Neoplasien wurde beispielsweise für die Onkogene p-53-Suppressoren, c-myc, Ha-ras, Ki-ras und c-erbB-2 nachgewiesen. Viele Onkogene wurden daher auch als prognostische Marker vorgeschlagen [2].

Das gewöhnliche Prostatakarzinom entsteht im äußeren Drüsenfeld der Prostata und infiltriert sekundär das Zentrum. Es wird als dorsoperipheres Karzinom bezeichnet. An den Nervendurchtrittsstellen erfolgt die Ausbreitung auf die Prostatakapsel – am häufigsten im Apexbereich und im Bereich der Kapselbasis. Nur etwa 10 % der Prostatakarzinome entstehen zentral. Der drüsenfreie ventrale Abschnitt der Prostata ist nur bei fortgeschrittenem Tumorwachstum infiltriert.

T – Primärtumor	
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
T1	Klinisch nicht erkennbarer Tumor, der weder tastbar noch in den bildgebenden Verfahren sichtbar ist T1a Tumor zufälliger histologischer Befund („incidental carcinoma“) in 5 % oder weniger des resezierten Gewebes T1b Tumor zufälliger histologischer Befund in mehr als 5 % des resezierten Gewebes T1c Tumor durch Nadelbiopsie diagnostiziert (z. B. wegen erhöhtem PSA)
T2	Tumor auf die Prostata begrenzt T2a Tumor infiltriert die Hälfte eines Lappens oder weniger T2b Tumor infiltriert mehr als die Hälfte eines Lappens T2c Tumor infiltriert beide Lappen
T3	Tumor durchbricht die Prostatakapsel T3a Extrakapsuläre Ausbreitung (ein- oder beidseitig) T3b Tumor infiltriert Samenblase(n)
T4	Tumor infiltriert benachbarte Strukturen (Blasenhals, Sphincter externus, Rektum, Levator-Muskulatur, Beckenwand)
N – Regionäre Lymphknoten	
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Kein Anhalt für regionäre Lymphknotenmetastasen
N1	Regionäre Lymphknotenmetastasen
M – Fernmetastasen	
MX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	Kein Anhalt für Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen M1a Nicht-regionärer Lymphknotenbefall M1b Knochenmetastasen M1c andere Manifestation

Tabelle 1: Klassifikation des Prostatakarzinoms nach der TNM-Klassifikation, 6. Aufl. UICC 2002

Per continuitatem kann das Prostatakarzinom auf das periprostatiche Gewebe, die Weichteile des kleinen Beckens, Samenblase, Urethra, Harnblase und Rektum übergreifen. Hämatogene Metastasen betreffen hauptsächlich das Skelettsystem und hier bevorzugt Becken und Wirbelsäule. Die lymphogene Metastasierung erfolgt in erster Linie in die obturatorischen und iliakalen Lymphknoten. Histologische Studien zeigen, dass das Auftreten von Metastasen mit steigendem Malignitätsgrad und pluriformem Aufbau (s. u.) von Prostatakarzinomen deutlich zunimmt. [2-4]

TNM-Klassifikation

Das Tumorstadium des Prostatakarzinoms wird nach der TNM-Klassifikation beurteilt (Tabelle 1).

Einteilung nach klinischen und histologischen Kriterien

Klinisch können folgende Formen des Prostatakarzinoms unterschieden werden:

- Das *manifeste dorsoperiphere Karzinom*, das durch rektale Palpation zu diagnostizieren ist.
- Das *inzidente Karzinom*, das klinisch unbekannt ist und nur als (operativer) Zufallsbefund diagnostiziert wird. Es liegt meist anterozentral.
- Das *okkulte Karzinom*, das sich durch Metastasen äußert, ohne dass vorher der Primärtumor klinisch entdeckt wurde.
- Das *latente Karzinom*, das zu Lebzeiten des Patienten klinisch nicht nachweisbar war und nur durch Obduktion entdeckt wird.

Es werden unterschiedliche morphologische Typen des Prostatakarzinoms beschrieben, die grundsätzlich *uniforme* und *pluriforme* Muster aufweisen können.

- *Gewöhnliche Prostatakarzinome mit glandulärem, kribriformem und solide-trabekulärem Muster* können eine uniforme oder pluriforme Struktur zeigen. Zu dieser Untergruppe zählen das hochdifferenzierte, hellzellige, drüsenbildende Karzinom, das wenig differenzierte, drüsenbildende Karzinom, das kribriforme Karzinom, das solide trabekuläre und das undifferenzierte Karzinom.
- *Ungewöhnliche und seltene Prostatakarzinome*. Hierzu zählen urotheliale, plattenepitheliale, muzinöse, papillär-duktales und Basalzell-Karzinome, außerdem Karzinoide/kleinzellige Karzinome und Karzinome mit gemischter glandulärer und neuroendokriner Differenzierung.

- *Undifferenzierte Karzinome.*

Ungefähr 95 % der Prostatakarzinome entsprechen dem gewöhnlichen Typ [2]. Von ihnen zeigen ca. 47-49 % einen uniformen, 50-56 % einen pluriformen Aufbau. Bei den pluriformen Karzinomen ist der strukturell niedrigste Differenzierungsgrad maßgebend für Therapie und Prognose. Die histologische Klassifikation ist insofern von therapeutischer Bedeutung, als nur die Gruppe der gewöhnlichen Prostatakarzinome auf eine Hormontherapie anspricht. Als vorherrschendes System für das histologische Grading des Prostatakarzinoms wird das System nach Gleason angewandt. [2]

Histologisches Grading nach Gleason

Grundlage des histologischen Gradings nach Gleason sind verschiedene Wachstumsmuster des Prostatakarzinoms, die durch den Verlust der typischen histologischen Drüsenstruktur die Entdifferenzierung des Karzinoms aufzeigen. Da in ein und demselben Prostatakarzinom häufig unterschiedliche Wachstumsmuster vorliegen, ist das Gradingssystem in ein primäres Muster (vorherrschendes Muster, „predominant pattern“) und ein sekundäres Muster unterteilt worden. Abhängig vom Grad der histologischen Entdifferenzierung werden primäres und sekundäres Muster jeweils durch 1-5 Punkte graduiert. Der niedrigste Malignitätsgrad ist durch jeweils einen Punkt für primäres und sekundäres Muster charakterisiert, also insgesamt durch zwei Punkte. Entsprechend werden für den höchsten Malignitätsgrad zweimal fünf, also insgesamt zehn Punkte vergeben. Anders als bei anderen Grading-Systemen, wie beispielsweise dem histologisch-zytologischen Grading der WHO, fließen beim histologischen Grading nach Gleason Kernatypien nicht in die Klassifikation ein.

Gleason 1 und 2: Tumordrüsen gleichmäßig, rund, hellzellig. Abstand zwischen den Tumordrüsen gleichmäßig, dicht gelagert.

Gleason 3: Tumordrüsen unregelmäßig gezackt, länglich. Abstand unregelmäßig, ohne Fusion.

Gleason 4: Fusion von mindestens vier Drüsen. Kribriforme Muster: unscharf begrenzt, infiltrativ, unregelmäßige Lumina. Papilläre Muster: unscharf begrenzt. Muzinöse Prostatakarzinome.

Gleason 5: Kribriform mit Komedonekrosen. Papillär-endometrioid mit Komedonekrosen. Solid-anaplastisch ohne drüsige Differenzierung. Soli-

de, mit abortiver Lumenbildung, Siegelringzellkarzinom, kleinzelliges Karzinom, sarkomatoides Karzinom. [5]

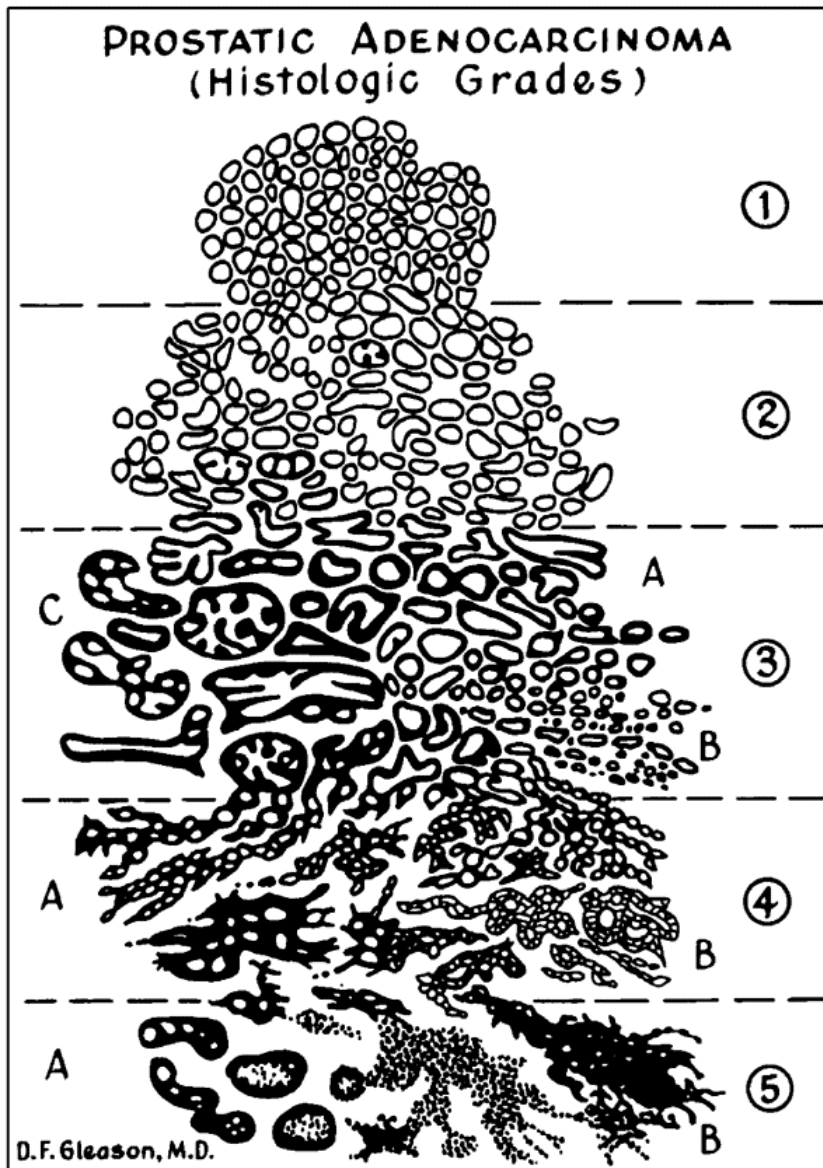


Abbildung 1: Aus Humphrey, Peter A, Gleason Grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate, *Modern Pathology* (2004) **17**, 292-306

Klinik und Diagnostik des Prostata-Karzinoms

Das Prostatakarzinom ist im Frühstadium meist symptomlos. Erst bei Infiltration der Harnröhre kommt es – wie bei der BPH (Benigne Prostatahyperplasie) – zu obstruktiven Miktionsproblemen oder auch Hämaturie. Symptome eines okkulten Karzinoms können Kreuz- oder Rückenschmerzen sein, da ossäre Metastasen bevorzugt Lendenwirbelsäule, Os sacrum, Beckenknochen und Femur infiltrieren. Zusätzlich sind bei fortgeschrittenen Tumor-

leiden unspezifische Begleitsymptome wie Gewichtsverlust, Nachtschweiß und Fieber (B-Symptomatik), eine Verschlechterung des Allgemeinzustandes und Anämien häufig.

Die vorrangigen diagnostischen Maßnahmen zur frühen Erkennung eines Prostatakarzinoms sind die rektale Palpation (digitale rektale Untersuchung), die transrektale Ultraschalluntersuchung (TRUS) und laborchemisch die Messung der PSA-Serumkonzentration (Prostata-spezifisches Antigen). [3, 4]

Prostata-spezifisches Antigen (PSA)

PSA ist ein beim Mann nur in den Prostatazellen gebildetes Glykoprotein, das vorwiegend sezerniert wird und in hoher Konzentration im Prostatasekret und damit im Ejakulat bzw. Seminalplasma vorliegt. Nur ein sehr geringer Teil gelangt von der normalen Prostata oder der BPH in die Blutbahn. Bei Tumorzellen ist dies anders: PSA wird vermehrt in die Blutbahn sezerniert und kann so als organspezifischer Marker, allerdings nicht als Tumormarker, zur Diagnostik herangezogen werden. Der Norm-PSA-Wert liegt beim Gesunden bei unter 4 ng/ml, als verdächtig gelten Serumkonzentrationen von über 10 ng/ml. Durch eine alleinige PSA-Wert-Erhöhung kann ein Prostatakarzinom allerdings nicht sicher diagnostiziert werden, sodass immer eine weiterführende diagnostische Abklärung (Biopsie unter transrektaler Ultraschallkontrolle) erfolgen sollte. [4]

Therapiemöglichkeiten

Therapie der Wahl bei Patienten mit lokal begrenztem Prostatakarzinom und einer Lebenserwartung von mindestens 10-15 Jahren ist die *radikale Prostatektomie* [6]. Die Operation ist indiziert für die Stadien T1b und T1c sowie T2. Das Stadium T3 dokumentiert eine Tumorbefestigung jenseits der Prostata kapsel, sodass mit einem erhöhten Vorkommen mikroskopischer Absiedlungen von Tumorzellen zu rechnen ist. Patienten mit Tumoren des Stadiums T3 profitieren dann von einer radikalen Operation, wenn histologisch eine nur geringfügige Kapselüberschreitung nachgewiesen werden kann (Stadium T3a), der PSA-Wert unter 20 ng/ml und der Gleason-Score unter 8 beträgt [6]. Jüngeren Patienten mit Tumoren im Stadium T1a, die einen hohen Gleason-Score haben (8-10), wird inzwischen optional ebenfalls die radikale Prostatektomie empfohlen. Inwieweit grundsätzlich eine Entfernung der Beckenlymphknoten durchgeführt werden sollte, ist umstritten [6]. Man kann jedoch festhalten, dass das Risiko eines pelvinen Lymphknotenbefalls bei Patienten mit T1c-Tumoren, einem Gleason-Score < 6 und einem PSA-Wert < 10 ng/ml relativ gering ist, bei Patienten mit Tumoren ab dem Stadium T2a, mit einem Gleason-Score ≥ 7 und

einem PSA-Wert ≥ 10 ng/ml deutlich höher ist und daher bei diesen Patienten eine ausgedehnte Lymphadenektomie des Beckenbereiches empfohlen wird. Eine postoperative Bestrahlung erwies sich in mehreren prospektiven Studien als günstig; die postoperative Überlebenszeit lag nach Bestrahlung etwa 20 % höher. [6]

Alternative bei der Therapie lokalisierter Stadien des Prostatakarzinoms ist die *Strahlentherapie*, die derzeit als beinahe gleichwertige Alternative zur radikalen Prostatektomie angesehen wird. Vor allem bei organüberschreitendem Wachstum ist eine primäre Strahlentherapie indiziert. Für Patienten mit Tumoren der Stadien T1-4 N0 M0 stellt die Bestrahlung einen kurativen Therapieansatz dar [6].

Für Patienten mit einem Low-risk-Profil (bis Stadium T1c, PSA ≤ 10 ng/ml, Gleason ≤ 6) ist eine Dosis von 72 Gy ausreichend, alternativ kann bei diesen Patienten eine Brachytherapie in Erwägung gezogen werden (siehe unten). Bei Intermediate-risk-Patienten (bis T2a mit Gleason 7-10 oder PSA 10-20 ng/ml oder T2c) ist eine Erhöhung der Strahlendosis auf Dosen zwischen 76 und 81 Gy sinnvoll. Aufgrund des Risikos eines subklinischen pelvilen Lymphknotenbefalls ist bei diesen Patienten auch eine Mitbestrahlung des Beckens indiziert, zusätzlich eine (zeitlich begrenzte) hormonblockierende Therapie. High-risk-Patienten (alle T3/T4 oder alle Gleason 7 und PSA 10-20 ng/ml, alle PSA > 20 ng/ml) profitieren nach der Bestrahlung von einer langfristigen adjuvanten Hormontherapie. [6]

Als weiteres strahlentherapeutisches Verfahren kommt unter bestimmten Voraussetzungen eine transperineale *Brachytherapie* in Frage. Indiziert ist die Low-dose-Brachytherapie bei Patienten mit Prostatakarzinomen, die folgende Kriterien erfüllen: Stadium cT1b-T2a N0 M0, Gleason-Score ≤ 6 , ein initialer PSA-Wert ≤ 10 ng/ml, ein Prostatavolumen bis 50 cm³ und ein ausreichender Abfluss (über 15 ml/s). Vorteil ist eine im Vergleich zur perkutanen Bestrahlung deutlich kürzere Behandlungszeit, es kommt allerdings häufiger zu Urethrastrikturen. [6]

Die *Behandlungsmöglichkeiten des disseminierten Prostatakarzinoms* sind palliativ ausgerichtet und zielen zunächst immer auf eine Androgendeprivation ab. Da das Wachstum des Karzinoms durch Testosteron stimuliert wird (Teilung und Proliferation der prostatistischen Epithelzellen sind von Testosteron abhängig), kann durch eine antihormonelle bzw. androgensuppressive Therapie eine Remission erzielt werden.

Als therapeutische Optionen kommen eine chirurgische Orchiectomie, eine Östrogentherapie, LNRH-Analoga und Antiandrogene in Frage. [6]

Meist kann mit diesen Mitteln eine vorübergehende Besserung der Symptome erreicht werden. Dann wird der Krebs jedoch androgen-unabhängig und schreitet sehr schnell fort. Androgen-unabhängige Prostata-Karzinome sind weitestgehend resistent gegenüber Chemotherapie. Nur eine kombinierte Chemotherapie mit Docetaxel und Prednison bietet einen geringen (2,4 Monate) Überlebensvorteil [7].

Der herausragende Erfolg *neuer genspezifischer Medikamente* wie Herceptin, Gleevec, Iressa oder Tarceva bei Brustkrebs, Bronchialkarzinom, CML und GIST weckt die Hoffnung, dass auch Patienten mit Prostata-Karzinom von solch gezielten Therapien profitieren könnten [8]. Die Ergebnisse der wenigen klinischen Studien über Anti-Prostata-Karzinom-Medikamente, die auf EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) [9], VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) [10], PSCA (Prostate Stem Cell Antigen) [11] und HER-2/neu [12, 13] zielen, waren bisher jedoch eher enttäuschend.

Prostata-spezifisches Membran-Antigen (PSMA)

PSMA ist ein Typ-II-Membranprotein, das sehr spezifisch von Prostata-Epithelzellen exprimiert wird [14, 15]. Während für extra-prostatische Gewebe enzymatische Funktionen des Proteins als Folathydrolase und Neurocarboxypeptidase beschrieben wurden [16], ist seine biologische Rolle beim Prostata-Karzinom immer noch unklar. Initiale Studien zeigten eine signifikant erhöhte PSMA-Expression beim Prostata-Karzinom im Vergleich zum Prostata-Normalgewebe [17, 18], außerdem die Assoziation einer hohen PSMA-Expression mit fortgeschrittenem Tumorstadium [19, 20], hormon-unabhängigem Tumorstadium [21], Vorhandensein von Metastasen [22] und frühem Rezidiv nach Therapie [20]. Die veröffentlichten Studien schlossen jedoch nur relativ kleine Patientengruppen ein, in denen häufig überproportional viele metastasierte oder sehr fortgeschrittene Tumorleiden zu finden waren [19-22].

Das Prostata-spezifische Membran-Antigen (PSMA) ist auch ein neues potenzielles Zielmolekül in der Therapie des Prostata-Karzinoms [23-26]. In klinischen Phase-I-Studien wurden mit dem radioisotop-gekoppelten Antikörper J591 vielversprechende erste Ergebnisse erreicht [26], Phase-II-Studien, in denen die Wirksamkeit der Anti-PSMA-Therapie bei Prostata-Krebs weiter untersucht wird, werden zur Zeit durchgeführt [27].

Gegenstand dieser Arbeit

Um mehr über die Rolle der PSMA-Expression bei Prostata-Krebs in einem früheren Stadium herauszufinden, haben wir die PSMA-Expression bei über 2.000 Prostata-Karzinomen, von denen wir die kompletten klinischen Verlaufsdaten haben, analysiert. Insbesondere haben wir die PSMA-Expression mit vorhandenen Daten zur HER-2/neu-Expression (ebenfalls Membranprotein, das als immuntherapeutische Zielstruktur dient) und zur Tumorzell-Proliferation verglichen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 TMA-Herstellung

Das Tumorarray-Verfahren erlaubt das Einbringen von bis zu tausend Gewebezylindern (Durchmesser 0.6mm) von histologisch definierten Regionen verschiedener Tumoren in einen einzigen Paraffinblock. Die Funktionsweise des „Arrayers“ ist in Abbildung 2 dargestellt.

Abbildung 3 zeigt das Array-Stanzgerät. Kernstück der Konstruktion sind zwei an der Spitze geschärfte Hohlzylinder. Die kleinere „Nadel“ hat einen äusseren Durchmesser von 0,6mm. Diese Nadel wird ausschliesslich zum Stanzen von Löchern in die Empfängerblöcke verwendet. Die dickere Nadel dient dem Ausstanzen von Tumorgewebestücken aus Spenderblöcken und dem Einbringen dieser Zylinder in den Empfängerblock. Der innere Durchmesser dieser zweiten Nadel entspricht dem äusseren Durchmesser der dünneren Nadel.

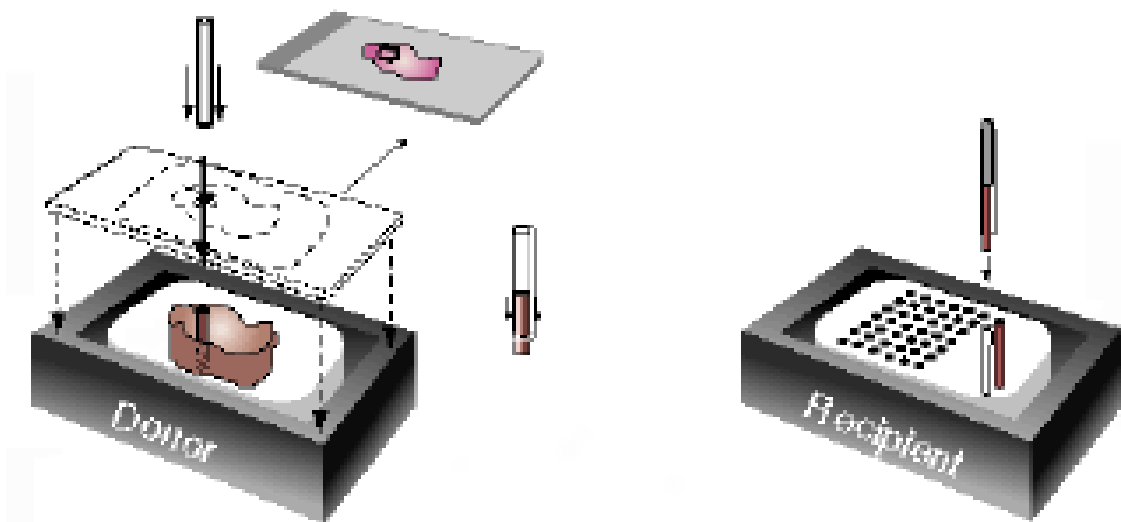


Abbildung 2: Tumor-Array-Herstellung.

Das Instrument besteht aus einem dünnen, an der Spitze geschärften Hohlzylinder (innerer Durchmesser ca. 600 μm), welcher in einem X-Y-Achsen-Präzisionsgerät gehalten wird. Ein genau in den Hohlzylinder passender Stahldraht ermöglicht das Ausstossen von gestanzten Gewebestücken in mit einem analogen Instrument (äusserer Durchmesser ca. 600 μm) vorgefertigte Löcher im Empfängerblock (Tumor-Array). Ein verstellbarer "Eindring-Stopper" sichert eine konstante Länge von Zylindern und vorgefertigten Löchern im Empfängerblock. Bis zu tausend Gewebezylinder können in einen 20 x 40 mm messenden Empfänger-Paraffinblock eingebracht werden.

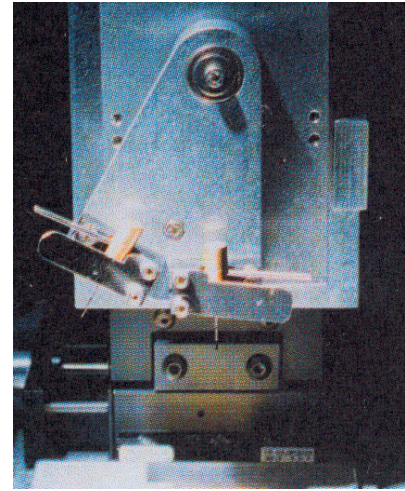


Abbildung 3: Gewebe-Array-Stanzgerät
Links: Übersicht. **Rechts:** Detailaufnahme der zwei Nadeln.

Ein Beispiel eines Array-Blocks ist in Abbildung 4 dargestellt (Hämatoxilin-Eosin (HE)-Färbung).

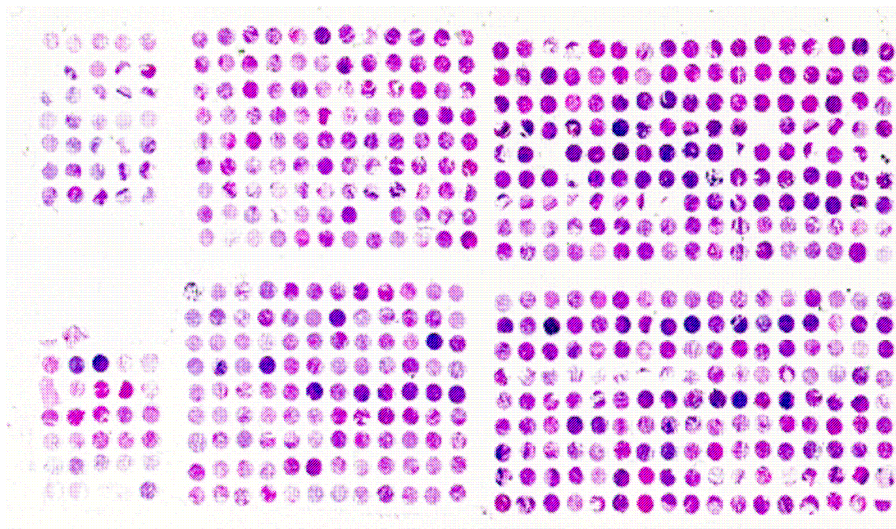


Abbildung 4: TMA. HE-Färbung, 5x Vergrößerung.
 Der Durchmesser jedes einzelnen Gewebespots ist 0,6mm.

2.2 Patientenproben und Prostata-Array-Herstellung

Der für die Studie verwendete TMA stand aus früheren Projekten zur Verfügung [28, 29]. Proben radikaler Prostatektomien waren von 3261 Patienten vorhanden, die zwischen 1992 und 2005 in der Abteilung für Urologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf behandelt wurden (Tabelle 2). Informationen über den klinischen Verlauf lagen von 2385 Patienten vor und reichten von 1 Monat bis zu 144 Monaten (im Mittel 34 Monate). Alle Prostatektomie-Proben wurden nach einer einheitlichen Vorgehensweise analysiert. Alle Prostata-Gewebe waren – wie bereits beschrieben - vollständig in Paraffin eingebettet, einschließlich der Whole-mount-Schnitte [30].

Alle Hämatoxylin- und Eosin- (H & E) gefärbten histologischen Schnitte aller Prostatektomie-Proben wurden für diese Studie nochmals durchgesehen und die Gebiete, die durch den größten Tumorherd und/oder den Herd mit dem schlechtesten Gleason-Score gekennzeichnet waren, wurden auf den Schnitten markiert.

Ein 0,6 mm großer Gewebezylinder wurde aus dem Tumorzentrum jeder Probe ausgestanzt und wie beschrieben in ein TMA-Format übertragen [31]. Die 3261 Gewebezylinder wurden auf 7 TMA-Blöcke verteilt, von denen jeder zwischen 129 und 522 Tumorproben enthielt. Jeder TMA-Block enthielt außerdem verschiedenen Kontrollgewebe, einschließlich 10 Prostata-Normalgewebeproben.

Merkmal	Anzahl Patienten (%)	
	Studienkohorte auf TMA (n = 3261)	BCR innerhalb der Kate- gorien (n = 2385)
Nachbehandlung (in Monaten)		
Mittelwert	34.9	-
Median	30.5	-
Alter (in Jahren)		
<50	83	13 (15,8)
50-60	998	157 (15,7)
60-70	1807	315 (17,4)
>70	175	46 (26,3)
PSA vor Behandlung (ng/ml)		
<4	513	48 (9,4)
4-10	1673	200 (12,0)
10-20	641	163 (25,4)
>20	225	113 (50,2)
Pathologisches Stadium (AJCC 2002)		
pT2a	298	12 (4,0)
pT2b	1077	95 (8,8)
pT2c	705	22 (3,1)
pT3a	609	171 (28,1)
pT3b	372	200 (53,8)
pT4	42	38 (90,5)
Gleason-Grad		
≤3+3	1426	66 (4,6)
3+4	1311	263 (20,1)
4+3	313	172 (55,0)
≥4+4	55	37 (67,3)
Pathologisches Lymphknoten- Stadium		
pN0	1156	
pN>0	1544	369 (23,9)
pN>0	96	73 (76,0)
pNx	1457	94 (6,5)
Resektionsrand		
negativ	2475	328 (13,3)
positiv	627	209 (33,3)

Tabelle 2: Klinische und pathologische Charakteristika sowie biochemische Rezidivrate (BCR) von 3261 Prostatakarzinom-Patienten. Aufgrund fehlender Daten reichen die Zahlen nicht in allen Kategorien bis 3261.

2.3 Immunhistochemie (IHC)

Indirekte Standard-Immunperoxidase-Verfahren wurden für den Nachweis der PSMA- und Ki67-Expression verwendet. Frisch geschnittene TMA-Schnitte wurden am selben Tag in einem Experiment analysiert, um eine größtmögliche Homogenität in der IHC zu erreichen. PSMA- (Abcam Ltd, Cambridge, UK, Cat #Ab19071) und MIB-1- (DAKO, Glostrup, DK, Cat #M7240) Antikörper wurden verwendet. Für die PSMA-Detektion wurden die TMA-Schnitte in einer Autoklaven bei einem pH von 7,8 fünf Minuten lang vorbehandelt, um die Antigene wieder zugänglich zu machen.

Beste Färbeergebnisse im Hinblick auf den Signal-Hintergrund-Kontrast wurden erreicht, wenn der Antikörper im Verhältnis 1:1.800 (Endkonzentration: 550 ng/ml) verdünnt wurde. Für die Ki67-Detektion wurden die TMA-Schnitte zur Wiederherstellung der Antigene in einem Dampfkocher bei einem pH von 6 fünf Minuten vorbehandelt. Beste Färbeergebnisse was das Verhältnis Signal - Hintergrund betrifft wurden erreicht, wenn der Primäranantikörper im Verhältnis 1:50 (Endkonzentration: 20 ng/ml) verdünnt wurde.

Bei den Primäranantikörpern wurden keine Negativkontrollen gemacht. Auf die Negativkontrollen konnte aufgrund des typischen Bindemusters von PSMA als membranständiges Protein (Membrandominanz) und der charakteristischen Gewebeverteilung von Ki67 (ausschließlich Nuclei und alle Mitosen positiv) verzichtet werden. Das Envision- System (DAKO) wurde für die optische Darstellung der Antikörperreaktionen genutzt. Gewebeproben, die eine membranöse oder zytoplasmatische Färbung zeigten, wurden im Hinblick auf die PSMA-Expression als positiv betrachtet. Die Färbeintensität (0, 1+, 2+, 3+) und der Anteil der positiven Tumorzellen wurden für jeden Gewebe-Spot festgehalten. Die PSMA-Level wurden nach vordefinierten Kriterien kategorisiert:

Negativ: überhaupt keine Färbung; schwach: 1+ Intensität; mittel/moderat: 2+ oder 3+ Intensität in < 30 % der Tumorzellen; stark: 2+ oder 3+ Intensität in > 30 % der Tumorzellen. Der Ki67 LI wurde definiert als der Anteil an Tumorzellen, der irgendeine nukleäre Ki67-Immunoreaktivität zeigte. 100 Tumorzellen wurden pro Gewebespot gezählt, um den Ki67 LI zu bestimmen. Die immunhistochemischen Daten für die HER2-Expression waren aus einer früheren Studie verfügbar [32]. Zum Vergleich mit der PSMA-Expression haben wir die Komplexität der vorhandenen HER-2-Daten reduziert: Tumoren ohne eine HER-2-Färbung in der vorherigen Studie wurden als negativ betrachtet, Tumoren mit einer 1+ Färbeintensität als „schwach“ gewertet, Tumoren mit einer 2+ oder 3+ Intensität zu einer „starken“ Gruppe zusammengefasst.

2.4 Statistik

Die statistischen Berechnungen wurden mit Hilfe der JMP Statistik-Software (SAS Institute, Cary, NC) durchgeführt. Wahrscheinlichkeitsberechnungen wurden mit dem χ^2 -Test und dem Fisher-Exact-Test berechnet, Überlebenskurven mit der Kaplan-Meier-Methode berechnet und mit dem Logrank-Test verglichen. Die Cox-Regression wurde genutzt, um die Unabhängigkeit von histologischen Parametern und der PSMA-Expression zu überprüfen, um einen Wiederanstieg von PSA nach radikaler Prostatektomie vorauszusagen.

Der ANOVA-Test wurde angewendet, um die Beziehung zwischen Ki67 LI und PSMA-Expression zu untersuchen.

3 ERGEBNISSE

3.1 PSMA-Expression

In 2433 von 3261 (74,6 %) Gewebeproben des Arrays war Prostatakarzinomgewebe vorhanden. Nicht-informative Fälle wurden durch fehlende Spots auf dem TMA oder durch Nichtvorhandensein von eindeutigem Tumorgewebe nach IHC-Färbung mit einem Antikörper gegen den Basalzellmarker 34BE12 IHC (480; 14,7 %; Daten nicht gezeigt) verursacht. Eine Gesamtanzahl von 137 (4,2 %) Spots enthielt entweder normales Prostatagewebe, hochgradige intraepitheliale Neoplasie des Prostatagewebes oder nur Bindegewebe. In 2238 von 2433 (91,8 %) Prostatakarzinomen war eine immunhistochemische Färbung nachweisbar, ebenso im Prostatanormalgewebe. Repräsentative Bilder werden in Abbildung 5 gezeigt. Während im Prostatanormalgewebe die PSMA-Expression im Normalfall gering war, korrelierte eine starke PSMA-Positivität signifikant mit einem hohen Gleason-Grad ($p < 0,0001$), erhöhten PSA-Wert ($p < 0,0001$) und positiven Resektionsrändern ($p = 0,0450$) (Tabelle 3).

		n	PSMA-Expressionslevel			p-Wert
			negativ (%)	schwach (%)	stark (%)	
Alle Tumoren		2433	8.0	24.6	67.4	
Tumorstadium	pT2	1468	8.4	26.8	64.8	0.0006
	pT3a	500	7.6	22.6	69.8	
	pT3b	306	5.9	17.6	76.5	
	pT4	37	18.9	24.3	56.8	
Gleason-Grad	≤3+3	971	10.1	30.9	59.0	<0.0001
	3+4	1034	6.7	21.2	72.1	
	4+3	260	6.5	16.2	77.3	
	≥4+4	48	4.2	20.8	75.0	
Lymphknotenstadium	pN0	1191	7.3	23.7	69.0	0.1774
	pN+	75	6.7	14.7	78.6	
PSA (ng/ml)	<4	354	10.2	28.2	61.6	0.0001
	4-10	1213	9.3	25.8	64.9	
	10-20	519	4.8	22.4	72.8	
	>20	190	5.3	17.4	77.4	
Resektionsrand	positiv	499	9.8	21.0	69.1	0.0450
	negativ	1811	7.6	25.7	66.8	

Tabelle 3: PSMA-IHC-Ergebnisse

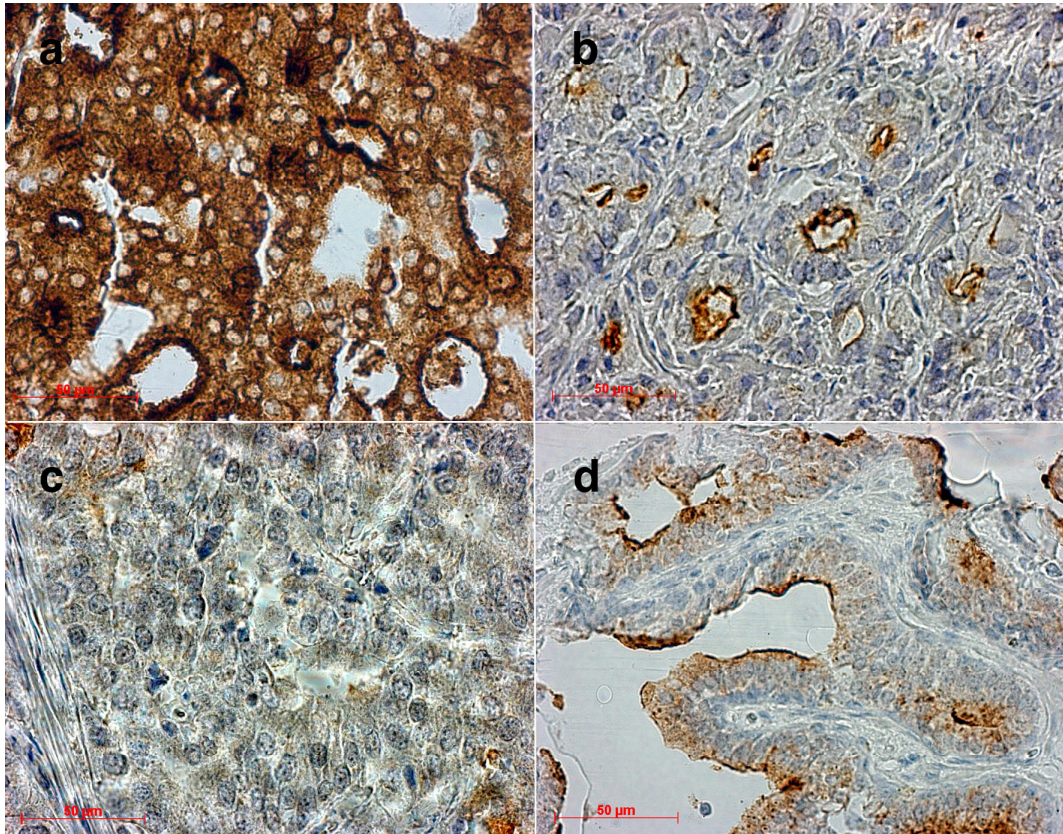


Abbildung 5: Beispiele von PSMA-Immunfärbungen. a-c) Hochgradige Prostatakarzinome, die a) eine starke diffuse Positivität, b) eine apikale Färbung in den Prostataadrüsen, und c) einen Verlust der PSMA-Expression zeigen. d) Apikale Färbung in Prostanormalgewebe.

Die PSMA-Expression korrelierte auch signifikant mit dem Tumorstadium ($p = 0,0006$), diese Assoziation war jedoch nicht linear. Die Fraktion der stark PSMA-positiven Tumoren stieg von Stadium pT2 (64,8 %) zu Stadium pT3b (76,5 %) an, fiel von Stadium pT3b zu Stadium pT4 (56,8 %) allerdings wieder ab. Damit übereinstimmend war die Anzahl der komplett PSMA-negativen Karzinome bei pT4-Fällen am häufigsten (18,9 % vs. 5,9 % in pT3b). Eine ähnlich kontroverse Beobachtung haben wir in unserer Überlebensanalyse gemacht. Sowohl Tumoren mit starker PSMA-Expression als auch Tumoren ohne jede PSMA-Färbung hatten ein signifikant erhöhtes Risiko für einen frühen Wiederanstieg von PSA (Abbildung 6a). In einer Multivariat-Analyse, die pT-Stadium, Gleason-Grad und postoperative PSA-Level einschloss, war diese Assoziation nicht unabhängig von etablierten Prognosefaktoren (Tabelle 4).

Parameter	Variable	RR	95% CI	p-Wert
pT-Stadium	pT2 vs pT3	1.05	0.90-1.24	<0.0001
	pT2 vs pT4	2.57	1.97-3.29	
Gleason-Grad	≤3+3 vs 3+4	0.73	0.62-0.86	<0.0001
	≤3+3 vs 4+3	1.91	1.60-2.29	
	≤3+3 vs ≥4+4	2.35	1.74-3.09	
PSA-Level	<4 vs 4-10	0.83	0.71-0.98	0.0004
	<4 vs 10-20	1.16	0.98-1.36	
	<4 vs >20	1.36	1.13-1.64	
PSMA-Expression	schwach vs. stark	1	0.86-1.17	0.4053
	schwach vs. negativ	1.13	0.88-1.42	

Tabelle 4: Multivariat-Analyse (Cox-Regressions-Modell)

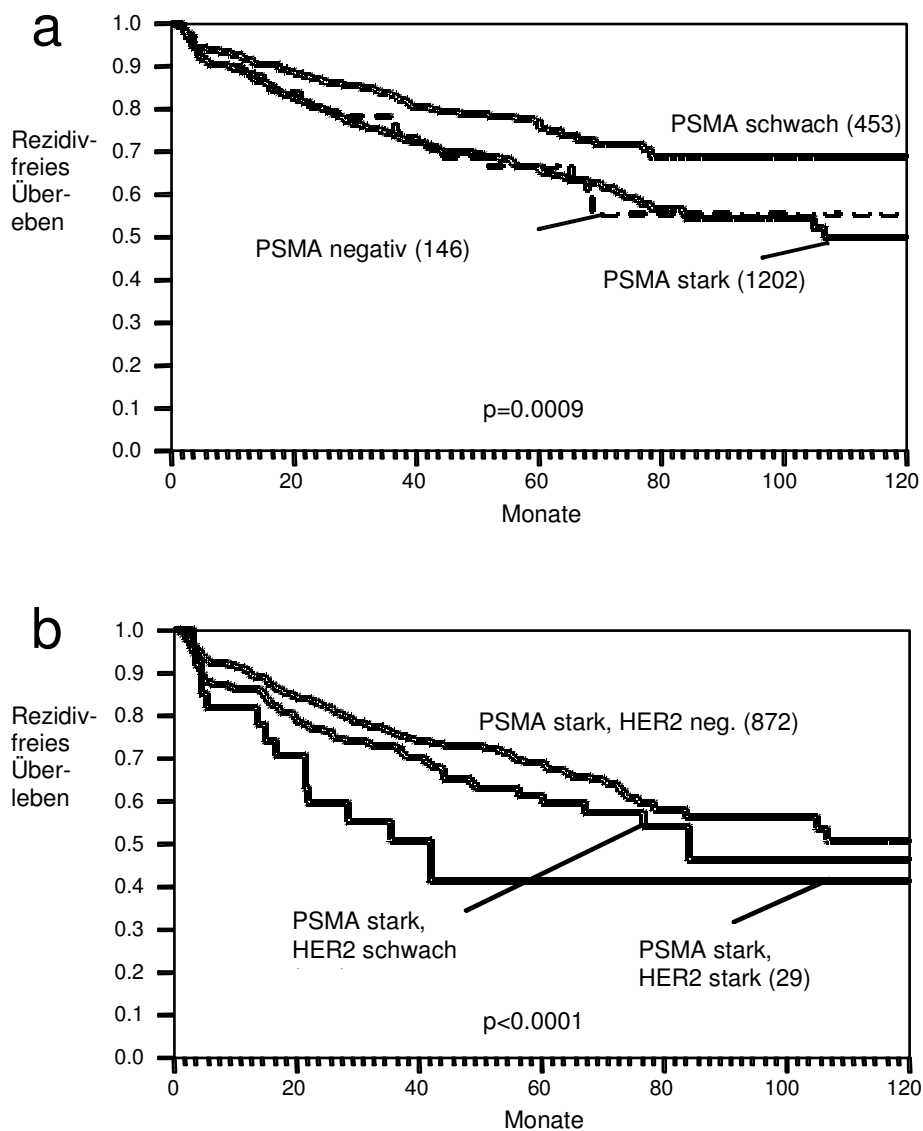


Abbildung 6: a) PSMA-Expression und rezidivfreies Überleben bei Prostatakarzinom-Patienten. b) Einfluss einer PSMA-HER2-Koexpression auf die Prostatakarzinom-Prognose.

3.2 Assoziation zu Ki67 LI und HER2-Expression

Eine immunhistochemische Ki67-Färbung konnte in 2276 Tumoren, zu denen PSMA-Daten vorlagen, analysiert werden. Der Ki67 LI war 4,3 % (+/- 0,23 %) bei Tumoren mit schwacher PSMA-Färbung und höher bei Karzinomen mit entweder verlorengegangener (4,6 % +/- 0,38 LI) oder starker PSMA-Expression (4,8 % +/- 0,13 % LI) (Abbildung 7). Diese Unterschiede waren statistisch jedoch nicht signifikant ($p = 0,2969$).

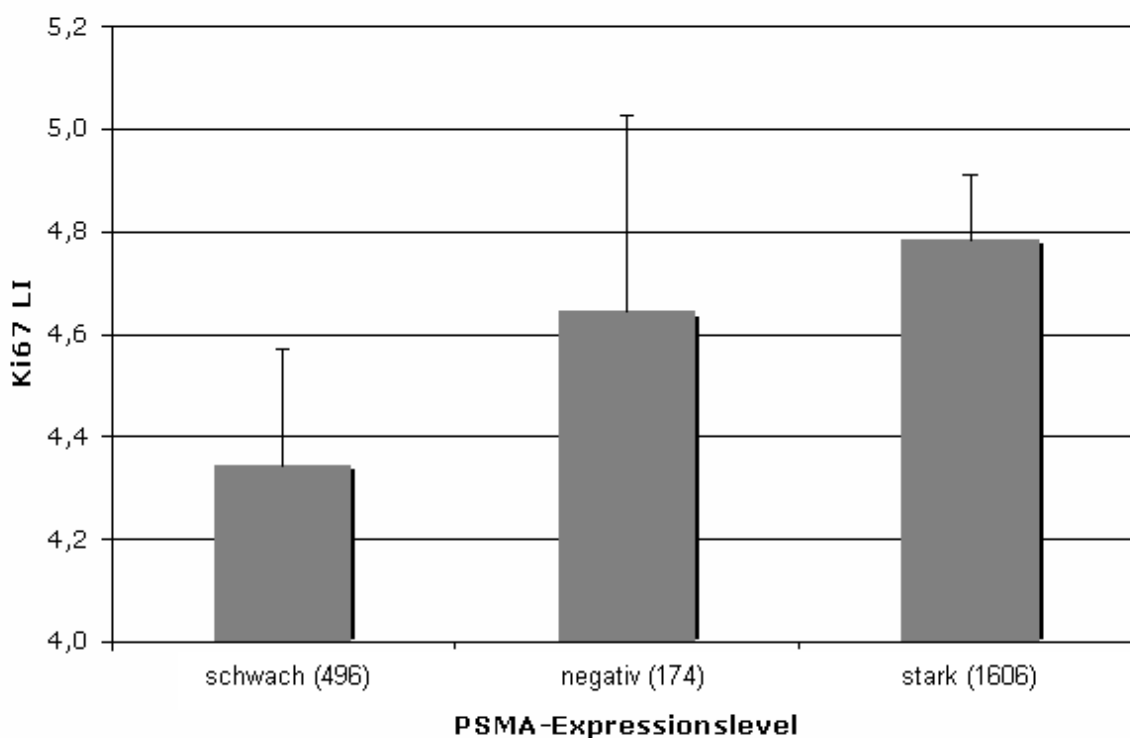


Abbildung 7: Beziehung zwischen PSMA-Expressionsleveln und Zellproliferation, gemessen durch den Ki67 LI.

Eine nachweisbare HER2-Färbung konnte bei 524 Tumoren mit vorhandenen Daten zur PSMA-Expression festgestellt werden. Unter diesen Tumoren konnte eine Korrelation zwischen HER2-Expression und PSMA-Positivität festgestellt werden. Nur 17/192 (8,9 %) der PSMA-negativen, aber 432/1621 (26,7 %) der stark PSMA-positiven Tumoren zeigten gleichzeitig auch eine HER2-Protein-Expression ($p < 0,0001$ %, Abbildung 8).

Eine starke HER2-Expression wurde fast ausschließlich (36/37, 97 %) in stark PSMA-exprimierenden Karzinomen gefunden. Innerhalb dieser Untergruppe der „starken PSMA-

Expressierer“ hatten Tumoren mit einer starken HER2-Koexpression eine signifikant schlechtere Prognose als Tumoren mit nur schwacher oder keiner HER2-Positivität ($p < 0,0001$, Abbildung 6 b). Die Anzahl der HER2-positiven Proben ohne PSMA-Expression ($n = 10$) war zu gering für eine sinnvolle statistische Analyse.

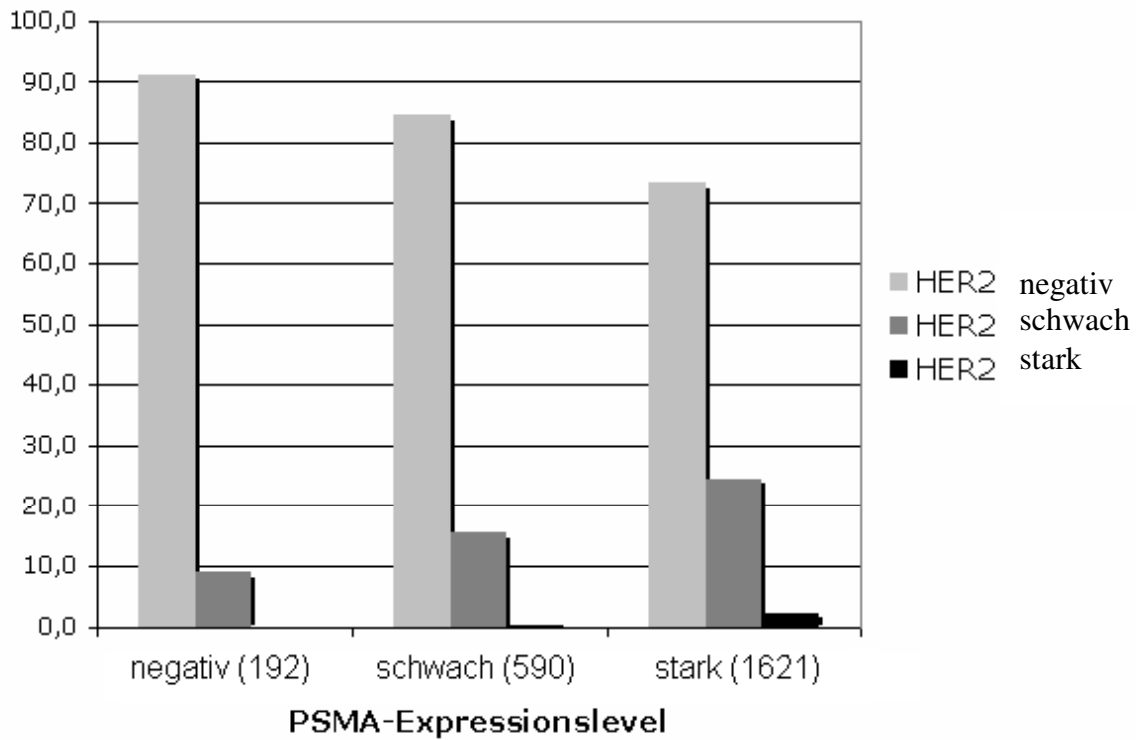


Abbildung 8: Beziehung zwischen immunhistochemischen PSMA- und HER2-Expressionsleveln.

4 DISKUSSION

Eine PSMA-Expression wurde bei der großen Mehrheit der über 2.000 analysierten Prostatakarzinome gefunden und korrelierte mit unterschiedlichen klinisch-pathologischen Faktoren. Während diese Assoziationen aus früheren Studien bekannt waren [15, 17, 19, 20], erlaubte die hohe Anzahl an Karzinomen, die in diese Studie eingeschlossen waren, die Identifizierung einer Untergruppe von mehr als 180 Tumoren ohne jegliche nachweisbare PSMA-Expression. Bemerkenswerterweise hatten diese Tumoren eine genauso schlechte Prognose wie die Tumoren mit der höchsten PSMA-Expression.

PSMA-negative Prostata-Karzinome sind bisher nicht beschrieben worden. Dies könnte mit der durchgehend kleinen Größe früherer Studien, die normalerweise weniger als 200 Proben einschlossen, in Zusammenhang stehen. Solch kleine Fallzahlen sind ganz offensichtlich nicht geeignet, um seltene Ereignisse festzustellen, die durch ein abweichendes molekulares Profil gekennzeichnet sind. Dies trifft insbesondere auf negative IHC-Ergebnisse zu. Es ist bekannt, dass eine gewisse Anzahl an Negativ-Ergebnissen in IHC-Studien immer vorkommt – oft durch methodische Fehler verursacht. Beispielsweise kann eine nicht optimale Gewebefixierung in manchen Fällen zu einem Verlust der Antigenität führen. Weil eine PSMA-Expression in allen normalen Prostata-Zellen bekannt ist [15, 17, 33], wäre es möglich, dass in manchen Fällen PSMA-negative Ergebnisse als „falsch-negativ“ interpretiert wurden und so möglicherweise von nachfolgenden Untersuchungen ausgeschlossen wurden. In unserer Studie ist es sehr unwahrscheinlich, dass negative PSMA-Ergebnisse durch technische Fehler verursacht wurden: Nicht nur deshalb, weil ein Verlust der PSMA-Expression mit einer verringerten Lebenserwartung korrelierte (was für einen Artefakt ungewöhnlich wäre), sondern auch, weil fast alle (174/186, 93 %) PSMA-negativen Gewebespots deutlich immunreaktiv mit Ki67-Antikörpern waren. Unserer Erfahrung nach ist die Ki67-Immunhistochemie gegenüber Gewebeartefakten ausgesprochen sensibel.

Die relativ schwache PSMA-Positivität in normalem Prostatagewebe, die in unserer und in früheren Studien gefunden wurde [14, 18, 34, 35], legt nahe, dass eine schwache PSMA-Expression den physiologischen (normalen) Proteinlevel darstellen könnte. Die Beobachtung, dass sowohl stark positive als auch komplett negative Tumoren eine besonders schlechte Prognose haben, ist auffällig. Die physiologische Rolle von PSMA in Prostata-

gewebe ist bis jetzt nicht vollständig geklärt. Vermutete Funktionen schließen eine Rolle bei der Nährstoffaufnahme, der Zellmigration oder der Signaltransduktion ein [36, 37]. Die genannten Mechanismen würden mit einem Überlebensvorteil von PSMA-überexprimierenden Zellen einhergehen und so die schlechte Prognose von stark PSMA-positiven Karzinomen erklären. Gleichzeitig zeigen aber unsere Daten, dass erhöhte PSMA-Level für die Entwicklung eines aggressiven Prostatakarzinoms offensichtlich nicht zwingend vorliegen müssen. Es bleibt allerdings unklar, ob aggressive PSMA-negative Tumoren *de novo* entstehen oder sekundär aus ehemals PSMA-überexprimierenden Tumoren. Im ersten Fall könnte PSMA-Negativität Kennzeichen eines spezifischen Pathways in der Entwicklung des Prostatakarzinoms sein. Im zweiten Fall könnte der Verlust der physiologischen PSMA-Expression als ein generelles Phänomen von Entdifferenzierung gesehen werden.

Aufgrund seiner hohen Spezifität für Prostatazellen und seiner häufigen Überexpression in Prostatakarzinomen besteht die Hoffnung, dass PSMA ein geeignetes therapeutisches Zielmolekül für Anti-Prostatakrebs-Medikamente darstellt. Unsere Ergebnisse mit über 90 % PSMA-positiven Tumoren bestärken diese Theorie. Dennoch lässt das Ergebnis von fast 10 % PSMA-negativen Karzinomen vermuten, dass nicht alle Tumoren von Anti-PSMA-Therapien profitieren würden. Prätherapeutische immunhistochemische Testungen beim Prostatakarzinom könnten daher für die Entscheidung, ob eine solche Therapie durchgeführt werden soll, notwendig sein.

Die antikörperbasierte Krebstherapie hat mit dem Einsatz Gen-spezifischer Medikamente in letzter Zeit vielversprechende Ergebnisse gezeigt, sowohl bei fortgeschrittenen Krebsleiden als auch als adjuvante Maßnahme [8]. Dennoch scheinen trotz einer initial hohen Ansprechrate auf die Therapie die meisten Tumoren nach einer bestimmten Zeit wieder zu wachsen. Das könnte dadurch erklärt werden, dass kleinere Untergruppen von Krebszellen Mutationen oder andere Molekülveränderungen aufweisen, die eine Resistenz gegenüber den immuntherapeutischen Präparaten ermöglichen. Man kann davon ausgehen, dass ein solches Resistenz-Problem durch ein simultanes Angreifen zweier oder mehrerer verschiedener Moleküle minimiert werden könnte. Um dieser Frage nachzugehen, haben wir in unserem TMA auch Koexpressionsmuster von PSMA und HER2 analysiert. In einer früheren Studie haben wir unter Verwendung eines sehr sensiblen IHC-Assays 20 % HER2-positiv Prostata-Karzinome gefunden [32]. Die besonders hohe PSMA-Expression, die in

den HER2-positiven Fällen dieser Studie gefunden wurde, spricht für den möglichen Nutzen einer kombinierten Anti-PSMA-anti-HER2-Therapie. Aufgrund der besonders schlechten Prognose von HER2/PSMA-koexprimierenden Tumoren könnte diese Beobachtung durchaus relevant sein.

Zusammenfassend belegen unsere Daten, dass PSMA häufig und stark in aggressiven Prostatakarzinomen exprimiert wird. Interessanterweise gab es in unserer Studie jedoch auch eine Untergruppe von fast 10 % PSMA-negativen Tumoren, die durch eine ähnlich schlechte Prognose wie die PSMA-überexprimierenden Tumoren gekennzeichnet waren. Im Hinblick auf eine mögliche Anti-PSMA-Therapie legen diese Daten nahe, dass molekulare Testungen notwendig sein könnten, um Patienten zu identifizieren, die von einer Anti-PSMA-Behandlung profitieren würden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Das Prostata-spezifische Membran-Antigen (PSMA) stellt eine mögliche Zielprotein der Antikörper-basierten Krebstherapie des Prostatakarzinoms dar. Um herauszufinden, welche Rolle PSMA in der Entwicklung von Prostatakrebs spielt, haben wir mittels immun-histochemischer Verfahren mehr als 2.500 Prostatakarzinome auf einem Gewebe-Microarray (Tissue-Microarray, TMA) im Hinblick auf ihre PSMA-Expression untersucht. Die PSMA-Immunfärbungen wurden mit klinischen Follow-up-Daten, bestehender HER2-Expression und Ki67-LI-Daten verglichen. Eine PSMA-Expression konnte in mehr als 91,9 % der Karzinome beobachtet werden, in über 70 % in hohem Maße, und korrelierte mit fortgeschrittenem Tumorstadium ($p=0,0006$), hohem Gleason-Grad ($p<0,0001$) und HER2-Expression ($p<0,0001$). Wie aufgrund der Ergebnisse früherer Studien erwartet, hatten Tumoren mit einer starken PSMA-Expression eine signifikant schlechtere Prognose als Tumoren mit einer nur schwach ausgeprägten PSMA-Färbeintensität ($p=0,0009$). Eine kleine Untergruppe von 8,1 % der Prostatakarzinome zeigte überhaupt keine nachweisbare PSMA-Expression. Überraschenderweise hatten diese PSMA-negativen Tumoren eine ebenso schlechte Prognose wie die Tumoren mit starker PSMA-Expression. Eine signifikante Untergruppe der aggressiven Prostatakarzinome zeigte also keine PSMA-Expression und würde demnach vermutlich auch nicht von einer Anti-PSMA-Therapie profitieren.

6 LITERATUR

1. Parkin, D.M., et al., *Global cancer statistics, 2002*. CA Cancer J Clin, 2005. **55**(2): p. 74-108.
2. Remmele, *Pathologie*. Vol. 5. 1997, Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag. 80-94.
3. Hautmann, H., *Urologie*. 3 ed. 2006, Heidelberg: Springer-Verlag. 229-241.
4. Alken, W., *Urologie*. 2 ed. 1998: Chapman and Hall. 246-258.
5. Gleason, D.F. and G.T. Mellinger, *Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging*. J Urol, 1974. **111**(1): p. 58-64.
6. Heidenreich, A., et al., *EAU guidelines on prostate cancer*. Eur Urol, 2008. **53**(1): p. 68-80.
7. Petrylak, D.P., et al., *Docetaxel and estramustine compared with mitoxantrone and prednisone for advanced refractory prostate cancer*. N Engl J Med, 2004. **351**(15): p. 1513-20.
8. Benson, J.D., et al., *Validating cancer drug targets*. Nature, 2006. **441**(7092): p. 451-6.
9. Canil, C.M., et al., *Randomized phase II study of two doses of gefitinib in hormone-refractory prostate cancer: a trial of the National Cancer Institute of Canada-Clinical Trials Group*. J Clin Oncol, 2005. **23**(3): p. 455-60.
10. Picus J, H.S., Rini B, *The use of bevacizumab (B) with docetaxel (D) and estramustine (E) in hormone refractory prostate cancer (HRPC): initial results of CALGB 90006*. Proc Am Soc Clin Oncol, 2003. **22**: p. 393.
11. Ross, S., et al., *Prostate stem cell antigen as therapy target: tissue expression and in vivo efficacy of an immunoconjugate*. Cancer Res, 2002. **62**(9): p. 2546-53.
12. Lara, P.N., Jr., et al., *Trastuzumab plus docetaxel in HER-2/neu-positive prostate carcinoma: final results from the California Cancer Consortium Screening and Phase II Trial*. Cancer, 2004. **100**(10): p. 2125-31.
13. Morris, M.J., et al., *HER-2 profiling and targeting in prostate carcinoma*. Cancer, 2002. **94**(4): p. 980-6.
14. Israeli, R.S., et al., *Molecular cloning of a complementary DNA encoding a prostate-specific membrane antigen*. Cancer Res, 1993. **53**(2): p. 227-30.
15. Kinoshita, Y., et al., *Expression of prostate-specific membrane antigen in normal and malignant human tissues*. World J Surg, 2006. **30**(4): p. 628-36.

16. Pinto, J.T., et al., *Prostate-specific membrane antigen: a novel folate hydrolase in human prostatic carcinoma cells*. Clin Cancer Res, 1996. **2**(9): p. 1445-51.
17. Bostwick, D.G., et al., *Prostate specific membrane antigen expression in prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma: a study of 184 cases*. Cancer, 1998. **82**(11): p. 2256-61.
18. Horoszewicz, J.S., E. Kawinski, and G.P. Murphy, *Monoclonal antibodies to a new antigenic marker in epithelial prostatic cells and serum of prostatic cancer patients*. Anticancer Res, 1987. **7**(5B): p. 927-35.
19. Marchal, C., et al., *Expression of prostate specific membrane antigen (PSMA) in prostatic adenocarcinoma and prostatic intraepithelial neoplasia*. Histol Histopathol, 2004. **19**(3): p. 715-8.
20. Ross, J.S., et al., *Correlation of primary tumor prostate-specific membrane antigen expression with disease recurrence in prostate cancer*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(17): p. 6357-62.
21. Wright, G.L., Jr., et al., *Upregulation of prostate-specific membrane antigen after androgen-deprivation therapy*. Urology, 1996. **48**(2): p. 326-34.
22. Sweat, S.D., et al., *Prostate-specific membrane antigen expression is greatest in prostate adenocarcinoma and lymph node metastases*. Urology, 1998. **52**(4): p. 637-40.
23. Bander, N.H., et al., *Targeting metastatic prostate cancer with radiolabeled monoclonal antibody J591 to the extracellular domain of prostate specific membrane antigen*. J Urol, 2003. **170**(5): p. 1717-21.
24. Henry, M.D., et al., *A prostate-specific membrane antigen-targeted monoclonal antibody-chemotherapeutic conjugate designed for the treatment of prostate cancer*. Cancer Res, 2004. **64**(21): p. 7995-8001.
25. Kahn, D., et al., *¹¹¹Indium-capromab pendetide in the evaluation of patients with residual or recurrent prostate cancer after radical prostatectomy. The ProstaScint Study Group*. J Urol, 1998. **159**(6): p. 2041-6; discussion 2046-7.
26. Milowsky, M.I., et al., *Phase I trial of yttrium-90-labeled anti-prostate-specific membrane antigen monoclonal antibody J591 for androgen-independent prostate cancer*. J Clin Oncol, 2004. **22**(13): p. 2522-31.
27. Ross, J.S., et al., *Antibody-based therapeutics: focus on prostate cancer*. Cancer Metastasis Rev, 2005. **24**(4): p. 521-37.

28. Schlomm, T., et al., *Clinical significance of p53 alterations in surgically treated prostate cancers*. Mod Pathol, 2008.
29. Schlomm, T., et al., *Clinical significance of epidermal growth factor receptor protein overexpression and gene copy number gains in prostate cancer*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(22 Pt 1): p. 6579-84.
30. Erbersdobler, A., et al., *Tumour grade, proliferation, apoptosis, microvessel density, p53, and bcl-2 in prostate cancers: differences between tumours located in the transition zone and in the peripheral zone*. Eur Urol, 2002. **41**(1): p. 40-6.
31. Bubendorf, L., et al., *Survey of gene amplifications during prostate cancer progression by high-throughout fluorescence in situ hybridization on tissue microarrays*. Cancer Res, 1999. **59**(4): p. 803-6.
32. Schlomm T, e.a., *Low level HER2 expression is associated with rapid tumor cell proliferation and poor prognosis in prostate cancer*. 2006 (submitted).
33. Silver, D.A., et al., *Prostate-specific membrane antigen expression in normal and malignant human tissues*. Clin Cancer Res, 1997. **3**(1): p. 81-5.
34. Troyer, J.K., M.L. Beckett, and G.L. Wright, Jr., *Detection and characterization of the prostate-specific membrane antigen (PSMA) in tissue extracts and body fluids*. Int J Cancer, 1995. **62**(5): p. 552-8.
35. Wright, G.L., Jr., Haley, C, Beckett, ML, et al., *Expression of prostate-specific membrane antigen (PSMA) in normal, benign and malignant prostate tissues*. Urol Oncol, 1995. **1**: p. 18-28.
36. Ghosh, A. and W.D. Heston, *Tumor target prostate specific membrane antigen (PSMA) and its regulation in prostate cancer*. J Cell Biochem, 2004. **91**(3): p. 528-39.
37. Rajasekaran, A.K., G. Anilkumar, and J.J. Christiansen, *Is prostate-specific membrane antigen a multifunctional protein?* Am J Physiol Cell Physiol, 2005. **288**(5): p. C975-81.

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

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

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