

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Institut für Pathologie

Direktor Prof. Dr. med. Guido Sauter

Prognostische Bedeutung der immunhistologischen CD166 Expression beim Prostatakarzinom

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin

an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Franziska Krätzig

aus Göttingen

Hamburg 2011

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 25.05.2012

**Veröffentlicht mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität
Hamburg:**

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

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. U. Schumacher

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: Prof. Dr. H. Heinzer

ARBEITSHYPOTHESE UND FRAGESTELLUNG	5
1 EINLEITUNG	6
1.1 Epidemiologie des Prostatakarzinoms	6
1.2 Ätiologie des Prostatakarzinoms	6
1.3 Pathologie des Prostatakarzinoms	7
1.4 Diagnostik des Prostatakarzinoms	9
1.5 Therapieoptionen beim Prostatakarzinom	10
1.6 Prognosefaktoren beim Prostatakarzinom unter besonderer Berücksichtigung des Zelladhäsionsmoleküls ALCAM	13
2 MATERIAL UND METHODEN	16
2.1 Patienten	16
2.2 Gewebeproben	16
2.3 Tissue-Microarray (TMA)	17
2.4 Immunhistochemie	19
2.5 Bewertung des Tumorgewebes	20
2.6 Statistik	21
3 ERGEBNISSE	22
3.1 Auswertbarkeit	22
3.2 Expression von ALCAM im Prostatakarzinom	22
3.3 Follow-up Daten	26
3.4 Multivariate Analyse	30

4 DISKUSSION	31
4.1 Methodische Aspekte	31
4.1.1 Besonderheiten des Prostatakarzinoms	31
4.1.2 Tissue-Microarray	32
4.1.3 Antikörper-Verdünnungen	33
4.2 ALCAM beim Prostatakarzinom und verschiedenen Tumortypen	34
4.2.1 Lokalisation von ALCAM	34
4.2.2 Veränderte Expressionsmuster von ALCAM in verschiedenen Tumoren	36
4.2.3 Ergebnisse dieser Studie	38
4.2.4 Bedeutung der Ergebnisse für die Praxis	39
5 ZUSAMMENFASSUNG	41
6 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	42
7 LITERATURVERZEICHNIS	43
8 ABBILDUNGSVERZEICHNIS	50
9 TABELLENVERZEICHNIS	50
10 DANKSAGUNG	51
11 LEBENSLAUF	52
11 EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	53

Arbeitshypothese und Fragestellung

ALCAM/CD166 (Activated leukocyte cell adhesion molecule/ Cluster of differentiation 166) ist ein Transmembranprotein, welches relativ homogen in der Membran vom Prostataepithel exprimiert wird. Es wird vermutet, dass ALCAM an der physiologischen Aufrechterhaltung von Zell-Zell-Interaktionen in zahlreichen Organen beteiligt ist.

Zurzeit wird die Rolle von ALCAM im Tumorgeschehen untersucht. Es gibt bereits Studien zu der Expression von ALCAM bei malignen Melanomen, Mammakarzinomen, kolorektalen Karzinomen, Blasenkarzinomen und beim Plattenepithelkarzinom.

Über die Expression im Prostatakarzinom ist bekannt, dass eine Änderung der Expression stattfindet, wobei die prognostische Relevanz kontrovers diskutiert wird.

Diese Arbeit soll untersuchen, ob eine abweichende Expression von ALCAM im Prostatakarzinom eine Bedeutung für die Diagnostik hat und somit als unabhängiger prognostischer Marker eingesetzt werden kann.

Alle bisherigen Erkenntnisse basieren nur auf relativ kleinen Patientenkollektiven. Dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf stehen jedoch über 3000 Prostatektomiepräparate zur Verfügung, von denen die meisten klinische Verlaufsdaten aufweisen. Dieses Prostatakarzinomgewebe wird immunhistologisch auf die Expression von ALCAM hin untersucht, damit klinische und prognostische Aussagen getroffen werden können.

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie des Prostatakarzinoms

Das Prostatakarzinom liegt mit 20% an erster Stelle der jährlich registrierten Krebsneuerkrankungen des Mannes. Dies entspricht einer Anzahl von 49000 neuen Prostatakarzinomen pro Jahr. Die Inzidenzzahlen haben sich somit innerhalb von etwa 8 Jahren fast verdoppelt. Ursächlich für dieses Phänomen sind eine immer besser werdende Diagnostik, zunehmendes Patientenalter und eine breitere zur Verfügung stehende Datenbasis.

Als positiv zu verzeichnen ist eine nicht gestiegene, sondern über die Jahre konstant gebliebene Mortalitätsrate von 10%. Damit liegt das Prostatakarzinom an dritter Stelle der krebsbedingten Todesursachen, hinter dem Bronchialkarzinom (26%) und dem kolorektalen Karzinom (12,4%).

Eine deutliche Verbesserung ist auch in der relativen-5-Jahres-Überlebensrate zu erkennen, die zurzeit zwischen 83 und 94% liegt [1,2]. (Quellen beziehen sich auf alle oben genannten Zahlen.)

1.2 Ätiologie des Prostatakarzinoms

Obwohl die Karzinogenese Gegenstand intensiver Nachforschungen ist, konnte sie für das Prostatakarzinom noch nicht hinreichend geklärt werden. Dennoch gibt es einige Faktoren, die die Entstehung begünstigen [3].

Der wohl wichtigste Risikofaktor ist das steigende Lebensalter. Drei Viertel aller Prostatakarzinome treten bei Männern auf, die 65 Jahre und älter sind [4], wobei das mittlere Erkrankungsalter bei 70 Jahren liegt [2]. Es konnte in Studien gezeigt werden, dass Männer mit 75 bis 79 Jahren ein annähernd 130fach höheres Risiko haben an Prostatakrebs zu erkranken als Männer im Alter zwischen 45 und 49 Jahren [3].

Auch ethnografische Ursachen spielen bei der Entstehung eines Prostatakarzinoms eine Rolle. So wird für schwarze US-Amerikaner die höchste Inzidenz-

rate weltweit verzeichnet. Sie haben ein 2mal so hohes Risiko ein Karzinom zu entwickeln als die weiße Bevölkerung. In Japan und China beispielsweise liegt die Rate der Krankheitsfälle auf einem sehr niedrigen Niveau. Immigrieren diese Bevölkerungsgruppen jedoch in risikoreichere Länder, wie beispielsweise die USA, so steigt auch unter ihnen die Inzidenzrate; was wiederum die Frage aufwirft, ob neben ethnografischen Ursachen auch die Ernährung und die Lebensweise von Bedeutung sind [4,5].

Eine weitere wichtige Ursache für die Karzinogenese ist die genetische Prädisposition. Es konnte gezeigt werden, dass etwa 9% der Prostatakarzinome hereditär bedingt sind. Das Risiko an einem Prostatakarzinom zu erkranken, wenn ein Verwandter 1. oder 2. Grades betroffen ist, steigt um das 2fache. Außerdem bricht die Krankheit bei diesen Personen oft schon zu einem früheren Zeitpunkt aus [5,6].

Ebenfalls eine Rolle spielt der Testosteronspiegel, denn dieser begünstigt das Wachstum manifester Karzinome, da die Tumorzellen scheinbar auf die Stimulation durch Androgene angewiesen sind. Ob allerdings die Entstehung des Prostatakarzinoms hormonabhängig ist, wurde noch nicht hinreichend untersucht und ist fraglich [3]. Es konnte allerdings in Studien ermittelt werden, dass Männer, die zu einem frühen Zeitpunkt kastriert wurden, kaum an einem Prostatakarzinom erkrankten [4].

1.3 Pathologie des Prostatakarzinoms

Das Prostatakarzinom ist zu 95% ein Adenokarzinom, welches von transformierten Stammzellen aus der Basalzellschicht abstammt. Es ist zu 70% in der peripheren Zone, zu 25% in der Transitionalzone und zu 5% zentral lokalisiert. In mehr als 85% der Fälle entsteht der Tumor multizentrisch [7,8].

Die prostatistische intraepitheliale Neoplasie ist charakterisiert durch eine beginnende Auflösung der Zellarchitektur mit Destruktionen der Basalzellschicht und stellt somit eine wichtige Progression zum invasiven Karzinom dar. Auch finden sich bei Vorstufen des Prostatakarzinoms zelluläre Atypien und prominente, singuläre Nukleolen mit zunehmend exzentrischer Lagerung [7,9].

Wichtige Kriterien für die Diagnose des Prostatakarzinoms sind irreguläre, invasive Wachstumsmuster, Verhalten der Zellen zum Stroma, entzündliche Begleitreaktion, Kernplasmarelation und Nukleolen- und Mitosehäufigkeit. Diese Charakteristika der Tumorzellen werden auch bei der Tumordifferenzierung verwendet und stellen das Grading dar [9,10].

Das Grading des Tumors ist ein wichtiger Prognosefaktor und hat das Ziel eine Korrelation zu den klinischen Verlaufswerten aufzuzeigen. Auch wenn die Reproduzierbarkeit des Gratings nicht perfekt ist, so ist es momentan doch einer der aussagekräftigsten prognostischen Faktoren, welcher signifikant mit Überleben und Krankheitsverlauf in Zusammenhang steht [11].

Das sogenannte Gleason-Grading hat sich international durchgesetzt und wird vom National Cancer Institute in den USA empfohlen. Es beurteilt den Differenzierungsgrad der Tumorzellen auf einer Skala von 1 bis 5, wobei 1 für sehr gut differenziertes und 5 für niedrig differenziertes Gewebe steht (*siehe Tabelle 1*). Die meisten Tumore wachsen jedoch multifokal und deshalb wird das primäre und sekundäre Wachstumsmuster gleichwertig addiert, so dass ein Score von 2 bis 10 entsteht. [3,8,12].

Tabelle 1: Histologisches Wachstumsmuster des Prostatakarzinoms [8,12]

Muster 1	Sehr gut differenzierte, dicht gepackte, kleine uniforme Drüsen in umschriebenen Haufen.
Muster 2	Ähnlich wie Muster 1 mit bereits mäßiggradigen Unterschieden in Größe und Form der Drüsen. Es finden sich stärkere Atypien in den einzelnen Zellen. Die Krebsherde sind jedoch umschriebener oder lockerer angeordnet.
Muster 3	Die Unregelmäßigkeiten hinsichtlich Größe und Form der Drüsen haben zugenommen. Schmale Drüsen und einzelne Tumorzellen wachsen infiltrierend aus umschriebenen Herden heraus.
Muster 4	Hier handelt es sich um große helle Zellen, die diffus wachsen, aber noch eine glanduläre Differenzierung aufweisen können.

Muster 5

Diese Karzinome entsprechen niedrig differenzierten Formen, die ein solides oder diffuses Wachstum mit geringer oder fehlender Differenzierung der Drüsen aufweisen.

1.4 Diagnostik des Prostatakarzinoms

Die digital rektale Untersuchung (DRU) gilt als Basisuntersuchung in der Prostatakarzinomdiagnostik. Einem erfahrenen Urologen ist es danach möglich eine Verdachtsdiagnose zu stellen. Als verdächtig gelten harte, knotige Bezirke der Prostata, jedoch kommen ursächlich auch gutartige Erkrankungen für solch einen positiven Tastbefund in Betracht [13]. Der Nachteil dieser Methode ist allerdings, dass Tumore der Transitionalzone im vorderen Bereich der Prostata übersehen und Veränderungen der Prostata erst in einem fortgeschrittenen Stadium erkannt werden, was dazu führt, dass etwa 32% der Karzinome auch von erfahrenen Urologen bei dieser Untersuchungsmethode übersehen werden. Trotz dieser Unsicherheiten stellt die DRU eine wichtige Basisuntersuchung dar und wird als Vorsorge jedem Mann ab dem 45. Lebensjahr empfohlen.

Zur genaueren Bestimmung der Größe des Tumors und zur Lokalisation ist die transrektale Ultraschalluntersuchung (TRUS) geeignet. Ein entscheidender Nachteil hierbei ist jedoch die fehlende Sensitivität für Tumore, die ein geringes Volumen aufweisen [14].

Die Bestimmung des prostataspezifischen Antigens (PSA) hat als erster routinemäßig angewandter Tumormarker vor allem Bedeutung in der Tumornachsorge. Als diagnostisches Mittel in der Früherkennung von Prostatakarzinomen ist das PSA momentan umstritten, da es zwar als organspezifisch, nicht aber als tumorspezifisch gilt. Grundsätzlich galt ein Wert von über 4 ng/ml als verdächtig und abklärungsbedürftig. Allerdings wurden in jüngster Zeit neue altersspezifische Grenzen festgelegt, um eine PSA-Wert Erhöhung noch besser einschätzen zu können und dem Risiko einer Überdiagnostik zu entgehen [4,15,16].

Die Diagnose Prostatakarzinom kann ausschließlich nach dem Nachweis von Karzinomzellen im Prostatagewebe gestellt werden. Dazu werden Gewebeproben

mittels ultraschallgesteuerter Biopsie entnommen. Es handelt sich dabei um eine Sextantenbiopsie, bei der jeweils 3 Gewebestanzten aus Apex, Mitte und Basis beider Prostatalappen entnommen und danach histologisch untersucht werden können. Momentan werden bereits vielerorts standardmäßig 8-fach Biopsien entnommen, um die Trefferquote nochmals zu erhöhen [14,17].

1.5 Therapieoptionen beim Prostatakarzinom

Bei der Behandlung des Prostatakarzinoms gibt es kein einheitliches Therapiekonzept. Jeder Patient benötigt eine individuelle Planung, wobei Tumorausdehnung, Tumorstadium, Lymphknotenbefall, eventuell vorhandene Fernmetastasen und der Allgemeinzustand des Patienten berücksichtigt werden muss.

In Deutschland wird das Tumorstaging nach dem TNM-Schema der UICC (Union International contre le Cancer) durchgeführt, das sich auf die Ausbreitung des Tumors in Bezug auf die anatomischen Grenzen bezieht. Für die Bestimmung der T-, N- und M-Kategorien ist stets eine klinische Untersuchung, die Durchführung von biochemischen Tests, bildgebende Verfahren, eine Endoskopie und eine Skelettuntersuchung notwendig [18].

Tabelle 2: TNM Klassifikation [19]

TNM	Erklärung
Tx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
T1	Klinisch inapparenter Tumor, weder tastbar noch in bildgebendem Verfahren sichtbar
T1a	Inzidenten Karzinom in weniger als 5% des resezierten Gewebes
T1b	Inzidenten Karzinom in mehr als 5% des resezierten Gewebes
T1c	Tumor durch Nadelbiopsie identifiziert
T2	Tumor auf Prostata begrenzt
T2a	Tumor infiltriert die Hälfte eines Prostatalappens

T2b	Tumor in über der Hälfte eines Prostatalappens
T2c	Tumor befällt beide Lappen
T3	Tumor durchbricht die Prostatakapsel
T3a	Uni- und bilaterale extrakapsuläre Ausdehnung
T3b	Tumor infiltriert Samenblase
T4	Tumor infiltriert benachbarte Strukturen außer den Samenblasen
Nx	Regionale Lymphknoten wurden nicht untersucht
N0	Kein Anhalt für regionäre Lymphknotenmetastasen
N1	Regionäre Lymphknotenmetastasen
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen
M1a	Nichtregionäre Lymphknotenmetastasen
M1b	Knochenmetastasen
M1c	Fernmetastasen anderer Lokalisation

Das Tumolvolumen beim Prostatakarzinom korreliert in besonderem Maße mit der Aggressivität des Tumors. Es steht im Zusammenhang mit Gleason-Grad, dem chirurgischen Resektionsrand, dem pT-Status und dem Progressionsrisiko. Erst ab einem Tumolvolumen von $0,5 \text{ cm}^3$ wird von einem klinisch manifesten Prostatakarzinom gesprochen, das als therapiebedürftig angesehen wird, da man davon ausgeht, dass kleine Tumore bis $0,2 \text{ cm}^3$ noch keine Metastasierungsfähigkeit besitzen [20].

Das lokalisierte Prostatakarzinom (T_1 - T_2 , N_0 , M_0) gilt allgemein als kurabel und die radikale Prostatektomie stellt die Methode der Wahl dar. Voraussetzung für eine Operation ist aber ein guter Allgemeinzustand und aufgrund des langsamen Wachstumsverhaltens des Prostatakarzinoms, eine Lebenserwartung des Patienten von mindestens 10-15 Jahren. Ist die Entfernung des gesamten Tumors

während der Operation möglich, so wird die Prognose als günstig eingeschätzt. Die Langzeitüberlebensrate kann zwischen 80 und 90% liegen und die intraoperative Mortalität liegt unter 1% [21, 22, 23].

Eine alternative Therapieoption ist die Strahlentherapie, die ebenfalls ein kuratives Behandlungsziel bei lokal begrenzten Prostatakarzinomen verfolgt. Es konnte gezeigt werden, dass die Brachytherapie bei den Niedrigrisikogruppen bereits ähnliche Ergebnisse erreichen konnte wie die radikale Prostatektomie. Außerdem ist die Bestrahlung insbesondere ein Therapiekonzept für Patienten ab dem 70. Lebensjahr, für Menschen mit einem erhöhten Risiko bei einer Operation und für solche, die einen chirurgischen Eingriff ablehnen. Ebenfalls Anwendung findet die Strahlentherapie in Fällen von Tumorpersistenz nach radikaler Prostatektomie und langsam ansteigendem PSA-Wert nach einer Operation. Liegt bereits ein fortgeschrittenes Tumorstadium vor, so ist die Strahlentherapie lediglich als palliativer Therapieansatz zu betrachten [23, 24].

Bei der Therapieentscheidung eines fortgeschrittenen Prostatakarzinoms steht vor allem die Verbesserung der Lebensqualität des Patienten im Vordergrund.

Als weitere Therapieoption steht die Hormonbehandlung zur Verfügung. Dabei erfolgt durch die Gabe von LHRH-Analoga oder Antiandrogenen eine chemische Kastration, wobei der Testosteronspiegel auf Werte unter 5% sinkt. Da das Prostatakarzinom in 80% der Fälle eine Hormonsensibilität aufweist, erfolgt meist eine Hemmung der Tumorpheriferation und somit eine Befundverbesserung. Diese Therapieform ist allerdings eine rein palliative Behandlung, da die Wirkung des Hormonentzugs in der Regel nach einigen Jahren nachlässt.

Ein weiterer palliativer Therapieansatz ist die Chemotherapie, die lange als wenig wirksam galt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Ansprechrate bei circa 20% liegt und gerade bei einem Tumorrediv oder nach versagender Hormontherapie von einer Chemotherapie profitiert werden kann [25].

1.6 Prognosefaktoren beim Prostatakarzinom unter besonderer Berücksichtigung des Zelladhäsionsmoleküls ALCAM

In der Tumorthherapie wird es immer wichtiger, ein individuelles Therapiekonzept für jeden einzelnen Patienten erstellen zu können. Besonders beim Prostatakarzinom sucht man nach Wegen, die aggressiv wachsenden und daher lebensbedrohlichen Formen möglichst früh diagnostizieren zu können. Wichtige Prognosefaktoren sind zum jetzigen Zeitpunkt die Bestimmung des PSA-Wertes prä- und postoperativ, die bildgebende Diagnostik und die digital rektale Untersuchung. Nach einer radikalen Prostatektomie werden für die Prognose das Grading, das Tumolvolumen und die Tumorausdehnung berücksichtigt [11].

Neben den allgemein etablierten Prognosefaktoren wird in der Literatur auch immer wieder über neue molekulare Tumormarker diskutiert, die eine frühe Prognose ermöglichen könnten [26] und eine Aussage über Krankheitsverlauf und möglichen Krankheitsausbruch treffen [11] oder neue therapeutische Zielstrukturen identifizieren könnten [2].

Eine Schlüsselrolle nehmen dabei die Zelladhäsionsmoleküle ein. Die Zelladhäsion ist ein wichtiger Prozess bei der Differenzierung und Etablierung von Gewebearchitektur. Bereits bei einer Neoplasie ist die normale Gewebearchitektur gestört [27] und auch die Anhäufung von Tumorzellen muss über adhäsive Mechanismen verfügen. Bei der Metastasierung, bei der Tumorzellen ins umliegende Gewebe, ins Blutssystem oder in das Lymphsystem auswandern, werden wahrscheinlich Expressionsmuster von Adhäsionsmolekülen moduliert, um so die Absonderung vom Primärtumor zu ermöglichen. Es wird demnach vermutet, dass verschiedene Arten der Adhäsion in unterschiedlichen Tumorstadien von Nutzen sein könnten [27].

Ein besonderes Augenmerk soll in dieser Arbeit auf das Molekül *Activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM/CD166)* gelegt werden, welches zu der Immunglobulin Superfamilie (IgSF) gehört. Gemeinsam ist dieser Gruppe die Immunglobulin-Domäne (Ig-Domäne), die aus zwei beta-Faltblattstrukturen mit antiparallelen beta-Strängen besteht. Innerhalb der beta-Stränge wechseln sich hydrophobe und hydrophile Aminosäuren ab. Die hydrophilen Aminosäuren liegen

dabei außen und die hydrophoben Aminosäuren sind nach innen gerichtet, sie halten über hydrophobe Wechselwirkungen die beiden Faltblätter zusammen [28]. Oft werden die beiden Faltblätter zusätzlich durch Disulfidbrücken stabilisiert [27, 30]. Die Ig-Domänen sind in der Lage inter- und intrazelluläre Wechselwirkungen einzugehen [30].

Die Moleküle dieser Untergruppe der Zelladhäsionsmoleküle übernehmen Aufgaben wie Antigenerkennung, Komplementbildung, Signalübertragung und Ca^{2+} -unabhängige zelluläre Adhäsion.

Das Molekül ALCAM gehört zu einer kleinen Untergruppe der Immunglobulin Superfamilie, die 2 Amino-terminale variable (v)-Typ Ig-Domänen und 3 konstante (c)-Typ Ig-Domänen hat [31]. Insgesamt ist ALCAM aus 5 extrazellulären Domänen, einer Transmembranregion und einem kurzen zytoplasmatischen Ausläufer aufgebaut [29]. Das Molekulargewicht beträgt 65 kDa und steigt nach der N-Glykolisierung auf 110 kDa an [32,33]. Das Gen für ALCAM ist auf dem langen Arm des Chromosoms 3 (3q13.1-q13.2) lokalisiert [34].

Die homophile Bindung von ALCAM wird durch das Aktin-Zytoskelett reguliert, wohingegen an der heterotypischen Adhäsion der Rezeptor CD6 beteiligt ist [29]. Die Amino-terminale Ig-Domäne ist die exakte Bindungsstelle für die ALCAM-ALCAM Adhäsion [35].

ALCAM ist ein Zelladhäsionsmolekül, welches in epithelialen Zellen von vielen Organen exprimiert wird. Die Aufgaben dieses Moleküls sind sehr vielfältig. Unter anderem ist ALCAM an der Angiogenese, der Hämatopoese, der Neurogenese, der Embryogenese und der Immunantwort beteiligt [31]. Auch bei der Vaskulogenese und der Entzündungsreaktion spielt ALCAM eine Rolle [35]. ALCAM wird vor allem in Zellen exprimiert, die an dynamischen Wachstumsprozessen beteiligt sind. Es wird vermutet, dass ALCAM die Zellbeweglichkeit fördert [35].

Abweichungen in der Expression von ALCAM wurden in verschiedensten Tumortypen festgestellt. Auch im Prostatakarzinom wird ALCAM exprimiert. Welche Rolle es dort spielt ist bislang noch nicht hinreichend geklärt, denn auch im gesunden Epithel der Prostata ist ALCAM aufzufinden.

Ziel dieser Studie soll es sein ALCAM als potentiellen molekularen Prognosemarker im Prostatakarzinom zu untersuchen.

2 Material und Methoden

2.1 Patienten

Für diese Arbeit stand Material von 3261 Patienten zur Verfügung, die zwischen 1992 und 2005 am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf in der Abteilung für Urologie radikal prostatektomiert wurden. Bei den verwendeten Proben handelte es sich stets um in Paraffin fixierte Prostatektomiepräparate aus dem Archiv des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf. Für diese Präparate stand eine anonymisierte Datenbank zur Verfügung. Diese beinhaltete klinische und pathologische TNM Klassifikationen, präoperative PSA-Werte (ng/ml), Gleason-Grad, in manchen Fällen das Tumolvolumen (cm³), positiven oder negativen Randstatus und zum Teil postoperative Daten zum Krankheitsverlauf, sowie Auftreten eines PSA-Rezidivs.

Follow-up Daten waren verfügbar für 2385 Patienten, wobei sich die Nachbeobachtungszeit zwischen einem und 144 Monaten bewegte.

Keiner der Patienten bekam eine neoadjuvante oder adjuvante Therapie. Eine ergänzende Behandlung wurde nur im Falle eines biochemischen Rezidivs durchgeführt. Bei allen Patienten wurde im ersten Jahr postoperativ der PSA-Wert vierteljährlich, im zweiten Jahr halbjährlich und nach dem dritten Jahr jährlich gemessen. Betrug der postoperative PSA-Wert 0,1 ng/ml oder mehr, so wurde dies als ein biochemisches Rezidiv gewertet.

2.2 Gewebeproben

Die formalin-fixierten Gewebeproben aus der Datenbank wurden sorgfältig auf das Vorhandensein von Tumorgewebe geprüft und der Tumorherd wurde auf den Schnitten markiert, um nur aus den sorgfältig ausgewählten Arealen Proben für den TMA (Tissue-Microarray) anzufertigen.

2.3 Tissue-Microarray (TMA)

Die Gewebearray Technik macht es möglich bis zu 1000 verschiedene Gewebeprobe­nen auf einem einzigen Objektträger unter standardisierten Bedingungen zu untersuchen und stellt somit einen wichtigen Fortschritt in der Tumorforschung dar [36]. Die Funktionsweise des Tumorarray-Verfahrens ist in *Abbildung 1* dargestellt.

Die ausgewählten Gewebeprobe­nen dieser Studie wurden nun zur Herstellung eines TMA eingesetzt.

Zuerst wurden die Bohrungen der Empfängerblöcke aus reinem Paraffin durchgeführt. Dann wurden mit Hilfe einer Nadel Gewebezylinder mit einem Durchmesser von 0,6 mm aus dem Donorblock entnommen (*Abb.1(A)*, *Abb.2*) und in den Empfängerblock transferiert (*Abb.1(B)*). Insgesamt wurden 129-522 Gewebeprobe­nen auf einen Empfängerblock platziert (*Abb.2*) und auf sechs Quadranten (A-F) verteilt. Die Quadranten A-D enthielten Prostatakarzinomgewebe und für die Quadranten E und F wurde Kontrollgewebe ausgewählt. Das Kontrollgewebe diente stets der Überprüfung der Färbequalität und der Kontrolle der Antikörperspezifität [37].

Um eine bessere Orientierung bei der Arbeit zu haben wurde ein Koordinatensystem zum Einbetten der Proben verwendet.

Die insgesamt 3261 Proben der Prostatakarzinome wurden auf 7 TMA Blöcke verteilt, die wiederum jeweils 129-522 Tumorproben enthielten.

Die neu hergestellten Paraffinblöcke wurden am Mikrotom geschnitten und konnten auf einen Objektträger übertragen und fixiert werden (*Abb.1(C,D)*). Im Anschluss war es möglich die Färbung mit einem Antikörper durchzuführen.

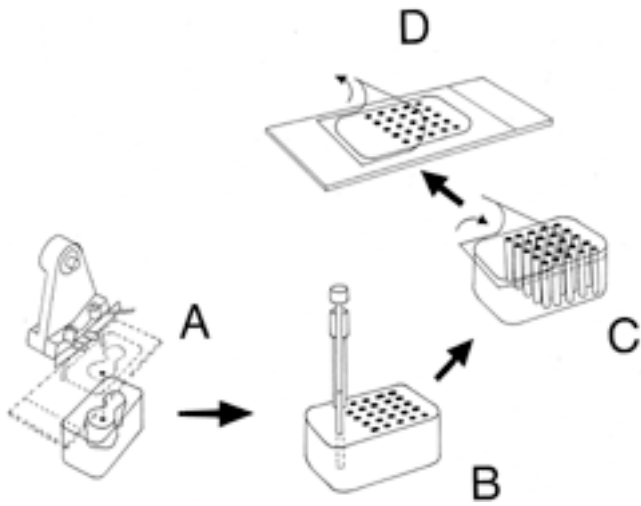


Abbildung 1: Funktionsweise des Tumorarray-Verfahrens [38]

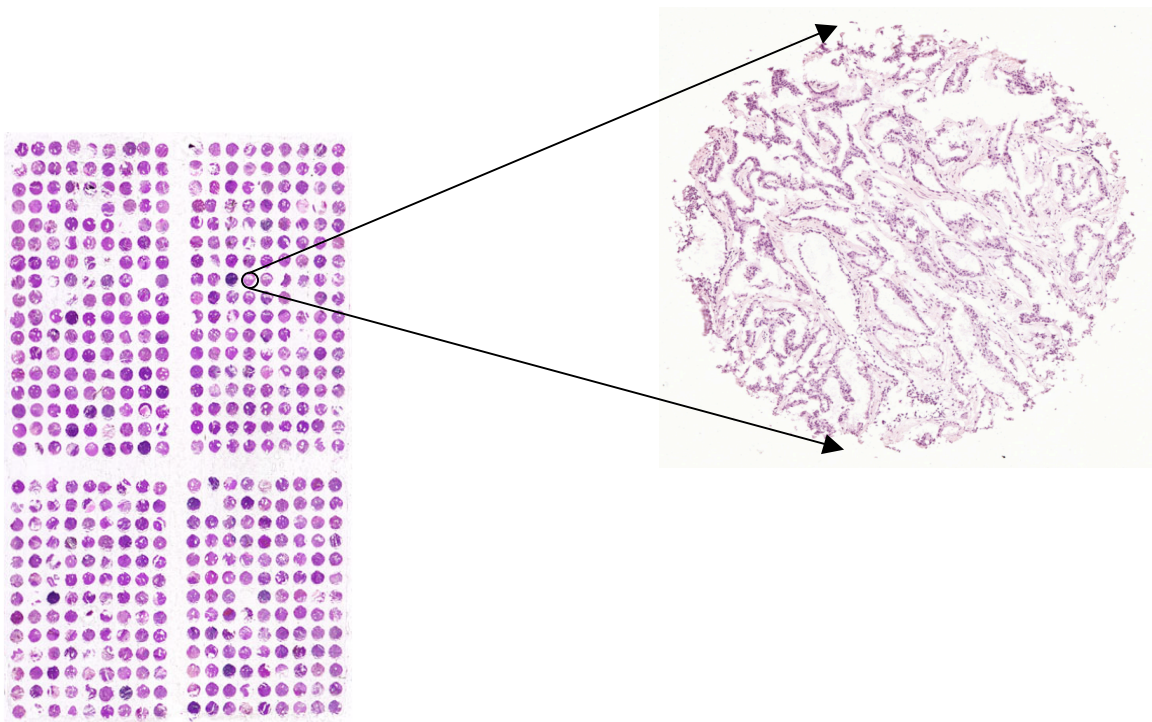


Abbildung 2: Übersichtsaufnahme eines Tumorarrays und eines einzelnen Gewebespots mit 0,6 mm Durchmesser (HE-Färbung)

2.4 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ermöglicht den Nachweis bzw. die Visualisierung von im Gewebe vorhandenen Proteinen. Die Methode beruht auf einer Antikörper-Antigen-Reaktion, bei der es das Ziel ist, den Antikörper mit einem Erkennungssystem zu koppeln, so dass er im Präparat sichtbar wird. Die Bindung sollte möglichst spezifisch und stark sein.

Denn es gibt viele Faktoren, die die Immunreaktion beeinflussen und damit die Ergebnisse entscheidend verändern können. Dazu gehören: die Temperatur, die Vorbehandlungs- und Einbettungsmethode, die Inkubationszeit, die Fixationsart und das Reaktionsmilieu [39].

Außerdem ist die optimale Verdünnung des Antikörpers von sehr großer Bedeutung für die Ergebnisse [40].

In dieser Studie wurden frisch geschnittene TMA Sektionen an einem Tag in einem einzigen Experiment gefärbt. Für die Vorbehandlung wurden die Proben im Autoclaven erhitzt und mit einem Citrat-Puffer bei einem pH-Wert von 7,8 für fünf Minuten behandelt.

Für die Immunfärbung von ALCAM wurde ein monoklonaler Antikörper genutzt (Klon: MOG/07, Novocastra, Newcastle, UK).

Die Färbung von ALCAM wurde in einer Testreihe von 100 Prostatakarzinomen und 50 Proben von benignen Prostatahyperplasien mit einer Antikörper-Verdünnung von 1:2700 ermittelt. Diese Konzentration wurde als optimal für die Studie angesehen, da in diesem Fall signifikante Unterschiede in der Färbintensität sichtbar wurden. Innerhalb dieser Testreihe zeigten nur 29 von 81 Tumorproben eine starke Membranfärbung, wohingegen bei einer Verdünnung von 1:450, 78 von 81 Proben eine starke Färbung aufwiesen.

Um die immunologische Färbung sichtbar zu machen wurde das Envision System (DAKO; Glostrup; Dänemark) genutzt.

In dieser Studie wurden Färbungen der Membran und des Zytoplasmas getrennt voneinander beurteilt. Zur Bewertung der Membranfärbung wurden Gewebe, bei denen eine Membranexpression von ALCAM bekannt ist, als positive Gewebekontrolle genutzt und Lymphozyten der Tonsillen als Negativkontrolle einbezogen.

2.5 Bewertung des Tumorgewebes

Für jeden Gewebespot wurde der prozentuale Anteil der Tumorzellen geschätzt und die Farbintensität (0,1+,2+,3+) dokumentiert. Daraus wurde nach folgendem Schema ein Score entwickelt, der in *Tabelle 3* dargestellt ist.

Tabelle 3: Bewertungskriterien für ALCAM entsprechend ihrer Farbintensität und dem prozentualen Anteil positiv gefärbter Tumorzellen.

Beurteilung der Färbung	Expression (Score)
0 = keine Färbung = weniger als 1% der Tumorzellen	negativ
1+ ≤ 70% der Tumorzellen	schwach
2+ ≤ 30% der Tumorzellen	
1+ > 70% der Tumorzellen	moderat
2+ > 30% der Tumorzellen ≤ 70% der Tumorzellen	
3+ ≤ 30% der Tumorzellen	
2+ > 70% der Tumorzellen	stark
3+ > 30% der Tumorzellen	

2.6 Statistik

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit der JMP Software (SAS Institute, Cary, NC) und die (Kontingenz-)Tabellen wurden mit dem chi²-Test berechnet.

Die Überlebenskurven wurden mittels Kaplan-Meier-Kurven dargestellt und mit dem Logranktest verglichen.

Die Cox-Regression wurde genutzt, um die unabhängige Aussagekraft von präoperativem PSA-Wert, pT-Status, Gleason-Grad, pN-Kategorie, chirurgischem Resektionsrand und ALCAM in Bezug auf ein PSA-Rezidiv nach radikaler Prostatektomie berechnen zu können.

3 Ergebnisse

3.1 Auswertbarkeit

Es waren insgesamt 2390 (73,3%) der 3261 Tumorproben des TMA im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich auswertbar. In 821 (26,7%) Fällen waren keine Gewebeproben zu finden oder es waren keine Tumorzellen im Gewebespot auffindig zu machen.

3.2 Expression von ALCAM im Prostatakarzinom

In dieser Studie wurden vor Beginn der Auswertung der Ergebnisse verschiedene Antikörper-Verdünnungen getestet, um so eine optimale Färbung und Abgrenzbarkeit der unterschiedlichen Expressionsmuster zu erreichen. Dafür wurde ein Test-TMA, der 100 Prostatakarzinome und 50 benigne Prostatahyperplasien umfasste, genutzt.

Bei einer Verdünnung des Antikörpers von 1:450 zeigte benignes Prostataepithel in 95,5% (42/44) eine Färbung der Membran an. Wählte man allerdings eine Verdünnung von 1:2700 so zeigten nur 84,1% (37/44) ein ALCAM positives Ergebnis. In dieser stärkeren Verdünnung waren meist schwache bis moderate Färbungen des benignen Prostataepithels zu finden und im Vergleich zu den meisten invasiven Prostatakarzinomen wurde die Färbung stets als schwächer dokumentiert.

Im weiteren Verlauf dieser Studie wurde dann mit der Verdünnung 1:2700 gearbeitet, weil so Unterschiede im Expressionsmuster von ALCAM optimal zu erkennen waren. *Abbildung 3* verdeutlicht die verschiedenen Verdünnungsstadien des Test-TMA nochmals.

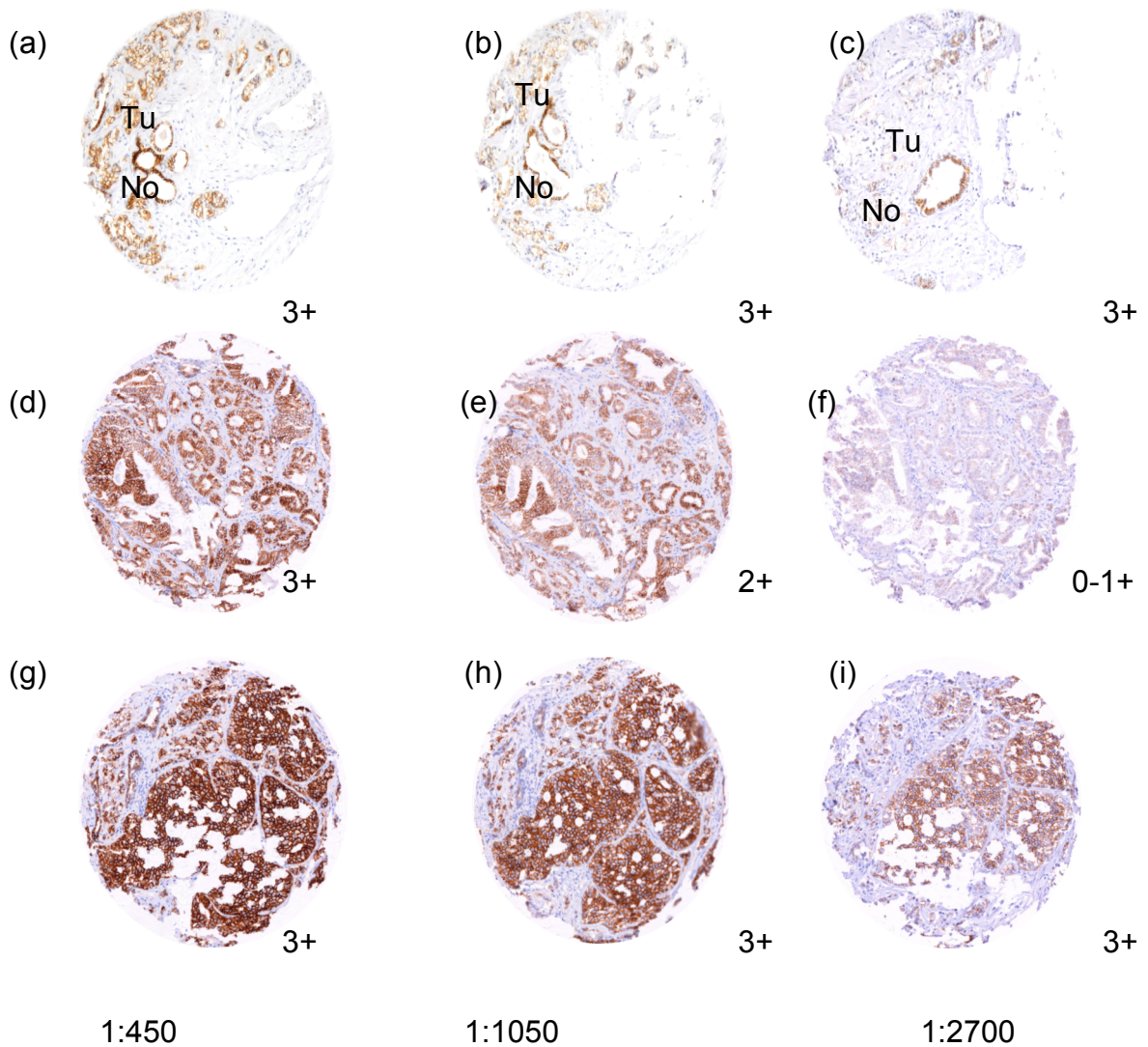


Abbildung 3: Abbildung unterschiedlicher Färbungen von ALCAM in nicht entartetem Prostataepithel (a-c) und im Prostatakarzinom (d-i) in verschiedenen Antikörper-Verdünnungen.

a-c: Das gesunde Prostatagewebe (No) zeigt eine konstante, starke Färbung, wohingegen das Tumorgewebe verschiedene Färbeintensitäten in den verschiedenen Verdünnungsstadien zeigt.

d-i: Die Auswirkung der Verdünnung auf die Färbung: Der gleiche Spot (d-f) zeigt unterschiedliche Färbeintensitäten bei verschiedenen Verdünnungen. Im Gegensatz dazu zeigt der Spot (g-i) stets eine gleichmäßige starke Färbung ganz unabhängig von der Verdünnung.

ALCAM war in dieser Studie stets dominierend in der Membran zu finden. Auch wenn zytoplasmatische Färbungen auftraten, so waren diese immer mit einer noch stärkeren Färbung der Membran verbunden ($P < 0,0001$). Lediglich in 72 von 1392 Tumorproben, die eine zytoplasmatische Färbung hatten, konnte keine Färbung der Membran nachgewiesen werden.

Tabelle 4: Vergleich zwischen ALCAM Färbung in der Membran und im Zytoplasma

		Zytoplasmatische Färbung von ALCAM				
		Negativ n(%)	Schwach n(%)	Moderat n(%)	Stark n(%)	n
Membranöse Färbung von ALCAM	Negativ	645 (66,1)	268 (27,4)	56 (5,7)	8 (0,8)	977
	Schwach	72 (5,5)	384 (29,2)	468 (35,5)	392 (29,8)	1316
	Moderat	0 (0)	1 (1,4)	6 (8,1)	67 (90,5)	74
	Stark	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (100)	2
	n	717	653	530	469	2369

$P < 0,0001$

ALCAM konnte in 1663 (69,6%) von 2390 auswertbaren Fällen immunhistologisch in der Membran nachgewiesen werden.

Eine schwache Färbung wurde in 659 (27,6%) der Proben festgestellt. 531 (22,2%) der Tumorproben wiesen eine moderate und 473 (19,8%) eine starke Färbung der Membran auf. Es konnte bewiesen werden, dass eine starke ALCAM Expression mit einem günstigen Tumor-Phänotyp assoziiert ist.

Signifikante Zusammenhänge mit dem pT-Stadium ($p = 0,0015$), der pN-Kategorie ($p = 0,0008$) und dem präoperativen PSA-Wert ($p = 0,0057$) wurden ebenfalls nachgewiesen. Wohingegen keine Korrelation mit dem Gleason-Grad ($p = 0,1812$) und dem chirurgischen Resektionsrand ($p = 0,4899$) zu bestehen scheint.

Die Beziehung der ALCAM Expression zum Tumorstadium, Gleason-Grad, chirurgischen Resektionsrand, der pN-Kategorie und dem präoperativen PSA-Wert wird in *Tabelle 5* verdeutlicht.

Tabelle 5: Beziehung der Expression von ALCAM zum Tumorstadium, Gleason-Grad, chirurgischem Resektionsrand, zur pN-Kategorie und zum präoperativen PSA-Wert (ng/ml)

		ALCAM Expression (Membran)						
	Variable	N des TMA	N (auswertbar)	Negativ %	Schwach %	Moderat %	Stark %	p-Wert
	Tumore (Gesamtanzahl)	3261	2390	30,4	27,6	22,2	19,8	
Tumorstadium	pT2	2080	1447	28,5	26,9	24,1	20,5	0,0015
	pT3	981	783	32,8	30,1	18,7	18,4	
	pT4	42	34	47,1	32,3	14,7	5,9	
Gleason-Grad	≤3+3	1426	962	29,4	26,4	23,8	20,4	0,1812
	3+4	1311	1009	30,1	29,7	20,9	19,3	
	4+3	313	250	32,0	28,4	22,4	17,2	
	≥4+4	55	45	44,4	28,9	8,9	17,8	
pN-Kategorie	pN0	1544	1197	30,5	29,9	20,5	19,1	0,0008
	pN1	96	80	51,2	26,2	8,8	13,8	
Präoperativer PSA-Wert (ng/ml)	<4	513	336	27,7	28,3	24,7	19,3	0,0057
	4-10	1673	1209	27,7	28,6	23,8	19,9	
	10-20	641	499	34,9	27,3	17,6	20,2	
	>20	225	183	38,8	27,9	20,2	13,1	

Ergebnisse

Chirurgischer Resektionsrand	Negativ	2475	1782	30,3	27,9	22,7	19,1	0,4899
	Positiv	627	481	30,1	29,1	19,8	21,0	

3.3 Follow-up Daten

Von den auswertbaren 2390 Gewebeproben waren von 1746 Patienten Follow-up Daten verfügbar. Es wurde der Krankheitsverlauf nach erfolgter Prostatektomie zwischen einem und 144 Monaten dokumentiert. Klinische und pathologische Charakteristika sowie das Vorkommen eines biochemischen Rezidivs sind von insgesamt 3261 Patienten in *Tabelle 6* dargestellt.

Tabelle 6: Klinische und pathologische Charakteristika sowie biochemische Rezidivrate (BCR) von 3261 Patienten.

Anzahl Patienten (%)*		
Charakteristika	Studienkohorte auf TMA (n=3261)	BCR innerhalb der Kategorien (n=2385)
Nachbehandlung (in Monaten)		-
Mittelwert	34,9	-
Media	30,5	
Alter (in Jahren)		
<50	83	13 (15,7)
50-60	998	157(15,7)
60-70	1807	315(17,4)
>70	175	46(26,3)

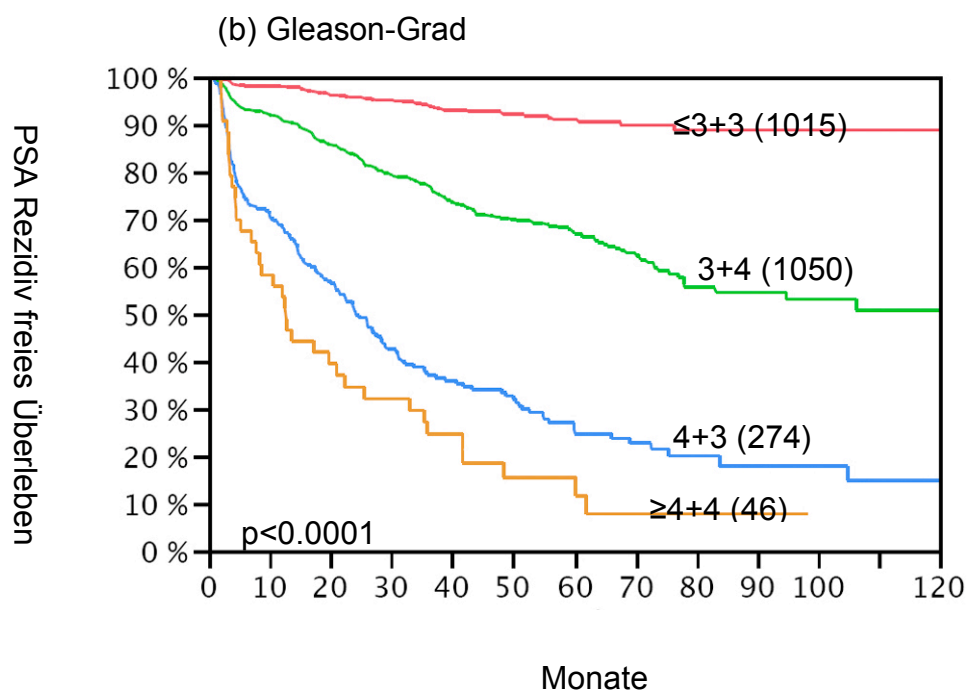
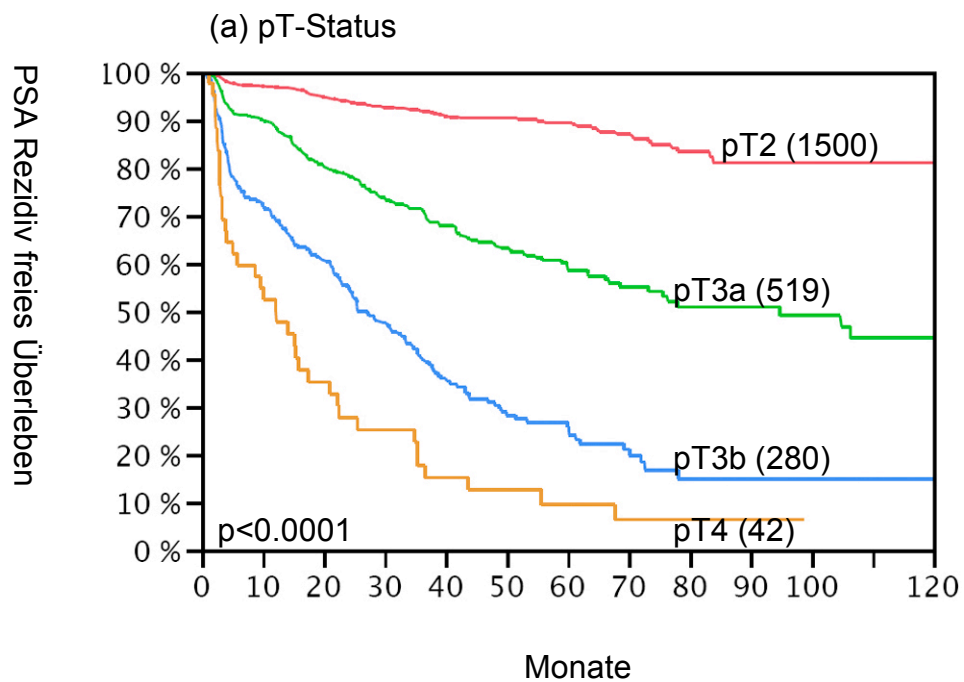
PSA-Wert vor Behandlung (ng/ml)		
<4	513	48(9,4)
4-10	1673	200(12,0)
10-20	641	163(25,4)
>20	225	113(50,2)
Tumorstadium (AJCC**)		
pT2	2080	129(6,2)
pT3a	609	171(28,1)
pT3b	372	200(53,8)
pT4	42	38(90,5)
Gleason-Grad		
≤3+3	1426	66(4,6)
3+4	1311	263(20,1)
4+3	313	172(55,0)
≥4+4	55	37(67,3)
pN-Kategorie		
pN0	1544	369(23,9)
pN1	96	73(76,0)
pNx	1457	94(6,5)
Chirurgischer Resektionsrand		
Negativ	2475	328(13,3)
Positiv	627	209(33,3)

*Aufgrund fehlender Daten wird in den einzelnen Kategorien nicht immer die Gesamtanzahl von 3261 erreicht.

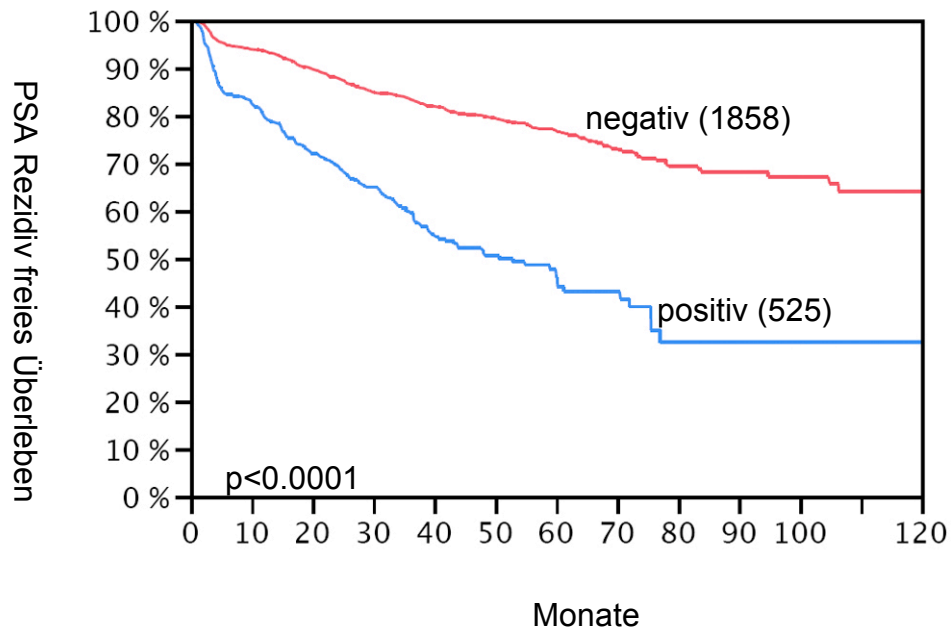
**American Joint Committee on Cancer

In dieser Studie konnte ein signifikanter Zusammenhang ($p < 0,0001$) von Gleason-Grad, pT-Stadium und der Anwesenheit von positivem operativen Randschnitt zu einem PSA-Rezidiv nachgewiesen werden. (siehe Abb.4a-c)

Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass eine starke Expression von ALCAM signifikant mit einem geringeren Risiko eines biochemischen Rezidivs assoziiert ist ($p = 0,0067$). (Siehe Abb. 4d, Abb.5)



(c) Chirurgischer Resektionsrand



(d) ALCAM Immunfärbung der Membran

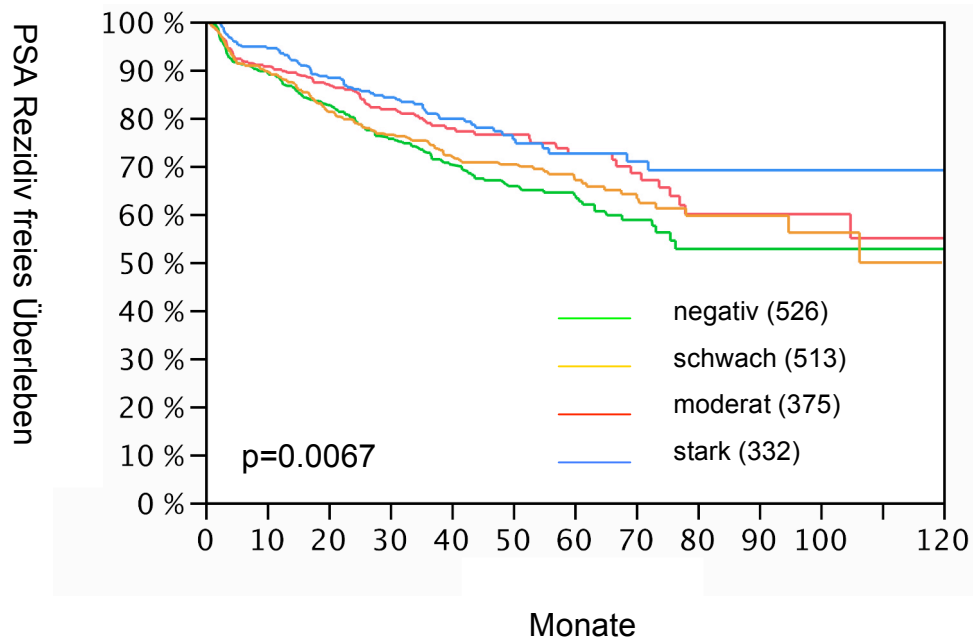


Abbildung 4: Einfluss von klinisch-pathologischen Merkmalen und der Expression von ALCAM auf das PSA-Rezidiv. (a) pT-Kategorie, (b) Gleason-Grad, (c) Chirurgischer Resektionsrand, (d) Immunhistologische Färbung von ALCAM

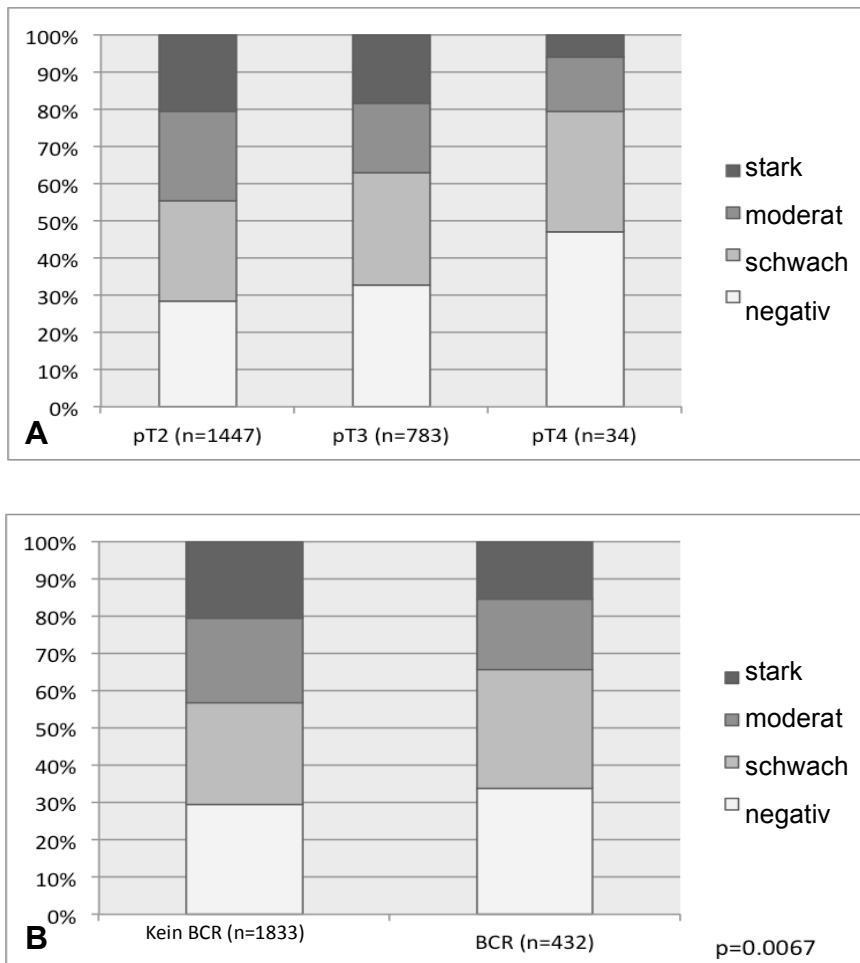


Abbildung 5: Beziehung zwischen der Expression von ALCAM und dem pT-Status(A) und dem BCR (B).

3.4 Multivariate Analyse

Die Multivariat-Analyse zeigte, dass ein fortgeschrittener pT-Status ($p < 0,0001$), hoher Gleason-Grad ($p < 0,0001$), hoher präoperativer PSA-Wert ($p = 0,0067$) und positiver Randstatus ($p = 0,0001$) als unabhängige Prädiktoren für ein PSA Rezidiv fungieren können. Eine unabhängige Prognoserelevanz von ALCAM ($p = 0,0813$) konnte in dieser Arbeit nicht gezeigt werden.

4 Diskussion

4.1 Methodische Aspekte

4.1.1 Besonderheiten des Prostatakarzinoms

Bereits die Diagnostik des Prostatakarzinoms gestaltet sich schwierig, denn bei der routinemäßig ab dem 45. Lebensjahr empfohlenen digital rektalen Untersuchung werden bis zu 32% der Karzinome nicht erkannt. Auch Tumore der Transitionalzone im vorderen Bereich der Prostata können übersehen werden und meist werden Veränderungen der Prostata erst in einem fortgeschrittenen Stadium erkannt [14]. So kommt es dazu, dass bis zu 50% der Karzinome, die durch die digital rektale Untersuchung entdeckt werden nicht mehr heilbar sind, da sie sich bereits in einem weit fortgeschrittenen Stadium befinden [2].

Auch durch die transrektale Sonographie können nur bis zu 40% der klinisch manifesten Karzinome visualisiert werden, da diese Untersuchungsmethode eine fehlende Sensitivität für Tumore mit geringem Volumen hat [4,14]. Nach den genannten Untersuchungen wird lediglich eine Verdachtsdiagnose geäußert. Die endgültige Diagnose Prostatakarzinom kann erst durch den Nachweis von Tumorzellen aus ultraschallgesteuerten Stanzbiopsien gestellt werden. Doch auch bei Biopsieproben stimmt die Tumorklassifikation in 60% der Fälle nicht mit der des Prostatektomiepräparates überein, denn das multifokale Wachstumsverhalten des Prostatakarzinoms macht die Auswertung der Biopsieproben schwierig und so kommt es in 30% der Fälle zu einem Undergrading [9]. Es besteht stets die Gefahr, dass die Proben nicht repräsentativ für den gesamten Tumor sind [11]. Verdeutlicht man sich diese Problematik, so werden prognostische Marker von immer dringlicherer Bedeutung für die Diagnostik, da sie die Fähigkeit haben, bereits sehr kleine Tumore im Frühstadium zu erkennen [26].

Ein weiteres stets bestehendes Problem beim Arbeiten mit Karzinomgewebe ist die begrenzt zur Verfügung stehende Probenanzahl und die vielerorts unzureichende Archivierung. Oftmals fehlen auch dokumentierte klinisch-pathologische

Daten und ein Langzeit-Follow-up, um eine Korrelation von möglichen molekularen Markern zur Langzeitprognose herstellen zu können [26,42].

Eine weitere Besonderheit des Prostatakarzinoms ist seine unvorhersehbare Prognose. Deshalb sucht man mit Nachdruck nach Wegen, um aggressiv wachsende und damit lebensbedrohliche Formen des Prostatakarzinoms identifizieren zu können. Wichtig ist es, neue Prognosemarker zu etablieren, die eine bessere Diagnostik ermöglichen.

4.1.2 Tissue-Microarray

Die Tissue-Microarray Technik ermöglicht die gleichzeitige Expressionsanalyse zehntausender Gene und tausender Proteine mit Hilfe der Immunhistochemie (IHC), der RNA-in-situ-Hybridisierung (RNA-ISH) oder der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) in einem einzigen Experiment und bietet außerdem die Möglichkeit der in situ Analyse von Zielstrukturen [36,37].

Diese Methode bietet viele Vorteile gegenüber der herkömmlichen Gewebeanalyse, die arbeitsintensiv und langsam ist und vor allem große Mengen an kostbarem Gewebematerial benötigt [37,43].

Von großem Nutzen bei dieser Technik ist die maximale Anzahl an Proben, die aufgrund des kleinen Durchmessers von 0,6 mm des Stanzenzylinders aus jedem Donorblock gewonnen werden kann. Dadurch kann das wertvolle, sehr begrenzt zu Verfügung stehende Material an Tumorproben maximal genutzt werden [36].

Andererseits ist dieser große Vorteil im Hinblick auf die Repräsentativität dieses 0,6 mm messenden Spots für das gesamte Gewebe auch als Nachteil zu betrachten. Besonders beim multifokal wachsenden Prostatakarzinom birgt diese Tatsache die Gefahr, dass sich keine Tumorzellen in der Probe nachweisen lassen, sondern sich nur gesundes Prostatagewebe finden lässt. Auch *Kristiansen et al.* [41] beschreiben diese Problematik beim Prostatakarzinom und empfehlen deshalb eine sehr sorgfältige Auswahl und Markierung des Gewebes für den TMA.

Ein weiterer großer Vorteil dieser Technik ist die Standardisierung einer angewandten Methode, da alle Proben auf einem Block unter völlig identischen

Bedingungen in einem einzigen Experiment behandelt werden können [37,43]. Das wiederum bedeutet: identische Inkubationszeit, Temperatur, Antikörperverdünnung, Pufferlösung und gleiche Schichtstärke der histologischen Schnittpräparate. All diese Parameter sind Faktoren, die die Immunreaktion beeinflussen und somit standardisiert werden sollten, damit Ergebnisse vergleichbar sind [40].

Durch die gleichzeitige Analyse in einem einzigen Experiment ergeben sich außerdem eine große Zeitersparnis und eine Minimierung der Kosten [36].

Schlussendlich kann man also sagen, dass die Tissue-Microarray Technik die Methode der Wahl bei der Auswertung großer Tumorkollektive darstellt und eine Standardisierung von Versuchsprotokollen endlich möglich macht.

4.1.3 Antikörper-Verdünnungen

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass ALCAM in fast allen Prostatakarzinomen exprimiert wird. Unterschiede in der Expression konnten allerdings erst bei einer bestimmten Verdünnung des Antikörpers festgestellt werden. Deshalb wurden verschiedene Testreihen mit unterschiedlichen Verdünnungen durchgeführt. Die Konzentration eines Antikörpers wird dann als optimal angesehen, wenn interzelluläre Unterschiede in der Färbeintensität sichtbar werden [40].

Bei einer Verdünnung des Antikörpers von 1:450 waren fast alle Tumorpräparate und auch das benigne Prostataepithel (95,5%) positiv, wohingegen bei einer Verdünnung von 1:2700 der Anteil der positiven Proben auf 70% reduziert werden konnte. Auch das gesunde Prostataepithel zeigte bei dieser Verdünnung in nur 84,1% eine Expression von ALCAM. Die Färbung konnte mit meist moderaten und schwachen Färbungen im Vergleich zum invasiven Prostatakarzinom somit stets als schwächer dokumentiert werden.

In der Literatur konnte lediglich eine Studie gefunden werden, in der eine genaue Angabe zur Antikörperverdünnung gemacht wurde. Diese Forschungsgruppe arbeitete mit einer Verdünnung von 1:200 [44]. Die veränderten Ergebnisse bei unterschiedlichen Konzentrationen zeigen sehr deutlich, wie wichtig immunhistologische Protokolle sind, denn weitere Verdünnungen hätten die Anzahl an

ALCAM positiven Tumoren weiter reduziert. Außerdem ist in diesem Zusammenhang darauf hinzuweisen, dass andere Studien zu völlig anderen Ergebnissen kommen können, denn Richtlinien für immunhistologische Protokolle fehlen im Moment noch vollkommen. Es ist deshalb nicht verwunderlich, dass abweichende Ergebnisse für dieselben Biomarker bestehen.

4.2 ALCAM beim Prostatakarzinom und verschiedenen Tumortypen

4.2.1 Lokalisation von ALCAM

Nicht nur die prognostische Relevanz, sondern auch die genaue Lokalisation von ALCAM wird in vorangehenden Studien kontrovers diskutiert.

Einige Autoren machen deutlich, dass eine ansteigende Expression von ALCAM in der Membran einen signifikanten Zusammenhang mit dem Lymphknotenstatus und dem Tumorgrad im Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle aufweist. Der Lymphknotenstatus wiederum korreliert mit der 5-Jahres-Überlebensrate und somit steigt bei hoher Expression von ALCAM in der Membran das Risiko eines frühen Todes [45].

Auch im Plattenepithelkarzinom des Ösophagus spielt die Lokalisation von ALCAM in der Membran eine entscheidende Rolle. Denn ein Anstieg von ALCAM in der Membran wurde in der Dysplasie beobachtet. Diese Erkenntnis ist von großer Bedeutung, denn es ist das erste Mal, dass eine Überexpression von ALCAM in einem prämaligen Stadium beschrieben wird. Dies bedeutet, der Anstieg von ALCAM könnte ein Ereignis in der Transformation zum Plattenepithelkarzinom sein. Im Allgemeinen wird die Überexpression von ALCAM im Plattenepithelkarzinom des Ösophagus mit vermehrter Tumorinvasivität, Lymphknotenmetastasen und spätem klinischem Stadium, also einem aggressiven Tumorverhalten assoziiert [46].

Mezzanzanica et al. [47], die sich mit der subzellulären Lokalisation von ALCAM im Ovarialkarzinom beschäftigt haben, fanden heraus, dass eine verminderte Expression von ALCAM in der Membran und ein Anstieg von ALCAM im Zytoplasma mit einem ungünstigen Krankheitsverlauf verbunden sind. In vorangehenden Studien konnte durch diese Forschungsgruppe gezeigt werden,

dass ALCAM aktiv an der Zellmembran internalisiert und somit reduziert werden kann. Dies könnte von Bedeutung sein bei der Umgestaltung von Zellkontakten oder auch beim Loslösen von malignen Zellen vom Primärtumor. Die Autoren stellen die Hypothese auf, dass die Umsiedlung von der Membran zum Zytoplasma die Zell-Zell Verbindung mindert und somit die Migration von malignen Zellen fördert. Die Lokalisation von ALCAM als Prognosemarker könnte somit helfen, die Patienten zu identifizieren, die von einer engmaschigeren Nachsorge oder alternativen Therapiemöglichkeiten profitieren könnten [47].

Das Molekül Tiam1 (T-Lymphoma invasion and metastasis 1) wird in metastasierenden Melanomzellen überexprimiert und ist ebenfalls in der Lage die Lokalisation von ALCAM zu beeinflussen. Dabei wurden die Zell-Zell-Kontakte verstärkt, ALCAM also zur Zellmembran umgelagert und somit wurde der Zellbeweglichkeit und der Invasion von Zellen entgegengearbeitet [48].

Auch beim kolorektalen Karzinom werden verschiedene Lokalisationen von ALCAM beschrieben. Eine Expression von ALCAM in der Membran korreliert bei diesem Tumortyp signifikant mit verkürzter Lebenszeit. Im Adenom, welches als Vorläuferläsion betrachtet wird, ist eine zytoplasmatische Expression von ALCAM zu verzeichnen [49].

Im Harnblasenkarzinom zeigt sich ein Zusammenhang zwischen positiver ALCAM Expression und einer ebenfalls veränderten Expression von alpha-Catenin und, oder E-Cadherin [50].

Diese Tatsache verdeutlicht ein Phänomen, welches auch beim Prostatakarzinom beschrieben wird. Die Aufrechterhaltung von einem differenzierten Phänotyp von Epithelzellen ist abhängig von einem funktionierenden E-Cadherin-Catenin-Komplex und offensichtlich auch von anderen Adhäsionsmolekülen, denn es gibt eine Korrelation zwischen Cadherin vermittelter Adhäsion und dem Expressionsmuster von ALCAM in Prostatakarzinomzellen. Denn fehlt die alpha-Catenin Expression und ist somit die E-Cadherin vermittelte Zelladhäsion gestört, so befindet sich ALCAM im Zytoplasma. Die intrazelluläre Lokalisation von ALCAM ist somit abhängig von der Expression von alpha-Catenin. Alpha-Catenin spielt also eine Rolle in der ALCAM vermittelten Adhäsion [51].

Kristiansen et al. [41] beschrieben in ihrer Studie, dass im gesunden Epithel der Prostata ALCAM vor allem in der Membran und nur schwach im Zytoplasma exprimiert wird. Deshalb wird eine Beteiligung von ALCAM an der physiologischen Aufrechterhaltung von Zell-Zell-Kontakten vermutet. Dieselbe Forschungsgruppe fand heraus, dass nicht nur die Überexpression von ALCAM, sondern auch die Lokalisation von großer Bedeutung ist. Die steigende Expression von ALCAM im Zytoplasma war assoziiert mit verkürzter Zeit zu einem PSA-Rezidiv. In der Studie wurden die Überexpression von ALCAM im Zytoplasma und CD24 als Markerkombination genutzt und konnten so als unabhängige prognostische Faktoren für ein PSA-Rezidiv fungieren.

In der vorliegenden Studie wurden die zytoplasmatische Expression und die Expression von ALCAM in der Membran unabhängig voneinander analysiert. Die zytoplasmatische Konzentration von ALCAM korrelierte in den meisten Fällen mit derjenigen in der Membran und hatte deshalb keine unabhängige Aussagekraft. Nur eine kleine Anzahl an Proben zeigte eine schwache Expression von ALCAM im Zytoplasma, bei Abwesenheit von ALCAM in der Membran. Da diese Tumorproben keinerlei klinische oder phänotypische Besonderheiten aufwiesen, kann nicht von einer großen unabhängigen Aussagekraft von der Expression von ALCAM im Zytoplasma ausgegangen werden.

4.2.2 Veränderte Expressionsmuster von ALCAM in verschiedenen Tumoren

Abweichungen von ALCAM wurden in den verschiedensten Tumoren festgestellt. Die genaue Rolle, die ALCAM jedoch dabei spielt konnte noch nicht zufriedenstellend geklärt werden [31]. Man ist sich einig darüber, dass die Expression von ALCAM vor allem auf Zellen beschränkt ist, die in dynamische Wachstumsprozesse und Migration involviert sind [29]. Es wird demnach spekuliert, ob ALCAM eventuell die Zellbeweglichkeit fördern könnte und an der Zelldifferenzierung und Migration beteiligt ist [35].

Über die Bedeutung von ALCAM bei neoplastischen Prozessen, aufgrund seiner Fähigkeit zur heterophilen und homophilen Adhäsion, wird ebenfalls spekuliert. Fest steht, dass Adhäsionsprozesse bei der Interaktion zwischen Tumorzellen und normalen Zellen und das dynamische Zusammenspiel zwischen mobilen Tumor-

zellen und ihrer Umgebung bei der Metastasierung eine wichtige Rolle spielen und die Expression von ALCAM in verschiedenen Tumorentwicklungsstadien variiert. Auch die Bindung von ALCAM an T-Zellen könnte ein Mechanismus sein, um das Immunsystem bei der Metastasierung zu umgehen [52].

Die Expression von ALCAM ist in einigen Tumoren erhöht, in anderen hingegen vermindert. Die Auswirkungen sind allerdings in den verschiedenen Tumoren völlig unterschiedlich.

Im malignen Melanom zum Beispiel korreliert eine hohe Expression von ALCAM mit der vertikalen Wachstumsphase (Clark-Level III, IV, V) und einer hohen Kapazität zu metastasieren, wohingegen in den meisten Nävi und in allen Clark-Level I und II Läsionen keine ALCAM Expression zu verzeichnen ist [53].

Van Kampen et al. [54] stellten in einer Studie eine verkürzte ALCAM Variante vor, der die Fähigkeit zur Adhäsion fehlte. Dadurch verringerte sich die Zusammenlagerung und es wurde eine erhöhte Zellbeweglichkeit provoziert. Daraus könnte geschlussfolgert werden, dass die schrittweise Modulation von ALCAM zum Übergang vom primären Tumorwachstum zur Gewebeinvasion und Metastasierungsprozessen führen könnte [54]. Auch in vielen anderen Tumoren, wie beispielsweise dem Harnblasenkarzinom, geht eine erhöhte Expression von ALCAM mit einer schlechten Prognose einher [50]. Im kolorektalen Karzinom korreliert ein hoher ALCAM Wert ebenfalls mit einer frühen malignen Transformation. Ein Zusammenhang zwischen Patientenalter, Tumor-Grad, Tumor-Stage und Lymphknoten-Status konnte nicht festgestellt werden [49].

Auch im Plattenepithelkarzinom des Ösophagus ist ein hoher ALCAM Wert mit spätem klinischen Stadium, fortgeschrittener Tumorinvasivität und Lymphknotenmetastasen assoziiert. Da ALCAM bei diesem Tumor bereits in der Dysplasie exprimiert wird, könnte es hier als prognostischer Marker für eine frühe Diagnose fungieren [46].

Beim Mammakarzinom weisen einige Studien darauf hin, dass eine reduzierte Expression von ALCAM ein prognostischer Indikator für eine schlechte Prognose ist [55]. Wohingegen andere Studien hohe ALCAM Werte im Zytoplasma im

Zusammenhang mit verkürzter Rezidiv-freier Zeit sehen [56] und wiederum andere Forschungsgruppen die Überexpression von ALCAM in Tumoren, die Estrogenrezeptor-negativ sind, mit aggressivem Tumorwachstum assoziieren [57].

In fast allen Prostatakarzinomen wird ALCAM exprimiert, dort wird allerdings eine steigende Expression im Zusammenhang mit einer günstigen Prognose gesehen.

4.2.3 Ergebnisse dieser Studie

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass es beim Prostatakarzinom einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Expression von ALCAM, dem pT-Status, der pN-Kategorie und dem präoperativen PSA-Wert gibt.

Es konnte keine Korrelation mit dem chirurgischen Resektionsrand und dem Gleason-Grad nachgewiesen werden. Auch *Kristiansen et al.* [41] war es nicht möglich eine simple Korrelation zwischen der Expression von ALCAM und dem histologisch definierten malignen Potential, wie es beispielsweise im malignen Melanom beschrieben wird festzustellen [53]. Jene Forschungsgruppe konnte jedoch auch keine Assoziation von ALCAM Expression zum pT-Status herausfinden [41].

Eine weitere Erkenntnis der vorliegenden Arbeit ist der signifikante Zusammenhang zwischen starker Expression von ALCAM und einem geringen Risiko zu einem biochemischen Rezidiv. Ebenfalls besteht in diesem Fall eine Assoziation zu einem günstigen Tumorphänotyp.

Auch andere Studien beweisen, dass eine starke Expression von ALCAM mit einer günstigen Prognose des Tumors einhergeht. Darüber hinaus wird verdeutlicht, dass eine niedrige Expression auch signifikant mit einem hohen Gleason-Grad verbunden ist [33,41].

Eine unabhängige Prognoserelevanz von ALCAM konnte in dieser Studie nicht bewiesen werden. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass mögliche Markerkombinationen in der Zukunft dies ermöglichen könnten.

Kristiansen et al. [44] haben bereits nachgewiesen, dass eine hohe zytoplasmatische Expression von ALCAM in Kombination mit dem Marker CD24 als unabhängiger prognostischer Marker für ein PSA-Rezidiv fungieren kann.

Es wird von immer größerer Bedeutung für die Forschung sein, mögliche Tumormarker aufzufinden und ihre Prognosefähigkeit an großen Patientenkollektiven zu testen, damit zukünftig die Erkennung von Tumoren im Frühstadium möglich und ihr malignes Potential besser einschätzbar wird.

4.2.4 Bedeutung der Ergebnisse für die Praxis

Die Identifikation von Zielstrukturen an der Zelloberfläche und das Entwickeln von neuen Behandlungsstrategien ist ein wichtiges Ziel der Forschung, besonders bei der hormonresistenten Form des Prostatakarzinoms. Insbesondere Tumor assoziierte Zelloberflächenmarker sind von unschätzbarem Wert für die Entwicklung von neuen Therapieformen [58]. Das Protein ALCAM könnte als Zielstruktur beim Prostatakarzinom dienen, denn aus dieser Studie geht hervor, dass ALCAM im Prostatakarzinom exprimiert wird. Seine reichlich vorhandene Präsenz im Prostataepithel macht ALCAM zu einem attraktiven Zelloberflächenprotein für die gezielte Tumortherapie.

Liu et al. [58] identifizierten bereits den Antikörper H3Ig1, der ALCAM als Antigen bindet. Antikörper können schnell durch rezeptorvermittelte Endozytose in die Zielzellen eindringen und so spezifische Last in die Tumorzellen transportieren. Auf diese Weise kann ein gezielter intrazellulärer Transport ermöglicht werden [58].

Für die gezielte Tumortherapie ist jedoch eine Kombination aus Tumorerkennungssystem und zytotoxischer Funktion in der Zielzelle in einer gemeinsamen therapeutischen Einheit nötig.

Die Forschungsgruppe, die bereits den Antikörper zu ALCAM entdeckte, hat ebenfalls Immunliposomen entwickelt, die den Antikörper nutzen, um liposomale Medikamente in die Prostatakarzinomzellen zu transportieren. Um selektiv Tumorzellen zu vernichten, werden klein-molekulare Therapeutika eingesetzt. Vor allem liposomale Nanokarrier stellen dabei einen der effektivsten und am besten charakterisierten Transporter dar [59].

Ein vollkommen anderer Therapieansatz könnte die bewusste Änderung der Funktion von ALCAM sein. Eine Forschungsgruppe stellte die Variante sALCAM vor, die interzelluläre ALCAM-Netzwerke oder Clustering verhindert. Die Folge war eine verminderte Komplexität der zellulären Antworten und somit eine verminderte Zell-Zell-Interaktion. Daraus könnte ein therapeutischer Nutzen entstehen [31]. Oder aber sALCAM stellt den initialen Schritt zur Metastasierung dar, indem ALCAM vermittelte Adhäsion inhibiert wird [35]. Daraus würde sich als Umkehrschluss ergeben, dass eine ALCAM-Variante mit verstärkter Fähigkeit zur Adhäsion eventuell eine Metastasierung verhindern könnte und dadurch eine gezielte Tumortherapie darstellen würde.

In Zukunft wird sicherlich immer öfter ein großer therapeutischer Nutzen von Zelloberflächenproteinen ausgehen, auch wenn diese Therapieformen noch eingehender untersucht und entwickelt werden müssen.

5 Zusammenfassung

Das Adhäsionsmolekül *ALCAM* (*CD166*) ist ein Transmembranprotein und gehört zur Immunglobulin Superfamilie. Momentan wird die Rolle von *ALCAM* im Tumorgeschehen untersucht. Es zeigen sich unterschiedliche Expressionsmuster von *ALCAM* in verschiedenen Tumoren.

Ziel dieser Arbeit war es die Expression von *ALCAM* im Prostatakarzinom zu untersuchen, um mehr über die Prävalenz und die klinische Signifikanz des Moleküls zu erfahren. Es stand für diese Studie ein einmaliges Patientenkollektiv von 3261 Prostatektomiepräparaten des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf zur Verfügung. Insgesamt waren 2390 Gewebeproben immunhistologisch im TMA-Format auswertbar, von denen 1746 klinische Verlaufsdaten aufwiesen. Eine Färbung der Membran wurde in 1663 (69,6%) der Fälle verzeichnet. Eine hohe Expression von *ALCAM* stand in signifikantem Zusammenhang mit günstigen Tumormerkmalen (pT:P=0,00015; pN:P=0,0008; präoperativer PSA-Wert: P=0,0057) und einem geringeren Risiko eines biochemischen Rezidivs (P=0,0067). Die zytoplasmatische Lokalisation von *ALCAM* stand stets im Zusammenhang mit einer Färbung der Membran. Die kleine Anzahl an Tumoren, die nur eine zytoplasmatische Färbung aufwiesen, ließen keine Besonderheiten in Bezug auf klinischen Ausbruch oder Tumorphänotyp erkennen.

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit geht somit hervor, dass *ALCAM* fast immer im Prostatakarzinom exprimiert wird und dass eine verminderte Expression von *ALCAM* zu einem aggressiven Verhalten von Tumorzellen führen könnte.

Die reichlich vorhandene Präsenz von *ALCAM* im Prostatakarzinomepithel macht es zu einem attraktiven Zelloberflächenprotein für die gezielte Tumorthherapie.

6 Abkürzungsverzeichnis

AJCC	American Joint Committee on Cancer
ALCAM	Activated leukocyte cell adhesion molecule
CD166	Cluster of differentiation 166
DRU	Digital rektale Untersuchung
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
HE	Hematoxylin und Eosin
IgSF	Immunglobulin Superfamilie
Ig-Domäne	Immunglobulin-Domäne
IHC	Immunhistochemie
n	Anzahl
LHRH	Luteinisierendes-Hormon-Releasing-Hormon
PSA	prostataspezifisches Antigen
Tiam1	T-Lymphoma and metastasis 1
TMA	Tissue-Microarray
TNM	Tumor-Nodulus-Metastase- (Klassifikation) der UICC
TRUS	Transrektale Ultraschalluntersuchung
UICC	Union International contre le Cancer

7 Literaturverzeichnis

1. Krebs in Deutschland 2005/2006.Häufigkeiten und Trends. 7. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg), Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). 2010. Berlin.
2. Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Prostataerkrankungen. Heft 36. Robert Koch-Institut (Hrsg). 2007. Berlin.
3. Chan JM, Stampfer MJ, Giovannucci EL. What causes prostate cancer? A brief summary of the epidemiology. *Semin Cancer Biol.*1998;8(4):263-73.
4. Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA. Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. (Eds.): World Health Organization Classification of Tumours. 2004. IARC Press. Lyon: 159-214.
5. Steinberg GD, Carter BS, Beaty TH, Childs B, Walsh PC. Family history and the risk of prostate cancer. *Prostate.*1990;17(4):337-47.
6. Carter BS, Beaty TH, Steinberg GD, Childs B, Walsh PC. Mendelian inheritance of familial prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA.*1992;89(8):3367-3371.
7. Jocham D (Hrsg) Miller K. (Hrsg) Praxis der Urologie. Band 2. Dritte Aufl. 2007. Thieme. Stuttgart.
8. Bostwick DB, Qian J, Schlesinger C. Contemporary pathology of prostate cancer. *Urol Clin North Am.*2003;30(2):181-207.
9. Helpap B. Pathologie der ableitenden Harnwege und der Prostata. 1989. Springer. Berlin, Heidelberg: 228-332.
10. Mastofi FK, Davis CJ, Sesterhenn IA. Pathology of Carcinoma of the Prostate. *Cancer.*1992;70(1):235-53.

11. Buhmeida A, Pyrhönen S, Laato M, Collan Y. Prognostic factors in prostate cancer. *Diagn Pathol.*2006;1:4.
12. Gleason DF. Histologic grading of prostate cancer: a perspective. *Hum Pathol.*1992;23(3):273-9.
13. Klosterhalfen H, Altenähr E, Franke HD. Das Prostatakarzinom- Pathologie, Diagnostik, Therapie [Broschiert]. 1982. Thieme. Stuttgart, New York: 77-79.
14. Hofmann R, Heidenreich A, Moul JW. Prostate Cancer-Diagnosis and Surgical Treatment. 2003. Springer. Berlin, Heidelberg: 49-53, 101-103.
15. Fornara P, Rübben H, Weißbach L, Wirth M, Wolff JM. Leitlinien zur PSA-Bestimmung in der Prostatakarzinomdiagnostik (Früherkennung des Prostatakarzinoms) [Kurzfassung]. Leitlinien der deutschen Gesellschaft für Urologie. Springer. *Urologe [A].* 2002.41:509-513.
16. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen medizinischen Fachgesellschaft. Prostatakrebs- viel häufiger als man denkt. 2005.
17. Ebler JN, Angermeier PA. The role of needle aspiration and needle core biopsies in the diagnosis of primary prostate cancer. *Hum Pathol.*1992;23(3):249-57.
18. TNM Klassifikation maligner Tumore. 5. Aufl. 1997. Springer. Berlin, Heidelberg, New York: 162-165.
19. Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Green FL, Trotti A. *AJCC Cancer Staging Manual.* 7. Aufl. 2010. Springer. New York: 457-68.
20. Hautmann RE, Huland H. *Urologie.* 1997. Springer. Berlin, Heidelberg: 230-241.
21. Frohmüller H, Theiß M, Wirth M, Hofmockel G. 15-Jahres-Ereignisse der radikalen Prostatektomie. *Urologe A.*1995;34(3):225-30.

22. Noldus J, Hammerer P, Graefen M, Huland H. Surgical therapy for localized prostatic carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol.*1997;123(3):180-4.
23. Schultze-Seemann W, Wetterauer U. Therapieleitfaden Prostataerkrankungen. Erste Aufl. 2002. UNI-MED. Bremen.
24. Deger S, Böhmer D, Roigas J, Türk I, Budach V, Loening SA. Brachytherapie des lokalen Prostatakarzinoms, *Urologe A.*2001;40(3):181-4.
25. Freeland SJ, Partin AW. Drawing of the age of chemotherapy for prostate cancer. *Rev Urol.*2005 Spring;7(2):110-2.
26. Schlomm T, Erbersdobler A, Mirlacher M, Sauter G. Molecular staging of prostate cancer in the year 2007. *World J Urol.*2007;25(1):19-30.
27. Pignatelli M, Vessey CJ. Adhesion molecules: novel molecular tools in tumor pathology. *Hum Pathol.*1994;25(9):849-56.
28. Wagner, Müller. *Molekulare Onkologie.* 2009. Thieme. Stuttgart: 233-238.
29. van Kempen LC, Nelissen JM, Degen WG, Torensma R, Weidle UH, Bloemers HP, Figdor CG, Swart GW. Molecular basis for the homophilic activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM)-ALCAM interaction. *J Biol Chem.*2001;276(28):25783-90.
30. Ganten, Ruckpaul. *Grundlagen der Molekularen Medizin.* Dritte Aufl. 2008. Heidelberg: 28-29.
31. van Kilsdonk JW, Wilting RH, Bergers M, van Muijen GN, Schalkwijk J, van Kempen LC, Swart GW. Attenuation of melanoma invasion by a secreted variant of activated leukocyte cell adhesion molecule. *Cancer Res.* 2008;68(10):3671-9.
32. Denziger T, Dieckmann H, Bruns K, Laessing K, Stuermer CA, Przybylski M. Isolation, primary structure characterization and identification of the glycosylation pattern of recombinant goldfish neurolin, a neuronal cell adhesion protein. *J Mass Spectrom.*1999;34:435-46.

33. Ofori-Acquah SF, King JA. Activated leukocyte cell adhesion molecule: a new paradox in cancer. *Transl Res.*2008;151(3):122-8.
34. Bowen MA, Patel DD, Li X, Modrell B, Malado AR, Wang WC, Marquardt H, Neubauer M, Pesando JM, Francke U, et al. Cloning, mapping, and characterization of activated leukocyte-cell adhesion molecule (ALCAM), a CD6 ligand. *J Exp Med*1995;181:2213-20.
35. Ikeda K, Quertermous T. Molecular isolation and characterization of a soluble isoform of activated leukocyte cell adhesion molecule that modulates endothelial cell function. *J Biol Chem.*2004;279(53):55315-23.
36. Simon R, Mirlacher M, Sauter G. Tissue microarrays. *Methods Mol Med.*2005;114:257-68.
37. Simon R, Sauter G. Tissue microarrays for miniaturized high-throughput molecular profiling of tumors. *Exp Hematol.*2002;30(12):1365-72.
38. Bubendorf L, Nocito A, Moch H, Sauter G. Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughput in situ studies. *J Pathol.*2001;195(1):72-9.
39. Dabbs DJ. Diagnostic immunohistochemistry. Ed 2001. Churchill Livingstone. New York, Edinburgh, London, Philadelphia: 673.
40. Grube D. Constants and variables in immunohistochemistry. *Arch Histol Cytol.*2004;67(2):115-34.
41. Kristiansen G, Pilarsky C, Wissmann C, Stephan C, Weissbach L, Loy V, Loening S, Dietel M, Rosenthal A. ALCAM/CD 166 is up-regulated in low-grade prostate cancers and progressively lost in high-grade lesions. *Prostate.*2003;54(1):34-43.
42. Schlomm T. Tissue Microarray: Molekulare Hochdurchsatzforschung beim Prostatakarzinom. *Blickpunkt der Mann*2007;5(2):28-30.

43. Sauter G, Simon R, Hillan K. Tissue microarrays in drug discovery. *Nat Rev drug Discov.*2003;2(12):962-72.
44. Kristiansen G, Pilarsky C, Wissmann C, Kaiser S, Bruemendorf T, Roepcke S, Dahl E, Hinzmann B, Specht T, Pervan J, Stephan C, Loening S, Dietel M, Rosenthal A. Expression profiling of microdissected matched prostate cancer samples reveals CD166/MEMD and CD24 as new prognostic markers for patient survival. *J Pathol.*2005;205(3):359-76.
45. van den Brand M, Takes RP, Blokpoel-de Ruyter M, Slootweg PJ, van Kempen LC. Activated leukocyte cell adhesion molecule expression predicts lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.*2010;46(5):393-398.
46. Verma A, Shukla NK, Deo SVS, Gupta SD, Ralhan R. MEMD/ALCAM: a potential marker for tumor invasion and nodal metastasis in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncology.*2005;68(4-6):462-70.
47. Mezzanzanica D, Fabbi M, Bagnoli M, Staurengo S, Losa M, Balladore E, Alberti P, Lusa L, Ditto A, Ferrini S, Pierotti MA, Barbareschi M, Pilotti S, Canevari S. Subcellular localization of activated leukocyte cell adhesion molecule is a molecular predictor of survival in ovarian carcinoma patients. *Clin Cancer Res.*2008;14(6):1726-1733.
48. Uhlenbrock K, Eberth A, Herbrand U, Daryab N, Stege P, Meier F, Friedl P, Collard JG, Ahmadian MR. The RacGEF Tiam 1 inhibits migration and invasion of metastatic melanoma via a novel adhesive mechanism. *J Cell Sci.*2004;117(Pt 20):4863-71.
49. Weichert W, Kösel T, Bellach J, Dietel M, Kristiansen G. ALCAM/CD166 is overexpressed in colorectal carcinoma and correlates with shortened patient survival. *J Clin Pathol.*2004;57(11):1160-4.
50. Tomita K, van Bokhoven A, Jansen CFJ, Kiemeneij LA, Karthaus HFM, Vriesema J, Bussemakers MJG, Witjes A, Schalken JA. Activated leukocyte

- cell adhesion molecule (ALCAM) expression is associated with a poor prognosis for bladder cancer patients. *Uro Oncology*.2003;3:121-9.
51. Tomita K, van Bokhoven A, Jansen CF, Bussemakers MJ, Schalken JA. Coordinate recruitment of E-cadherin and ALCAM to cell-cell contacts by alpha-catenin. *Biochem Biophys Res Commun*.2000;267(3):870-874.
52. Degen WG, van Kempen LC, Gijzen EG, van Groningen JJ, van Kooyk Y, Bloemers HP, Swart GW. MEMD, a new cell adhesion molecule in metastasizing human melanoma cell lines, is identical to ALCAM (activated leukocyte cell adhesion molecule). *Am J Pathol*.1998;152(3):805-13.
53. Van Kempen LC, van den Oord JJ, van Muijen GN, Weidle UH, Bloemers HP, Swart GW. Activated leucocyte cell adhesion molecule/CD166, a marker of tumor progression in primary malignant melanoma of the skin. *Am J Pathol*.2000;156(3):769-74.
54. van Kempen LC, Meier F, Egeblad M, Kersten-Niessen MJ, Garbe C, Weidle UH, van Muijen GN, Herlyn M, Bloemers HP, Swart GW. Truncation of activated leukocyte cell adhesion molecule: a gateway to melanoma metastasis. *J Invest Dermatol*.2004;122(5):1293-301.
55. King JA, Ofori-Acquah SF, Stevens T, Al-Mehdi AB, Fodstad O, Jiang WG. Activated leukocyte cell adhesion molecule in breast cancer: prognostic indicator. *Breast Cancer Res*.2004;6(5):R478-87.
56. Burkhardt M, Mayordomo E, Winzer K-J, Fritsche F, Gansukh T, Pahl S, Weichert W, Denkert C, Guski H, Dietel M, Kristiansen G. Cytoplasmic overexpression of ALCAM is prognostic of disease progression in breast cancer. *J Clin Pathol*.2006;59(4):403-409.
57. Doane AS, Danso M, Lal P, Donaton M, Zhang L, Hudis C, Gerald WL. An estrogen receptor-negative breast cancer subset characterized by a hormonally regulated transcriptional program and response to androgen. *Oncogene*2006;25(28):3994-4008.

58. Liu B, Conrad F, Roth A, Drummond DC, Simko JP, Marks JD. Recombinant full-length human IgG1s targeting hormone-refractory prostate cancer. *J Mol Med.*2007;85(10):1113-23.
59. Roth A, Drummond DC, Conrad F, Hayes ME, Kirpotin DB, Benz CC, Marks JD, Liu B. Anti-CD166 single chain antibody-mediated intracellular delivery of liposomal drugs to prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther.*2007;6(10):2737-46.

8 Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Funktionsweise des Tumorarray-Verfahrens [38]</i>	18
<i>Abbildung 2: Übersichtsaufnahme eines Tumorarrays und eines einzelnen Gewebespot mit 0,6 mm Durchmesser (HE-Färbung)</i>	18
<i>Abbildung 3: Abbildung unterschiedlicher Färbungen von ALCAM in nicht entartetem Prostataepithel (a-c) und im Prostatakarzinom (d-i) in verschiedenen Antikörper-Verdünnungen.</i>	23
<i>Abbildung 4: Einfluss von klinisch-pathologischen Merkmalen und der Expression von ALCAM auf das PSA-Rezidiv.(a) pT-Kategorie,(b) Gleason-Grad,(c) Chirurgischer Resektionsrand,(d) Immunhistologische Färbung von ALCAM</i>	29
<i>Abbildung 5: Beziehung zwischen der Expression von ALCAM und dem pT-Status(A) und dem BCR (B).</i>	30

9 Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Histologisches Wachstumsmuster des Prostatakarzinoms [8,12]</i>	8
<i>Tabelle 2: TNM Klassifikation [19]</i>	10
<i>Tabelle 3: Bewertungskriterien für ALCAM entsprechend ihrer Farbintensität und dem prozentualen Anteil positiv gefärbter Tumorzellen.</i>	20
<i>Tabelle 4: Vergleich zwischen ALCAM Färbung in der Membran und im Zytoplasma</i>	24
<i>Tabelle 5: Beziehung der Expression von ALCAM zum Tumorstadium, Gleason-Grad, chirurgischem Resektionsrand, zur pN-Kategorie und zum präoperativen PSA-Wert (ng/ml)</i>	25
<i>Tabelle 6: Klinische und pathologische Charakteristika sowie biochemische Rezidivrate (BCR) von 3261 Patienten.</i>	26

10 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. G. Sauter, für die konstruktive Zusammenarbeit und die freundliche Unterstützung. Er hat es mir möglich gemacht, diese Dissertation am Institut für Pathologie am Universitäts-Klinikum Hamburg-Eppendorf zu schreiben.

Ebenfalls sehr herzlich möchte ich mich bei meiner Betreuerin Frau Dr. med. S. Minner bedanken, die mit anregenden Diskussionen und wertvollen Ratschlägen das Gelingen der Arbeit vorangetrieben hat.

Ich bedanke mich bei allen Personen im Pathologischen Institut, ohne deren Arbeit diese Dissertation nicht gelungen wäre.

Am Schluss möchte ich meinen Eltern danken. Ihr habt immer an mich geglaubt und habt mich durch eure Liebe und Unterstützung auch in schwierigen Phasen meines Studiums dazu gebracht nie aufzugeben.

11 Lebenslauf

11 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.

Unterschrift: