

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Pathologie

Direktor Prof. Dr. med. Guido Sauter

**Die PSCA Expression ist mit günstigen Tumoreigenschaften und reduziertem
PSA Rezidiv bei operiertem Prostatakarzinom assoziiert**

Dissertation

Zur Erlangung eines Doktorgrades in der Medizin
an der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von
Marie-Christine Heinrich
aus Berlin

Hamburg 2020

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät Universität Hamburg am: 08.10.2020**

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

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Michael Rink

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Guido Sauter

1	Publikation der Originalarbeit.....	2
2	Darstellung der Publikation	11
2.1	Einleitung	11
2.2	Material und Methoden.....	12
2.2.1	Patienten.....	12
2.2.2	Immunhistochemie.....	12
2.2.3	Statistik	12
2.3	Ergebnisse	13
2.4	Diskussion	14
2.5	Zusammenfassung.....	17
2.6	Abstract.....	17
2.7	Literaturverzeichnis	18
3	Erklärung des Eigenanteils	23
4	Danksagung.....	24
5	Curriculum vitae.....	25
6	Eidesstattliche Erklärung	26

RESEARCH ARTICLE

Open Access



PSCA expression is associated with favorable tumor features and reduced PSA recurrence in operated prostate cancer

Marie-Christine Heinrich^{1†}, Cosima Göbel^{1†}, Martina Kluth¹, Christian Bernreuther², Charlotte Sauer¹, Cornelia Schroeder³, Christina Möller-Koop¹, Claudia Hube-Magg¹, Patrick Lebok¹, Eike Burandt¹, Guido Sauter¹, Ronald Simon^{1*} , Hartwig Huland⁴, Markus Graefen⁴, Hans Heinzer⁴, Thorsten Schlömm^{4,5} and Asmus Heumann³

Abstract

Background: Prostate Stem Cell Antigen (PSCA) is frequently expressed in prostate cancer but its exact function is unclear.

Methods: To clarify contradictory findings on the prognostic role of PSCA expression, a tissue microarray containing 13,665 prostate cancers was analyzed by immunohistochemistry.

Results: PSCA staining was absent in normal epithelial and stromal cells of the prostate. Membranous and cytoplasmic PSCA staining was seen in 53.7% of 9642 interpretable tumors. Staining was weak in 22.4%, moderate in 24.5% and strong in 6.8% of tumors. PSCA expression was associated with favorable pathological and clinical tumor features: Early pathological tumor stage ($p < 0.0001$), low Gleason grade ($p < 0.0001$), absence of lymph node metastasis ($p < 0.0001$), low pre-operative PSA level ($p = 0.0118$), negative surgical margin ($p < 0.0001$) and reduced PSA recurrence ($p < 0.0001$). PSCA expression was an independent predictor of prognosis in multivariate analysis (hazard ratio 0.84, $p < 0.0001$).

Conclusions: The absence of statistical relationship to TMPRSS2-ERG fusion status, chromosomal deletion or high tumor cell proliferation argues against a major role of PSCA for regulation of cell cycle or genomic integrity. PSCA expression is linked to favorable prognosis. PSCA measurement is a candidate for inclusion in multi-parametric prognostic prostate cancer tests.

Keywords: PSCA, ERG, Tissue microarray, Prostate cancer, Immunohistochemistry

Background

While most prostate cancers have an indolent clinical course, the disease represents the third most common cause of cancer related death in men in Western societies [1]. Gleason grade and tumor extent on biopsies, pre-operative prostate-specific antigen (PSA), and clinical stage are the currently established pretreatment prognostic parameters. Although these parameters are linked to cancer aggressiveness, the distinction between indolent and aggressive prostate cancer is difficult for the individual patient. Molecular marker may enable a better prediction of prostate cancer aggressiveness in the future.

Prostate stem cell antigen (PSCA) is a protein of unknown function anchored to the cell surface. It was discovered in an attempt to identify genes up regulated in human prostate cancer [2]. Though the name implies specificity for the prostate, PSCA is expressed in several tissues: Placenta, kidney, pancreas, and bladder [3–5]. The function of PSCA has not been fully elucidated [6–9]. Experiments suggest a possible role in cell adhesion, proliferation control and cell survival [2, 10]. Evidence is accumulating that – depending on the cell type involved – PSCA can have a tumor promoting or a tumor suppressive effect [11–15]. For example, loss of PSCA was associated with poor outcome in cancer of the gallbladder and stomach [12, 16], but with improved prognosis in pancreatic adenocarcinoma, renal cell carcinoma and non-small lung cancer [17–20]. The part of PSCA in prostate cancer remains unclear. Even if most available data suggest that prostate cancer may belong to the tumors with an oncogenic function of PSCA overexpression [21–24], there are

* Correspondence: r.simon@uke.de

[†]Marie-Christine Heinrich and Cosima Göbel contributed equally to this work.

¹Institute of Pathology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistrasse 52, D-20246 Hamburg, Germany

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2018 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

also studies that do not support such a conclusion [25] or suggest the opposite that prostate cancer aggressiveness and metastasis is driven by PSCA down regulation [26–29].

To clarify the prognostic role of PSCA expression in prostate cancer, we analyzed PSCA expression by immunohistochemistry on a large preexisting tissue micro array (TMA).

Methods

Patients

Radical prostatectomy specimens were from 13,660 consecutive patients operated between 1992 and 2014 at the University Medical Center Hamburg-Eppendorf (Department of Urology and Martini Clinic). In addition to the classical Gleason categories, “quantitative” Gleason grading was performed as described elsewhere [30]. Follow-up was available for 12,208 patients (Table 1). In Kaplan-Meier analysis prostate specific antigen (PSA) recurrence was defined as the time point when postoperative PSA was at least 0.2 ng/ml.

Immunohistochemistry

TMAs were manufactured as described [31]. Rabbit polyclonal antibody specific for PSCA (cat#PA1–38516, Thermo scientific, dilution 1:150) was applied at 37 °C for 60 min. Bound antibody was visualized with the EnVision Kit (Dako, Glostrup, Denmark). Staining was membranous and cytoplasmic in cancer and negative in normal tissue (Fig. 1). PSCA staining was typically found in either all (100%) or none (0%) of the cells in a cancer spot. Staining intensity was semi-quantitatively assessed by visual examination of the stained slides under a microscope and grouped into four categories: Examples of negative, weak, moderate and strong staining are in Fig. 1.

Statistics

To study association between PSCA expression and clinico-pathological variables, contingency tables were calculated and tested with the chi-square (likelihood) method. Analysis of variance and F-test was applied to find associations between PSCA expression and tumor cell proliferation. Kaplan-Meier curves were generated for PSA recurrence-free survival. Differences were checked by the log-rank test. Cox proportional hazards regression analysis was performed to test for independence and significance between pathological, molecular, and clinical variables. All calculations were done with JMP 11 (SAS Institute Inc., NC, USA).

Results

A total of 9642 (70.6%) of TMA spots were interpretable. Non-informative cases (4023 spots; 29.4%) lacked tissue samples or unequivocal cancer tissue spots. PSCA staining was absent in glands, stromal tissue and inflammatory cells of the normal prostate. In cancers, positive PSCA staining was seen in 5581 of our 9642 (53.7%) interpretable tumors

Table 1 Pathological and clinical data of the arrayed prostate cancers

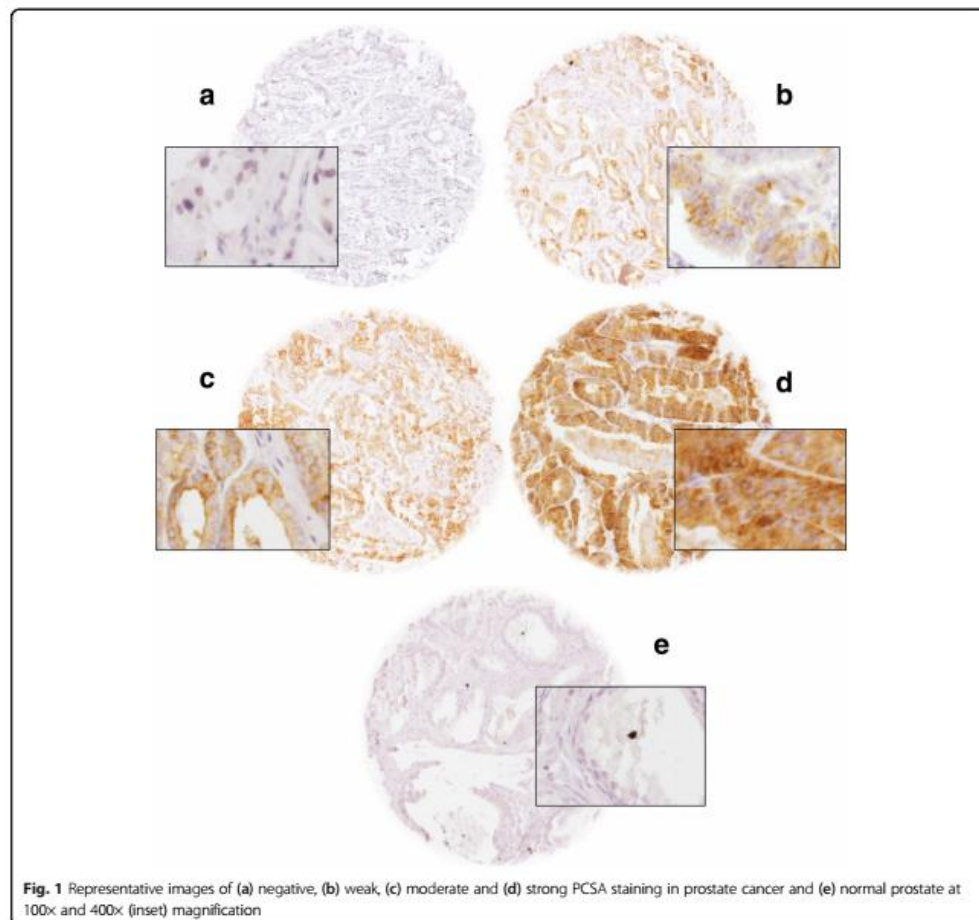
	Study cohort on TMA (n = 13,660)	Biochemical relapse among category
Follow-up		
n	12,208	3017 (25%)
Mean / median	58.8 / 48.5 months	–
Age (y)		
≤50	352	61 (17%)
51–59	3335	701 (21%)
60–69	7827	1747 (22%)
≥70	2093	508 (24%)
Pretreatment PSA (ng/ml)		
< 4	1694	252 (15%)
4–10	8195	1464 (18%)
10–20	2763	847 (31%)
> 20	922	442 (48%)
pT stage (AJCC 2002)		
pT2	8861	1030 (12%)
pT3a	2984	958 (32%)
pT3b	1696	976 (58%)
pT4	71	53 (75%)
Gleason grade		
≤3 + 3	2888	236 (8%)
3 + 4	7286	1269 (17%)
3 + 4 Tertiary 5	573	133 (23%)
4 + 3	1301	594 (46%)
4 + 3 Tertiary 5	868	380 (44%)
≥4 + 4	733	404 (55%)
Nodal (pN) stage		
pN0	7904	1896 (24%)
pN+	856	524 (61%)
Surgical margin (R) status		
Negative	10,962	1939 (18%)
Positive	2649	1078 (41%)

NOTE: Numbers do not always add up to 13,660 in the different categories because of cases with missing data. Abbreviation: AJCC American Joint Committee on Cancer

and was considered weak in 22.4%, moderate in 24.5% and strong in 6.8% of cancers. 4461 tumors (46.3%) showed no PSCA staining.

PSCA expression and tumor phenotype

Absence of PSCA expression was linked to advanced pathological tumor stage ($p < 0.0001$), high Gleason grade ($p < 0.0001$), lymph node metastases ($p < 0.0001$),



preoperative PSA level ($p = 0.0118$) and positive surgical margin ($p < 0.0001$). Data are summarized in Table 2.

PCSA expression and TMPRSS2:ERG fusion

Because TMPRSS2:ERG fusion is the predominant genetic marker in prostate cancer we analyzed its relation to PCSA expression [32]. Data on TMPRSS2:ERG fusion status obtained by FISH were available from 5241 and by immunohistochemistry (IHC) from 7762 tumors with evaluable PCSA staining. Data on both ERG FISH and IHC were available from 5042 cancers, and an identical result (ERG IHC positive and break by FISH or ERG IHC negative and missing break by FISH) was found in

95% cancers. PCSA staining did not differ significantly between ERG positive and ERG negative cancers (Fig. 2).

Association with other key genomic deletion

Earlier studies had provided evidence for distinct molecular subgroups of prostate cancer defined by TMPRSS2:ERG fusion and several genomic deletions [32–37]. Therefore PCSA expression was compared with preexisting data on 10q23 (PTEN), 3p13 (FOXP1), 6q15 (MAP3K7), and 5q21 (CHD1) deletion. PCSA expression did not differ notably between cancers with and without these deletions with the exception of marginal association of positive PCSA

Table 2 Association between PSCA staining and prostate cancer phenotype

	Evaluable	PSCA staining (%)				
Parameter	(N)	Negative	Weak	Moderate	Strong	P
Total	9642	46.3	22.4	24.5	6.8	
Tumor stage						
pT2	6003	41.5	23.6	26.9	8.0	< 0.0001
pT3a	2269	51.1	20.9	22.5	5.5	
pT3b-pT4	1326	59.7	19.5	17.0	3.8	
Gleason grade						
≤3 + 3	1713	47.0	23.0	22.8	7.2	< 0.0001
3 + 4	5275	43.4	22.8	26.5	7.4	
3 + 4 Tertiary 5	441	46.3	23.6	23.8	6.3	
4 + 3	977	50.2	21.2	21.8	6.9	
4 + 3 Tertiary 5	666	48.6	22.8	23.7	4.8	
≥4 + 4	562	61.6	17.4	17.8	3.2	
Lymph node metastasis						
N0	5873	46.0	22.4	24.4	7.2	< 0.0001
N+	674	59.9	19.1	17.7	3.3	
Preoperative PSA level (ng/ml)						
< 4	1099	48.6	19.7	25.3	6.4	0.0118
4–10	5715	44.9	23.4	24.7	7.0	
10–20	1995	46.9	21.8	24.1	7.3	
> 20	724	51.2	20.0	23.6	5.1	
Surgical margin						
Negative	7544	45.1	22.8	24.8	7.3	< 0.0001
Positive	1882	51.3	20.8	22.6	5.3	

expression and 6q15- ($p = 0.0318$) respective 3p13- deletion ($p = 0.0019$, Fig. 3).

Tumor cell proliferation

No association was found between PSCA staining and tumor cell proliferation as measured by Ki67 labeling index ($p = 0.2211$), neither in all cancers nor in subsets of ERG negative or ERG positive cancer, or in tumor subsets with identical Gleason score ($p > 0.05$; data not shown).

Association with PSA recurrence

Follow-up data were available from 8410 patients with interpretable PSCA staining. Tumors with negative PSCA staining showed a significantly shortened PSA recurrence-free interval compared with positively stained cancers ($p < 0.0001$, Fig. 4). This holds true for the subgroup of ERG fusion negative and positive cancer (data not shown). In further analysis weak, moderate and strong stained tumors were grouped as positive. PSCA expression provided additional prognostic impact in most subsets of cancer with identical classical Gleason grade group ($p = 0.0346$ for $\leq 3 + 3$, $p = 0.0206$ for $3 + 4$, $p = 0.0092$ for $4 + 3$ and $p = 0.4423$ for $\geq 4 + 4$, Fig. 5). However, the prognostic impact of PSCA

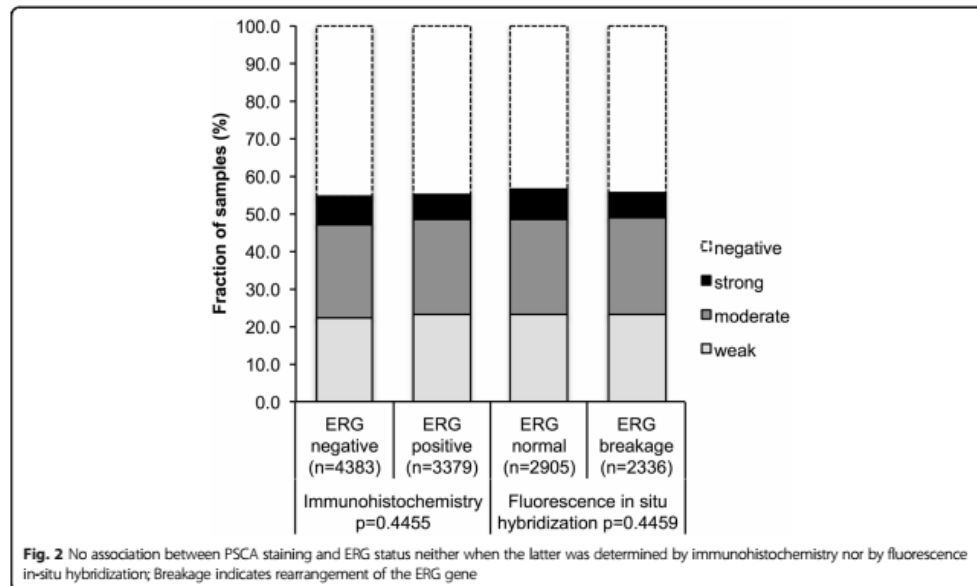
expression was lost in subgroups with comparable quantitative Gleason scores (Additional file 1: Figure S1).

Multivariate analysis

Four different multivariate scenarios were used to simulate clinical decisions (Table 3). Scenario 1 evaluated the pre-operatively available parameters: Preoperative Gleason grade obtained on the original biopsy, clinical tumor stage (cT stage) and preoperative PSA together with the postoperatively obtained PSCA expression. In scenario 2, the radical prostatectomy Gleason grade replaced the biopsy Gleason grade, while in scenario 3 pathological (pT) stage and surgical margin (R) status replaced cT stage. In scenario 4, the lymph node (pN) stage is added. Overall, PSCA expression proved to be an independent favorable prognostic parameter. The Cox hazard ratio for PSA recurrence-free survival after radical prostatectomy between weak and negative PSCA expression varied from 0.84 to 0.93 and was significant in scenario 1 and 2 (Table 3).

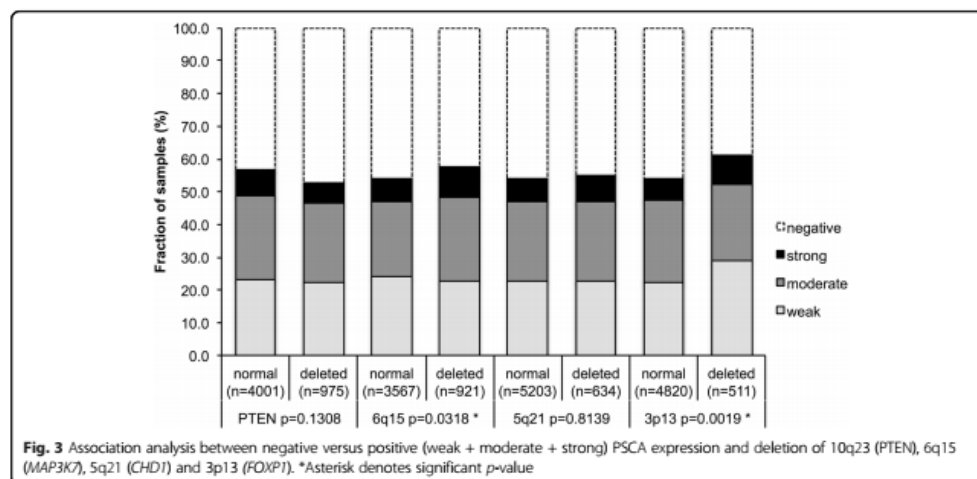
Discussion

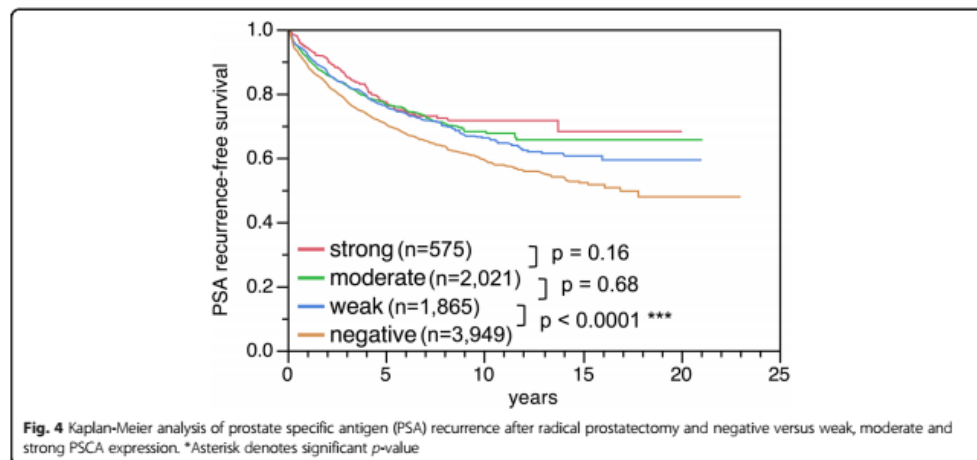
This study demonstrates that PSCA expression is significantly associated with favorable tumor phenotype and a



reduced risk for PSA recurrence. A total of 54% of prostate cancers showed detectable PSCA expression in our IHC study. This is in the range of two other studies reporting in 88% of 126 [2] or 48% of 233 patients [4] IHC positivity. These IHC findings are not contradictory to further studies describing at least a low level PSCA expression in all prostate cancers utilizing polymerase chain reaction [5, 23]. It is well known that IHC negativity does not reflect the absence of

expression but rather that a certain threshold for detection is not reached. The threshold of detection is greatly influenced by the IHC protocol [38]. Although Ross et al. [4] and Reiter et al. [2] used different antibodies and protocols; they obviously resulted in a comparable sensitivity as in our study. We consider our protocol suited for studying the prognostic impact of PSCA expression as the selected conditions enable a distinction of cancers with high and low levels of PSCA





expression. Given that normal prostate epithelial cells usually did not stain for PSCA, we assume that PSCA up-regulation had occurred in a fraction of prostate cancers. The link between cancer specific up-regulation of a protein and better prognosis is uncommon and argues for a "protective" or tumor suppressive role. Our outcomes are in concordance with data from Larkin et al. [27], also reporting a link between elevated PSCA expression and favorable clinical course. A tumor suppressive role of high level PSCA expression is also supported from cell line models. For example, functional analysis of cell lines from gastric and gallbladder cancer demonstrated that forced overexpression of PSCA hampered cell proliferation [12, 16].

It is noteworthy that several investigators reported contrary results. IHC with various and partly custom made antibodies to conventional large sections of 40 [22] and 112 [5] prostate cancers revealed associations with high Gleason score, advanced stage and castration resistant disease. Also in TMA studies including 114 [23] and 246 [24] prostate cancers the authors reported associations between strong PSCA expression and high Gleason score. However, another TMA study on 64 prostate cancers could not confirm these findings [25]. We cannot explain the discrepancy between these studies and our data obtained on almost 10,000 successfully analyzed carcinoma.

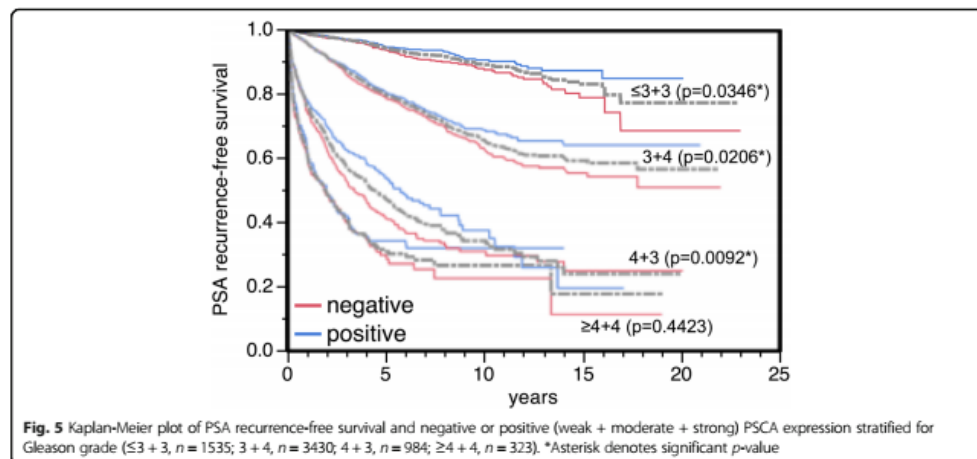


Table 3 Hazard ratios of established prognostic parameters and PSCA expression in prostate cancer

Scenario	1	2	3	4
Analyzable (N)	8334	8454	8570	5801
Gleason grade biopsy				
3 + 4 vs. ≤3 + 3		1.94***		
4 + 3 vs. 3 + 4		1.63***		
≥4 + 4 vs. 4 + 3		1.39***		
cT stage				
T2a vs. T1c		1.53***	1.47***	
T3a vs. T2c		0.65*	1.07	
Preoperative PSA level				
4–10 vs. < 4		1.25*	1.21*	1.11
10–20 vs. 4–10		1.58***	1.41***	1.25***
> 20 vs. 10–20		1.67***	1.47***	1.23*
PSCA expression				
Positive vs. negative	0.84***	0.86**	0.93	0.93
Gleason grade prostatectomy				
3 + 4 vs. ≤3 + 3		2.91***	2.39***	2.30***
4 + 3 vs. 3 + 4		2.72***	2.24***	2.05***
≥4 + 4 vs. 4 + 3		1.75***	1.25*	1.21*
pT stage				
T3a vs. T2			1.94***	1.94***
T3b vs. T3a			1.73***	1.52***
T4 vs. T3b			1.20	1.24
Surgical margin (R) status				
R1 vs. R0			1.40***	1.18*
Nodal (pN) stage				
N+ vs. N0				1.56***

Scenario 1 combines preoperatively available parameter (preoperative Gleason grade obtained on the original biopsy, clinical tumor (cT) stage, and preoperative PSA) with the postoperative PSCA expression. In scenario 2 the biopsy Gleason is replaced by the Gleason grade obtained on radical prostatectomy. In scenario 3 cT stage is superseded by pathological tumor (pT) stage and surgical margin (R) status. In scenario 4 the lymph node (pN) stage is added. Asterisk indicate significance level: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.001$, and *** $p \leq 0.0001$

The mechanism for a tumor suppressive function of PSCA is unknown. In our study, we compared the expression of PSCA with molecular attributes associated with genomic instability, chromosomal deletion and tumor cell proliferation [37]. We found previously that features with a role in cell cycle control (p16 [39] or APE1 [40]) were significantly associated with a high Ki67 labeling index. Molecular attributes linked to genomic instability (MSH6/PMS2/MLH1 [41], ELAV1 [42], or HOOK3 [43]) were found to be associated with chromosomal deletion. The lack of clear-cut association with these features argues against a relevant impact of PSCA on cell proliferation

control and development of deletion in prostate cancer. This is in contrast to one experimental study, suggesting an accelerating effect of PSCA loss on cell proliferation in a gastric cancer cell line [16]. That PSCA expression was completely unrelated to TMPRSS2:ERG fusion further demonstrates that PSCA is not significantly affected by any of the hundreds of genes that are deregulated in ERG fusion positive prostate cancer [44–47].

PSCA expression was significantly associated with favorable patient outcome in our cohort. A possible clinical relevance of this finding is supported by its statistical independence of classical prognostic markers, especially in a pre-operative disease state. However, in comparison with established features such as the Gleason score, the impact of PSCA expression on patient outcome was rather small. If traditional prognostic Gleason groups were used, a small prognostic impact was still found in Gleason 3 + 4 ($p = 0.0206$) or Gleason 4 + 3 ($p = 0.0092$). However, if these subgroups were further differentiated according to the fraction of Gleason 4 (quantitative Gleason grading [30]) these PSCA associated prognostic differences vanished. This further illustrates the high bar that molecular characteristics have to overcome if compared with optimized morphologic analysis.

Conclusions

PSCA expression is a statistically independent predictor of favorable prognosis in prostate cancer. Although its prognostic impact per se is not very strong, PSCA expression analysis could be considered for inclusion in multi-parametric prognostic tests to distinguish prostate cancers with need for radical therapy.

Additional file

Additional file 1: Figure S1. Kaplan-Meier plot of prostate specific antigen (PSA) recurrence and PSCA expression stratified for quantitative Gleason grade. Note the different time scale for Gleason Tertiary 5 grades. (DOC 2467 kb)

Abbreviations

AR: Androgen receptor; CHD1: Chromodomain-Helicase-DNA-Binding Protein 1; ELAV1: Embryonic Lethal, Abnormal Vision, Drosophila-Like 1; FISH: Fluorescence in-situ hybridization; FOXF1: Forkhead box protein P1; HOOK3: Hook Microtubule Tethering Protein 3; IHC: Immunohistochemistry; MAP3K: Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 7; PSCA: Prostate stem cell antigen; PSA: Prostate specific antigen; PTEN: Phosphatase and tensin homolog; RPE: Radical prostatectomy; TMPRSS2: Transmembrane protease, serine 2; ERG: ETS-related gene fusion; TMA: Tissue microarray

Acknowledgements

We thank Julia Schumann, Sünje Seekamp and Inge Brandt for excellent technical assistance.

Availability of data and materials

All data generated or analyzed during this study are included in this published article [and its Additional file 1].

Authors' contributions

MCH, AH, RS, and GS designed the study, and drafted the manuscript. HH1, MG, CB and TS participated in study design. MCH, AH, CG, CS1, CS2 performed IHC analysis and scoring. PL and EB participated in pathology data analysis. CH-M and RS performed statistical analysis. TS, CK, MK, MCH, HH2 and AH participated in data interpretation, and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Ethics approval and consent to participate

The ethics committee of the Ärztekammer Hamburg approved this study (WF-049/09 and PV3652). According to local laws (HmbKHG, §12,1) informed consent was not required for this study.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹Institute of Pathology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistrasse 52, D-20246 Hamburg, Germany. ²Institute of Neuropathology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistrasse 52, D-20246 Hamburg, Germany. ³Department of Surgery, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistrasse 52, D-20246 Hamburg, Germany. ⁴Martini-Clinic, Prostate Cancer Center, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistrasse 52, D-20246 Hamburg, Germany. ⁵Department of Urology, Section for translational Prostate Cancer Center, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistrasse 52, D-20246 Hamburg, Germany.

Received: 11 October 2017 Accepted: 22 May 2018

Published online: 31 May 2018

References

- Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*. 2015;65(2):87–108.
- Reiter RE, Gu Z, Watabe T, Thomas G, Szigeti K, Davis E, Wahl M, Nisitani S, Yamashiro J, Le Beau MM, et al. Prostate stem cell antigen: a cell surface marker overexpressed in prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95(4):1735–40.
- Cunha AC, Weigle B, Kiessling A, Bachmann M, Rieber EP. Tissue-specificity of prostate specific antigens: comparative analysis of transcript levels in prostate and non-prostatic tissues. *Cancer Lett*. 2006;236(2):229–38.
- Ross S, Spencer SD, Holcomb I, Tan C, Hongo J, Devaux B, Rangell L, Keller GA, Schow P, Steeves RM, et al. Prostate stem cell antigen as therapy target: tissue expression and in vivo efficacy of an immunconjugate. *Cancer Res*. 2002;62(9):2546–53.
- Gu Z, Thomas G, Yamashiro J, Shintaku IP, Dorey F, Raitano A, Witte ON, Said JW, Loda M, Reiter RE. Prostate stem cell antigen (PSCA) expression increases with high Gleason score, advanced stage and bone metastasis in prostate cancer. *Oncogene*. 2000;19(10):1288–96.
- Saeki N, Gu J, Yoshida T, Wu X. Prostate stem cell antigen: a Jekyll and Hyde molecule? *Clin Cancer Res*. 2010;16(14):3533–8.
- Raff AB, Gray A, Kast WM. Prostate stem cell antigen: a prospective therapeutic and diagnostic target. *Cancer Lett*. 2009;277(2):126–32.
- Esfahani M, Ataei N, Panjehpour M. Biomarkers for evaluation of prostate cancer prognosis. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015;16(7):2601–11.
- Tricoli JV, Schoenfeldt M, Conley BA. Detection of prostate cancer and predicting progression: current and future diagnostic markers. *Clin Cancer Res*. 2004;10(12 Pt 1):3943–53.
- Kim SH, Park WS, Kim SH, Park B, Joo J, Lee GK, Joung JY, Seo HK, Chung J, Lee KH. Prostate stem cell antigen expression in radical prostatectomy specimens predicts early biochemical recurrence in patients with high risk prostate cancer receiving Neoadjuvant hormonal therapy. *PLoS One*. 2016; 11(3):e0151646.
- Zhang LY, Wu JL, Qiu HB, Dong SS, Zhu YH, Lee VH, Qin YR, Li Y, Chen J, Liu HB, et al. PSCA acts as a tumor suppressor by facilitating the nuclear translocation of RB1CC1 in esophageal squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis*. 2016;37(3):320–32.
- Ono H, Hiraoka N, Lee YS, Woo SM, Lee WJ, Choi U, Saito A, Yanagihara K, Kanai Y, Ohnami S, et al. Prostate stem cell antigen, a presumable organ-dependent tumor suppressor gene, is down-regulated in gallbladder carcinogenesis. *Genes Chromosomes Cancer*. 2012;51(1):30–41.
- Saeki N, Ono H, Sakamoto H, Yoshida T. Down-regulation of immune-related genes by PSCA in gallbladder Cancer cells implanted into mice. *Anticancer Res*. 2015;35(5):2619–25.
- Wang L, Sang Y, Tang J, Zhang RH, Luo D, Chen M, Deng WG, Kang T. Down-regulation of prostate stem cell antigen (PSCA) by slug promotes metastasis in nasopharyngeal carcinoma. *J Pathol*. 2015;237(4):411–22.
- Zhigang Z, Wenlv S. Prostate stem cell antigen (PSCA) expression in human prostate cancer tissues: implications for prostate carcinogenesis and progression of prostate cancer. *Jpn J Clin Oncol*. 2004;34(7):414–9.
- Study Group of Millennium Genome Project for C, Sakamoto H, Yoshimura K, Saeki N, Katai H, Shimoda T, Matsuno Y, Saito D, Sugimura H, Tanaka F, et al. genetic variation in PSCA is associated with susceptibility to diffuse-type gastric cancer. *Nat Genet*. 2008;40(6):730–40.
- Amara N, Palapattu GS, Schrage M, Gu Z, Thomas GV, Dorey F, Said J, Reiter RE. Prostate stem cell antigen is overexpressed in human transitional cell carcinoma. *Cancer Res*. 2001;61(12):4660–5.
- Argani P, Rosty C, Reiter RE, Wilentz RE, Murugesan SR, Leach SD, Ryu B, Skinner HG, Goggins M, Jaffee EM, et al. Discovery of new markers of cancer through serial analysis of gene expression: prostate stem cell antigen is overexpressed in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res*. 2001;61(11):4320–4.
- Elamman EM, Fukumori T, Tanimoto S, Nakanishi R, Takahashi M, Toida K, Kanayama HO. The expression of prostate stem cell antigen in human clear cell renal cell carcinoma: a quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis. *BJU Int*. 2006;98(3):668–73.
- Kawaguchi T, Sho M, Tojo T, Yamato I, Nori T, Hotta K, Hamada K, Suzuki Y, Sugiyama S, Kishibe K, et al. Clinical significance of prostate stem cell antigen expression in non-small cell lung cancer. *Jpn J Clin Oncol*. 2010;40(4):319–26.
- Gu X, Ma Y, Xiao J, Zheng H, Song C, Gong Y, Xing X. Up-regulated biglycan expression correlates with the malignancy in human colorectal cancers. *Clin Exp Med*. 2012;12(3):195–9.
- Ruan Y, Yu W, Cheng F, Zhang X, Larre S. Detection of prostate stem cell antigen expression in human prostate cancer using quantum-dot-based technology. *Sensors (Basel)*. 2012;12(5):5461–70.
- Taeb J, Asgari M, Abolhasani M, Farajollahi MM, Madjd Z. Expression of prostate stem cell antigen (PSCA) in prostate cancer: a tissue microarray study of Iranian patients. *Pathol Res Pract*. 2014;210(1):18–23.
- Han KR, Seligson DB, Liu X, Horvath S, Shintaku PI, Thomas GV, Said JW, Reiter RE. Prostate stem cell antigen expression is associated with Gleason score, seminal vesicle invasion and capsular invasion in prostate cancer. *J Urol*. 2004;171(3):1117–21.
- Joung JY, Yang SO, Jeong IG, Han KS, Seo HK, Chung J, Park WS, Lee KH. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction and immunohistochemical studies for detection of prostate stem cell antigen expression in prostate cancer: potential value in molecular staging of prostate cancer. *Int J Urol*. 2007;14(7):635–43.
- Fuessel S, Sickert D, Meyer A, Klenk U, Schmidt U, Schmitz M, Rost AK, Weigle B, Kiessling A, Wirth MP. Multiple tumor marker analyses (PSA, hK2, PSCA, trp-p8) in primary prostate cancers using quantitative RT-PCR. *Int J Oncol*. 2003;23(1):221–8.
- Larkin SE, Holmes S, Cree IA, Walker T, Basketter V, Bickers B, Harris S, Garbis SD, Townsend PA, Aukim-Hastie C. Identification of markers of prostate cancer progression using candidate gene expression. *Br J Cancer*. 2012;106(1):157–65.
- Moore ML, Teitell MA, Kim Y, Watabe T, Reiter RE, Witte ON, Dubey P. Deletion of PSCA increases metastasis of TRAMP-induced prostate tumors without altering primary tumor formation. *Prostate*. 2008;68(2):139–51.
- Schmidt U, Fuessel S, Koch R, Baretton GB, Lohse A, Tomasetti S, Unversucht S, Froehner M, Wirth MP, Meyer A. Quantitative multi-gene expression profiling of primary prostate cancer. *Prostate*. 2006;66(14):1521–34.
- Sauter G, Steurer S, Clauditz TS, Krech T, Wittmer C, Lutz F, Lennartz M, Janssen T, Hakiimi N, Simon R, et al. Clinical utility of quantitative Gleason grading in prostate biopsies and prostatectomy specimens. *Eur Urol*. 2016;69(4):592–8.
- Mirlacher M, Simon R. Recipient block TMA technique. *Methods Mol Biol*. 2010;664:37–44.
- Tomkins SA, Rhodes DR, Perner S, Dhanasekaran SM, Mehra R, Sun XW, Varambally S, Cao X, Tchinda J, Kuefer R, et al. Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science*. 2005; 310(5748):644–8.

33. Minner S, Enodien M, Sirma H, Luebke AM, Krohn A, Mayer PS, Simon R, Tennstedt P, Muller J, Scholz L, et al. ERG status is unrelated to PSA recurrence in radically operated prostate cancer in the absence of antihormonal therapy. *Clin Cancer Res*. 2011;17(18):5878–88.
34. Burkhardt L, Fuchs S, Krohn A, Masser S, Mader M, Kluth M, Bachmann F, Huland H, Steuber T, Graefen M, et al. CHD1 is a Sq21 tumor suppressor required for ERG rearrangement in prostate cancer. *Cancer Res*. 2013;73(9):2795–805.
35. Kluth M, Hesse J, Heinl A, Krohn A, Steurer S, Sirma H, Simon R, Mayer PS, Schumacher U, Grupp K, et al. Genomic deletion of MAP3K7 at 6q12-22 is associated with early PSA recurrence in prostate cancer and absence of TMPRSS2:ERG fusions. *Mod Pathol*. 2013;26(7):975–83.
36. Krohn A, Seidel A, Burkhardt L, Bachmann F, Mader M, Grupp K, Eichenauer T, Becker A, Adam M, Graefen M, et al. Recurrent deletion of 3p13 targets multiple tumour suppressor genes and defines a distinct subgroup of aggressive ERG fusion-positive prostate cancers. *J Pathol*. 2013;231(1):130–41.
37. Minner S, Jessen B, Stiedenroth L, Burandt E, Kolleremann J, Mirlacher M, Erbersdobler A, Eichelberg C, Fisch M, Brummendorf TH, et al. Low level HER2 overexpression is associated with rapid tumor cell proliferation and poor prognosis in prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2010;16(5):1553–60.
38. Schlomm T, Iwers L, Kirstein P, Jessen B, Kolleremann J, Minner S, Passow-Drolet A, Mirlacher M, Milde-Langosch K, Graefen M, et al. Clinical significance of p53 alterations in surgically treated prostate cancers. *Mod Pathol*. 2008;21(11):1371–8.
39. Burdelski C, Dieckmann T, Heumann A, Hube-Magg C, Kluth M, Beyer B, Steuber T, Pompe R, Graefen M, Simon R, et al. p16 upregulation is linked to poor prognosis in ERG negative prostate cancer. *Tumour Biol*. 2016;37(9):12655–63.
40. Juhnke M, Heumann A, Chirico V, Hoffmayer D, Menz A, Hinsch A, Hube-Magg C, Kluth M, Lang DS, Moller-Koop C, et al. Apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 (APE1/Ref-1) overexpression is an independent prognostic marker in prostate cancer without TMPRSS2:ERG fusion. *Mol Carcinog*. 2017;56(9):2135–45.
41. Wilczak W, Rashed S, Hube-Magg C, Kluth M, Simon R, Buscheck F, Clauditz TS, Grupp K, Minner S, Tsourlakis MC, et al. Up-regulation of mismatch repair genes MSH6, PMS2 and MLH1 parallels development of genetic instability and is linked to tumor aggressiveness and early PSA recurrence in prostate cancer. *Carcinogenesis*. 2017;38(1):19–27.
42. Melling N, Taskin B, Hube-Magg C, Kluth M, Minner S, Koop C, Grob T, Graefen M, Heinzer H, Tsourlakis MC, et al. Cytoplasmic accumulation of ELAVL1 is an independent predictor of biochemical recurrence associated with genomic instability in prostate cancer. *Prostate*. 2016;76(3):259–72.
43. Melling N, Harutyunyan L, Hube-Magg C, Kluth M, Simon R, Lebok P, Minner S, Tsourlakis MC, Koop C, Graefen M, et al. High-level HOOK3 expression is an independent predictor of poor prognosis associated with genomic instability in prostate cancer. *PLoS One*. 2015;10(7):e0134614.
44. Brase JC, Johannes M, Mannsperger H, Falth M, Metzger J, Kacprzyk LA, Andrasiuk T, Gade S, Meister M, Sirma H, et al. TMPRSS2-ERG-specific transcriptional modulation is associated with prostate cancer biomarkers and TGF-beta signaling. *BMC Cancer*. 2011;11:507.
45. Gupta S, Ijlin K, Sara H, Mpindi JP, Mirtti T, Vainio P, Rantala J, Alanen K, Nees M, Kallioniemi O. FZD4 as a mediator of ERG oncogene-induced WNT signaling and epithelial-to-mesenchymal transition in human prostate cancer cells. *Cancer Res*. 2010;70(17):6735–45.
46. Jhavar S, Brewer D, Edwards S, Kote-Jarai Z, Attard G, Clark J, Flohr P, Christmas T, Thompson A, Parker M, et al. Integration of ERG gene mapping and gene-expression profiling identifies distinct categories of human prostate cancer. *BJU Int*. 2009;103(9):1256–69.
47. Taylor BS, Schultz N, Hieronymus H, Gopalan A, Xiao Y, Carver BS, Arora VK, Kaushik P, Cerami E, Reva B, et al. Integrative genomic profiling of human prostate cancer. *Cancer Cell*. 2010;18(1):11–22.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



2 Darstellung der Publikation

2.1 Einleitung

Obwohl Prostatakrebs meist indolent verläuft, ist er weiterhin die dritthäufigste Krebs-assoziierte Todesursache unter Männern der westlichen Welt (Torre et al. 2015). Das Gleason Grading, die Tumorausdehnung in Biopsien, der präoperative Serum-Wert des Prostata-spezifischen Antigens (PSA) und das klinische Stadium sind die aktuell etablierten prätherapeutischen Prognoseparameter. Obgleich diese Parameter statistisch mit aggressivem Krebswachstum verknüpft sind, fällt die Unterscheidung zwischen indolentem und aggressivem Prostatakarzinom bei einzelnen Patienten schwer. Zukünftig könnten molekulare Marker eine bessere Einschätzung der Krebsaggressivität ermöglichen.

Das Prostata-Stammzellantigen (PSCA), ein Protein unklarer Funktion, ist an der Zelloberfläche von Prostata-Epithelzellen verankert. Es wurde ursprünglich bei dem Versuch entdeckt, Gene zu identifizieren, welche im Prostatakarzinom hoch reguliert werden (Reiter et al. 1998). Trotz der wegen des Namens anzunehmenden Prostata-Spezifität wird PSCA in unterschiedlichen extraprostatatischen Geweben exprimiert, darunter Plazenta, Niere, Pankreas und Harnblase (Cunha et al. 2006; Gu et al. 2000; Ross et al. 2002). Die Funktion von PSCA wurde noch nicht vollständig geklärt (Esfahani, Ataei, and Panjehpour 2015; Raff, Gray, and Kast 2009; Saeki et al. 2010; Tricoli, Schoenfeldt, and Conley 2004). Experimentelle Arbeiten deuten auf eine mögliche Rolle bei Zelladhäsion, Proliferationskontrolle und Zellüberleben hin (Kim et al. 2016; Reiter et al. 1998). Immer mehr Arbeiten belegen, dass PSCA, je nach involviertem Zelltyp, entweder einen Tumorfördernden oder Tumor-supprimierenden Effekt zeigen kann (Ono et al. 2012; Saeki et al. 2010; Wang et al. 2011; Zhang et al. 2016; Zhigang and Wenlv 2006). Zum Beispiel wurde der Verlust von PSCA bei Karzinomen der Gallenblase oder des Magens mit einer ungünstigen Prognose assoziiert (Ono et al. 2012; Study Group of Millennium Genome Project for et al. 2008), wohingegen das Adenokarzinom des Pankreas, das Nierenzellkarzinom und das nicht-kleinzellige Lungenkarzinom bei Verlust von PSCA eine bessere Prognose zeigten (Amara et al. 2001; Argani et al. 2001; Elsamman et al. 2006; Kawaguchi et al. 2010). Die Rolle von PSCA bei Prostatakrebs bleibt unklar. Selbst wenn die meisten veröffentlichten Daten bezogen auf das Prostatakarzinom einer PSCA Überexpression eine malignitätssteigernde Wirkung zuschreiben (Gu et al. 2000; Han et al. 2004; Ruan et al. 2012; Taeb et al. 2014), gibt es ebenso Studien, die diesen Schluss nicht zulassen (Joung et al. 2007) oder sogar das Gegenteil belegen. Einige Studien fanden, dass eine PSCA Herunterregulierung mit Prostatakrebs-Aggressivität und Metastasen einhergeht (Fuessel et al. 2003; Larkin et al. 2012; Moore et al. 2008; Schmidt et al. 2006).

Um die prognostische Rolle der PSCA Expression im Prostatakarzinom zu bestimmen, wurden in unserer Arbeitsgruppe immunhistochemische Untersuchungen zur PSCA Expression an einem großen, vorbestehenden Prostatakarzinom Tissue Microarray (TMA) durchgeführt und ausgewertet.

2.2 Material und Methoden

Die verwendeten Materialien und die angewandten Methoden wurden in der dieser Doktorarbeit zugrunde liegenden Publikation detailliert beschrieben (Heinrich et al. 2018) und werden nachstehend verkürzt wiedergegeben.

2.2.1 Patienten

Es wurden Operationspräparate radikaler Prostatektomien von 13.660 Patienten verwendet. Alle wurden zwischen 1992 und 2014 an der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf (Abteilung für Urologie und Martini Klinik) gewonnen. Diagnostisch wurde zusätzlich zum klassischen Gleason Grading das „quantitative“ Gleason Grading angewendet (Sauter et al. 2016). Follow-up Daten waren von 12.208 Patienten verfügbar. Für die Kaplan-Meier-Analysen wurde der Zeitpunkt eines PSA Rezidivs bei einem post-operativen Wert von 0,2 ng/ml definiert. Von jedem Patienten wurde ein 0,6 mm messendes, zylindrisches Gewebestück in ein TMA Format eingebracht (Mirlacher and Simon 2010).

2.2.2 Immunhistochemie

Auf frisch angefertigte Schnittpräparate wurden ein polyklonaler Kaninchen-Antikörper für PSCA (cat#PA1-38516 von Thermo scientific in 1:150facher Verdünnung) aufgetragen und bei 37° Celsius für 60 Minuten inkubiert. Gebundene Antikörper wurden mit dem EnVision™ Kit (Dako, Glostrup, Dänemark) visualisiert. Das Färbemuster war im Tumorgewebe membranös und zytoplasmatisch. In normalem Prostataepithel fand sich keine Färbung. Eine Anfärbung für PSCA wurde entweder in allen (100%) oder keinen (0%) der Tumorzellen eines TMA-Spots gefunden. Die Färbeintensität wurde deswegen semiquantitativ am Mikroskop an gefärbten Schnittpräparaten bestimmt und in vier Kategorien eingeteilt: negativ, schwach, moderat und stark.

2.2.3 Statistik

Um die Assoziation von PSCA und verschiedenen klinisch-pathologischen Variablen zu untersuchen, wurden Kontingenztabellen angefertigt und mittels Chi-Quadrat-Test ausgewertet. Um eine mögliche Assoziation zwischen PSCA Expression und Tumorproliferation zu finden, wurden Varianzanalysen durchgeführt und der F-Test angewendet. Für das PSA Rezidiv-freie Überleben wurden Kaplan-Meier Kurven angefertigt. Unterschiede hierin wurden mittels Log-Rank-Test untersucht. Mittels Cox-Regressionsanalysen wurde auf Unabhängigkeit und Signifikanz zwischen pathologischen, molekularen und klinischen Variablen untersucht.

2.3 Ergebnisse

Die erzielten Ergebnisse wurden in der dieser Doktorarbeit zugrunde liegenden Publikation unter Verwendung von Abbildungen und Tabellen detailliert beschrieben (Heinrich et al. 2018). Die wichtigsten Ergebnisse sind:

1. Insgesamt waren von 13.660 (100%) „TMA Spots“ 9642 (70,6%) auswertbar. In den restlichen 4023 (29,4%) Fällen befand sich entweder kein oder nicht eindeutig als Tumor zu identifizierendes Gewebe.
2. In Drüsen, Stroma und Entzündungszellen des normalen Prostatagewebes ließ sich kein PSCA nachweisen. Im Tumorgewebe konnte eine positive Reaktion für PSCA in 5581 (53,7%) von 9642 auswertbaren, Tumor-enthaltenden „TMA Spots“ beobachtet werden. Diese setzen sich zusammen aus 22,4% schwach, 24,5% moderat und 6,8% stark gefärbten „TMA Spots“.
3. Eine fehlende PSCA Expression ist mit fortgeschrittenem pathologischem Tumorstadium, hohem Gleasongrad, Lymphknotenmetastasen, hohem präoperativem Gleasongrad und positivem chirurgischem Resektionsrand assoziiert.
4. Zwischen ERG-positiven und ERG-negativen Tumoren unterscheidet sich die PSCA Anfärbbarkeit nicht signifikant.
5. Zwischen Tumoren mit oder ohne eine der untersuchten Deletionen (10q23, 6q15, 5q21 und 3p13) unterscheidet sich die PSCA Expression nicht merklich. Ein schwacher statistischer Zusammenhang fand sich lediglich für die 6q15 (MAP3K7) und 3p13 (FOXP1) Deletion.
6. Es ergab sich keine Assoziation zwischen der PSCA Anfärbbarkeit und dem Proliferationsindex, weder bezogen auf alle Tumoren noch in Subgruppen von ERG-positiven und ERG-negativen oder Gruppen mit identischem Gleasonscore. Die Bewertung erfolgte mittels Ki67-Labeling Index.
7. PSCA-negative Tumoren zeigten ein signifikant kürzeres Intervall bis zum PSA Rezidiv als PSCA-positive Tumoren. Dieses Ergebnis wurde auch in den Subgruppen von ERG-Fusions-positiven bzw. -negativen Karzinomen gefunden.
8. Wenn nur präoperativ verfügbare Prognoseparameter für eine multivariate Analyse herangezogen wurden, erwies sich die PSCA Expression als unabhängiger prognostischer Marker.
9. Die PSCA Expression erwies sich in Tumoren mit identischem „klassischem“ Gleason Grading signifikant prognoserelevant, außer in der Gleason Gruppe $\geq 4+4$.
10. Unter Verwendung des „quantitativen“ Gleasongrades zeigte die PSCA Expression keine weitere Prognoserelevanz.

2.4 Diskussion

Diese Arbeit zeigt, dass eine nachweisbare PSCA Expression signifikant mit einem günstigen Tumorphänotyp und einem reduzierten Risiko eines PSA Rezidivs assoziiert ist. Insgesamt wiesen 54% der Prostatakarzinome unserer Studie eine nachweisbare PSCA Expression via Immunhistochemie auf. Dieser Wert ist vergleichbar mit Ergebnissen früherer Studien, in denen bei 126 Patienten 88% PSCA positive Karzinome gefunden wurden (Reiter et al. 1998) bzw. bei 233 Patienten 48% (Ross et al. 2002). Diese immunhistochemischen Studien lassen sich nur bedingt mit anderen Publikationen vergleichen, welche die PSCA Expression via Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) untersuchten und geringere Werte nachwiesen (Gu et al. 2000; Taeb et al. 2014).

Für das Verständnis der Daten unserer Arbeitsgruppe ist es wichtig zu verstehen, dass immunhistochemische Negativität nicht die Abwesenheit eines Proteins widerspiegelt, sondern aufzeigt, dass ein benötigter Grenzwert zur optischen Detektion nicht erreicht wurde. Dieser Grenzwert hängt stark vom verwendeten Immunhistochemie (IHC) Protokoll ab (Schlomm et al. 2008). Obwohl andere Arbeitsgruppen (Reiter et al. 1998; Ross et al. 2002) andere Antikörper und Protokolle verwendet haben, erreichten sie eine vergleichbare Sensitivität wie bei unserem Ansatz. Das von unserer Arbeitsgruppe verwendete Protokoll ist darauf ausgelegt, den prognostischen Einfluss der „Höhe“ der PSCA Expression zu bestimmen. Es wurden Bedingungen gewählt, die eine Unterscheidung zwischen Tumoren mit hoher und niedriger PSCA Expression zulassen. Da nicht-neoplastisches Prostataepithel typischerweise PSCA negativ ist, wurde davon ausgegangen, dass eine PSCA Hochregulierung in einem Teil der Prostatakarzinome stattfindet. Die Verbindung von tumorspezifischer Hochregulierung eines Proteins und einer verbesserten Prognose ist ungewöhnlich und spricht für eine protektive bzw. Tumor-supprimierende Rolle von PSCA. Die Daten sind dahingehend konkordant mit den Ergebnissen einer britischen Arbeitsgruppe (Larkin et al. 2012), welche ebenso von einer Verbindung zwischen erhöhter PSCA Expression und einem günstigen klinischen Verlauf berichtete. Die Annahme eines Tumor-supprimierenden Effektes hoher PSCA Expressionswerte wird durch Zelllinien Modelle unterstützt. Zum Beispiel zeigen funktionelle Analysen von Gallenblasen- und Magenkrebs-Zelllinien, dass eine experimentelle Überexpression von PSCA die Zellen am Wachstum hindert (Ono et al. 2012; Study Group of Millennium Genome Project for et al. 2008).

Andere Arbeitsgruppen erzielten Resultate, die unseren Befunden widersprechen. Immunhistochemische Untersuchungen mit verschiedenen und teils selbstproduzierten Antikörpern an Kohorten von 40 (Ruan et al. 2012) und 112 (Gu et al. 2000) Prostatakarzinomen berichten von Assoziationen einer erhöhten PSCA Expression mit einem hohen Gleason Grad, fortgeschrittenen Tumorstadium und Kastrations-resistenten Tumorleiden. Zudem wurde in vorangegangenen TMA Studien an 114 (Taeb et al. 2014) und 246 (Han et al. 2004) eingeschlossenen Patienten eine Assoziation zwischen hoher PSCA Expression und hohem Gleason

Grad beschrieben. Die in unserem Institut an fast 10.000 analysierten Prostatakarzinomen ermittelten Werte, konnten die Ergebnisse der oben genannten kleineren Studien nicht bestätigen. Konkordant dazu kam eine weitere TMA Studie aus Korea (Joung et al. 2007) mit 64 untersuchten Prostatakarzinomen zu vergleichbaren Schlussfolgerungen.

Der genaue Mechanismus für eine Tumor-supprimierende Funktion von PSCA ist unbekannt. In unserem Studiendesign wurde die Expression von PSCA mit molekularen Attributen verglichen, welche mit Genominstabilität, chromosomaler Deletion und Tumorzellproliferation assoziiert sind (Minner et al. 2010). Anhand von Zusammenhängen mit besser verstandenen molekularen Veränderungen, können Rückschlüsse auf die Funktion eines Proteins gezogen werden. Zuvor wurde in unserem Institut an der gleichen Kohorte von Prostatakarzinomen gezeigt, dass Marker mit einer bekannten Rolle in der Zellzykluskontrolle wie p16 (Burdelski et al. 2016) und APE1 (Juhnke et al. 2017) signifikant mit einem hohen Ki-67-Labeling Index verknüpft waren. Weiterhin konnte an den untersuchten Tumoren gezeigt werden, dass molekulare Attribute, die mit Genominstabilität verbunden sind, wie MSH6/PMS2/MLH1 (Wilczak et al. 2017), ELAVI (Melling et al. 2016) oder HOOK3 (Melling et al. 2015) signifikant mit dem generellen Vorkommen von chromosomalen Deletionen assoziiert sind. Die weitgehend fehlende Assoziation der PSCA Expression zum Ki67-Labeling Index und zu Deletionen legt nahe, dass die PSCA Expression beim Prostatakrebs keinen relevanten Einfluss auf Zellproliferationskontrolle oder die genomische Integrität hat. Diese Aussage widerspricht einer experimentellen Studie, die einem PSCA Verlust eine beschleunigte Zellproliferation in einer Magenkrebs-Zelllinie zuschreibt (Study Group of Millennium Genome Project for et al. 2008). Dass die PSCA Expression in der vorliegenden Studie unabhängig von der TMPRSS2:ERG Fusion war, lässt schlussfolgern, dass PSCA nicht durch eines der Gene verändert wird, welche in ERG Fusions-positiven Prostatakarzinomen dereguliert werden (Brase et al. 2011; Gupta et al. 2010; Jhavar et al. 2009; Taylor et al. 2010).

In der hier untersuchten Kohorte war die PSCA Expression signifikant mit einer günstigen Patientenprognose assoziiert. Eine mögliche klinische Konsequenz aus diesem Ergebnis wird vor allem durch eine statistische Unabhängigkeit von anderen klassischen Prognosemarkern deutlich, besonders im präoperativen Setting. Jedoch ist der Einfluss auf die Prognose im Vergleich zu etablierten Prognose Markern wie dem Gleason Grad eher klein. Wenn man den traditionellen Gleason Grad verwendet, lässt sich ein zusätzlicher, statistisch signifikanter Einfluss auf die Prognose attestieren. Dieser fällt unter die Signifikanzschwelle, wenn das an unserem Institut entwickelte „quantitative“ Gleason Grading zum Einsatz kommt (Sauter et al. 2016). Diese Feststellung verdeutlicht, welche hohe Hürde molekulare Attribute überwinden müssen, um einen diagnostischen und/oder prognostischen Zugewinn zu erbringen, wenn optimale morphologische Analysen zur Verfügung stehen.

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass der PSCA Expression beim

Prostatakarzinom eine signifikante, in multivariaten Analysen unabhängige, Prognoserelevanz zukommt. Diese Prognoserelevanz ist zu gering um aktuell eine Einführung der PSCA Färbung in die Routinediagnostik von Prostatakarzinomen zu rechtfertigen. Für die Zukunft ist es aber denkbar, dass die PSCA Analyse in Kombination mit anderen Prognose-relevanten Proteinen für einen klinisch nutzbaren „Multiparameter-Immunhistochemie-Cocktail“ verwendet werden könnte.

2.5 Zusammenfassung

Bei meist indolentem Verlauf, bleibt das Prostatakarzinom eines der führenden Krebs-assoziierten Todesursachen der entwickelten Welt. Trotz intensiver Forschung sind die Möglichkeiten zur Differenzierung einer indolenten von einer potentiell lebensbedrohlichen Neoplasie eingeschränkt und neben unserer Arbeitsgruppe in Hamburg richten sich internationale wissenschaftliche Bemühungen auf die Entdeckung und Einordnung molekularer prognostischer Marker für eine präoperative Einschätzung des individuellen Tumorleidens, zusätzlich zu den klinisch bekannten Parametern wie PSA-Wert, Bildgebung und Gleason Grad der Biopsie. Ein solcher potentieller Marker ist PSCA, dessen Verlust in anderen Tumorentitäten (Magen, Gallenblase) mit einer verbesserten Prognose einhergeht. Sein genauer Wirkmechanismus im Prostatakarzinom ist trotz des naheliegenden Namens nicht vollends geklärt. Ziel der Studie war es, die klinische Relevanz der PSCA Expression mit den Verlaufsdaten von Patienten zu analysieren und mit bekannten prognostischen Markern ins Verhältnis zu setzen. Dazu wurden mehr als 10.000 Patienten zwischen 1992 und 2014 radikal prostatektomiert und in unserem Institut diagnostiziert. Mithilfe der TMA Technik war es möglich alle Tumoren zur selben Zeit und unter gleichen Bedingungen immunhistochemisch zu bearbeiten und anschließend auszuwerten.

2.6 Abstract

Prostate Stem Cell Antigen (PSCA) is frequently expressed in prostate cancer but its exact function is unclear. To clarify contradictory findings on the prognostic role of PSCA expression, a tissue microarray containing 13,665 prostate cancers was analyzed by immunohistochemistry. PSCA staining was absent in normal epithelial and stromal cells of the prostate. Membranous and cytoplasmatic PSCA staining was seen in 53.7% of 9,642 interpretable tumors. Staining was weak in 22.4%, moderate in 24.5% and strong in 6.8% of tumors. PSCA expression was associated with favorable pathological and clinical tumor features: Early pathological tumor stage ($p < 0.0001$), low Gleason grade ($p < 0.0001$), absence of lymph node metastasis ($p < 0.0001$), low pre-operative PSA level ($p = 0.0118$), negative surgical margin ($p < 0.0001$) and reduced PSA recurrence ($p < 0.0001$). PSCA expression was an independent predictor of prognosis in multivariate analysis (hazard ratio 0.84, $p < 0.0001$). The absence of statistical relationship to TMPRSS2:ERG fusion status, chromosomal deletion or high tumor cell proliferation argues against a major role of PSCA for regulation of cell cycle or genomic integrity. PSCA expression is linked to favorable prognosis. PSCA measurement is a candidate for inclusion in multi-parametric prognostic prostate cancer tests.

2.7 Literaturverzeichnis

- Amara, N., G. S. Palapattu, M. Schrage, Z. Gu, G. V. Thomas, F. Dorey, J. Said, and R. E. Reiter. 2001. 'Prostate stem cell antigen is overexpressed in human transitional cell carcinoma', *Cancer Research*, 61: 4660-5.
- Argani, P., C. Rosty, R. E. Reiter, R. E. Wilentz, S. R. Murugesan, S. D. Leach, B. Ryu, H. G. Skinner, M. Goggins, E. M. Jaffee, C. J. Yeo, J. L. Cameron, S. E. Kern, and R. H. Hruban. 2001. 'Discovery of new markers of cancer through serial analysis of gene expression: prostate stem cell antigen is overexpressed in pancreatic adenocarcinoma', *Cancer Research*, 61: 4320-4.
- Brase, J. C., M. Johannes, H. Mannsperger, M. Falth, J. Metzger, L. A. Kacprzyk, T. Andrasiuk, S. Gade, M. Meister, H. Sirma, G. Sauter, R. Simon, T. Schlomm, T. Beissbarth, U. Korf, R. Kuner, and H. Sultmann. 2011. 'TMPRSS2-ERG - specific transcriptional modulation is associated with prostate cancer biomarkers and TGF-beta signaling', *BMC Cancer*, 11: 507.
- Burdelski, C., T. Dieckmann, A. Heumann, C. Hube-Magg, M. Kluth, B. Beyer, T. Steuber, R. Pompe, M. Graefen, R. Simon, S. Minner, M. C. Tsourlakis, C. Koop, J. Izbicki, G. Sauter, T. Krech, T. Schlomm, W. Wilczak, and P. Lebok. 2016. 'p16 upregulation is linked to poor prognosis in ERG negative prostate cancer', *Tumour Biol*, 37: 12655-63.
- Cunha, A. C., B. Weigle, A. Kiessling, M. Bachmann, and E. P. Rieber. 2006. 'Tissue-specificity of prostate specific antigens: comparative analysis of transcript levels in prostate and non-prostatic tissues', *Cancer Lett*, 236: 229-38.
- Elsamman, E. M., T. Fukumori, S. Tanimoto, R. Nakanishi, M. Takahashi, K. Toida, and H. O. Kanayama. 2006. 'The expression of prostate stem cell antigen in human clear cell renal cell carcinoma: a quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis', *BJU Int*, 98: 668-73.
- Esfahani, M., N. Ataei, and M. Panjehpour. 2015. 'Biomarkers for evaluation of prostate cancer prognosis', *Asian Pac J Cancer Prev*, 16: 2601-11.
- Fuessel, S., D. Sickert, A. Meye, U. Klenk, U. Schmidt, M. Schmitz, A. K. Rost, B. Weigle, A. Kiessling, and M. P. Wirth. 2003. 'Multiple tumor marker analyses (PSA, hK2, PSCA, trp-p8) in primary prostate cancers using quantitative RT-PCR', *Int J Oncol*, 23: 221-8.
- Gu, Z., G. Thomas, J. Yamashiro, I. P. Shintaku, F. Dorey, A. Raitano, O. N. Witte, J. W. Said, M. Loda, and R. E. Reiter. 2000. 'Prostate stem cell antigen (PSCA) expression increases with high gleason score, advanced stage and bone metastasis in prostate cancer', *Oncogene*, 19: 1288-96.
- Gupta, S., K. Iljin, H. Sara, J. P. Mpindi, T. Mirtti, P. Vainio, J. Rantala, K. Alanen, M. Nees, and O. Kallioniemi. 2010. 'FZD4 as a mediator of ERG oncogene-induced WNT signaling and epithelial-to-mesenchymal transition in human prostate cancer cells', *Cancer Research*, 70: 6735-45.

- Han, K. R., D. B. Seligson, X. Liu, S. Horvath, P. I. Shintaku, G. V. Thomas, J. W. Said, and R. E. Reiter. 2004. 'Prostate stem cell antigen expression is associated with gleason score, seminal vesicle invasion and capsular invasion in prostate cancer', *J Urol*, 171: 1117-21.
- Heinrich, M. C., C. Gobel, M. Kluth, C. Bernreuther, C. Sauer, C. Schroeder, C. Moller-Koop, C. Hube-Magg, P. Lebok, E. Burandt, G. Sauter, R. Simon, H. Huland, M. Graefen, H. Heinzer, T. Schlomm, and A. Heumann. 2018. 'PSCA expression is associated with favorable tumor features and reduced PSA recurrence in operated prostate cancer', *BMC Cancer*, 18: 612.
- Jhavar, S., D. Brewer, S. Edwards, Z. Kote-Jarai, G. Attard, J. Clark, P. Flohr, T. Christmas, A. Thompson, M. Parker, C. Shepherd, U. H. Stenman, T. Marchbank, R. J. Playford, C. Woodhouse, C. Ogden, C. Fisher, G. Kovacs, C. Corbishley, C. Jameson, A. Norman, J. De-Bono, A. Bjartell, R. Eeles, and C. S. Cooper. 2009. 'Integration of ERG gene mapping and gene-expression profiling identifies distinct categories of human prostate cancer', *BJU Int*, 103: 1256-69.
- Joung, J. Y., S. O. Yang, I. G. Jeong, K. S. Han, H. K. Seo, J. Chung, W. S. Park, and K. H. Lee. 2007. 'Reverse transcriptase-polymerase chain reaction and immunohistochemical studies for detection of prostate stem cell antigen expression in prostate cancer: potential value in molecular staging of prostate cancer', *Int J Urol*, 14: 635-43.
- Juhnke, M., A. Heumann, V. Chirico, D. Hoflmayer, A. Menz, A. Hinsch, C. Hube-Magg, M. Kluth, D. S. Lang, C. Moller-Koop, G. Sauter, R. Simon, B. Beyer, R. Pompe, I. Thederan, T. Schlomm, and A. M. Luebke. 2017. 'Apyrimidinic/apurinic endonuclease 1 (APE1/Ref-1) overexpression is an independent prognostic marker in prostate cancer without TMPRSS2:ERG fusion', *Mol Carcinog*, 56: 2135-45.
- Kawaguchi, T., M. Sho, T. Tojo, I. Yamato, T. Nomi, K. Hotta, K. Hamada, Y. Suzaki, S. Sugiura, K. Kushibe, Y. Nakajima, and S. Taniguchi. 2010. 'Clinical significance of prostate stem cell antigen expression in non-small cell lung cancer', *Jpn J Clin Oncol*, 40: 319-26.
- Kim, S. H., W. S. Park, S. H. Kim, B. Park, J. Joo, G. K. Lee, J. Y. Joung, H. K. Seo, J. Chung, and K. H. Lee. 2016. 'Prostate Stem Cell Antigen Expression in Radical Prostatectomy Specimens Predicts Early Biochemical Recurrence in Patients with High Risk Prostate Cancer Receiving Neoadjuvant Hormonal Therapy', *PLoS One*, 11: e0151646.
- Larkin, S. E., S. Holmes, I. A. Cree, T. Walker, V. Basketter, B. Bickers, S. Harris, S. D. Garbis, P. A. Townsend, and C. Aukim-Hastie. 2012. 'Identification of markers of prostate cancer progression using candidate gene expression', *Br J Cancer*, 106: 157-65.
- Melling, N., L. Harutyunyan, C. Hube-Magg, M. Kluth, R. Simon, P. Lebok, S. Minner, M. C. Tsourlakis, C. Koop, M. Graefen, M. Adam, A. Haese, C. Wittmer, S. Steurer, J. Izbic, G. Sauter, W. Wilczak, T. Schlomm, and T. Krech. 2015.

- 'High-Level HOOK3 Expression Is an Independent Predictor of Poor Prognosis Associated with Genomic Instability in Prostate Cancer', *PLoS One*, 10: e0134614.
- Melling, N., B. Taskin, C. Hube-Magg, M. Kluth, S. Minner, C. Koop, T. Grob, M. Graefen, H. Heinzer, M. C. Tsourlakis, J. Izbicki, C. Wittmer, H. Huland, R. Simon, W. Wilczak, G. Sauter, S. Steurer, T. Schlomm, and T. Krech. 2016. 'Cytoplasmic accumulation of ELAVL1 is an independent predictor of biochemical recurrence associated with genomic instability in prostate cancer', *Prostate*, 76: 259-72.
- Minner, S., B. Jessen, L. Stiedenroth, E. Burandt, J. Kollermann, M. Mirlacher, A. Erbersdobler, C. Eichelberg, M. Fisch, T. H. Brummendorf, C. Bokemeyer, R. Simon, T. Steuber, M. Graefen, H. Huland, G. Sauter, and T. Schlomm. 2010. 'Low level HER2 overexpression is associated with rapid tumor cell proliferation and poor prognosis in prostate cancer', *Clin Cancer Res*, 16: 1553-60.
- Mirlacher, M., and R. Simon. 2010. 'Recipient block TMA technique', *Methods in molecular biology*, 664: 37-44.
- Moore, M. L., M. A. Teitell, Y. Kim, T. Watabe, R. E. Reiter, O. N. Witte, and P. Dubey. 2008. 'Deletion of PSCA increases metastasis of TRAMP-induced prostate tumors without altering primary tumor formation', *Prostate*, 68: 139-51.
- Ono, H., N. Hiraoka, Y. S. Lee, S. M. Woo, W. J. Lee, I. J. Choi, A. Saito, K. Yanagihara, Y. Kanai, S. Ohnami, F. Chiwaki, H. Sasaki, H. Sakamoto, T. Yoshida, and N. Saeki. 2012. 'Prostate stem cell antigen, a presumable organ-dependent tumor suppressor gene, is down-regulated in gallbladder carcinogenesis', *Genes Chromosomes Cancer*, 51: 30-41.
- Raff, A. B., A. Gray, and W. M. Kast. 2009. 'Prostate stem cell antigen: a prospective therapeutic and diagnostic target', *Cancer Lett*, 277: 126-32.
- Reiter, R. E., Z. Gu, T. Watabe, G. Thomas, K. Szigeti, E. Davis, M. Wahl, S. Nisitani, J. Yamashiro, M. M. Le Beau, M. Loda, and O. N. Witte. 1998. 'Prostate stem cell antigen: a cell surface marker overexpressed in prostate cancer', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95: 1735-40.
- Ross, S., S. D. Spencer, I. Holcomb, C. Tan, J. Hongo, B. Devaux, L. Rangell, G. A. Keller, P. Schow, R. M. Steeves, R. J. Lutz, G. Frantz, K. Hillan, F. Peale, P. Tobin, D. Eberhard, M. A. Rubin, L. A. Lasky, and H. Koeppen. 2002. 'Prostate stem cell antigen as therapy target: tissue expression and in vivo efficacy of an immunoconjugate', *Cancer Research*, 62: 2546-53.
- Ruan, Y., W. Yu, F. Cheng, X. Zhang, and S. Larre. 2012. 'Detection of prostate stem cell antigen expression in human prostate cancer using quantum-dot-based technology', *Sensors (Basel)*, 12: 5461-70.
- Saeki, N., J. Gu, T. Yoshida, and X. Wu. 2010. 'Prostate stem cell antigen: a Jekyll and Hyde molecule?', *Clin Cancer Res*, 16: 3533-8.

- Sauter, G., S. Steurer, T. S. Clauditz, T. Krech, C. Wittmer, F. Lutz, M. Lennartz, T. Janssen, N. Hakimi, R. Simon, M. von Petersdorff-Campen, F. Jacobsen, K. von Loga, W. Wilczak, S. Minner, M. C. Tsourlakis, V. Chirico, A. Haese, H. Heinzer, B. Beyer, M. Graefen, U. Michl, G. Salomon, T. Steuber, L. H. Budaus, E. Hekeler, J. Malsy-Mink, S. Kutzera, C. Fraune, C. Gobel, H. Huland, and T. Schlomm. 2016. 'Clinical Utility of Quantitative Gleason Grading in Prostate Biopsies and Prostatectomy Specimens', *Eur Urol*, 69: 592-8.
- Schlomm, T., L. Iwers, P. Kirstein, B. Jessen, J. Kollermann, S. Minner, A. Passow-Drolet, M. Mirlacher, K. Milde-Langosch, M. Graefen, A. Haese, T. Steuber, R. Simon, H. Huland, G. Sauter, and A. Erbersdobler. 2008. 'Clinical significance of p53 alterations in surgically treated prostate cancers', *Modern pathology*, 21: 1371-79.
- Schmidt, U., S. Fuessel, R. Koch, G. B. Baretton, A. Lohse, S. Tomasetti, S. Unversucht, M. Froehner, M. P. Wirth, and A. Meye. 2006. 'Quantitative multi-gene expression profiling of primary prostate cancer', *Prostate*, 66: 1521-34.
- Study Group of Millennium Genome Project for, Cancer, H. Sakamoto, K. Yoshimura, N. Saeki, H. Katai, T. Shimoda, Y. Matsuno, D. Saito, H. Sugimura, F. Tanioka, S. Kato, N. Matsukura, N. Matsuda, T. Nakamura, I. Hyodo, T. Nishina, W. Yasui, H. Hirose, M. Hayashi, E. Toshiro, S. Ohnami, A. Sekine, Y. Sato, H. Totsuka, M. Ando, R. Takemura, Y. Takahashi, M. Ohdaira, K. Aoki, I. Honmyo, S. Chiku, K. Aoyagi, H. Sasaki, S. Ohnami, K. Yanagihara, K. A. Yoon, M. C. Kook, Y. S. Lee, S. R. Park, C. G. Kim, I. J. Choi, T. Yoshida, Y. Nakamura, and S. Hirohashi. 2008. 'Genetic variation in PSCA is associated with susceptibility to diffuse-type gastric cancer', *Nat Genet*, 40: 730-40.
- Taeb, J., M. Asgari, M. Abolhasani, M. M. Farajollahi, and Z. Madjd. 2014. 'Expression of prostate stem cell antigen (PSCA) in prostate cancer: a tissue microarray study of Iranian patients', *Pathol Res Pract*, 210: 18-23.
- Taylor, B. S., N. Schultz, H. Hieronymus, A. Gopalan, Y. Xiao, B. S. Carver, V. K. Arora, P. Kaushik, E. Cerami, B. Reva, Y. Antipin, N. Mitsiades, T. Landers, I. Dolgalev, J. E. Major, M. Wilson, N. D. Socci, A. E. Lash, A. Heguy, J. A. Eastham, H. I. Scher, V. E. Reuter, P. T. Scardino, C. Sander, C. L. Sawyers, and W. L. Gerald. 2010. 'Integrative genomic profiling of human prostate cancer', *Cancer Cell*, 18: 11-22.
- Torre, L. A., F. Bray, R. L. Siegel, J. Ferlay, J. Lortet-Tieulent, and A. Jemal. 2015. 'Global cancer statistics, 2012', *CA Cancer J Clin*, 65: 87-108.
- Tricoli, J. V., M. Schoenfeldt, and B. A. Conley. 2004. 'Detection of prostate cancer and predicting progression: current and future diagnostic markers', *Clin Cancer Res*, 10: 3943-53.
- Wang, M., J. Bai, Y. Tan, S. Wang, Y. Tian, W. Gong, Y. Zhou, Y. Gao, J. Zhou, and Z. Zhang. 2011. 'Genetic variant in PSCA predicts survival of diffuse-type gastric cancer in a Chinese population', *Int J Cancer*, 129: 1207-13.

- Wilczak, W., S. Rashed, C. Hube-Magg, M. Kluth, R. Simon, F. Buscheck, T. S. Clauditz, K. Grupp, S. Minner, M. C. Tsourlakis, C. Moller-Koop, M. Graefen, M. Adam, A. Haese, C. Wittmer, G. Sauter, J. R. Izbicki, H. Huland, T. Schlomm, S. Steurer, T. Krech, and P. Lebok. 2017. 'Up-regulation of mismatch repair genes MSH6, PMS2 and MLH1 parallels development of genetic instability and is linked to tumor aggressiveness and early PSA recurrence in prostate cancer', *Carcinogenesis*, 38: 19-27.
- Zhang, L. Y., J. L. Wu, H. B. Qiu, S. S. Dong, Y. H. Zhu, V. H. Lee, Y. R. Qin, Y. Li, J. Chen, H. B. Liu, J. Bi, S. Ma, X. Y. Guan, and L. Fu. 2016. 'PSCA acts as a tumor suppressor by facilitating the nuclear translocation of RB1CC1 in esophageal squamous cell carcinoma', *Carcinogenesis*, 37: 320-32.
- Zhigang, Z., and S. Wenlv. 2006. 'Prostate stem cell antigen (PSCA) expression in human prostate cancer tissues: implications for prostate carcinogenesis and progression of prostate cancer', *Jpn J Clin Oncol*, 36: 121.

3 Erklärung des Eigenanteils

Eigenanteil

- Auswahl des Proteins PSCA
- Literaturrecherche zum Protein PSCA
- Auswertung der Ergebnisse (IHC-Analysen und Dateninterpretation)
- Mitarbeit an der Verfassung des Manuskripts

Anteil der Co-Autoren

- Ausführung der IHC-Analysen: Cosima Göbel, Asmus Heumann, Cornelia Schröder, Charlotte Sauer
- Mitarbeit an der Verfassung des Manuskripts: Cosima Göbel, Eike Burandt, Patrick Lebok, Christian Bernreuther, Ronald Simon, Martina Kluth
- Datenakquisition, Datenbankgenerierung und statistische Analysen: Claudia Hube-Magg, Eike Burandt, Patrick Lebok, Ronald Simon
- Studien-Design und -Koordination sowie fachliche Revision des Manuskripts: Ronald Simon, Guido Sauter, Hartwig Huland, Markus Graefen, Thorsten Schlomm, Asmus Heumann

4 Danksagung

Prof. Guido Sauter, meinem Chef, für die ausdauernde Bemängelung meiner „Titellosigkeit“ und den zahlreichen Chancen und Möglichkeiten meiner umfassenden pathologischen Ausbildung in seinem Institut und darüber hinaus, sowie einem zeitlichen Rahmen zur Realisierung dieser Arbeit.

Ronald Simon, Martina Kluth und Claudia Hube-Magg für Ihre andauernde Begleitung durch die Hochs und Tiefs der technischen, statistischen und biologischen Hintergründe der Dissertation und des dazu gehörigen Manuskripts.

Meiner Familie für ihre liebevolle Unterstützung und insbesondere meinem Vater für telefonisches Krisenmanagement, egal um welche Tages- oder Nachtzeit. Ferner meinem Onkel, der mich zum Medizinstudium inspirierte und mich hindurch unterstützte.

5 Curriculum vitae

Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

6 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich diese Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Es wurden keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und die Seite des benutzten Werkes kenntlichgemacht gemacht.

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

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

Unterschrift:

.....