

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Pathologie

Prof. Dr. med. Sauter

Die Sensitivität, Spezifität und Prognoserelevanz der PSA- Immunhistochemie in Prostatakarzinomen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Greta Sökeland
aus Heidelberg

Hamburg 2020

(wird von der Medizinischen Fakultät ausgefüllt)

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 08.03.2021**

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

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Alexander Haese

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

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	4
Tabellenverzeichnis	6
1 Einleitung	7
2 Material und Methoden.....	14
2.1 Tissue Microarray Methode	14
2.1.1 Prostata Prognose Tissue Microarray.....	15
2.1.2 Multitumor Tissue Microarray.....	16
2.1.3 Tissue Microarray mit fortgeschrittenen Prostatakarzinomen.....	19
2.2 Immunhistochemie.....	19
2.3 Statistik	19
3 Ergebnisse	22
3.1 Prognose Untersuchung	22
3.1.1 Hohe PSA-Antikörper Konzentration (1:1'350)	22
3.1.2 Niedrige PSA-Antikörper Konzentration (1:36'450)	36
3.2 Multitumor Tissue Microarray (und Tissue Microarray mit fortgeschrittenen Prostatakarzinomen).....	49
3.2.1 PSA-Immunhistochemie (1:1'350)	49
3.2.2 PSA-Immunhistochemie (1:36'450)	51
4 Diskussion.....	59
5 Zusammenfassung	65
6 Abkürzungsverzeichnis	68
7 Literaturverzeichnis.....	70
8 Danksagung	81
9 Lebenslauf.....	82
10 Eidesstattliche Erklärung.....	83

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.	TMA-Layout: Aufbau des Gewebeschnittes auf dem Objektträger.....	14
Abbildung 2.	Prostatakarzinom Gleason Grad 3+3 (1:1'350).....	23
Abbildung 3.	Prostatakarzinom Gleason Grad 4+3 (1:1'350).....	23
Abbildung 4.	Prostatakarzinom Gleason Grad 4+5 (1:1'350).....	24
Abbildung 5.	PSA-Expression und biochemisches Rezidiv (1:1'350).....	24
Abbildung 6.	PSA-Expression und ERG-Status (IHC, FISH) (1:1'350).....	26
Abbildung 7.	PSA-Expression und biochemisches Rezidiv in ERG-negativen Karzinomen (1:1'350).....	28
Abbildung 8.	PSA-Expression und biochemisches Rezidiv in ERG-positiven Karzinomen (1:1'350).....	30
Abbildung 9.	PSA-IHC und Deletionen in a) allen Tumoren, b) ERG-negativen und c) ERG-positiven Tumoren (1:1'350).....	32
Abbildung 10.	PSA-Expression und biochemisches Rezidiv in PTEN-deletierten Tumoren (1:1'350).....	33
Abbildung 11.	PSA-Expression und biochemisches Rezidiv in a) klassischen Gleason Grad Gruppen, b-h) quantitativen Gleason Grad Gruppen (1:1'350).....	34
Abbildung 12.	Prostatakarzinom Gleason Grad 3+3 (1:36'450).....	36
Abbildung 13.	Prostatakarzinom Gleason Grad 4+3 (1:36'450).....	37
Abbildung 14.	Prostatakarzinom Gleason Grad 4+5 (1:36'450).....	37
Abbildung 15.	PSA-Expression und biochemisches Rezidiv (1:36'450).....	39
Abbildung 16.	PSA-Expression und ERG-Status (IHC, FISH) (1:36'450).....	40
Abbildung 17.	PSA-Expression und biochemisches Rezidiv in ERG-negativen Karzinomen (1:36'450).....	40
Abbildung 18.	PSA-Expression und biochemisches Rezidiv in ERG-positiven Karzinomen (1:36'450).....	42
Abbildung 19.	PSA-IHC und Deletionen in a) allen Tumoren, b) ERG-negativen und c) ERG-positiven Tumoren (1:36'450).....	45
Abbildung 20.	PSA-Expression und biochemisches Rezidiv in PTEN-deletierten Tumoren (1:36'450).....	46
Abbildung 21.	PSA-Expression und biochemisches Rezidiv in a) klassische Gleason Grad Gruppen, b-h) quantitative Gleason Grad Gruppen.....	47
Abbildung 22.	Kleinzelliges Prostatakarzinom.....	51
Abbildung 23.	Endometrioides Ovarialkarzinom.....	52
Abbildung 24.	Adenokarzinom der Lunge.....	53

Abbildung 25.	Endometrioides Ovarialkarzinom	53
Abbildung 26.	Seröses Ovarialkarzinom.....	54
Abbildung 27.	Plattenepithelkarzinom der Vagina	54
Abbildung 28.	Osteosarkom	55
Abbildung 29.	Malignes Mesotheliom	55
Abbildung 30.	Papilläre Nierenzellkarzinome	56
Abbildung 31.	Hormonrefraktäres Prostatakarzinom Gleason Grad 4+4	57
Abbildung 32.	Hormonrefraktäres Prostatakarzinom Gleason Grad 5+4	57
Abbildung 33.	Hormonrefraktäres Prostatakarzinom Gleason Grad 5+4	58

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.	Repräsentativer Ausschnitt eines TMA-Datenfiles.	15
Tabelle 2.	Vorliegende klinische und pathologische Daten	16
Tabelle 3.	Zusammensetzung des Multitumor Tissue Microarrays.	18
Tabelle 4.	Zusammenhang zwischen der PSA-Expression und dem Tumorphänotyp (1:1'350).....	25
Tabelle 5.	PSA-Expression und Phänotyp in ERG-negativen Karzinomen (1:1'350).....	27
Tabelle 6.	PSA-Expression und Phänotyp in ERG-positiven Karzinomen (1:1'350).....	29
Tabelle 7.	Multivariate Analyse (1:1'350).	31
Tabelle 8.	PSA-Expression und Ki-67-Labeling Index (1:1'350).	35
Tabelle 9.	PSA-Expression und Tumorphänotyp (1:36'450).	38
Tabelle 10.	PSA-Expression und Phänotyp in ERG-negativen Karzinomen (1:36'450).....	41
Tabelle 11.	PSA-Expression und Phänotyp in ERG-positiven Karzinomen (1:36'450).....	43
Tabelle 12.	Multivariate Analyse (1:36'450).	44
Tabelle 13.	PSA-Expression und Ki-67-Labeling Index (1:36'450).	48
Tabelle 14.	PSA-Immunhistochemie in Prostata- und anderen Karzinomen.	50

1 Einleitung

Das Prostatakarzinom ist der häufigste Tumor bei Männern. Etwa 50% der 50-Jährigen und 80% aller 80-Jährigen tragen in ihrer Prostata mindestens ein Karzinom (Grozescu and Popa, 2017). Einer von acht Männern (11,9%) erkrankt an einem Prostatakarzinom und 1 von 31 verstirbt an den Konsequenzen dieser Krebserkrankung (Robert Koch Institut, 2017). Zwar sind die meisten Prostatakarzinome nicht klinisch relevant und bleiben im Laufe des gesamten Lebens symptomlos, dennoch versterben allein in Deutschland ca. 13'900 Männer jährlich (2015) an den Folgen eines zu spät entdeckten und zu spät behandelten Prostatakarzinoms (Robert Koch Institut, 2017).

Die Verdachtsdiagnose Prostatakarzinom wird meist auf Grund eines erhöhten Serum-PSA-Wertes gestellt. Nachdem Studien aus den frühen 90er Jahren zeigten, dass die serologische Messung des Prostata spezifischen Antigens (PSA) zur Identifikation von Prostatakarzinomen verwendet werden kann (Catalona *et al.*, 1991; Balk, Ko und Bublely, 2003), hat sich die regelmäßige Messung des Serum-PSA-Wertes bei Männern über 50 Jahren in Deutschland und in vielen anderen westlichen Ländern weitgehend etabliert. Im Jahr 2017 gab die U.S. Preventive Services Task Force ein Update der Leitlinie für die Früherkennung von Prostatakrebs heraus. Es wird empfohlen, Männer zwischen 55 und 69 Jahren über Vor- und Nachteile einer Früherkennung zu informieren und eine Testung anzubieten (Eastham, 2017). Allerdings gibt es auch kritische Stimmen zur routinemäßigen Serum-PSA-Kontrolle. Nach der Einführung der Testung (in den Vereinigten Staaten von Amerika, 1986) erreichte die Rate an Prostatakarzinom Diagnosen einen Höchststand (Hodson, 2015). Es wurden Stimmen laut, dass mit dem Serum-PSA-Test vor allem eine Überdiagnostik und Übertherapie induziert würde. Tatsächlich wurden viele Prostatakarzinome operiert, welche möglicherweise keiner Art der Behandlung bedurft hätten (Graefen *et al.*, 2014). Eine randomisierte europäische Studie zur Früherkennung und der Prostatakarzinom Mortalität schätzte die Überdiagnostik (die Diagnose in Männern, die im Laufe ihres Lebens keinerlei Symptome entwickelt hätte) auf 50% in der Früherkennungs-Gruppe (Schröder *et al.*, 2009). Obwohl die Ergebnisse der Studie einen Rückgang der Prostatakarzinom assoziierten Mortalität zeigten, darf die miteinhergehende Überdiagnostik, Übertherapie und der damit zusammenhängende Verlust an Lebensqualität nicht vergessen werden (Schröder *et al.*, 2009). Nichtsdestotrotz spricht die markante Abnahme der Prostatakarzinomsterblichkeit seit den 90er-Jahren ganz eindeutig für die Sinnhaftigkeit der PSA-Früherkennung (Graefen *et al.*, 2014).

Die Prostatakarzinom Diagnose wird bei Patienten mit erhöhtem PSA-Werten (typischerweise >4ng/ml) oder bei verdächtiger Digital Rektaler Untersuchung (DRU) durch

eine transrektal Ultraschall-gestützte (TRUS) Prostatabiopsie gesichert (Catalona *et al.*, 1994). Um die Sensitivität der Biopsie zu erhöhen, wurden die anfänglich entnommenen 6 Stenzen graduell bis auf 12 (bzw. gegebenenfalls auf bis zu 24) gesteigert (Tanaka *et al.*, 2015). Die interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms (Version 5.1, Mai 2019) empfiehlt die Entnahme von 10-12 Gewebezylindern (Empfehlungsgrad A, level of evidence 1++) (Leitlinienprogramm Onkologie, 2019). Zusätzlich wird in einigen Zentren eine Magnet Resonanz Tomografie (MRT) / Ultraschall (US) fusionierte Biopsie durchgeführt (Maxeiner *et al.*, 2015). Wenn bei einem Mann die Prostatakarzinom Diagnose gestellt wird, müssen die behandelnden Ärzte zusammen mit dem Patienten entscheiden (partizipative Entscheidungsfindung), ob eine Therapie notwendig ist oder nicht. Das Prostatakarzinom wird in Gleason Gruppen eingeteilt. Die Einteilung nach Gleason beruht auf einer Studie (1959-1964) der „Veteran’s Affairs Cooperative Research Group“. Dr. Donald Gleason entwickelte eine histopathologische Einteilung des Adenokarzinoms der Prostata anhand der Morphologie der prostatistischen Drüsen (Gleason and Mellinger, 1974; Gordetsky and Epstein, 2016). Es werden fünf verschiedenen Grade unterschieden. Je höher der Gleason Grad, desto höher der Grad der Entdifferenzierung. Der endgültige Gleason Score berechnet sich durch die Addition des häufigsten und schlechtesten Gleason Grades (Prostatastanzbiopsie) oder des häufigsten und zweithäufigsten Gleason Grad im Prostatektomiepräparat (Epstein *et al.*, 2005; Gordetsky and Epstein, 2016). Bei niedrigem Gleason-Score (Gleason Grad ≤ 6) und niedrigem Serum-PSA-Werten (≤ 10 ng/ml), sowie bei geringer Tumorausdehnung in den Prostata-Stanzen, kann eine sogenannte Aktive Überwachung (active surveillance) initiiert werden (niedrige Risikogruppe (Thompson *et al.*, 2007)) (Leitlinienprogramm Onkologie, 2019). Dabei wird der Patient in den ersten beiden Jahren durch PSA-Testung und DRU alle drei Monate regelmäßig (wenn stabil, danach 6-monatlich) kontrolliert und alle 12-18 Monate wird eine Kontroll-Biopsie entnommen, ohne dass eine aktive Therapie durchgeführt wird (Leitlinienprogramm Onkologie, 2019). Erst im Falle einer Tumorprogression (z.B. markanter PSA Anstieg, Zunahme des Gleason-Grades in der Biopsie) würde dann, der Beginn einer aktiven Therapie neu evaluiert werden (Warlick *et al.*, 2006).

Die Therapie der Wahl besteht bei lokal begrenztem Prostatakarzinom aller Risikogruppen in der Regel in der radikalen Prostatektomie, alternativ kann eine primäre Radiotherapie vorgenommen werden (Donovan *et al.*, 2016; Leitlinienprogramm Onkologie, 2019). Auch hier wird mit dem Patienten eine individuelle Entscheidung in Abhängigkeit vom Risikoprofil, den patientenabhängigen Faktoren (z.B. Allgemeinzustand, Alter) und dem Patientenwunsch getroffen. Zusätzlich kann bei lokal begrenzten Prostatakarzinomen mit niedrigem Risikoprofil eine LDR(low dose rate)-Brachytherapie und bei mittlerem bis hohem

Risiko eine HDR(high dose rate)-Brachytherapie, in Kombination mit perkutaner Bestrahlung, erwogen werden (Kupelian *et al.*, 2004; Leitlinienprogramm Onkologie, 2019). Da die Prostata die einzige Quelle des Serum-PSA darstellt, kann die Serum-PSA-Messung zum Monitoring der Wirksamkeit der lokalen Therapie (radikale Prostatektomie oder lokale primäre Radiotherapie) verwendet werden (Balk, Ko und Bublely, 2003). Die meisten Männer sind nach radikaler Prostatektomie (oder primärer Radiotherapie) geheilt und bedürfen keiner weiteren Behandlung. Bei diesen Patienten sinkt der Serum-PSA-Wert postoperativ innerhalb von 4 Wochen auf nicht-nachweisbare Werte (0ng/ml) (Partin und Oesterling, 1994; Skove *et al.*, 2017; Balk, Ko und Bublely, 2003). Bei einem Teil der Patienten kommt es im Verlauf der Erkrankung zu einem Rezidiv, welches in der Regel durch den Nachweis eines Wiederanstiegs des PSA-Wertes im Serum (in 92% der Patienten (Kuriyama *et al.*, 1981; Killian *et al.*, 1985)) diagnostiziert wird (Tilki *et al.*, 2015; Skove *et al.*, 2017). Kommt es beim Patienten zum PSA-Rezidiv liegt entweder ein Lokalrezidiv vor, dies insbesondere dann, wenn der Tumor nicht vollständig entfernt worden war, oder es bestehen Metastasen (Partin und Oesterling, 1994). Um zwischen lokalem und Fernrezidiv zu unterscheiden, ist es wichtig neben dem Gleason Grad und dem Resektionsstatus (R-Status), auch die Zeitspanne, in der es zum Wiederanstieg des Serum PSA kommt, zu evaluieren (Balk, Ko und Bublely, 2003). Im Falle eines Anstiegs in den ersten 2 Jahren nach Prostatektomie, wird auf Grund von retrospektiven Daten, eher von einer Fernmetastasierung ausgegangen (Pound *et al.*, 1997). Generell gilt, dass ein schneller PSA-Anstieg (>2ng/ml/Jahr), ein PSA-Rückfall <3 Jahren und eine postoperative PSA-Verdoppelungszeit von <3 Monaten eher für eine Metastasierung sprechen und den Patienten einem erhöhten Prostatakarzinom spezifischen Mortalitätsrisiko aussetzen (Lee und Amico, 2005). Eine langsamere PSA-Anstiegs-Geschwindigkeit nach einem Intervall von >3 Jahren und eine verlängerte postoperative PSA-Verdoppelungszeit sprechen damit eher für ein Lokalrezidiv und machen diesen Patienten zu einem optimalen Kandidaten für eine Strahlentherapie des Rezidivs (Lee und Amico, 2005; Jerezek-fossa und Orecchia, 2007). Nach alleiniger Strahlentherapie kann ein biochemisches Rezidiv bioptisch gesichert werden, nach RPE ist dies nicht erforderlich (Leitlinienprogramm Onkologie, 2019). Bildgebende Verfahren wie Skelettszintigraphie, CT, PET-CT (beispielsweise PSMA (Prostata-spezifisches Membranantigen)-PET) und MRT können für die Diagnostik einer Metastasierung von Hilfe sein (Sartor and De Bono, 2018). Sind die gesamten klinischen Befunde mit einem Lokalrezidiv vereinbar, wird (bei noch nicht bestrahlten Patienten) eine lokale perkutane Radiotherapie durchgeführt (Jerezek-fossa and Orecchia, 2007; Leitlinienprogramm Onkologie, 2019). Dies ist bei Patienten, welche tatsächlich nur einen Lokalbefund hatten, kurativ. Das Serum-PSA geht dann wieder auf 0ng/ml. Im Falle einer Metastasierung kommt es nicht zur Senkung des Serum-PSA auf nicht nachweisbare

Werte, da die Metastasen nicht im Einflussbereich einer lokalen Bestrahlung liegen. Beim metastasierten Prostatakarzinom bleiben den Patienten verschiedene systemische Therapieoptionen mit meist palliativem Charakter. Bei dem hormonsensitiven, fortgeschrittenen Prostatakarzinom wird eine kombinierte Hormontherapie (Chemotherapie und Androgendeprivation) empfohlen (Thompson *et al.*, 2007; Leitlinienprogramm Onkologie, 2019). Das therapeutische Vorgehen bei androgen-unabhängigen oder kastrationsresistenten Prostatakarzinomen muss interdisziplinär beraten werden und die Therapieentscheidungen werden in Abhängigkeit von Patientenpräferenzen, Nebenwirkungsprofil und Begleiterkrankungen getroffen (Leitlinienprogramm Onkologie, 2019).

Die neoplastischen Zellen des Prostatakarzinoms weisen ein breites Spektrum an genetischen Aberrationen auf. Häufig handelt es sich um Veränderungen, die in Androgen-gesteuerten Signalwegen mitwirken. Diese Alterationen umfassen Abweichungen des Androgen-Rezeptors und verschiedener interagierender Proteine, die die Aktivität des Rezeptors modulieren können (Barbieri *et al.*, 2013). Zusätzlich sind verschiedene genomische rearrangements (Umlagerungen) in der Prostatakarzinom-Karzinogenese bekannt. Dabei fusionieren Androgen-regulierte Gene, beispielsweise mit Genen der ETS(E26 transformation specific)-Familie von onkogenen Transkriptionsfaktoren (Tomlins *et al.*, 2005). Häufig handelt es sich dabei um Fusionen des TMPRSS2 Gens und des Transkriptionsfaktors ERG. Verschiedene Studien haben die prognostische Relevanz der TMPRSS2:ERG Fusion untersucht, jedoch mit sehr widersprüchlichen Ergebnissen im Hinblick auf eine Korrelation mit der Tumoraggressivität (Tomlins *et al.*, 2009; Barbieri *et al.*, 2013). Unter anderem berichten Steurer *et al.* von einer Assoziation der Fusion mit niedrig-gradigen Prostatakarzinomen in jungen Patienten (Steurer *et al.*, 2014). Weiter gehören auch andere molekulare Veränderung, wie beispielsweise 5q21 (Kluth *et al.*, 2019), 6q15 (Kluth *et al.*, 2016), 10q23 (PTEN) (Phin, Moore und Cotter, 2013; Lotan *et al.*, 2017) und 3p13 (Kluth *et al.*, 2018) Deletionen zur Bandbreite der molekularen Veränderungen in Prostatakarzinomen.

Das Prostata-spezifische Antigen (PSA) ist die wichtigste Komponente bei der Diagnostik und dem Monitoring der Therapie des Prostatakarzinoms. PSA ist eine Prostata-spezifische Serin-Protease (humanes kallikrein 3 (hK3)) und gehört zur Familie der Kallikreine, die auf Chromosom 19q13.4 lokalisiert sind (Bhoola, Figueroa und Worthy, 1992; Yousef und Diamandis, 2001). PSA wird durch das Gen KLK 3 kodiert, wobei die Transkription dieses Genes einer Androgenen-Regulation unterliegt (Balk, Ko und Bubley, 2003). Das PSA wird von den luminalen sekretorischen Epithelialzellen der prostatistischen Drüsen gebildet und direkt in das Lumen sezerniert, wobei über die Basalzellen und die Basalmembran geringe

Mengen an PSA in das Serum gelangen (Balk, Ko und Bublely, 2003). Dabei spricht keine Funktion des Proteins dafür, dass es möglicherweise gezielt, ins Serum abgegeben wird. Die biologische Funktion des PSA, als ein Hauptbestandteil der Samenflüssigkeit, besteht in der Spaltung von Semenogelinen. Dies verflüssigt den Samen beim Mann (Balk, Ko und Bublely, 2003). Die Menge des Serum-PSA ist im Wesentlichen proportional zur Menge des in einem Menschen vorhandenen Prostataepithels. Dementsprechend steigt der Serum-PSA-Wert im Laufe des Lebens bei Männern geringgradig an, da auch die Prostata durch die „physiologische“ Prostatahyperplasie mit zunehmendem Alter etwas wächst (Vuichoud und Loughlin, 2015).

Wie oben ausgeführt, ist die serologische PSA Messung eine wichtige Komponente bei allen diagnostisch-therapeutischen Entscheidungen in Bezug auf die Prostata. Bei Patienten ohne bekanntes Prostatakarzinom, dient die Serum-PSA-Wert Bestimmung zur Indikationsstellung, ob eine Prostatabiopsie erfolgen sollte. Ist ein Prostatakarzinom bei einem Mann diagnostiziert, ist der Serum-PSA Wert für die Einschätzung der Tumoraggressivität mitentscheidend (Balk, Ko und Bublely, 2003). Hierbei korreliert auch die PSA-Dichte (Serum-PSA-Wert geteilt durch das Volumen der Prostata) mit der Tumoraggressivität (Kundu *et al.*, 2007). Ist der Serum-PSA-Wert >10ng/ml, liegt gemäß aktuellen Leitlinien bereits mindestens ein Karzinom mit mittlerem (intermediärem) Risiko vor, bei dem eine abwartende Haltung (active surveillance) nicht mehr durchgeführt werden sollte (Leitlinienprogramm Onkologie, 2019). Ist ein Prostatakarzinom diagnostiziert, wird bei Patienten wahrscheinlich lebenslang der Serum-PSA-Wert gemessen. Dies unabhängig davon, ob eine Therapie erfolgte. Wenn keine Therapie erfolgt, ist die PSA-Messung notwendig zur Klärung der Frage, ob eine mögliche Progression vorliegt. Postoperativ dient die regelmäßige PSA-Messung dem Nachweis oder Ausschluss eines Rezidivs bzw. einer Metastasierung. Zusätzlich dient die regelmäßige serologische PSA-Messung der Erfolgskontrolle aller weiteren therapeutischen Maßnahmen, wie eine Radiotherapie oder eine systemische Chemotherapie (Leitlinienprogramm Onkologie, 2019).

Die immunhistochemische Darstellung von PSA spielt zudem eine Rolle in der Pathologie. Diese kommt vor allem bei der Untersuchung von Tumorgewebe bei unbekanntem Primarius. Besonders häufig wird die PSA-Immunhistochemie bei Lymphknoten- oder Knochenmetastasen angewendet. Der Nachweis einer PSA Expression in diesen Gewebefragmenten gilt dann als beweisend für das Vorliegen eines metastasierten Prostatakarzinoms (Bernacki *et al.*, 2014; Stelow und Yaziji, 2018). Wird die PSA Immunhistochemie mit der für PSAP (Prostata-spezifische saure Phosphatase) verwendet, werden für die Identifikation von Prostatakarzinom-Metastasen Sensitivitäten von bis zu 95% erreicht (Stelow und Yaziji, 2018). Weiterhin kann zusätzlich die

immunhistochemische Darstellung von PSMA für derartige Fragestellungen zur Hilfe genommen werden (Bravaccini *et al.*, 2018). Die PSA-Immunhistochemie eine wichtiges Mittel für die Differenzierung von Prostata-, Urothel- und Kolonkarzinomen dar (Epstein, Egevad und Humphrey, 2014). Dabei muss beachtet werden, dass nicht wenige der hochgradigen Prostatakarzinome PSA-negativ sind (Epstein, Egevad und Humphrey, 2014). Sie sind derart entdifferenziert, dass sie weniger oder kein PSA mehr exprimieren (Gallee *et al.*, 1990). In einer Studie von Goldstein waren 99% der 75 Prostatakarzinomen mit einem Gleason Grad von 6 oder 7 PSA-positiv, demgegenüber waren nur noch 58,7% der Karzinome mit einem Gleason Grad von 8, 9 oder 10 PSA-positiv (Goldstein, 2002). Daneben haben viele weitere Studien gezeigt, dass Prostatakarzinome mit einer geringeren PSA-Expression eher einen höheren Gleason Score, einen niedrigeren Grad der Differenzierung und extraprostatiches Wachstum aufweisen, als Tumoren mit ausgeprägter PSA Expression (Abrahamsson *et al.*, 1988; Gallee *et al.*, 1990; Varma, Morgan und Jasani, 2002; Erbersdobler *et al.*, 2009). Außerdem deuten die Ergebnisse aus neueren Studien darauf hin, dass der Ausprägungsgrad der PSA-Expression in Prostatakarzinomen eine prognostische Bedeutung haben könnte (Erbersdobler *et al.*, 2009).

Die Immunhistochemie ist eine in der Pathologie generell weitgehend etablierte Untersuchungstechnik. Die Methode erlaubt den Nachweis spezifischer Proteine an Gewebeschnitten. Der Nachweis bestimmter Proteine ist ein essentieller Bestandteil der histologischen Diagnostik. Am Institut für Pathologie des UKE werden beispielsweise, mehr als 200 verschiedene Antikörper für die Routinediagnostik eingesetzt. Trotz der weiten Verbreitung der Immunhistochemie handelt es sich bei diesem Verfahren um eine erstaunlich wenig standardisierte Methode. Für interessante Proteine werden von zahlreichen Anbietern viele verschiedene Antikörper angeboten. Hat man sich für einen bestimmten Antikörper entschieden, ist das Vorgehen, in der Routinediagnostik oder der Durchführung eines wissenschaftlichen Projektes prinzipiell identisch. Der Antikörper wird an einer kleinen Anzahl von Geweben getestet. „Gefällt“ dem verantwortlichen Menschen die Färbung, dann wird die Färbung so in die Routine aufgenommen oder es wird eine Studie durchgeführt. Angesichts der Tatsache, dass die meisten immunhistochemischen Studien darauf basieren, dass ein Forscher sich aus subjektiven Gründen für ein bestimmtes Protokoll entschieden hat, erstaunt es nicht, dass sich erhebliche Diskrepanzen in ihren Ergebnissen finden.

Hintergrund der vorliegenden Arbeit war die Absicht, einen neu hergestellten PSA Antikörper auf seine Tauglichkeit für die Diagnostik zu testen. Dabei ging es darum, einerseits die diagnostische Qualität des Antikörpers, d.h. seine Sensitivität und Spezifität

für den Nachweis von Prostatakarzinomen, zu testen und die mögliche prognostische Relevanz zu eruieren. Um diese komplexe Fragestellung bearbeiten zu können, wurden zwei verschiedene Tissue Microarrays (TMA) miteinander kombiniert, die bisher nicht in einer gemeinsamen Studie verwendet worden waren. Zur Klärung der Sensitivität und Spezifität der Prostatakarzinom Diagnostik wurde ein Multitumor-Array verwendet. Dieser enthielt mehr als 3'500 Gewebeprobe von 84 verschiedenen Tumortypen und -subtypen. Zur Klärung der Prognoserelevanz der immunhistochemischen PSA-Färbung wurde zusätzlich ein großer Prostatakarzinom-TMA verwendet. Dieser bestand aus Gewebeprobe von mehr als 17'000 Patienten, von denen auch Verlaufsdaten vorlagen.

Ziel der Untersuchung war die Identifikation eines „optimalen“ Protokolls für die sensitive und spezifische Diagnose eines Prostatakarzinoms und bei dem gleichzeitig eine prognostische Aussage zu einem diagnostizierten Prostatakarzinom getroffen werden kann. Um dieses Ziel zu erreichen, wurde in diesem Projekt die gesamte Studienpopulation von mehr als 20'000 Tumoren mit zwei verschiedenen immunhistochemischen Protokollen untersucht, die sich in ihrer Antikörperkonzentration um den Faktor 27 unterschieden.

2 Material und Methoden

2.1 Tissue Microarray Methode

Die TMA-Technik erlaubt die gleichzeitige Untersuchung von bis zu 1'000 verschiedenen Gewebeproben auf einem einzigen Gewebeschnitt. Um dies zu ermöglichen, werden aus den Paraffinblöcken interessierender Tumoren 0,6mm im Durchmesser messende Zylinder mit einer Hohnadel entnommen. Diese Zylinder werden dann in vorgefertigte Löcher eines sog. Empfängerparaffinblockes eingebracht. Dabei wird jeder Tumorgewebszylinder an einer genau definierten Stelle (Koordinate) in den TMA-Block eingebracht. Die TMAs sind aus mehreren Gründen hervorragend für Forschungszwecke geeignet. Ein wesentlicher Grund sind die optimalen Bedingungen für die Pseudonymisierung und Anonymisierung von Gewebeproben. Ein typisches TMA-Layout ist in Abbildung 1 zusammen mit dem entsprechenden Koordinatensystem dargestellt. Jeder Gewebeschnitt besteht aus 4-6 Quadranten (A-F). Jede Gewebeprobe wird einer Koordinate (Quadrant, Zahl (1-9), Buchstabe (a-r)) zugeordnet. In Tabelle 1 ist zu einem derartigen TMA gehörenden Stanz-Datenfile zu erkennen. Jeder Koordinate wird eine spezifische Patientenprobe mit zugehörigen klinischen Daten zugeteilt. Der Gewebszylinder wird an der definierten Stelle z.B. Quadrant A, Position 2h eingebracht. Patientenidentifikationsnummern, welche sonst zur Pseudonymisierung von Patientenproben verwendet werden, sind nicht erkennbar. Nach Herstellung eines TMA können die Patienten-identifizierenden Parameter wie die Biopsie-Nummer unwiderruflich gelöscht werden was eine technisch einfache unwiderrufliche Anonymisierung der Gewebeproben ermöglicht.

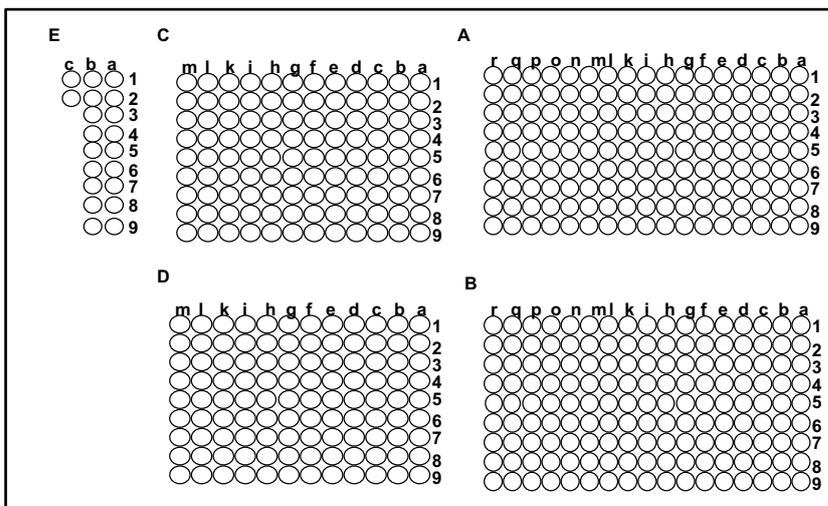


Abbildung 1. TMA-Layout: Aufbau des Gewebeschnittes auf dem Objektträger.

Tabelle 1. Repräsentativer Ausschnitt eines TMA-Datenfiles.

Pat. ID	TMA	Lok.	Alter bei OP	PSA präOP	RPE Gleason	pT	pN	R-Status	Gleason Biopsie	Bioch. Rezidiv (Monate)	Gesamt-überleben
1	Pro 6.1	A 1a	68,6	52,7	≤3+3	T2a	N0	positiv	3+4	48,1	111,1
2	Pro 6.1	A 1b	61,1	11	3+4	T2a	N0	negativ	3+4	192,6	192,6
3	Pro 6.1	A 1c	54,5	35,8	3+4	T2b	N0	negativ	3+4	45,3	192,5
4	Pro 6.1	A 1d	56,3	11,33	3+4	T2a	N0	negativ		40,4	263,6
5	Pro 6.1	A 1e	72,5	10,06	3+4	T2a	N0	positiv	3+4	191	191
6	Pro 6.1	A 1f	66,3	3,3	5+3		N0	negativ		62	191,7
7	Pro 6.1	A 1g	54,8	4,14	3+4	T2a	N0	negativ	3+4	6,9	70,1
8	Pro 6.1	A 1h	72,1		≤3+3	T2b	N0	negativ	3+3	100,3	100,3
9	Pro 6.1	A 1i	69,3	15,4	3+4	T1c	N0	negativ	4+3	90,4	190,9
10	Pro 6.1	A 1k	65,6	14	≤3+3	T2a	N0	negativ	2+3	137,2	137,2
11	Pro 6.1	A 1l	72	5	≤3+3		N0	negativ		275,8	275,8
12	Pro 6.1	A 1m	63,2	50	3+4	T2c	N0	positiv		11,4	193,2
13	Pro 6.1	A 1n	70,2	3,85	4+3	T1c	N0	positiv	3+3	105,7	125,9
14	Pro 6.1	A 1o	53,1	7,48	3+4	T2a	N0	negativ	3+4	115,7	228,1
15	Pro 6.1	A 1p	60,3	20,61	3+4	T2c	N0	positiv	3+3	252,6	252,6
16	Pro 6.1	A 1q	54,4	6,4	≤3+3	T2a	N0	negativ	3+3	139,7	226,3
17	Pro 6.1	A 1r	56,4	12,26	4+5	T1c	N0	positiv	3+4	28,2	77,9
18	Pro 6.1	A 2a	72	15,4	≤3+3	T2a	N0	negativ	3+2	252,4	252,4
19	Pro 6.1	A 2b	67,4		4+3	T3a	N0	positiv	3+3	34,7	34,7
20	Pro 6.1	A 2c	68,6	52,7	≤3+3	T2a	N0	negativ	3+4	48,1	111,1

2.1.1 Prostata Prognose Tissue Microarray

Der Prostata Prognose TMA beinhaltet jeweils ein 0,6mm messendes Gewebefragment von 17'752 Patienten, welche zwischen 1993 und 2017 an der urologischen Martiniklinik des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf, behandelt worden waren. Alle Prostatapräparate wurden am Institut für Pathologie nach einem standardisierten Vorgehen untersucht. Dieses Vorgehen beinhaltet eine komplette Einbettung der gesamten Prostata

für die histologische Untersuchung. Verlaufsdaten waren von insg. 14'667 dieser Patienten vorhanden, wobei der mediane Follow-Up 47,9 Monate betrug (Spannweite: 0-275,8 Monate) (Mittelwert: 56±47 Monate). Die klinischen und pathologischen Daten, welche für die einzelnen Proben zur Verfügung standen, sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2. Vorliegende klinische und pathologische Daten

Patientendaten des Prostata Prognose-TMA
Alter bei RPE (Radikale Prostatektomie)
Serum PSA-Wert präoperativ
Gleason Grad der RPE
Quantitativer Gleason Grad der RPE
Stadium (TNM) bei RPE
R-Status bei RPE
Klinisches Stadium bei Biopsie
Gleason Grad der Biopsie
Anzahl der Stenzen und Anzahl der pos. Stenzen
Risikoklassifizierung nach D'Amico
Hormontherapie (adjuvant, neoadjuvant)
Strahlentherapie (adjuvant)
BCR (Zeitintervall)
Metastasen (Zeitintervall)
Überleben/CSS (cancer specific survival)

Zusätzlich war eine molekulare Datenbank verfügbar, wobei Ergebnisse von früheren Studien zur Verfügung standen. Dies beinhaltete v.a. Daten zur ERG-Expression (Minner *et al.*, 2011; Weischenfeldt *et al.*, 2013), zum TMPRSS2:ERG-Fusionsstatus, sowie Informationen zu Deletionen von 5q21 (Burkhardt *et al.*, 2013; Kluth *et al.*, 2019), 6q15 (Kluth *et al.*, 2013, 2016), 10q23 (PTEN) (Krohn *et al.*, 2012) und 3p13 (Krohn *et al.*, 2013; Kluth *et al.*, 2018). Daten zum ki67 Labeling Index standen ebenfalls zur Verfügung (Minner *et al.*, 2010). Die Daten zum pT, pN, Gleason-Grad und R-Status waren dem ursprünglichen Pathologiebericht entnommen. Bei allen seit 2005 operierten Patienten war zusätzlich zum klassischen Gleason Grad jeweils der prozentuale Anteil von Gleason 3, Gleason 4 und Gleason 5 Mustern registriert worden, was eine Bestimmung des sog. „quantitativen Gleason-Grades“ erlaubte.

2.1.2 Multitumor Tissue Microarray

Der Multitumor-TMA beinhaltete 3'659 verschiedene Tumorproben von 84 verschiedenen Tumortypen und Subtypen. Der Multitumor TMA dient dem Zweck die Prävalenz von

molekularen Parametern in verschiedenen Tumorarten zu klären. Die genaue Zusammensetzung des Multitumor TMA ist in Tabelle 3 aufgeschlüsselt auf verschiedene Organsysteme dargestellt.

Tabelle 3. Zusammensetzung des Multitumor Tissue Microarrays.

Entität	Anzahl	Entität	Anzahl
Prostatakarzinom	49	Analkarzinom	50
Magenkarzinom, intestinaler Typ	50	Karzinoid (NET)	50
Magenkarzinom, diffuser Typ	50	Neuroendokriner Tumor, Pankreas	50
Plattenepithelkarzinom, Ösophagus	50	Dünndarmkarzinom	10
Adenokarzinom, Ösophagus	50	Phäochromozytom	50
Kolonkarzinom	50	NNR-Karzinom	27
Plattenepithelkarzinom, Lunge	50	Gastrointestinaler Stromatumor (GIST)	50
Bronchioloalveoläres Karzinom	6	Plattenepithelkarzinom, Haut	50
Großzelliges Bronchialkarzinom	31	Basaliom	48
Kleinzelliges Bronchialkarzinom	4	Malignes Melanom	48
Adenokarzinom, Lunge	50	Benigne Naevi	29
Duktales Adenokarzinom, Pankreas	50	Schilddrüsenadenom	50
Adenokarzinom, Pankreas (Papille)	30	Follikuläres Schilddrüsenkarzinom	49
Duktales Mammakarzinom	46	Papilläres Schilddrüsenkarzinom	50
Tubuläres Mammakarzinom	18	Medulläres Schilddrüsenkarzinom	50
Lobuläres Mammakarzinom	48	Anaplastisches Schilddrüsenkarzinom	26
Seröses Ovariakarzinom	50	Leiomyom	50
Muzinöses Ovariakarzinom	26	Leiomyosarkom	50
Brenner-Tumor, Ovar	9	Stromasarkom des Uterus	12
Endometrioides Ovariakarzinom	36	Karzinom (MMT)	50
Muzinöses Mammakarzinom	22	Thymom	29
Medulläres Mammakarzinom	15	Basalzellenadenom	15
Phylloides Mammakarzinom	50	Mundbodenkarzinom	50
Plattenepithelkarzinom, Zervix	50	Larynxkarzinom	50
Adenokarzinom, Zervix	50	Pleomorphes Adenom, Parotis	50
Endometrioides Endometriumkarzinom	50	Warthin Tumor	50
Seröses Endometriumkarzinom	50	Non-Hodgkin Lymphom	49
Plattenepithelkarzinom, Vulva	50	Hodgkin Lymphom	46
Plattenepithelkarzinom, Vagina	50	Angiosarkom	32
Teratom	50	Chondrosarkom	25
Seminom	50	Liposarkom	49
Embryonales Hodenkarzinom	50	Granularzelltumor	30
Dottersacktumor	50	Osteosarkom	25
Onkozytom	50	Malignes Mesotheliom	48
Papilläres Nierenzellkarzinom	50	Pilomatrixom	35
Chromophobes Nierenzellkarzinom	50	Riesenzell-Sehnenscheiden Tumor	45
Klarzelliges Nierenzellkarzinom	50	Kleinzelliges Bronchialkarzinom	16
Urothelkarzinom (T2-4)	50	Merkelzellkarzinom	46
Urothelkarzinom (pTa)	50	Kleinzelliges Prostatakarzinom	17
NNR-Adenom	50	Kleinzelliges Harnblasenkarzinom	18

2.1.3 Tissue Microarray mit fortgeschrittenen Prostatakarzinomen

Da im Standard-Multitumor TMA nur verhältnismäßig wenige Prostatakarzinome vorkommen und die diagnostisch heikelsten fortgeschrittenen und hormon-refraktären Fälle in dem TMA weitgehend fehlen, wurde ein zusätzlicher TMA verwendet, der ausschließlich aus fortgeschrittenen, rezidierten Prostatakarzinomen bestand. Insgesamt bestand dieser TMA aus 419 fortgeschrittenen Prostatakarzinomen. Bei 158 Tumoren waren die Kriterien für eine sog. Kastrationsresistenz erfüllt. Bei 261 der 419 Karzinome bestehen keine Informationen darüber, ob es sich um hormonrefraktäre Tumoren handelt oder nicht. Angesichts der Tatsache, dass sie alle rezidivierende Prostatakarzinome sind, ist aber davon auszugehen, dass eine Teilmenge dieser Tumoren ebenfalls kastrationsrefraktär ist.

2.2 Immunhistochemie

Für alle immunhistochemischen Untersuchungen wurden frischgeschnittene TMA-Schnitte genutzt, welche jeweils an einem Tag und in einem einzigen Experiment zur Untersuchung kamen. Dabei wurde der am UKE hergestellte monoklonale Maus anti-humanes-PSA Antikörper (Dianova DIA-PSA, clone HAM18) bei Konzentrationen von 1:1'350 und 1:36'450 verwendet. Die Schnitte wurden vor der Färbung entparaffinisiert und in pH 7.8 Tris-EDTA-Citrat Puffer bei 121°C in einem Autoclav für "antigen retrieval" inkubiert. Danach erfolgte der Peroxidase-Block (H_2O_2 von Dako) und anschließend die Inkubation mit dem anti-PSA Antikörper in der jeweiligen Konzentration für 1h bei 37°C. Der gebundene Antikörper wurde dann mit dem EnVision Kit (Dako, Glostrup, Dänemark) entsprechend den Empfehlungen der Hersteller visualisiert. Hinterher erfolgte die Färbung mittels DAB-Chromogen und Hämalaun. Für jedes Gewebestück wurde die PSA-Färbung semi-quantitativ beurteilt und in vier Kategorien eingeteilt: negativ, schwache Färbung, mäßiggradige Färbung oder starke Färbung.

2.3 Statistik

Alle statistischen Berechnungen wurden mit der JMP 11.0.0 Software (SAS Institute Inc., NC, USA) vorgenommen. Kontingenztafeln und Chi-Quadrat-Test wurden verwendet, um nach statistischen Zusammenhängen zwischen der PSA-Expression und molekularen Parametern bzw. dem Tumorphänotyp zu suchen. Überlebenskurven wurden nach der Kaplan-Meier-Methode hergestellt. Um statistisch signifikante Unterschiede zwischen Subgruppen zu identifizieren wurde ein Log-Rank Test durchgeführt. Zur Klärung unabhängiger statistischer Zusammenhänge wurde ein Cox-Regressionsanalyse durchgeführt.

Besondere Aufmerksamkeit wurde der Frage zugewandt, ob die PSA-Expression ein unabhängiger Prognoseparameter sein könnte. Für diese Analysen wurde berücksichtigt, dass die Frage nach der Prognose eines Prostatakarzinoms sowohl präoperativ wie auch postoperativ gestellt werden kann, wobei unterschiedliche Grundlagen für die Beantwortung dieser Frage bestehen. Die Szenarien 1 und 2 unserer Multiparameter Analyse beschäftigten sich mit der postoperativen Situation. Szenario 1 verwendete sämtliche postoperativ zur Verfügung stehende Parameter wie pT-Stadium, pN-Stadium, R-Status, präoperativer Serum-PSA-Wert und den Gleason Grad. In Szenario 2 wurden die gleichen Parameter wie in 1 verwendet abgesehen von dem pN-Status. Das pN-Stadium steht nur bei Patienten zur Verfügung, bei denen die Lymphknoten im Rahmen der Prostatektomie-OP entfernt wurden. Eine Lymphknoten-Resektion wird insbesondere bei Patienten mit einem höheren Risikoprofil (Leitlinienprogramm Onkologie, 2019), wenn ein aggressiver Tumor vorliegt, vorgenommen, sodass die Verwendung aller Parameter eine gewisse Selektion in Richtung aggressiverer Tumoren induziert. Szenario 2 vermeidet somit eine mögliche Verzerrung (bias) in Richtung aggressiverer Tumoren. Die wichtigste Prognoseabschätzung erfolgt allerdings präoperativ, denn basierend auf dieser Prognosebeurteilung wird entschieden, ob ein Patient operiert werden muss oder nicht. Präoperativ stehen als Prognoseparameter nur der Serum-PSA-Wert, das klinische Stadium und der Gleason Grad zur Verfügung. Für den Gleason Grad ist hierbei zu berücksichtigen, dass der für diese Studie zur Verfügung stehende präoperative Gleason Grad von hunderten von verschiedenen Pathologen an vielen externen Pathologieinstituten gestellt wurde und es ist anzunehmen, dass die Interpretation des Gleason Grades bei diesen Pathologen zum Teil sehr unterschiedlich war. Die Interobserver-Variabilität der Gleason Gradierung beträgt zwischen erfahrenen Pathologen bis zu 40% (Ozkan *et al.*, 2016). Dies bedeutet, dass nur in etwa 60% der Fälle, der durch unterschiedliche Pathologen bestimmte Gleason Grad, übereinstimmt. Zusätzlich darf auch die intraobserver Variabilität nicht vernachlässigt werden (Ozkan *et al.*, 2016). Pathologen, die sich speziell der urologischen Pathologie widmen, weisen eine geringere Interobserver-Variabilität auf (Variabilität in etwa 30%) (Oyama *et al.*, 2005). Ausgehend von der Idee, dass der von vielen Pathologen bestimmte externe präoperative Gleason Grad einer stärkeren Interobserver-Variabilität ausgesetzt war, führten wir auch für die präoperativen Parameter zwei unterschiedliche statistische Evaluationen aus. Einerseits verwendeten wir den extern bestimmten, möglicherweise weniger reproduzierbaren, präoperativen Gleason Grad und andererseits den durch urologische Pathologen bestimmten Gleason Grad des Prostatektomiepräparats. In Szenario 3 wurde der präoperative Serum-PSA-Wert, das klinische Stadium (cT) und der PSA-Wert vom Prostatektomiepräparat verwendet. In

Szenario 4 wurde der präoperative Serum-PSA-Wert, das klinische Stadium und der präoperative Gleason Grad der externen Pathologen berücksichtigt.

3 Ergebnisse

3.1 Prognose Untersuchung

3.1.1 Hohe PSA-Antikörper Konzentration (1:1'350)

3.1.1.1 Technische Aspekte

Von den 17'752 in den Prostatakarzinom-Prognose Array eingebrachten Prostatastanzen waren 12'679 (71,42%) beurteilbar. Gründe für fehlende Daten in 5'073 nicht beurteilbaren Tumoren waren das Fehlen von Gewebe an einzelnen Lokalisationen (beispielsweise durch Abschwimmen von Gewebefragmenten während der immunhistochemischen Färbung) oder das Fehlen von eindeutigen Tumorzellen in den Gewebeproben.

3.1.1.2 PSA-Expression, Tumorphänotyp und Prognose

Annähernd alle Prostatakarzinome zeigten eine meist deutliche PSA-Färbung. Der 12'679 evaluierbaren Tumore zeigten 80,4% eine starke, 16,1% eine moderate, 3,3% eine schwache und 0,1% keine Färbung. Beispiele von PSA gefärbten Tumoren unterschiedlicher Gleason Grade sind in den Abbildungen 2-4 dargestellt. Eine hohe Intensität der PSA Färbung war mit Parametern eines günstigen Tumorphänotyps assoziiert wie einem niedrigen pT-Stadium, einem niedrigen Gleason Grad, einem niedrigen quantitativen Gleason Grad, dem Fehlen von Lymphknotenmetastasen und einem negativen R-Status (Tab. 4, jeweils $p < 0,0001$). Die Intensität der PSA-Immunhistochemie war eng mit der Prognose der Patienten assoziiert. Die 8'413 Tumoren, die als stark positiv eingeschätzt worden waren, zeigten eine deutlich bessere Prognose als die 1'719 Patienten mit moderater und die 361 Patienten mit schwacher PSA-Färbung ($p < 0,0001$) (Abb. 5). Nur 12 Patienten mit Verlaufsdaten hatten einen komplett negativen Ausfall der PSA Färbung. Die relativ günstige Prognose dieser Patienten könnte darauf hindeuten, dass es sich hierbei nicht um echt PSA-negative Tumoren, sondern um Färbeartefakte handelt.

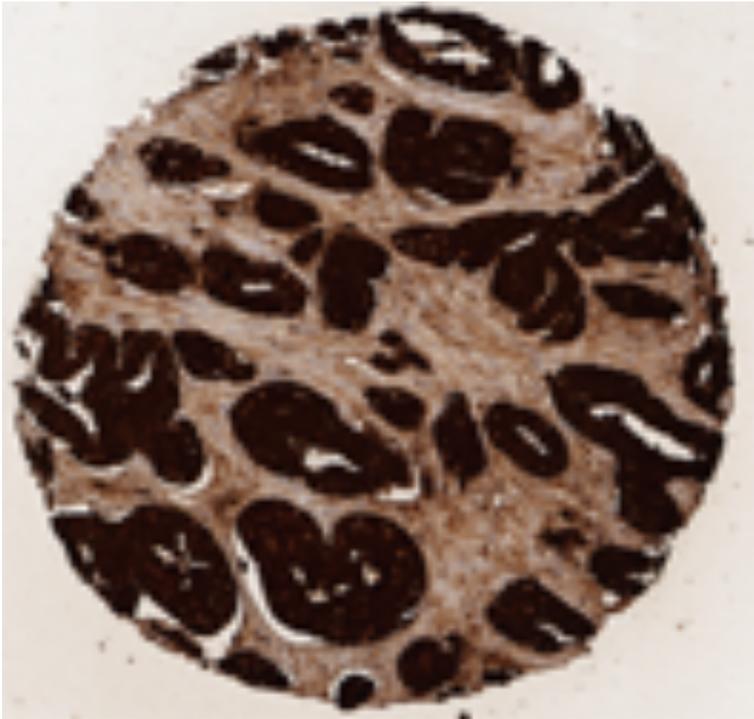


Abbildung 2. Prostatakarzinom Gleason Grad 3+3 (1:1'350).

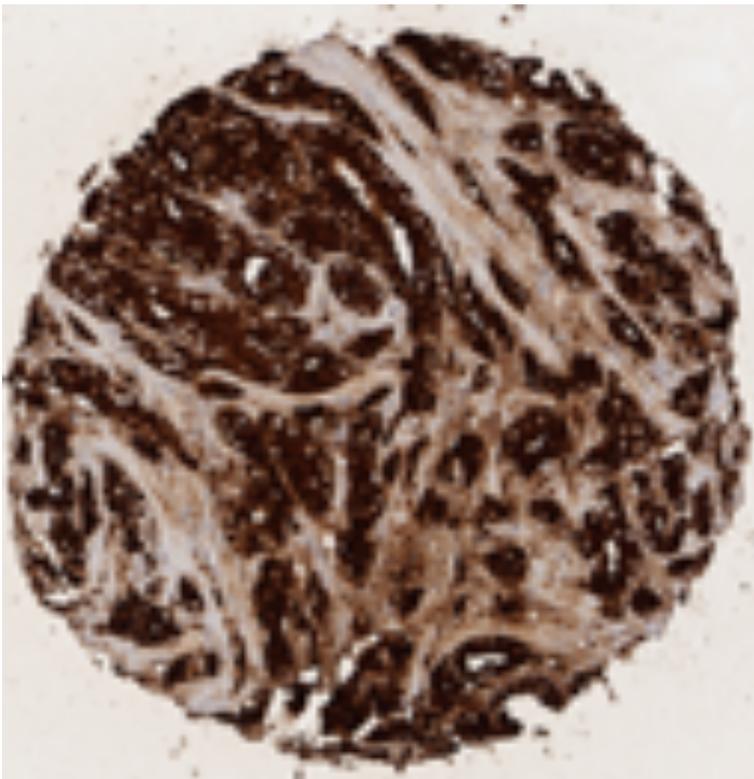


Abbildung 3. Prostatakarzinom Gleason Grad 4+3 (1:1'350).

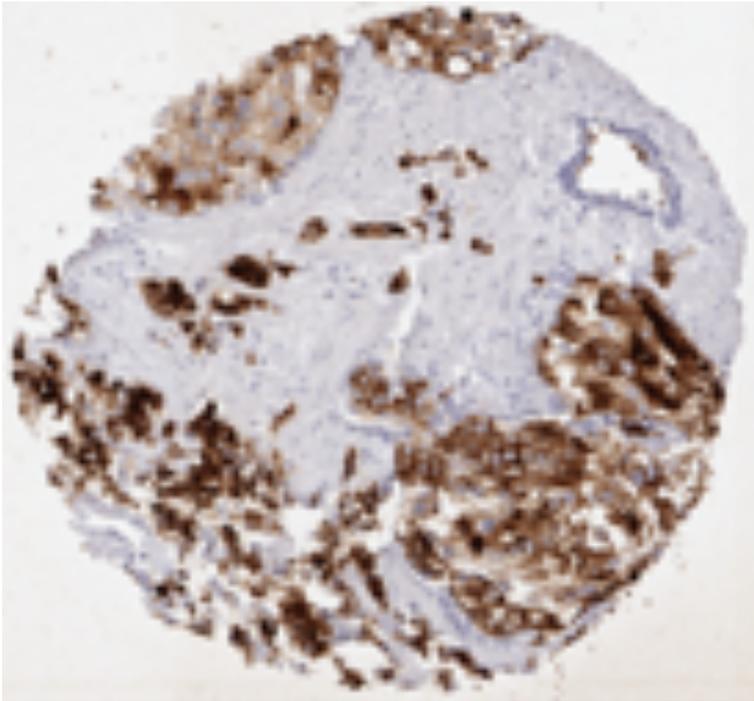


Abbildung 4. Prostatakarzinom Gleason Grad 4+5 (1:1'350).

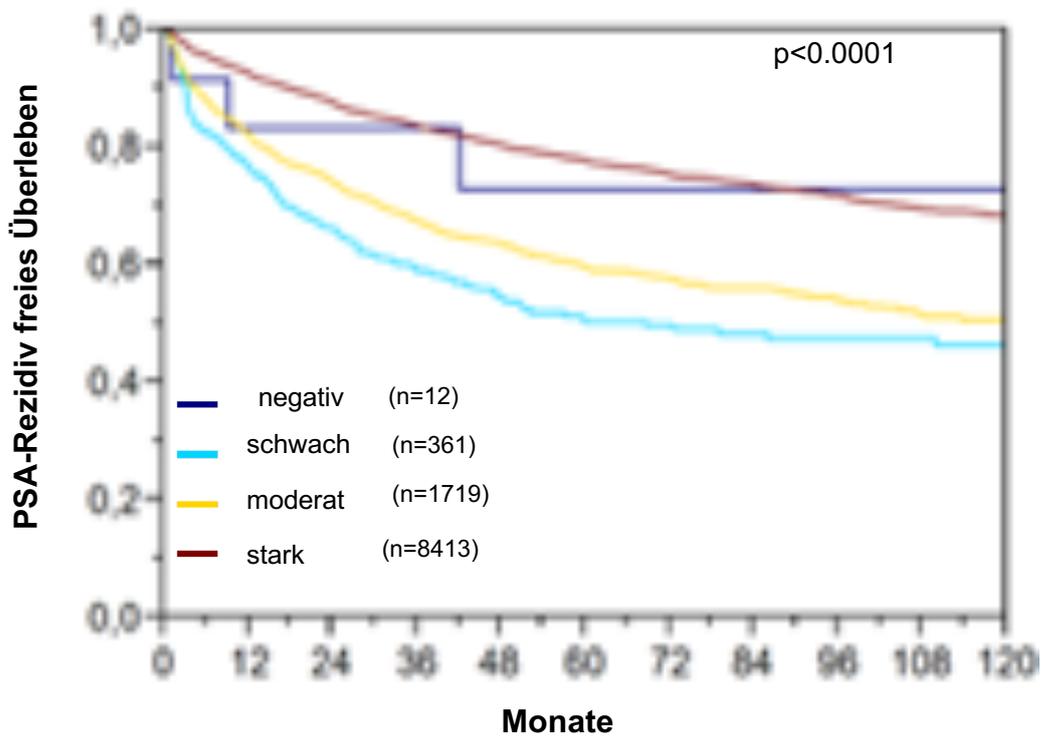


Abbildung 5. PSA-Expression und biochemisches Rezidiv (1:1'350).

Tabelle 4. Zusammenhang zwischen der PSA-Expression und dem Tumorphänotyp (1:1'350).

Parameter	n auswertbar	negativ (%)	schwach (%)	moderat (%)	stark (%)	p-Wert
Alle Tumoren	12679	0.1	3.3	16.1	80.4	
Tumorstadium						<0.0001
pT2	8034	0.1	2.1	11.6	86.3	
pT3a	2875	0.0	3.0	20.4	76.6	
pT3b-pT4	1719	0.2	9.9	30.2	59.7	
Gleason Grad						<0.0001
≤3+3	2419	0.2	2.3	8.9	88.6	
3+4	6706	0.1	1.7	14.4	83.9	
3+4 Tert.5	569	0.0	3.5	16.2	80.3	
4+3	1269	0.1	5.0	22.2	72.7	
4+3 Tert.5	927	0.0	5.9	29.7	64.4	
≥4+4	704	0.6	15.9	30.1	53.4	
Quantitativer Gleason Grad						<0.0001
≤3+3	2419	0.2	2.3	8.9	88.6	
3+4 ≤5%	1686	0.1	1.3	10.6	88.0	
3+4 6-10%	1675	0.1	1.6	12.0	86.4	
3+4 11-20%	1512	0.1	1.8	15.7	82.5	
3+4 21-30%	764	0.0	1.4	19.6	78.9	
3+4 31-49%	627	0.0	2.2	18.0	79.7	
3+4 Tert.5	569	0.0	3.5	16.2	80.3	
4+3 50-60%	538	0.0	3.2	18.6	78.3	
4+3 Tert.5	927	0.0	5.9	29.7	64.4	
4+3 61-100%	574	0.2	5.2	26.3	68.3	
≥4+4	613	0.7	14.7	30.7	54.0	
Lymphknoten Metastasen						<0.0001
N0	7622	0.1	3.2	17.0	79.8	
N+	940	0.2	10.5	31.4	57.9	
Präoperativer PSA Wert (ng/ml)						<0.0001
<4	1497	0.2	6.3	17.0	76.6	
4-10	7487	0.1	2.6	14.7	82.6	
10-20	2684	0.1	3.4	17.5	78.9	
>20	931	0.1	4.4	21.6	73.9	
Resektionsrand						<0.0001
negativ	10032	0.1	2.8	14.6	82.5	
positiv	2600	0.1	5.3	21.8	72.7	

3.1.1.3 PSA-Expression und ERG-Status

Die Intensität der PSA Färbung war signifikant mit dem ERG(ETS-related gene)-Status assoziiert (Abb. 6). Dabei war in ERG-positiven Tumoren die PSA Intensität signifikant geringer und der Anteil an schwachen PSA-Färbungen deutlich höher als in ERG-negativen Tumoren.

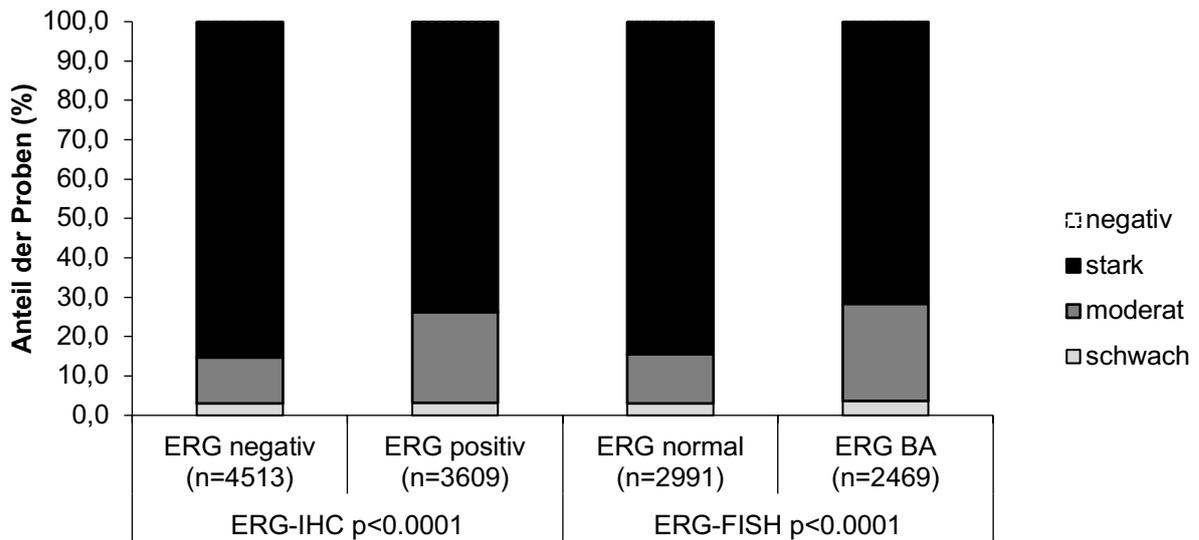


Abbildung 6. PSA-Expression und ERG-Status (IHC, FISH) (1:1'350).

Diese Unterschiede waren sowohl bei Bestimmung des ERG-Status mittels Immunhistochemie als auch mittels FISH (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung) hoch signifikant (jeweils $p < 0,0001$).

3.1.1.4 Phänotyp und Prognose in ERG-negativen Karzinomen

Die unterschiedliche Ausprägung der PSA-Färbung in ERG-positiven und ERG-negativen Tumoren motivierte uns, eine separate Untersuchung der Beziehung der PSA Expression zu Tumorphänotyp und Prognose in ERG-negativen und ERG-positiven Tumoren vorzunehmen. Der Zusammenhang zwischen der PSA Expression und dem Tumorphänotyp ist für die ERG-negativen Tumoren in Tabelle 5 dargestellt. Die Daten zeigen, ebenso wie im Gesamtkollektiv, eine hoch signifikante Korrelation zwischen einem günstigen Tumorphänotyp und einem hohen PSA-Expressionsniveau im Primärtumor.

Tabelle 5. PSA-Expression und Phänotyp in ERG-negativen Karzinomen (1:1'350).

Parameter	n auswertbar	negativ (%)	schwach (%)	moderat (%)	stark (%)	p-Wert	
Alle Tumoren	4513	0.1	3.0	11.7	85.2		
Tumorstadium							
pT2	2985	0.1	1.8	8.5	89.5	<0.0001	
pT3a	936	0.1	2.6	12.6	84.7		
pT3b-pT4	580	0.2	9.5	26.9	63.4		
Gleason Grad							
≤3+3	905	0.1	1.9	6.0	92.0	<0.0001	
3+4	2344	0.1	1.6	9.9	88.5		
3+4 Tert.5	198	0.0	2.5	14.1	83.3		
4+3	499	0.0	4.8	16.0	79.2		
4+3 Tert.5	293	0.0	4.4	20.5	75.1		
≥4+4	272	0.7	14.0	28.3	57.0		
Quantitativer Gleason Grad							
≤3+3	905	0.1	1.9	6.0	92.0	<0.0001	
3+4 ≤5%	599	0.0	1.5	7.2	91.3		
3+4 6-10%	603	0.0	1.2	5.6	93.2		
3+4 11-20%	549	0.2	1.5	12.4	86.0		
3+4 21-30%	264	0.0	1.1	14.0	84.8		
3+4 31-49%	242	0.0	2.5	12.4	85.1		
3+4 Tert.5	198	0.0	2.5	14.1	83.3		
4+3 50-60%	209	0.0	2.4	11.5	86.1		
4+3 Tert.5	293	0.0	4.4	20.5	75.1		
4+3 61-100%	242	0.0	5.4	21.1	73.6		
≥4+4	241	0.8	13.3	29.5	56.4		
Lymphknoten Metastasen							
N0	2617	0.1	2.4	12.7	84.8		<0.0001
N+	276	0.4	13.8	29.0	56.9		
Präoperativer PSA Wert (ng/ml)							
<4	469	0.0	6.2	13.2	80.6	<0.0001	
4-10	2640	0.2	2.2	10.5	87.2		
10-20	1016	0.0	3.0	12.3	84.7		
>20	365	0.3	4.9	17.3	77.5		
Resektionsrand							
negativ	3573	0.1	2.5	10.1	87.4	<0.0001	
positiv	928	0.2	5.0	18.2	76.6		

Dabei ist eine niedrigere PSA-Intensität mit einem höheren pT-Stadium, einem höheren klassischen und quantitativen Gleason Grad, dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen

und einem positiven R-Status vergesellschaftet (jeweils $p < 0,0001$). Auch die prognostische Bedeutung der PSA-Expression ist in ERG-negativen Tumoren klar erhalten (Abb. 7, $p < 0,0001$). Hier zeigten die 3'526 stark gefärbten Tumore einen besseren prognostischen Verlauf als die 506 moderat und 122 schwach gefärbten Prostatakarzinome.

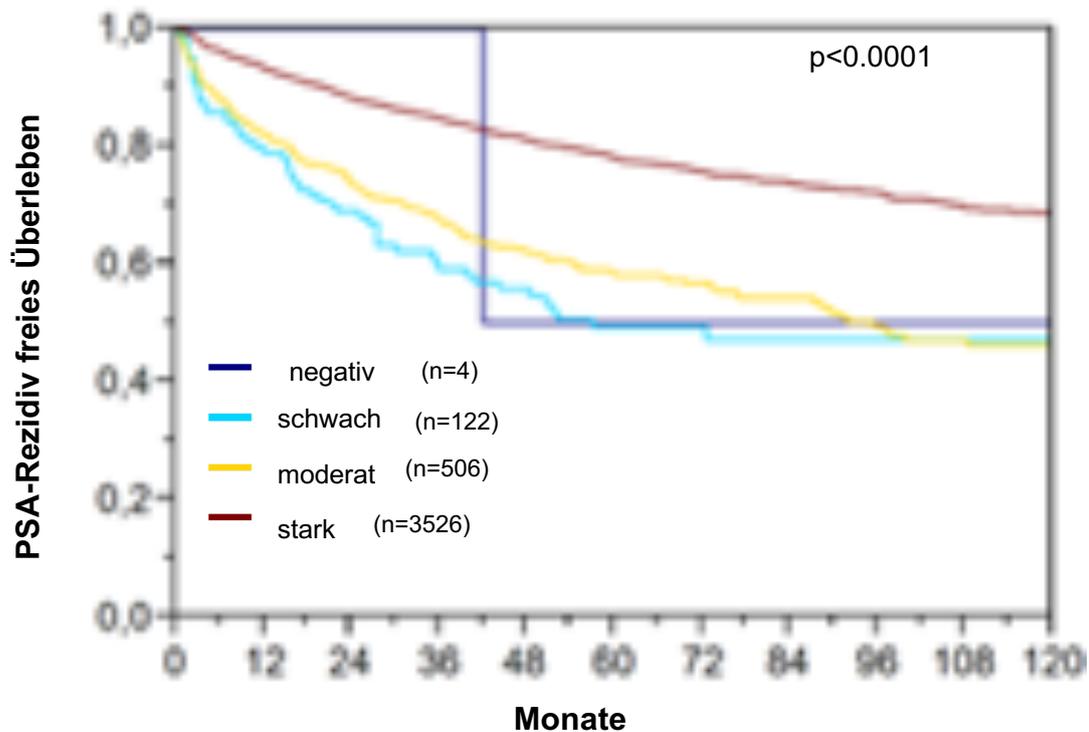


Abbildung 7. PSA-Expression und biochemisches Rezidiv in ERG-negativen Karzinomen (1:1'350).

3.1.1.5 Phänotyp und Prognose in ERG-positiven Karzinomen

Die Beziehung zwischen der PSA-Immunhistochemie und dem Tumorphänotyp ERG-positiver Tumoren ist in Tabelle 6 dargestellt. Gleichmaßen besteht eine hoch signifikante Korrelation zwischen einer hohen PSA-Expression und einem ungünstigen Phänotyp ($p < 0,0001$ für pT-Stadium, Gleason Grad, quantitativen Gleason Grad und R-Status; $p = 0,0005$ für pN-Status). Dementsprechend fand sich auch eine hoch signifikante Prognoserelevanz für die PSA-Expression in ERG-positiven Tumoren (Abb. 8, $p < 0,0001$). In diesem Fall zeigten die 2'455 stark positiv eingeschätzten Karzinome eine markant bessere Prognose als die 750 moderat und die 109 schwach-positiv bewerteten Tumore.

Tabelle 6. PSA-Expression und Phänotyp in ERG-positiven Karzinomen (1:1'350).

Parameter	n auswertbar	negativ (%)	schwach (%)	moderat (%)	stark (%)	p-Wert
Alle Tumoren	3609	0.1	3.1	23.1	73.7	
Tumorstadium						
pT2	2145	0.1	2.2	17.9	79.8	<0.0001
pT3a	971	0.0	2.8	27.7	69.5	
pT3b-pT4	478	0.0	8.2	36.6	55.2	
Gleason Grad						
≤3+3	758	0.3	2.0	15.4	82.3	<0.0001
3+4	2056	0.0	2.0	21.3	76.7	
3+4 Tert.5	105	0.0	6.7	23.8	69.5	
4+3	364	0.0	4.1	35.7	60.2	
4+3 Tert.5	199	0.0	7.5	38.7	53.8	
≥4+4	124	0.0	13.7	37.1	49.2	
Quantitativer Gleason Grad						
≤3+3	758	0.3	2.0	15.4	82.3	<0.0001
3+4 ≤5%	517	0.0	1.4	16.8	81.8	
3+4 6-10%	543	0.2	1.8	18.8	79.2	
3+4 11-20%	441	0.0	2.3	24.9	72.8	
3+4 21-30%	265	0.0	2.6	26.8	70.6	
3+4 31-49%	182	0.0	2.7	27.5	69.8	
3+4 Tert.5	105	0.0	6.7	23.8	69.5	
4+3 50-60%	165	0.0	3.0	30.9	66.1	
4+3 Tert.5	199	0.0	7.5	38.7	53.8	
4+3 61-100%	162	0.0	3.7	41.4	54.9	
≥4+4	104	0.0	9.6	37.5	52.9	
Lymphknoten Metastasen						
N0	2061	0.0	3.9	24.6	71.4	0.0005
N+	230	0.0	4.8	37.4	57.8	
Präoperativer PSA Wert (ng/ml)						
<4	484	0.2	4.5	20.9	74.4	<0.0001
4-10	2241	0.0	2.5	21.8	75.8	
10-20	642	0.3	3.9	25.4	70.4	
>20	214	0.0	5.1	34.6	60.3	
Resektionsrand						
negativ	2825	0.1	2.7	21.5	75.6	<0.0001
positiv	769	0.0	4.7	28.5	66.8	

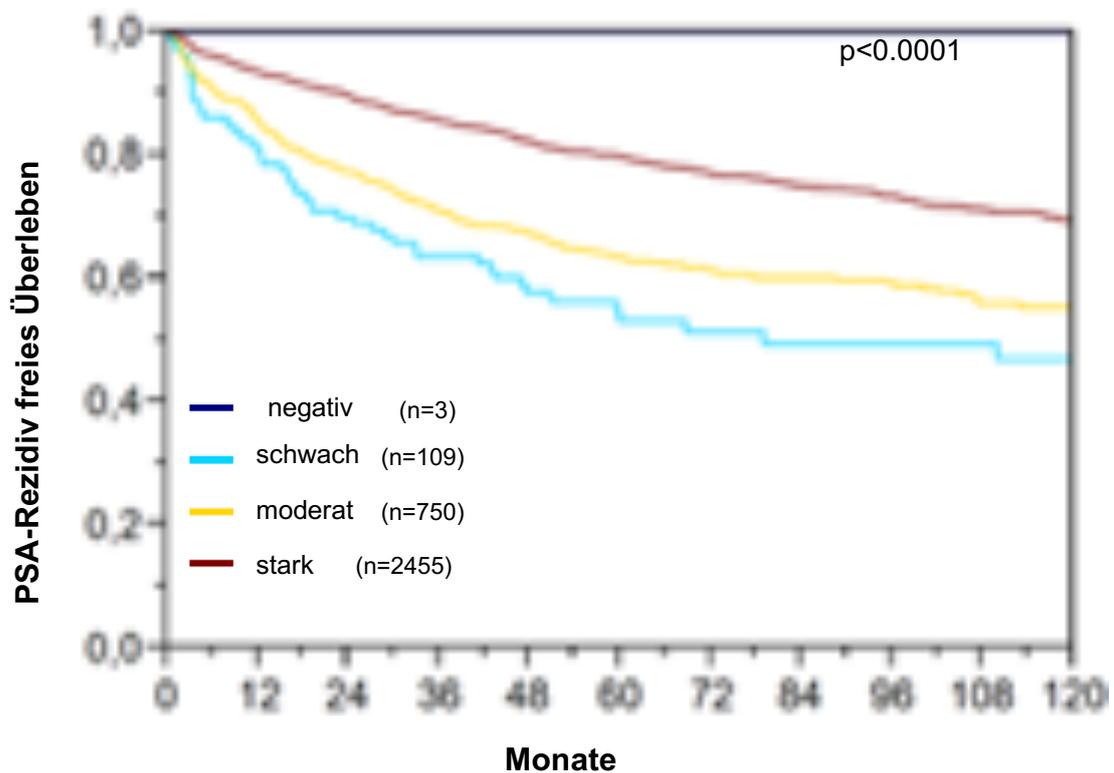


Abbildung 8. PSA-Expression und biochemisches Rezidiv in ERG-positiven Karzinomen (1:1'350).

3.1.1.6 Multivariate Analyse

Die Multivariate Analyse der Prognoserelevanz der Gewebe-PSA-Expression ergab für alle Szenarien und für ERG-positive wie auch für ERG-negative eine hoch signifikante unabhängige Prognoserelevanz der PSA-Expression (Tabelle 7).

Tabelle 7. Multivariate Analyse (1:1'350).

Tumor Subgruppe	Szenario	n auswertbar	p -Wert							
			Präoperativer PSA-Wert	pT Stadium	cT Stadium	Gleason Grad RPE	Gleason Grad Biopsie	pN Stadium	R Status	PSA-Expression
Alle Tumoren	1	6838	<0.0001	<0.0001	-	<0.0001	-	<0.0001	<0.0001	<0.0001
	2	10397	<0.0001	<0.0001	-	<0.0001	-	-	<0.0001	<0.0001
	3	10231	<0.0001	-	<0.0001	<0.0001	-	-	-	<0.0001
	4	8754	<0.0001	-	<0.0001	-	<0.0001	-	-	<0.0001
ERG-negative Tumore	1	2667	<0.0001	<0.0001	-	<0.0001	-	0.0008	0.2017	0.0017
	2	4147	<0.0001	<0.0001	-	<0.0001	-	-	0.017	0.0033
	3	4105	<0.0001	-	<0.0001	<0.0001	-	-	-	<0.0001
	4	4038	<0.0001	-	<0.0001	-	<0.0001	-	-	<0.0001
ERG-positive Tumore	1	2120	0.0314	<0.0001	-	<0.0001	-	0.0285	0.0006	0.0063
	2	3313	0.0001	<0.0001	-	<0.0001	-	-	<0.0001	0.0006
	3	3255	<0.0001	-	<0.0001	<0.0001	-	-	-	<0.0001
	4	3201	<0.0001	-	<0.0001	-	<0.0001	-	-	<0.0001

3.1.1.7 PSA-Expression und chromosomale Deletionen

Die Beziehung zwischen der PSA-Expression in Tumoren und den Deletionen von PTEN, 6q15, 5q21 und 3p13 ist für alle Tumoren und die Untergruppen der ERG-negativen und ERG-positiven Karzinome in Abb. 9 dargestellt. Die Darstellung zeigt eine hoch signifikante Beziehung zwischen dem Vorliegen einer PTEN-Deletion und einer reduzierten PSA-Expression. Diese Beziehung ist sowohl in ERG-negativen ($p=0,0005$) wie auch in ERG-positiven ($p<0,0001$) hoch signifikant. Für die anderen Deletionen findet sich lediglich für

5q21 in der Untergruppe der ERG-positiven Karzinome eine marginale statistische Assoziation ($p=0,0072$).

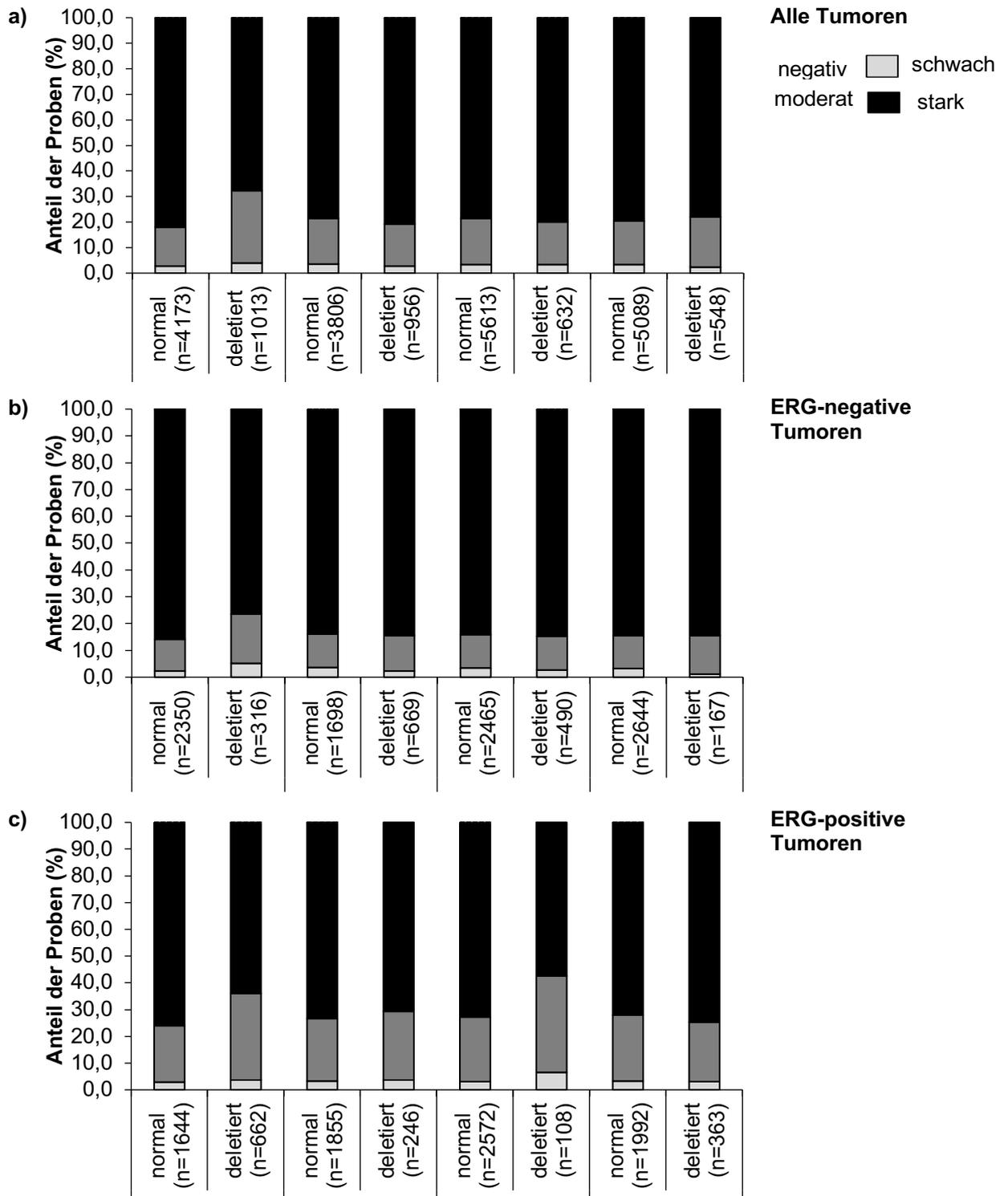


Abbildung 9. PSA-IHC und Deletionen in a) allen Tumoren, b) ERG-negativen und c) ERG-positiven Tumoren (1:1'350).

3.1.1.8 Prognoserelevanz in PTEN-deletierten Tumoren

Die PTEN-Deletion ist die am besten etablierte prognostische molekulare Veränderung bei Prostatakarzinomen (Wang and Dai, 2015). Dementsprechend sind die meisten molekularen Faktoren, die bei Prostatakarzinomen prognostisch relevant sind in der Untergruppe der PTEN-deletierten Tumoren, welche bereits durch eine schlechte Prognose charakterisiert sind, nicht mehr prognostisch relevant. Für die PSA-Expression zeigt sich allerdings in dieser Gruppe besonders aggressiver Tumoren eine hochgradige Prognoserelevanz (Abb. 10, $p < 0,0001$).

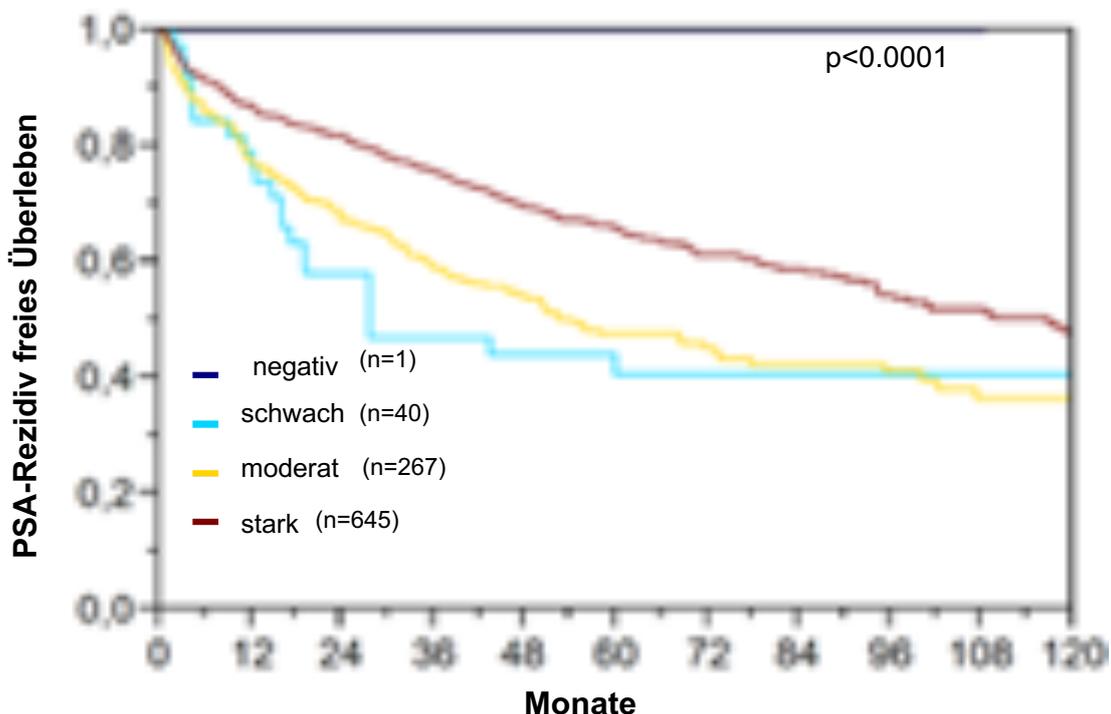


Abbildung 10. PSA-Expression und biochemisches Rezidiv in PTEN-deletierten Tumoren (1:1'350).

3.1.1.9 Prognoserelevanz der PSA-Expression in Tumoren mit identischem klassischen und quantitativen Gleason Grad

Die prognostische Bedeutung der PSA-Expression ist in Abb. 11 a-h) für Gruppen gezeigt, die durch einen identischen klassischen Gleason Grad (Abb. 11a)) bzw. quantitativen Gleason Grad (Abb. 11 b-h)) gekennzeichnet sind. Die Darstellung macht deutlich, dass bei Betrachtung von Gruppen mit identischem Gleason Grad, die PSA-Expression sowohl in den Kategorien Gleason 3+4 ($p < 0,0001$) als auch 4+3 ($p < 0,0001$) und Gleason $\geq 4+4$ ($p = 0,0036$) prognoserelevant ist. Die Prognoserelevanz der PSA-Expression geht in den kleineren, besser definierten Untergruppen von Tumoren mit identischem quantitativem Gleason Grad weitgehend verloren. Lediglich in der Gruppe der 4+3 Karzinome mit 61-

100% Gleason 4 Anteil findet sich eine grenzwertige Prognoserelevanz der PSA Expression ((Abb. 11h), $p=0,0109$).

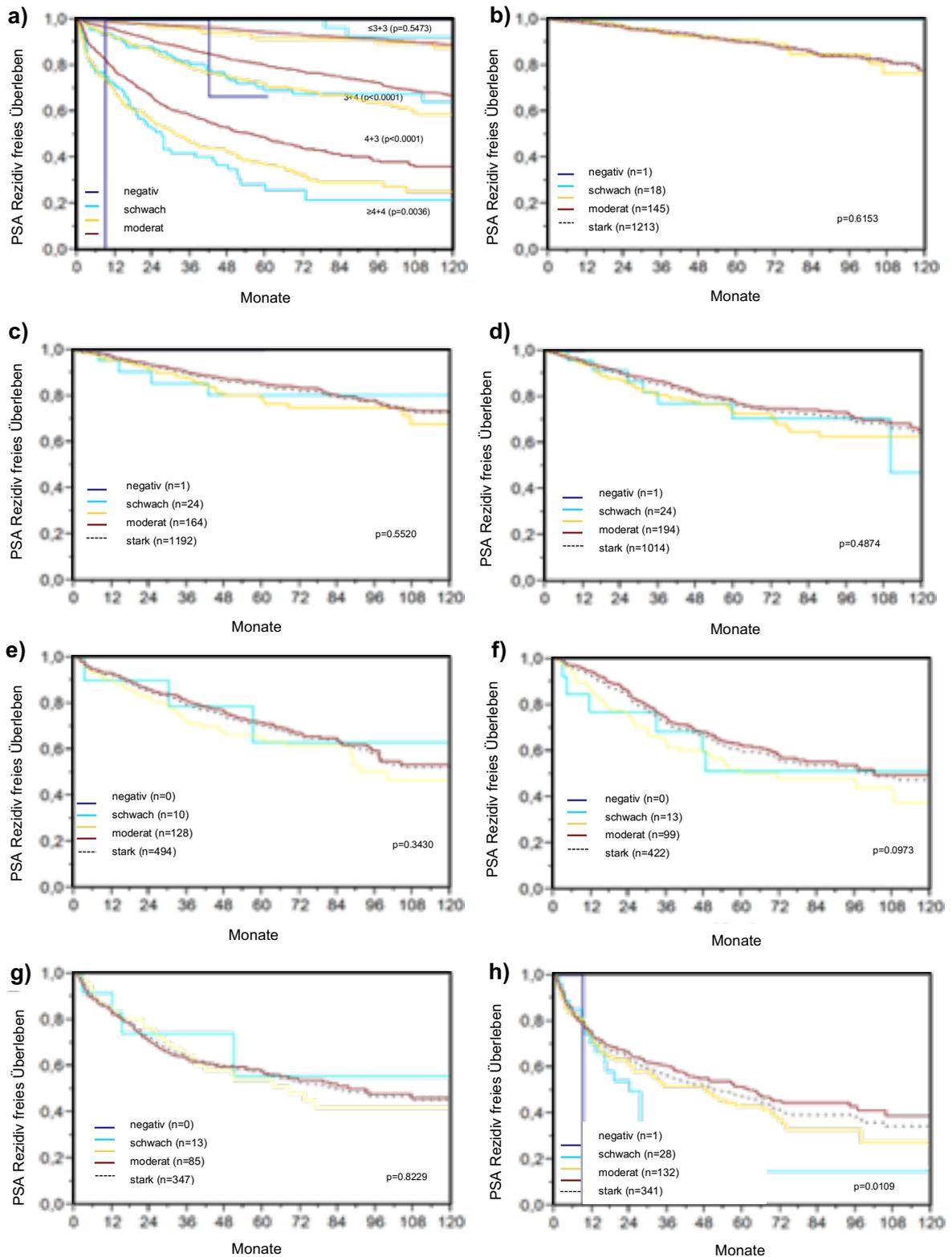


Abbildung 11. PSA-Expression und biochemisches Rezidiv in a) klassischen Gleason Grad Gruppen, b-h) quantitativen Gleason Grad Gruppen (1:1'350).

3.1.1.10 PSA-Expression und Tumorzellproliferation

Die Beziehung zwischen der PSA-Expression und der Tumorzellproliferation, der mittels Antikörper gegen Ki67 Protein (exprimiert in allen Zellen der G1-, S-, G2- und M-Phase) ermittelt wurde, ist in Tabelle 8 dargestellt. Dabei zeigt sich, dass in definierten Gruppen mit identischem Gleason Grad eine marginale Beziehung zwischen den Parametern PSA-Färbung und Ki67-Labeling Index besteht. Generell gilt, dass eine kräftige PSA-Expression tendenziell mit einer eher geringeren Proliferationsaktivität vergesellschaftet ist.

Tabelle 8. PSA-Expression und Ki-67-Labeling Index (1:1'350).

ki67	Marker	n=	ki67 LI (Median)
alle p<0.0001	negativ	4	1.00±1.32
	schwach	144	3.91±0.22
	moderat	896	3.49±0.09
	stark	4569	2.55±0.04
pGleason ≤3+3 p=0.0093	negativ	2	1.00±1.47
	schwach	21	2.24±0.45
	moderat	112	2.79±0.20
	stark	1088	2.11±0.06
pGleason 3+4 p<0.0001	negativ	2	1.00±1.62
	schwach	47	2.85±0.33
	moderat	474	3.24±0.11
	stark	2551	2.45±0.05
pGleason 3+4 Tert.5 p=0.5864	negativ	0	0.00±0.00
	schwach	9	2.33±0.82
	moderat	33	3.27±0.43
	stark	172	3.16±0.19
pGleason 4+3 p=0.0007	negativ	0	0.00±0.00
	schwach	21	5.52±0.72
	moderat	130	3.86±0.29
	stark	410	3.09±0.16
pGleason 4+3 Tert.5 p=0.2106	negativ	0	0.00±0.00
	schwach	14	5.14±1.01
	moderat	72	4.21±0.45
	stark	216	3.61±0.26
pGleason ≥4+4 p=0.1032	negativ	0	0.00±0.00
	schwach	31	5.45±0.78
	moderat	75	4.88±0.50
	stark	130	3.88±0.38

3.1.2 Niedrige PSA-Antikörper Konzentration (1:36'450)

3.1.2.1 Technische Aspekte

Von 17'752 untersuchten Prostatakarzinomen waren 13'033 (73,42%) auswertbar, die anderen Proben waren entweder durch ein Fehlen der gesamten Gewebeslots oder ein Fehlen von eindeutigen Tumorzellen nicht beurteilbar.

3.1.2.2 PSA-Expression, Tumorphänotyp und Prognose

In der höheren Antikörper Verdünnung zeigen die meisten Prostatakarzinome eine kräftige Färbung mit unserem Antikörper. Beispiele von typischen Fällen mit unterschiedlichem Gleason Grad sind in den Abbildungen 12-14 dargestellt. Im Gegensatz zu den stärker gefärbten Präparaten bei einer Verdünnung von 1:1'350, zeigten mehr Tumoren eine Tendenz zu einer apikalen Dominanz der PSA Färbung.

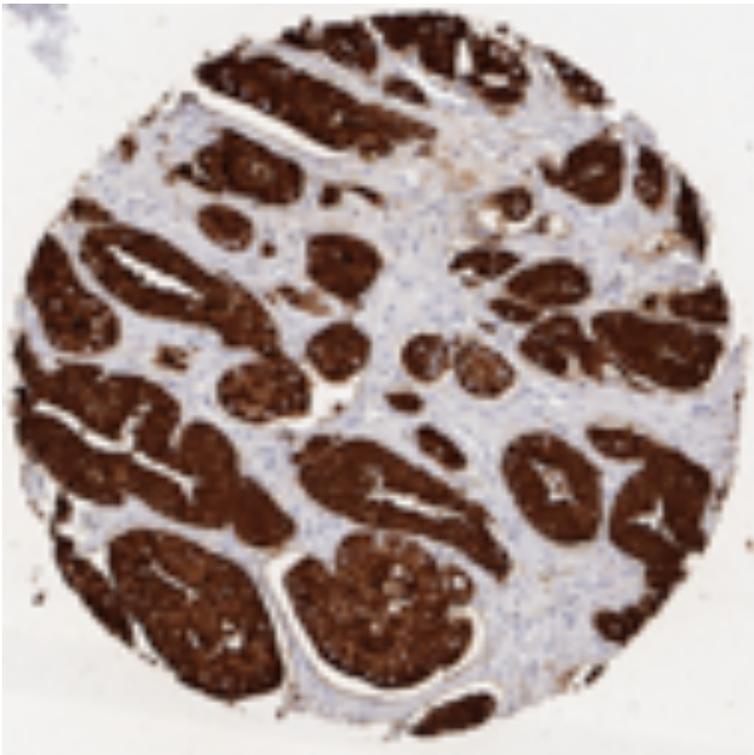


Abbildung 12. Prostatakarzinom Gleason Grad 3+3 (1:36'450).

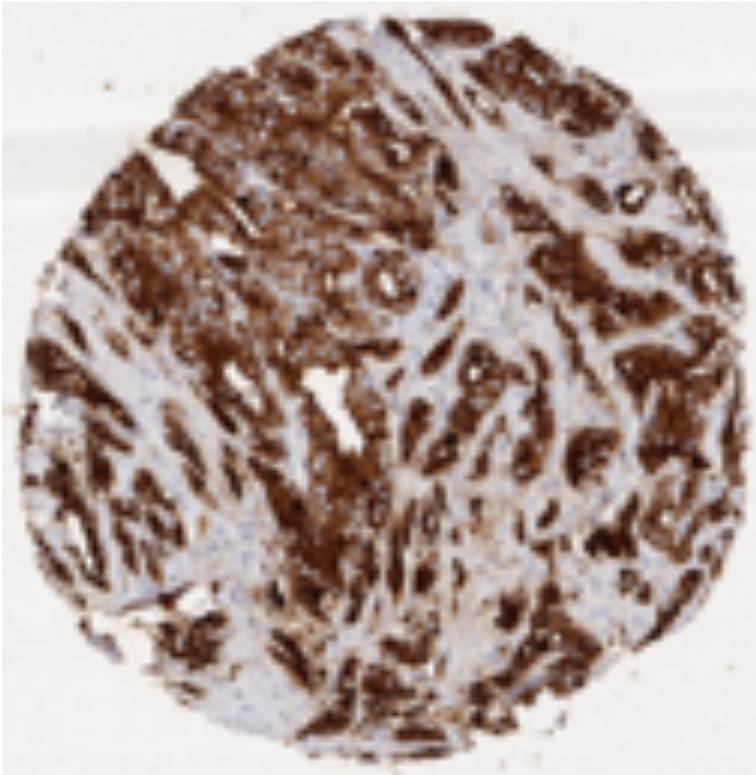


Abbildung 13. Prostatakarzinom Gleason Grad 4+3 (1:36'450).

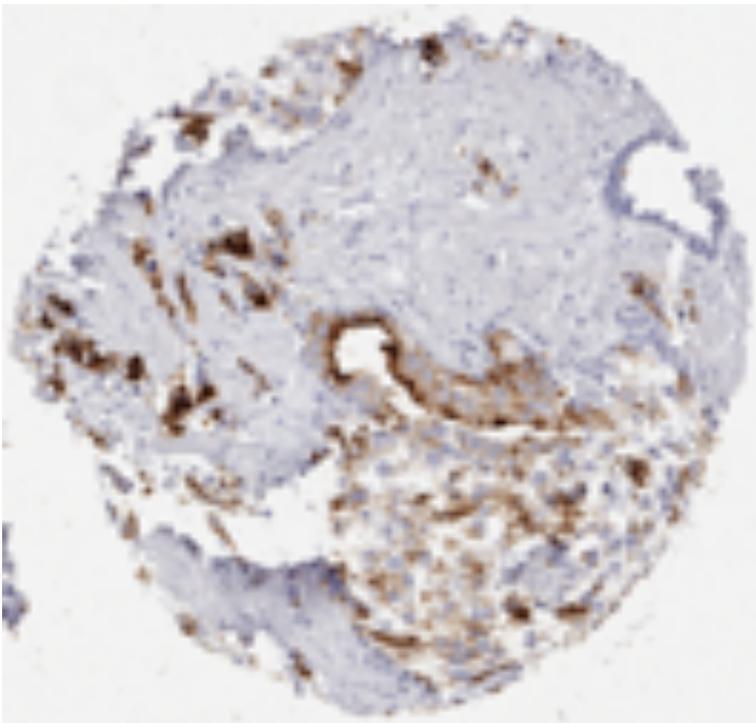


Abbildung 14. Prostatakarzinom Gleason Grad 4+5 (1:36'450).

Tabelle 9. PSA-Expression und Tumorphänotyp (1:36'450).

Parameter	n auswertbar	negativ (%)	schwach (%)	moderat (%)	stark (%)	p-Wert	
Alle Tumoren	13033	0.7	15.5	44.2	39.5		
Tumorstadium							
pT2	8270	0.6	10.7	42.2	46.5	<0.0001	
pT3a	2943	0.3	19.2	49.1	31.4		
pT3b-pT4	1767	2.0	32.0	45.0	20.9		
Gleason Grad							
≤3+3	2459	0.9	9.4	38.2	51.5	<0.0001	
3+4	6911	0.4	12.9	44.9	41.8		
3+4 Tert.5	598	0.3	17.4	45.5	36.8		
4+3	1296	1.6	21.7	47.8	28.9		
4+3 Tert.5	939	0.2	27.1	48.5	24.3		
≥4+4	745	2.7	34.8	44.2	18.4		
Quantitativer Gleason Grad							
≤3+3	2459	0.9	9.4	38.2	51.5	<0.0001	
3+4 ≤5%	1766	0.5	9.7	41.3	48.6		
3+4 6-10%	1730	0.5	12.5	43.9	43.1		
3+4 11-20%	1540	0.2	13.2	46.8	39.7		
3+4 21-30%	785	0.0	15.2	48.9	35.9		
3+4 31-49%	634	0.5	14.0	47.0	38.5		
3+4 Tert.5	598	0.3	17.4	45.5	36.8		
4+3 50-60%	539	0.6	17.1	49.5	32.8		
4+3 Tert.5	939	0.2	27.1	48.5	24.3		
4+3 61-100%	595	1.7	24.7	45.2	28.4		
≥4+4	650	2.3	33.4	45.5	18.8		
Lymphknoten Metastasen							
N0	7833	0.7	15.7	46.4	37.2		<0.0001
N+	977	1.7	33.3	44.8	20.2		
Präoperativer PSA Wert (ng/ml)							
<4	1529	1.4	17.9	42.8	37.9	<0.0001	
4-10	7702	0.6	14.0	43.8	41.6		
10-20	2754	0.6	16.3	45.1	37.9		
>20	964	0.8	21.8	46.9	30.5		
Resektionsrand							
negativ	10337	0.6	13.9	44.0	41.4	<0.0001	
positiv	2648	1.0	21.8	45.0	32.2		

Die Beziehung zu Tumorphänotyp und Prognose ist in Tabelle 9 dargestellt. Für pT-Stadium, Gleason Grad, quantitativer Gleason Grad, Lymphknotenmetastasen und R-Status gilt jeweils dasselbe. Eine hohe PSA-Expression ist mit einer günstigen phänotypischen Situation assoziiert ($p < 0,0001$). Dementsprechend ist eine reduzierte PSA-

Expression mit einer ungünstigen Patientenprognose assoziiert (Abb. 15, $p < 0,0001$). Stark oder moderat gefärbte Tumore zeigen eine unverkennbar bessere Prognose als schwach oder nicht gefärbte Tumore.

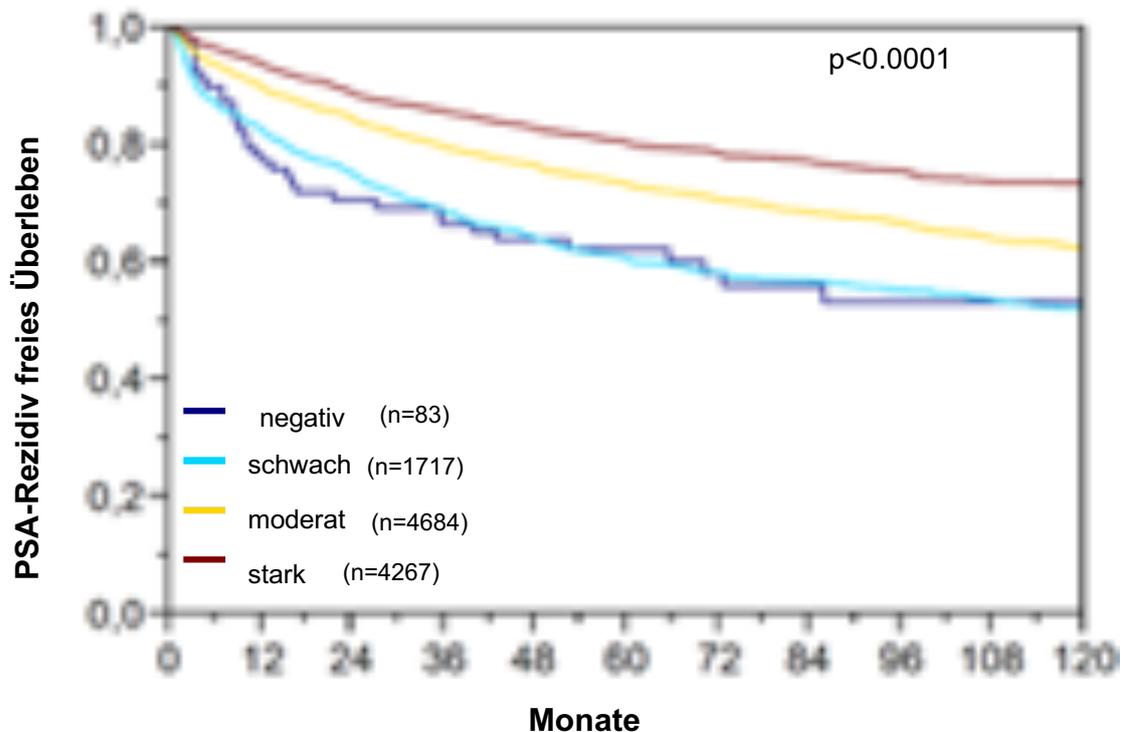


Abbildung 15. PSA-Expression und biochemisches Rezidiv (1:36'450).

3.1.2.3 Der Zusammenhang zwischen der PSA-Expression und ERG-Status

Die Beziehung zwischen der PSA Expression und dem ERG-Status ist in Abb. 16 dargestellt. Unabhängig von der für die Bestimmung des ERG-Status verwendeten Methode (Immunhistochemie oder FISH), findet sich in den ERG-positiven Tumoren eine geringere PSA-Expression als in den ERG-negativen. Diese Unterschiede sind statistisch hoch signifikant ($p < 0,0001$).

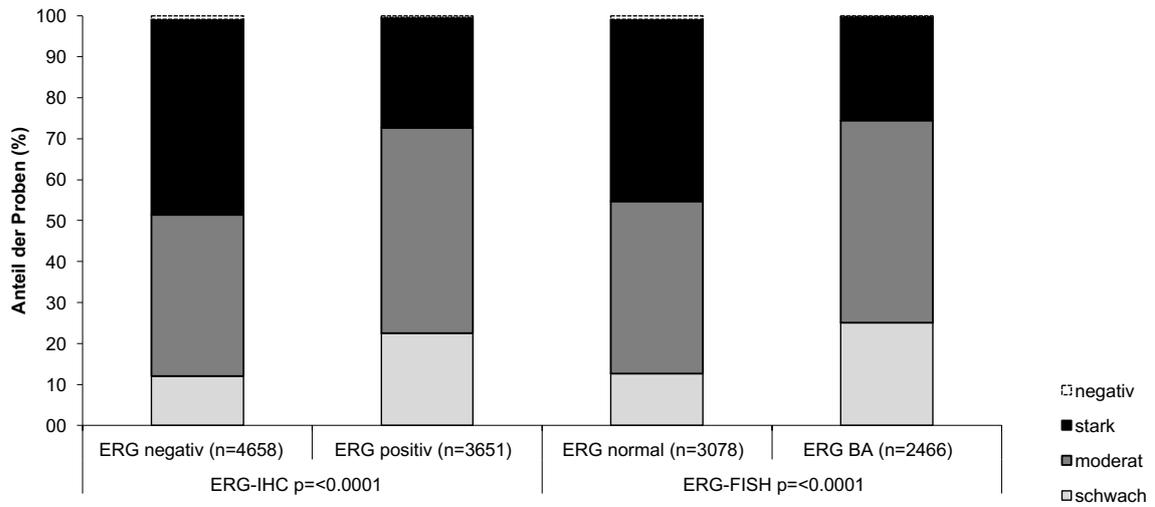


Abbildung 16. PSA-Expression und ERG-Status (IHC, FISH) (1:36'450).

3.1.2.4 Phänotyp und Prognose in ERG-negativen Karzinomen

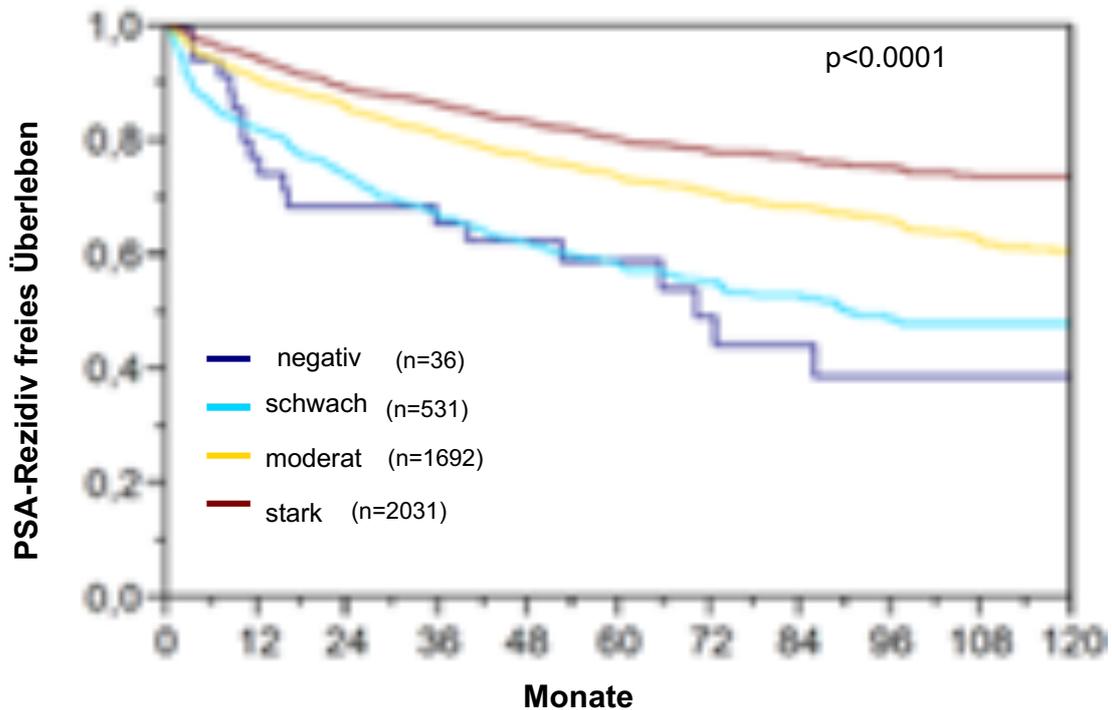


Abbildung 17. PSA-Expression und biochemisches Rezidiv in ERG-negativen Karzinomen (1:36'450).

Tabelle 10. PSA-Expression und Phänotyp in ERG-negativen Karzinomen (1:36'450).

Parameter	n auswertbar	negativ (%)	schwach (%)	moderat (%)	stark (%)	p-Wert
Alle Tumoren	4658	0.9	12.0	39.4	47.7	
Tumorstadium						
pT2	3087	0.6	8.3	37.1	54.0	<0.0001
pT3a	963	0.5	14.8	44.4	40.2	
pT3b-pT4	595	2.9	26.7	43.0	27.4	
Gleason Grad						
≤3+3	914	0.8	6.6	33.9	58.8	<0.0001
3+4	2443	0.5	9.4	39.0	51.1	
3+4 Tert.5	209	0.5	15.8	38.8	45.0	
4+3	514	2.1	17.7	44.0	36.2	
4+3 Tert.5	297	0.0	20.5	46.5	33.0	
≥4+4	279	3.9	30.5	45.2	20.4	
Quantitativer Gleason Grad						
≤3+3	914	0.8	6.6	33.9	58.8	<0.0001
3+4 ≤5%	647	0.5	6.8	35.7	57.0	
3+4 6-10%	634	0.5	7.6	38.2	53.8	
3+4 11-20%	552	0.4	10.5	40.0	49.1	
3+4 21-30%	275	0.0	11.3	48.0	40.7	
3+4 31-49%	249	0.8	11.6	37.8	49.8	
3+4 Tert.5	209	0.5	15.8	38.8	45.0	
4+3 50-60%	215	0.9	13.0	46.5	39.5	
4+3 Tert.5	297	0.0	20.5	46.5	33.0	
4+3 61-100%	250	1.6	22.0	40.4	36.0	
≥4+4	247	3.2	30.4	45.3	21.1	
Lymphknoten Metastasen						
N0	2701	0.9	12.0	42.7	44.4	<0.0001
N+	283	3.9	32.2	41.3	22.6	
Präoperativer PSA Wert (ng/ml)						
<4	478	1.5	15.3	37.0	46.2	<0.0001
4-10	2739	0.8	10.5	38.7	50.0	
10-20	1045	0.7	12.3	40.9	46.1	
>20	371	1.6	18.1	43.9	36.4	
Resektionsrand						
negativ	3710	0.8	10.7	38.8	49.8	<0.0001
positiv	935	1.4	17.3	41.7	39.6	

Die wegen der in ERG-positiven und ERG-negativen unterschiedlichen PSA-Expressionsniveaus vorgenommene separate Untersuchung ERG-positiver und ERG-negativer Tumoren, ergab für die ERG-negativen Tumore eine hoch signifikante Beziehung zwischen einer hohen PSA-Expression und einem günstigen Phänotyp (Tabelle 10,

p<0,0001). Zusätzlich war die prognostische Bedeutung der PSA-Expression in dieser Gruppe deutlich vorhanden (Abb.17, p<0,0001).

3.1.2.5 Phänotyp und Prognose in ERG-positiven Karzinomen

Die Beziehung zwischen Tumorphänotyp und PSA-Expression ist für die ERG-positiven Tumoren in Tabelle 11 dargestellt. Hier besteht eine hoch signifikante Korrelation zwischen einem günstigen Phänotyp und einer hohen PSA-Expression für alle Parameter (p<0,0001). Zudem besteht in dieser Untergruppe ein hoch signifikanter Zusammenhang mit der Patientenprognose (Abb. 18, p<0,0001).

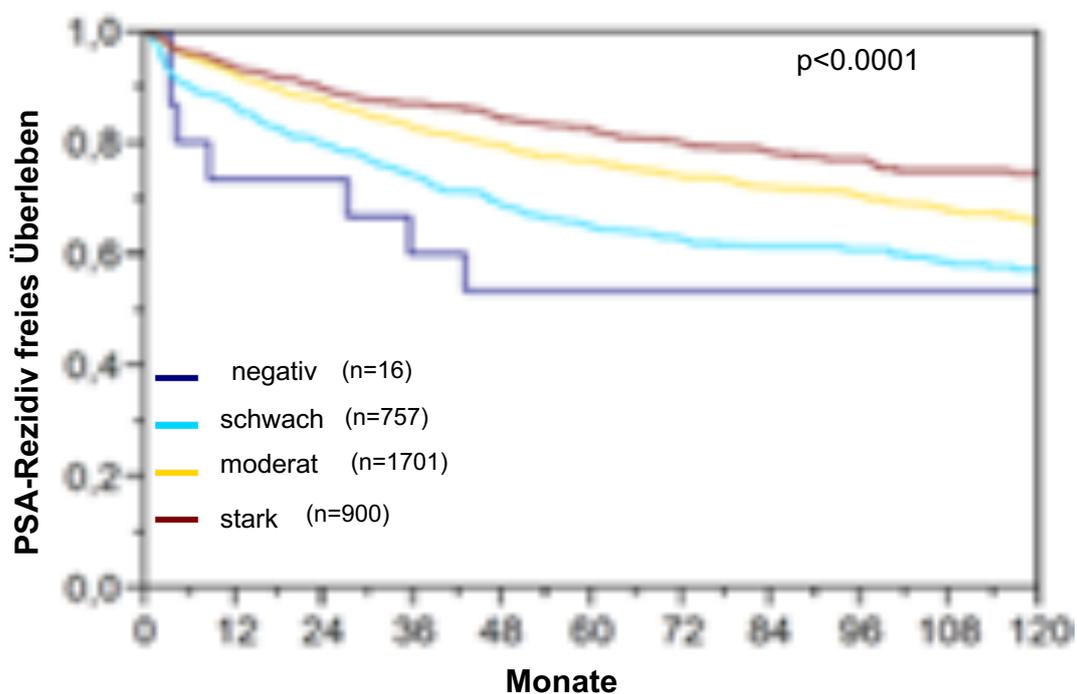


Abbildung 18. PSA-Expression und biochemisches Rezidiv in ERG-positiven Karzinomen (1:36'450).

Tabelle 11. PSA-Expression und Phänotyp in ERG-positiven Karzinomen (1:36'450).

Parameter	n auswertbar	negativ (%)	schwach (%)	moderat (%)	stark (%)	p-Wert
Alle Tumoren	3651	0.4	22.5	50.2	26.9	
Tumorstadium						
pT2	2173	0.4	16.7	50.3	32.6	<0.0001
pT3a	983	0.1	27.0	52.8	20.1	
pT3b-pT4	480	1.5	39.2	44.0	15.4	
Gleason Grad						
≤3+3	767	0.5	14.2	49.3	36.0	<0.0001
3+4	2085	0.2	21.0	51.2	27.6	
3+4 Tert.5	106	0.9	24.5	51.9	22.6	
4+3	359	1.4	31.5	51.3	15.9	
4+3 Tert.5	200	0.5	38.5	47.5	13.5	
≥4+4	132	0.8	43.9	37.9	17.4	
Quantitativer Gleason Grad						
≤3+3	767	0.5	14.2	49.3	36.0	<0.0001
3+4 ≤5%	529	0.0	16.4	50.3	33.3	
3+4 6-10%	544	0.4	21.1	49.3	29.2	
3+4 11-20%	460	0.0	22.2	53.5	24.3	
3+4 21-30%	261	0.0	24.5	50.2	25.3	
3+4 31-49%	180	0.0	23.3	57.8	18.9	
3+4 Tert.5	106	0.9	24.5	51.9	22.6	
4+3 50-60%	160	0.6	26.3	51.9	21.3	
4+3 Tert.5	200	0.5	38.5	47.5	13.5	
4+3 61-100%	164	1.2	36.0	49.4	13.4	
≥4+4	111	0.0	39.6	40.5	19.8	
Lymphknoten Metastasen						
N0	2082	0.5	24.4	50.7	24.4	<0.0001
N+	237	0.0	38.8	45.1	16.0	
Präoperativer PSA Wert (ng/ml)						
<4	499	1.4	20.6	49.5	28.5	<0.0001
4-10	2248	0.2	20.8	50.3	28.7	
10-20	653	0.5	25.9	51.1	22.5	
>20	223	0.4	33.6	48.0	17.9	
Resektionsrand						
negativ	2859	0.4	20.3	51.0	28.4	<0.0001
positiv	777	0.6	30.5	47.1	21.8	

3.1.2.6 Multivariate Analyse

Die Multivariate Analyse zur Klärung der Unabhängigkeit der Prognoserelevanz der PSA-Expression ergab bei der Verdünnung 1:36'450 eine unabhängige Prognoserelevanz in allen Szenarien für die Gesamtpopulation aller Tumoren und für die ERG-negativen

Tumoren. In den ERG-positiven Karzinomen bestand nur in den Szenarien 3 und 4 eine tendenzielle prognostische Unabhängigkeit (Szenario 3 $p=0,0574$; Szenario 4 $p=0,0016$) (Tabelle 12).

Tabelle 12. Multivariate Analyse (1:36'450).

Tumor Subgruppe	Szenario	n auswertbar	p-Wert							
			Präoperativer PSA-Wert	pT Stadium	cT Stadium	Gleason Grad RPE	Gleason Grad Biopsie	pN Stadium	R Status	PSA-Expression
Alle Tumoren	1	6984	<0.0001	<0.0001	-	<0.0001	-	<0.0001	<0.0001	0.0195
	2	10630	<0.0001	<0.0001	-	<0.0001	-	-	<0.0001	0.011
	3	10467	<0.0001	-	<0.0001	<0.0001	-	-	-	<0.0001
	4	8947	<0.0001	-	<0.0001	-	<0.0001	-	-	<0.0001
ERG-negativ	1	2751	0.0001	<0.0001	-	<0.0001	-	0.0004	0.1049	0.0004
	2	4278	<0.0001	<0.0001	-	<0.0001	-	-	0.006	0.0018
	3	4237	<0.0001	-	<0.0001	<0.0001	-	-	-	<0.0001
	4	4168	<0.0001	-	<0.0001	-	<0.0001	-	-	<0.0001
ERG-positiv	1	2150	0.0168	<0.0001	-	<0.0001	-	0.2046	0.0006	0.4593
	2	3361	0.0001	<0.0001	-	<0.0001	-	-	<0.0001	0.3335
	3	3304	<0.0001	-	<0.0001	<0.0001	-	-	-	0.0574
	4	3250	<0.0001	-	<0.0001	-	<0.0001	-	-	0.0016

3.1.2.7 PSA-Expression und chromosomale Deletionen

Die Beziehung zwischen chromosomalen Deletionen und der PSA-Expression ist für die hier gewählte PSA-Antikörperverdünnung (1:36'450) in Abb. 19 für alle Tumoren wie auch für die Untergruppen der ERG-negativen und ERG-positiven Karzinome dargestellt.

Es zeigt sich in erster Linie eine deutlich signifikante Beziehung zwischen einer reduzierten PSA-Expression und dem Vorliegen von PTEN-Deletionen. Auch für das Vorliegen von 5q21 und 6q15 Deletionen bestehen in allen Untergruppen statistisch signifikante Beziehungen, auch wenn diese meistens weniger deutlich ausgeprägt sind als für PTEN. Für 3p13 besteht eine Tendenz zur geringeren PSA-Expression in Tumoren mit einer Deletion, dies vor allem in ERG-positiven Tumoren ($p=0,0068$).

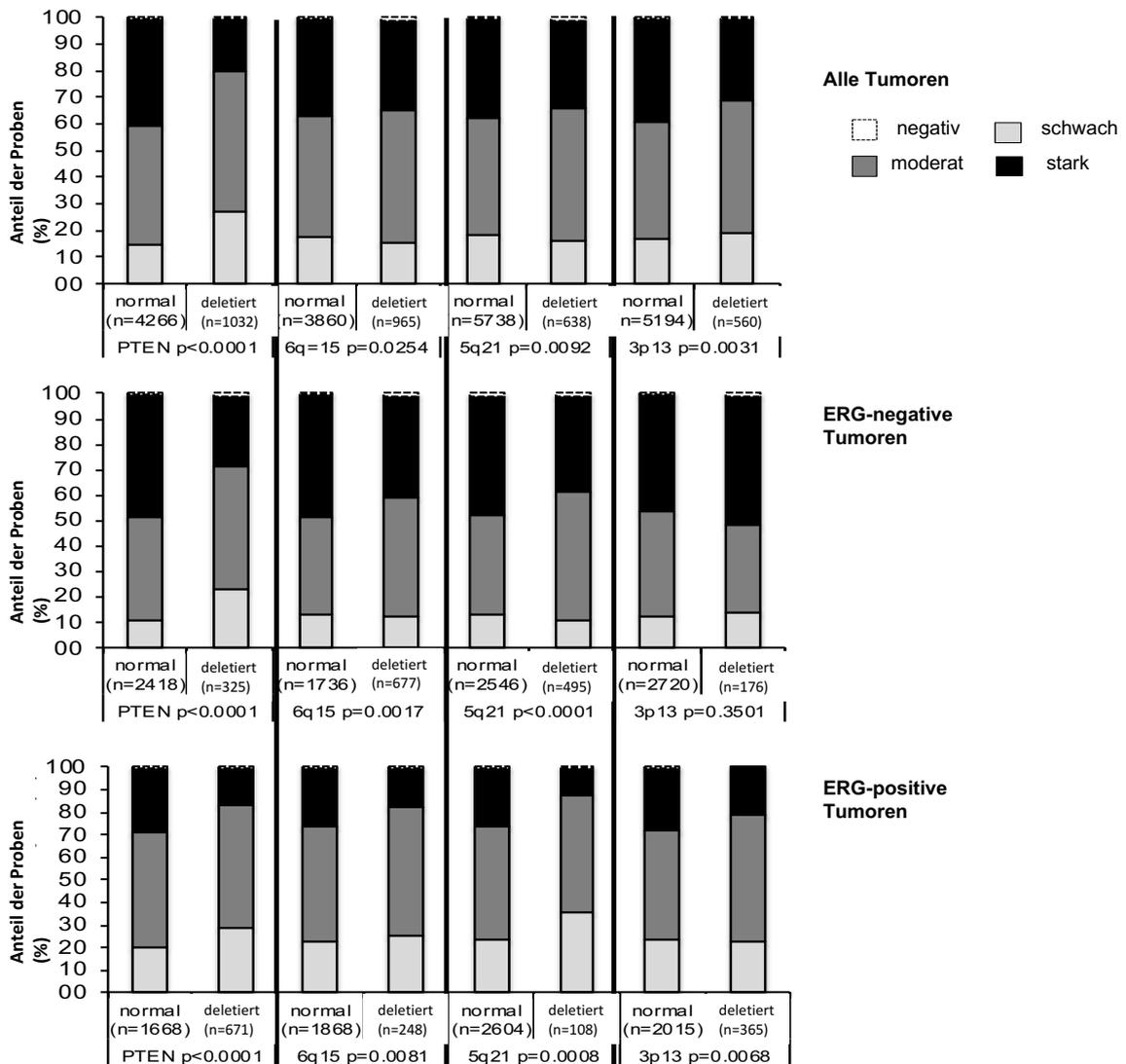


Abbildung 19. PSA-IHC und Deletionen in a) allen Tumoren, b) ERG-negativen und c) ERG-positiven Tumoren (1:36'450).

3.1.2.8 Prognoserelevanz in PTEN-deletierten Tumoren

Die PSA Immunhistochemie ergab mit der Verdünnung 1:36'450 bei PTEN-deletierten Tumoren eine signifikante Beziehung zwischen hoher PSA-Expression und günstiger Prognose (Abb. 20).

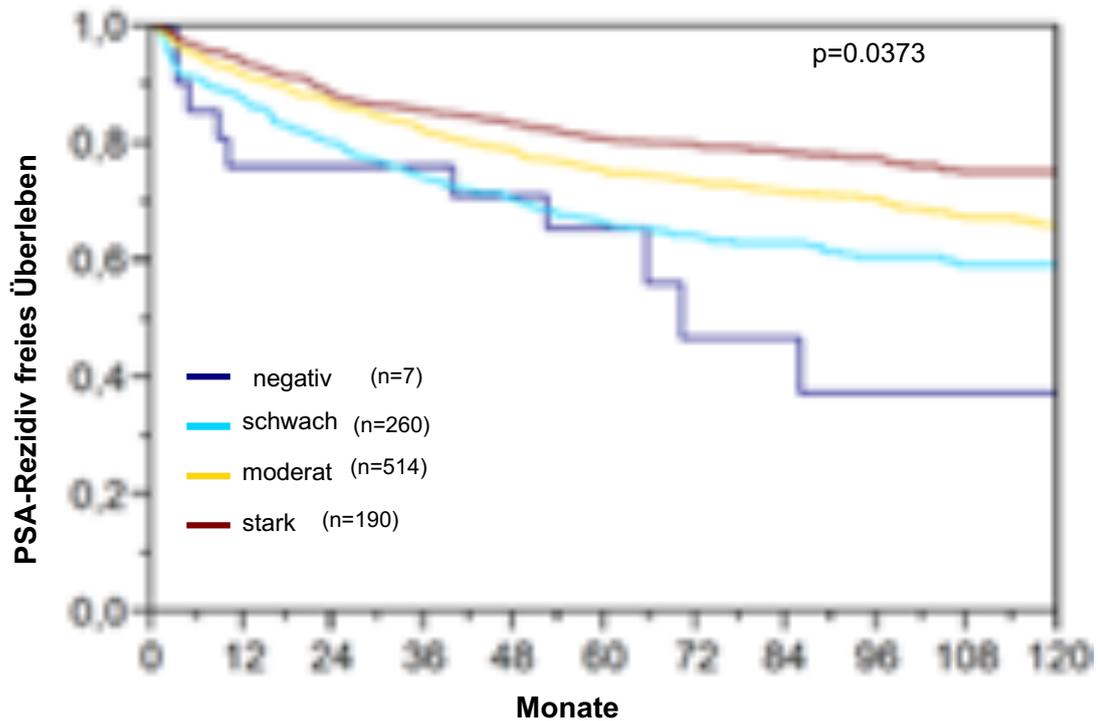


Abbildung 20. PSA-Expression und biochemisches Rezidiv in PTEN-deletierten Tumoren (1:36'450).

3.1.2.9 Prognoserelevanz der PSA-Expression in Tumoren mit identischem klassischem und quantitativem Gleason Grad

Die Beziehung zwischen PSA-Expression und Gleason Grad Gruppen ist für diese Verdünnung in Abbildung 21 a-h) dargestellt. Die Darstellung zeigt, dass in allen klassischen Gleason Graden die PSA-Expression prognostische Relevanz besitzt. Bei feinerer Aufteilung der Gleason 7 Karzinome nach dem quantitativen Gleason Grad ergibt sich lediglich für die Untergruppen der Tumore mit einem Gleason 4 Anteil von 21-30% ((Abb. 21e), $p=0,0152$) und die Tumoren mit einem Gleason 4 Anteil von 61-100% ((Abb. 23h), $p=0,0169$) eine signifikante prognostische Bedeutung.

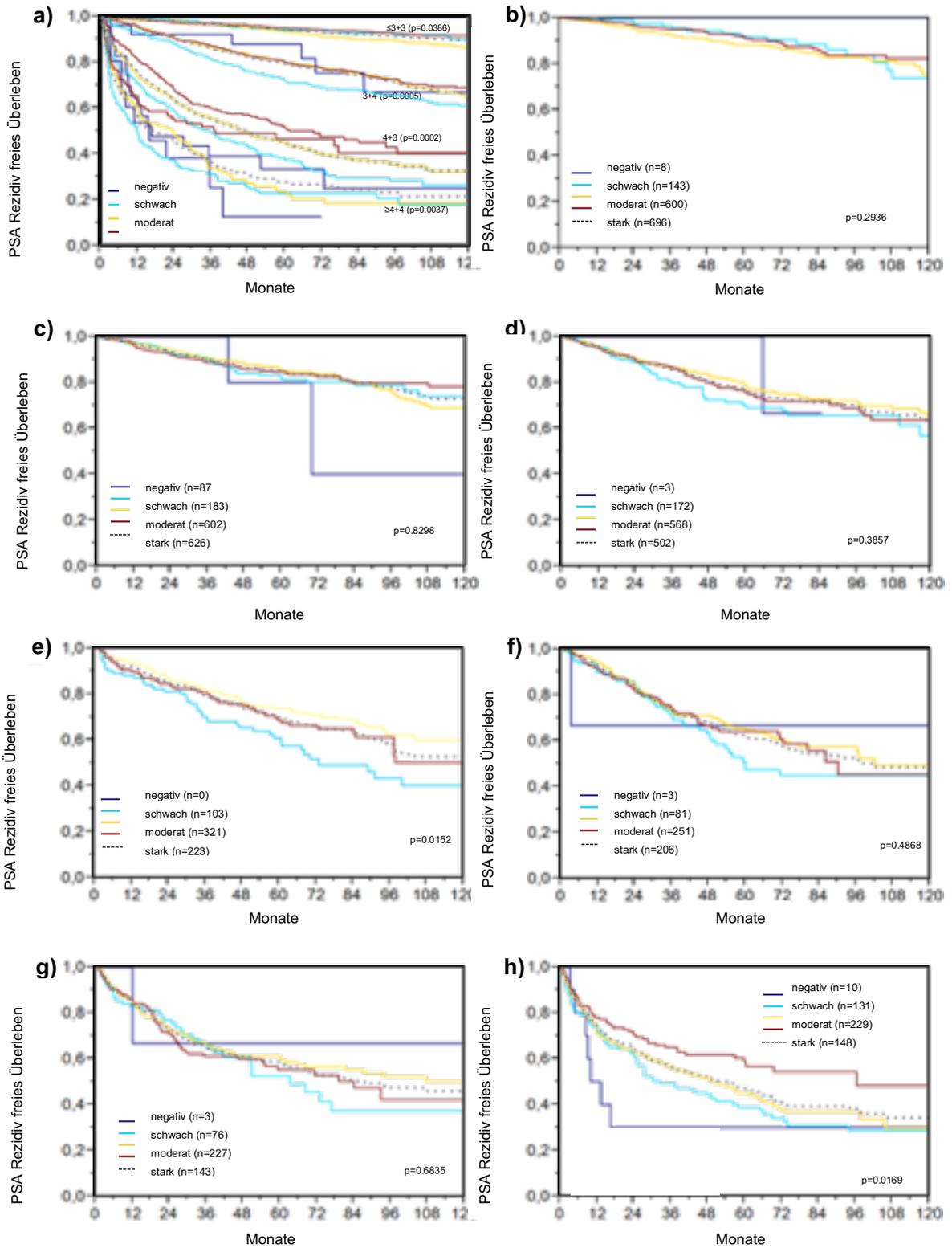


Abbildung 21. PSA-Expression und biochemisches Rezidiv in a) klassische Gleason Grad Gruppen, b-h) quantitative Gleason Grad Gruppen.

3.1.2.10 PSA-Expression und Tumorzellproliferation

Die Beziehung zwischen PSA-Expression und dem Ki67-Labeling Index ist für alle Tumoren und für Gruppen mit identischem Gleason Grad in Tabelle 13 dargestellt. Auch hier findet sich eine Tendenz zu einer geringeren Proliferationsrate in Tumoren mit hoher PSA-Expression. Diese Tendenz ist aber weniger ausgeprägt als bei vielen früher untersuchten molekularen Parametern (Stumm *et al.*, 2013; Burdelski, Menan, *et al.*, 2015; Melling *et al.*, 2017).

Tabelle 13. PSA-Expression und Ki-67-Labeling Index (1:36'450).

ki67	Marker	n=	ki67 LI (Median)
alle p<0.0001	negativ	27	3.70±0.51
	schwach	900	3.45±0.09
	moderat	2563	2.82±0.05
	stark	2231	2.35±0.06
pGleason ≤3+3 p=0.0050	negativ	5	1.80±0.92
	schwach	115	2.43±0.19
	moderat	517	2.33±0.09
	stark	595	1.93±0.08
pGleason 3+4 p<0.0001	negativ	6	1.50±0.95
	schwach	463	3.08±0.11
	moderat	1433	2.71±0.06
	stark	1249	2.28±0.07
pGleason 3+4 Tert.5 p=0.8250	negativ	1	1.00±2.51
	schwach	38	3.11±0.41
	moderat	90	3.22±0.26
	stark	92	3.27±0.26
pGleason 4+3 p=0.0853	negativ	8	4.75±1.17
	schwach	126	3.92±0.29
	moderat	266	3.20±0.20
	stark	165	3.10±0.26
pGleason 4+3 Tert.5 p=0.0686	negativ	0	0.00±0.00
	schwach	74	4.70±0.45
	moderat	142	3.81±0.32
	stark	85	3.29±0.42
pGleason ≥4+4 p=0.0260	negativ	7	6.14±1.62
	schwach	83	5.31±0.47
	moderat	113	3.88±0.40
	stark	45	3.31±0.64

3.2 Multitumor Tissue Microarray (und Tissue Microarray mit fortgeschrittenen Prostatakarzinomen)

3.2.1 PSA-Immunhistochemie (1:1'350)

Bei dieser Untersuchung waren von insgesamt 3'659 Gewebeprobe des Multitumor Arrays 2'835 (77,48%) auswertbar und von 439 Proben des TMA mit fortgeschrittenen rezidivierenden Prostatakarzinomen waren 260 (59,23%) auswertbar. Die Untersuchung ergab eine PSA-Positivität in 10'994 Proben der Prostatakarzinome, wobei die Intensität meist stark oder moderat war. Nur 22 (0,20%) Prostatakarzinome waren PSA-negativ. 11 dieser PSA-negativen Tumoren waren kleinzellige Prostatakarzinome (50%). Immerhin 2/13 (15,38%) kleinzellige Prostatakarzinome waren aber PSA-positiv. Von 2'835 in diesem Multitumor Array untersuchten Tumoren, die nicht aus der Prostata stammten, waren 37 positiv (1,29%). Alle Tumortypen, von denen mindestens ein Tumor positiv war, sind in Tabelle 14 dargestellt, zusammen mit den Ergebnissen aus dem Tissue Microarray mit fortgeschrittenen Prostatakarzinomen.

Tabelle 14. PSA-Immunhistochemie in Prostata- und anderen Karzinomen.

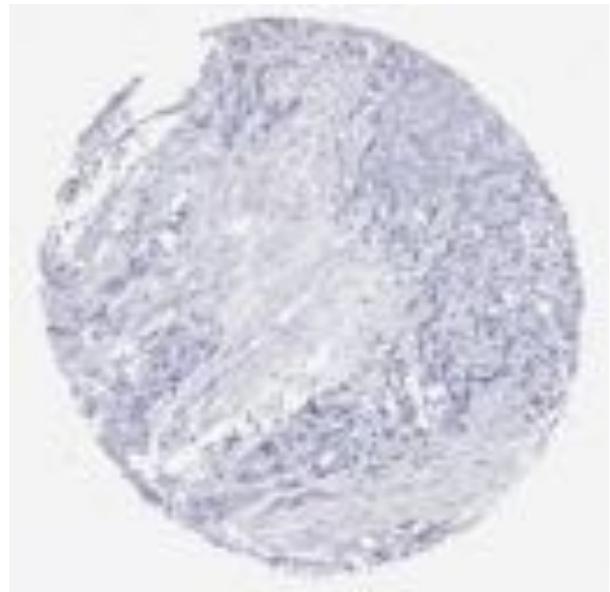
	Auswertbar (n)		PSA-positiv (%)	
	<i>PSA Antikörper Konzentration</i>		<i>PSA Antikörper Konzentration</i>	
	<i>niedrig (1:36'450)</i>	<i>hoch (1:1'350)</i>	<i>niedrig (1:36'450)</i>	<i>hoch (1:1'350)</i>
Prostatatumoren				
Gleason <4+3	9337	9104	99,89	99,96
Gleason 4+3	1289	1265	99,38	99,92
Primärtumor ca. ≥8	233	216	98,71	99,07
Rezidivierend ca. ≥8	392	383	98,72	99,74
CR ca. Gleason ≥8	26	35	84,62	91,43
Kleinzellige Karzinome	13	13	7,69	15,38
<i>Gesamt</i>	<i>11290</i>	<i>11016</i>	<i>99,63</i>	<i>99,80</i>
Nicht-prostatische Tumoren				
Malignes Mesotheliom	37	39	0,00	28,21
Osteosarkom	19	19	0,00	21,05
Seröses Ovarialkarzinom	45	45	0,00	8,89
Endometrioides Ovarialkarzinom	30	32	6,67	6,25
Klarzelliges Nierenzellkarzinom	48	48	0,00	6,25
Plattenepithelkarzinom, Vagina	36	39	0,00	5,13
Plattenepithelkarzinom, Blase	18	18	0,00	5,56
Muzinöses Ovarialkarzinom.	22	23	0,00	4,35
Papilläres Schilddrüsenkarzinom	48	47	0,00	4,26
Anaplastisches Schilddrüsenkarzinom.	24	23	0,00	4,35
Liposarkom	39	35	0,00	2,86
Adenokarzinom, Lunge	38	39	0,00	2,56
Cholangiozelluläres Karzinom	33	39	0,00	2,56
Leiomyosarkom	48	48	0,00	2,08
Karzinom	47	48	0,00	2,08
Karzinom, Mundhöhle	49	49	0,00	2,04
<i>Total</i>	<i>581</i>	<i>591</i>	<i>0,34</i>	<i>6,26</i>
Andere Tumortypen	2254	2286	0,00	0,00

3.2.2 PSA-Immunhistochemie (1:36'450)

Bei der Untersuchung waren von insgesamt 3'659 Gewebeproben des Multitumor Arrays 2'835 (77,48%) auswertbar und von 419 Proben des TMA mit fortgeschrittenen rezidivierenden Prostatakarzinomen waren 270 (64,44%) auswertbar. Die Zahl der PSA-negativen Prostatakarzinome erhöhte sich bei Verwendung der niedrigeren Antikörperkonzentration nur gering (Tab. 14). Die Unterschiede beliefen sich bei Karzinomen mit Gleason <4+3, Gleason 4+3, Primärtumoren mit einem Gleason ≥ 8 und bei rezidivierenden, nicht-sicher hormon-refraktären Tumoren auf weniger als 1%. Immerhin noch 98,72% der rezidivierenden Karzinome mit einem Gleason ≥ 8 waren PSA-positiv. Repräsentative Beispiele von Tumoren des fortgeschrittenen Prostatakarzinom TMA sind in den Abbildungen 31-33 a-b) dargestellt. Der Rückgang des Anteils der PSA-positiven Prostatakarzinomen war merkbarer bei den kastrationsresistenten Karzinomen (Gleason ≥ 8) (84,62% vs. 91,43%) (siehe Abb. 33 a-b)) und bei den kleinzelligen Karzinomen. Bei diesem Subtyp war eines von zweien vorher positiven Tumoren jetzt negativ (Abb. 22 a und b).



a) (1:1'350).

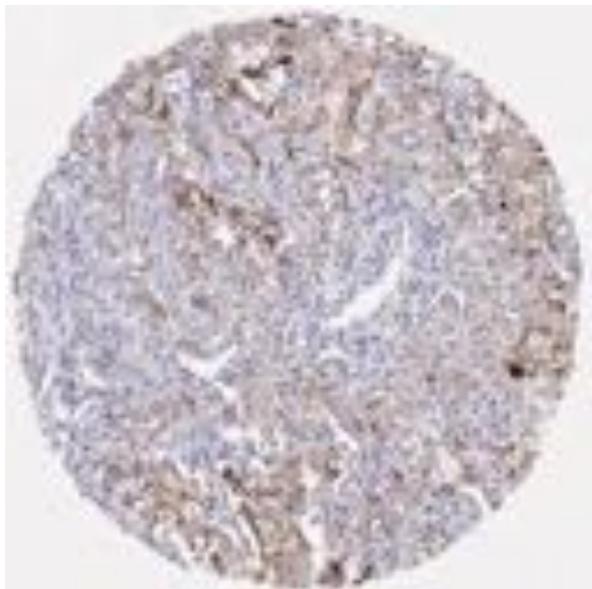


b) (1:36'450).

Abbildung 22. Kleinzelliges Prostatakarzinom

Währenddessen die Sensitivität der Prostatakarzinom Diagnostik durch die 27-fache Verdünnung des Antikörpers wenig beeinträchtigt war, ergab sich somit eine deutlich höhere Spezifität.

Repräsentative Beispiele von extraprostatatischen Tumoren mit positiver PSA-Färbung bei einer Verdünnung von 1:1'350 aber negativem Färbegergebnis bei einer Verdünnung von 1:36'450 sind in den Abbildungen 23-29 a) und b) dargestellt. Abbildung 30 a-c) zeigt ein Färbeartefakt, dass bei der ersten Auswertung zu einem falsch positiven Ergebnis geführt hat. Bei diesem papillärem Nierenzellkarzinom fand sich in beiden Färbekonzentrationen eine granuläre Färbung, die sich in der Intensität nicht veränderte. Es handelt sich hierbei um Hämosiderin-Pigment (Abb. 30 c)).

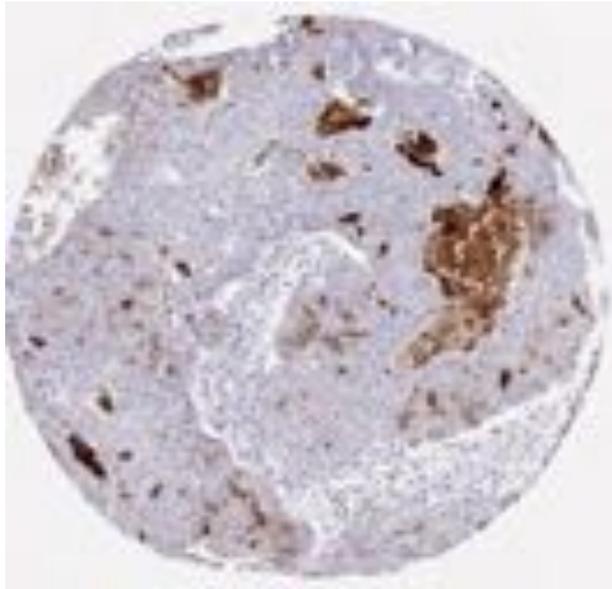


a) (1:1'350).

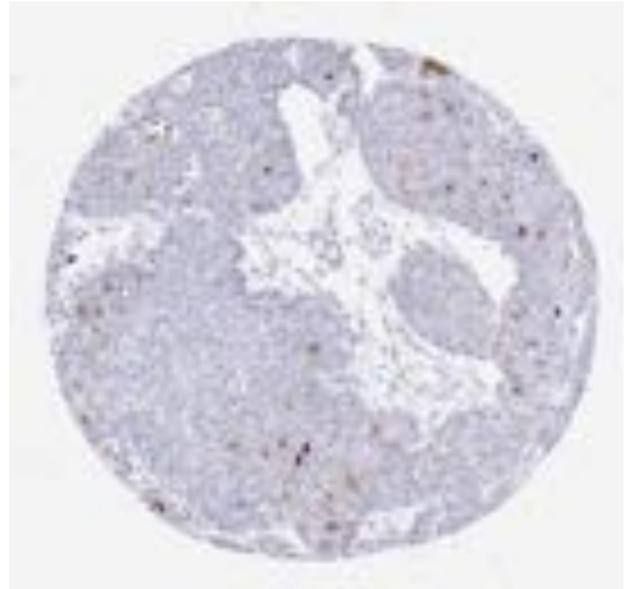


b) (1:36'450).

Abbildung 23. Endometrioides Ovarialkarzinom

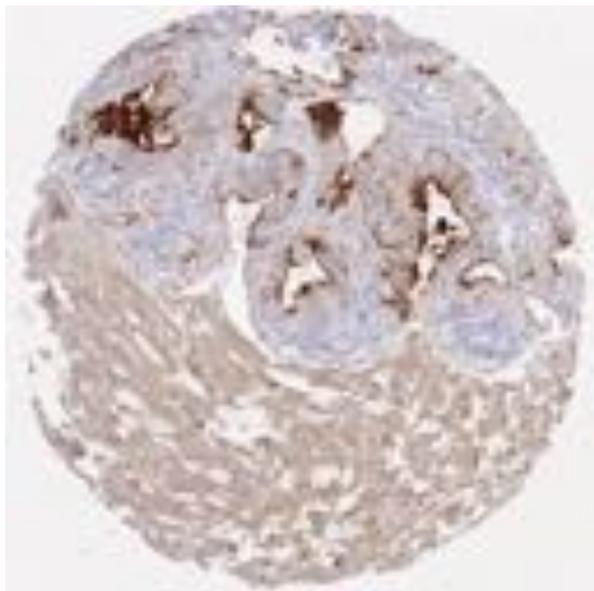


a) (1:1'350).

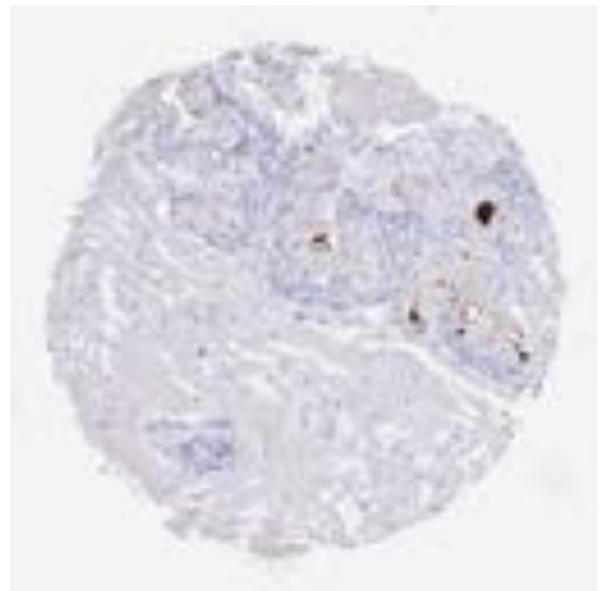


b) (1:36'450).

Abbildung 24. Adenokarzinom der Lunge

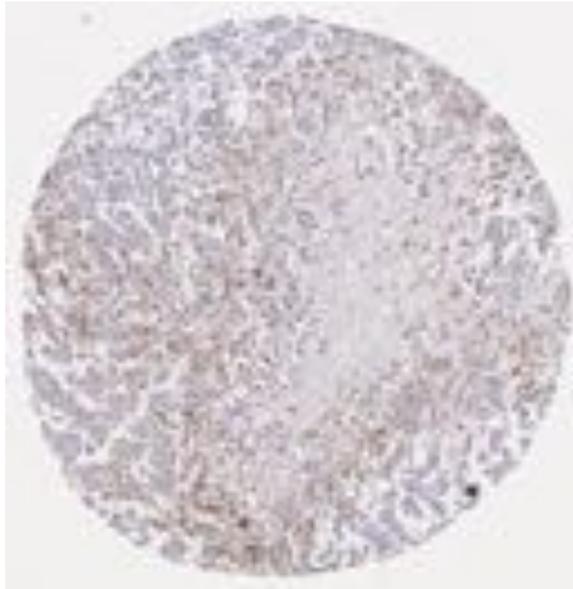


a) (1:1'350).

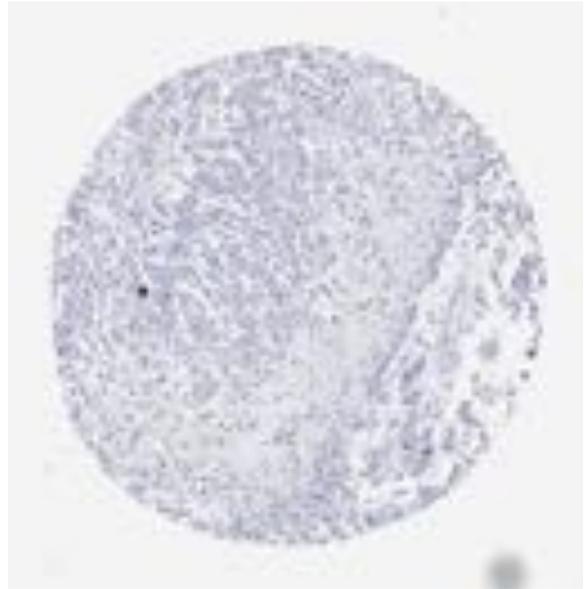


b) (1:36'450).

Abbildung 25. Endometrioides Ovarialkarzinom

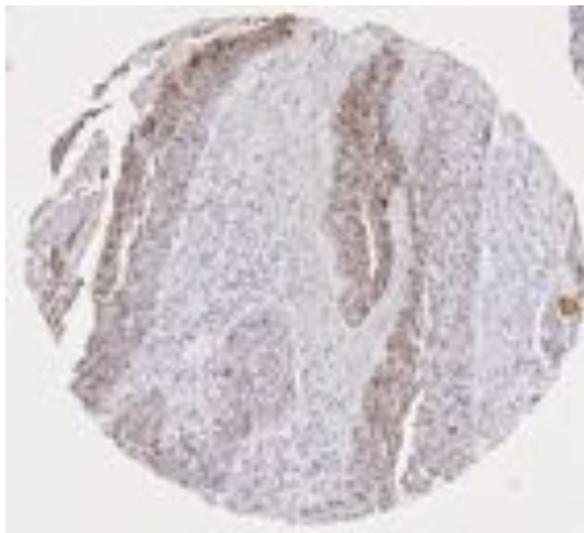


a) (1:1'350).

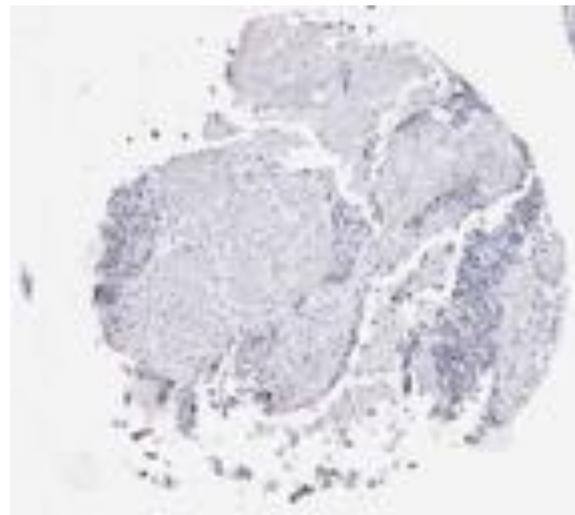


b) (1:36'450).

Abbildung 26. Seröses Ovarialkarzinom

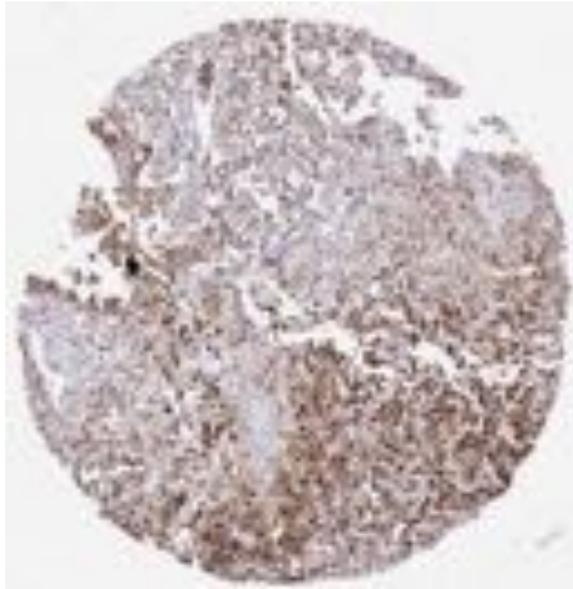


a) (1:1'350).

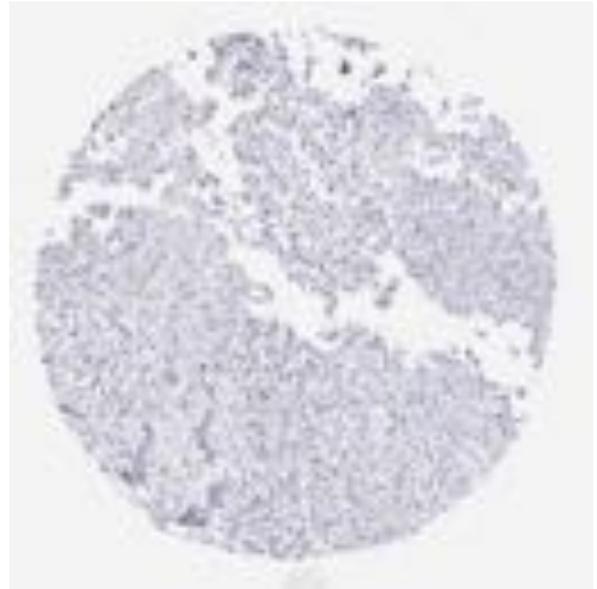


b) (1:36'450).

Abbildung 27. Plattenepithelkarzinom der Vagina

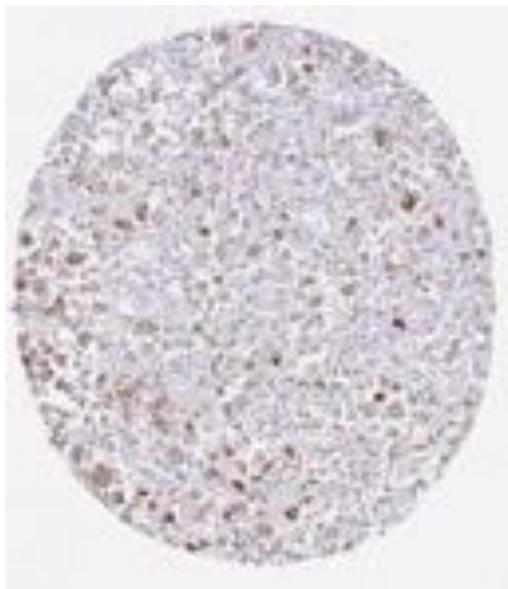


a) (1:1'350).

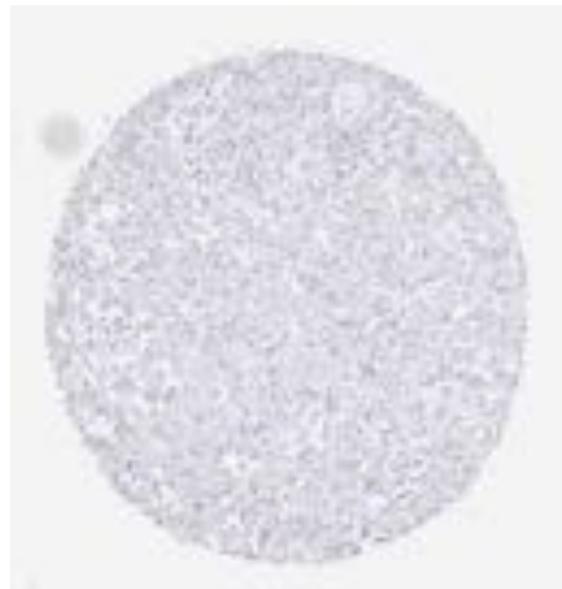


b) (1:36'450).

Abbildung 28. Osteosarkom



a) (1:1'350).



b) (1:36'450).

Abbildung 29. Malignes Mesotheliom



a) (1:1'350).

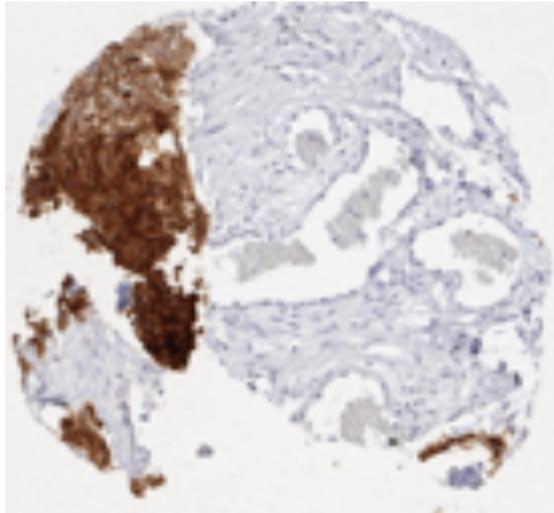


b) (1:36'450).

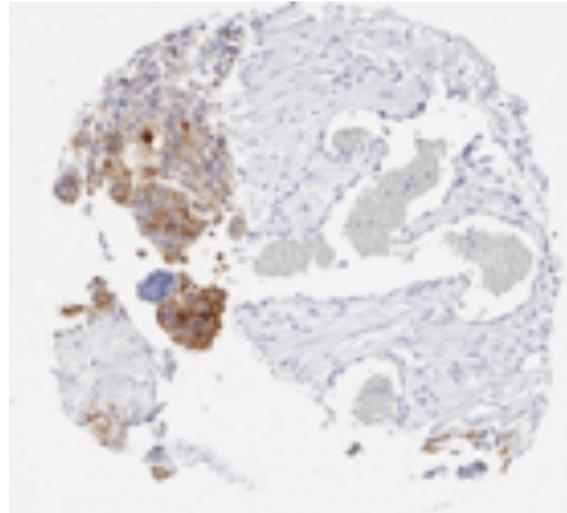


c) (1:1'350)

Abbildung 30. Papilläre Nierenzellkarzinome

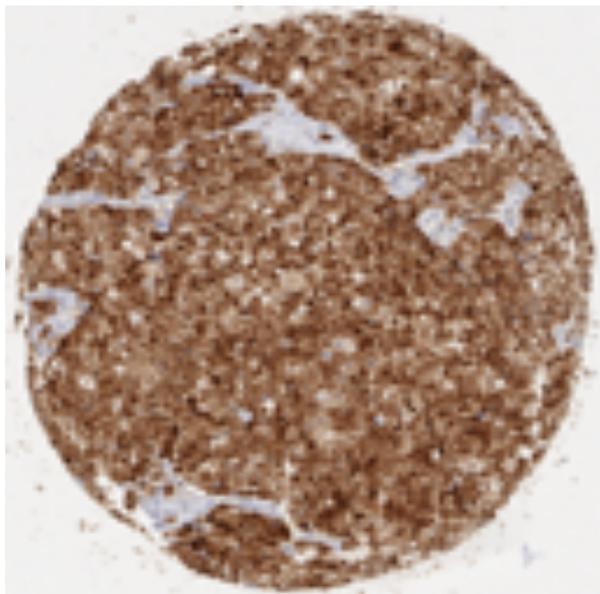


a) (1:1'350).

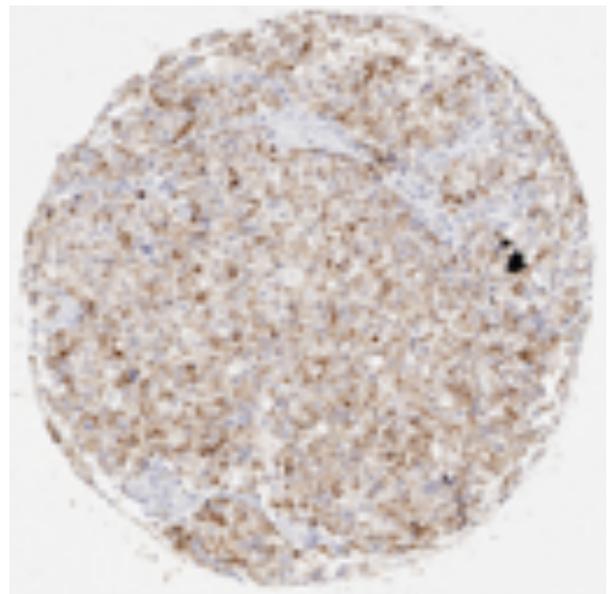


b) (1:36'450).

Abbildung 31. Hormonrefraktäres Prostatakarzinom Gleason Grad 4+4

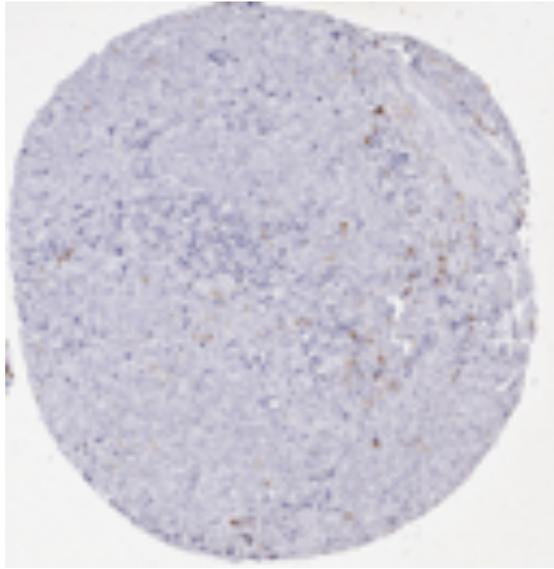


a) (1:1'350).

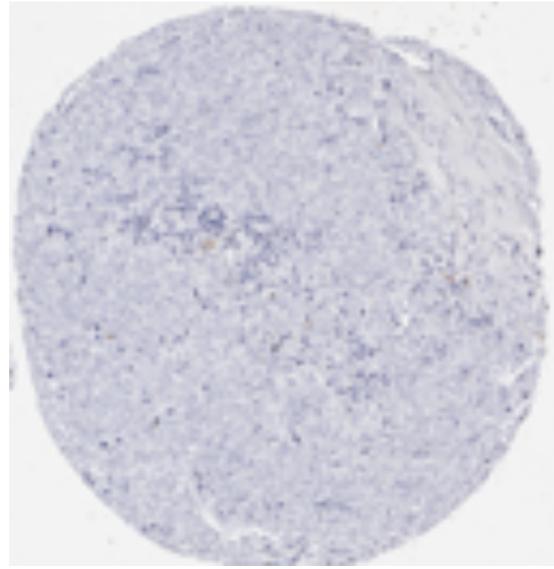


b) (1:36'450).

Abbildung 32. Hormonrefraktäres Prostatakarzinom Gleason Grad 5+4



a) (1:1'350).



b) (1:36'450).

Abbildung 33. Hormonrefraktäres Prostatakarzinom Gleason Grad 5+4

4 Diskussion

Die vorliegende Studie ist die weltweit erste Untersuchung, bei der an einem sehr großen Patientenkollektiv eine immunhistochemische Analyse mit zwei verschiedenen Antikörper-Verdünnungen vorgenommen wurde. Die Untersuchung führt zur Identifikation eines optimalen Protokolls für die Diagnostik und zeigt eine erhebliche Prognoserelevanz der PSA-Expression beim Prostatakarzinom. Schlüssel für die Durchführung einer derartigen Studie ist die TMA-Technik, die die gleichzeitige Untersuchung von tausenden von Tumoren mittels in-situ Methoden ermöglicht. Die Vorteile der TMA-Technik sind neben der Geschwindigkeit der Untersuchung, die geringen Kosten. Mit der gleichen Arbeitsleistung und Reagenzienmenge, die mit konventionellen Methoden für die Untersuchung von einem Tumor nötig wäre, können mit der TMA-Technik 600 Tumoren untersucht werden. Als Nachteil wird bei der TMA-Methode die Kleinheit der untersuchten Gewebefragmente gesehen. Zahlreiche Autoren hatten, nach der Erstbeschreibung der TMA-Methode durch Kononen 1998 (Kononen *et al.*, 1998), die möglicherweise mangelnde Repräsentativität von TMA-Untersuchungen wegen der lediglich 0,6mm messenden Gewebeproben pro Patient kritisiert (Moch *et al.*, 2001; Koo *et al.*, 2019). Dieser „Nachteil“ ist allerdings für Untersuchungen bei denen Reagenzien oder Protokolle miteinander verglichen werden ein massiver Vorteil. Für jeden einzelnen Tumor erfolgte der Vergleich der beiden Protokolle an konsekutiven Gewebeschnitten an einem genau definierten Gewebeareal, so dass davon ausgegangen werden kann, dass von jedem Tumor weitgehend identische Strukturen untersucht wurden. Angesichts der bekannten Tumorerogenität, die insbesondere beim Prostatakarzinom sehr ausgeprägt ist (Ciccarese *et al.*, 2017), ist dies ein wesentlicher Vorteil unseres Untersuchungsansatzes. Die am weitesten verbreitete Anwendung der PSA-Immunhistochemie ist die Zuordnung von Metastasen unbekannter Herkunft zu einem Prostatakarzinom. Der Vergleich der beiden Protokolle zeigte, dass die PSA-Immunhistochemie bei Verwendung des hochkonzentrierten Antikörpers (1:1'350) zwar sehr sensitiv aber nicht komplett spezifisch ist. Besorgniserregend war insbesondere, dass zahlreiche Tumorentitäten, die auch im Knochen angetroffen werden können, PSA positiv waren. Dies gilt für die ebenso wie das Prostatakarzinom häufig in die Knochen metastasierenden Schilddrüsen-, Nieren- und Lungenkarzinome. Darüber hinaus waren mehrere Osteosarkome PSA-positiv. Dieser Befund unserer Studie induzierte sogar eine nachträgliche Überprüfung der früher diagnostizierten Osteosarkome, da die Sorge aufkam, die Osteosarkome könnten verkannte Prostatakarzinom-Metastasen gewesen sein. Frühere Studien hatten in Einzelfällen über eine PSA-Positivität in extraprostatatischen Tumoren berichtet. Vornehmlich hatten mehrere Studien über PSA-positive Mammakarzinome berichtet. Beispielsweise fanden Poh *et al.* eine PSA-Positivität in 8/20 (40%) der invasiv duktalem Karzinomen (Poh *et al.*, 2008) und Alanen *et al.* berichteten über

eine PSA-Positivität in 54/171 (32%) der Mammakarzinome unterschiedlicher Typen (Alanen *et al.*, 1999). Weiter hatten andere Autoren über PSA-positive Mammakarzinome berichtet (Bodey und E Kaiser, 1997; Heyl *et al.*, 1999; Miller, Unger und Bleiweiss, 2001; Ilvan *et al.*, 2004; Narita *et al.*, 2005, 2006; Kraus, Cohen und Siddiqui, 2010) (und Tumoren der Brust des Mannes (Carder *et al.*, 2005; Kraus, Cohen und Siddiqui, 2010)). Ferner hatten unterschiedliche Autoren über PSA-Positivitäten bei Speicheldrüsentumoren (Krieken, 1993; Elgamal *et al.*, 1996; James *et al.*, 1996; Tazawa *et al.*, 1999), Tumoren der paraurethralen Drüsen (Svanholm, Andersen und Rohl, 1987; Spencer, Brodin und Ignatoff, 1990; Zaviacic, Sidlol und Borovsk, 1993; Ebisuno, Miyai und Nagareda, 1995; Sloboda *et al.*, 1998), Melanomen (Bodey und E Kaiser, 1997), Blasen- (Grignon *et al.*, 1991) und Pankreaskarzinomen (Kuopio *et al.*, 1995) berichtet. Hingegen fanden wir in unserer Untersuchung weder bei Mammakarzinomen noch bei Speicheldrüsentumoren, selbst in der hoch konzentrierten Anwendung unseres Antikörpers, positive Färbungen.

Die Verwendung einer 27-fach verdünnten Antikörperkonzentration zeigt, dass eine Protokollmodifikation einen Antikörper wesentlich spezifischer machen kann. Bei dieser Konzentration gingen praktisch alle vorher nachgewiesenen Färbungen bei extraprostatischen Karzinomen verloren. Lediglich zwei endometrioiden Ovarialkarzinome zeigten weiterhin eine PSA-Positivität. Die gleiche PSA-Positivität wurde auch bei Verwendung unseres polyklonalen Routine-Standardantikörpers (Dako) gefunden, so dass wir in diesem Fall tatsächlich von einer aberranten PSA-Expression ausgehen. In der Literatur findet man einen Fallbericht von Yu *et al.*, indem ein PSA-positives endometrioides Ovarialkarzinom beschrieben wird (Yu *et al.*, 1995). Angesichts der in Tumoren häufig anzutreffenden Dysregulation der Expression von zahlreichen Genen, erscheint es nicht erstaunlich, dass eine neoplastische Zelle ein Gen aktiviert, das für die Zelle nicht von Nutzen ist. Ein anderes Beispiel ektopter Proteinexpression durch Tumoren sind die sog. paraneoplastischen Syndrome, wobei Tumorzellen Proteine exprimieren welche auch klinische Symptome erzeugen können (Dimitriadis *et al.*, 2017). Grundsätzlich sollte eine Zuordnung eines Tumors – auch wegen der Möglichkeit einer ektopter Proteinexpression – nie auf Grund eines einzigen positiven immunhistochemischen Befundes erfolgen. Hervorzuheben ist bei der Untersuchung mit dem niedrigkonzentrierten Antikörper, die immer noch sehr hohe Sensitivität bei wenig differenzierten Adenokarzinomen der Prostata, die in fast allen Tumorkategorien bei größer 98% lag. Dies zeigt das die PSA-Immunhistochemie eine hervorragende Methode zur Sicherung der Diagnose des Prostatakarzinoms ist.

Die erhebliche prognostische Relevanz der PSA-Färbung war erwartet worden. In einer früheren Doktorarbeit von Frau Franziska Eisner (Eisner, 2019) war die prognostische Rolle

von PSA alleine und vor allem in Kombination mit dem verwandten, ebenfalls Prostata-spezifischen Protein KLK2, gezeigt worden. In dieser Untersuchung war das PSA-immunhistochemische Protokoll, wie allgemein üblich, zufällig gewählt worden. Das wichtige Ergebnis der hier vorliegenden Untersuchung ist die Tatsache, dass eine praktisch gleichwertige Prognoserelevanz bei zwei verschiedenen Verdünnungen, welche um einen Faktor von 27 auseinanderliegen, gefunden werden konnte. In der früheren Studie war zudem bereits dargestellt worden, dass die PSA Expression mit ERG-, PTEN- und teilweise auch mit anderen Deletionen korreliert.

Der PI3K/Akt/mTOR-Signalweg ist in 30-50% der Prostatakarzinome hochreguliert (Yoshimoto *et al.*, 2007; Phin, Moore und Cotter, 2013). Dabei spielt besonders mTOR eine bedeutende Rolle in der Regulation der Proliferation und des Zellüberlebens. Außerdem kann Akt (wenn über den Signalweg aktiviert) mit dem Androgen-Rezeptor interagieren und diesen aktivieren. Aus dieser Aktivierung kann dann, die Hochregulation bestimmter in die Prostatakarzinom-Karzinogenese involvierter Gene (AR-Zielgene) resultieren (Feldman und Feldman, 2001; Velasco und Uemura, 2012). Das Tumorsuppressorgen PTEN fungiert hierbei als wichtigster Inhibitor des PI3K Signalweges. Als negativer Regulator führt der bei Prostatakarzinomen bekannte Verlust von PTEN zu einer Überaktivität von Akt und damit zu einer Stimulation der Zellproliferation und einer verminderten Apoptose (Carnero *et al.*, 2008; Phin, Moore und Cotter, 2013). Weiter deuten Studien an, dass eine Androgene-Stimulation TMPRSS2:ERG Umlagerungen induzieren könnte (Mani *et al.*, 2009; Haffner *et al.*, 2010). Diese Ergebnisse implizieren, dass möglicherweise die Androgen-regulierte transkriptionelle Aktivität verschiedene molekulare Veränderung wie beispielsweise die TMPRSS2:ERG Fusion induzieren könnte (Mani *et al.*, 2009; Haffner *et al.*, 2010; Barbieri *et al.*, 2013). Damit wäre ein Zusammenhang zwischen den verschiedenen Signalwegen hergestellt. Dies wäre eine mögliche Erklärung für die Assoziation von PSA/ERG/PTEN.

Für das Verständnis des Ergebnisses der vorliegenden Untersuchung ist es wichtig, die Möglichkeiten und Limitierungen der Hellfeld-Immunhistochemie zu verstehen. Viele Anwender der Immunhistochemie denken, dass ein negatives Ergebnis einer immunhistochemischen Färbung bedeutet, dass ein Protein in einer Zelle nicht exprimiert wird. Dies ist allerdings falsch. Jede immunhistochemische Untersuchung detektiert Proteine nur dann, wenn sie in einer gewissen Menge vorliegen. Dabei ist die Menge, die durch die Immunhistochemie entdeckt werden kann, vom Färbeprotokoll abhängig. Je nach Protokoll wird eine immunhistochemische Färbung dann positiv, wenn ein gewisser Schwellenwert eines Proteins in der Zelle überschritten wird. Ist mehr Protein da als der Schwellenwert, wird die Färbung stärker. Die Quantifizierung der Färbung geht aber nur bis zu dem Punkt, an dem die Färbung tiefbraun wird. Ist noch mehr Protein in der Zelle

vorhanden, kann das menschliche Auge keine weitere zusätzliche Braunfärbung abgrenzen. Jedes immunhistochemische Protokoll definiert dementsprechend einen Minimalwert, ab dem ein Protein identifiziert werden kann, und einen Maximalwert bis zu dem ein Protein quantitativ beurteilt werden kann. Die Befunde unserer Arbeit zeigen nun an zwei verschiedenen „Fenstern“ eine erhebliche Prognoserelevanz der PSA Färbung. Dies deutet darauf hin, dass eine feinere Messung der PSA Intensität (die gewissermaßen beide Fenster kombinieren würde) eine noch subtilere Prognoseeinschätzung zulassen könnte. Es besteht also ein Bedarf nach einer stärker quantitativen Analyse der PSA-Expression. Denkbar wäre hierfür beispielsweise eine RNA-Quantifizierung, allerdings bestünde bei diesem Verfahren das Problem einer Verwässerung durch im Tumor immer wieder anzutreffende nicht-neoplastische Zellen. Eine andere Möglichkeit wäre eine Quantifizierung mittels Immunofluoreszenz. Frühere Studien haben gezeigt, dass der Bereich, indem ein Protein quantifiziert werden kann, mit Fluoreszenzmethoden breiter ist als mit der Hellfeld-Immunhistochemie (Bartlett *et al.*, 2001; Giltnane *et al.*, 2008; Wesola und Jelen, 2015). In Zukunft wird es interessant sein zu klären, ob möglicherweise mittels Immunofluoreszenzmessung der PSA-Expression ein noch mächtigerer Prognoseeffekt erzielt werden kann, als in diesem Projekt gezeigt.

Dass die PSA Messung auch in der „groben“ Hellfeld-Technik erhebliche Prognoserelevanz besitzt, zeigt sich unter anderem im Nachweis einer Prognoserelevanz in PTEN-deletierten Tumoren. Die PTEN-Deletion ist, die wahrscheinlich bekannteste prognostisch hoch relevante molekulare Veränderung beim Prostatakarzinom und es wird empfohlen, eine routinemäßige PTEN-Analyse (auch immunhistochemisch) durchzuführen. Der Verlust von PTEN wird als kritisches molekulares Ereignis in der Prostata-Karzinogenese angesehen. PTEN ist eine Phosphoinositid 3-Phosphatase und agiert durch die negative Regulation des 3-Kinase(PIK3)/PKB/Akt Signalweges als Tumorsuppressorgen (Feilolter *et al.*, 1998; Stambolic *et al.*, 1998; Wang und Dai, 2015). Studien haben gezeigt, dass diese PTEN-Deletionen (an 10q23.3) in Prostatakarzinomen mit einem aggressiveren Tumorphänotyp, einem größeren metastatischen Potenzial und einer schlechteren Prognose einhergehen (Yoshimoto *et al.*, 2012). Viele früher am UKE untersuchten molekularen Marker hatten trotz Prognoserelevanz im Gesamtkollektiv, in der Untergruppe der PTEN-deletierten Tumoren keinen prognostischen Effekt gezeigt (Beispiele hierfür sind SOX9 (Burdelski, Bujupi, *et al.*, 2015), p16 (Burdelski *et al.*, 2016), DNA Ligase IV (Grupp *et al.*, 2015), ADAM15 (Burdelski *et al.*, 2017), SUMO1/Sentrin specific peptidase 1 (SEN1) (Burdelski, Menan, *et al.*, 2015) u.a.).

Die traditionell wichtigste Methode, um die Aussagekraft eines Prognosemarkers zu identifizieren ist die Multivariate Analyse. Dabei besteht das Bedürfnis Parameter zu finden,

die von den bereits etablierten Prognosemarkern unabhängige zusätzliche Prognoserelevanz zeigen. Tatsächlich erwies sich der immunhistochemisch gemessene Gewebe-PSA-Wert bei beiden Konzentrationen, in allen vier untersuchten Szenarien, als unabhängiger Prognosefaktor. Dies nicht nur im Gesamtkollektiv aller Tumoren, sondern auch in ERG-negativen Tumoren. Nur bei der geringeren Färbekonzentration erwies sich der PSA-Wert in den Szenarien 1 und 2, bei ERG-positiven Tumoren, nicht als prognoserelevant. Diese Ergebnisse der Multivariaten Analyse sind weitere Argumente für die klinische Relevanz der PSA-Messung. Tatsächlich besteht beim Prostatakarzinom jedoch nicht nur ein Bedarf an unabhängigen Prognosefaktoren, sondern auch an robusteren Prognosefaktoren als die etablierten. Die meisten etablierten Prognosefaktoren beim Prostatakarzinom leiden unter substantiellen Schwächen. Der Gleason Grad ist nur in etwa 60% reproduzierbar, da er einer bedeutenden Interobserver-Variabilität ausgesetzt ist (Ozkan *et al.*, 2016). Das pT-Stadium kann nur postoperativ bestimmt werden. Das Gleiche gilt für den pN-Status. Zudem hängt die Identifikation tumorbefallener Lymphknoten nicht nur davon ab, ob Metastasen im Lymphknoten vorhanden sind, sondern auch von Ausmaß des operativen Eingriffes und ob bei der pathologischen Untersuchung die vorhandenen Metastasen erfasst werden.

Der stärkste am UKE verfügbare Prognoseparameter beim Prostatakarzinom ist der quantitative Gleason Grad. Es handelt sich hierbei, um eine Modifizierung des traditionellen Gleason Grades, wobei auf die Bildung der traditionellen fünf Gruppen (3+3, 3+4, 4+3, 8, 9-10) verzichtet wird und stattdessen die prozentualen Gleason 3, 4 und 5 Musteranteile verwendet werden (Sauter *et al.*, 2016). Die Überlegenheit des quantitativen Gleason Grades, im Vergleich zum traditionellen Gleason Grad, wird auch durch die vorliegende Untersuchung deutlich. Die PSA-Färbeintensität war in den klassischen Gleason Gruppen, meist prognoserelevant, währenddessen die PSA-Expression in den feiner definierten Gruppen mit ähnlichen quantitativen Gleason Grad meistens als Prognoseparameter versagten. Da die Prognoserelevanz bei Verwendung quantitativer Daten, vor allem in den Tumoren mit hohem Gleason 4 Anteil erhalten blieb, kann angenommen werden, dass die Prognoserelevanz der PSA-Expression, vor allem in den Tumorgruppen, in denen die Expression mehr und mehr zurückgeht, von klinischer Bedeutung ist.

Zusammengefasst beschreibt diese Doktorarbeit eine sehr umfassende Untersuchung eines neuen PSA-Antikörpers. Erstmals wurden in einer einzigen Studie, Sensitivität, Spezifität und Prognoserelevanz der PSA-Testung evaluiert und dies unter Verwendung zwei verschiedener Antikörper-Konzentrationen. Das Vorgehen erlaubte es, ein Protokoll zu identifizieren, dass eine hohe Sensitivität und Spezifität in der Prostatakarzinom Diagnostik ermöglicht. Darüber hinaus zeigt die Studie, dass der PSA-Expression eine

überragende prognostische Bedeutung zukommt und dies mehr oder weniger unabhängig von dem gewählten Färbeprotokoll. In zukünftigen Studien muss getestet werden, ob eine feinere Quantifizierung der PSA-Expression, beispielsweise durch Verwendung von Methoden der Immunfluoreszenz erzielt werden könnte.

5 Zusammenfassung

Die Serinprotease Prostata-spezifisches Antigen (PSA) ist das wichtigste Protein zur Diagnostik und Therapiesteuerung bei potentiellen und tatsächlichen Prostatakarzinom-Patienten. In der Pathologie wird PSA häufig immunhistochemisch untersucht, insbesondere bei metastatisierten Adenokarzinomen, um einen prostatistischen Tumorsprung auszuschließen (Stelow und Yaziji, 2018). Eine frühere Studie aus dem UKE hat darüber hinaus gezeigt, dass eine verminderte PSA-Expression beim Prostatakarzinom mit einer ungünstigen Prognose vergesellschaftet ist (Erbersdobler *et al.*, 2009). Ausgehend von der Idee, dass die immunhistochemische PSA-Messung gleichzeitig spezifisch für Prostatakrebs, sensitiv für die Prostatakarzinom-Diagnose und prognostisch relevant sein könnte; wurde in der vorliegenden Studie die Frage untersucht, ob es immunhistochemische Protokolle gibt, bei denen die PSA Untersuchung optimal vorgenommen werden könnte. Um ein optimales PSA Protokoll zu entwickeln, wurde ein Prostata-Prognose Array mit 17'752 Patienten mit klinischen Verlaufsdaten, ein weiterer Prostatakarzinom Array, mit besonders undifferenzierten Tumoren (n=419) und ein Multitumor TMA bestehend aus 3'659 Tumorproben von 84 verschiedenen Entitäten und Subentitäten mit zwei verschiedenen immunhistochemischen Protokollen untersucht, die um einen Faktor von 27 divergierten. Die Untersuchung mit dem hochkonzentrierten Antikörper (1:1'350) ergab eine PSA-Positivität in >99% bei allen nicht-hormonrefraktären, eine Positivität in 91,43% von 35 hormon-refraktären und in 15,38% von den 13 kleinzelligen Prostatakarzinomen. Jedoch war diese Verdünnung weniger spezifisch, denn einige Mesotheliome (28%), Osteosarkome (21%), seröse Ovarialkarzinome (8,9%), endometrioide Ovarialkarzinome (6,2%), klarzellige Nierenzellkarzinome (6,2%) und 11 weitere Entitäten (jeweils <6%) zeigten PSA-Positivität. Die Verwendung der niedrigeren Antikörper-Konzentration (1:36'450) ergab bei primären und rezidivierenden nicht-hormonrefraktären Prostatakarzinomen nur marginal schlechtere Sensitivität-Werte (>98,7%), wobei bei hormonrefraktären Prostatakarzinomen 84,6% von 26 Tumoren positiv waren und 1 von 13 kleinzelligen Prostatakarzinomen (7,7%). Die geringere Antikörper-Konzentration führte aber zu deutlich spezifischeren Ergebnissen. Lediglich zwei endometrioide Ovarialkarzinome waren PSA-positiv. Alle übrigen bei der stärkeren Konzentration PSA-positiven Tumore erwiesen sich jetzt als PSA-negativ. Die prognostische Untersuchung zeigte in beiden Konzentrationen einen hoch signifikanten Zusammenhang zwischen PSA-Färbeintensität, Tumorphänotyp bzw. Patientenprognose. Je ausgeprägter die PSA-Expression, desto niedriger das pT-Stadium, desto niedriger der Gleason Grad und desto weniger Lymphknotenmetastasen waren vorhanden (jeweils $p < 0,0001$). Zusätzlich korrelierte eine starke PSA-Expression mit einer günstigeren Prognose (jeweils $p < 0,0001$). In der Multivariaten Analyse erwies sich unter Anwendung

verschiedener Szenarien die PSA-Expression immer als unabhängiger Prognosefaktor bei Untersuchungen des Gesamtkollektivs.

Schlussfolgerungen: Die äußerst umfangreiche Untersuchung von mehr als 20'000 Patienten, unter Verwendung von PSA-Antikörpern deutlich unterschiedlicher Konzentration, erlaubt, die Identifikation eines optimal erscheinenden Protokolls für die immunhistochemische PSA-Diagnostik mit hoher Sensitivität und fast perfekter Spezifität. Die Untersuchungen identifizieren die PSA-Expression als sehr starken Prognosefaktor, der unabhängig vom verwendeten immunhistochemischen Protokoll ist.

The serine protease prostate-specific antigen (PSA) is the most important protein for the diagnostic and therapeutic monitoring in potential and actual patients with prostate carcinoma. PSA-immunohistochemistry is often used in pathology, especially to determine the origin of a tumor in metastatic adenocarcinomas (Stelow und Yaziji, 2018). A former study from the UKE revealed that a reduced PSA-expression in prostate carcinoma correlated with a more unfavorable prognosis (Erbersdobler *et al.*, 2009). Originating from the idea that immunohistochemical PSA-measurement could be specific for prostate carcinoma, sensitive for the diagnosis and could have a prognostic value, with this study we wanted to investigate whether there are immunohistochemical protocols for an optimal PSA-examination. To develop an ideal protocol, we examined a prostate carcinoma prognostic array with 17'752 patients with clinical history data, a second array with especially undifferentiated tumors (n=419) and a multitumor TMA consisting of 3'659 samples from 84 different entities and subentities; with two different immunohistochemical protocols, differing by the factor 27. The study with the highly concentrated antibody (1:1'350) showed a PSA-positivity in >99% of the non-hormone-refractory, 91,43% in 35 hormone-refractory and 15,38% in 13 small-cell prostate carcinoma. Nevertheless, this dilution was less specific, as some mesothelioma (28%), osteosarcoma (21%), serous ovarian carcinoma (8,9%), endometrioid carcinoma (6,2%), clear cell renal cell carcinoma (6,2%) and 11 further entities (respectively <6%) showed PSA-positivity. The protocol with the lower antibody concentration (1:36'450) revealed only marginally lower sensitivity values (>98,7%) in primary and recurring non-hormone-refractory prostate carcinoma. The examination of the 26 hormone-refractory carcinomas showed a sensitivity of 84,6% and only one of the 13 small-cell prostate carcinoma (7,7%) was PSA-positive. The results of the protocol with the higher diluted antibody showed an increased specificity. Merely two endometrioid ovarian carcinoma were PSA-positive. The other tumor entities that had been

positive in the higher concentration were now PSA negative. The prognostic evaluation showed a significant correlation between PSA-staining intensity, the phenotype and patient prognosis. The more pronounced the PSA-expression was, the lower was the pT-stage, the Gleason grade and the less lymph node metastases were present (respectively $p < 0,0001$). In addition, the strong PSA-expression was linked to a better prognostic outcome (respectively $p < 0,0001$). In the multivariate analysis the PSA-expression pattern, in the different scenarios, turned out to be an independent prognostic factor.

Conclusion: The extensive study including over 20'000 patients and using two differing antibody-concentrations allows the identification of an ideal protocol for the immunohistochemical PSA-diagnostics with high sensitivity and nearly perfect specificity. The evaluation identifies the PSA-expression as a strong independent prognostic relevant factor.

6 Abkürzungsverzeichnis

ADAM15	A disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein15
BA	Break-apart
BCR	Biochemisches Rezidiv
ca	Karzinom
CCS	Cancer specific survival
CR	Kastrationsresistent
DRU	Digital Rektale Untersuchung
ERG	ETS-related gene
ETS	E26 transformation specific
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
HDR	High Dose Rate Brachytherapie
hK3	Humanes Kallikrein 3
IHC	Immunhistochemie
Ki67 LI	ki67-Labeling Index
LDR	Low Dose Rate Brachytherapie
Lok	Lokalisation
MMT	Maligner Müllerscher Mischtumor
MTA	Multitumor Array
mTOR	Mammalian target of rapamycin
NET	Neuroendokriner Tumor
NNR	Nebennierenrinde
PKB	Protein kinase B
PSA	Prostata spezifisches Antigen
PSAP	Prostataspezifische saure Phosphatase

PSMA	Prostata-spezifisches Membranantigen
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
RPE	Radikale Prostatektomie
SENP1	Senstrin specific peptidase 1
SOX9	SRY-Box Transcription factor 9
TMA	Tissue Microarray

7 Literaturverzeichnis

- Abrahamsson P, Lilja H, Falkmer S und Wadströ LB (1988) 'Immunohistochemical distribution of the three predominant secretory proteins in the parenchyma of hyperplastic and neoplastic prostate glands'. *Prostate*. 12(1):39-46.
- Alanen KA, Kuopio T, Collan YU, Kronqvist P, Juntti L und Nevalainen TJ (1999) 'Immunohistochemical labelling for prostate-specific antigen in breast carcinomas'. *Breast Cancer Res Treat*. 56(2):169-176.
- Balk BSP, Ko Y und Bubley GJ (2003) 'Biology of Prostate-Specific Antigen'. *J Clin Oncol*. 21(2):383-391.
- Barbieri CE, Bangma CH, Bjartell A, Catto JW, Culig Z, Grönberg H, Luo J, Visakorpi T und Rubin MA (2013) 'The mutational landscape of prostate cancer'. *Eur Urol*. 64(4):567-576.
- Bartlett JM, Going JJ, Mallon EA, Watters AD, Reeves JR, Stanton P, Richmond J, Donald B, Ferrier R und Cooke TG (2001) 'Evaluating HER2 amplification and overexpression in breast cancer'. *J Pathol*. 195(4):422-428.
- Bernacki KD, Fields KL und Roh MH (2014) 'The utility of PSMA and PSA immunohistochemistry in the cytologic diagnosis of metastatic prostate carcinoma'. *Diagn Cytopathol*. 42(7):570-5.
- Bhoola KD, Figueroa CD und Worthy K (1992) 'Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases'. *Pharmacol Rev*. 44(1):1-80.
- Bodey B, Bodey B Jr und Kaiser HE (1997) 'Immunocytochemical detection of prostate specific antigen expression in human breast carcinoma cells'. *Anticancer Res*. 17(4A):2577-81.
- Bravaccini S, Puccetti M, Bocchini M, Ravaioli S, Celli M, Scarpi E, De Giorgi U, Tumedei MM, Raulli G, Cardinale L und Paganeli G (2018) 'PSMA expression: A potential ally for the pathologist in prostate cancer diagnosis'. *Sci Rep*. 8:4254. doi: 10.1038/s41598-018-22594-1.
- Burdelski C, Bujupi E, Tsourlakis MC, Hube-Magg C, Kluth M, Melling N, Lebok P, Minner S, Koop C, Graefen M, Heinzer H, Wittmer C, Sauter G, Wilczak W, Simon R, Schlomm T, Steurer S und Krech T (2015) 'Loss of SOX9 Expression Is Associated with PSA Recurrence in ERG-Positive and PTEN Deleted Prostate Cancers'. *PLoS One*. 10(6):e0128525. doi: 10.1371/journal.pone.0128525.
- Burdelski C, Menan D, Tsourlakis MC, Kluth M, Hube-Magg C, Melling N, Minner S, Koop C,

-
- Graefen M, Heinzer H, Wittmer C, Sauter G, Simon R, Schlomm T, Steurer S und Krech T (2015) 'The prognostic value of SUMO1 / Sentrin specific peptidase 1 (SENP1) in prostate cancer is limited to ERG-fusion positive tumors lacking PTEN deletion'. *BMC Cancer*. 15:538. doi: 10.1186/s12885-015-1555-8.
- Burdelski C, Dieckmann T, Heumann A, Hube-Magg C, Kluth M, Beyer B, Steuber T, Pompe R, Graefen M, Simon R, Minner S, Tsourlakis MC, Koop C, Izbicki J, Sauter G, Krech T, Schlomm T, Wilczak W und Lebok P (2016) 'p16 upregulation is linked to poor prognosis in ERG negative prostate cancer'. *Tumor Biol*. 37(9):12655-12663.
- Burdelski C, Fitzner M, Hube-Magg C, Kluth M, Heumann A, Simon R, Krech T, Clauditz T, Büscheck F, Steurer S, Wittmer C, Hinsch A, Luebke AM, Jacobsen F, Minner S, Tsourlakis MC, Beyer B, Steuber T, Thederan I, Sauter G, Izbicki J, Schlomm T und Wilczak W (2017) 'Overexpression of the A Disintegrin and Metalloproteinase ADAM15 is linked to a Small but Highly Aggressive Subset of Prostate Cancers 1'. *Neoplasia*. 19(4):279-287.
- Burkhardt L, Fuchs S, Krohn A, Masser S, Mader M, Kluth M, Bachmann F, Huland H, Steuber T, Graefen M, Schlomm T, Minner S, Sauter G, Sirma H und Simon R (2013) 'CHD1 Is a 5q21 Tumor Suppressor Required for ERG Rearrangement in Prostate Cancer'. *Cancer Res*. 73(9):2795-2805.
- Carder PJ, Speirs v, Ramsdale J und Lansdown MRJ (2005) 'Expression of prostate specific antigen in male breast cancer'. *J Clin Pathol*. 58(1):69-71.
- Carnero A, Blanco-Aparicio C, Renner O, Link W und Leal JF (2008) 'The PTEN / PI3K / AKT Signalling Pathway in Cancer, Therapeutic Implications'. *Curr Cancer Drug Targets*. 8(3):187-198.
- Catalona WJ, Smith DS, Ratliff TL, Dodds KM, Coplen DE, Yuan JJ, Petros JA und Andriole GL (1991) 'Measurement of Prostate-Specific Antigen in Serum as a Screening Test for Prostate Cancer'. *N Engl J Med*. 324(17):1156-1161.
- Catalona WJ, Richie JP, Ahmann FR, Hudson MA, Scrdino PT, Flanigan RC, DeKernion JB, Ratliff TL, Kavoussi LR, Dalkin BL, Waters WB, MacFarlane MT und Southwick PC (1994) 'Comparison of digital rectal examination and serum prostate specific antigen in the early detection of prostate cancer: results of a multicenter clinical trial of 6'630 men'. *J Urol*. 151(5):1283-1290.
- Ciccarese C, Massari F, Iacovelli R, Fiorentino M, Montironi R, Di Nunno V, Giunchi F, Brunelli M und Tortora G (2017) 'Prostate cancer heterogeneity: Discovering novel molecular targets for therapy'. *Cancer Treat Rev*. 54:68-73.

-
- Dimitriadis GK, Angelousi A, Weickert MO, Randeve HS, Kaltsas G und Grossman A (2017) 'Paraneoplastic endocrine syndromes'. *Endocr Relat Cancer*. 24(6):173-190.
- Donovan JL, Hamdy FC, Lane JA, Mason M, Metcalfe C, Walsh E, Blazeby JM, Peters TJ, Holding P, Bonnington S, Lennon T, Bradshaw L, Cooper D, Herbert P, Howson J, Jones A, Lyons N, Salter E, Thompson P, Tidball S, Blaikie J, Gray C, Bollina P, Catto J, Doble A, Doherty A, Gillatt D, Kockelbergh R, Kynaston H, Paul A, Powell P, Prescott S, Rosario DJ, Rowe E, Davis M, Turner EL, Martin RM, Neal DE und ProtecT Study Group (2016) 'Patient-Reported Outcomes after Monitoring, Surgery, or Radiotherapy for Prostate Cancer'. *N Engl J Med*. 375(15):1425-1437.
- Eastham J (2017) 'Prostate cancer screening'. *Investig Clin Urol*. 58(4):217-219.
- Ebisuno S, Miyai M und Nagareda T (1995) 'Clear cell adenocarcinoma of the female urethra showing positive staining with antibodies to prostate-specific antigen and prostatic acid phosphatase'. *Urology*. 45(4):682-685.
- Eisner F (2019) 'Die prognostische Rolle der PSA und KLK2 Expression in Prostatakarzinomen'. (Noch unveröffentlicht).
- Elgamal AA, Ectors NL, Sunardhi-Widyaputra S, Van Poppel HP, Van Damme BJ und Baert LV (1996) 'Detection of prostate specific antigen in pancreas and salivary glands: a potential impact on prostate cancer overestimation'. *J Urol*. 156(2 Pt 1):464-468.
- Epstein JI, Egevad L, Humphrey PA, Montironi R und Members of the ISUP immunohistochemistry in Diagnostic Urologic Pathology Group (2014) 'Best Practices Recommendations in the Application of Immunohistochemistry in the Prostate Report From the International Society of Urologic Pathology Consensus Conference'. *Am J Surg Pathol*. 38(8):e6-e19.
- Erbersdobler A, Isbarn H, Steiner I, Schlomm T, Chun F, Mirlacher M und Sauter G (2009) 'Predictive Value of Prostate-specific Antigen Expression in Prostate Cancer: A Tissue Microarray Study'. *Urology*. 74(5):1169-1173.
- Feilotter HE, Nagai MA, Boag AH, Eng C und Mulligan LM (1998) 'Analysis of PTEN and the 10q23 region in primary prostate carcinomas'. *Oncogene*. 16(13):1743-8.
- Feldman BJ und Feldman D (2001) 'The development of androgen-independent prostate cancer'. *Nat Rev Cancer*. 1(1):34-45.
- Gallee MPW, Visser-de Jong E, Van der Korput JAGM, Van der Kwast TH, Ten Kate FJW, Schroeder FH und Trapman J (1990) 'Variation of prostate-specific antigen expression in

different tumour growth patterns present in prostatectomy specimens'. *Urol Res.* 18(3):181-187.

Giltane JM, Molinaro A, Cheng H, Robinson A, Turbin D, Gelmon K, Huntsman D und Rimm DL (2008) 'Comparison of quantitative immunofluorescence with conventional methods for HER2/neu testing with respect to response to trastuzumab therapy in metastatic breast cancer'. *Arch Pathol Lab Med.* 132(10):1635-47.

Gleason DF und Mellinger GT (1974) 'Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging'. *J Urol.* 111(1):58-64.

Goldstein NS (2002) 'Immunophenotypic Characterization of 225 Prostate Adenocarcinomas With Intermediate or High Gleason Scores'. *Am J Clin Pathol.* 117(3):471-477.

Gordetsky J und Epstein J (2016) 'Grading of prostatic adenocarcinoma: current state and prognostic implications'. *Diagn Pathol.* 11:25. doi: 10.1186/s13000-016-0478-2.

Graefen M, Schlomm T, Steuber T und Sauter G (2014) 'Aktuelle Ergebnisse zur PSA-basierten Früherkennung des Prostatakarzinoms'. *Bundesgesundheitsblatt.* 57:312-317.

Grignon DJ, Ro JY, Ayala AG, Johnson DE und Ordóñez NG (1991) 'Primary Adenocarcinoma of the Urinary Bladder. A clinicopathologic analysis of 72 cases'. *Cancer.* 67(8):2165-2172.

Grozescu T und Popa F (2017) 'Prostate cancer between prognosis and adequate / proper therapy'. *J Med Life.* 10(1):5-12.

Grupp K, Roettger L, Kluth M, Hube-Magg C, Simon R, Lebok P, Minner S, Tsourlakis MC, Koop C, Graefen M, Adam M, Haese A, Wittmer C, Sauter G, Wilczak W, Huland H, Schlomm T, Steurer S und Krech T (2015) 'Expression of DNA ligase IV is linked to poor prognosis and characterizes a subset of prostate cancers harboring TMPRSS2 : ERG fusion and PTEN deletion'. *Oncol Rep.* 34(3):1211-1220.

Haffner MC, Aryee MJ, Toubaji A, Esopi DM, Albadine R, Gurel B, Isaacs WB, Bova GS, Liu W, Xu J, Meeker AK, Netto G, De Marzo AM, Nelson WG und Yegnasubramanian S (2010) 'Androgen-induced TOP2B-mediated double-strand breaks and prostate cancer gene rearrangements'. *Nat Genet.* 42(8):668-675.

Heyl W, Wolff JM, Biesterfeld S, Schröder W, Zitzelsberger D, Jakse G und Rath W (1999) 'Immunohistochemical analysis of prostate-specific antigen does not correlate to other prognostic factors in breast cancer'. *Anticancer Res.* 19(4A):2563-2565.

Hodson R (2015) 'Small organ, big reach'. *Nature.* 528(7582):S118-9.

-
- Ilvan S, Celik V, Cetinaslan I, Calay Z und Ferahman M (2004) 'Immunohistochemical analysis of prostate-specific antigen in female breast cancer'. *J BUON*. 9:183-186.
- James GK, Pudek M, Berean KW, Diamandis EP und Archibald BL (1996) 'Salivary Duct Carcinoma Secreting Prostate-Specific Antigen'. *Am J Clin Pathol*. 106(2):242-247.
- Jereczek-fossa BA und Orecchia R (2007) 'Evidence-based radiation oncology: Definitive, adjuvant and salvage radiotherapy for non-metastatic prostate cancer'. *Radiother Oncol*. 84(2):197-215.
- Killian CS, Yang N, Emrich LJ, Vargas FP, Kuriyama M, Wang MC, Slack NH, Papsidero LD, Murphy GP, Chu TM und the investigators of the National Prostatic Cancer Project (1985) 'Prognostic Importance of Prostate-specific Antigen for Monitoring Patients with Stages B2 to D1 Prostate Cancer'. *Cancer Res*. 45:886-891.
- Kluth M, Hesse J, Heini A, Krohn A, Steurer S, Sirma H, Sion R, Mayer PS, Schumacher U, Grupp K, Izbicki JR, Pantel K, Dikomey E, Korbel JO, Plass C, Sauter G, Schlomm T und Minner S (2013) 'Genomic deletion of MAP3K7 at 6q12-22 is associated with early PSA recurrence in prostate cancer and absence of TMPRSS2:ERG fusions'. *Mod Pathol*. 26(7):975-983.
- Kluth M, Meyer D, Krohn A, Freudenthaler F, Bauer M, Salomon G, Heinzer H, Michl U, Steurer S, Simon R, Sauter G, Schlomm T und Minner S (2016) 'Heterogeneity and chronology of 6q15 deletion and ERG-fusion in prostate cancer'. *Oncotarget*. 7(4):3897-3904.
- Kluth M, Volta H, Hussein M, Taskin B, Frogh S, Möller-Koop C, Büscheck F, Jacobsen F, Tsourlakis MC, Lübke AM, Hinsch A, Clauditz T, Graefen M, Heinzer H, Huland H, Minner S, Sauter G, Wilczak W, Schlomm T und Simon R (2018) 'Deletion of 3p13 is a late event linked to progression of TMPRSS2:ERG fusion prostate cancer'. *Cancer Manag Res*. 10:5909-5917.
- Kluth M, Al Kilani Z, Özden C, Hussein K, Frogh S, Möller-Koop C, Burandt E, Steurer S, Büscheck F, Jacobsen F, Luebke AM, Minner S, Tsourlakis MC, Hoeflmayer D, Wittmer C, Schlomm T, Sauter G, Simon R und Wilczak W (2019) '5q21 deletion is often heterogeneous in prostate cancer'. *Genes Chromosomes Cancer*. doi: 10.1002/gcc.22730
- Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärlund M, Schrami P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G und Kallioniemi OP (1998) 'Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens'. *Nat Med*. 4(7):844-7.
- Koo M, Squires JM, Ying D und Huang J (2019) 'Making a Tissue Microarray'. *Methods Mol Biol*. 1897:313-323.

-
- Kraus TS, Cohen C und Siddiqui MT (2010) 'Prostate-specific antigen and hormone receptor expression in male and female breast carcinoma'. *Diagn Pathol.* 5:63.
- Krieken H (1993) 'Prostate marker immunoreactivity in salivary gland neoplasms: A rare pitfall in immunohistochemistry'. *Am J Surg Pathol.* 17(4):410-4.
- Krohn A, Diedler T, Burkhardt L, Mayer PS, De Silva C, Meyer-Kornblum M, Kötschau D, Tennstedt P, Huang J, Gerhäuser C, Mader M, Kurtz S, Sirma H, Saad F, Steuber T, Graefen M, Plass C, Sauter G, Simon R, Minner S und Schlomm T (2012) 'Genomic Deletion of PTEN Is Associated with Tumor Progression and Early PSA Recurrence in ERG Fusion-Positive and Fusion-Negative Prostate Cancer'. *Am J Pathol.* 181(2):401-412.
- Krohn A, Seidel A, Burkhardt L, Bachmann F, Mader M, Grupp K, Eichenauer T, Becker A, Adam M, Graefen M, Huland H, Kurtz S, Steurer S, Tsourlakis MC, Minner S, Michl U, Schlomm T, Sauter G, Simon R und Sirma H (2013) 'Recurrent deletion of 3p13 targets multiple tumour suppressor genes and defines a distinct subgroup of aggressive ERG fusion-positive prostate cancers'. *J Pathol.* 231(1):130-141.
- Kundu SD, Roehl KA, Yu X, Antenor JA, Suarez BK und Catalona WJ (2007) 'Prostate specific antigen density correlates with features of prostate cancer aggressiveness'. *J Urol.* 177(2):505-509.
- Kuopio T, Ekfors TO, Nikkanen V und Nevalainen TJ (1995) 'Acinar cell carcinoma of the pancreas'. *APMIS.* 103(1):69-78.
- Kupelian PA, Potters L, Khuntia D, Ciezki JP, Reddy CA, Reuther AM, Carlson TP und Klein EA (2004) 'Radical prostatectomy, external beam radiotherapy <72 Gy, external beam radiotherapy > or = 72 Gy, permanent seed implantation, or combined seeds/external beam radiotherapy for stage T1-T2 prostate cancer'. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 58(1):25-33.
- Kuriyama M, Wang MC, Lee CI, Papsidero LD, Killian CS, Inaji H, Slack NH, Nishiura T, Murphy GP und Chu TM (1981) 'Use of Human Prostate-specific Antigen in Monitoring Prostate Cancer'. *Cancer Res.* 41(10):3874-3876.
- Lee AK und D'Amico AV (2005) 'Utility of Prostate-Specific Antigen Kinetics in Addition to Clinical Factors in the Selection of Patients for Salvage Local Therapy'. *J Clin Oncol.* 23(32):8192-8197.
- Leitlinienprogramm Onkologie (2019) 'Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms (Version 5.1, Mai 2019)'. [Online im Internet.] URL: https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Prostata_5_0/LL_Prostata_Lang

- Lotan TL, Heumann A, Rico SD, Hicks J, Lecksell K, Koop C, Sauter G, Schlomm T und Simon R (2017) 'PTEN loss detection in prostate cancer: comparison of PTEN immunohistochemistry and PTEN FISH in a large retrospective prostatectomy cohort'. *Oncotarget*. 8(39): 65566-65576.
- Mani RS, Tomlins SA, Callahan K, Ghosh A, Nyati MK, Varambally S, Palanisamy N und Chinnaiyan AM (2009) 'Induced Chromosomal Proximity and Gene Fusions in Prostate Cancer'. *Science*. 326(5957):1230. doi: 10.1126/science.1178124.
- Maxeiner A, Stephan C, Fischer T, Durmus T, Kilic E, Asbach P, Haas M, Günzel K, Neymeyer J, Miller K und Cash H (2015) 'Real-time MRI/US fusion-guided biopsy in biopsy-naïve and pre-biopsied patients with suspicion for prostate cancer'. *Aktuelle Urol*. 46(1):34-38.
- Melling N, Rashed M, Schroeder C, Hube-Magg C, Kluth M, Lang D, Simon R, Möller-Koop C, Steurer S, Sauter G, Jacobsen F, Büscheck F, Wittmer C, Clauditz T, Krech T, Tsourlakis MC, Minner S, Huland H, Graefen M, Budäus L, Thederan I, Salomon G, Schlomm T und Wilczak W (2017) 'High-Level γ -Glutamyl-Hydrolase (GGH) Expression is Linked to Poor Prognosis in ERG Negative Prostate Cancer'. *Int J Mol Sci*. 18(2):286.
- Miller MK, Unger PD und Bleiweiss IJ (2001) 'Immunohistochemical analysis of prostate specific antigen in breast cancer'. *Breast Cancer Res Treat*. 68(2):111-116.
- Minner S, Jessen B, Stiedenroth L, Burandt E, Köllermann J, Mirlacher M, Erbersdobler A, Eichelberg C, Fisch M, Brümmendorf TH, Bokemeyer C, Simon R, Steuber T, Graefen M, Huland H, Sauter G und Schlomm T (2010) 'Low Level Her2 Overexpression Is Associated with Rapid Tumor Cell Proliferation and Poor Prognosis in Prostate Cancer'. *Clin Cancer Res*. 16(5):1553-1560.
- Minner S, Enodien M, Sirma H, Luebke AM, Krohn A, Mayer PS, Simon R, Trennstedt P, Müller J, Scholz L, Brase JC, Liu AY, Schlüter H, Pantel K, Schumacher U, Bokemeyer C, Steuber T, Graefen M, Sauter G und Schlomm T (2011) 'ERG Status Is Unrelated to PSA Recurrence in Radically Operated Prostate Cancer in the Absence of Antihormonal Therapy'. *Clin Cancer Res*. 17(18):5878-5888.
- Moch H, Kononen T, Kallioniemi OP und Sauter G (2001) 'Tissue microarrays: what will they bring to molecular and anatomic pathology?'. *Adv Anat Pathol*. 8(1):14-20.
- Narita D, Raica M, Anghel A, Suciuc C und Cîmpean A (2005) 'Immunohistochemical localization of prostate-specific antigen in benign and malignant breast conditions'. *Rom J Morphol Embryol*. 46(1):41-45.

-
- Narita D, Cimpean AM, Anghel A und Raica M (2006) 'Prostate-specific antigen value as a marker in breast cancer'. *Neoplasma*. 53(2):161-167.
- Oyama T, Allsbrook WC Jr, Kurokawa K, Matsuda H, Segawa A, Sano T, Suzuki K und Epstein JI (2005) 'A comparison of interobserver reproducibility of Gleason grading of prostatic carcinoma in Japan and the United States'. *Arch Pathol Lab Med*. 129(8):1004-1010.
- Ozkan TA, Eruyar AT, Cebeci OO, Memik O, Ozcan L und Kuskonmaz I (2016) 'Interobserver variability in Gleason histological grading of prostate cancer'. *Scand J Urol*. 50(6):420-424.
- Partin AW und Oesterling JE (1994) 'The clinical usefulness of prostate specific antigen: update 1994'. *J Urol*. 152(5 Pt 1):1358-68.
- Phin S, Moore MW und Cotter PD (2013) 'Genomic rearrangements of PTEN in prostate cancer'. *Front Oncol*. 3:240. doi: 10.3389/fonc.2013.00240.
- Poh BH, Jayaram G, Sthaneshwar P und Yip CH (2008) 'Prostate-specific antigen in breast disease'. *Malays J Pathol*. 30(1):43-51.
- Pound CR, Partin AW, Epstein JI und Walsh PC (1997) 'Prostate-specific antigen after anatomic radical retropubic prostatectomy. Patterns of recurrence and cancer control'. *Urol Clin North Am*. 24(2):395-406.
- Robert Koch Institut (2017) 'Krebs in Deutschland für 2013/2014' [Online im Internet.] URL: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Prostatakrebs/prostatakrebs_node.html?jsessionid=DCEAB29CF3C4B78B0EF94117849415A4.1_cid298 [Stand: 18.03.2019, 20:00h]
- Sauter G, Steurer S, Clauditz TS, Krech T, Wittmer C, Lutz F, Lennartz M, Janssen T, Hakimi N, Simon R, von Petersdorff-Campen M, Jacobsen F, von Loga K, Wilczak W, Minner S, Tsourlakis MC, Chirico V, Haese A, Heinzer H, Beyer B, Graefen M, Michl U, Salomon G, Steuber T, Budäus LH, Hekeler E, Malsy-Mink J, Kutzera S, Fraune C, Göbel C, Huland H und Schlomm T (2016) 'Prostate Cancer Clinical Utility of Quantitative Gleason Grading in Prostate Biopsies and Prostatectomy Specimens'. *Eur Urol*. 69(4):592-598.
- Schröder FH, Hugosson J, Roobol MJ, Tammela TL, Ciatto S, Nelen V, Kwiatkowski M, Lujan M, Lilja H, Zappa M, Denis LJ, Recker F, Berenguer A, Määttänen L, Bangma CH, Aus G, Villers A, Rebillard X, van der Kwast T, Blijenberg BG, Moss SM, de Koning HJ, Auvinen A und ERSPC Investigators (2009) 'Screening and Prostate-Cancer Mortality in a Randomized European Study'. *N Engl J Med*. 360(13):1320-8.
- Skove SL, Howard LE, Aronson WJ, Terris MK, Kane CJ, Amling CL, Cooperberg MR, Moreira

-
- DM und Freedland SJ (2017) 'Timing of PSA nadir after radical prostatectomy and risk of biochemical recurrence'. *Urology*. 108:129-134.
- Sloboda J, Zaviacic M, Jakubovsky J, Hammar E und Johnsen J (1998) 'Metastasizing Adenocarcinoma of the Female Prostate (Skene's Paraurethral Glands). Histological and Immunohistochemical Prostate Markers Studies and First Ultrastructural Observation'. *Pathol Res Pract*. 194(2):129-136.
- Spencer JR, Brodin AG und Ignatoff JM (1990) 'Clear cell adenocarcinoma of the urethra: evidence for origin within paraurethral ducts'. *J Urol*. 143(1):122-125.
- Stambolic V, Suzuki A, de la Pompa JL, Brothers GM, Mirtsos C, Sasaki T, Ruland J, Penninger JM, Siderovski SP und Mak TW (1998) 'Negative Regulation of PKB / Akt-Dependent Cell Survival by the Tumor Suppressor PTEN'. *Cell*. 95(1):29-39.
- Stelow EB und Yaziji H (2018) 'Immunohistochemistry, carcinomas of unknown primary, and incidence rates'. *Semin Diagn Pathol*. 35(2):143-152.
- Steurer S, Mayer PS, Adam M, Krohn A, Koop C, Ospina-Klinck D, Tehrani AA, Simon R, Tennstedt P, Graefen M, Wittmer C, Brors B, Plass C, Korbel J, Weischenfeldt J, Sauter G, Huland H, Tsourlakis MC, Minner S und Schlomm T (2014) 'TMPRSS2-ERG fusions are strongly linked to young patient age in low-grade prostate cancer'. *Eur Urol*. 66(6):978-981.
- Stumm L, Burkhardt L, Steurer S, Simon R, Adam M, Becker A, Sauter G, Minner S, Schlomm T, Sirma H und Michl U (2013) 'Strong expression of the neuronal transcription factor FOXP2 is linked to an increased risk of early PSA recurrence in ERG fusion-negative cancers'. *J Clin Pathol*. 66(7):563-568.
- Svanholm H, Andersen OP und Rohl H (1987) 'Tumour of female paraurethral duct. Immunohistochemical similarity with prostatic carcinoma'. *Virchows Arch*. 411(4):395-398.
- Tanaka N, Shimada K, Nakagawa Y, Hirao S, Watanabe S, Miyake M, Anai S, Hirayama A, Konishi N und Fujimoto K (2015) 'The optimal number of initial prostate biopsy cores in daily practice: a prospective study using the Nara Urological Research and Treatment Group normogram'. *BMC Res Notes*. 8:689. doi:10.1186/s13104-015-1668-9.
- Tazawa K, Kurihara Y, Kamoshida S, Tsukada K und Tsutsumi Y (1999) 'Localization of prostate-specific antigen-like immunoreactivity in human salivary gland and salivary gland tumors'. *Pathol Int*. 49(6):500-505.
- Thompson I, Thrasher JB, Aus G, Burnett AL, Canby-Hagino ED, Cookson MS, D'Amico AV, Dmochowski RR, Eton DT, Forman JD, Goldenberg SL, Hernandez J, Higano CS, Kraus

-
- SR, Moul JW, Tangen CN und AUA Prostate Cancer Clinical Guideline Update Panel (2007) 'Guideline for the management of clinically localized prostate cancer: 2007 Update'. *J Urol.* 177(6):2106-2131.
- Tilki D, Kim SI, Hu B, Dall'Era MA und Evans CP (2015) 'Ultrasensitive Prostate Specific Antigen and Its Role after Radical Prostatectomy: A Systematic Review'. *J Urol.* 193(5):1525-31.
- Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, Dhanasekaran SM, Mehra R, Sun XW, Varambally S, Cao X, Tchinda J, Kuefer R, Lee C, Montie JE, Shah RB, Pienta KJ, Rubin MA und Chinnaiyan AM (2005) 'Recurrent Fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer'. *Science.* 310(5748):644-649.
- Tomlins SA, Bjartell A, Chinnaiyan AM, Jenster G, Nam RK, Rubin MA und Schalken JA (2009) 'ETS gene fusions in prostate cancer: from discovery to daily clinical practice'. *Eur Urol.* 56(2):275-286.
- Varma M, Morgan M, Jasani B, Tamboli P und Amin MB (2002) 'Polyclonal anti-PSA is more sensitive but less specific than monoclonal anti-PSA: implications for diagnostic prostatic pathology'. *Am J Clin Pathol.* 118(2):202-207.
- Velasco De MA und Uemura H (2012) 'Preclinical Remodeling of Human Prostate Cancer through the PTEN / AKT Pathway'. *Adv Urol.* 2012:419348. doi: 10.1155/2012/419348.
- Vuichoud C und Loughlin KR (2015) 'Benign prostatic hyperplasia: epidemiology, economics and evaluation'. *Can J Urol.* 22 Suppl 1:1-6.
- Wang Y und Dai B (2015) 'PTEN genomic deletion defines favorable prognostic biomarkers in localized prostate cancer: a systematic review and meta-analysis'. *Int J Clin Exp Med.* 8(4):5430-5437.
- Warlick C, Trock BJ, Landis P, Epstein JI und Carter HB (2006) 'Delayed Versus Immediate Surgical Intervention and Prostate Cancer Outcome'. *J Natl Cancer Inst.* 98(5):355-357.
- Weischenfeldt J, Simon R, Feuerbach L, Schlangen K, Weichenhan D, Minner S, Wuttig D, Warnatz HJ, Stehr H, Rausch T, Jäger N, Gu L, Bogatyrova O, Stütz AM, Claus R, Eils J, Eils R, Gerhäuser C, Huang PH, Hutter B, Kabbe R, Lawerenz C, Radomski S, Bartholomae CC, Fälth M, Gade S, Schmidt M, Amschler N, Haß T, Galal R, Gjoni J, Kuner R, Baer C, Masser S, von Kalle C, Zichner T, Benes V, Raeder B, Mader M, Amstislavskiy V, Avci M, Lehrach H, Parkhomchuk D, Sultan M, Burkhardt L, Graefen M, Huland H, Kluth M, Krohn A, Sirma H, Stumm L, Steurer S, Grupp K, Sültmann H, Sauter G, Plass C, Brors B, Yaspo ML, Korbelt JO und Schlomm T (2013) 'Integrative genomic analyses reveal an androgen-

driven somatic alteration landscape in early-onset prostate cancer'. *Cancer Cell*. 23(2):159-170.

Wesola M und Jelén M (2015) 'A Comparison of IHC and FISH Cytogenetic Methods in the Evaluation of HER2 Status in Breast Cancer'. *Adv Clin Exp Med*. 24(5):899-903.

Yoshimoto M, Cunha IW, Coudry RA, Fonseca FP, Torres CH, Soares F und Squire JA (2007) 'FISH analysis of 107 prostate cancers shows that PTEN genomic deletion is associated with poor clinical outcome'. *Br J Cancer*. 97(5):678-685.

Yoshimoto M, Ludkovski O, DeGrace D, Williams JL, Evans A, Sircar K, Bismar TA, Nui P und Squire JA (2012) 'PTEN Genomic Deletions that Characterize Aggressive Prostate Cancer Originate Close to Segmental Duplications'. *Genes Chromosomes Cancer*. 51(2):149-60.

Yousef GM und Diamandis EP (2001) 'The New Human Tissue Kallikrein Gene Family: Structure, Function, and Association to Disease'. *Endocr Rev*. 22(2):184-204.

Yu H, Diamandis EP, Levesque M, Asa SL, Monne M und Croce CM (1995) 'Expression of the Prostate-specific Antigen Gene by a Primary Ovarian Carcinoma'. *Cancer Res*. 55(19):1603-1606.

Zaviacic M, Sidlol J und Borovsk M (1993) 'Prostate specific antigen and prostate specific acid phosphatase in adenocarcinoma of Skene's paraurethral glands and ducts'. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*. 423(6):503-505.

8 Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem Betreuer Prof. Dr. med. Sauter für die Unterstützung und Zeit danken.

Des weiteren möchte ich mich herzlich bei Dr. Simon, Frau Möller-Koop, Frau Witt und den Mitarbeitern des Instituts für Pathologie für Ihre Hilfe bedanken.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie, meinen Großeltern und Ayla, ihr seid einfach weltklasse.

9 Lebenslauf

Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

10 Eidesstattliche Erklärung

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.

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

Unterschrift: 