

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für Diagnostik, Institut für Pathologie, Sektion Molekularpathologie

Direktor des Instituts: Prof. Dr. med. Guido Sauter

Prävalenz und klinische Signifikanz der PTK7-Expression beim Prostatakarzinom

Dissertation

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

vorgelegt von:

Sohrab Rahmani
aus Kabul

Hamburg 2020

(wird von der Medizinischen Fakultät ausgefüllt)

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 10.03.2021**

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

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

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

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Das Prostatakarzinom	1
1.2 Klinische und histologische Parameter	2
1.3 Therapie des Prostatakarzinoms	4
1.4 Die Protein-Thyrosin-Kinase 7	5
2. Material und Methoden	8
2.1 Patienten	8
2.2 Immunhistochemie	10
2.3 Statistik	10
3. Ergebnisse	11
3.1 Immunhistochemische Auswertbarkeit der PTK7 Expression beim Prostatakarzinom	11
3.2 PTK7 und Prostatakarzinomphänotyp	12
3.3 PTK7 Expression und ERG Status (TMPRSS2-ERG Fusion)	16
3.4 PTK7 Expression und chromosomale Deletionen beim Prostatakarzinom	17
3.5 Prognostische Bedeutung der PTK7 Expression beim Prostatakarzinom	19
3.6 PTK7 Expression und Ki-67 Labeling Index (LI) beim Prostatakarzinom	23
4. Diskussion	25
5. Zusammenfassung	34
6. Abstract	35
7. Abkürzungsverzeichnis	36
8. Literaturverzeichnis	37
9. Danksagung	43
10. Lebenslauf	44
11. Eidesstattliche Erklärung	45

1. Einleitung

1.1 Das Prostatakarzinom

Prostatakrebs ist weltweit einer der am häufigsten diagnostizierten Krebserkrankungen bei Männern. In Industriestaaten übertrifft die Inzidenzrate sogar die von Lungenkrebs [1]. In Deutschland erkranken jährlich über 60.000 Männer, die Sterberate beträgt jedoch nur 13.000 [2]. Das mittlere Alter bei einer Diagnose liegt bei 66 Jahren [3]. Die Prävalenz ist stark vom Alter und von der Bevölkerungsgruppe abhängig. In unselektionierten Autopsiestudien konnte man Prostatatumoren bei bis zu 50% der Männer über 70 Jahre nachweisen. Dabei sind Afroamerikaner (50,5%) und Kaukasier (47,4 %) gegenüber Asiaten (28,9%) besonders stark betroffen [4]. Eine genetische Prädisposition und Umweltfaktoren spielen offensichtlich eine bedeutende Rolle. Hinzu kommt eine starke Altersabhängigkeit. Prostatakrebs besteht bei < 30-Jährigen in nur 5% der Fälle, bei Männern im Alter > 79 Jahren bereits in 59% [5]. Betrachtet man nochmal die verhältnismäßig geringe Sterberate, so lässt sich schlussfolgern, dass der überwiegende Teil der Männer nicht am Prostatakarzinom verstirbt. Dies belegt auch die relative 5-jahres-Überlebensrate, die bei 91% liegt. Auch bei Verdopplung des Zeitraumes bleibt die relative 10-jahres-Überlebensrate mit 90% fast konstant. Die Sterberate selbst ist seit Mitte der 1990er rückläufig und seit 2007 fast unverändert. Trotzdem zählt das Prostatakarzinom nach wie vor zu den häufigsten Krebstodesursachen bei Männern [2]. Die Verlaufsformen des Prostatakarzinoms reichen somit von einer langsam wachsenden Form mit indolentem Charakter bis hin zu einem schnell wachsenden, aggressiven Tumor mit letalem Ausgang [6, 7]. Daher spricht man bei Prostatakrebs auch von einer „two-faced disease“ [8]. 15 % der Prostatakarzinome nehmen die hochriskante Verlaufsform an [9].

Aus diesem Grund ist es entscheidend das Progressionsrisiko beim Prostatakarzinom zuverlässig vorhersagen zu können. Zu den bislang etablierten prognostischen Parametern zählen *der serologisch bestimmte PSA-Wert, der Gleason Grad und das klinische Tumorstadium.*

1.2 Klinische und histologische Parameter

PSA-Wert / digitale rektale Untersuchung

Männern ab 45 Jahren und einer Lebenserwartung von mehr als 10 Jahren sollte im Rahmen der Frühdiagnostik die Konzentration des Enzyms „prostataspezifisches Antigen (PSA)“ im Blutserum gemessen werden [10]. Ein erhöhter PSA-Wert deutet auf ein Prostatakarzinom hin. Allerdings können auch andere Ursachen wie eine Entzündung der Prostata oder eine benigne Prostatahyperplasie für erhöhte PSA-Werte verantwortlich sein [11]. Darum zieht man ergänzende Parameter wie die PSA-Dichte, die PSA-Anstiegsgeschwindigkeit oder die PSA-Verdopplungszeit heran, die zu einer genaueren Diagnostik beitragen. Erreicht der PSA-Wert erstmalig einen Wert von $\geq 4\text{ng/ml}$ bzw. liegt ein besonders schneller PSA-Anstieg vor und/oder wird bei der „digitalen rektalen Untersuchung (DRU)“ ein auffälliges Ergebnis (Verhärtungen, Knoten) ertastet, folgt meist die sonographisch gesteuerte Entnahme von 10-12 Stanzbiopsien [12, 13].

Gleason Grad

Der Pathologe kann anhand von Stanzbiopsien oder auch am Prostatektomiepräparat den „Gleason Grad“ bestimmen. Dabei wird die Drüsenmorphologie histologisch untersucht und anschließend in fünf Grade eingeteilt. Der Wert „1“ bedeutet sehr gut differenziert; der Wert 5 bedeutet hingegen am schlechtesten differenziert, d.h. die Drüsenarchitektur hat sich vom Ausgangsgewebe stark entfremdet und es besteht ein hoher Malignitätsgrad [14]. Der „Gleason Score (GS)“ errechnet sich anschließend aus der Addition des primären (häufigsten) und sekundären (zweithäufigsten) Gleason Grades. Die Grade 1 und 2 werden heute nicht mehr verwendet, sodass folgende Variationen möglich sind: 3+3, 3+4, 4+3, 4+4, 3+5, 5+3, 4+5, 5+4, 5+5 [14]. Beispielsweise kann sich ein Gleason 7 Prostatakrebs aus 3+4 oder 4+3 zusammensetzen. Die Prognose dieser beiden weicht jedoch aufgrund der heterogenen Menge an Gleason 4 Anteilen stark voneinander ab [15].

Ein Nachteil des Gleason Scores ist, dass dieser in hohem Maße von der subjektiven Beurteilung des Pathologen abhängt. In 40% der Fälle kommen zwei Pathologen zu unterschiedlichen Ergebnissen. Man spricht von einer hohen „Interobserver-Variabilität“ [16]. Eine Verbesserung wird durch den „quantitativen Gleason (qG)“ erreicht, welcher eine feinere Klassifizierung erlaubt. Bei diesem Verfahren werden

keine Gleason Kategorien, sondern die prozentualen Gleason 4/5 Anteile als kontinuierliche Variable verwendet. Vor allem bei grenzwertigen Tumorbefunden kann hierdurch eine bessere Vorhersagbarkeit getroffen werden [17].

Tumorstadium

Das „klinische Tumorstadium (cT)“ wird nach der TNM-Klassifikation der „UICC“ angegeben. Diese erlaubt eine systematische Einteilung des Tumors nach seiner Ausbreitung („T“) und gibt zudem an, ob Lymphknoten („N“) betroffen und Metastasen („M“) vorhanden sind (s. Tabelle 1) [18].

Die klinische Festlegung des Tumorstadiums ist allerdings sehr unzuverlässig, da ein positiver Tastbefund nur dann erhoben werden kann, wenn der Tumor in der Nachbarschaft des Rektums liegt, was nicht immer der Fall ist [19]. Auch die Festlegung des Nodalstatus ist auch mit den fortgeschrittensten radiologischen Methoden wie dem PSMA-PET nur bei Metastasen möglich, welche eine bestimmte Mindestgröße überschritten haben. Die Festlegung des T- und N-Status ist somit eigentlich nur postoperativ möglich [20].

Tabelle 1: TNM Klassifikation nach UICC [21]

T - Primärtumor	
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Hinweis eines Primärtumors
T1	Klinisch unauffälliger Tumor, der nicht tastbar ist
	T1a zufälliger Nachweis eines Tumors in der histologischen Untersuchung, höchstens 5% des Gewebes betroffen
	T1b zufälliger Nachweis eines Tumors in der histologischen Untersuchung, mehr als 5% des Gewebes betroffen
	T1c Tumornachweis durch Nadelbiopsie, die z.B. aufgrund eines erhöhten PSA-Werts durchgeführt wurde
T2	Tastbarer Tumor, der auf die Prostata begrenzt ist
	T2a Tumor umfasst maximal die Hälfte eines Prostatalappens
	T2b Tumor umfasst mehr als die Hälfte eines Prostatalappens, jedoch nicht beide Lappen
	T2c Tumor umfasst beide Lappen
T3	Tumor erstreckt sich durch die Prostatakapsel
	T3a Tumorausbreitung ein- oder beidseitig über die Prostatakapsel hinaus, Samenblasen jedoch tumorfrei
	T3b Ausbreitung bis in die Samenblase
T4	Tumor ist fixiert oder hat sich auf benachbarte Strukturen (außer der Samenblase) wie Schließmuskeln, Rektum und/oder Beckenboden ausgebreitet

N - Regionale Lymphknoten	
NX	Regionale Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionalen Lymphknotenmetastasen nachweisbar
N1	Regionale Lymphknotenmetastasen nachweisbar
M - Fernmetastasen	
M0	Keine Fernmetastase nachweisbar
M1	Fernmetastasen nachweisbar
	M1a Nichtregionale Lymphknoten betroffen
	M1b Knochenmetastasen nachweisbar
	M1c Andere Organe betroffen

1.3 Therapie des Prostatakarzinoms

Die Therapie beim Prostatakarzinom ist sehr individuell und richtet sich nach dem Risikotyp bzw. nach der Schwere der Erkrankung. Grundsätzlich bestehen die folgenden Optionen:

Active Surveillance (AS)

Die „Active Surveillance (AS)“ besteht aus einer klinischen *Überwachung* des Patienten. Ihr liegt die Diagnose eines „low-risk“ PCa und die Beschwerdefreiheit des Patienten mit hoher Lebenserwartung (> 10 Jahre) zugrunde. Engmaschig wird der PSA-Wert, die DRU und die Ergebnisse der Stanzbiopsie kontrolliert [12]. Erst bei Änderung der Einschätzung des Aggressionspotentials des Tumors oder bei Auftreten von Symptomen wird eine kurative Therapie eingeleitet [22]. Der Vorteil der AS liegt in der Zurückhaltung der Therapie. Es können auf diese Weise therapeutische Nebenwirkungen vermieden oder zumindest hinausgezögert werden. Einziger Nachteil ist, dass das reine Beobachten des Krebses für viele Patienten eine mentale Belastung darstellt. Die regelmäßigen Kontrollen erzeugen zudem auch laufende Kosten [23].

Watchful Waiting

Das „Watchful Waiting (WW)“ ist von der AS abzugrenzen. Es zeichnet sich durch die *palliative* Therapie von Patienten mit schlechtem Allgemeinzustand und einer niedrigen Lebenserwartung (< 10 Jahren) aus. Die Behandlung richtet sich dabei gegen die Symptome. Das Ziel ist die Aufrechterhaltung einer hohen Lebensqualität für den Patienten [12, 22].

Radikale Prostatektomie

Als wichtigste *kurative* Behandlungsform eines lokalisierten PCa gilt nach wie vor die „radikale Prostatektomie (RPE)“. Sie beinhaltet die vollständige Entfernung der Prostata und der umliegenden Organe wie Samenblase und Beckenlymphknoten. Die Prostatektomie kann dabei offen, laparoskopisch oder roboter-unterstützt durchgeführt werden [24]. Häufige Nebenwirkungen, die mit der OP einhergehen, sind die postoperative erektile Dysfunktion (bis zu 68%) und die Harninkontinenz (bis zu 69%) [23, 25-27].

Strahlentherapie

Die Strahlentherapie wird als Monotherapie bei lokalisiertem und lokal fortgeschrittenem PCa genutzt. Unterstützt wird sie durch dreidimensionale Bildgebung mittels CT, wodurch eine präzisere Bestrahlung des Tumoreals ermöglicht wird. Die Strahlungs-dosis beträgt zwischen 74 und 80 Gray [13]. Im Rahmen der Therapie können Komplikationen wie gastrointestinale und urogenitale Spätfolgen auftreten. Durch die „intensitätsmodulierte Strahlentherapie“ versucht man diese gering zu halten [27].

Zu weiteren Therapieoption gehört die Brachytherapie, die Antihormontherapie und die Chemotherapie. Diese kommen meist als adjuvante Therapien vor und finden je nach Aggressionsrisiko, Tumorstadium und Patientenalter Anwendung [24].

Trotz der beschriebenen klinisch-pathologischen Prognoseparameter finden beim PCa in bis zu 67% der Fälle eine Überbehandlung statt [26]. Um diese zu vermeiden und um eine möglichst sichere Therapieempfehlungen zu geben, wären bessere Prognosemarker notwendig. Die Suche hiernach konzentriert sich aktuell auf molekulare Biomarker.

1.4. Die Protein-Thyrosin-Kinase 7

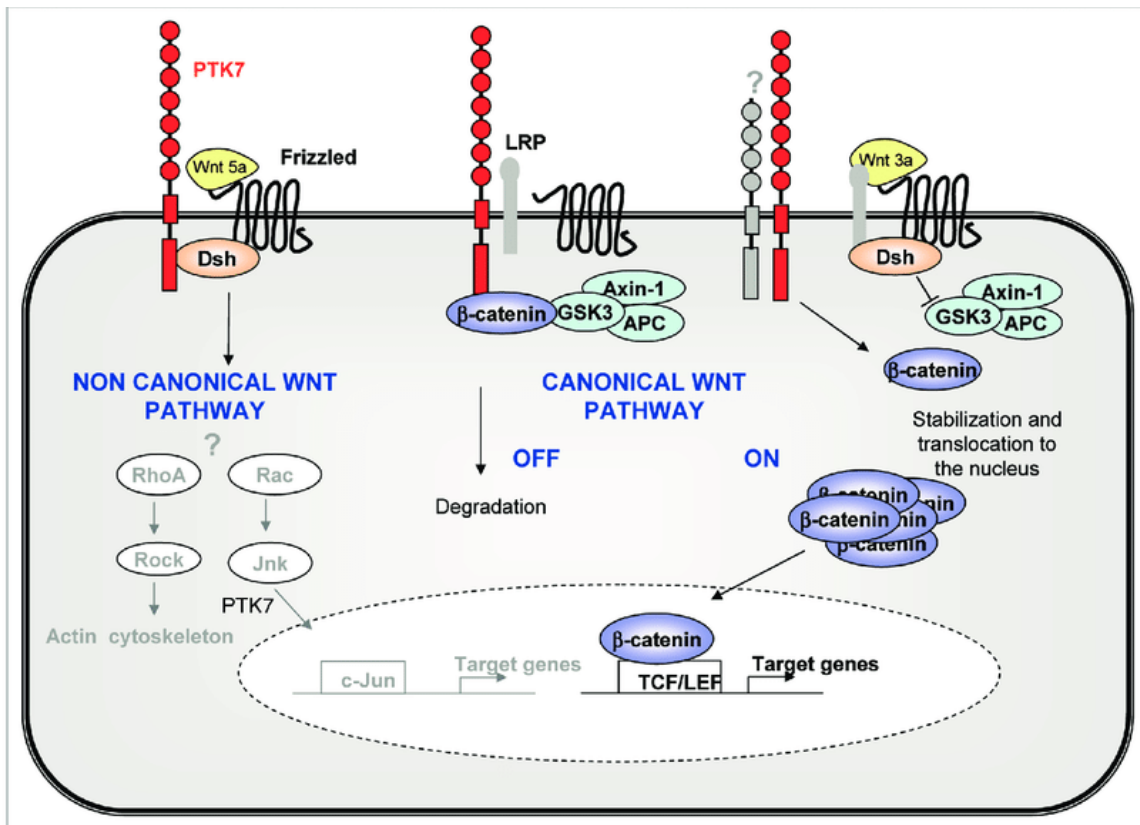
Die Protein-Thyrosin-Kinase 7 (PTK7), auch bekannt als Colon-Carcinoma-Kinase 4 (CCK4) ist ein Transmembranrezeptor der Familie der Thyrosin-Kinasen, welche erstmalig in hoher Konzentration in Darmkrebs gefunden wurde [28]. Sie besteht aus einer extrazellulären Domäne mit sieben Immunoglobulin Schlaufen, einer Transmembran-Domäne und einer intrazellulären Thyrosin-Kinase-Domäne. Aufgrund

der katalytisch inaktiven Thyrosin-Kinase-Domäne wird sie auch als Pseudokinase bezeichnet [29].

PTK7 reguliert die Zellpolarität und die Zellmigration und spielt in der Embryonalentwicklung, in der Gewebehämostase, bei der Geweberegeneration und Wundheilung eine entscheidende Rolle [30, 31]. Darüber hinaus ist PTK7 ein Co-Ligand des „WNT-Pathway“. Dieses Netzwerk von Signalkaskaden ist für die Steuerung von diversen physiologischen Prozessen wie Zellproliferation, Apoptose und Zellmorphologie zuständig. Maßgeblich beteiligt ist der WNT-Pathway an der Embryonalentwicklung, der Organogenese sowie der Stammzellproliferation. Seine Fehlregulierung steht in Zusammenhang mit der Tumorbildung [30].

PTK7 wirkt sowohl am kanonischen Zweig als auch am nicht-kanonischen PCP-Signalweg des WNT-Pathways (Abb. 1). Der kanonische Signalweg reguliert die Zellproliferation und Zelldifferenzierung und ist ganz wesentlich von dem Strukturprotein β -Catenin abhängig [31]. Die Wirkungsweise von PTK7 auf den kanonischen Zweig gilt bisher als nicht verstanden und wird kontrovers diskutiert [32]. Es konnte nämlich sowohl eine aktivierende als auch eine inhibitorische Wirkung nachgewiesen werden [30, 33, 34]. Die Wirkung von PTK7 auf den „Planar-Cell-Polarity“ (PCP)-Signalweg, welcher im Wesentlichen die Zellpolarität und Zellmigration steuert, ist hingegen besser erforscht [31]. Beispielsweise ist die PTK7 in *Drosophila* für die planare Polarität der Flügelhaare und der Sinnesborsten zuständig. Im PCP-Signalweg bei Wirbeltieren reguliert PTK7 die konvergente Extension während der Embryogenese und hat außerdem Einfluss auf die Ausrichtung der Stereozilien im Innenohr [30]. Bei Mäusen mit einem mutierten PTK7-Gen kommt es zu Neuralrohrschlussdefekten (NTDs) [35]. Auch beim Menschen wird die PTK7 mit NTD assoziiert [36].

Abbildung 1: Kanonischer und nicht kanonischer/PCP Zweig des WNT-Pathway



Der nicht kanonische PCP Signalweg wird durch die Bindung von Liganden wie WNT5a oder WNT11 am Co-Rezeptor Frizzled (Fz) aktiviert. Die Signalübertragung verläuft anschließend über das Protein Dishevelled (Dsh), welcher die GTPasen RhoA und Rac und deren Zielkinasen ROCK und JNK aktiviert, wodurch die Regulierung des Zytoskeletts bzw. die Zellpolarität gesteuert wird. PTK7 ist in der Lage „Dsh“ in Anwesenheit von „Fz“ zu binden und wirkt somit aktiv am PCP-Signalweg [34].

Die PTK7 konnte bereits mit einer Reihe von Tumoren in Verbindung gebracht werden. Eine Überexpression wurde bei Darm-, Magen-, Brust-, Lungenkrebs, im Liposarkom und im Plattenepithelkarzinom der Speiseröhre festgestellt [37-40]. Jedoch wurde beim Ovarialkarzinom und beim malignen Melanom – im Vergleich zu Normalgewebe – eine Unterexpression von PTK7 beobachtet [37].

An Prostatatumoren gibt es derzeit nur eine Studie an 180 Patienten. In dieser ließen sich erhöhte PTK7 Expressionen signifikant mit einem erhöhtem pT-Stadium, einem hohen präoperativen PSA-Wert, einem erhöhtem Gleason Score, sowie mit Lymphknotenmetastasen, einem Tumorbefall der Samenblase und einem häufigeren

biochemischen Rezidiv assoziieren [41]. Angesichts der aufgrund dieser Daten zu vermutenden klinisch relevanten Prognoserelevanz der PTK7 Expression sollte die tatsächliche klinische Nützlichkeit dieses Parameters in dieser Studie an eine Kohorte von > 15.000 Prostatakarzinomen geklärt werden.

2. Material and Methoden

2.1 Patienten

Im Rahmen der Doktorarbeit wurden 17.747 Prostatektomiepräparate untersucht, die allesamt aus Operationen der „radikalen Prostatektomie“ zwischen 1992 und 2014 aus der Martiniklinik und der Klinik & Poliklinik für Urologie des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf hervorgingen. Klinische Verlaufsdaten waren von insgesamt 14.464 Patienten vorhanden. Der Beobachtungszeitraum betrug im Median 48 Monate (Intervall: 0,5 bis 275,8 Monate; s. Tabelle 2). Zur klinischen Verlaufskontrolle wurde postoperativ das „Prostata-spezifische-Antigen“ im Blutserum (PSA-Wert) gemessen. Ein PSA-Rezidiv wurde in diesem Zusammenhang ab einem Wert von 0,2 ng/ml und bei ansteigendem Verlauf nach dem ersten Auftreten angenommen.

Tabelle 2: Auflistung des untersuchten Patientenkollektivs (n=17.747)

	Anzahl der Patienten	
	TMA Studienkohorte (n=17,747)	PSA-Rezediv
Follow-up (Monate)		
n	14464 (81.5%)	3612 (25%)
Mean	56.3	-
Median	48	-
Alter (Jahre)		
≤50	433 (2.4%)	66 (15.2%)
51-59	4341 (24.5%)	839 (19.3%)
60-69	9977 (56.4%)	2073 (20.8%)
≥70	2936 (16.6%)	634 (21.6%)
Präoperativer PSA (ng/ml)		
<4	2225 (12.6%)	313 (14.1%)
4-10	10520 (59.6%)	1696 (16.1%)
10-20	3662 (20.8%)	1043 (28.5%)
>20	1231 (7%)	545 (44.3%)
Tumorstadium (AJCC 2002)		
pT2	11518 (65.2%)	1212 (10.5%)
pT3a	3842 (21.7%)	1121 (29.2%)
pT3b	2233 (12.6%)	1213 (54.3%)
pT4	85 (0.5%)	63 (74.1%)
Gleason Score		
≤3+3	3570 (20.3%)	264 (7.4%)
3+4	9336 (53%)	1436 (15.4%)
3+4 Tert.5	798 (4.5%)	165 (20.7%)
4+3	1733 (9.8%)	683 (39.4%)
4+3 Tert.5	1187 (6.7%)	487 (41%)
≥4+4	999 (5.7%)	531 (53.2%)
Lymphknoten-Metastasen		
pN0	10636 (89.4%)	2243 (21.1%)
pN+	1255 (10.6%)	700 (55.8%)
Resektionsrand		
Negative	14297 (80.8%)	2307 (16.1%)
Positive	3388 (19.2%)	1304 (38.5%)

Alle Prostatektomiepräparate waren nach einem standardisierten Verfahren analysiert worden. Zum Zwecke der histologischen Untersuchung wurde eine vollständige Einbettung der gesamten Prostata durchgeführt [42]. Es folgte die Herstellung eines „Tissue Microarrays“ (TMA). Das hierfür verwendete Verfahren wurde bereits früher detailliert beschrieben [43, 44]. Der Herstellungsprozess in Kürze dargestellt: Aus tumorhaltigen Gewebestücken eines jeden Patienten wurden Gewebeproben mittels einer 0,6 mm breiten Hohlzylinder gewonnen. Die entnommenen „Gewebezylinder“

wurden im Anschluss in hierfür vordefinierte Positionen eines Empfängerparaffinblocks eingebracht. Das zu untersuchende Gewebe wurde auf diese Weise auf insgesamt 39 TMA-Blöcke verteilt, wovon jeder 129 – 522 Tumorproben enthielt. Für interne Kontrollen erhielt jeder TMA-Block zusätzlich eine Anzahl von unterschiedlichem Kontrollgeweben, normales Prostatagewebe miteingeschlossen. Die molekulare Datenbank, die diesem TMA angegliedert ist, enthält Ergebnisse zur ERG Expression in 10.678 Fällen [45], ERG Translokation in 7.099 Fällen [46], 5q21 Deletion (CHD1) in 7.932 Fällen [47], 6q15 Deletion (MAP3K7) in 6.069 Fällen [48], PTEN Deletion (10q23) in 6.704 Fällen [49] und 3p13 Deletion (FOXP1) in 7.081 Fällen [50]. Daten zum Ki-67 Labeling Index lagen in 5.841 Fällen vor [51].

2.2 Immunhistochemie

Für die Untersuchung wurden frische TMA-Schnitte verwendet, die alle am selben Tag und in einem einheitlichen Verfahren gefärbt wurden. Die Schnitte wurden hierfür deparaffiniert und zur Hitze induzierten Antigenmaskierung (Antigen Retrieval) für fünf Minuten in einem Autoklaven (121°C) in einem pH-9 Puffer inkubiert. Der primäre Antikörper für PTK7 (spez. monoklonaler Mausantikörper [Millipore MABN721 Klon 4F9] wurde in der Verdünnung 1:4050 bei 37°C für 60 Minuten zugesetzt. Die Darstellung des gebundenen Antikörpers fand mittels des EnVison KIT (Dako, Glostrup, Dänemark) gemäß der Herstellerangaben statt. Die PTK7-Färbung zeigte eine charakteristische Zellmembranfärbung, die meistens mit einer geringeren Färbung des Zytoplasmas einherging. Im Rahmen dieser Studie wurde nur die Membranfärbung ausgewertet. Diese war typischerweise in allen Zellen (100%) der PTK7-positiven Krebszellen vorhanden und wurde semiquantitativ in vier Kategorien beurteilt: negativ, schwach, moderat, stark.

2.3 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mittels der Software JMP 12.0 (SAS Institute Inc., NC, USA). Kontingenztafeln und der Chi-Quadrat-Test (Wahrscheinlichkeit) wurden verwendet um jeweils nach signifikanten Beziehungen zwischen Kategorien zu suchen (PKT7-Expression und klinisch-pathologischen Faktoren). Zusammenhänge zwischen PTK7 und der Zellproliferation, gemessen am Ki-67-Labeling-Index (LI), wurden durch

eine ANOVA Statistik berechnet. Es wurden Kaplan-Meier-Kurven hergestellt, die als klinischen Endpunkt den biochemischen PSA-Rezidiv verwendeten. Der Log-Rank-Test wurde verwendet um signifikante Unterschiede zwischen Einflussfaktoren auf das PSA-Rezidiv festzustellen. Die Cox-Regressions-Analyse wurde angewandt um die statistische Unabhängigkeit von pathologischen, molekularen und klinischen Variablen zu testen.

3. Ergebnisse

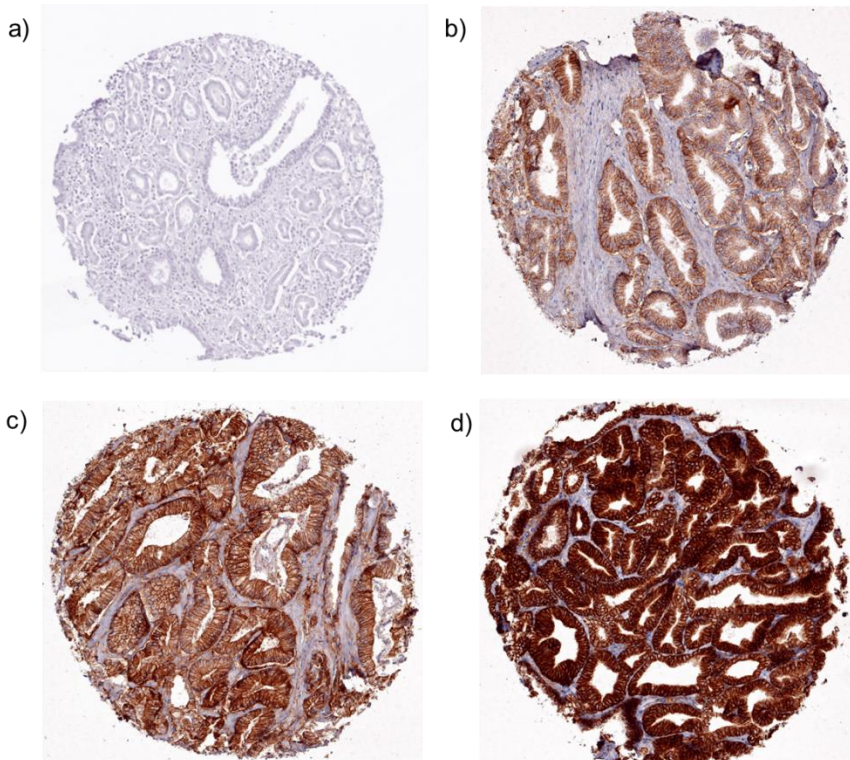
3.1 Immunhistochemische Auswertbarkeit der PTK7 Expression beim Prostatakarzinom

Die Immunfärbung von PTK7 konnte in 13.884 (78,2 %) der insgesamt 17.747 Tumorproben ausgewertet werden. Bei den restlichen 3.863 Proben konnten keine Ergebnisse erzielt werden, weil in den entsprechenden Gewebeslots kein Gewebe oder keine Tumorzellen enthalten waren oder die Tumorzellen nicht eindeutig identifiziert werden konnten. In normalen Prostatagewebe fand sich regelmäßig eine kräftige PTK7 Anfärbung von Basalzellen. Die normalen azinären/luminalen Prostataepithelien zeigten in der Regel eine moderate Expression. Viele Prostatakarzinome zeigten eine im Vergleich zu Normalgewebe ähnlich starke Membranfärbung. Allerdings war die PTK7 Expression in Tumorzellen in einem Teil der Tumoren auch deutlich stärker als in den azinären Normalzellen. Dies war insbesondere bei Tumoren mit „starker“ PTK7 Expression der Fall.

Die untersuchten Tumorproben waren zu 10% negativ für PTK7 oder wiesen jeweils in einem Anteil von 56% eine schwache, in einem Anteil von 29,4 % eine moderate und in 4% der Fälle eine starke membranöse PTK7 Färbung auf. Repräsentative Beispiele für negative, schwache, moderate und starke Intensität der PTK7 Färbung in Prostatakarzinomen sind in Abbildung 2 dargestellt.

Abbildung 2: PTK7 Immunhistochemie beim Prostatakarzinom

a) negative, b) schwache, c) moderate und d) starke Intensität der PTK7 Färbung



Für die folgenden Analysen wurden die Färbeintensitäten von PTK7, die zunächst in den Kategorien „schwach“ und „moderat“ unterschieden wurden, in einer einzigen Kategorie „gering“ zusammengefasst. Diese Zusammenfassung erfolgte, weil Tumoren mit diesen beiden Intensitäten der PTK7 Färbung einen annähernd gleichen Verlauf in Kaplan-Meyer-Kurven zeigten.

3.2. PTK7 und Prostatakarzinomphänotyp

Um zu untersuchen, ob eine PTK7 Expression mit dem Phänotyp des Prostatakarzinoms assoziiert ist, wurden die immunhistochemischen Ergebnisse für PTK7 mit den verschiedenen klinisch-pathologischen Kriterien der Prostatakarzinome verglichen. Wenn alle Tumorproben berücksichtigt wurden (Tab. 3), zeigte sich eine signifikante Korrelation der PTK7 Expression mit allen klinisch relevanten Parametern, wie Tumorstadium und Gleason Grad (jeweils $p < 0,0001$), Nodalstatus und präoperativer PSA-Wert (jeweils $p < 0,0005$) sowie dem Resektionsrandstatus ($p = 0,0344$). Bei den Untergruppen des Prostatakarzinoms, die durch den ERG-Status charakterisiert sind, wiesen ERG-negative Tumoren statistisch signifikante

Assoziationen mit Tumorstadium ($p < 0,0001$), Gleason Grad ($p = 0,0002$) sowie präoperativem PSA-Wert ($p = 0,0116$) auf (Tab. 4), während in ERG-positiven Tumoren eine PTK7-Überexpression nur noch mit dem Tumorstadium ($p = 0,0042$) und mit dem Gleason Grad ($p = 0,0003$) signifikant assoziiert blieb (Tab. 5).

Tabelle 3: PTK7 Expression und Tumorphänotyp

Parameter	PTK7 Expression				p Wert
	n auswertbar	negativ (%)	gering (%)	stark (%)	
Alle Tumoren	13.884	10,1	85,8	4,1	
Tumorstadium					
pT2	8.839	11,2	85,2	3,6	<0.0001
pT3a	3.092	8,7	86	5,3	
pT3b-pT4	1,899	7	88	5,0	
Gleason Grad					
≤3+3	2.564	13,3	84,6	2,1	<0.0001
3+4	7.389	9,6	86,2	4,1	
3+4 Tert.5	663	9,7	86,6	3,8	
4+3	1.343	8,8	84,9	6,3	
4+3 Tert.5	985	7,9	86,2	5,9	
≥4+4	822	8,5	86	5,5	
Nodalstatus					
N0	8.300	9,9	85,8	4,4	0,0005
N+	1.056	6,8	87,2	6,0	
Präoperativer PSA Wert (ng/ml)					
<4	1.673	8,2	87,8	4	0,0005
4-10	8.219	9,5	86,3	4,2	
10-20	2.895	11,7	84,1	4,1	
>20	1.014	12,5	83,4	4,0	
Resektionsrand					
negativ	11.086	10,2	85,9	3,9	0,0344
positiv	2.750	9,6	85,4	5,0	

Tabelle 4: PTK7 Expression und Tumorphänotyp in ERG-negativen Prostatakarzinomen

Parameter	n auswertbar	PTK7 Expression			p Wert
		negativ (%)	gering (%)	stark (%)	
ERG negative Tumoren	4.827	16,3	82,0	1,7	
Tumorstadium					
pT2	3.226	17,4	81,3	1,4	<0.0001
pT3a	966	16,7	81,7	1,7	
pT3b-pT4	622	10,8	86,2	3,1	
Gleason Grad					
≤3+3	924	20,8	78,2	1,0	0,0002
3+4	2.601	15,9	82,7	1,4	
3+4 Tert.5	221	15,8	83,3	0,9	
4+3	505	14,1	82,6	3,4	
4+3 Tert.5	292	12,7	83,9	3,4	
≥4+4	281	14,6	83,3	2,1	
Nodalstatus					
N0	2.776	16,2	81,8	1,9	0,4768
N+	284	13,7	83,8	2,5	
Präoperativer PSA Wert (ng/ml)					
<4	500	14,4	83,6	2,0	0,0116
4-10	2.889	15,1	83,3	1,6	
10-20	1.032	19,3	79,3	1,5	
>20	384	20,1	77,6	2,3	
Resektionsrand					
negativ	3.850	16,3	82,1	1,6	0,9405
positiv	965	16,5	81,8	1,8	

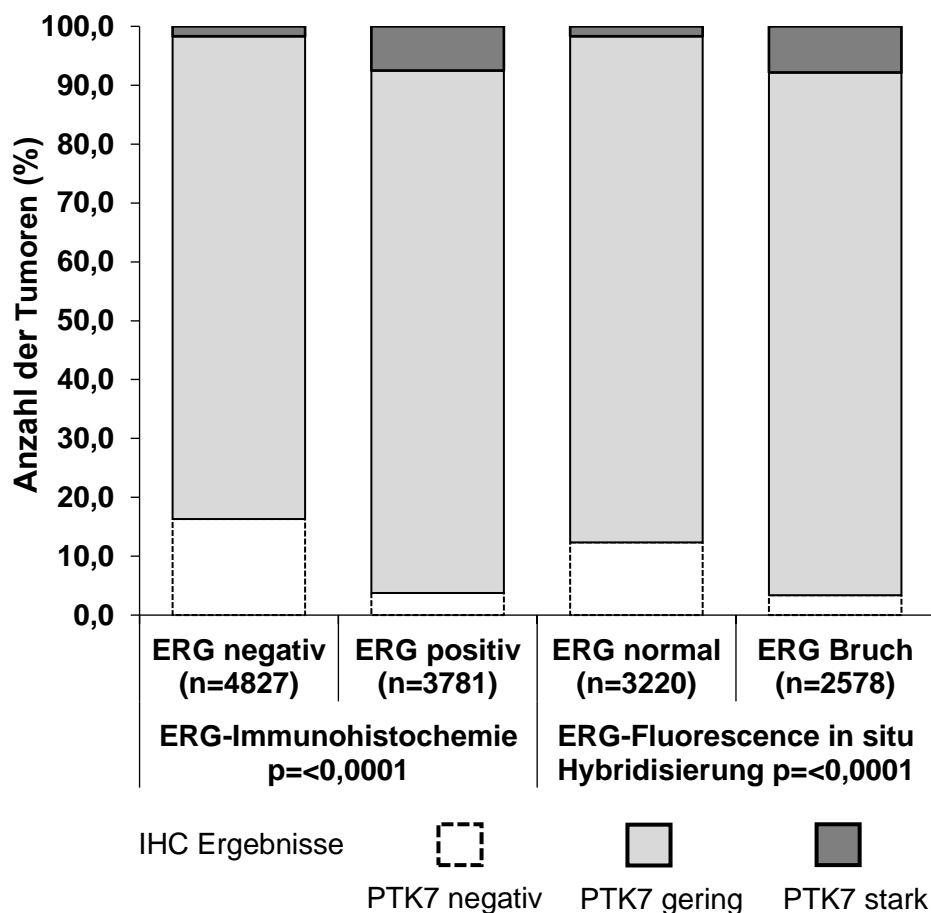
Tabelle 5: PTK7 Expression und Tumorphänotyp in ERG-positiven Prostatakarzinomen

Parameter	n auswertbar	PTK7 Expression			p Wert
		negativ (%)	gering (%)	stark (%)	
ERG positive Tumoren	3.781	3,8	88,7	7,5	
Tumorstadium					
pT2	2.259	4,3	88,9	6,8	0,0042
pT3a	1.008	2,4	88	9,6	
pT3b-pT4	500	4,0	89,4	6,6	
Gleason Grad					
≤3+3	746	5,9	89,9	4,2	0,0003
3+4	2.182	3,3	88,9	7,8	
3+4 Tert.5	117	2,6	89,7	7,7	
4+3	366	2,2	88,3	9,6	
4+3 Tert.5	213	3,8	85,9	10,3	
≥4+4	154	3,9	85,1	11,0	
Nodalstatus					
N0	2.137	3,6	88,1	8,3	0,7433
N+	253	3,2	89,7	7,1	
Präoperativer PSA Wert (ng/ml)					
<4	513	4,9	89,1	6,0	0.294
4-10	2.338	3,2	88,9	7,9	
10-20	679	4,6	87,8	7,7	
>20	226	4,4	88,9	6,6	
Resektionsrand					
negativ	2.980	3,8	88,8	7,4	0,8524
positiv	786	3,7	88,3	8,0	

3.3. PTK7 Expression und ERG Status (TMPRSS2-ERG Fusion)

Die PTK7 Färbungen wurden zur Untersuchung einer möglichen Assoziation mit ERG mit bereits früher erhobenen Ergebnissen zum ERG-Status [45, 52] verglichen. Der ERG-Status war sowohl mittels IHC (ERG-Expression) als auch Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) (ERG-Rearrangement) bestimmt worden. ERG-IHC-Daten lagen von 8608 Patienten vor, ERG-FISH-Daten waren von 5798 dieser Patienten vorhanden. Es konnte eine signifikante Assoziation von starker PTK7 Überexpression mit positiven ERG-Status nachgewiesen werden (jeweils $p < 0,0001$). So war eine stark positive PTK7 Färbung in lediglich 80 von 4.827 (1,7%) immunhistochemisch ERG-negativen Tumoren, aber in 284 von 3.781 (7,5%) immunhistochemisch ERG-positiven Tumoren zu finden. Die Ergebnisse für die ERG-FISH Daten waren analog. So fand sich eine stark positive PTK7 Färbung in nur 54 von 3.220 (1,7%) Tumoren ohne ERG-Fusion, aber in 202 von 2578 (7,8%) der Tumoren mit einer TMPRSS2-ERG Fusion. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3 dargestellt.

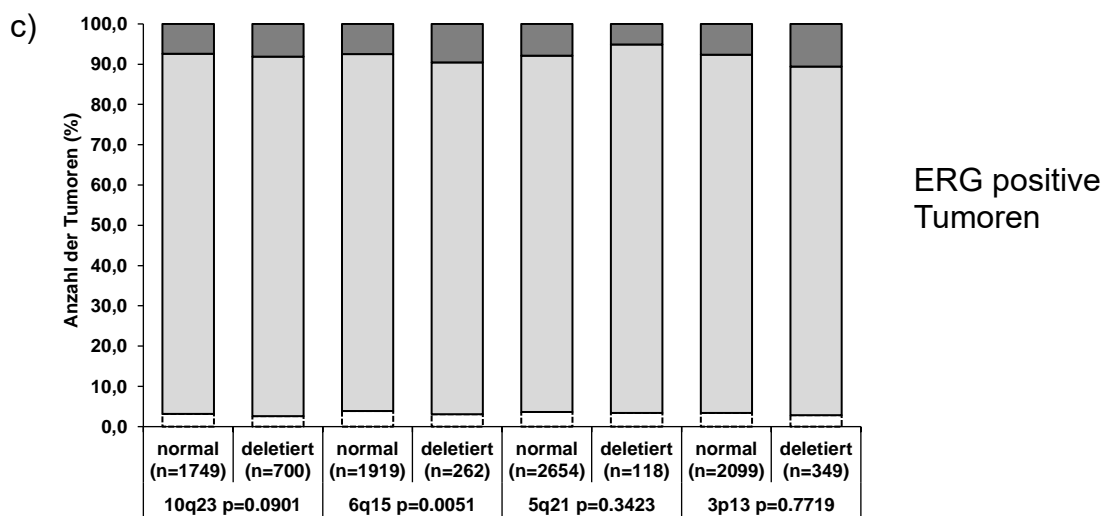
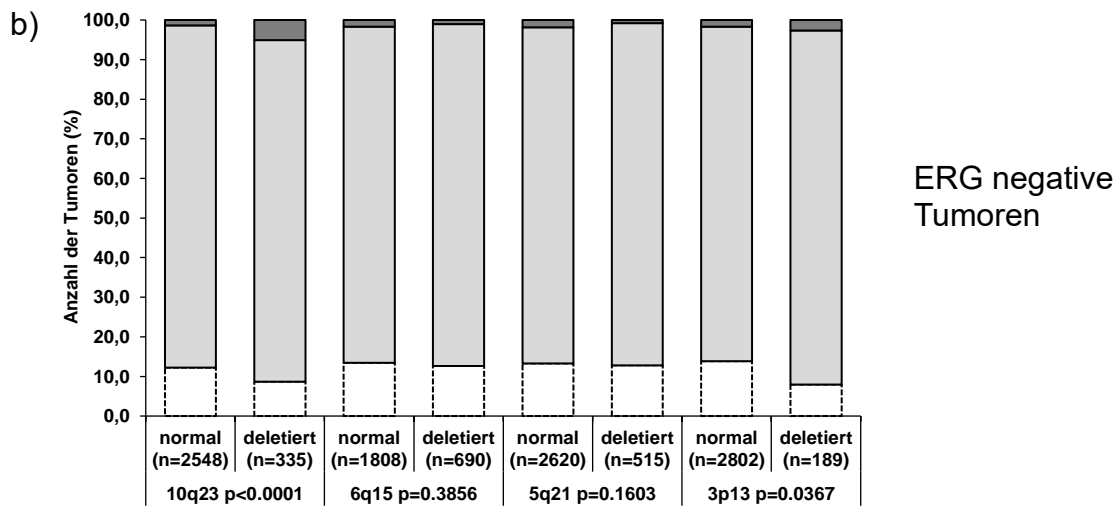
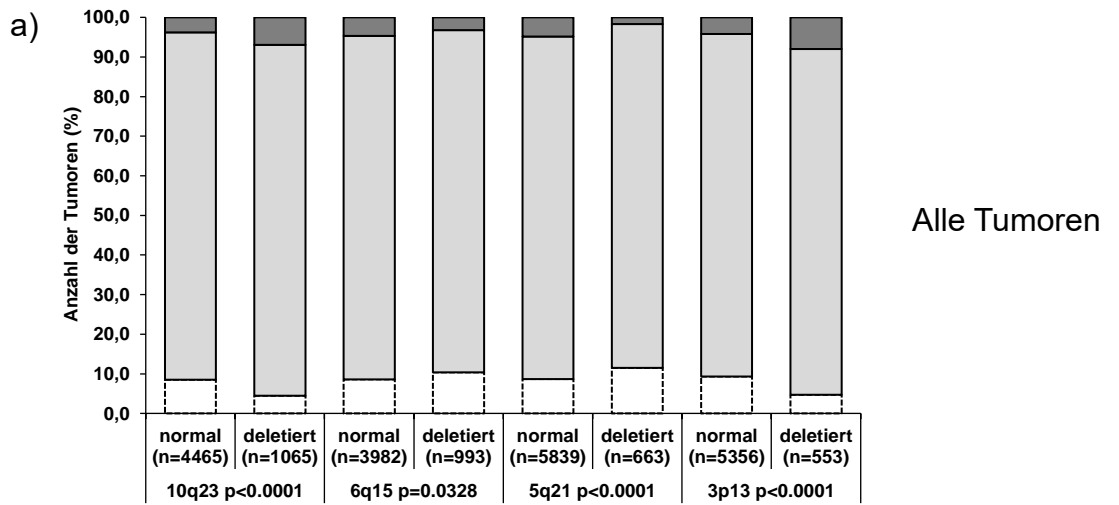
Abbildung 3: PTK7 Expression und ERG-Status



3.4. PTK7 Expression und chromosomale Deletionen beim Prostatakarzinom

Frühere Studien haben gezeigt, dass molekulare Prostatakarzinomuntergruppen durch TMPRSS2-ERG Fusionen in Kombination mit verschiedenen genomischen Deletionen definiert werden können. Zu den wichtigsten Deletionen gehören PTEN [49] und 3p13 [50], die eng mit positiver ERG-Expression assoziiert sind, sowie Deletionen von 5q21 [47] und 6q12-22 [48], welche eng mit einer ERG-Negativität korrelieren. Der Vergleich der PTK7 Expression mit genomischen Deletionen (Abb. 4) zeigte, dass PTK7 mit allen Deletionen ($p=0,03268$ für 6q15; sonst $p<0,0001$) statistisch signifikant assoziiert war. Die weitere Analyse in den durch den ERG-Status definierten Subgruppen ergab eine signifikante Assoziation zwischen PTEN-Deletion und der PTK7 Expression bei ERG-negativen Tumoren ($p<0,0001$), bei ERG-positiven Tumoren wurde eine solche signifikante Beziehung nur annähernd erreicht ($p=0,0901$). Deletionen von 3p13 ($p=0,0367$) waren nur in ERG-negativen Tumoren und Deletionen von 6q15 ($p=0,0051$) waren nur in ERG-positiven Karzinomen marginal mit der PTK7 Expression assoziiert. Diese Unterschiede waren aber insgesamt so gering, dass diese wohl kaum auf eine relevante biologische Bedeutung hindeuten.

Abbildung 4: PTK7 Expression und chromosomale Deletionen beim Prostatakarzinom: a) alle Tumoren, b) ERG-negative und c) ERG-positive Karzinome



PTK7 negativ
 PTK7 gering
 PTK7 stark

3.5. Prognostische Bedeutung der PTK7 Expression beim Prostatakarzinom

Die prognostische Bedeutung der klassischen Parameter pT, pN, traditioneller Gleason Score und R-Status sind in Abbildung 5 a) + b) und 6 a) + b) dargestellt. Die eindeutige Beziehung dieser Parameter zum Endpunkt PSA-Rezidiv stellt eine starke Validierung der Prognosedaten des verwendeten Patientenkollektivs dar. Die PTK7 Expression war sowohl in allen Tumoren als auch in ERG negativen Karzinomen signifikant mit einer ungünstigen Prognose korreliert (jeweils $p < 0,0001$), aber nicht in Tumoren mit TMPRSS2-ERG Fusion ($p = 0,0413$). Die Ergebnisse für alle Tumore und für die beiden Untergruppen der ERG- negativen und ERG- positiven Karzinome sind in Abbildung 7 a) - c) dargestellt.

Abbildung 5: Prognostische Bedeutung von a) Gleason Grad und b) pT-Status

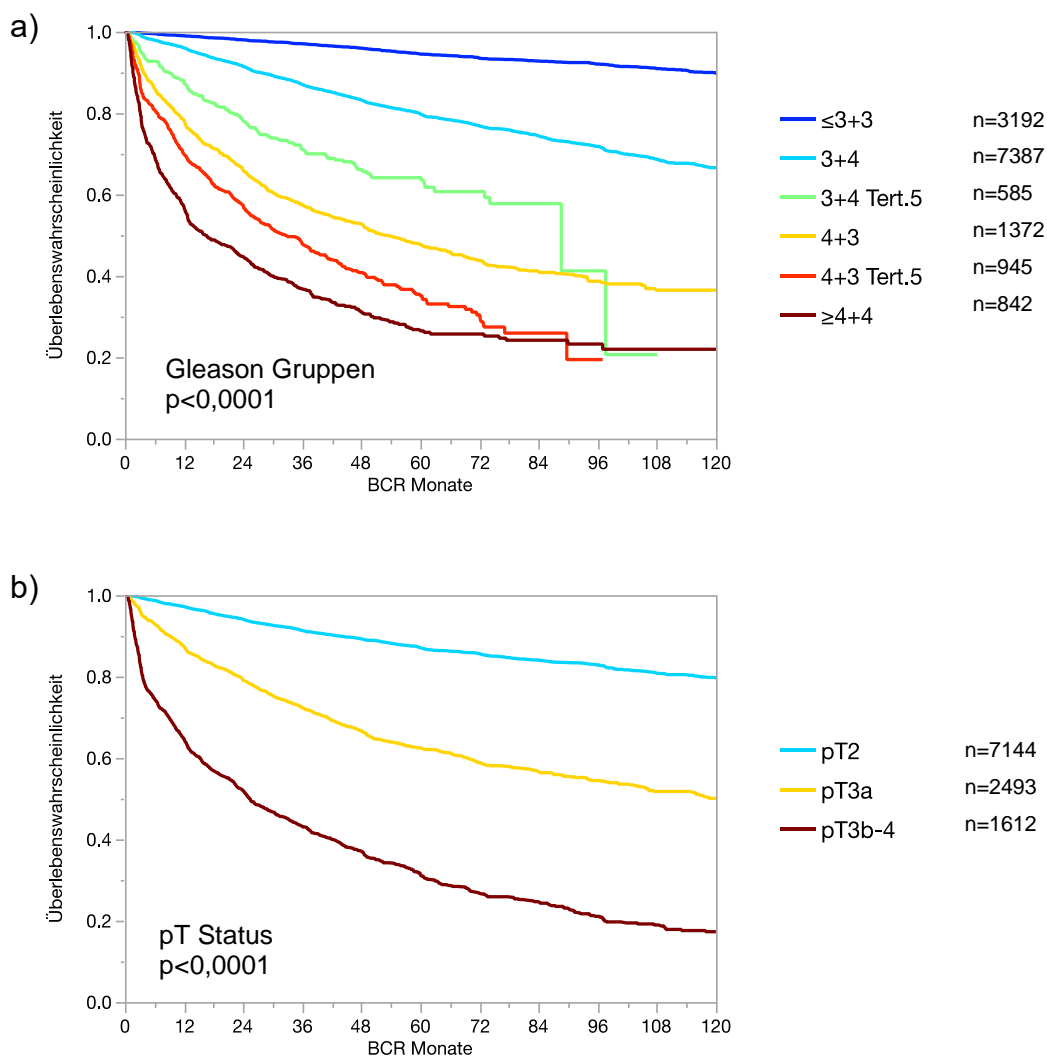


Abbildung 6: Prognostische Bedeutung von a) N-Status und b) R-Status

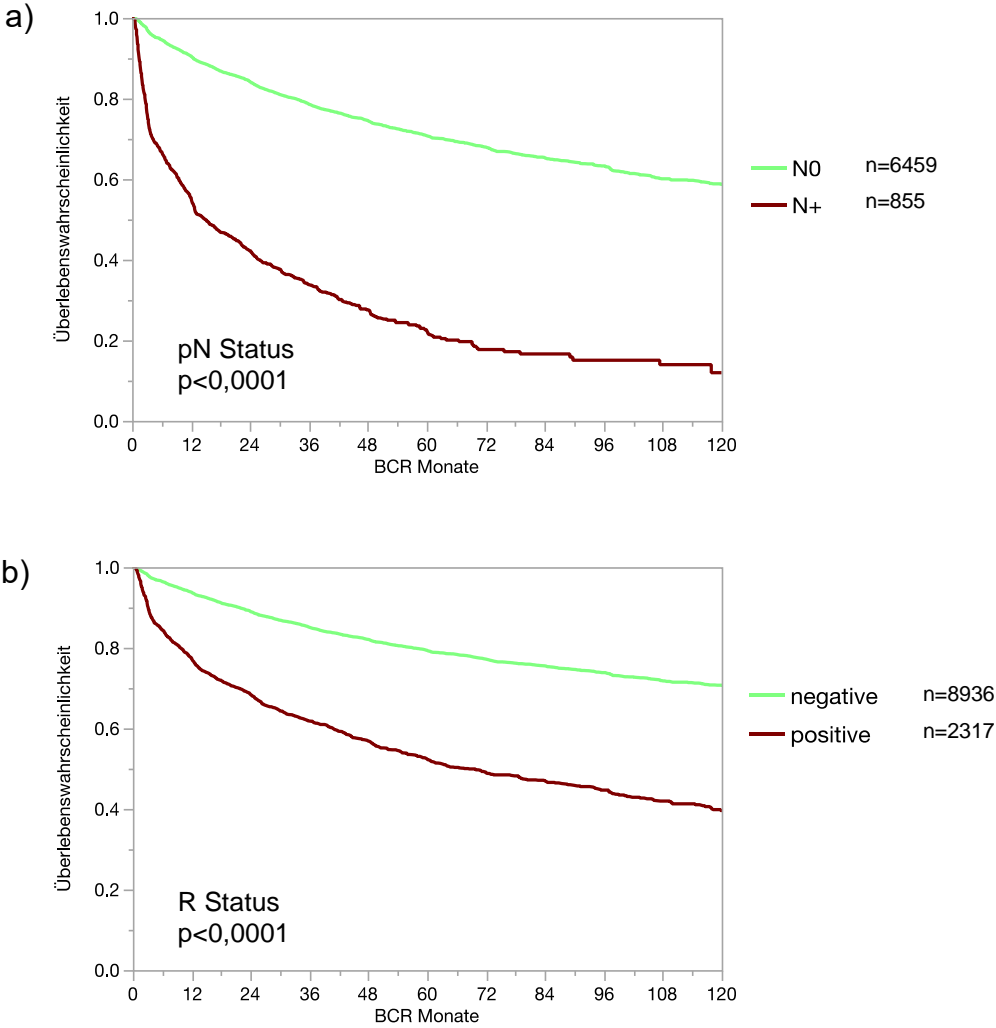
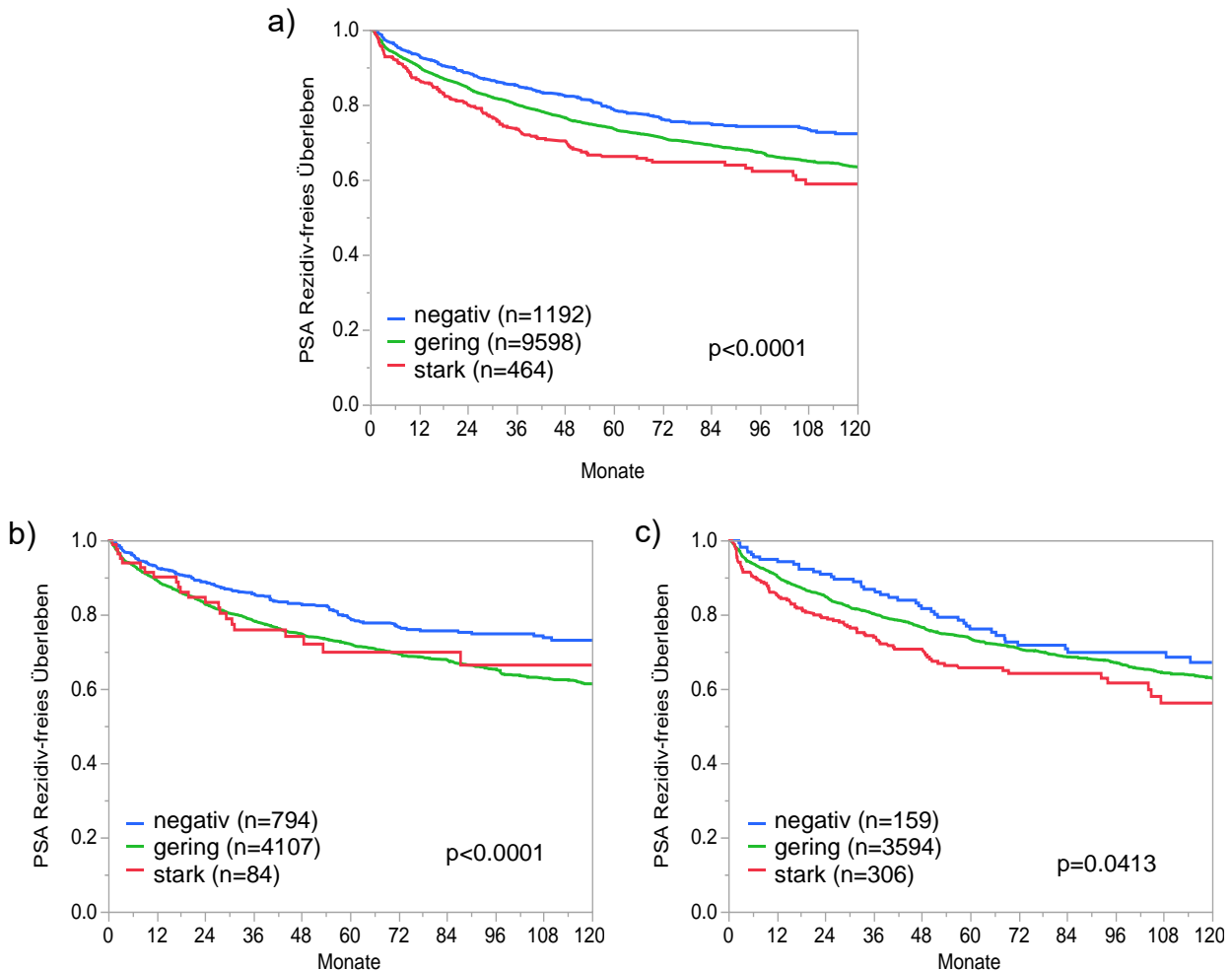
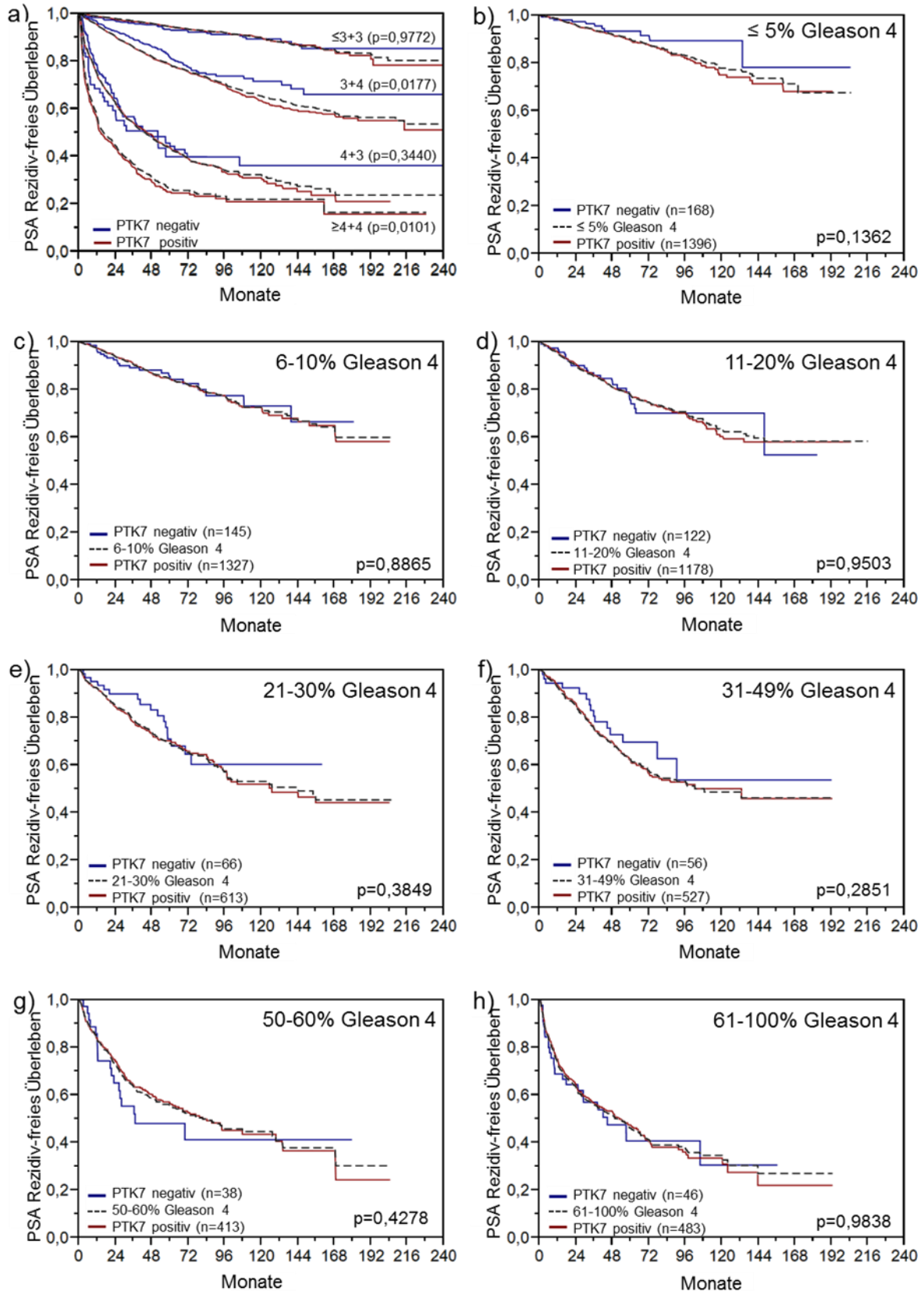


Abbildung 7: Prognostische Bedeutung der PTK7 Expression: Kaplan-Meyer-Kurven a) in allen, b) in ERG-negativen und c) ERG-positiven Prostatakarzinomen



In Tumoruntergruppen mit identischem quantitativem oder traditionellem Gleason Grad erwies sich die PTK7 Expression nicht als relevanter Prognosefaktor. Während bei den klassischen Gleason-Gruppen eine grenzwertig signifikante Korrelation von PTK7 mit einer ungünstigen Prognose sowohl in Tumoren mit Gleason 3+4 ($p = 0,0177$) als auch mit Gleason $\geq 4+4$ ($p = 0,0101$) erkennbar war, fand sich eine derartige Beziehung in Subgruppen, die einen identischen quantitativen Gleason Grad aufwiesen nicht. Alle Ergebnisse für die klassischen und quantitativen Gleason-Gruppen sind in Abbildung 8 a) - h) dargestellt. Für diese Untersuchung wurden die Kategorien „gering“ und „stark“ zu einer einzigen Kategorie „positiv“ zusammengefasst.

Abbildung 8: Prognostischer Einfluss der PTK7 Expression in Tumorgruppen mit identischen Gleason Grades. a) PTK7 Expression und klassische Gleason Grade ($\leq 3+3$, $3+4$, $4+3$ und $\geq 4+4$). b-h) PTK7 Expression und quantitativer Gleason in den Subgruppen $\leq 5\%$ bis $\geq 61-100\%$ Gleason 4.



Dennoch ergab die multivariate Analyse für die PTK7 Expression auch dann eine unabhängige Prognoserelevanz, wenn alle erst postoperativ verfügbaren Parameter mit PTK7 verglichen wurden (Tab. 6).

Tabelle 6: Multivariate Analyse der Prognoserelevanz von PTK7 Expression beim Prostatakarzinom

Parameter		Risikoverhältnis	95% Konfidenzintervall	p-Wert
Präoperativer PSA- Wert (ng/ml)				
>20	10-20	1,10	1,01-1,19	0,0352
10-20	4-10	1,04	0,98-1,10	0,1713
4-10	<4	1,01	0,93-1,10	0,7658
Gleason Grad				
≥4+4	4+3 Tert.5	0,97	0,87-1,07	0,5234
4+3 Tert.5	4+3	1,64	1,48-1,81	<0,0001
4+3	3+4 Tert.5	0,73	0,65-0,82	<0,0001
3+4 Tert.5	3+4	1,73	1,56-1,91	<0,0001
3+4	≤3+3	2,12	1,95-2,31	<0,0001
pT Stadium				
pT3b-4	pT3a	1,19	1,10-1,28	<0,0001
pT3a	pT2	0,95	0,90-1,01	0,0859
Resektionsrand				
positiv	negativ	1,13	1,06-1,20	0,0001
pN Stadium				
N+	N0	1,45	1,33-1,58	<0,0001
PTK-Expression				
positiv	negativ	1,18	1,09-1,27	<0,0001

3.6 PTK7 Expression und Ki-67 Labeling Index (LI) beim Prostatakarzinom

Der Vergleich der PTK7 Expression mit dem Ki-67 Labeling Index zeigt eine prinzipiell höhere Tumorzellproliferation in Tumoren mit starker PTK7 Positivität als bei Tumoren mit geringem oder gar fehlendem PTK7 Nachweis. Diese Beziehung wird insbesondere bei gleichzeitiger Betrachtung aller Tumoren deutlich. Aber auch innerhalb der Tumoren mit einem Gleason 3+3 Score ($p < 0,0001$) und in Tumoren mit einem Gleason 3+4=7 ($p < 0,0001$) ist die Beziehung zwischen dem Ki-67 Labeling Index und der PTK7 Expression statistisch signifikant. In Tumoren mit höherem Gleason Score findet sich allerdings – trotz Tendenz zu höherer Tumorzellproliferation in stärker exprimierenden Tumoren – keine signifikante Beziehung mehr (Tab. 7).

Tabelle 7: PTK7 Expression und Ki-67 Labeling Index

Ki-67	PTK7	n=	Ki-67 Li (Mittelwert)		Std.abweichung
alle p<0.0001	negativ	689	1,85	±	0,10
	gering	4.910	2,88	±	0,04
	stark	242	3,72	±	0,17
pGleason ≤3+3 p<0.0001	negativ	190	1,51	±	0,15
	gering	993	2,29	±	0,06
	stark	31	2,77	±	0,37
pGleason 3+4 p<0,0001	negativ	349	1,65	±	0,13
	gering	2.789	2,73	±	0,04
	stark	142	3,70	±	0,20
pGleason 3+4 Tert.5 p=0.3172	negativ	25	2,44	±	0,52
	gering	204	3,25	±	0,18
	stark	9	3,44	±	0,86
pGleason 4+3 p=0.0506	negativ	58	2,29	±	0,41
	gering	461	3,37	±	0,15
	stark	29	3,38	±	0,59
pGleason 4+3 Tert.5 p=0.4672	negativ	29	3,34	±	0,72
	gering	252	3,86	±	0,24
	stark	18	4,78	±	0,91
pGleason ≥4+4 p=0.0633	negativ	38	3,11	±	0,78
	gering	207	5,03	±	0,34
	stark	13	5,69	±	1,34
PTEN norm p<0.0001	negativ	273	2,38	±	0,17
	gering	2.658	3,07	±	0,05
	stark	107	3,82	±	0,27
PTEN del p=0.0285	negativ	36	3,00	±	0,49
	gering	580	3,64	±	0,12
	stark	55	4,58	±	0,40

4. Diskussion

Die erfolgreiche Untersuchung von insgesamt 13.884 Prostatakarzinomen auf die Expression von PTK7 ergab insgesamt eine variable membranöse Expression in Tumorzellen, wobei eine besonders starke Expression in 4 % und eine geringe Expression in 86 % der Tumoren festgestellt wurde. Bei 10 % der Tumoren konnte keine PTK7 Expression festgestellt werden. Die prädominant membranöse PTK7 Färbung in unserer Studie steht im Gegensatz zu den Befunden der einzigen früheren Untersuchung von „Zhang et al.“, welcher die Expression von PTK7 immunhistochemisch an 180 Prostatakarzinomen untersucht hatte [41]. Die Autoren dieser Arbeit hatten eine durchweg zytoplasmatische Expression beschrieben. In der Studie von „Zhang et al.“ wurde der monoklonale Mausanti-PTK7 Antikörper (MAB4499, R&D Systems, Minneapolis) verwendet, während in unserer Untersuchung ein Antikörper der Firma Millipore (MABN721, Klon 4F9, monoklonaler Mausantikörper) verwendet wurde. Die Unterschiede zwischen unserer Studie und der Studie von „Zhang“ dürften somit durch die unterschiedlichen verwendeten Reagenzien bedingt sein. Immerhin hatte „Zhang“ in seiner Arbeit auch in einer Western-Blot Untersuchung eine höhere Expression vom PTK7 Protein in Tumoren als im Normalgewebe gezeigt. Zumindest dieser Befund passt gut zu den Ergebnissen unserer Studie, welche in einem Teil der Prostatakarzinome eine erhöhte PTK7 Expression findet.

PTK7 wurde bisher in Tumoren nur wenig untersucht. Eine Medline-Abfrage am 30.10.2019 mit den Suchbegriffen „PTK7“, „Immunohistochemistry“ und „Cancer“ ergab nur 18 durchgeführte Studien. Untersucht worden waren Plattenepithelkarzinome des Ösophagus [53], kolorektale Karzinome [54], Mammakarzinome [55], Ovarialkarzinome [56], Magenkarzinome [57], Leberzellkarzinome [58], Hypophysentumoren [59] und Nierenzellkarzinome [60]. Bei den meisten dieser Tumorarten war in malignen Neoplasien eine im Vergleich zu Normalgewebe erhöhte Expression beschrieben worden [53-55, 57, 58]. Weitere Studien hatten allerdings beim Melanom und bei Ovarialkarzinomen an dem Vergleich zu Normalgewebe eine verminderte Expression beschrieben [56, 61]. Allerdings ist es gerade bei diesen beiden Tumorarten schwierig korrespondierendes Normalgewebe zu isolieren. Beim Ovarialkarzinom wäre das korrespondierende Normalepithel peritonealen Ursprungs bzw. würden Inklusionszysten entsprechen

[62]. Beim Melanom wären die Vorläuferzellen Melanozyten, welche in normalen Geweben nur vereinzelt vorkommen [63].

Die in unserer Studie beobachtete Beziehung zwischen einer erhöhten PTK7 Expression und einem ungünstigen Tumorphänotyp bzw. einer ungünstigen Prognose passt ebenfalls gut zur Literatur. Obwohl „Zhang et al.“ in ihrer Studie bei durchweg zytoplasmatischen immunhistochemischen Nachweis von PTK7 etwas anderes gemessen haben dürften als in unserer Studie, hatten auch „Zhang et al.“ eine ungünstigere Prognose bei Tumoren beschrieben, welche eine hohe PTK7 Anfärbung zeigten als bei Tumoren mit einer geringen Anfärbung [41]. Auch die meisten Studien, welche andere Tumoren untersucht hatten, hatten eine ungünstige Prognose bei Tumoren mit besonders hoher PTK7 Expression beschrieben. Beim Ösophaguskarzinom hatten „Shin et al.“ 157 Plattenepithelkarzinome untersucht und eine signifikante Beziehung zwischen hoher PTK7 Expression und einer erhöhten Mortalität beschrieben [40]. Eine Studie an 201 Magenkarzinomen hatte für die 114 PTK7 positiven Fälle eine ungünstigere Prognose ergeben als bei den PTK7 negativen Karzinomen [57]. Die prognostische Bedeutung der PTK7 Expression beim Kolonkarzinom wurde in zwei Studien untersucht. Dabei hatten sowohl „Lhoumeau et al.“ an 192 Karzinomen, als auch „Tian et al.“ an 138 Karzinomen eine signifikante Beziehung zwischen hoher PTK7-Expression und ungünstiger Prognose beschrieben [54, 64]. „Ataseven et al.“ hatten bei 133 Triple-negativen Mammakarzinomen ebenfalls eine Prognoserelevanz der PTK7 Expression gefunden mit ungünstiger Prognose bei Tumoren mit erhöhter PTK7 Expression [55]. „Wang et al.“ fanden bei 204 Ovarialkarzinomen eine signifikante Beziehung zwischen niedriger PTK7 Expression und ungünstiger Prognose [56]. Insgesamt passt die prognostische Bedeutung der PTK7 Expression gut zu der biologischen Rolle von PTK7, welcher ein wichtiger Einflussfaktor auf die WNT-Signalkaskade darstellt [30]. Das WNT-Regelsystem ist bei vielen Tumorarten von Bedeutung und wurde in vielen früheren Studien als prognostisch bedeutsam gefunden [37].

Die Stärke der folgenden Untersuchung liegt insbesondere in der hohen Anzahl der untersuchten Tumoren. Die bisher publizierten 18 Studien, bei denen immunhistochemische Untersuchungen bei malignen humanen Tumoren durchgeführt hatten, hatten insgesamt 1470 Tumoren untersucht. Diese Zahl

entspricht gerade 10,5 % der in unserer Studie erfolgreich untersuchten 13.884 Prostatakarzinome. Die Tissue-Microarray Methode ist eine hervorragende Technik für translationale Forschung, welche die Untersuchung sehr großer Patientenkollektive ermöglicht und dabei auch erhebliche ökonomische Vorteile bietet. Die Untersuchung von 17.474 Karzinomen hätten bei Verwendung ursprünglicher Techniken die Herstellung von 17.474 Schnitten und deren immunhistochemische Anfärbung erfordert. Die Durchführung einer immunhistochemischen Färbung kostet einschließlich Personalkosten mindestens 7 € pro Schnitt. Die Durchführung dieser Studie hätte somit bei herkömmlichen Verfahren mindestens 122.000 € gekostet. Da für diese Studie nur 40 TMA-Schnitte gefärbt werden mussten, reduzierten sich diese Kosten auf 280 €. Auch die Auswertung durch einen Pathologen wurde deutlich erleichtert. Die Auswertung der 17.474 Tumorgewebe erfolgte innerhalb von zwei Tagen. Die Durchmusterung von 17.474 Großschnitten hätte für einen Pathologen einen Zeitaufwand von mehreren Wochen bedeutet. Ein weiterer wichtiger Vorteil der Tissue-Microarray Technik ist die hohe Standardisierung der Untersuchung. Alle Gewebe wurden an einem Tag in identischen Reagenzien bei absolut identischen Bedingungen gefärbt. Zu diesen identischen Bedingungen gehören nicht nur Parameter, welche theoretisch auch in einem Immunfärbautomaten standardisiert werden können wie identische Antikörperkonzentrationen, Temperaturen und Inkubationszeiten, sondern auch Parameter wie Schnittalter und Schnittdicke. Das „Schnittalter“ ist für immunhistochemische Untersuchungen von besonderer Bedeutung. Mit Schnittalter wird die Zeitspanne vom Herstellen eines Schnittes bis zu seiner immunhistochemischen Färbung bezeichnet. Studien haben gezeigt, dass bereits ein Schnittalter von zwei Wochen zu einer markanten Reduzierung immunhistochemischer Färbungen führt [65]. Als „Nachteil“ der Tissue-Microarray-Technik wird immer wieder die Tatsache diskutiert, dass pro Tumor lediglich ein 0,6 mm messendes Gewebefragment untersucht wird, sodass die Repräsentativität der Untersuchung in Frage gestellt wurde. Allerdings haben sich – überraschenderweise – sämtliche in der Literatur etablierten molekularen Prognoseparameter, wie beispielsweise die Östrogen- und Progesteronrezeptor-Expression oder die HER2-Amplifikation beim Mammakarzinom [66, 67], der Ki-67 Labeling Index beim Harnblasenkarzinom [68] oder die PTEN-Deletion beim Prostatakarzinom [69] bzw. die p53-Positivität beim Prostata-, Harnblasen- oder

Mammakarzinom [70-72] auch am Tissue-Microarrays reproduzieren lassen. Es gibt sogar eine Studie von „Torhost et al.“ [73], bei welcher 550 Mammakarzinome sowohl an Großschnitten als auch an Tissue-Microarrays untersucht wurden. In der Studie konnte die Prognoserelevanz der p53-Positivität nur an Tissue-Microarrays, aber nicht an Großschnitten dargestellt werden. Dieses Ergebnis macht deutlich, dass die Kleinheit der Gewebeprobe, welche in einem Tissue-Microarray-Format pro Patienten untersucht wird, möglicherweise nicht nur kein Nachteil, sondern sogar ein Vorteil ist. Biologisch relevante Veränderungen könnten eine größere Wahrscheinlichkeit haben auch in einer kleinen Probe gefunden zu werden, während die biologisch nicht relevanten Veränderungen vielleicht nur herdförmig anzutreffen sind und nur einer kleinen Wahrscheinlichkeit unterliegen in einem Tissue-Microarray-Spot gefunden zu werden. Studien welche gezeigt hätten, dass ein Prognosemarker an Großschnitten als solcher identifiziert wurde, an einem aus den gleichen Blöcken angefertigten Tissue-Microarray aber nicht, gibt es bisher keine.

Da Untersuchungen molekularer Marker an Tissue-Microarrays schnell und kostengünstig durchgeführt werden können, erstaunt es nicht, dass zu dem Prostatakarzinom Tissue-Microarray, welcher am Institut für Pathologie des UKE vorhanden ist, bereits früher zahlreiche molekulare Untersuchungen durchgeführt worden sind. Aus diesen Untersuchungen ist eine Datenbank entstanden, welche mehr als 100 verschiedene Parameter beinhaltet. Diese Parameter können für vergleichende Studien molekularer Aberrationen verwendet werden. Für die aktuelle Studie wurden als Vergleichsparameter der ERG-Status, vier verschiedene Deletionen und der Ki-67 Labeling Index gewählt. Die Gründe hierfür sind wie folgt: Die TMPRSS2:ERG Translokation ist die häufigste molekulare Veränderung beim Prostatakarzinom und deswegen von Interesse [74]. Auch die ausgewählten Deletionen von PTEN, 3p13, 6q15, 5q21 gehören zu den häufigsten molekularen Aberrationen beim Prostatakarzinom und definieren molekulare Untergruppen der ERG-positiven und ERG-negativen Karzinome [75]. Der Ki-67 Labeling Index ist ein Parameter für die Tumorzellproliferation und deswegen von erheblichem biologischem Interesse [76]. Die TMPRSS2:ERG Translokation kommt bei ca. 50 % aller Prostatakarzinome vor [74], insbesondere bei jüngeren Patienten. Die Beziehung mit dem jungen Patientenalter ist dadurch zu erklären, dass die Translokation insbesondere bei hoher Androgenaktivität auftritt [77, 78]. Bei

jüngeren Männern ist der Testosteronspiegel im Durchschnitt etwas höher als bei älteren Männern [79, 80], sodass es bei einer Prostatakarzinomentwicklung gehäuft zu einer TMPRSS2:ERG Translokation kommt. Die Translokation führt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors ERG, der durch die Translokation in den Einflussbereich des androgen-regulierten Gens TMPRSS2 kommt [81]. Dadurch kommt es zu einer konstitutiven Überexpression von ERG. Die ERG-Expression ist beim Prostatakarzinom per se nicht prognoserelevant [82], führt aber zu einer Deregulierung von mehr als 1600 Genen, sowie derer assoziierter Signalwege und somit zu einem profund veränderten Mikromilieu in ERG-positiven Prostatakarzinomzellen im Vergleich zu ERG-negativen Prostatakarzinomzellen [83]. Dementsprechend sind viele molekulare Veränderungen in ERG-positiven und ERG-negativen Tumoren unterschiedlich häufig und weisen in ERG-positiven und ERG-negativen Tumoren auch unterschiedliche biologische Effekte auf [84]. Der Vergleich von PTK7 Expression mit dem ERG-Status zeigt eine signifikant höhere PTK7 Expression in ERG-positiven als in ERG-negativen Tumoren. Dies konnte mit zwei verschiedenen Methoden gezeigt werden, mit dem immunhistochemischen ERG-Nachweis und dem FISH-Nachweis der Translokation. Der Nachweis dieser Beziehung mit zwei verschiedenen Methoden ist eine Validierung dieses biologischen Zusammenhanges, der durch die Beziehung von ERG und WNT-Pathway auch biologisch gut zu erklären ist. Zahlreiche Studien haben eine massive Aktivierung des WNT-Pathways in ERG positiven Prostatakarzinom beschrieben [83, 85, 86]. PTK7 ist ein bekannter Co-Regulator des Frizzled-Rezeptors, der an der Spitze des WNT-Signalwegs steht. Die Assoziation zwischen der PTK7 Überexpression und der ERG Expression in dieser Studie, lässt darauf schließen, dass die ERG-abhängige Deregulierung von PTK7 einer der molekularen Mechanismen ist, die zur Aktivierung des WNT-Pathway führen. Eine Analyse des PTK7 Promoters sowie dessen Enhancer Bereiches zeigen keine Bindungsstellen für ERG oder andere ETS Transkriptionsfaktoren [87, 88]. Es ist daher davon auszugehen, dass es in ERG-positiven Prostataepithelien zu einer indirekten Aktivierung der PTK7 Expression kommt.

In der Rangliste molekularer Veränderungen beim Prostatakarzinom folgen nach der TMPRSS2:ERG Translokation ca. 10 verschiedene chromosomale Deletionen, darunter die Deletionen von 5q, 6q, 3p und PTEN [89]. Es ist eine Besonderheit des

Prostatakarzinoms, dass Deletionen (und auch Translokationen) insgesamt viel häufiger vorkommen als spezifische Mutationen von krebsassoziierten Genen [90, 91]. Es wird angenommen, dass die meisten Deletionen ihren biologischen Effekt durch eine sogenannte Haploinsuffizienz erzeugen [89]. Das heißt, dass die Deletion gleichzeitig zu einer reduzierten Expression von mehreren krebsrelevanten Genen führen, welche kollektiv einen krebsbegünstigenden Effekt aufweisen [92]. Welche Gene bei den häufigen Deletionen eine besonders wichtige Rolle spielen, ist nicht ausreichend bekannt. Bekannt ist allerdings, dass die Entstehung von Deletionen durch Reparaturdefekte von Doppelstrangbrüchen begünstigt werden [93], dass die meisten Deletionen beim Prostatakarzinom von teils erheblicher prognostischer Bedeutung sind [47, 48, 50, 70, 94-97] und dass die meisten Deletionen signifikant mit ERG-Positivität [50, 70, 94] oder ERG-Negativität assoziiert sind [47, 48, 95]. Dies gilt auch für die in dieser Studie untersuchten Deletionen. PTEN- und 3p-Deletionen sind mit positivem ERG-Status assoziiert [49, 50], während die 5q- und 6q-Deletionen vor allem bei ERG-negativen Karzinomen auftreten [47, 48]. Der Vergleich der PTK7 Expression mit Deletionen ergab vor allem bei gleichzeitiger Untersuchung aller Tumoren signifikante Zusammenhänge. Dies war zu erwarten, denn sowohl die PTK7 Expression wie auch die genannten Deletionen sind mit dem ERG-Status assoziiert. Deswegen sind alle diese Assoziationen durch indirekte Beziehungen zu erklären. Die separate Untersuchung der ERG-positiven und ERG-negativen Unterkollektive zeigte jedoch eine besonders starke Beziehung zwischen der PTK7 Expression und dem Vorliegen von PTEN-Deletionen ($p=0,0901$ bei ERG-Positivität und $p<0,0001$ bei ERG-Negativität), während die anderen Deletionen in ERG-positiven und ERG-negativen Tumoren nur marginal oder gar nicht mit dem PTK7 Expressionsstatus korrelierten. Die Assoziation der PTK7 Überexpression mit PTEN Deletionen passt gut zu den bekannten Funktionen von PTK7. PTK7 fungiert als Co-Rezeptor zahlreicher Rezeptor-Thyrosin-Kinasen, wie z.B. VEGF1, ROR2 und FGFR1 [98-100]. Für den FGFR1-Rezeptor wird vermutet, dass er den AKT/PI3K Signalweg aktiviert [100, 101], der wiederum von PTEN negativ kontrolliert wird [102]. Eine Heraufregulierung der PTK7 führt somit zu einer Aktivierung des Pathways, die durch den Verlust der Kontrolle (durch die PTEN-Deletion) weiter verstärkt wird. Derzeit gibt es erste klinische Studien in Phase I, die eine Kombinationstherapie mit PTK7 Inhibitoren und mTOR Inhibitoren einsetzen (NCT03243331) [103].

Auch zwischen einer erhöhten PTK7 Expression und einem hohen Ki-67 Labeling Index fand sich eine signifikante Korrelation, welche allerdings weniger ausgeprägt war als bei anderen, früher am gleichen Patientenkollektiv untersuchten molekularen Parametern [51, 104]. Dementsprechend war der Ki-67 Labeling Index lediglich in den Untergruppen der Gleason 3+3 und 3+4 Karzinome prognostisch relevant, aber nicht in Tumoren mit anderem Gleason Grad. Die Befunde deuten insgesamt darauf hin, dass PTK7 keine starke Rolle bei der Regulation der Zellproliferation ausübt.

Eine weitere Besonderheit der folgenden Studie liegt in den klinischen Verlaufsdaten. Daten zum PSA-Rezidiv lagen bei 11.254 von 17.747 untersuchten Patienten vor. Das PSA-Rezidiv ist ein herausragend geeigneter klinischer Endpunkt beim Prostatakarzinom, da bei praktisch allen prostatektomierten Patienten regelmäßig eine PSA-Kontrolle durchgeführt wird. Es kann deswegen davon ausgegangen werden, dass das PSA-Rezidiv, wenn es dann vorliegt, von den Patienten bzw. den behandelnden Ärzten relativ rasch erkannt wird. Andere in der Literatur verwendete Endpunkte sind das „metastasenfreie Überleben“ oder das „tumorspezifische Überleben“. Viele klinisch tätige Urologen würden diese beiden Endpunkte gegenüber dem PSA-Rezidiv intuitiv bevorzugen, weil das Vorliegen von Metastasen oder ein tumorspezifischer Tod eine „dramatischere“ Folge eines Prostatakarzinoms ist als das simple Vorliegen eines PSA-Rezidiv. Allerdingen haben die Endpunkte „metastasenfreies“ Überleben und „tumorspezifisches Überleben“ gravierende Schwächen. Der Nachweis von Metastasen hängt bei einem Prostatakarzinompatienten wesentlich damit zusammen wie intensiv nach Metastasen klinisch gesucht wird. Es ist deswegen u. a. anzunehmen, dass bei älteren Patienten weniger intensiv nach Metastasen geforscht wird und bei privatversicherten Patienten häufiger. Auch der Endpunkt tumorspezifischer Tod ist wesentlich schwieriger zu bestimmen als vom Laien angenommen. Selbst bei einer Autopsie kann häufig nicht entschieden werden, ob der Tod tumorbedingt war oder nicht. Die größte Autopsiestudie vom Prostatakarzinompatienten macht dies deutlich. „Bubendorf et al.“ stellten im Jahr 2000 die Befunde von 1589 Prostatakarzinompatienten zusammen, welche am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Basel, Schweiz untersucht worden waren [105]. Dabei fanden sich zahlreiche Patienten, welche an einer Pneumonie oder einem Herzinfarkt verstorben waren und bei denen einzelne kleinere Lungen-, Leber- oder

Lymphknotenmetastasen vorlagen. In solchen Fällen ist es schwierig bzw. unmöglich zu entscheiden, wie sehr die Metastasen zum Tod beigetragen haben. Auch bei Patienten mit ausgedehnterem Metastasenbefall und Tod durch Herzinfarkt kann nicht eindeutig festgelegt werden, ob der Tumorbefall zum Herzinfarkt geführt hat oder nicht. Der Charme des Endpunktes PSA-Rezidiv liegt darin, dass alle Patienten mit einem erhöhtem PSA postoperativ offensichtlich Tumorresiduen in ihrem Körper aufweisen. Falls eine Bestrahlung der Prostataloge nicht zu einem Rückgang des PSA-Wertes führt, muss bei einem PSA-Rezidiv betroffenen Patienten imperativ vom Vorliegen von Metastasen ausgegangen werden. Da 99,5% aller Prostatakarzinome PSA exprimieren [106], ist nicht damit zu rechnen, dass ein signifikanter Anteil von Patienten Metastasen aufweist, welche sich serologisch nicht als PSA-Rezidiv zu erkennen geben.

Die Befunde zur Prognoserelevanz des Markers PTK7 sind so, wie man sie bei großen Tissue-Microarray Studien häufig findet. Die Expression von PTK7 ist hochsignifikant mit der Prognose der Patienten assoziiert und selbst bei einer multivariaten Analyse erweist sich PTK7 als starker Prognosefaktor. Dies würde an sich für eine potentielle klinische Bedeutung dieses Markers sprechen. Allerdings zeigen die Kaplan-Meyer-Kurven, dass die Prognoseunterschiede von PTK7-positiven und -negativen Tumoren nicht sehr groß sind, sodass die praktische Bedeutung der durch PTK7 stratifizierten Prognosewerte anzuzweifeln ist. Für eine eher geringere Bedeutung der PTK7 Expression als Prognosemarker spricht auch das Fehlen einer relevanten prognostischen Bedeutung in Untergruppen von Patienten, welche durch einen identischen quantitativen Gleason Grad definiert sind. Die Gruppe von Tumoren, bei denen prognostische Informationen besonders wichtig wären, ist die Gruppe von Gleason 3+4=7 Karzinomen, wo tatsächlich signifikante prognostische Unterschiede zwischen Tumoren mit unterschiedlichem PTK7 Expressionsmuster gefunden wurden ($p=0,0177$, Abbildung 8a). Allerdings ist die Gruppe Gleason 3+4=7 von allen durch den klassischen Gleason Grad definierten Gruppen, diejenige mit dem breitesten Spektrum von prognostisch unterschiedlichen Tumoren. Die Gruppe Gleason 3+4=7 setzt sich zusammen aus Tumoren mit einem Gleason 4 Anteil von 5 %, welche prognostisch den Gleason 3+3 Karzinomen nahestehen, bis zu Tumoren mit einem Gleason 4 Anteil von 45 %, welche prognostisch Gleason 4+3 Tumoren und selbst Gleason 4+4 Karzinomen ähneln

[107]. In dieser Untergruppe von Tumoren sind sehr viele molekulare Parameter prognoserelevant [108-110]. Allerdings ist eine Verwendung der Gruppe Gleason 3+4 als Diagnosekategorie obsolet. Zumindest in der Gruppe Gleason 3+4 ist eine Verwendung des quantitativen Gleason Grades unerlässlich.

Zusammengefasst zeigen die Daten unserer Studie, dass PTK7 bei einem Teil der Prostatakarzinome vermehrt exprimiert wird und dass diese vermehrte Expression mit einer ungünstigen Prognose assoziiert ist. Obwohl die prognostische Relevanz bei einer multivariaten Analyse unabhängig ist von den Parametern pT, pN, R-Status und Gleason Grad sind die absoluten Unterschiede der Prognose bei PTK7-positiven und -negativen Tumoren nur sehr gering. Wir nehmen deswegen nicht an, dass die PTK7-Expression sich für eine Untersuchung in der Routinediagnostik eignet.

5. Zusammenfassung

Die Protein-Thyrosin-Kinase 7 (PTK7) ist ein Transmembranrezeptor mit einer katalytisch inaktiven Thyrosin-Kinase-Domäne und spielt eine wichtige Rolle als Co-Ligand des WNT-Pathways. Untersuchungen haben gezeigt, dass PTK7 bei vielen verschiedenen Tumortypen im Vergleich zu Normalgewebe überexprimiert gefunden werden kann und dass eine PTK7 Überexpression oft mit einer ungünstigen Prognose einhergeht. Um die prognostische Bedeutung der PTK7 Expression beim Prostatakarzinom zu evaluieren, wurde ein Tissue-Microarray bestehend aus 17.747 Prostatakarzinomen immunhistochemisch mit einem Antikörper gegen PTK7 gefärbt. Die Untersuchung ergab eine konstante Expression von PTK7 in Basalzellen von Prostata Drüsen und eine variable membranöse Positivität für PTK7 in Prostatakarzinomzellen. Die PTK7 Expression wurde in Karzinomen in 4 % als stark, in 86 % als gering und in 10 % als negativ klassifiziert. Eine hohe PTK7 Expression war signifikant mit einem hohen pT-Stadium ($p < 0,0001$), einem ungünstigen Gleason Grad ($p < 0,0001$), dem Vorliegen von Lymphknotenmetastasen ($p < 0,0005$), einem hohen präoperativen PSA-Wert ($p < 0,0005$), einem positiven R-Status ($p = 0,0344$) und einem erhöhten Risiko eines PSA-Rezidivs ($p < 0,0001$) assoziiert. Der Vergleich mit molekularen Parametern ergab einen signifikanten Zusammenhang zwischen erhöhter PTK7 Expression und einem positiven ERG-Status ($p < 0,0001$), Deletionen von PTEN ($p < 0,0001$), 3p13 ($p < 0,0001$), 5q21 ($p < 0,0001$) und 6q15 ($p = 0,03268$) und einem erhöhten Ki-67 Labeling Index ($p < 0,0001$). Die positive Korrelation zwischen PTK7 Expression und dem Transkriptionsfaktor ERG passt gut zur bekannten Aktivierung des WNT-Pathways in ERG-positiven Prostatakarzinomen. Eine Subgruppenanalyse von ERG-positiven und ERG-negativen Karzinomen ergab, dass die meisten statistisch signifikanten Korrelationen zwischen PTK7 und Deletionen durch die bekannte Beziehung dieser Deletionen mit dem ERG-Status bedingt war. Die Subgruppenanalyse ergab lediglich für PTEN in ERG-positiven Tumoren eine annähernd signifikante ($p = 0,0901$) und in ERG-negativen Tumoren eine hoch signifikante Beziehung zu PTK7 ($p < 0,0001$). Dieser Befund passt zur bekannten Funktion von PTK7 als Co-Rezeptor von Thyrosin-Kinasen, welche mit PTEN bekannterweise interagieren. Die zur Klärung der klinischen Relevanz der Assoziation von erhöhter PTK7 Expression mit ungünstiger Prognose durchgeführte multivariate Analyse ergab, dass die PTK7 Expression bei gleichzeitiger Untersuchung von pT, pN, Gleason Grad, Serum-PSA und PTK7 ein unabhängiger Prognoseparameter war ($p < 0,0001$). Da die absoluten Prognoseunterschiede zwischen PTK7-negativen Karzinomen (PSA-Rezidiv Wahrscheinlichkeit nach fünf Jahren: 80 %) und stark PTK7-positiven Karzinomen (PSA-Rezidiv Wahrscheinlichkeit nach fünf Jahren: 65 %) in absoluten Werten keine sehr markanten Unterschiede zeigten und da die PTK7 Expression in Untergruppen von Tumoren mit identischen quantitativen Gleason Grad keine prognostische Relevanz zeigte, ist dennoch anzunehmen, dass dem Nachweis der PTK7 Expression beim Prostatakarzinom keine klinische Bedeutung zukommt.

6. Abstract

The protein tyrosine kinase 7 (PTK7) is a transmembrane receptor with a catalytic inactive tyrosine kinase domain and plays an important role as a co-receptor of the WNT signaling pathway. Research have shown, that PTK7 can be found overexpressed in a variety of cancers in comparison to normal tissue and that PTK7 overexpression is often correlated with a poor prognosis. To evaluate the prognostic relevance of PTK7 expression in prostate cancer a tissue-microarray consisting of 17.747 prostate cancers was immunohistochemical stained with an antibody against PTK7. The study revealed a constant expression of PTK7 in basal cells of prostate glands and a variable membranous positivity for PTK7 in prostate cancer cells. The PTK7 expression in carcinoma was classified in 4 % high, in 86 % low and in 10 % negative. A high level of PTK7 expression was associated with a high pathologic tumor stage ($p < 0,0001$), an unfavorable Gleason grade ($p < 0,0001$), the presence of lymph node metastasis ($p < 0,0005$), a high preoperative PSA ($p < 0,0005$), a positive surgical margin ($p = 0,0344$) and a higher risk of PSA recurrence ($p < 0,0001$). The comparison with molecular parameters revealed a significant relation between a higher PTK7 expression and a positive ERG status ($p < 0,0001$), deletion of PTEN ($p < 0,0001$), 3p13 ($p < 0,0001$), 5q21 ($p < 0,0001$) and 6q15 ($p = 0,03268$) and a higher Ki-67 labeling index ($p < 0,0001$). The positive correlation between PTK7 expression and the ERG transcription factor goes well with known activation of the WNT signaling pathway in ERG positive prostate cancer. A subgroup analysis of ERG positive and ERG negative carcinoma revealed, that the most statistically significant correlation between PTK7 and deletions was caused by the known relation of those deletions with the ERG status. The subgroup analysis revealed only for PTEN in ERG positive cancers a nearly significant ($p = 0,0901$) and in ERG negative cancers a highly significant relation to PTK7 ($p < 0,0001$). This result fits to known functions of PTK7 as a co-receptor of tyrosine kinases, which interact with PTEN. The multivariate analysis for clarification the clinical relevance of the association of higher PTK7 expression and poor prognosis revealed, that PTK7 expression was an independent prognostic parameter by simultaneously investigation of pathologic tumor stage, pathologic nodal status, Gleason grade, serum PSA and PTK7 ($p < 0,0001$). Since the absolute prognostic differences between PTK7-negative carcinoma (chances of PSA recurrence after 5 years: 80 %) and strongly PTK7-positive carcinoma (chances of PSA recurrence after 5 years: 65 %) haven't shown prominent differences in absolute terms and the PTK7 expression in subgroups of tumors with identical quantitative Gleason grade haven't revealed prognostic relevance, it can be assumed, that the verification of PTK7 expression in prostate cancer has no clinical value.

7. Abkürzungsverzeichnis

AJCC	American Joint Committee on Cancer
AS	Active Surveillance
°C	Grad Celsius
CCK4	Colon-Carcinoma-Kinase 4
cT	klinisches Tumorstadium
CT	Computertomographie
DRU	Digitale rektale Untersuchung
Dsh	Dishevelled (Protein)
€	Euro
FGFR1	Fibroblast Growth Factor Receptor 1
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
Fz	Frizzled (Protein)
GS	Gleason Score
IHC	Immunhistochemie
ml	Milliliter
n	Anzahl der untersuchten Probenmenge
ng	Nanogramm
NTD	Neural tube defect
%	Prozent
PCa	Prostatakarzinom
PCP	Planar-Cell-Polarity
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
PTK7	Protein-Thyrosin-Kinase 7
qG	quantitativer Gleason
ROR2	Receptor Tyrosine Kinase Like Orphan Receptor 2
RPE	Radikale Prostatektomie
TNM	Tumor, Nodus (Lymphknoten), Metastasen
TMA	Tissue Microarray
UICC	International Union against Cancer
VEGF1	Vascular Endothelial Growth Factor 1
WW	Watchful Waiting

8. Literaturverzeichnis

1. Torre, L.A., et al., *Global cancer statistics, 2012*. CA Cancer J Clin, 2015. **65**(2): p. 87-108.
2. Robert Koch Institut. *Krebsdaten - Prostatakrebs (Prostatakarzinom)*. 2014; Available from: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Prostatakrebs/prostatakrebs_node.html.
3. *Prostate Cancer Treatment (PDQ(R)): Health Professional Version*, in *PDQ Cancer Information Summaries*. 2002: Bethesda (MD).
4. Jahn, J.L., E.L. Giovannucci, and M.J. Stampfer, *The high prevalence of undiagnosed prostate cancer at autopsy: implications for epidemiology and treatment of prostate cancer in the Prostate-specific Antigen-era*. Int J Cancer, 2015. **137**(12): p. 2795-802.
5. Bell, K.J., et al., *Prevalence of incidental prostate cancer: A systematic review of autopsy studies*. Int J Cancer, 2015. **137**(7): p. 1749-57.
6. Irshad, S., et al., *A molecular signature predictive of indolent prostate cancer*. Sci Transl Med, 2013. **5**(202): p. 202ra122.
7. Mundbjerg, K., et al., *Identifying aggressive prostate cancer foci using a DNA methylation classifier*. Genome Biol, 2017. **18**(1): p. 3.
8. Kwiatkowski, M., et al., *Prostate cancer screening: and yet it moves!* Asian J Androl, 2015. **17**(3): p. 437-8.
9. Chang, A.J., et al., *High-risk prostate cancer-classification and therapy*. Nat Rev Clin Oncol, 2014. **11**(6): p. 308-23.
10. Nadji, M., et al., *Prostatic-specific antigen: an immunohistologic marker for prostatic neoplasms*. Cancer, 1981. **48**(5): p. 1229-32.
11. Pezaro, C., H.H. Woo, and I.D. Davis, *Prostate cancer: measuring PSA*. Intern Med J, 2014. **44**(5): p. 433-40.
12. European Association of Urology, *EAU Guidelines: Prostate Cancer*. 2019.
13. AWMF online. *Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms*. 2019.
14. Epstein, J.I., et al., *The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma: Definition of Grading Patterns and Proposal for a New Grading System*. Am J Surg Pathol, 2016. **40**(2): p. 244-52.
15. Tollefson, M.K., et al., *Long-term prognostic significance of primary Gleason pattern in patients with Gleason score 7 prostate cancer: impact on prostate cancer specific survival*. J Urol, 2006. **175**(2): p. 547-51.
16. Berney, D.M., et al., *The reasons behind variation in Gleason grading of prostatic biopsies: areas of agreement and misconception among 266 European pathologists*. Histopathology, 2014. **64**(3): p. 405-11.
17. Sauter, G., et al., *Clinical Utility of Quantitative Gleason Grading in Prostate Biopsies and Prostatectomy Specimens*. Eur Urol, 2016. **69**(4): p. 592-598.
18. Cheng, L., et al., *Staging of prostate cancer*. Histopathology, 2012. **60**(1): p. 87-117.
19. Deutsche Krebsgesellschaft. *Früherkennung von Prostatakrebs*. 2018; Available from: <https://www.krebsgesellschaft.de/onko-internetportal/basis-informationen-krebs/krebsarten/prostatakrebs/frueherkennung.html>.

20. Jilg, C.A., et al., *Detection of lymph node metastasis in patients with nodal prostate cancer relapse using (18)F/(11)C-choline positron emission tomography/computerized tomography*. J Urol, 2014. **192**(1): p. 103-10.
21. Deutsche Krebsgesellschaft. *Klassifikation des Krankheitsstadiums*. 2019; Available from: <https://www.krebsgesellschaft.de/onko-internetportal/basis-informationen-krebs/krebsarten/prostatakrebs/klassifikation-des-krankheitsstadiums.html>.
22. Matulewicz, R.S., A.B. Weiner, and E.M. Schaeffer, *Active Surveillance for Prostate Cancer*. JAMA, 2017. **318**(21): p. 2152.
23. Saman, D.M., et al., *A review of the current epidemiology and treatment options for prostate cancer*. Dis Mon, 2014. **60**(4): p. 150-4.
24. Jaiswal, S., et al., *Prostate Cancer for the Internist*. N Am J Med Sci, 2015. **7**(10): p. 429-35.
25. Sanda, M.G., et al., *Quality of life and satisfaction with outcome among prostate-cancer survivors*. N Engl J Med, 2008. **358**(12): p. 1250-61.
26. Loeb, S., et al., *Overdiagnosis and overtreatment of prostate cancer*. Eur Urol, 2014. **65**(6): p. 1046-55.
27. Finazzi, T. and M. Guckenberger, *[Image-guided intensity-modulated radiation therapy decreases late gastrointestinal side effects after radiation therapy for prostate cancer]*. Strahlenther Onkol, 2017. **193**(2): p. 162-164.
28. Mossie, K., et al., *Colon carcinoma kinase-4 defines a new subclass of the receptor tyrosine kinase family*. Oncogene, 1995. **11**(10): p. 2179-84.
29. Katoh, M., *Antibody-drug conjugate targeting protein tyrosine kinase 7, a receptor tyrosine kinase-like molecule involved in WNT and vascular endothelial growth factor signaling: effects on cancer stem cells, tumor microenvironment and whole-body homeostasis*. Ann Transl Med, 2017. **5**(23): p. 462.
30. Berger, H., A. Wodarz, and A. Borchers, *PTK7 Faces the Wnt in Development and Disease*. Front Cell Dev Biol, 2017. **5**: p. 31.
31. Peradziryi, H., N.S. Tolwinski, and A. Borchers, *The many roles of PTK7: a versatile regulator of cell-cell communication*. Arch Biochem Biophys, 2012. **524**(1): p. 71-6.
32. Berger, H., et al., *PTK7 localization and protein stability is affected by canonical Wnt ligands*. J Cell Sci, 2017. **130**(11): p. 1890-1903.
33. Peradziryi, H., et al., *PTK7/Otk interacts with Wnts and inhibits canonical Wnt signalling*. EMBO J, 2011. **30**(18): p. 3729-40.
34. Lhoumeau, A.C., et al., *PTK7: a cell polarity receptor with multiple facets*. Cell Cycle, 2011. **10**(8): p. 1233-6.
35. Lu, X., et al., *PTK7/CCK-4 is a novel regulator of planar cell polarity in vertebrates*. Nature, 2004. **430**(6995): p. 93-8.
36. Wang, M., et al., *Role of the planar cell polarity gene Protein tyrosine kinase 7 in neural tube defects in humans*. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, 2015. **103**(12): p. 1021-7.
37. Dunn, N.R. and N.S. Tolwinski, *Ptk7 and Mcc, Unfancied Components in Non-Canonical Wnt Signaling and Cancer*. Cancers (Basel), 2016. **8**(7).
38. Gartner, S., et al., *PTK 7 is a transforming gene and prognostic marker for breast cancer and nodal metastasis involvement*. PLoS One, 2014. **9**(1): p. e84472.
39. Kim, J.H., et al., *Protein tyrosine kinase 7 plays a tumor suppressor role by inhibiting ERK and AKT phosphorylation in lung cancer*. Oncol Rep, 2014. **31**(6): p. 2708-12.

40. Shin, W.S., et al., *Oncogenic role of protein tyrosine kinase 7 in esophageal squamous cell carcinoma*. *Cancer Sci*, 2013. **104**(8): p. 1120-6.
41. Zhang, H., et al., *Protein tyrosine kinase 7 (PTK7) as a predictor of lymph node metastases and a novel prognostic biomarker in patients with prostate cancer*. *Int J Mol Sci*, 2014. **15**(7): p. 11665-77.
42. Erbersdobler, A., et al., *Numerical chromosomal aberrations in transition-zone carcinomas of the prostate*. *J Urol*, 1997. **158**(4): p. 1594-8.
43. Mirlacher, M. and R. Simon, *Recipient block TMA technique*. *Methods Mol Biol*, 2010. **664**: p. 37-44.
44. Kononen, J., et al., *Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens*. *Nat Med*, 1998. **4**(7): p. 844-7.
45. Weischenfeldt, J., et al., *Integrative genomic analyses reveal an androgen-driven somatic alteration landscape in early-onset prostate cancer*. *Cancer Cell*, 2013. **23**(2): p. 159-70.
46. Minner, S., et al., *High level of Ets-related gene expression has high specificity for prostate cancer: a tissue microarray study of 11 483 cancers*. *Histopathology*, 2012. **61**(3): p. 445-53.
47. Burkhardt, L., et al., *CHD1 is a 5q21 tumor suppressor required for ERG rearrangement in prostate cancer*. *Cancer Res*, 2013. **73**(9): p. 2795-805.
48. Kluth, M., et al., *Genomic deletion of MAP3K7 at 6q12-22 is associated with early PSA recurrence in prostate cancer and absence of TMPRSS2:ERG fusions*. *Mod Pathol*, 2013. **26**(7): p. 975-83.
49. Krohn, A., et al., *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*, 2012. **181**(2): p. 401-12.
50. Krohn, A., et al., *Recurrent deletion of 3p13 targets multiple tumour suppressor genes and defines a distinct subgroup of aggressive ERG fusion-positive prostate cancers*. *J Pathol*, 2013. **231**(1): p. 130-41.
51. Minner, S., et al., *Low level HER2 overexpression is associated with rapid tumor cell proliferation and poor prognosis in prostate cancer*. *Clin Cancer Res*, 2010. **16**(5): p. 1553-60.
52. Minner, S., et al., *ERG status is unrelated to PSA recurrence in radically operated prostate cancer in the absence of antihormonal therapy*. *Clin Cancer Res*, 2011. **17**(18): p. 5878-88.
53. Liu, K., et al., *PTK7 is a novel oncogenic target for esophageal squamous cell carcinoma*. *World J Surg Oncol*, 2017. **15**(1): p. 105.
54. Tian, X., et al., *PTK7 overexpression in colorectal tumors: Clinicopathological correlation and prognosis relevance*. *Oncol Rep*, 2016. **36**(4): p. 1829-36.
55. Ataseven, B., et al., *PTK7 expression in triple-negative breast cancer*. *Anticancer Res*, 2013. **33**(9): p. 3759-63.
56. Wang, H., et al., *PTK7 protein is decreased in epithelial ovarian carcinomas with poor prognosis*. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014. **7**(11): p. 7881-9.
57. Lin, Y., et al., *PTK7 as a novel marker for favorable gastric cancer patient survival*. *J Surg Oncol*, 2012. **106**(7): p. 880-6.
58. Hishida, M., et al., *Protein tyrosine kinase 7: a hepatocellular carcinoma-related gene detected by triple-combination array*. *J Surg Res*, 2015. **195**(2): p. 444-53.
59. Colli, L.M., et al., *Components of the canonical and non-canonical Wnt pathways are not mis-expressed in pituitary tumors*. *PLoS One*, 2013. **8**(4): p. e62424.

60. Behbahani, T.E., et al., *Tyrosine kinase expression profile in clear cell renal cell carcinoma*. *World J Urol*, 2012. **30**(4): p. 559-65.
61. Easty, D.J., et al., *Loss of expression of receptor tyrosine kinase family genes PTK7 and SEK in metastatic melanoma*. *Int J Cancer*, 1997. **71**(6): p. 1061-5.
62. Brewer, M.A., et al., *Preneoplastic changes in ovarian tissues*. *Anal Quant Cytol Histol*, 2004. **26**(4): p. 207-16.
63. Bastian, B.C., *The molecular pathology of melanoma: an integrated taxonomy of melanocytic neoplasia*. *Annu Rev Pathol*, 2014. **9**: p. 239-71.
64. Lhoumeau, A.C., et al., *Overexpression of the Promigratory and Prometastatic PTK7 Receptor Is Associated with an Adverse Clinical Outcome in Colorectal Cancer*. *PLoS One*, 2015. **10**(5): p. e0123768.
65. Mirlacher, M., et al., *Influence of slide aging on results of translational research studies using immunohistochemistry*. *Mod Pathol*, 2004. **17**(11): p. 1414-20.
66. Dekker, T.J., et al., *Quality assessment of estrogen receptor and progesterone receptor testing in breast cancer using a tissue microarray-based approach*. *Breast Cancer Res Treat*, 2015. **152**(2): p. 247-52.
67. Furrer, D., et al., *Tissue Microarray Is a Reliable Tool for the Evaluation of HER2 Amplification in Breast Cancer*. *Anticancer Res*, 2016. **36**(9): p. 4661-6.
68. Margulis, V., et al., *Ki-67 is an independent predictor of bladder cancer outcome in patients treated with radical cystectomy for organ-confined disease*. *Clin Cancer Res*, 2006. **12**(24): p. 7369-73.
69. Chaux, A., et al., *Loss of PTEN expression is associated with increased risk of recurrence after prostatectomy for clinically localized prostate cancer*. *Mod Pathol*, 2012. **25**(11): p. 1543-9.
70. Kluth, M., et al., *Clinical significance of different types of p53 gene alteration in surgically treated prostate cancer*. *Int J Cancer*, 2014. **135**(6): p. 1369-80.
71. Hodgson, A., B. Xu, and M.R. Downes, *p53 immunohistochemistry in high-grade urothelial carcinoma of the bladder is prognostically significant*. *Histopathology*, 2017. **71**(2): p. 296-304.
72. Axelrod, D.E., et al., *Prognosis for Survival of Young Women with Breast Cancer by Quantitative p53 Immunohistochemistry*. *Cancer Clin Oncol*, 2012. **1**(1): p. 52-64.
73. Torhorst, J., et al., *Tissue microarrays for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints*. *Am J Pathol*, 2001. **159**(6): p. 2249-56.
74. Tomlins, S.A., et al., *Role of the TMPRSS2-ERG gene fusion in prostate cancer*. *Neoplasia*, 2008. **10**(2): p. 177-88.
75. Grupp, K., et al., *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*, 2015. **34**(3): p. 1211-20.
76. Mathieu, R., et al., *Multi-institutional validation of the prognostic value of Ki-67 labeling index in patients treated with radical prostatectomy*. *World J Urol*, 2015. **33**(8): p. 1165-71.
77. Steurer, S., et al., *TMPRSS2-ERG fusions are strongly linked to young patient age in low-grade prostate cancer*. *Eur Urol*, 2014. **66**(6): p. 978-81.
78. Schaefer, G., et al., *Distinct ERG rearrangement prevalence in prostate cancer: higher frequency in young age and in low PSA prostate cancer*. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 2013. **16**(2): p. 132-8.
79. Feldman, H.A., et al., *Age trends in the level of serum testosterone and other hormones in middle-aged men: longitudinal results from the Massachusetts male aging study*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002. **87**(2): p. 589-98.

80. Ahern, T. and F.C. Wu, *New horizons in testosterone and the ageing male*. Age Ageing, 2015. **44**(2): p. 188-95.
81. Tomlins, S.A., et al., *Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer*. Science, 2005. **310**(5748): p. 644-8.
82. Gopalan, A., et al., *TMPRSS2-ERG gene fusion is not associated with outcome in patients treated by prostatectomy*. Cancer Res, 2009. **69**(4): p. 1400-6.
83. Brase, J.C., et al., *TMPRSS2-ERG -specific transcriptional modulation is associated with prostate cancer biomarkers and TGF-beta signaling*. BMC Cancer, 2011. **11**: p. 507.
84. Ayala, G., et al., *Expression of ERG protein in prostate cancer: variability and biological correlates*. Endocr Relat Cancer, 2015. **22**(3): p. 277-87.
85. Wu, L., et al., *ERG is a critical regulator of Wnt/LEF1 signaling in prostate cancer*. Cancer Res, 2013. **73**(19): p. 6068-79.
86. Gupta, S., et al., *FZD4 as a mediator of ERG oncogene-induced WNT signaling and epithelial-to-mesenchymal transition in human prostate cancer cells*. Cancer Res, 2010. **70**(17): p. 6735-45.
87. Zhang, G., et al., *DiseaseEnhancer: a resource of human disease-associated enhancer catalog*. Nucleic Acids Res, 2018. **46**(D1): p. D78-D84.
88. Smedley, D., et al., *A Whole-Genome Analysis Framework for Effective Identification of Pathogenic Regulatory Variants in Mendelian Disease*. Am J Hum Genet, 2016. **99**(3): p. 595-606.
89. Dong, J.T., *Chromosomal deletions and tumor suppressor genes in prostate cancer*. Cancer Metastasis Rev, 2001. **20**(3-4): p. 173-93.
90. Boyd, L.K., X. Mao, and Y.J. Lu, *The complexity of prostate cancer: genomic alterations and heterogeneity*. Nat Rev Urol, 2012. **9**(11): p. 652-64.
91. Barbieri, C.E., et al., *The mutational landscape of prostate cancer*. Eur Urol, 2013. **64**(4): p. 567-76.
92. Kwabi-Addo, B., et al., *Haploinsufficiency of the Pten tumor suppressor gene promotes prostate cancer progression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(20): p. 11563-8.
93. Davis, A.J. and D.J. Chen, *DNA double strand break repair via non-homologous end-joining*. Transl Cancer Res, 2013. **2**(3): p. 130-143.
94. Kluth, M., et al., *Concurrent deletion of 16q23 and PTEN is an independent prognostic feature in prostate cancer*. Int J Cancer, 2015. **137**(10): p. 2354-63.
95. Kluth, M., et al., *13q deletion is linked to an adverse phenotype and poor prognosis in prostate cancer*. Genes Chromosomes Cancer, 2018. **57**(10): p. 504-512.
96. Kluth, M., et al., *Deletion of 18q is a strong and independent prognostic feature in prostate cancer*. Oncotarget, 2016. **7**(52): p. 86339-86349.
97. Rubin, M.A. and F. Demichelis, *The Genomics of Prostate Cancer: emerging understanding with technologic advances*. Mod Pathol, 2018. **31**(S1): p. S1-11.
98. Lee, H.K., et al., *Flt-1 regulates vascular endothelial cell migration via a protein tyrosine kinase-7-dependent pathway*. Blood, 2011. **117**(21): p. 5762-71.
99. Martinez, S., et al., *The PTK7 and ROR2 Protein Receptors Interact in the Vertebrate WNT/Planar Cell Polarity (PCP) Pathway*. J Biol Chem, 2015. **290**(51): p. 30562-72.

100. Shin, W.S., H.W. Lee, and S.T. Lee, *Catalytically inactive receptor tyrosine kinase PTK7 activates FGFR1 independent of FGF*. *FASEB J*, 2019. **33**(11): p. 12960-12971.
101. Shin, W.S., et al., *Catalytically defective receptor protein tyrosine kinase PTK7 enhances invasive phenotype by inducing MMP-9 through activation of AP-1 and NF-kappaB in esophageal squamous cell carcinoma cells*. *Oncotarget*, 2016. **7**(45): p. 73242-73256.
102. Chalhoub, N. and S.J. Baker, *PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer*. *Annu Rev Pathol*, 2009. **4**: p. 127-50.
103. Costa, R.L.B., H.S. Han, and W.J. Gradishar, *Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in triple-negative breast cancer: a review*. *Breast Cancer Res Treat*, 2018. **169**(3): p. 397-406.
104. Schroeder, C., et al., *Nuclear ELAC2 overexpression is associated with increased hazard for relapse after radical prostatectomy*. *Oncotarget*, 2019. **10**(48): p. 4973-4986.
105. Bubendorf, L., et al., *Metastatic patterns of prostate cancer: an autopsy study of 1,589 patients*. *Hum Pathol*, 2000. **31**(5): p. 578-83.
106. Bonk, S., et al., *Prognostic and diagnostic role of PSA immunohistochemistry: A tissue microarray study on 21,000 normal and cancerous tissues*. *Oncotarget*, 2019. **10**(52): p. 5439-5453.
107. Choy, B., et al., *Prognostic Significance of Percentage and Architectural Types of Contemporary Gleason Pattern 4 Prostate Cancer in Radical Prostatectomy*. *Am J Surg Pathol*, 2016. **40**(10): p. 1400-6.
108. Hoflmayer, D., et al., *SNW1 is a prognostic biomarker in prostate cancer*. *Diagn Pathol*, 2019. **14**(1): p. 33.
109. Meiners, J., et al., *Upregulation of SPDEF is associated with poor prognosis in prostate cancer*. *Oncol Lett*, 2019. **18**(5): p. 5107-5118.
110. Weidemann, S.A., et al., *High-level expression of protein tyrosine phosphatase non-receptor 12 is a strong and independent predictor of poor prognosis in prostate cancer*. *BMC Cancer*, 2019. **19**(1): p. 944.

9. Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei allen bedanken, die mich bei der Umsetzung meiner Doktorarbeit unterstützt haben.

Ganz besonders danke ich meinem Doktorvater Prof. Sauter für seine fachliche Unterstützung und seiner konstruktiven Kritik. Herrn Dr. Simon und Frau Dr. Hube danke ich für die gute Zusammenarbeit, ihren wissenschaftlichen Austausch und ihren ermutigenden Worten.

Schließlich gilt auch mein besonderer Dank meiner Familie für die tatkräftige Unterstützung und meiner Frau, die an mich geglaubt hat und mir stets mit einem offenen Ohr zur Seite stand.

10. Lebenslauf:

Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt

11. Eidesstattliche Versicherung

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

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

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

Unterschrift: