



Fakultät für Medizin

Anwendung von Kallikrein 2 bei der molekularbiologischen Detektion und topographischen Einordnung disseminierter Tumorzellen in Lymphknoten von Prostatakarzinom-Patienten mittels quantitativer RT-PCR

Miriam Cornelia Bandur

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Prof. Dr. Margitta Retz
2. Prof. Dr. Wilko Weichert

Die Dissertation wurde am 28.07.2020 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 30.12.2020 angenommen.

Meinen Eltern Cornelia und Wolfgang Bandur

Meinem Onkel Hans Rynass

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	5
1.1 Das Prostatakarzinom	5
1.1.1 Epidemiologie	5
1.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren	6
1.1.3 Klinische Präsentation und Diagnostik	7
1.1.4 Klassifizierung	7
1.1.5 Stadium-abhängige Therapieempfehlungen	9
1.1.6 Nachsorge	12
1.1.7 Prognose	12
1.2 Disseminierte Tumorzellen	14
1.2.1 Definition und Relevanz	14
1.2.2 Methoden der Detektion disseminierter Tumorzellen	16
1.3 Serinproteasen der humanen Kallikreinfamilie als molekulare Marker	17
1.3.1 Humanes Kallikrein 2	18
1.4 Fragestellung	19
2. Material und Methoden	20
2.1 Studienprotokoll und Patientenselektion	20
2.2 Zellkulturen	21
2.2.1 Materialien	21
2.2.1.1 Reagenzien	21
2.2.1.2 Verbrauchsmaterialien	21
2.2.1.3 Gerätschaften	21
2.2.2 Methodik	21
2.2.2.1 Kultivierung der Zelllinie	21
2.2.2.2 Lyse der Kulturzellen	22
2.3 Gewebeproben	22
2.3.1 Gewinnung der PBMC aus peripher venösem Blut	22
2.3.1.1 Reagenzien	23
2.3.1.2 Verbrauchsmaterialien	23
2.3.1.3 Gerätschaften	23
2.3.1.4 Methodik der PBMC-Isolation	23
2.3.2 Gewinnung der lymphonodulären Proben	24
2.3.2.1 Reagenzien	24
2.3.2.2 Verbrauchsmaterialien	25
2.3.2.3 Gerätschaften	25
2.3.2.4 Methodik der Lymphknotengewinnung	25
2.3.3 RNA-Extraktion	26
2.3.3.1 Aufbereitung der Lymphknotenpräparate	26
2.3.3.1.1 Reagenzien	26
2.3.3.1.2 Verbrauchsmaterialien	26
2.3.3.1.3 Gerätschaften	27

2.3.3.1.4	Methodik der Zellyse	27
2.3.3.2	Organische Extraktion	28
2.3.3.2.1	Reagenzien	28
2.3.3.2.2	Verbrauchsmaterialien	28
2.3.3.2.3	Gerätschaften	29
2.3.3.2.4	Methodik der RNA-Extraktion	29
2.3.4	RNA-Analyse von Reinheit und Konzentration	30
2.3.4.1	Reagenzien	30
2.3.4.2	Verbrauchsmaterialien	30
2.3.4.3	Gerätschaften	30
2.3.4.4	Methodik der Photometrie	30
2.3.5	Die Reverse Transkription	30
2.3.5.1	Reagenzien	31
2.3.5.2	Verbrauchsmaterialien	31
2.3.5.3	Gerätschaften	31
2.3.5.4	Methodik der Reversen Transkriptase Reaktion	31
2.3.6	Die Polymerase-Kettenreaktion	32
2.3.6.1	Reagenzien	33
2.3.6.2	Verbrauchsmaterialien	34
2.3.6.3	Gerätschaften	34
2.3.6.4	Methodik der quantitativen reversen Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)	34
2.3.7	Kontrolle der PCR-Analyse	35
2.3.7.1	Positivkontrolle	35
2.3.7.2	Negativkontrolle	35
2.3.7.3	Sensitivitäts- und Spezifitätsprüfung	35
2.3.8	Auswertung der qRT-PCR-Resultate	35
2.3.9	Statistische Auswertung	38
3.	Ergebnisse	39
3.1	Analytische Beurteilung der qRT-PCR anhand von KLK3 und KLK2	39
3.1.1	Auswahl der Referenzgene	39
3.1.2	Charakterisierung der angewandten qRT-PCR-Methode	39
3.1.3	Positivkontrollen der RT-PCR Reaktionen	40
3.1.4	Negativkontrollen der RT-PCR Reaktion	40
3.1.5	Sensitivität und Spezifität der qRT-PCR	40
3.2	Patientenspezifische Daten	41
3.2.1	Definition des Patientenkollektivs	41
3.2.2	Bestimmung des Lymphknotenstatus	42
3.2.2.1	Spezifische Genexpression von KLK3	43
3.2.2.2	Spezifische Genexpression von KLK2	43
3.2.2.3	Vergleich der Detektionsmethoden	44
3.3	Topographische Verteilung der Lymphknoten	46
4.	Diskussion	54
4.1	Studiendesign	54

4.2	Materialgewinnung	55
4.2.1	Operatives Vorgehen	55
4.2.2	Präparation der Proben	55
4.2.3	Einflüsse auf die Probengewinnung und Qualität der angewandten Methoden der Detektion vereinzelter Turmozellen im lymphatischen Gewebe	56
4.2.3.1	Degradierung der RNA	57
4.2.3.2	Entdifferenzierung der Zellen	57
4.2.4	Kontrolle, Sensitivität und Spezifität der RT-qPCR	57
4.3	Ergebnisbewertung	58
4.3.1	Nachweis einer (Mikro-)Metastasierung	58
4.3.2	Topographische Beurteilung und klinische Bedeutung	60
4.4	Zusammenfassung	61
5.	Anhang	63
5.1	Abkürzungsverzeichnis	63
5.2	Abbildungsverzeichnis	65
5.3	Tabellenverzeichnis	66
5.4	Literaturverzeichnis	67
5.5	Danksagung	77
5.6	Publikationen	78
5.7	Curriculum vitae	79

1. Einleitung

1.1 Das Prostatakarzinom

Das Prostatakarzinom zählt nach wie vor zu den häufigsten malignen Erkrankungen des Mannes weltweit und bedingt trotz verbesserter Methoden der Früherkennung mit Anstieg der Detektion lokal begrenzter und der Option folglich primär kurativ intendierter therapeutischer Ansätze eine hohe Anzahl von Sterbefällen/Jahr. Die Verbesserung der früh-diagnostischen Methodik kann über die Adjustierung der Therapieauswahl anhand der differenzierteren Identifikation von Risikopatienten zu einer Verbesserung der Prognose führen.

Der Nachweis einer regionalen lymphatischen Metastasierung mit Anstieg der Wahrscheinlichkeit eines Erkrankungsrezidivs beeinflusst die Entscheidung über die Notwendigkeit einer adjuvanten Therapie, sodass eine Steigerung der Sensitivität des Nachweises disseminierter Tumorzellen in regionalen Lymphknoten mittels molekularbiologischer Methoden im Gegensatz zur konventionellen histopathologischen Aufarbeitung einen erfolgsversprechenden Ansatz zur Verbesserung von individueller Risiko- und Prognosebewertung bietet.

1.1.1 Epidemiologie

Mit Blick auf die demografische Entwicklung Deutschlands und weiterer westlicher Industrienationen lässt sich über den Verlauf der letzten Jahrzehnte ein steter Anstieg der sogenannten „Alterskrankheiten“ beobachten und infolgedessen auch für die Zukunft eine Zunahme ihrer gesellschaftlichen Relevanz in sozialer als auch sozioökonomischer Hinsicht prognostizieren. Als eine der häufigsten onkologischen Erkrankungen hat in diesem Zusammenhang das Prostatakarzinom des Mannes an Bedeutung gewonnen, welches bei einer altersstandardisierten Inzidenzrate von 92,7 auf 100000 männliche Personen den häufigsten malignen Tumor des erwachsenen Mannes mit einem mittleren Erkrankungsalter von 69 Jahren repräsentiert (Robert Koch Institut (RKI) und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland (GEKID), Daten 2014, Stand 12/2017). Nach Daten des Global Cancer Observatory (WHO, Stand Mai 2019) erkrankten 2018 62641 Männer in Deutschland und 1 276 106 Männer weltweit an Prostatakrebs; es besteht somit die höchste Inzidenz aller Malignome für das männliche Geschlecht und die dritthäufigste Inzidenz nach Brust- und Lungenkrebs bei den Krebserkrankungen beider Geschlechter. Die Mortalitätsraten der Erkrankung entsprachen bei unter 65-Jährigen 2,9 Todesfällen auf 100000 Einwohner (D) (EU: 2,6 Todesfälle) mit einem massiven Anstieg der Sterblichkeit in der Altersgruppe der über 65-Jährigen mit 196,8 (D) bzw. 191,0 (EU) pro 100000 Einwohner (Eurostat, Daten für 2015); 2015 starben 13919 Männer in Deutschland (D) bzw. 73315 Männer in der Europäischen Union (EU) an Prostatakarzinomen entsprechend einem Anteil von 3,1% bzw. 2,9% an allen männlichen Todesfällen. Das Prostatakarzinom stellt somit nach dem Bronchialkarzinom und kolorektalen Karzinom die dritthäufigste onkologische Todesursache dar.

Weltweit lassen sich gravierende Unterschiede in den Inzidenzraten darlegen, so ist die Inzidenz in der afroamerikanischen Bevölkerung der USA mit 185,4/100000 beschrieben (Haas et al., 2008), während die standardisierte Erkrankungsrate in Griechenland mit 34,2/100000 angegeben wird (Ferlay et al., 2013). Auffällig im weltweiten Vergleich ist zudem eine erheblich niedrigere Inzidenzrate u. a. im asiatischen Raum, welche sich zu einem erheblichen Teil durch einen anderen Umgang mit potenziellen Screening-Verfahren in den Ländern erklären lässt. Seit Einführung und Verbreitung des PSA-Tests als

Marker für das Bestehen eines Prostatakarzinoms ließ sich in den vergangenen Jahren ein deutlicher Anstieg mit aktuell seit einigen Jahren bestehender Stagnation der Inzidenz in Europa beobachten, welcher in Diskordanz zur annähernd unveränderten altersstandardisierten Mortalitätsrate steht (S3-Leitlinie Prostatakarzinom, Version 5.1, Mai 2019).

Im internationalen Vergleich bestätigt sich eine höhere Inzidenz des Prostatakarzinoms in Abhängigkeit von Risikofaktoren, insbesondere der Lebenserwartung, und dem Nutzen von Screeningverfahren bei relativ niedriger Mortalitätsrate zu Gunsten der industriell höher entwickelten Regionen, relativ betrachtet höhere Sterberaten werden hierbei in Ressourcen-armen Ländern beobachtet.

Bei einer relativen 5-Jahres-Überlebensrate von 91% in Deutschland (Robert Koch Institut (Hrsg.): Krebs in Deutschland 2013/2014. 11. Ausgabe, Berlin 2017) stellt sich die Frage nach Bedeutung und Nutzen einer frühen Erkennung insbesondere in Hinsicht auf mögliche Therapieoptionen und deren Einfluss auf die Überlebensraten in Abhängigkeit des Zeitpunkts der Diagnosestellung. Hierzu ist ein grundlegendes Verständnis der Ätiologie und Pathogenese des Prostatakarzinoms von Nöten.

1.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren

An ätiologischen Faktoren sind insbesondere Alter, genetische Disposition und ethnische Zugehörigkeit zu nennen. Die eindrücklichste Korrelation besteht zwischen Erkrankung und Alter, da mit Beginn der fünften Lebensdekade eine deutliche Zunahme der Inzidenz belegt ist, welche mit steigendem Alter bis etwa zum fünfundachtzigstem Lebensjahr korreliert; hiernach bedingt u. a. die deutlich seltener betriebene Diagnostik mittels Stanzbiopsie der Prostata keinen weiteren Anstieg der Inzidenzraten.

Anhand zweier Metaanalysen konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Erkrankungswahrscheinlichkeit von 2,5% bis 4,3% relativem Risiko bei familiärer Belastung (Verwandtschaft 1°) besteht (Zeegers et al., 2003). Ebenso haben Träger des BRCA-Gens eine höhere Wahrscheinlichkeit an einem Prostatakarzinom zu erkranken (Castro et al., 2012).

Unter dem Gesichtspunkt der ethnischen Zugehörigkeit kann eine deutlich höhere Erkrankungsrate insbesondere bei Afroamerikanern beobachtet werden (Haas et al., 2008). Auch scheinen lokale Entzündungsprozesse i.S. einer Prostatitis z. B. durch sexuell übertragbare Erkrankungen das Risiko eines Malignoms der Prostata zu erhöhen. Nicht eindeutig belegte Zusammenhänge bestehen zwischen Erkrankungshäufigkeit und sozioökonomischen und alimentären Faktoren bei global gegebenem Ost-Südgefälle sowie europäischen Nord-Südgefälle zu Gunsten der Asiaten bzw. Südeuropäer (Ferlay et al., 2013). Keinen sicheren Beweis für eine Beeinflussung der Erkrankungswahrscheinlichkeit gibt es zudem für Adipositas und Vasektomie. Die Höhe der Serumtestosteronwerte gilt nicht als prädiktiver Faktor, während ein Diabetes mellitus scheinbar sogar tendenziell protektive Wirkung zeigt (S3-Leitlinie Prostatakarzinom, Version 5.1, Mai 2019).

Als einzige medikamentöse Präventionsmöglichkeit ist bislang die Einnahme von 5-Alpha-Reduktase-Hemmern identifiziert worden (Castro et al., 2012), welche aufgrund der Nutzen-Risiko-Relation aktuell allerdings nicht zur primären Prävention zugelassen ist.

1.1.3 Klinische Präsentation und Diagnostik

Klinisch bleibt ein Prostatakarzinom häufig lange Zeit unauffällig, die klinische Symptomatik mit unter anderem Miktionsbeschwerden im Sinne einer verzögerten Miktion, erhöhten Miktionsfrequenz, Nykturie, Inkontinenz sowie Hämaturie oder –spermie bis zu (unilateralem) Harnstau und Impotenz ist kaum von der einer Benigen Prostatahyperplasie zu unterscheiden und statistisch gesehen auch deutlich häufiger durch eine solche als durch eine maligne Neoplasie der Prostata hervorgerufen. Fortgeschrittene Erkrankungsstadien führen häufig zu unspezifischen Allgemeinsymptomen mit unbeabsichtigter Gewichtsabnahme und Abgeschlagenheit, auch das Auftreten paraneoplastischer Symptome oder pathologischer Frakturen durch eine ossäre Metastasierung bedingen vielfach die Erstdiagnose eines Prostatakarzinoms.

Seit Einführung der serologischen PSA-Bestimmung ist diese in Kombination mit der konsekutiven Prostatabiopsie zu 80% für die Erkennung von Prostatakarzinomen verantwortlich, jedoch werden trotz geringer Sensitivität bei jedoch hoher Spezifität ca. 20% der Karzinome weiterhin primär durch einen suspekten Tastbefund in der Digital-rektalen Untersuchung (DRU) entdeckt, welche ab dem 45. Lebensjahr zu den Leistungen der gesetzlichen Krankenkassen im Rahmen der Früherkennung für Männer gehört, deren effektiver Nutzen jedoch umstritten bleibt. Die ergänzende quantitative Bestimmung des Prostata-spezifischen Antigens als sensitives Screeningverfahren seit den 90er Jahren sowie Verlaufskontrollparameter bedingt einen höheren Nachweis insbesondere früher Stadien der Erkrankung ohne jedoch nachweisbaren Einfluss auf die erkrankungsspezifische Mortalität oder die Gesamtüberlebenszeit unter Inkaufnahme des Risikos häufiger Überdiagnosen und -therapien. (Ilic et al., 2013). Die Durchführung dieser Screeningtests soll daher im „informed consent“ zwischen behandelndem Arzt und Patienten individuell abgestimmt werden.

Diagnostischer Goldstandard bleibt auch unter Ergänzung der DRU durch bildgebende Verfahren wie des transrektalen Ultraschalls die Stanzbiopsie der Prostata, welche bei einem initialen PSA-Wert von ≥ 4 ng/ml oder einer Verlaufsdynamik mit Grenzwerten zwischen 0,35 und 0,75 ng/ml pro Jahr erwogen werden sollte (Leitlinienempfehlung). Auffällige Werte sollten zunächst nach sechs bis acht Wochen kontrolliert werden, bevor eine transrektal-sonographisch gestützte Stanzbiopsie angeschlossen wird, welche als systematische Biopsie 10-12 Gewebezylinder oder nach Durchführung einer MR-Untersuchung der Prostata gezielt suspektere Bereiche untersuchen soll. Eine PET-CT-Untersuchung ist im Rahmen der Primärdiagnostik bislang nicht indiziert (Krause et al., 2011).

1.1.4 Klassifizierung

97% der Prostatakarzinome entsprechen epithelialen Adenokarzinomen, deren histopathologisches Wachstumsmuster und Differenzierungsgrad, das sogenannte Grading (G1-5), im Gleason-Score als diagnostischem und prognostischem Marker beschrieben werden (Epstein et al., 2016). Der Gleason-Score eines Prostatektomiepräparats ergibt sich dabei aus der Summe der zwei vorrangig vorkommenden Gewebsbilder, bei Vorliegen eines monomorphen Bildes aus der doppelten Summe des einzelnen Gleason-Grade. Sollte ein Teil des Prostatagewebes einen dritten Grad aufweisen, sollte eine Erwähnung dieses auch bei einer Ausbreitung von lediglich $<5\%$ erfolgen, da ein Einfluss auf den Verlauf der Erkrankung erkennbar ist. (Pan et al., 2000). Im Rahmen einer Stanzbiopsie

gewonnene Gewebeproben werden hingegen anhand des häufigsten und des schlechtesten Scores beurteilt.

Die Stadieneinteilung erfolgt anhand der TNM-Klassifikation der UICC (Union internationale contre le cancer) für das Adenom der Prostata (Wittekind et al., 2017; Tabelle 1). Die restlichen 3% der Tumore der Prostata werden als seltene oder besonders differenzierte Prostatakarzinome bezeichnet und müssen – ggf. unter Hinzuziehung immunhistochemischer Untersuchungsmethoden - anders klassifiziert werden; ebenso abgegrenzt werden gutartige und atypische Läsionen der Prostata. In Abhängigkeit des Stadiums – basierend auf den Ergebnissen der DRU - können lokal begrenzte (Stadien T1-2 N0 M0), lokal fortgeschrittene (Stadien T3-4 N0 M0) und fortgeschrittene bzw. metastasierte Prostatakarzinome unterschieden; lokal begrenzte Stadien unterliegen dabei einer gesonderten Risikoklassifikation, anhand derer das Ausmaß der apparativen Diagnostik im Rahmen des Stagings bestimmt wird.

Primärtumor	
Primärtumor kann nicht beurteilt werden	TX
Kein Anhalt für Primärtumor	T0
Klinisch nicht erkennbarer Tumor, weder tastbar noch in bildgebenden Verfahren sichtbar	T1
Tumor zufälligen histologischen Befunds (Incidental carcinoma) in 5 % oder weniger des resezierten Gewebes	T1a
Tumor zufälligen histologischen Befunds (Incidental carcinoma) in mehr als 5 % des resezierten Gewebes	T1b
Tumor durch Nadelbiopsie diagnostiziert (z. B. wegen erhöhtem PSA)	T1c
Tumor begrenzt auf Prostata	T2
Tumor befällt die Hälfte eines Lappens oder weniger	T2a
Tumor befällt mehr als die Hälfte eines Lappens	T2b
Tumor in beiden Lappen	T2c
Tumor durchbricht die Prostatakapsel	T3
Extrakapsuläre Ausbreitung (einseitig oder beidseitig) eingeschlossen mikroskopischer Infiltration des Blasenhalses	T3a
Tumor infiltriert Samenblasen	T3b
Tumor ist fixiert oder infiltriert andere benachbarte Strukturen als Samenblasen, z. B. Sphincter externus, Rektum und/oder Levatormuskel und/oder ist an Beckenwand fixiert	T4
Regionäre Lymphknoten	
Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden	NX
Keine regionären Lymphknotenmetastasen	N0
Regionäre Lymphknotenmetastasen	N1
Fernmetastasen	
Keine Fernmetastasen	M0
Fernmetastasen	M1
Metastasen nur in nicht regionären Lymphknoten	M1a

Metastasen in Knochen	M1b
Fernmetastasen in anderen Lokalisationen	M1c

Tabelle 1: Schema zur TNM-/pTNM-Klassifikation [UICC 2017], 7. Auflage (aus S1- Leitlinie zur pathologisch-anatomischen Diagnostik des Prostatakarzinoms des Bundesverbandes Deutscher Pathologen e. V. © und der Deutschen Gesellschaft für Pathologie e. V. ©, 4. Auflage, 2017)

Im UICC-Stadium I werden Tumore bis zu einer Ausdehnung T1, T2a N0 M0 erfasst, das Stadium II (T2b-2c N0 M0) bezeichnet das auf die Prostata beschränkte Wachstum, das extraprostatitisches lokales Tumorwachstum (Stadium III mit T3,T4 N0 M0), die lymphatische oder hämatogene Metastasierung definiert das UICC Stadium IV (jedes T N1 und/oder M1), siehe Tabelle 2.

Stadium I	T1, T2a	N0	M0
Stadium II	T2b, T2c	N0	M0
Stadium III	T3	N0	M0
Stadium IV	T4	N0	M0
	Jedes T	N1	M0
	Jedes T	Jedes N	M1

Tabelle 2: Stadiengruppierung [UICC 2017], 7. Auflage (aus S1- Leitlinie zur pathologisch-anatomischen Diagnostik des Prostatakarzinoms des Bundesverbandes Deutscher Pathologen e. V. © und der Deutschen Gesellschaft für Pathologie e. V. ©, 4. Auflage, 2017)

Die Stratifizierung des Rezidivrisikos bei lokalem Prostatakarzinom kann mittels der sogenannten D'Amico-Klassifikation unter Berücksichtigung der TNM-Klassifikation in Kombination mit PSA-Level und Gleason-Score durchgeführt werden:

- Niedriges Risiko: PSA \leq 10 ng/ml und Gleason-Score \leq 6 und cT-Kategorie \leq T2a
- Intermediäres (im Folgenden: mittleres) Risiko: PSA > 10 ng/ml - 20 ng/ml oder Gleason-Score 7 oder cT-Kategorie 2b.
- Hohes Risiko: PSA > 20 ng/ml oder Gleason-Score \geq 8 oder cT-Kategorie 2c

1.1.5 Stadium-abhängige Therapieempfehlungen

Die Therapie und Prognose des Prostatakarzinoms hängt von der Risikostratifizierung ab und bestimmt die Aggressivität des therapeutischen Vorgehens. Aufgrund der regelhaft langsamen Progredienz der Erkrankung mit langen Gesamtüberlebenszeiten auch ohne therapeutische Intervention gilt es die durch eine Therapie gewonnenen Lebensjahre gegen einen therapieassoziierten Verlust an Lebensqualität abzuwägen (S3-Leitlinie Prostatakarzinom, Version 5.1, Mai 2019). Unter Erfüllung der Kriterien PSA-Wert \leq 10 ng/ml, Gleason-Score \leq 6, TNM-Stadium cT1 und cT2a und Tumornachweis in \leq 2 Stenzen bei leitliniengerechter Entnahme von 10-12 Stenzen mit \leq 50 % Tumor pro Stanze ist eine Active Surveillance mit dreimonatigen Kontrollen durch DRU und PSA-Bestimmung sowie Re-Biopsie nach sechs bis zwölf Monaten mit Verlängerung der Intervalle nach zwei Jahren möglich, ebenso ist ein solches Vorgehen bei einer Lebenserwartung des Patienten von unter zehn Jahren aufgrund des erwartungsgemäß langsamen Progresses zu diskutieren. In der ProtecT-Studie mit 1643 Patienten vorwiegend geringen bzw. intermediären Risikoprofils konnte anhand der 10-Jahres-Daten kein

signifikanter Unterschied bzgl. des Prostatakrebs-spezifischen Überlebens gezeigt werden, jedoch war das Vorliegen eines metastasierten Erkrankungsstadiums unter Active Surveillance Strategie deutlich höher als nach radikaler Prostatektomie oder Strahlentherapie (Hamdy et al., 2016).

Hiervon abzugrenzen sind insbesondere - aber nicht ausschließlich - nicht kurativ intendierte, palliative Therapieansätze bei lokal begrenzten, wenig aggressiven Tumoren älterer oder multimorbider Patienten, welche u. a. eine antihormonelle Behandlung, Interventionen zur Blutstillung, Bestrahlung bei Schmerzen und die palliative TUR-P bei Störung der Blasenentleerung umfassen. Diese Entscheidung ist stets unter Berücksichtigung des Patientenwunsches, der individuellen Lebenserwartung durch Alter und Morbidität und des zu erwartenden Krankheitsverlaufes mit und ohne Therapie zu diskutieren.

Nichtdestotrotz bleiben als Therapie der Wahl bei lokalem, nicht-metastasiertem Prostatakarzinom aller Risikogruppen eine Strahlentherapie oder eine radikale Prostatektomie mit dem Ziel der Heilung des Patienten. Studiendaten zeigen, dass bei einem TNM-Stadium T1b-T2 N0 M0), einem PSA- Wert unter 50 ng/ml und einer Lebenserwartung von mindestens zehn Jahren die radikale Prostatektomie signifikant die Häufigkeit einer Progression der Erkrankung, das Risiko von Fernmetastasen, die prostatakarzinomspezifische Mortalität und die Gesamtmortalität gegenüber der Strategie des „Watchful Waiting“ senkt (Bill-Axelsson et al., 2008 und 2011; Thompson et al., 2007). Das höchste Risiko einer therapieassoziierten Komplikation besteht für die erektile Dysfunktion gefolgt von Problemen der Kontinenz, auch therapierelevante Blutungen sind in unterschiedlich hoher Zahl beziffert (1,0 – 11,5% gemäß aktueller Leitlinie). Das Auftreten von Rezidiven nach RPE ist abhängig vom etwaigen Vorliegen einer (Mikro-)Metastasierung zum Operationszeitpunkt sowie der vollständigen Resektion der Prostata mit tumorfreien Resektionsrändern (R0-Situation; Qualitätsindikator) bei gesichertem Standard der Kompetenzen des Operateurs. Ein nerv- bzw. potenterhaltendes operatives Vorgehen erhöht das Risiko einer R1-Resektion und gilt gemäß EAU Guidelines bei Tumoren im Stadium cT3, cT2c, einem Gleason-Score >7 oder mehr als einer positiven Biopsie mit Gleason-Score ≥ 7 auf der ipsilateralen Seite als kontraindiziert (Heidenreich et al., 2011).

Die Aggressivität des operativen Vorgehens hängt auch in Hinsicht auf die Durchführung und Ausweitung einer Lymphadenektomie vom klinischen Stadium ab; dem Informationszugewinn bzgl. der Notwendigkeit einer postoperativen hormonablativen Therapie bei nodal positiven Befunden steht hierbei das potenziell höhere intraoperative Risiko mit Auftreten intra- oder postoperativer Komplikationen (Ausbildung von Lymphozelen, Lymphödemen und einem erhöhten Thromboserisiko) bei bisher nicht belegtem Einfluss auf das Gesamtüberleben. Als nicht empfohlen gilt sie daher bei Karzinompatienten des niedrigen Risikoprofils aufgrund der geringen Wahrscheinlichkeit eines lymphonodulären Befalls. Mehrere Studien konnten jedoch zeigen, dass die Wahrscheinlichkeit der Detektion von Metastasen mit dem Ausmaß der Lymphadenektomie korreliert (Touijer et al, 2007) und eine Begrenzung des Eingriffs im Sinne einer „limited“ bzw. „Standard“-Lymphadenektomie nur einen Teil der möglichen Metastasierungsfelder umfasst (Bader et al., 2002; Weckermann et al., 2007). Als Mindestausmaß wurden die Gebiete der Fossae obturatoriae und Regionen medial der Arteriae iliacae externae mit Entnahme von mindestens zehn Lymphknoten definiert, wodurch Joslyn et al. einen statistisch signifikanten tumorspezifischen Überlebensvorteil ohne jedoch Einfluss auf das

Gesamtüberleben nachweisen konnten (Joslyn et al., 2006). Dennoch gilt der therapeutische Stellenwert der Lymphadenektomie im Rahmen der radikalen Prostatektomie beim lymphknotenpositiven Prostatakarzinom als nicht geklärt (Fossati et al., 2017).

Neben der operativen Lymphadenektomie besteht bei Nachweis eines lymphonodulären Befalls die Option einer lokalen Strahlentherapie in Kombination mit einer systemischen hormonablativen Therapie mit 24-36 Monaten Dauer, beide Verfahren können jedoch auch adjuvant nach RPE mit Lymphadenektomie indiziert werden.

Weitere primäre Therapieoptionen sind in lokal begrenzten Stadien die perkutane Strahlentherapie mit einer Dosis von mindestens 74 Gray bis etwa 80 Gray in Standardfraktionierung (1,8 bis 2,0 Gy) nach ICRU 50 mit oder ohne begleitende hormonablativen Therapie bzw. Bestrahlung der pelvinen Lymphabflusswege. Die Durchführung der Strahlentherapie sollte mittels Kombination der Verfahren einer Intensitäts-modulierten und bildgeführten Strahlentherapie erfolgen (IMRT bzw. IGRT), um durch eine Reduktion der Strahlendosis die Rate an organspezifischen Nebenwirkungen (v.a. gastrointestinale Komplikationen) zu verringern. Der Nutzen der Bestrahlung der pelvinen Lymphabflusswege beim lokal begrenzten Prostatakarzinom mit hohem Risikoprofil oder beim lokal fortgeschrittenen Prostatakarzinom ist nicht hinreichend belegt, kann aber angenommen werden. Bei allerdings erwartungsgemäß nur geringem prognostischem Nutzen und der Gefahr Therapie-assoziiertes Sekundärerkrankungen sollte eine solche bei Patienten der Niedrigrisikogruppe hingegen unterbleiben.

Diese Patienten können alternativ einer Low-Dose-Rate-Brachytherapie im Sinne einer transperinealen Applikation von Implantaten mit Jod-125 bzw. Palladium-103 als Therapieäquivalent zu radikaler Prostatektomie oder perkutaner Strahlentherapie zugeführt werden, alternativ besteht die Option einer high-dose-rate-Brachytherapie als Dosisescalation mit perkutaner Strahlentherapie für alle Risikogruppen.

Für Patienten mit lokal begrenztem Prostatakarzinom sollte bei mittlerem bzw. soll bei hohem Risikoprofil die perkutane Strahlentherapie von einer hormonablativen Therapie gefolgt werden.

Für lokal fortgeschrittene Karzinome gelten die radikale Prostatektomie mit Lymphadenektomie sowie die primäre perkutane Strahlentherapie kombiniert mit einer langfristigen hormonablativen Therapie über 24 bis 36 Monate ebenso als primäre Therapieoptionen. Die Lymphadenektomie sollte hierbei nach ausgedehntem Schema erfolgen und die Regionen der Venae iliacae externae, Arteriae iliacae internae und Fossae obturatoriae sowie Lymphknoten medial der Aa. Iliacae internae umfassen. Primär relevant ist der Informationsgewinn hierbei hinsichtlich der Entscheidung über eine adjuvante Therapie (Heidenreich et al., 2002; Stone et al., 1997).

Eine adjuvante Strahlentherapie bei postoperativ negativem PSA-Wert soll in der Regel bis vier Monate nach radikaler Prostatektomie erfolgen und zeigt insbesondere bei R1-resezierten Tumoren eine signifikante Risikoreduktion bzgl. des biochemisch-rezidivfreien Überlebens (van der Kwast et al., 2007), sodass sie eine alternativ zu einer Salvagestrahlentherapie als perkutane Bestrahlung erst bei

PSA-Anstieg erfolgen kann. Beide Methoden bieten Vorteile bzgl. des metastasenfrenen Überlebens und des Gesamtüberlebens verglichen mit einer watch&wait-Strategie, bergen jedoch das Risiko einer Übertherapie sowie einer erhöhten Toxizität.

Ein biochemisches Rezidiv im Sinne eines erneuten PSA-Anstiegs über Primärtherapie-abhängig definierte Werte erfordert eine Differenzierung zwischen einem lokalen bzw. systemischen Rezidiv in dem Fall, das eine Lokalrezidivtherapie zur Verfügung steht. Therapeutisch können eine Salvage-Prostatektomie nach bioptischer Sicherung bzw. perkutane Salvage-Strahlentherapie mit mindestens 66Gy mit oder ohne Bestrahlung der ableitenden Lymphbahnen oder eine Salvage-High-Intensity-Ultrasound-Therapie (HIFU) in Abhängigkeit der Primärtherapie und unter Berücksichtigung eventuell bestehender individueller Indikationen für ein palliativ orientiertes Therapiekonzept sowie auch das Konzept des „watchful waiting“ diskutiert werden.

1.1.6 Nachsorge

Nach kurativer Therapie kann eine fachspezifische Rehabilitation mit dem Ziel der Behandlung und dem Training im Umgang mit therapieinduzierten Funktionsstörungen, der Verbesserung der Leistungsfähigkeit und der Befähigung zu gesellschaftlicher und beruflicher Wiedereingliederung mittels multimodaler, interdisziplinärer Ansätze indiziert sein.

Nach kurativ intendierter Therapie sollten regelmäßige Nachsorgeuntersuchungen mit Bestimmung des PSA-Wertes beginnend innerhalb der ersten drei Monate nach Therapieabschluss gemäß den aktuell geltenden Leitlinienempfehlungen erfolgen. Auch Patienten unter hormonablativer Therapie sollten zwei- bis viermal jährlich Verlaufskontrollen, mindestens umfassend Anamnese, körperliche Untersuchung und PSA-Bestimmung, unterzogen werden.

1.1.7 Prognose

Die relativen 5- und 10-Jahres-Überlebensraten beim Prostatakarzinom sind mit über 90% (Zentrum für Krebsregisterdaten/Robert-Koch-Institut, Daten 2014, Stand 12/2017) vergleichsweise hoch und die Wahrscheinlichkeit an einem Prostatakarzinom zu versterben liegt niedriger als das Risiko an begleitenden, z. B. kardiovaskulären Erkrankungen zu versterben.

Eine Prognoseeinschätzung erfolgt anhand von TNM-Klassifikation, Gleason-Score und chirurgischem Resektionsbefund (R1/R0). Die prätherapeutische Stadiendiagnostik wird postoperativ durch das pathologische Staging ersetzt, welches durch detailliertere Kenntnis des TNM-Stadiums eine bessere prognostische Einschätzung des Krankheitsverlaufes ermöglicht. Der allgemeine Nutzen immunhistochemischer, DNA-zytometrischer oder molekularbiologischer Marker außerhalb der Diagnosesicherung ist nicht bewiesen (Kristiansen, 2012).

Weitere relevante Prognosefaktoren sind die individuelle Morbidität, die Art der primären Therapie sowie das Therapieansprechen und ferner die Erfahrung des Operateurs bei Entscheidung für eine radikale Prostatektomie. Darüber hinaus wird die PSA-Velocity in dem Jahr vor Therapie als prädiktiver Wert beurteilt, ungünstig ist hier ein Anstieg von über 2 ng/ml (D'Amico et al., 2006).

Zur individuellen Prognoseeinschätzung können Nomogramme nach Kattan dienen, welche die Wahrscheinlichkeit eines progressionsfreien Überlebens nach einem definierten Zeitintervall anhand von PSA-Wert, Gleason-Score und klinischem Stadium unter Berücksichtigung der gewählten Therapieoption bestimmen (Kattan et al., 1998). Analog hierzu existieren weitere spezifische Nomogramme u. a. zur Prädiktion einer lymphogenen Metastasierung (Briganti et al., 2006). Für die gebräuchlichen Nomogramme konnte eine ähnlich hohe prädiktive Genauigkeit demonstriert werden (Cimino et al., 2017).

Für das lokal begrenzte Prostatakarzinom wird zur Einschätzung der biochemischen Progressionswahrscheinlichkeit die oben beschriebene Stratifizierung nach Risikogruppen nach D'Amico et al. genutzt, anhand derer sich das Risiko eines PSA-Progresses nach RPE mit 17% bei niedrigem Risiko, 54% bei mittlerem Risiko und 71% bei hohem Risiko bestimmen lässt, die prostatakarzinomspezifischen 10-Jahres-Mortalitäten nach RPE liegen bei 1%, 4% bzw. 11% im selben zeitlichen Intervall (D'Amico et al., 1998 und 2003).

Gemäß einer retrospektiven Studie nach Pound et al. war nach RPE bei 15% der behandelten Patienten ein biochemisches Rezidiv zu beobachten, von welchen etwa ein Drittel im Mittel im Verlauf von acht Jahren nach erneutem PSA-Anstieg eine Fernmetastasierung mit Exitus letalis etwa fünf Jahre später zeigte, sodass die berechnete Rate eines metastasenfreien Verlaufs nach 15 Jahren 82 % betrug (Pound et al., 1999).

Im Vergleich von active surveillance, radikaler Prostatektomie und Strahlentherapie als primäre Therapieoptionen bei lokal begrenztem Prostatakarzinom konnte für Patienten mit geringem und intermediärem Risikoprofil bei einem prostatakrebspezifischen Überleben von jeweils mindestens 98,8% nach 10 Jahren in allen drei Gruppen die Gleichwertigkeit hinsichtlich der Mortalität gezeigt werden, RPE und Strahlentherapie konnten jedoch das Risiko einer Metastasierung signifikant senken (ProtecT-Studie; Hamdy et al., 2016).

Die nicht unumstrittene PIVOT-Studie (RCT, 2012) konnte für die RPE gegenüber einer watchful waiting Strategie allerdings eine statistisch signifikante Reduktion der Mortalität (HR: 0,67; 95 % KI: 0,48 – 0,94) für Patienten mit geringem bis mittlerem Risiko diagnostizieren, zudem wurde nach RPE das Auftreten von Knochenmetastasen seltener beobachtet (Wilt et al., 2012).

Bill-Axelson et al. konnten zeigen, dass für die Gruppe an Patienten unter 65 Jahren durch die RPE die erkrankungsspezifische Mortalität, die Häufigkeit einer lokalen Tumorprogression und die Rate an Fernmetastasen gegenüber einer watchful waiting Strategie signifikant reduziert werden kann und auch bzgl. des Gesamtüberlebens ein Vorteil zugunsten der RPE besteht. (Bill-Axelson et al., 2011).

Eine Entnahme von mindestens zehn Lymphknoten im Rahmen der Lymphadenektomie konnte nach Joslyn et al. einen statistisch signifikanten Vorteil bzgl. des tumorspezifischen Überlebens, nicht jedoch des Gesamtüberlebens zeigen (Joslyn et al., 2006).

Die Anzahl der befallenen Lymphknoten hat prognostische Bedeutung bezüglich des krankheitsfreien und Gesamtüberlebens. So konnten Briganti et al. sowie Boorjian et al. bereits bei Befall mehr als eines Lymphknotens eine Prognoseverschlechterung belegen (Briganti et al., 2009; Boorjian et al., 2007).

Die Prävalenz einer lymphatischen Metastasierung steigt mit einem Gleason-Score >7 sowie Fortschreiten des lokalen Tumorbefundes (Abuzallouf et al., 2004). Ebenso korreliert die Wahrscheinlichkeit nodal positiver Befunde mit der Anzahl der entnommenen Lymphknoten im Rahmen der Lymphadenektomie (Briganti et al., 2006).

Bzgl. der Wertigkeit der Lymphadenektomie bei nachgewiesener lymphonodulärer Metastasierung konnten Fossati et al. 2017 in einer nicht-randomisierten, retrospektiven Studie keine sichere Empfehlung bzgl. des Vorgehens aufzeigen (Fossati et al., 2017). Ob eine Kuration in einer N1-Situation zu erzielen ist, konnte ebenso noch nicht hinreichend evaluiert werden. Hinweise hierauf bei Befall maximal eines Lymphknotens zeigen ältere Studienergebnisse von Bader sowie Catalona et al. (Bader et al., 2003; Catalona et al., 1988). Prognostische Relevanz gewinnt die histopathologische Aufarbeitung der Lymphadenektomiepräparate primär aufgrund der Entscheidung bzgl. einer adjuvanten Therapienotwendigkeit.

Bei nodal positiven Karzinomen kann nach RPE ohne adjuvante Therapie ein biochemisches Rezidiv in über 70% der Fälle innerhalb von fünf Jahren nachgewiesen werden, unter einem Viertel der Patienten überleben die ersten zehn Jahre nach Diagnosestellung. Durch eine alleinige Bestrahlung oder hormonablative Therapie lässt sich das 10-Jahres-Überleben auf 5-48% bzw. 15-45% steigern, bei Kombination der Therapiemodalitäten kann eine 10-Jahres-Überlebensrate über 65% und ein krankheitsfreies Überleben bis zu 80% erreicht werden (Swanson et al., 2006).

Auch Da Pozzo et al identifizierten in einer retrospektiven Studie die adjuvante Strahlentherapie als positiven Prädiktor (Da Pozzo et al., 2009).

Durch die adjuvante hormonablative Therapie über zwei Jahre in Kombination mit einer Strahlentherapie kann das krankheitsfreie und krankheitsspezifische Überleben, die biochemische Progression, das Auftreten von Lokalrezidiven und Fernmetastasen, nicht jedoch das Gesamtüberleben verbessert werden (RTOG 92-02 Studie, Horwitz et al., 2008). Auch die EORTC-Studie 22961 (Bolla et al., 2009) zeigte einen Überlebensvorteil der langfristigen hormonablativen Therapie.

Hinsichtlich des Gesamtüberlebens ist belegt, dass krankheitsfreies Überleben und Gesamtüberleben durch eine neoadjuvante hormonablative Therapie vor RPE nicht positiv beeinflusst werden können, die lokale Progression und der Nachweis positiver Lymphknoten können jedoch reduziert werden (Klotz et al., 2003).

1.2 Disseminierte Tumorzellen

1.2.1 Definition und Relevanz

Bereits 1869 formulierte der australische Pathologe Thomas Ashworth die Hypothese, dass vereinzelte im Blut nachweisbare Tumorzellen die Grundlage einer Metastasierung bildeten (Ashworth, 1869).

Heute als zirkulierende Tumorzellen („circulating tumor cells“, CTCs) bezeichnet, besitzen diese als aus dem Primärtumorzellverband oder dessen metastatischen Absiedlungen gelöste maligne Zellen die Fähigkeit zur systemischen hämatogenen oder lymphatischen Ausbreitung. Die Bezeichnung „disseminierte Tumorzellen“ (DTCs) oder auch Mikrometastasierung beschreibt hierbei bereits in Lymphknoten, Knochenmark oder andere sekundäre Organe abgesiedelte Zellen (Braun et al., 2005). Das Vorliegen von DTCs im Knochenmark kann bei 20-40% hinsichtlich einer ossären sowie viszeralen Metastasierung klinisch sowie histopathologisch unauffälligen Patienten (N0, M0) mit soliden Tumoren nachgewiesen werden und ist mit einer schlechteren Prognose durch eine konsekutiv apparente Metastasierung assoziiert. (Pantel et al., 2004).

Bzgl. des lokalisierten Prostatakarzinoms konnten Miyake et al. schon 2007 nachweisen, dass das Vorliegen von molekularbiologisch nachgewiesenen Tumorzellen in pelvinen Lymphknoten unabhängig von anderen prädiktiven Faktoren mit dem Auftreten eines biochemischen Rezidivs nach radikaler Prostatektomie korreliert (Miyake et al., 2007).

Auch Ferrari et al. konnten die prognostische Relevanz okkulter Lymphknotenmetastasen in pelvinen Lymphknoten mit zunehmendem Einfluss bei Ausgangs-PSA-Werten über 20 ng/ml einem Gleason-Score ≥ 8 , Stadium T3c sowie für Hochrisikogruppen belegen (Ferrari et al., 2006).

Bzgl. des Zeitpunkts der Dissemination gibt es Hinweise auf eine sehr frühe Abspaltung der disseminierenden Zellen und eine unabhängige metastatische Progression. In Untersuchungen bei früh-invasiven Brustkrebskarzinomen konnte eine nur geringe Ähnlichkeit zwischen den im Knochenmark detektierten DTCs und den Tumorzellen des Primarius gefunden werden, zudem wiesen diese Zellen kaum TP53-Mutationen auf, welche mit einer späteren Tumorentwicklung assoziiert sind (Pantel, et al., 2004).

Als Transportvehikel für Zellbestandteile sowie Teile von DNA, RNA oder Proteinen sind tumorspezifische Exosomen als sogenannte „prämetastatische Nische“ identifiziert worden, deren Ansiedelung u. a. anhand von Integrinen reguliert wird, und prädiktiv eine Metastasierung in bestimmte Organe anhand verschiedener Zellmarker auf der Oberfläche der Exosomen erkennen lassen (Hoshino et al., 2015).

Die Zellen sind nach Einwanderung in sekundäre Organe in der Lage in einem resistenten Zustand der Inaktivität langfristig zu verweilen, in welchem sie den therapeutischen Ansätzen der gängigen Chemotherapeutika gegenüber wenig bzw. nicht zugänglich sind. Der Zeitpunkt der Dissemination und die Vorgänge, welche den Zustand der sogenannten „tumor cell dormancy“ induzieren sind Gegenstand aktueller Forschung und noch nicht abschließend erklärt (Bragado et al., 2012; Kalluri et al., 2010). Die disseminierten Tumorzellen weisen eine hohe genetische Heterogenität auf, wobei die Befähigung zur Metastasierung im Sinne der klonalen Expansion erst nach Dissemination der Zellen determiniert zu werden scheint (Klein et al., 2002).

Auch die Ursachen der Reaktivierung als Impuls zur Metastasierung bedürfen weiterer Untersuchungen, es konnte aber gezeigt werden, dass eine Vaskularisierung des Tumors als obligater Wachstumsimpuls durch verschiedene Botenstoffe induziert werden kann (Kareva, 2016). Einer Forschungsgruppe der Universität Princeton gelang es anhand eines Tiermodells für Brustkrebs-Tumorzellen einen Einfluss

des vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) auf die Umwandlung einer indolenten Mikrometastase in eine aktive Metastasierung des Knochens nachzuweisen (Lu et al., 2011).

Weckermann et al. postulierten für das Prostatakarzinom die These, dass durch perioperative Stimuli eine Aktivierung der disseminierten Tumorzellen erfolge (Weckermann et al., 2009), da eine prognostische Bedeutung disseminierter zirkulierender Tumorzellen (ossär) bislang ausschließlich für deren Nachweis vor Primärtherapie aufgezeigt werden konnte. Weder eine Relevanz der gewählten primären Therapieform (operativ, Radiatio, Hormontherapie) noch ein Einfluss eines posttherapeutischen Nachweises disseminierter Tumorzellen im Knochenmark konnte als unabhängiger prognostischer Faktor identifiziert werden (Lilleby et al., 2013).

Die weitere Charakterisierung disseminierter Zellen verspricht einen Erkenntniszuwachs bezüglich der Abläufe einer Metastasierung u. a. in Bezug auf genomische Instabilität, tumor dormancy, Tumorzellheterogenitäten und das Konzept der epithelial-mesenchymalen Transition als Grundlage einer Metastasierung durch den Gewinn der Befähigung zur Invasion (Magbanua et al., 2015).

Folglich hat das Vorhandensein zirkulierender sowie disseminierter Tumorzellen prognostische Relevanz für die Wahrscheinlichkeit eines progressionsfreien Überlebens und kann bei der Entscheidung bzgl. der Notwendigkeit einer adjuvanten Therapie herangezogen werden. Zudem bietet es die Option therapeutischer Angriffspunkte über die Immunphänotypisierung dieser Zellen sowie ihre Nutzung als Biomarker bei Therapieauswahl und Beurteilung des Therapieansprechens/-verlaufs und in der posttherapeutischen Nachsorge.

Darüber hinaus kann ferner über die topographische Lagebestimmung der positiv getesteten Lymphknoten eine Aussage über die sinnhafte Ausweitung der Lymphadenektomie mit Relevanz für die gängige klinische Praxis getroffen werden.

1.2.2 Methoden der Detektion disseminierter Tumorzellen

Der Nachweis zirkulierender sowie disseminierter Tumorzellen erfolgt primär mittels immunzytochemischer oder molekularbiologischer Methoden; aufgrund ihrer niedrigen Dichte mit $1:10^6$ – 10^7 Zellen im Knochenmark ist häufig zunächst ein Anreicherungsschritt mittels Dichtegradientenzentrifugation und immunomagnetischer Separation über z. B. EPCAM oder CD45 vor Einsatz immunzytochemischer und immunfluoreszenter Assays erforderlich. Eine standardisierte Anwendung analog zum CellSearch® System zum Nachweis von CTCs existiert bislang nicht (Magbanua et al., 2015).

In der oben angeführten Studie von Miyake et al. konnte die Überlegenheit der RT-PCR bzgl. der Sensitivität der Detektion von Tumorzellen in regionalen Lymphknoten gegenüber der konventionellen Histopathologie sowie immunhistochemischen Aufarbeitung gezeigt werden. Mittels quantitativer RT-PCR wurde die Expression von KLK3 und PSMA in 2215 Lymphknoten von 120 Patienten mit Vorliegen eines klinisch lokalisierten Prostatakarzinoms untersucht und mit den Ergebnissen der konventionellen Histopathologie sowie der KLK3-spezifischen immunhistochemischen Färbung verglichen. Die molekularbiologische Untersuchung detektierte eine höhere Anzahl klinisch okkulten Lymphknotenmetastasen, deren Vorliegen signifikant mit einem späteren biochemischen Rezidiv

assoziiert war und als unabhängiger Risikofaktor hierfür determiniert werden konnte (Miyake et al., 2007).

Auch Shariat et al. konnten im Vergleich von Immunhistochemie und einer KLK2-spezifischen RT-PCR hinsichtlich der Detektion okkultester Metastasen in pathologisch unauffälligen Lymphknoten eine höhere Sensitivität der molekularbiologischen Methode aufzeigen. Die Gruppe führte an 1864 in Paraffin eingebetteten Lymphknoten von 199 Patienten mit nicht-metastasiertem Karzinom der Prostata (pT3 N0 M0) neben einer RT-PCR für KLK2 immunhistochemische Färbungen für KLK3, CK und in einer kleineren Subgruppe (164 Patienten) für KLK2 durch. Trotz höherer Spezifität bzgl. der Detektion klinisch relevanter Lymphknotenmetastasen durch die Immunhistochemie, war für die Ergebnisse der RT-PCR eine höhere Sensitivität mit der höchsten prognostischen Aussagekraft bzgl. Prostatakrebs-spezifischer Mortalität, späterer Metastasierung und biochemischem Rezidiv nach radikaler Prostatektomie aufzuzeigen (Shariat et al., 2003).

1.3 Serinproteasen der humanen Kallikreinfamilie als molekulare Marker

Der gebräuchlichste molekulare Marker für den Nachweis eines Prostatakarzinoms ist das Prostata-spezifische Antigen (PSA), welches sowohl als Screening-Verfahren als auch bei Risikostratifizierung/Staging sowie in der posttherapeutischen Verlaufsbeobachtung Bedeutung hat. PSA bzw. humanes Kallikrein 3 (hK3) ist eine Serinprotease der humanen Kallikreinfamilie und wird primär von den Paraurethraldrüsen der Prostata produziert, ist aber geschlechtsunabhängig auch in geringeren Konzentrationen in anderen Geweben nachweisbar, sodass es trotz hoher Sensitivität keinen primären Malignitätsnachweis erbringt. Es liegt in freier oder an Protease-Inhibitoren wie α 1-Antichymotrypsin oder α 2-Macroglobulin gebundener Form im Serum vor (Pentyala et al., 2016). Eine Erhöhung des Anteils des freien PSA bei Patienten mit einem Serum-PSA zwischen 4 und 10 ng/ml erhöht die Wahrscheinlichkeit einer BPH als Ursache der Elevation der Serumwerte im Vergleich zu einem Malignom (Catalona et al., 1995). Die Wahrscheinlichkeit der Malignom-bedingten Elevation der Serumkonzentration steigt hingegen mit abnehmendem Verhältnis von freiem – nicht proteingebundenem – Serum-PSA zum Gesamt-PSA, wobei die Erhöhung des Serum-PSA-Spiegels im Falle eines Prostatakarzinoms bedingt wird durch die hohe Zellularität bei fortlaufender Expression von PSA nach Entartung der Zellen. Über die erhaltene Expression des Antigens wird auch die Detektion metastasierter Zellen anhand des Markers möglich.

PSA spielt zudem eine Rolle in der Aktivierung von Wachstumsfaktoren (VEGF-C, VEGF-D) der Tumorigenese und lymphatischen Metastasierung (Jha et al., 2019).

Alle Kallikreine zeichnen sich als Serin-Proteasen durch eine katalytische Triade aus Histidin, Asparaginsäure und Serin im aktiven Zentrum der Enzyme aus; über die kovalente Bindung eines Substrats katalysieren sie die Spaltung von Peptidbindungen zwischen der Carboxygruppe einer Aminosäure und der Aminogruppe des α -Kohlenstoffatoms (α -C-Atom) einer zweiten Aminosäure unter Nutzung von Wasser (Hydrolyse). Beim Menschen sind zwei Klassen von Kallikreinen bekannt, das Plasma-Kallikrein mit seiner Rolle in der plasmatischen Gerinnungskaskade sowie die Gewebs-Kallikreine, eine strukturell verwandte Gruppe an Serinproteasen mit Ähnlichkeiten in Bezug auf Gen- und Proteinstruktur bei Co-Lokalisation im selben Chromosomenloкус 19q13.4. Sie werden als

Propeptide mit einem Signalpeptid gefolgt von einem kurzen Aktivierungspeptid am aminoterminalen Ende synthetisiert (Diamandis et al., 2002); ihre Expression ist mit steigender Sensitivität der Nachweismethodik in diversen, v. a. endokrin aktiven Geweben nachgewiesen worden.

1.3.1 Humanes Kallikrein 2

Das humane Kallikrein 2 als Produkt des KLK2-Gens besteht aus 237 Aminosäuren und besitzt eine zu 80% zu KLK3 identische Primärstruktur (Young et al., 1992). Seine physiologische Funktion besteht in der Spaltung von u. a. Seminogelin I und II im Seminalplasma mit jedoch geringerer Effizienz als PSA (Gressner et al., 2019). Es wird ebenso wie PSA nach Induktion durch Androgene über eine enzymatische Kaskade aus seiner Prä-/Pro-Peptidvorläuferform in den Paraurethralzellen der Prostata synthetisiert und kann im Serum in freier oder gebundener Form vorliegen, im prostatistischen Gewebe findet sich KLK2- mRNA in einer Höhe von 10-60% der KLK3-mRNA Konzentration, im Serum von etwa 0-10% (Potter et al., 2000). Auch humanes Kallikrein 2 besitzt eine hohe Spezifität für die Prostata, ist aber ebenso in geringeren Konzentrationen in anderen Drüsengeweben zu detektieren (Ulmert et al., 2009). Es verfügt über eine starke Trypsin-ähnliche enzymatische Aktivität, während PSA im Vergleich hierzu eine deutlich schwächere Chymotrypsin-ähnliche Wirksamkeit hat. Humanes Kallikrein 2 bewirkt in vivo die Umwandlung von proPSA zu PSA und reguliert somit dessen Aktivität (Kumar et al., 1997). Mehr noch als PSA ist humanes Kallikrein 2 mit Malignomen der Prostata verbunden, da seine Sekretion mit abnehmender Tumordifferenzierung zunimmt (Rittenhouse, et al., 1998), so wurde es auch in der Prostatakrebs Zell-Linie LNCaP nachgewiesen (Grauer et al., 1996).

Während das Vorliegen eines mäßig erhöhten PSA-Levels im Serum bei hohem Anteil ungebundenen PSAs eine ursächliche BPH wahrscheinlich macht, deutet ein Anstieg des humanen Kallikreins 2 (hK2/PSA-Ratio $>0,18$) bei erniedrigtem freien PSA ($<25\%$) auf das Vorliegen eines Prostatakarzinoms hin (Partin et al., 1999). Haese et al. konnten in einer Studie mittels Vergleich der Höhe der Serumwerte von humanem Kallikrein 2 und 3 vor radikaler Prostatektomie bei gleicher Spezifität eine mit 37% zu 14% höhere Sensitivität des humanen Kallikreins 2 für das Vorliegen eines lokalisierten Karzinoms gegenüber der Bestimmung des Gesamt-PSA belegen (Haese et al., 2000). Im Vergleich mit PSA als singulärem molekularem Marker scheint humanes Kallikrein 2 bzw. dessen Ratio zu freiem PSA eine Verbesserung der Spezifität im Rahmen der Screeninguntersuchungen zu erlauben (Bachour et al.; 2015). Auch bei Kombination von PSA, humanem Kallikrein 2 und PCA3 als Serummarker konnte eine Steigerung der Vorhersagewahrscheinlichkeit eines Prostatakarzinoms gezeigt werden (Mao et al., 2018).

Der Nachweis von KLK2-mRNA mittels RT-PCR konnte in früheren Studien bereits das Vorliegen einer lymphatischen Mikrometastasierung bei postoperativ nodal negativ eingestufteten Patienten zeigen, eine signifikante Beziehung zwischen einem lymphonodulären KLK2-Nachweis und einem Krankheitsprogress sowie der Entwicklung einer Metastasierung und einer konsekutiv reduzierten Überlebenswahrscheinlichkeit für Patienten mit lokal fortgeschrittenen, nicht metastasierten Tumoren nach radikaler Prostatektomie (pT3 N0) wurde durch Shariat et al. belegt. Des weiteren konnte gezeigt werden, dass der Nachweis von KLK2 ein negativer Prädiktor bzgl. des Ansprechens auf eine Salvage Radiotherapie zu sein scheint (Shariat et al., 2003).

1.4 Fragestellung

Inhalt der vorliegenden Arbeit war der Nachweis von humanem Kallikrein 2 in regionalen Lymphknoten bei Vorliegen eines lokal begrenzten Prostatakarzinoms vor dem Hintergrund der Frage nach Einsatzfähigkeit von humanem Kallikrein 2 als diagnostischem molekularbiologischen Marker.

Hierzu wurde die Expression von KLK2 in regionalen Lymphknoten von Prostatakarzinompatienten mittels RT-PCR im Vergleich zu KLK3 untersucht und die Sensitivität des Nachweises mit klassischen histopathologischen Methoden der Detektion verglichen.

Eine Verbesserung der Diagnostik durch Anwendung von KLK2 als eigenständigem oder kombiniertem molekularem Marker sowie die Nutzung molekularbiologischer Methoden zur frühen Detektion einer noch klinisch inapparenten lymphogenen Metastasierung könnte eine angepasste Risikogruppenzuordnung und konsekutiv frühere Identifikation von Patienten, welche von einer adjuvanten Therapie profitieren, ermöglichen und so zu einer Verbesserung der Prognose führen.

Zudem erlaubt die Auswertung der topographischen Lage der positiv getesteten Lymphknoten im untersuchten Patientenkollektiv mit primärtherapeutischer radikaler Prostatektomie und ausgedehnter Lymphadenektomie unter Einbeziehung der anatomischen Regionen der Fossae obturatoriae, Aa. iliacaе externaе und internaе sowie der Aa. iliacaе communes eine Aussage bezüglich der erforderlichen Ausweitung der Lymphadenektomie im Rahmen der Prostatektomie bei in der Literatur differierenden Empfehlungen bzgl. des erforderlichen Resektionsausmaßes.

2. Material und Methoden

2.1 Studienprotokoll und Patientenselektion

In die Studie eingeschlossen wurden Patienten mit einem lokal resektablen, bioptisch gesicherten Prostatakarzinom, welche klinisch keine Zeichen einer ossären oder viszeralen Metastasierung aufwiesen und im Vorfeld noch keiner anderweitigen Therapie mit Einfluss auf das Gewebe des Operationsgebiets zugeführt worden waren.

Die Erfüllung der folgenden Kriterien musste zum Einschluss in die Studie gewährleistet sein:

- Stanzbioptisch gesichertes Adenokarzinom der Prostata mit Vorhandensein von Mittleren oder Hochrisikofaktoren (Gleason Score ≥ 7 , PSA > 10 ng/ml, cT \geq T2b)
- Lokal operabler Tumor in der digital rektalen Untersuchung (DRU) bzw. im transrektalen Ultraschall (TRUS)
- Negatives Knochenszintigramm (obligat bei PSA > 20 ng/ml, Biopsie mit Gleason Score 8-10)
- Allgemeinzustand nach Karnofsky $\geq 80\%$
- Alter 18 – 75 Jahre
- Schriftliches Einverständnis des Patienten
- Ausreichende hämatologische, gerinnungsphysiologische und renale Funktionen
- Compliance des Patienten und geographische Nähe für adäquate Tumornachsorge

Als Ausschlusskriterien waren folgende Merkmale bestimmt:

- Manifestes Zweitkarzinom
- Histologisch oder durch Bildgebung gesicherte Organmetastasierung
- Myokardinfarkt oder Apoplex innerhalb der letzten 6 Monate
- Bestehende schwere kardiovaskuläre (Grad III-IV gemäß NYHA), pulmonale ($pO_2 < 60$ mmHg), renale, hepatische oder hämatopoetische Erkrankungen
- Schwere aktive oder chronische Infektionen
- Schwere psychiatrische Erkrankungen
- Präoperative antiandrogene Therapie, Chemotherapie oder pelvine Strahlentherapie
- Personen, die auf gerichtliche oder behördliche Anordnung in einer Anstalt untergebracht sind
- Personen, die in einem Abhängigkeits- oder Arbeitsverhältnis zum Sponsor oder Prüfer stehen

Eine Risikostratifizierung erfolgt anhand der Kriterien PSA, Gleason Score und cTNM-Klassifikation wie in Tabelle 3 dargestellt. Eingeschlossen wurden Patienten mit intermediärem oder hohem Risiko.

	Niedrigrisiko	intermediäres Risiko	Hochrisiko
cT-Kategorie (UICC)	cT1c/cT2a	cT2b	\geq cT2c ^{1/3}
Gleason-Score	≤ 6	7	≥ 8
PSA	≤ 10 ng/ml	> 10 und ≤ 20 ng/ml	>20 ng/ml

Tabelle 3: Präoperative Risikostratifizierung anhand PSA, Gleason Score und cT-Kategorie (D'Amico et al., 1998)

¹ Je nach Quelle (EAU, ESMO) Zuordnung des Stadiums cT2c zur mittleren oder hohen Risikogruppe

2.2 Zellkulturen

Als Kalibratoren der Gewebeproben, d. h. Proben zur Eichung der gemessenen Werte der Lymphknotenproben, wurden LnCAP-Zellen in Zellkulturen kultiviert, mittels derer zum Einen in Verdünnungsreihen die Sensitivität des PCR-Ansatzes definiert werden konnte und welche des Weiteren als Positivkontrollen der quantitativen Reversen Transkriptase Polymerasekettenreaktion Nutzung fanden. LnCAP-Zellen sind Androgen-sensitive humane adenokarzinomatöse Prostatazellen, welche sowohl in Zellverbänden als auch vereinzelt wachsen können und unter experimentellen Bedingungen das Verhalten der Tumorzellen im Menschen nachahmen.

2.2.1 Materialien

2.2.1.1 Reagenzien

RPMI 1640 Medium mit Phenolrot	Biochrom AGTM
Antibiotikagemisch: 1000U Penicillin + 10mg Streptomycin	
Nicht essentielle Aminosäuren	
Fötale Kälberserum	Biochrom AGTM
Dulbecco's PBS/5mM EDTA	Biochrom AGTM
Lysepuffer, mirVana TM miRNA isolation kit	Ambion [®]
Trypsin/EDTA Solution: 0,5 g/l EDTA in PBS (ohne Calcium/Magnesium)	

2.2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Zellkulturschalen 100x200 mm	BD Falcon TM
Sterile Einwegpipetten Cellstar [®] 1 ml, 5 ml, 10 ml	Greiner Bio One
Zentrifugenröhrchen Cellstar [®] Tubes 15 ml	Greiner Bio One
Zellschaber Costar [®]	Corning Incorporated
Reaktionsgefäße (Tube) 1,5 ml	Eppendorf AG
Handschuhe Senso Skin	Medika Medizintechnik GmbH
Pipettenspitzen 1250 µl	Biozym
Neubauer Zählkammer Tiefe 0,1 mm	Superior Marienfeld

2.2.1.3 Gerätschaften

Bench: HERA safe	Thermo Electron Cooperation
Absauger	Schütt Labortechnik
Wasserbad	Memmert GmbH & Co. KG
Zentrifuge Rotina 35R	HettichLab
Inkubator HERA Cell 240	Thermo Electron Cooperation
Mikroskop Axiovert 135	Zeiss

2.2.2 Methodik

2.2.2.1 Kultivierung der Zelllinie

Die LnCAP-Zellen wurden in RPMI 1640 Zellkulturmedium mit nichtessentiellen Aminosäuren und einem Penicillin- und Streptomycingemisch ergänzt durch 10% fötales Kälberserum in einer Umgebung

bei 37°C und 5% atmosphärischem CO₂ kultiviert. RPMI 1640 nutzt ein Hydrogencarbonatpuffersystem, welches unter diesen Bedingungen einen physiologischen pH erhält.

Bei adäquatem Wachstum der Zellen in der Kulturschale in der mikroskopischen Beurteilung wurden diese nach vorsichtigem Absaugen des Zellkulturmediums RPMI 1640 mittels Hinzugabe von 10 ml DPBS und EDTA als Chelatkomplexbildner gespült. Die phosphatgepufferte Salzlösung DPBS hat einen pH-Wert von 7,4 und einen dem menschlichen Organismus entsprechenden osmotischen Druck, sodass keine Zellschädigung induziert wird; sie wird im Anschluss umgehend wieder entfernt. Den Zellen wurde sodann 2,5 ml Trypsin-/EDTA-Lösung zugefügt, das Trypsin spaltet innerhalb der kurzen Einwirkzeit extrazelluläre Proteine und löst adhärente Zellen vom Boden der Kulturschale. Nach mindestens 5 min Inkubationszeit bei 37°C unter 5% CO₂-Gehalt der Atmosphäre, während derer sich die zusammengelagerten Zellen isolieren, konnten nach positiver mikroskopischer Kontrolle der Zellvereinzelnung erneut 7,5 ml Nährmedium addiert werden. Die in insgesamt 10ml Trypsin-/EDTA-Lösung und RPMI 1640 suspendierten Zellen wurden gemischt - das enthaltende Trypsin wird hierbei durch das fötale Kälberserum des Zellkulturmediums RPMI 1640 abgestoppt - und in ein 10ml Zentrifugenröhrchen überführt, welches bei Raumtemperatur für 5 min bei 250g relativer Zentrifugalkraft zentrifugiert wurde. Die Zellen sind nun in einem Pellet am Boden gesammelt; der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet erneut in 10 ml RPMI 1640 suspendiert. Die Zellsuspension wurde auf zwei Zellkulturschalen mit jeweils weiteren 5ml Nährmedium aufgeteilt und abermals inkubiert.

Eine Bestimmung der Zellmenge konnte vor der Aufteilung in neue Zellkulturschalen mittels Auszählung in der Neubauer Zählkammer erfolgen. Hierzu wurden 20 µl der in RPMI 1640 suspendierten Zellen mit 20 µl Trypanblau gemischt und in die 4-Felder-Kammer eingebracht; unter Korrektur des Verdünnungsfaktors des Trypanblaus und Berücksichtigung des Volumens konnte über die mittlere Zellzahl aus vier Feldern die in den initialen 10ml Zell-RPMI-Suspension enthaltende Zellzahl bestimmt werden. Ein entsprechendes Volumen mit 10⁶ gelösten Zellen wird auf zwei 2 ml Eppendorfgefäße aufgeteilt, bei 20°C für 5min abzentrifugiert und nach Entfernung des Überstands in 500 µl Lysepuffer resuspendiert. Eine Lagerung bei -80°C war möglich.

2.2.2.2 Lyse der Kulturzellen

Vor der weiteren Verwendung der Zellen bzw. derer Zellkernbestandteile in den folgenden Schritten mussten diese zunächst lysiert werden. Hierzu wurde den Zellen nach Abpipettieren des Nährmediums und Beseitigung etwaiger Rückstände durch Waschen mit PBS-/EDTA-Lösung 600 µl Lysepuffer aus dem mirVana Kit hinzugefügt und eine mechanische Ablösung der Zellen vom Boden der Kulturplatte mittels Zellschaber vorgenommen. Die Zellsuspension wurde mehrfach durchmischt und in 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen überführt; im Anschluss konnte das Zellysat bei – 20°C aufbewahrt werden.

2.3 Gewebeproben

2.3.1 Gewinnung der PBMC aus peripher venösem Blut

Die Sensitivitätsprüfung der ausgewählten Gen-Marker erfolgte durch qRT-PCR-Nachweis ihrer Expression in LnCAP-Zell-Verdünnungsreihen, für welche LnCAP-Zellen in absteigender Konzentration in je 10⁶ PBMC gelöst wurden. Zudem wurde ein Ansatz von 10 LnCAP-Zellen pro 10⁶ PBMC

als Kalibrator-Probe in der Auswertung der PCR-Ergebnisse verwendet. Hierzu mussten die mononukleären Zellen aus dem Vollblut gesunder Probanden isoliert werden.

2.3.1.1 Reagenzien

Biocoll separating solution (Ficoll)	Biochrom AG
PBS	Biochrom AG
Türksche Lösung	Fluka Analytical
mirVana™ miRNA Lysepuffer	Ambion®

2.3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Einmalpipetten 10 ml	Greiner bio-one
Pipettenspitzen 1000, 100, 10 µl	Biozym
Sterile Reaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf AG
Falconröhrchen 50 ml	Greiner bio-one
Neubauer Zählkammer Tiefe 0,1 mm	Superior Marienfeld
Deckgläser	

2.3.1.3 Gerätschaften

Mikroskop Axiovert 135	Zeiss
Zentrifuge Eppendorf 5810 R	Eppendorf AG
Zentrifuge Eppendorf 5415 R	Eppendorf AG

2.3.1.4 Methodik der PBMC-Isolation

Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) können mittels Zentrifugation durch ein hydrophiles Kolloid wie z. B. das Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer „Ficoll“ isoliert werden.

Bei der sogenannten Dichtegradientenzentrifugation erfolgt die Sortierung der Bestandteile des peripheren Blutes unter dem Einfluss der Zentrifugalkraft entlang eines Konzentrationsgefälles bzw. entsprechend ihrer Sedimentationsrate (rate-zonal centrifugation).

Zur Isolation der PBMC wurden hierzu 10 ml Vollblut eines gesunden Spenders mit 15 ml PBS-Puffer vermischt und mit 20 ml Ficoll-Lösung bedeckt; durch Zentrifugation mit 800 g über 20 min bei 25°C erfolgte die Trennung in eine obere plasmatische Schicht und eine untere Schicht aus Erythrozyten in Ficoll-Lösung, zwischen denen sich die PBMC in einer Interphase absetzten. Nach Isolation und Vermengung dieser Interphase mit 45 ml PBS-Puffer konnte nach Zentrifugation des Gemisches mit 500 g über 10 min das entstandene Zellpellet in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und erneut in einem Milliliter PBS suspendiert werden.

Die Anzahl von PBMC aus 10 ml Vollblut konnte nun mittels Auszählung in der Neubauer-Zählkammer erfolgen, wozu 10 µl der in einem Milliliter suspendierten PBMC mit 90 µl Türkischer Lösung zur Hämolyse zurückgebliebener Erythrozyten und Verbesserung der Zählbarkeit der Leukozyten durch Anfärbung derer Kerne vermischt und in die Zählkammer eingebracht wurden. Bei 100facher Vergrößerung wurden diese nach entsprechendem Standard ausgezählt und die mittlere Zellzahl der Vollblut-Probe über den Verdünnungsfaktor der eingebrachten Lösung berechnet. Das entsprechende

Volumen der PBS-PBMC-Suspension, in welchem 10^6 Zellen enthalten waren, wurde anschließend bei 500 g und 4°C für 10 min erneut zentrifugiert, das isolierte Zellpellet dann in 600 µl Lysepuffer resuspendiert und entsprechend lysiert.

Für die Zellverdünnungsreihen konnten diese Lysate mit der entsprechenden Anzahl an LnCAP-Zellen versetzt werden, eine Lagerung der Proben konnte bei -20°C erfolgen.

2.3.2 Gewinnung der lymphonodulären Proben

Alle Patienten der Studie wurden einer offenen radikalen Prostatektomie mit ausgedehnter Lymphadenektomie unterzogen, welche durch einen Kreis von vier erfahrenen Operateuren aus der Urologischen Klinik des Klinikums Rechts der Isar in München durchgeführt wurde. Diese umfasst die Gebiete der Aa./Vv. iliaca externa und Fossae obturatoriae sowie – entgegen der eingeschränkten Lymphadenopathie – zudem die Regionen der Aa./Vv. iliaca interna und Aa./Vv. iliaca communis; Abbildung 1 stellt die Resektionsfelder schematisch dar.

Anatomische Grenzen stellten hierbei die Aortenbifurkation nach kranial, die Harnleiter nach lateral sowie distal der Canalis inguinalis dar. Durch die sukzessive Präparation der Lymphknotenstationen war die regionale Zuordnung jeden entnommenen Lymphknoten zu sichern.

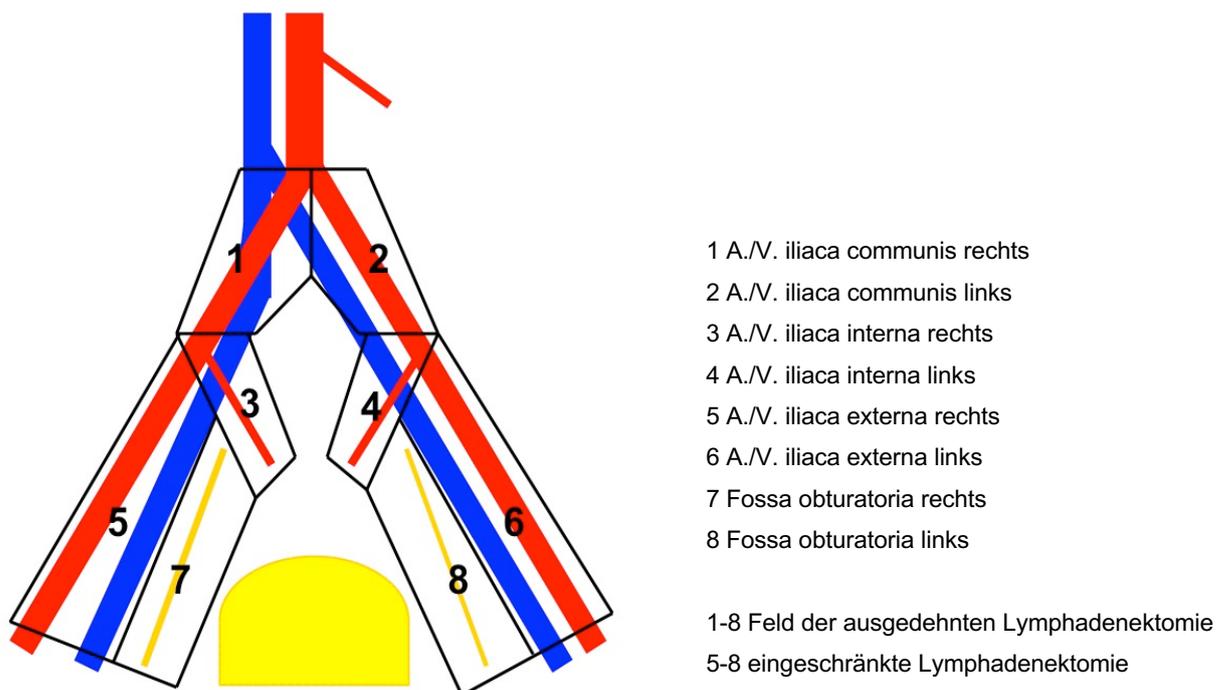


Abbildung 1: Resektionsfelder der Lymphadenektomie

2.3.2.1 Reagenzien

Flüssigstickstoff

Formalin

Fixierlösung

Farben (rot, gelb, blau, grün)

Hausinterne Apotheke

2.3.2.2 Verbrauchsmaterialien

Handschuhe SensoSkin	Medika Medizintechnik GmbH
Einwegskalpell Nr. 21	Feather®
Einmal Pinzetten – steril	servoprax® GmbH
Klebetuch Raucodrape® 75cmx75cm	Lohmann & Rauscher GmbH und Co. KG
Sterilisierte Aluminiumfolie	
Patientenetiketten	
Mullfix	
Pathologieröhrchen	

2.3.2.3 Gerätschaften

Stickstoffbehälter
Styroporbox mit Eis

2.3.2.4 Methodik der Lymphknotengewinnung

Unverzüglich nach der regional separierten Entnahme der Lymphknoten im Rahmen der Radikalen Prostatektomie erfolgte unter sterilen Bedingungen die Präparation des Gewebes parallel zur fortlaufenden Operation. Es wurde ein ca. 40%iger Anteil eines jeden Lymphknotens nach Entfernung der nicht-lymphatischen, anhaftenden Gewebeteile zur späteren molekularen Aufarbeitung in sterilisierte Aluminiumfolie verpackt und zur Integritätswahrung der RNA durch unverzügliche Kryokonservierung in flüssigem Stickstoff bei -80°C schockgefroren; die zeitliche Latenz zwischen Entnahme und Gefrieren ist mit etwa 10 min, während derer die Proben auf Eis gelagert wurden, zu beziffern. Jedes Lymphknotenpräparat wurde in drei Teile unterteilt, wobei die beiden lateralen Anteile mit etwa 10% bzw. 50% des Gewebevolumentes der histologischen Aufarbeitung, die medialen annähernd 40% des Präparats der molekularbiologischen Beurteilung unterzogen werden sollten. Der größere Teil der aufzuarbeitenden Lymphknoten, entsprechend annähernd 60% des Gewebevolumentes, sowie das der definierten Region entnommene umgebende Restgewebe wurde in Formalin fixiert der Pathologischen Klinik des Klinikums Rechts der Isar zur konventionellen histopathologischen Aufarbeitung zugeführt. Es wurde hierbei sorgfältig auf eine korrekte Katalogisierung der Gewebeproben geachtet, um eine exakte regionale Zuordnung gewährleisten zu können.

Lymphome von über 20 mm wurden vor der entsprechenden Präparation zunächst halbiert und dementsprechend als Teilpräparat gekennzeichnet. Lymphknoten mit einem sehr geringen Gesamtvolumen hingegen wurden zu 50%igen Anteilen der histopathologischen bzw. molekularbiologischen Aufarbeitung zugeteilt. Nicht der molekularbiologischen Untersuchung zugänglich gemacht werden, konnten Proben von unter drei Millimetern Durchmesser, welche ausschließlich histopathologisch analysiert wurden. Ergebnis der histopathologischen Aufarbeitung war die Klassifikation eines jeden entnommenen Lymphknotens entsprechend der N-Kategorie der TNM-Klassifikation nach UICC, folglich „N0“ bei fehlendem Nachweis von Tumorzellen bzw. „N1“ bei positivem Befund.

Die Verwahrung der der molekularbiologischen Aufarbeitung zugeordneten Proben erfolgte bis zum Zeitpunkt der Weiterverarbeitung in bestehender steriler Umhüllung bei -80°Celsius.

2.3.3 RNA-Extraktion

2.3.3.1 Aufbereitung der Lymphknotenpräparate

Das Gesamtprotokoll für die Extraktion der RNA aus den vorliegenden Gewebeproben war im Urologischen Forschungslabor des Klinikums Rechts der Isar bereits als Methode etabliert. Es handelt sich hierbei um die Guanidium-Thiocyanat-Phenol-Chloroform-Methode, welche sich aus den Schritten der Chloroform-Fällung und anschließender Isopropanol-Präzipitation zusammensetzt (Retz et al., 2004).

Hierbei wird den Gewebeproben nach Versetzung mit Lysepuffer zur Denaturierung der Proteinstrukturen Acid-Phenol-Chloroform (APC) zugegeben. Die Vermengung von Phenol und Wasser bzw. der wässrigen Lösung, in welcher die lysierten Zellbestandteile enthalten sind, führt zu einer Verteilung winziger Phenoltropfen innerhalb dieser Lösung, in welche die durch die veränderte Löslichkeit der Umgebung denaturierten Proteine des Gewebes aufgrund ihrer nun schlechteren Wasserlöslichkeit diffundieren, sodass eine Trennung gegenüber der polaren und somit deutlich besser wasserlöslichen DNA/RNA erfolgt. Durch das saure Milieu des Gemisches wird zudem die negative Ladung der DNA neutralisiert, während die RNA über eine stickstoffhaltige Base Wasserstoffbrückenverbindungen aufbauen kann, sodass diese letztlich in der wässrigen Phase verbleibt, während die DNA analog zu den denaturierten Proteinbestandteilen in die organische Phase übertritt. Chloroform verstärkt durch seine hydrophobe Grundstruktur diesen Effekt durch eine stärkere Denaturierung der Proteine und Erhöhung des Anteils reiner RNA in der wässrigen Phase. Es reduziert auch die Bildung unlöslicher RNA-Protein-Komplexe, welche sich in der mittleren, sogenannten Interphase ablagern. Das beigefügte Guanidium inaktiviert sich noch in Lösung befindliche Nucleasen. Durch Zentrifugation der Probe markiert die erzeugte Phasentrennung eine visuelle Auftrennung der Bestandteile mit in wässriger Lösung enthaltender RNA als Überstand, dem dichteren Chloroform mit Proteinen am Boden und der dazwischen liegenden Interphase, in welcher primär die präzipitierten Anteile inklusive der DNA des Gewebes zu finden sind. Die RNA der wässrigen oberen Phase kann nun isoliert abpipettiert und weiteren Untersuchungen zugeführt werden.

2.3.3.1.1 Reagenzien

Trockeneis	Hausinterne Apotheke
Flüssigstickstoff	Hausinterne Apotheke
RNA-Later Solution	Ambion®
mirVana™ miRNA Isolation Kit, Lysepuffer	Ambion®

2.3.3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Fast-Prep® Reaktionsgefäße, 2 ml	MP Biomedicals
Fast-Prep® Deckel, 2 ml	MP Biomedicals
Eppendorf-Reaktionsgefäße, 1,5 ml, nucleasfrei	SLG® Süd Laborbedarf GmbH
5 ml und 10 ml Röhrchen RNase frei	
0,5 ml Reaktionsgefäße	VWR
Safe Seal Tips professional, 1250 µl	Biozym®
5 ml Pipettenspitzen	Ritter

Kugeln Ceramic Sphere 1/4"	MP Biomedicals
Garnet Matrix A Bulk (Sand)	MP Biomedicals
Einweg-Pinzetten	servoprax® GmbH
Handschuhe SensoSkin	Medika Medizintechnik GmbH
Einwegskalpell Nr. 21	Feather®
OP Haube Sentinex® Trend	Lohmann&Rauscher Int. GmbH&Co. KG
Mundschutz Sentinex® Lite EL	Lohmann&Rauscher Int. GmbH&Co. KG
Rotilabo®-Wägeschälchen, 20 ml	Carl Roth GmbH + Co. KG

2.3.3.1.3 Gerätschaften

FastPrep®-24h Tissue and Cell Homogenizer	MP Biomedicals Eschwege, Hessen
CoolPrep™ Sample Holder, 24x2 ml	MP Biomedicals Eschwege, Hessen
Zentrifuge 5415R	Eppendorf
Pipettierhilfe	Eppendorf
1000 µl Pipette	Eppendorf
Waage AT250	Mettler
Lange Metallpinzette	
Dewar-Gefäß für Flüssigstickstoff	

2.3.3.1.4 Methodik der Zelllyse

Nach gründlicher Desinfektion des Arbeitsplatzes und Reinigung der zu verwendenden Geräte werden die Gewebeproben unter Berücksichtigung persönlicher Schutzmaßnahmen zum Zwecke des Transports aus ihrem Aufbewahrungsort bei -80° Celsius in ein mit flüssigem Stickstoff gefülltes Dewar-Gefäß überführt. Um ein vorzeitiges Auftauen sicher zu vermeiden, da infolge des Auftauprozesses Eiskristalle innere und äußere Kompartimente der Zellen beschädigen und RNAsen freisetzen würden, wird die Entfernung der schützenden sterilen Aluminiumfolie zügig auf Eis durchgeführt, bevor jeder Lymphknoten mit Hilfe einer sterilen Pinzette in ein vorbereitetes, mit 500 µl RNA-Later gefülltes 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt wird. Die RNA-Later Lösung erlaubt eine weitere Verarbeitung der Proben unter Raumluftbedingungen, indem es nach Eindringen in das lymphatische Gewebe zu einer raschen Inaktivierung der vorhandenen RNA-degradierenden Enzyme mit Stabilisation der RNA führt. Hierdurch werden sowohl Temperatur- als auch Zeit-Abhängigkeit der weiteren Analyseschritte deeskaliert. Um eine sichere Permeation der Proben gewährleisten zu können, sollten die Proben einen maximalen unidirektionalen Durchmesser von 5 mm nicht überschreiten und das Verhältnis von Probe zu Lösung 1:5 betragen, größere Gewebeproben wurden daher zunächst in 5 ml Eppendorfgefäße mit 1000 µl RNA-Later Lösung überführt; eine risikofreie Weiterverarbeitung war nach 10 min Submersionszeit gesichert. Durch Rückrechnung des bekannten Gewichts des Aufbewahrungsgefäßes kann das genaue Gewicht eines jeden entnommenen Gewebestücks ermittelt werden, sodass nach der zehnminütigen Auftauzeit eine Zerteilung der Proben in die erforderliche Anzahl maximal 100 mg großer Anteile mittels Stichskalpell erfolgte. Jede dieser bis zu 100 mg schweren lymphatischen Gewebeproben wird unter sterilen Bedingungen zur mechanischen Zerkleinerung in jeweils ein 2ml FastPrep-Tube gefüllt mit

1000µl Lysepuffer - zur Zersetzung der Gewebeprobe mit Freisetzung der Proteine des Zellkerns unter Stabilisation der RNA durch Denaturierung der RNAsen - und einer Ceramic Sphere Kugel, verlagert. Positioniert im CoolPrep™ Sample Holder werden die so befüllten Tubes in zwei Durchgängen unter Kühlung durch Trockeneis bei 6,5m/s für je 40 Sekunden im FastPrep®-24h Tissue and Cell Homogenizer bewegt, bevor jedem FastPrep-Tube ca. 200mg Sand Garnet Matrix zugeführt wird und erneut unter Betrachtung der Homogenität der Masse zwei bis drei Zyklen im FastPrep®-24h Tissue and Cell Homogenizer folgen. Nach Erreichen einer feinkörnigen Konsistenz wird die Masse unter Entfernen der Ceramic Sphere Kugel in ein 2ml Eppendorf-Reaktionsgefäß umgefüllt und 60 Sekunden lang bei 1000g zentrifugiert, um den zugegebenen Sand von der RNA-enthaltenden flüssigen Phase zu trennen. Dieser Überstand wird behutsam in ein bis zwei 1,5ml Eppendorf-Röhrchen pipettiert (maximales Füllvolumen 500 µl) und bis zur weiteren Verarbeitung erneut bei -80° Celsius gelagert. Bei Gewebeproben, bei denen aufgrund ihrer Masse eine Teilung erforderlich geworden war, erfolgt vor Überführung in das endgültige Gefäß eine Zusammenführung und Durchmischung des Inhalts der zu einer einzelnen Gewebeprobe gehörigen Tubes, sowie eine erneute Aufteilung des homogenen Gemischs zur Lagerung. Die sorgfältige Beschriftung der verschiedenen Reaktionsgefäße ist hierbei unerlässlich.

Die Entsorgung der mit den Proben in Kontakt geratenen Verbrauchsmaterialien erfolgte unter Berücksichtigung der Infektiosität.

2.3.3.2 Organische Extraktion

Die weiteren Verarbeitungsschritte wurden sowohl für die Lymphknotenlysate als auch für die lysierten LnCAP-Zellen durchgeführt, exemplarisch wird dieser Prozess anhand der Aufarbeitung der lymphatischen Gewebeproben beschrieben.

2.3.3.2.1 Reagenzien

Aqua bidest. (nucleasefrei)	GIPCO Invitrogen
Eis	Eismaschine
Ethanol absolut	Merck KGaA
mirVana™ miRNA isolation kit	Ambion®
- Waschlösung 1	
- Waschlösung 2/3	
- miRNA Homogenate Additive	
- Acid-Phenol-Chloroform	

2.3.3.2.2 Verbrauchsmaterialien

1,5 ml Reaktionsgefäße	SLG® Süd Laborbedarf GmbH
1250 µl, 200 µl, 10 µl Filter Tips	Biozym
mirVana™ miRNA isolation kit	Ambion®
- Reaktionsgefäße	
- Filter	
Handschuhe SensoSkin	Medika Medizintechnik GmbH

2.3.3.2.3 Gerätschaften

Zentrifuge 5415R Eppendorf	Eppendorf, Germany, Hamburg
Pipetten 1000 µl, 200 µl, 10µl peqpette	Peqlab, Erlangen
Blockthermostat BT100	Kleinfeld
Tischzentrifuge Qik Spin	Süd-Laborbedarf GmbH
Vortex MS1 Minishaker	IKA®

2.3.3.2.4 Methodik der RNA-Extraktion

Die Lysatlösungen mit einem Einzelvolumen von je 500 µl, in welcher die zellulären Bestandteile der Lymphknotenzellen in RNAlater enthalten sind, werden auf Eis aufgetaut und mit 10% ihres Volumens an miRNA Homogenate Additive, welches eine Denaturierung der enthaltenen Proben bei zeitgleicher Stabilisierung der enthaltenen RNA und Inaktivierung der zellulären RNAsen bewirkt, versetzt. Mithilfe des Vortex-Geräts erfolgt eine homogene Durchmischung, anschließend werden die Proben für 10 Minuten auf Eis gekühlt, bevor unter stetiger Entlüftung Acid-Phenol-Chloroform (APC) in einem 1:1-Verhältnis zur Ausgangsmenge des Lysats zugefügt und durchmischt wird. Die Addition des APC bewirkt die Ausfällung der zellulären Bestandteile der Probe sowie eines großen Teils der enthaltenen DNA, welche nach Zentrifugation über fünf Minuten mit einer relativen Zentrifugalkraft von 12000g (entsprechend dem 12000fachen der mittleren Erdbeschleunigung) bei Raumtemperatur in der kompakten Interphase präzipitiert zu finden sind.

Sollte sich nach der Zentrifugation keine visuell erkennbare Dreischichtung darstellen, wird der Vorgang wiederholt. Der flüssige Überstand oberhalb dieser wird behutsam mit Hilfe einer Pipettenspitze mit manuell vergrößertem Durchmesser in ein neues 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert und mit einem Drittel seines Volumens Äthanol absolut vermischt, um eine partielle Präzipitation der RNA zu provozieren. Das Gemisch wird bei Raumtemperatur und 10000g für 15 Sekunden durch einen Glasfaserfiltereinsatz, welcher eine Fixation der large RNA bewirkt, in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß filtriert; bei Probenvolumen über 700 µl war hierzu eine wiederholte Pipettierung unter Nutzung desselben Filters erforderlich. Während nach diesem Vorgang die enthaltene small-RNA, d.h. RNA von unter 200 Basenpaaren (bp) Länge, im Eluat zu finden ist, sammelt sich die large-RNA hingegen auf dem Filter. Das Eluat mit der isolierten smallRNA konnte nach Durchmischung mit zwei Dritteln seines Volumens an Äthanol absolut für spätere Verwendungen bei -80° Celsius eingelagert werden.

Der Glasfaserfilter enthält nun die zu untersuchenden RNA-Bestandteile. Er wird in ein erneuertes RNase-freies Reaktionsgefäß eingeführt und in der Folge mit 700µl miRNA Wash Solution 1 durch Zentrifugation bei 10000g für 15 sec gespült. Das entstehende Eluat wird entsorgt, bevor der Vorgang in zwei weiteren Durchgängen mit je 500 µl der miRNA Wash Solution 2/3 wiederholt wird, wobei nach jedem Waschdurchgang das resultierende Eluat verworfen wird. Hierdurch werden etwaige neben der large RNA auf dem Filter zurückgebliebene zelluläre Bestandteile ausgespült und die Reinheit der isolierten RNA erhöht. Anschließend wird der Filter durch Zentrifugation mit 12000g über eine Minute bei Raumtemperatur getrocknet. Nach Überführung des Filters in ein Collection Tube des mirVana™ Kits werden 100µl auf 95° Celsius erhitztes Nuclease-freies Wasser zur Denaturierung potentiell noch

auf dem Filter zurückgebliebener Proteine sowie zur Lösung von Wasserstoffbrücken mit Darstellung der RNA als Einzelstrang in die Filtermitte pipettiert und nach Ablauf von fünf Minuten Inkubationszeit mit 12000g bei Raumtemperatur 30 Sekunden lang nochmals zentrifugiert. Nachdem so die auf dem Glasfaserfilter fixierte RNA erneut in eine flüssige Phase überführt wurde, enthält das entstandene Eluat den Anteil der in den Gewebeproben enthaltenen RNA mit über 200 bp Länge.

2.3.4 RNA-Analyse von Reinheit und Konzentration

2.3.4.1 Reagenzien

Aqua bidest. (nucleasefrei) GIPCO Invitrogen

2.3.4.2 Verbrauchsmaterialien

Küvetten

2.3.4.3 Gerätschaften

NanoDrop 2000c Spectrophotometer und Software Peqlab, Erlangen

2.3.4.4 Methodik der Photometrie

Zur Messung der optischen Dichte und somit der Bestimmung der RNA-Konzentration wird das RNA-haltige Eluat im Verhältnis 1:30 mit Nuclease-freiem Wasser verdünnt und in einer photometrischen Küvette sorgfältig unter Vermeidung von Blasenbildung vermischt. Für die Bestimmung der vorliegenden large-RNA in Bezug auf sowohl Quantität als auch Qualität erfolgt die photometrische Messung der Absorption im Vergleich zu Wasser (Blank) im Nanodrop 2000c Spectrophotometer bei 260nm (E260) unter der grundlegenden Annahme, dass die Menge von 40µg/ml RNA dem Wert 1,0 zugeordnet ist. Durch die Messung der Absorption bei 260 nm wird die RNA-Konzentration bestimmt. Ergänzend wird die Reinheit der Probe anhand der Bestimmung der Quotienten E260/280 als Hinweis auf eine eventuelle Verunreinigung durch Proteine, sowie des Quotienten E260/230 zur Beurteilung eventuell vorhandener niedermolekularer Stoffe. Der Zielbereich liegt in beiden Fällen bei 1,8 - 2,1 um eine entsprechende Reinheit der RNA zu gewährleisten. Proben, welche einen Reinheitsgrad von 1,8 nicht erfüllten oder eine RNA-Konzentration unter 0,037 ng/µl aufwiesen, wurden ausgeschlossen. Die RNA wurde bis zur weiteren Verarbeitung wieder bei -80°C gelagert.

2.3.5 Die Reverse Transkription

RNA – ebenso wie DNA – setzt sich aus einer Aneinanderreihung von Nukleotiden mit wechselnden Nukleinbasen zusammen, liegt aber – anders als DNA – als Einzelstrang mit lediglich abschnittsweise durch Wasserstoffbrückenbildung komplementärer Basenpaare doppelsträngigen Sequenzen vor. Jedes Nukleotid der RNA besteht neben einer der Nukleinbasen Adenin (A), Guanin (G), Cytosin (C) oder Uracil (U) aus dem Monosaccharid Ribose (Pentose) sowie einer Phosphatgruppe; welche durch Phosphorsäurediesterbindungen (Zucker) bzw. N-glycosidisch (Base und Ribose) miteinander verknüpft werden.

Die Pentose Ribose unterscheidet sich von der Desoxyribose der DNA durch das Fehlen eines Wasserstoffatoms im Pentose-Ring, wodurch eine Hydrolyse durch Basen möglich ist und konsekutiv

die Zerlegung des Einzelstrangs resultiert. RNA reagiert zudem äußerst sensitiv auf ubiquitär vorhandene Ribonukleasen und ist in ihrer ursprünglichen Form somit sehr instabil. Unter Zuhilfenahme des Enzyms Reverse Transkriptase, wie sie z.B. in Retroviren wie dem HI-Virus zu finden ist, kann mittels der Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) isolierte Einzelstrang-RNA in komplementäre cDNA transkribiert werden.

Bei dem Enzym Reverse Transkriptase handelt es sich um eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, welche nach Bindung des 3'-OH-Endes eines DNA-Oligonukleotids, dem sogenannten „Primer“, durch Anlagerung weiterer Desoxyribose-Nukleosidtriphosphate (dNTP, entsprechend dATP, dCTP, dGTP und dTTP) zur RNA komplementäre DNA (cDNA) synthetisieren kann. Diese kann durch ihre höhere Widerstandsfähigkeit Umwelteinflüssen gegenüber als Ausgangsmatrize für folgende Amplifikationen im Rahmen der Polymerase-Ketten-Reaktion herangezogen werden.

2.3.5.1 Reagenzien

High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit Applied Biosystems

- 10x RT Buffer, 1.0ml
- 10x RT Random Primers, 1.0ml
- 25x dNTP Mix (100mM)
- MultiScribe Reverse Transcriptase, 50 U/μl
- RNase Inhibitor, 100μl

Aqua bidest GIBCO Invitrogen

2.3.5.2 Verbrauchsmaterialien

Safe Seal Tips professional BIOZYM
 Reaktionsgefäße, 1,5ml Süd Laborbedarf GmbH

2.3.5.3 Gerätschaften

MJ Research PTC-200, Peltier Thermal Cycler BIOZYM
 QikSpin Modell QS7000 Edwards Instrument Co.
 MS1 Minishaker IKA Works, Inc.
 Pipetten 1000 μl, 200 μl, 10 μl peqette Peqlab

2.3.5.4 Methodik der Reversen Transkriptase Reaktion

Zur Herstellung der für die anschließende quantitative PCR benötigten Einzelstrang-cDNA aus der in Nuclease-freiem Wasser eluierten RNA wird ein sogenannter Mastermix aus verschiedenen Komponenten des High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits unter fortlaufender Kühlung zusammengestellt, welche unter anderem den Einsatz von 2μg der isolierten RNA erfordert. Mit Hilfe der photometrischen Bestimmung der optischen Dichte kann diese Menge unkompliziert durch die Proben-abhängig variierende Entnahme eines durch den jeweiligen RNA-Gehalt des Eluats definierten Probenvolumens erfolgen. Das Volumen des Master-Mix wird durch die Anzahl der erwünschten Reaktionen bestimmt, wobei pro Reaktion jeweils 2μl 10xRT Buffer, 0,8μl dNTP Mix (100mM), 2μl 10xRT Random Primers und jeweils 1 μl sowohl RNase Inhibitor als auch MultiScribe™ Reverse

Transcriptase eingesetzt wird. Bei der hier verwendeten MultiScribe™ Reverse Transcriptase handelt es sich um eine der reversen Transkriptase des rekombinanten Moloney Maus-Leukämievirus (rMoMuLV) ähnlichen Form einer rekombinanten RNA-abhängige DNA-Polymerase, die einzelsträngige RNA in Gegenwart eines Primers als Template verwendet, um einen komplementären DNA-Strang zu synthetisieren. Durch die Zugabe einer Pufferlösung entsteht ein für die Aktivität der DNA-Polymerase benötigtes chemisches Milieu; die vorsorgliche Addition ein RNase-Inhibitor inhibiert möglicherweise vorhandene Ribonucleasen.

Bei definierter Menge des Mastermixes sowie einem durch den RNA-Gehalt vorgegebenen Volumen des Eluats variiert die Menge des Nuclease-freien Wassers in Abhängigkeit der Differenz zum Zielvolumen von 20µl, welches jedes Reaktionsgefäß bei Einstellung in den ThermoCycler aufweisen muss. Nach Durchmischung aller Komponenten werden die Proben kurz zentrifugiert und in den ThermoCycler eingesetzt, in welchem sie in einem ersten Schritt für 10 Minuten bei 25°C und im Folgenden für 120 Minuten bei 37°C inkubiert werden, bevor sie nach einer 5-sekündigen Erhitzung auf 85°C mit dem Ziel der Inaktivierung der Reversen Transkriptase bis zur Entnahme bei 4°C gehalten werden. Eine Lagerung der so hergestellten cDNA kann bei -15 bis -25°C über einen längeren Zeitraum ohne Schädigung der cDNA erfolgen.

2.3.6 Die Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion als viel genutzte Standardmethode zum Nachweis sowie zur enzymatischen Replikation von DNA ermöglicht die in vitro Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen ohne die Verwendung von Zellen. Für ihre Entwicklung wurde Kary Mullis fast zehn Jahre nach Erstbeschreibung der Methodik im Jahre 1984 mit dem Nobelpreis geehrt. Sie lässt sich biochemisch in drei Schritte gliedern: Denaturierung, Annealing und Elongation entsprechend der eigentlichen DNA-Synthese.

Im ersten Schritt wird das sogenannte Template, d.h. die doppelsträngige DNA-Sequenz (dsDNA), in welche der zu untersuchende Abschnitt integriert ist, durch Erhitzen auf 95°C in seine Einzelstränge aufgetrennt. Das nachfolgende Annealing setzt die Verwendung zweier chemisch synthetisierter, mehrere Basenpaare langer Oligodesoxyribonukleinsäure-Primer voraus, welche in ihrer Sequenz jeweils komplementär zu Abschnitten der Einzelstrang-DNA sind und die zu amplifizierende Sequenz nach Hybridisierung zwischen sich einschließen, hierbei diktiert der entsprechende Primer die erforderliche Reaktionstemperatur. Die eigentliche DNA-Synthese, die Elongation, nutzt den so entstandenen doppelsträngigen Abschnitt an seinem 3'-OH-Ende als Ausgangspunkt für die Anlagerung der dNTP-Substrate unter Zuhilfenahme einer thermostabilen DNA-Polymerase, sodass letztendlich ein vollständiger Doppelstrang komplementär zu der Ziel-Sequenz entsteht. Auch hierbei ist eine definierte Temperatur in Abhängigkeit der DNA-Polymerase essentiell.

Durch repetitives Durchlaufen dieser drei Schritte in mehreren Zyklen mit exponentieller Vervielfältigung der DNA gelingt auch ein Nachweis geringer Mengen an Ausgangsmaterial.

Abhängig von der Zielsetzung kann der Prozess eine qualitative Antwort auf die Frage nach Vorhandensein oder Fehlen der entsprechend vervielfältigten Sequenz, auch Amplikon genannt, geben oder eine Quantifizierung des vorhandenen Genprodukts bzw. der Genexpression im untersuchten Material leisten. Während bei der qualitativen PCR erst nach Abschluss der Prozessierung mittels

gelelektrophoretischer Aufspaltung der Endprodukte der PCR ein Nachweis der amplifizierten Sequenz erfolgt, wird bei der quantitativen Polymerasekettenreaktion als sogenannte Real Time PCR (qPCR) in der exponentiellen Phase der Reaktion fortlaufend, d. h. nach jedem Amplifikations-Zyklus des Syntheseprozesses, mittels Fluoreszenzmessung die Höhe des DNA-Produktes bestimmt, sodass eine proportionale Korrelation zwischen Fluoreszenzsignal und Höhe der Genexpression besteht. Durch Kombination von RT-PCR und qPCR gelingt somit ein Nachweis kleinster Mengen mRNA, die fortlaufende Quantifizierung der Amplikons reduziert hierbei die Wahrscheinlichkeit für falsch-negative Ergebnisse erheblich.

Die Fluoreszenz-markierten dNTP werden zum generellen Mengennachweis des PCR-Produktes entweder zufällig in die Doppelstränge eingebaut oder als bekannte fluorogene Sequenzen, welche nahe der Primer an die Matrize binden. Diese binden entsprechend komplementäre Sequenzen der synthetisierten DNA unter Nutzung des sogenannten Förster-Resonanzenergietransfers (FRET), einer Form der physikalischen Energieübertragung, bei welchem die Energie eines angeregten Donor-Farbstoffes strahlungsfrei auf einen Akzeptor-Farbstoff übertragen wird. Die Stärke des Fluoreszenzsignals wird hierbei von der Entfernung der beiden zueinander Fluorochrome bestimmt. Vorteil gegenüber den interkalierenden, unspezifischen, Farbstoffen bietet hierbei die hohe Spezifität des Assays.

In dieser Arbeit wurde nach reverser Transkription die quantitative Polymerasekettenreaktion zum Nachweis der entsprechend nachzuweisenden bzw. zu quantifizierenden Nukleotidsequenz der interessierenden Tumormarker angeschlossen. Die im ersten Schritt synthetisierte einzelsträngige DNA wurde unter Nutzung einer Taq-Polymerase, einer aus dem namengebenden Bakterium *Thermus aquaticus* isolierten hitzebeständigen DNA-Polymerase, dupliziert.

Durch Verwendung spezieller TaqMan-Sonden mit unilateraler Markierung durch einen sogenannten Quencher an ihrem 3'-Ende und kontralateraler Markierung des 5'-Endes durch einen Reporter-Farbstoff kann die Akkumulation des PCR-Produktes während der Amplifizierung zyklusabhängig erfasst werden.

Durch die initiale Nähe des Quenchers zum Reporter wird die Fluoreszenz mittels FRET auch nach Bindung an die Matrize unterdrückt. Da die Taq-Polymerase sowohl eine DNA-Polymerase als auch eine 5'-3'-Exonucleaseaktivität aufweist und während der Amplifikation des 5'-Ende der Sonde verdrängen und abbauen kann, kann folglich das nun frei gesetzte Fluoreszenzsignal gemessen werden. Diese hydrolytische Reaktion kann nur nach vollständiger Bindung der Sonde an die DNA-Matrize durch Aktivierung der 5'-3'-Exonucleaseaktivität mittels entstehender Sekundärstruktur bei Verdrängung der Oligonukleotide der Sonde erfolgen, eine weitere Elongation am 3'-Ende ist aufgrund der Modifikation des Quenchers durch Anlagerung eines Phosphatrestes nicht möglich. Somit kann von der Fluoreszenz-Signalhöhe der freigesetzten Reporterfarbstoffe auf die Menge der vorliegenden DNA rückgeschlossen werden.

2.3.6.1 Reagenzien

TaqMan® Gene expression master mix
Aqua bidest.

Applied Biosystems
GIBCO Invitrogen

2.3.6.2 Verbrauchsmaterialien

MicroAmp™ 96 Well Reaction Plate	BioRad
PCR Soft Tubes, Flachdeckel, 0,5 ml	BIOZYM
Microseals®“B“ Film	BioRad
Adhesive Seal Applicator	
Filter Tips, 10 µl, 20 µl, 200 µl (lang + kurz), 1250 µl	Corning
Markierte PCR-Sonden:	Applied Biosystems
KLK2 (73 bp/FAM-markiert); Bestellnr.: Hs00428383_m1	
KLK3 (64 bp/FAM-markiert); Bestellnr.: Hs03063374_m1	
UBC (71bp/VIC-markiert); Bestellnr.: Hs008244723_m1	
HPRT1 (72bp/VIC-markiert); Bestellnr.: Hs01003267_m1	

2.3.6.3 Gerätschaften

CFX96 RealTime-System/C1000 Thermal Cycler	BioRad
QikSpin Modell QS7000	Edwards Instrument Co.
PipetMan	Gilson

2.3.6.4 Methodik der quantitativen reversen Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)

Die Pipettierung der 96-Well-Platten erfolgte unter akribischer Berücksichtigung von Akkuratessse und Sauberkeit in jeweilig paarigem Ansatz der Marker-DNA-Probe sowie je einer Positiv- und einer Negativkontrolle zur Validierung der Ergebnisse.

Das einzusetzende Gesamtvolumen für den Probenansatz entsprach insgesamt 10 µl/Well.

Jede cDNA-Probe – entsprechend einem exakt lokalisierbaren Lymphknoten - wurde mit Nuclease-freiem Wasser auf eine allgemeine standardisierte Konzentration von 12,5 ng/µl verdünnt; bei 4µl später einzusetzenden Pobenvolumen enthielten diese somit 50ng cDNA. Additiv wurden jedem Well 5µl TaqMan® Gene Expression-Mastermix (s. o.) sowie 0,5µl FAM-markierter Primer und Markersonden (entsprechend KLK3 und KLK2) und 0,5 µl nukleasefreies Wasser zugesetzt.

Neben diesen „Mono-Color“ Ansätzen wurde in sogenannten „Dual Color“-Reaktionen zudem die Expression zweier endogener Referenzgene, Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (HPRT1) und Ubiquitin 1 (UBC), mit ubiquitärer und durch äußere Einflüsse unveränderlicher Expression in allen untersuchten Zellen, geprüft. In der späteren Ergebnisanalyse kann somit bezogen auf ihre Expression eine relative Quantifizierung der zu untersuchenden Marker KLK2 und KLK3 erfolgen. Für diese Ansätze wurde der Anteil nukleasefreien Wassers durch 0,5µl VIC-markierter Primer und Referenzgensonden ersetzt.

Nach vollständigem Pipettieren der 96-Well-Platte und luftdichtem Verschluss mittels Microseals®“B“-Film wird diese für zwei Minuten bei Raumtemperatur mit 600 rpm zentrifugiert und anschließend in den CFX96 RealTime-System/C1000 Thermal Cycler eingestellt. Hier erfolgte im ersten Zyklus die initiale Denaturierung der cDNA-Stränge bei 95°C über einen Zeitraum von 10:00 min, bevor sich die Schritte des Annealings und der Elongation mit konsekutiver Fluoreszenzmessung innerhalb von 60 Sekunden bei 60°C anschlossen. Ab dem zweiten Zyklus war die Denaturierung innerhalb von lediglich 15 Sekunden zu erzielen; der Vorgang erfolgte repetitiv in weiteren 44 Zyklen.

2.3.7 Kontrolle der PCR-Analyse

2.3.7.1 Positivkontrolle

Der sogenannten Positivkontrolle dient die Verwendung von cDNA aus LnCap-Zellen bereits etablierter Prostatakarzinomzelllinien, welche durch die Reproduktion eines bekannten Ergebnisses dem Nachweis eines korrekt durchgeführten Verfahrens dient.

2.3.7.2 Negativkontrolle

Die Negativkontrolle dient der Überprüfung der verwendeten Einzelkomponenten, wobei dem Versuchsansatz der zu untersuchende Faktor - in diesem Falle die aus den lymphatischen Gewebeproben extrahierte cDNA - als Replikationsgrundlage vorenthalten und durch Wasser ersetzt wird (non-template-control). Ein dennoch erbrachter Nachweis eines Amplikons in einer solchen Reaktion der PCR würde dabei eine initiale Verunreinigung einer der eingesetzten Reagenzien oder verwendeten Materialien durch DNA anzeigen.

2.3.7.3 Sensitivitäts- und Spezifitätsprüfung

Die Sensitivität des PCR-Ansatzes für die entsprechenden Marker wurde mittels qRT-PCR-Nachweises ihrer Genexpression in LnCAP-Zell-Verdünnungsreihen getestet. Hierzu wurde die Höhe der Genexpression von KLK2 bzw. KLK3 bei Konzentrationen von keiner bis zu 1000 LnCAP-Zellen in je einer Millionen mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (PBMC) für jede Verdünnungsstufe bestimmt; eine Sensitivität der Detektion einer LnCAP-Zelle bzw. einer Anzahl von 10 KLK3 Kopien konnte hierbei erzielt werden.

Die Spezifität der Methodik konnte durch den Vergleich der Untersuchungsergebnisse gegen die entsprechenden Expressionslevels der Marker in Lymphknoten gesunder Probanden gesichert werden; als Kontrollgruppe dienten 143 nach Zystoprostektomie bzgl. des Vorliegens eines Prostatakarzinoms histopathologisch negativ getestete Lymphknoten von 25 männlichen Blasen-tumor-Patienten. Der berechnete Cutoff dieser als molekular negativ definierten Lymphknoten wurde als Grenzwert für den molekularen Nachweis des Vorliegens einer lymphatischen Metastasierung gewertet.

2.3.8 Auswertung der qRT-PCR-Resultate

Die Real Time PCR erlaubt die Quantifizierung der absoluten Menge einer exprimierten Gensequenz (Menge DNA/Probenmenge) sowie den relativen Vergleich derer Expression in verschiedenen Proben (relatives Verhältnis der Höhe der DNA-Zielsequenz in äquivalenten Mengen von Test- und Kontrollprobe).

In jedem der Amplifikationszyklen des CFX96 RealTime-System/C1000 Thermal Cycler wird die absolute Anzahl der vorliegenden Genprodukte (= Kopien) erfasst und kann mittels der integrierten Rechensoftware graphisch dargestellt werden. Ein Beispiel hierfür zeigt Abbildung 2.

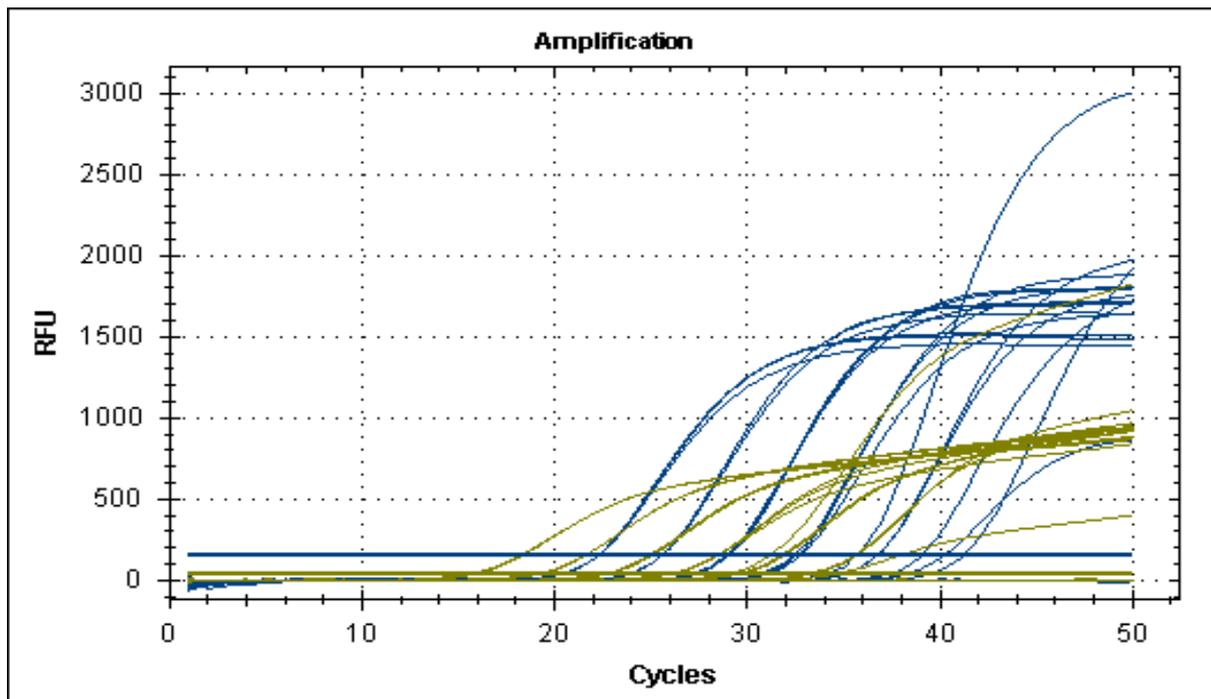


Abbildung 2: Graphische Darstellung der Höhe des Fluoreszenzsignals (RFU = „relative fluorescence units“) in Korrelation zum Reaktionszyklus (Cycles). Die waagerechten Linien markieren die markerspezifisch farblich gekennzeichneten „thresholds“.

Trotz der Spezifität der Bestandteile unterliegt jeder PCR ein sogenanntes „Grundrauschen“ im Sinne einer Signaldetektion, welche nicht ausschließlich durch die Amplifizierung der Zielsequenz zustande kommt und somit keine Relevanz in der Bewertung der Höhe der Expression des Markers haben kann. Der sogenannte threshold cycle (Cq-Wert) definiert den Zyklus, in welchem das Fluoreszenzsignal über dieses Hintergrundsignal ansteigt; er zeigt den Beginn der exponentiellen Phase des Signalzuwachses durch Amplifikation der Zielsequenz an. Die reaktionsspezifisch festgelegte threshold line (dargestellt als kräftige horizontale Linie in der Grafik oben) kreuzt in diesem Punkt die Reaktionskurve der Probe, sie wird automatisch als Vielfaches der Standardabweichung des Hintergrundrauschens durch die Software des RealTime-Systems definiert. Da sich zu diesem Zeitpunkt in allen Reaktionsgefäßen die annähernd selbe Menge an DNA befindet, können Rückschlüsse auf die initiale Kopien-Menge der einzelnen Proben gezogen werden.

Zwischen Cq-Wert und Ausgangshöhe der Amplifikationssequenz in der Probe besteht ein inverses Verhältnis, zudem ist der threshold cycle abhängig von pH und Salzgehalt des MasterMixes, den Fluoreszenzmarkern und der Reaktionseffizienz. Die Reaktionseffizienz kann in seriellen Verdünnungsreihen anhand einer Standardkurve bestimmt werden, wobei eine 100%ige Effizienz einer Verdopplung der Zielsequenz in jedem Zyklus entspricht, eine geringere Effizienz bedeutet eine Änderung des Ct-Wertes ≥ 1 bei Verdopplung der Konzentration. Zur Erstellung einer Standardkurve werden die Ct-Werte einer jeden Gensequenz (Referenzgen und Zielgen) gegen den logarithmischen Wert des Verdünnungsfaktors bzw. der Konzentration aufgetragen, die Effizienz der Kombination von Zielgen und Primer kann dann durch Vergleich der Ct-Werte über die Steigung der Kurve bestimmt werden (Effizienz = $2^{-1/\text{Steigung}}$). Über die Berechnung des Determinationskoeffizienten R^2 als Anteil der durch die Regression erklärten Quadratsumme an der zu erklärenden totalen Quadratsumme kann über ein lineares Regressionsmodell die akzeptable Streuung der Ergebniswerte bestimmt werden.

Durch den Einsatz von sogenannten Referenz- oder „Housekeeping“-Genen, deren Expression durch die Bedingungen des Experiments nicht veränderbar ist, kann mittels der „ $\Delta\Delta\text{Ct}$ “-Methode, auch Livak-Methode genannt, ein Abgleich der ermittelten Probenwerte gegenüber standardisierten Ergebnissen dieser Gene erfolgen. Die Methode geht davon aus, dass die Reaktionseffizienz von Ziel- und Referenzgenen bei annähernd 100% liegt bzw. nicht mehr als 5% differiert. Durch die Normalisierung der Zielgene zu einem Referenzgen können systemische Fehler durch Unterschiede in den Probenansätzen korrigiert werden (Livak et al., 2001).

Abbildung 3 stellt die „ $\Delta\Delta\text{Ct}$ “-Methode nach Livak dar. Hierbei werden die Differenzen der durchschnittlichen Ct-Werte von Test- und Referenzgenen sowohl in den Proben- als auch in den Kontrollansätzen gebildet. Die Differenz dieser beiden Werte wiederum bildet den „ $\Delta\Delta\text{Ct}$ “-Wert. Da es sich hier um einen logarithmischen Wert zur Basis 2 handelt – jeder Anstieg des Ct-Wertes um 1 entspricht einer Verdopplung der DNA-Menge – muss zur Darstellung der relativen Genexpression des Zielgens zum Referenzgen der logarithmische Wert zur Basis 2 gebildet werden, entsprechend $2^{\text{hoch}\Delta\Delta\text{Ct}}$.

$\text{Ct}(\text{Zielgen Kontrolle}) = \text{Ct-Wert des Zielgens in der Kontrolle}$

$\text{Ct}(\text{Referenzgen Kontrolle}) = \text{Ct-Wert des Referenzgens in der Kontrolle}$

$\text{Ct}(\text{Zielgen Probe}) = \text{Ct-Wert des Zielgens im Probenansatz}$

$\text{Ct}(\text{Referenzgen Probe}) = \text{Ct-Wert des Referenzgens im Probenansatz}$

$\Delta\text{Ct}(\text{Probe}) = \text{Ct}(\text{Zielgen Probe}) - \text{Ct}(\text{Referenzgen Probe})$

$\Delta\text{Ct}(\text{Kontrolle}) = \text{Ct}(\text{Zielgen Kontrolle}) - \text{Ct}(\text{Referenzgen Kontrolle})$

$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}(\text{Probe}) - \Delta\text{Ct}(\text{Kontrolle})$

$\Delta\Delta\text{Ct} = (\text{Ct}(\text{Zielgen Kontrolle}) - \text{Ct}(\text{Referenzgen Kontrolle})) - (\text{Ct}(\text{Zielgen Probe}) - \text{Ct}(\text{Referenzgen Probe}))$

Verhältnis des Zielgens im Probenansatz zur Kontrollprobe: $2^{\text{hoch}\Delta\Delta\text{Ct}}$

Abbildung 3: Vereinfachte Darstellung der Livak-Methode

Diese Methodik ausgehend von einer 100%igen Effizienz der Ziel- als auch Referenzgene entspricht dabei einem Sonderfall der sogenannten Pfaffl-Methode. Bei einer geringeren PCR-Effizienz kann entsprechend der Methodik nach Pfaffl ein Abgleich der idealisierten PCR-Kurve zu der Normalisierungskurve einer Verdünnungsreihe (des Kalibrators) erfolgen. Hierdurch gelingt eine Korrektur der Unterschiede in der Effizienz, da die Effizienz eines jeden Primer-Sets in die Formel zur relativen Quantifizierung eingefügt wird (Pfaffl, 2001 und 2004).

Oben angeführte Referenz- bzw. Housekeeping-Gene sind ubiquitär unabhängig von Veränderungen der Zelle selbst oder äußeren Einflüssen exprimierte, nicht-regulierte Gene, die in der Regel für den Zellstoffwechsel essentielle Produkte codieren. Abhängig von den Ansprüchen des experimentellen Ansatzes muss ein für die Bedingungen optimales Gen gefunden werden, dessen Expression für alle Probenansätze nahezu unverändert ist. Hierzu wurde die Arbeit von Vandesompele et al. herangezogen, in welcher sechs Referenzgene in 13 verschiedenen Gewebetypen mit weitgehend

konstanter Expression von Hypoxanthinphosphoryl-Transferase 1 (HPRT1) und Ubiquitin C (UBC) in allen untersuchten Geweben mittels der dort publizierten „gNorm Analyse-Software“ verglichen wurden.

Unter Berücksichtigung der Ansprüche des experimentellen Ansatzes wurden mit Hilfe dieser gNorm Analyse-Software, einer Visual Basic Application (VBA) für Microsoft Excel, die sechs potentiellen Referenzgene GAPDH (Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase), RPL13A (Ribosomales Protein 13A), YWHAZ (Tyrosin 3-Monooxygenase/Tryptophan 5-Monooxygenase Aktivierungsprotein Zeta), β -Actin, Hypoxanthinphosphoryl-Transferase 1 (HPRT1) und Ubiquitin C (UBC) an 14 lymphonodulärem Gewebeproben getestet. Unter der Annahme, dass das Verhältnis der Expression zweier idealer Referenzgene unabhängig von den experimentellen Bedingungen oder der Zellart in allen Proben identisch ist, definierten Vandesompele et al. den M-Wert als internen Faktor der Genexpressionsstabilität. Er zeigt die durchschnittliche Abweichung einer Referenzgenpaarung im Vergleich zu allen anderen Referenzgenen an. Ein niedriger M-Wert zeigt somit eine geringere Abweichung und eine stabile Genexpression an. Durch schrittweise rechnerische Elimination des Referenzgens mit dem jeweils höchsten M-Wert können konsekutiv die beiden Referenzgene mit dem stabilsten Expressionsmuster definiert werden. Der V-Wert als paarweise Abweichung spiegelt die systematische Variation im Sinne systemimmanenter Fehler bei wiederholten RT-PCR Experimente mit demselben Gen wider (Vandesompele et al., 2002).

Die Untersuchungsergebnisse wurden dementsprechend gegen die mittlere Proportionale (geometrisches Mittel) von HRPT1 und UBC verglichen mit einer Kalibrator-Probe, welche in der vorliegenden Arbeit der Expressionskurve einer Probe aus 10^6 PBMC versetzt mit 10^6 LnCAP-Zellen entsprach, normalisiert. Die relative Genexpression der Kalibrator-Probe wurde hierzu mit 1,0 definiert, die Ergebnisse mittels der „ $\Delta\Delta C_t$ “-Methode dargestellt.

2.3.9 Statistische Auswertung

Die Daten wurden anhand des IBM SPSS Statistics 24.0 und des statistischen Software Pakets R analysiert.

Mittels des Software Pakets R, einem System für Computational Statistics als Schnittstelle zwischen Statistik und Informatik mit Grafikdatenverarbeitung, wurde ein Limes zur Einteilung molekular negativer (molN0) und positiver (molN1) Ergebnisse berechnet. Hierdurch konnten anhand von Toleranzintervallen basierend auf der Gammaverteilung der Werte der KLK3-Expression mit einer 99%igen Sicherheit 99% der histopathologisch richtig-negativen Lymphknoten identifiziert werden (Young, 2010; Krishnamoorthy, 2008).

3. Ergebnisse

3.1 Analytische Beurteilung der qRT-PCR anhand von KLK3 und KLK2

3.1.1 Auswahl der Referenzgene

Unter Berücksichtigung der Ansprüche des experimentellen Ansatzes wurden mit Hilfe der geNorm Analyse-Software (Visual Basic Application für Microsoft Excel) die sechs potentiellen Referenzgene GAPDH (Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase), RPL13A (Ribosomales Protein 13A, YWHAZ (Tyrosin 3-Monooxygenase/Tryptophan 5-Monooxygenase Aktivierungsprotein Zeta), β -Actin, Hypoxanthinphosphoryl-Transferase 1 (HPRT1) und Ubiquitin C (UBC) an 14 lymphonodulärem Gewebeprobe getestet. Aufgrund ihres stabilen Expressionsmusters mit einer geNorm V Größe $< 0,15$ und einem geNorm Mittelwert M von $\leq 0,5$ konnten die Marker Hypoxanthinphosphoryl-Transferase 1 und Ubiquitin C als Referenzgene definiert werden, Abbildung 4 verbildlicht dies.

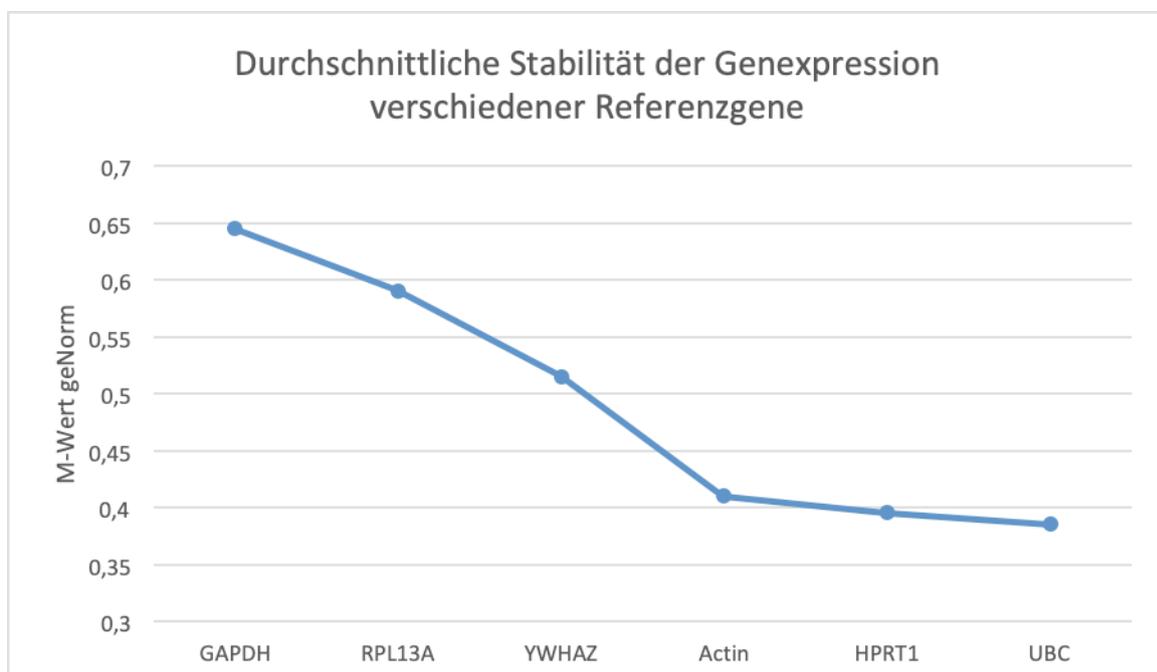


Abbildung 4: Durchschnittliche Stabilität der Genexpression der Referenzgene. Mit einem geNorm V Wert von $< 0,15$ und einer stabilen Expression bei einem durchschnittlichen geNorm Mittelwert M von $\leq 0,5$ konnten HPRT1 und UBC in der Expressionanalyse der sechs Referenzgene in 14 Lymphknotenproben bestimmt werden.

3.1.2 Charakterisierung der angewandten qRT-PCR-Methode

Für die Referenzgene HPRT1 und UBC sowie für KLK2 und KLK3 konnte in einer Verdünnungsreihe von LnCAP-Zellen für Konzentrationen zwischen 100ng und 10pg RNA eine stabile lineare Korrelation nachgewiesen werden. Der lineare Korrelationskoeffizient r^2 lag hierbei für KLK3 bei 0,997, für KLK2 bei 0,987, für HPRT1 bei 0,991 und 0,992 für UBC. Die Effizienz der Amplifikation der Ziel- und Referenzgene lag zwischen 90-102% und konnte somit als gleichwertig betrachtet werden. Die relative Genexpression (Ratio der Expression des Zielgens zum Kalibrator, Kalibrator = LnCAP cDNA Äquivalent von 1ng RNA) für alle Marker war über die gesamte Verdünnungsreihe hinweg stabil. Einbezogen in die Ergebnisauswertung wurde hierbei jeweils der Mittelwert der als Duplikate in der qRT-PCR angesetzten lymphonodulären Proben.

3.1.3 Positivkontrollen der RT-PCR Reaktionen

Der Positivkontrolle aller PCR-Reaktionsansätze diene die Verwendung von cDNA aus LnCap-Zellen bereits etablierter Prostatakarzinomzelllinien, in welchen ausnahmslos eine stabile Expression von KLK2 und KLK3 nachgewiesen werden konnte.

3.1.4 Negativkontrollen der RT-PCR Reaktion

Bei Ersatz der zu untersuchenden RNA-Proben durch Aqua bidest in den PCR-Reaktionsansätzen im Sinne einer non-template-control bzw. Negativkontrolle der RT-PCR-Reaktion war in allen untersuchten Ansätze kein Nachweis eines spezifischen cDNA-Produktes zu erbringen, sodass eine initiale Verunreinigung einer der eingesetzten Reagenzien oder verwendeten Materialien durch DNA auszuschließen war.

3.1.5 Sensitivität und Spezifität der qRT-PCR

Die Sensitivität der qRT-PCR wurde mittels des Nachweises der Genexpression von KLK2 und KLK3 in LnCAP-Zell-Verdünnungsreihen mit 0 bis 1000 LnCAP-Zellen in je 10 Millionen mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (PBMC) als Modell für die Gen-Expression in lymphatischen Zellen reproduzierbar getestet; hierbei war die Detektion einer einzelnen LnCAP-Zelle sowie eine KLK3- sowie KLK2-Expression ab einer Konzentration von 10 LnCAP-Zellen/ 10^7 PBMC möglich (Abbildung 5).

Der intra- und inter-assay Variationskoeffizient betrug für alle Ergebnisse der Testreihe unter 20%.

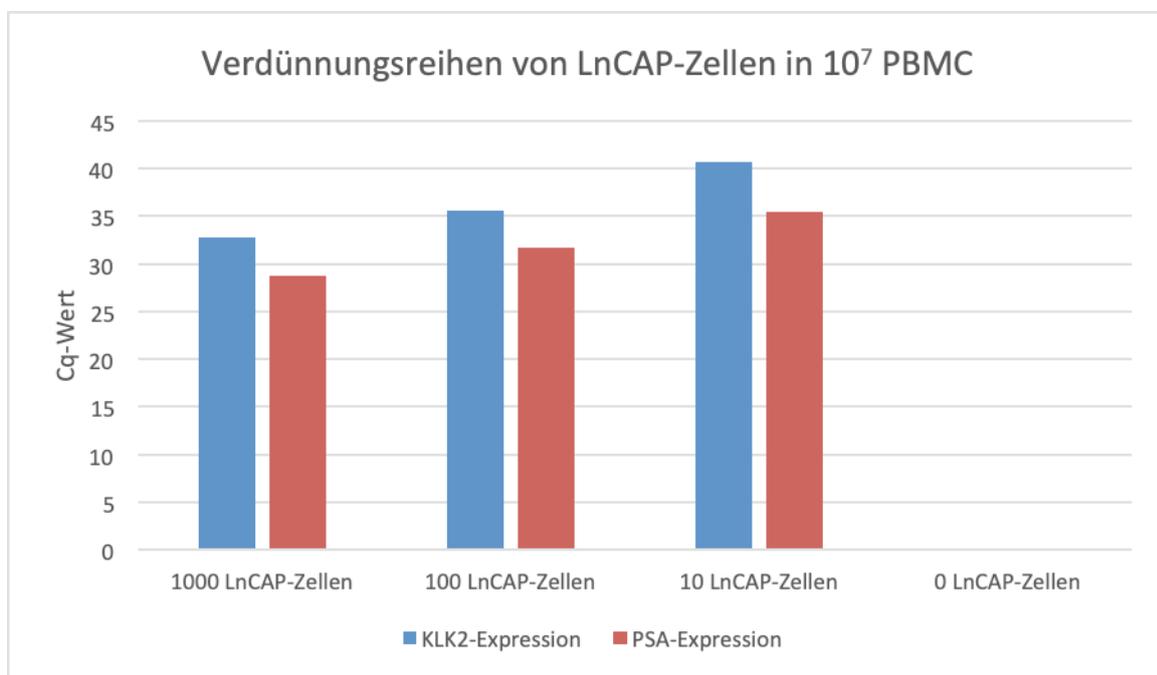


Abbildung 5: Darstellung der Sensitivität der Detektion von KLK2/3 in Verdünnungsreihen von LnCAP-Zellen in 10^7 PBMC

Die Spezifität der Methodik konnte durch den Vergleich der Untersuchungsergebnisse gegen die entsprechenden Expressionslevels der Marker KLK2 und KLK3 in Lymphknoten gesunder Probanden gesichert werden; als Kontrollgruppe dienten 143 nach Zystoprostektomie bzgl. des Vorliegens eines Prostatakarzinoms histopathologisch negativ getestete Lymphknoten von 25 männlichen Blasen-tumor-

Patienten. Anhand dieser Daten wurde ein statistischer Cut-off für den Nachweis des Vorliegens einer molekularen lymphatischen Metastasierung (molN1) berechnet. Dieser definierende Grenzwert, bei dessen Überschreiten entsprechend eine molN1-Situation definiert wurde, konnte für KLK3 auf 1,47 und für KLK2 auf 9,6 festgelegt werden.

3.2 Patientenspezifische Daten

3.2.1 Definition des Patientenkollektivs

In die Studie aufgenommen wurden insgesamt 111 Patienten mit einem mittleren Lebensalter von 66 Jahren (44 bis 82 Jahre, 55% zwischen 65 und 75 Jahren) zum Zeitpunkt der operativen Therapie. Das arithmetische Mittel für den PSA-Wert lag bei 22 ng/ml mit einem medianen Wert von 11 ng/ml mit einem Schwerpunkt im Bereich von PSA-Werten unter 10 ng/ml (46%) bei ähnlicher Verteilung der Anteile im Bereich zwischen 10 und 20 ng/ml (28%) bzw. über 20 ng/ml (26%).

Der präoperative Gleason-Score lag im Mittel bei einem Wert von 8 mit einer Verteilung von 58 Patienten (entsprechend 52%) mit Werten zwischen 8 und 10 und 45 Patienten (41%) mit einem Score von 7 bzw. 8 Patienten (7%) mit einem Score von 6.

Das klinische Tumorstadium konnte für 52 Patienten (47%) als cT1c-2a definiert werden, 57 Patienten (51%) fielen in die Kategorie cT2b-c, bei zwei Patienten (2%) lag ein Stadium cT3a-b vor.

Anhand der Einteilung mittels des TNM-Stadiums, Gleason-Scores und PSA-Wertes in die D'Amico Risikogruppen wurden konsekutiv 29% der Studienpatienten (absolut 32 Patienten) als intermediate risk und 71% als high risk (79 Patienten absolut) klassifiziert. Tabelle 4 stellt diese präoperativen Patientendaten zusammengefasst dar.

Präoperative Patientendaten (n=111)	
Alter [Lebensjahre]	
Durchschnitt (Median)	66 (67)
Interquartilsabstand (Spannweite)	61-71 (44-82)
Anzahl Patienten (%)	
< 65	43 (39)
65-75	61 (55)
>75	7 (6)
PSA [ng/ml]	
Durchschnitt (Median)	22 (11)
Interquartilsabstand (Spannweite)	7-22 (1-367)
Anzahl Patienten (%)	
< 10	51 (46)
10-20	31 (28)
> 20	29 (26)
Gleason Score bei Prostatabiopsie	
Durchschnitt (Median)	8 (8)
Interquartilsabstand (Spannweite)	7-9 (6-10)
Anzahl Patienten (%)	
6	8 (7)

7	45 (41)
8-10	58 (52)
Klinisches Tumorstadium, Anzahl Patienten (%)	
cT1c-2a	52 (47)
cT2b-c	57 (51)
cT3a-b	2 (2)
D´Amico Risikogruppe, Anzahl Patienten (%)	
Intermediäres Risiko	32 (29)
Hochrisiko	79 (71)

Tabelle 4: Präoperative Patientendaten des Gesamtkollektivs von 111 Patienten

3.2.2 Bestimmung des Lymphknotenstatus

Mit acht vorbestimmten Lymphknotenregionen wurden bei 111 Patienten von 888 möglichen Resektionsfeldern insgesamt 863 Lymphknotenfelder entsprechend einem Anteil von 97% reseziert (5-8 Felder/Patient); 25 Felder von 15 Patienten konnten aufgrund von Adhäsionen durch vorhergegangene Operationen oder unzureichend respektablem fibrolipomatösen Gewebes nicht entnommen werden (2% der Gesamtfelder, 1-3 Felder/Patient).

Insgesamt konnten 3173 Lymphknoten mit im Mittel 27 LK/Patienten (Minimum 9 LK, Maximum 78 LK) entnommen werden, 78 LK von 46 Patienten entfielen aufgrund technischer oder logistischer Problematiken für die weitere Auswertung, sodass bei einem Durchmesser von >3 mm 2333 LK (73,5%) mit im Mittel 21 LK/Patient (min. 6 bis max. 48 LK/Pat., Median 20 LK/Pat.) histopathologisch und molekularbiologisch aufgearbeitet werden konnten. Die 762 LK, entsprechend einem Anteil von 24,0% aller resezierten LK, mit einem zu geringen Volumen zur Aufarbeitung mit beiden Methoden (<3mm Durchmesser) wurden ausschließlich in der klassischen Histopathologie analysiert.

Von den 2333 histopathologisch und molekularbiologisch aufgearbeiteten LK konnten 69 LK von 28 Patienten (25,2% des gesamten Patientenkollektivs; im Mittel 2,5 LK/Pat., min. 1 LK – max. 11 LK, median 1 LK) histopathologisch als nodal positiv determiniert werden (pN1). 2264 LK (97,0%) – verteilt über alle Patienten des Gesamtkollektivs - zeigten in der konventionellen Histopathologie keine Hinweise auf eine Metastasierung. Abbildung 6 zeigt die Verteilung der Präparate auf die Methoden und stellt die histopathologischen Ergebnisse dar.

Unter den 762 LK mit einem Durchmesser von unter 3mm und konsekutiv ausschließlich histopathologischer Untersuchung war eine Metastasierung in nur drei LK (0,4%) von drei Patienten nachzuweisen. Die entsprechenden Patienten zeigten jedoch in jeweils weiteren Lymphknoten positive Befunde, sodass diese ihren Gesamt-Nodalstatus nicht beeinflussten.

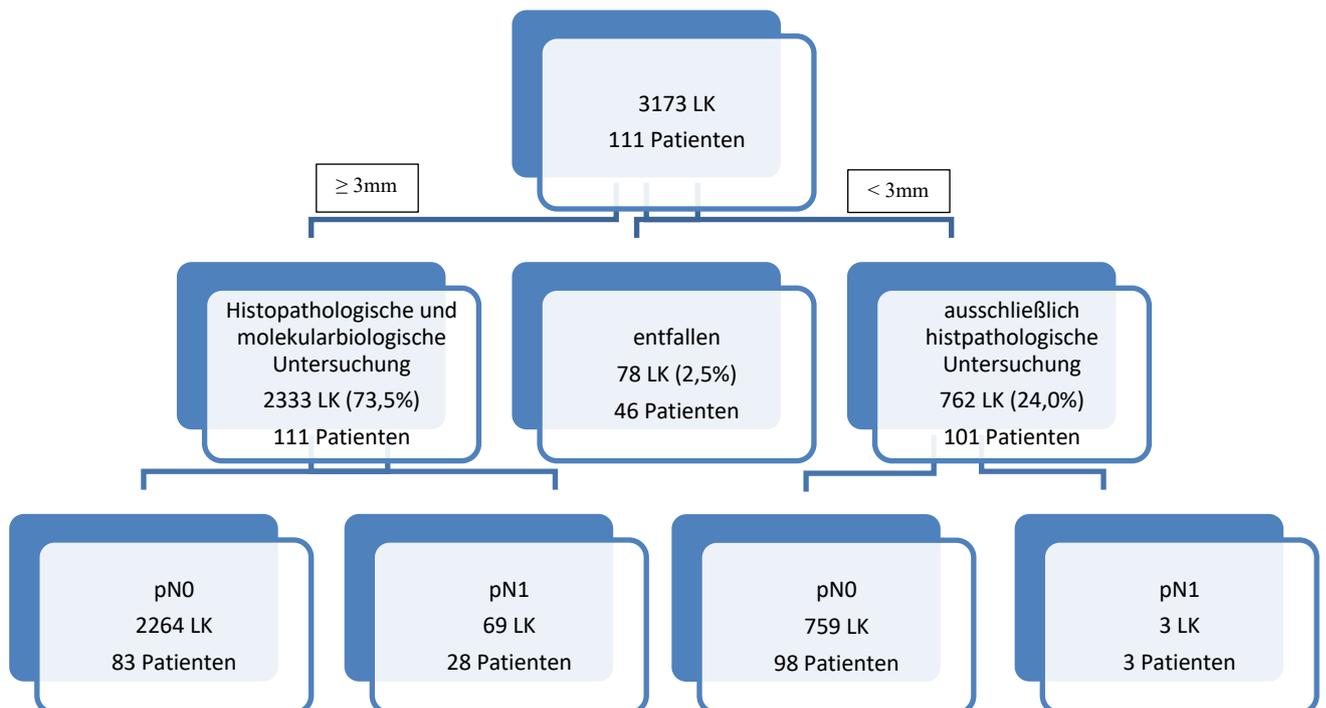


Abbildung 6: Methodenzuordnung und histopathologische Ergebnisse

3.2.2.1 Spezifische Genexpression von KLK3

290 LK (12,4%) zeigten in der RT-PCR eine erhöhte Expression von KLK3 (molN1). Von den 69 histopathologisch positiven LK konnten 66 LK (95,7%) auch molekularbiologisch anhand von erhöhten KLK3-Leveln identifiziert werden, nur drei LK (4,3%) zeigten trotz positiver Befunde in der konventionellen Aufarbeitung kein entsprechendes Korrelat in der KLK3-spezifischen RT-PCR. Im Vergleich zur histopathologischen Bewertung wurden über die molekularbiologisch detektierte KLK3-Expression weitere 224 LK entsprechend einem Anteil von 9,6% der simultan geprüften LK als nodal positiv identifiziert.

Aus dem Gesamtkollektiv der 111 Patienten waren somit 60 Patienten (54,1%) anhand einer signifikanten KLK3-Expression als molekularbiologisch positiv einzuordnen (Mittelwert 4,8 LK/Patient, min. 1 LK – max. 27 LK, Median 3 LK/Pat.). Über die Ergebnisse der Histopathologie mit Identifikation von 28 nodal positiven Patienten (25,2%) hinaus gelang mittels KLK3-RT-PCR die Identifikation von weiteren 32 Patienten (28,8%, pN0/molN1).

Patienten mit histopathologisch positiven LK (pN1/molN1) wiesen hierbei im Mittel 7,6 KLK3-positive LK auf (Range 1-27 LK, Median 5,5 LK/Pat.), histopathologisch negative Patienten (pN0/molN1) 2,4 KLK3-positive LK (Range 1 – 8 LK, Median 2 LK/Pat.).

3.2.2.2 Spezifische Genexpression von KLK2

Analog hierzu erfolgte die Ergebnisauswertung für den Marker KLK2.

Mittels RT-PCR konnte in insgesamt 215 LK (9,2%) eine erhöhte KLK2-Expression detektiert werden. Von den 69 histopathologisch positiven LK waren 62 LK (89,9%) auch molekularbiologisch KLK2-positiv, 7 LK (10,1%) wiesen konträr zu den Ergebnissen der konventionellen Histopathologie keine

entsprechende KLK2-Expression in der RT-PCR auf (10,1% der pN1-LK). Ergänzend zur histopathologischen Untersuchung konnten somit weitere 153 LK - entsprechend einem Anteil von 6,6% - als nodal positiv identifiziert werden.

55 Patienten des Gesamtkollektivs (49,5%) wiesen in der KLK2-RT-PCR positive Befunde auf (molN1), darunter alle 28 histopathologisch positiv determinierten Patienten (25,2%, pN1/molN1) sowie weitere 27 Patienten (24,3%) mit ausschließlich molekularbiologischen KLK2-Nachweis eines LK-Befalls (pN0/molN1).

Patienten mit histopathologisch positiven LK (pN1/molN1) wiesen im Mittel 5,8 KLK2-positive LK auf (Range 1 - 19 LK, Median 4 LK/Pat.), histopathologisch negative Patienten (pN0/molN1) 1,6 KLK2-positive LK (Range 0 – 6 LK, Median 1 LK/Pat.).

3.2.2.3 Vergleich der Detektionsmethoden

Durch die Kombination der Methoden Histopathologie sowie KLK2- bzw. KLK3-spezifischer RT-PCR fanden sich in 294 der 2333 LK positive Befunde (12,6%), folglich waren in 2039 LK (87,4%) weder histopathologisch noch molekularbiologisch lymphonoduläre Metastasen zu detektieren.

Die Histopathologie detektierte 69 maligne infiltrierte Lymphknoten (23,5% der gesamten Positivbefunde), molekularbiologisch ließen sich 291 positive Nodalbefunde (99,0%) abbilden; für den Marker KLK3 waren 98,6% entsprechend 290 aller 294 detektierten metastasierten Lymphknoten positiv zu testen, für den Marker KLK 2 73,1% entsprechend 215 LK des Kollektivs.

Die 291 molekularbiologisch positiven LK können weiter unterteilt werden in 214 LK mit einer gesteigerten Expression sowohl von KLK2 als auch KLK3 (73,5%), 76 LK mit einer alleinigen signifikanten Expression von KLK3 (26,1%) und einen einzelnen LK mit ausschließlichem Nachweis einer Überexpression von KLK2 in der RT-PCR (0,3%), siehe Abbildung 7.

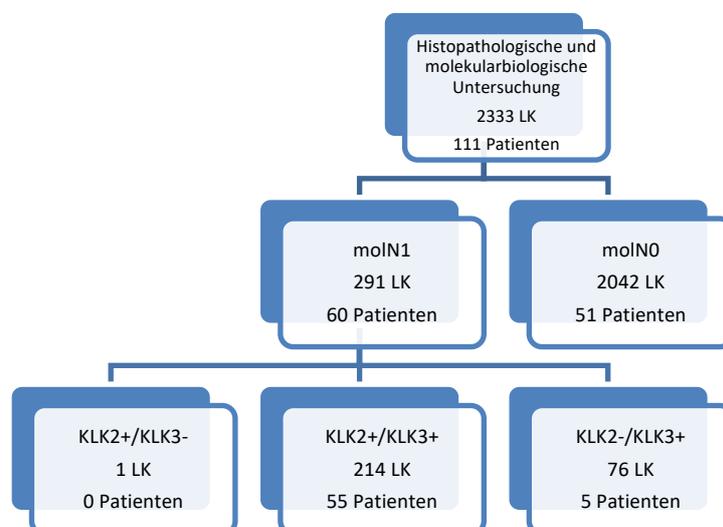


Abbildung 7: Marker-spezifische Identifikation molekularpositiver Patienten

Von den 69 histopathologisch positiven Lymphknoten wiesen 66 LK auch molekularbiologisch erhöhte Expressionslevel der molekularen Marker auf (95,7%), eine erhöhte Expression von KLK3 konnte in allen 66 LK, eine Überexpression von KLK2 in 62 LK (89,9%) gezeigt werden (siehe Abbildung 9).

Abzüglich dieser simultan histopathologisch und molekularbiologisch positiven Lymphknoten wurden somit in 225 der 2264 histopathologisch unauffällig bewerteten Lymphknoten (9,9%) mittels RT-PCR okkulte Metastasen detektiert, 153 LK zeigen eine gesteigerte KLK2-Expression, 224 LK eine erhöhte KLK3-Überexpression. Simultan erhöhte Expressionslevel von KLK2 und KLK3 finden sich in 152 LK, die alleinig gesteigerte KLK3- bzw. KLK2-Expression in 72 bzw. einem LK (siehe Abbildung 8).

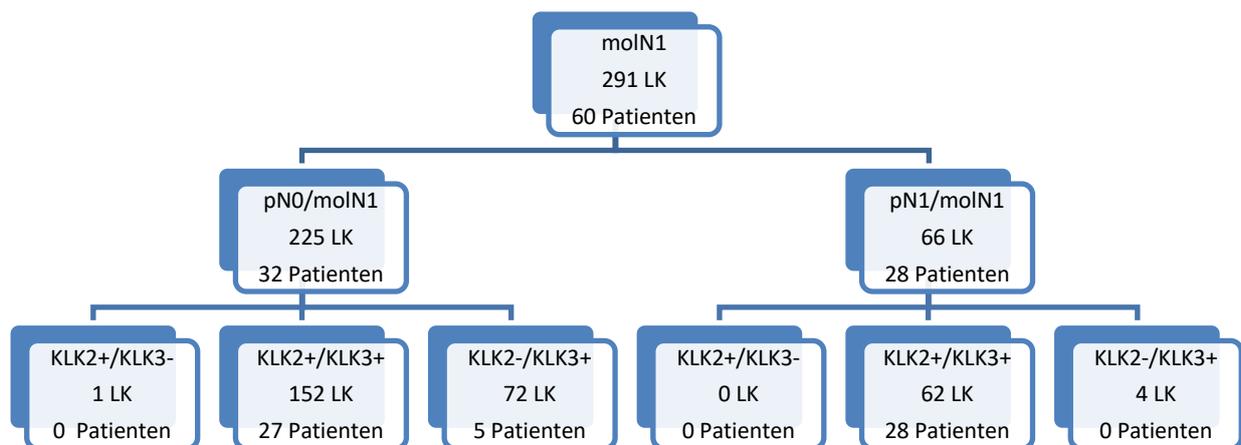


Abbildung 8: Marker-spezifische Aufteilung ausgehend vom Molekularstatus

Anhand der histopathologischen Begutachtung kann eine N1-Situation bei 28 Patienten des Gesamtkollektivs detektiert werden (25,2%), insgesamt 60 Patienten wiesen jedoch molekularbiologisch positive LK auf (54,1%).

Alle 28 Patienten mit histopathologisch positivem Nodalstatus zeigten entsprechende Befunde auch in der RT-PCR (pN1/molN1), während 32 Patienten ausschließlich über die molekularbiologische Methode als nodal positiv eingestuft werden konnten (pN0/molN1).

55 der 60 molekularbiologisch positiven Patienten können über die simultane Erhöhung der Expression von KLK2 und KLK3 identifiziert werden (91,7%), fünf Patienten sind lediglich anhand einer signifikanten KLK3-Genexpression zu klassifizieren (8,3%), diese wiesen alle ausschließlich einen KLK3-positiven Lymphknoten auf.

Anhand der erhöhten KLK3-Expression können somit alle 60 nodal positiven Patienten identifiziert werden (100%), anhand einer signifikant erhöhten KLK2-Expression 91,7%.

Allein anhand einer erhöhten KLK3-Expression konnten 72 LK von 34 Patienten detektiert werden. Für keinen Patienten wurde der molekulare Status hingegen mittels des singulären Nachweises einer gesteigerten KLK2-Expression determiniert (0,0%). Der einzelne ausschließlich KLK2-positive Lymphknoten war bei einem Patienten (Gesamtstatus pN0/molN1) mit insgesamt 4 molekularbiologisch positiven LK (gesamt 30 LK) zu beobachten, von denen die übrigen 3 LK sowohl eine erhöhte Expression von KLK2 als auch KLK3 zeigten.

Ebensowenig wird ausschließlich anhand der histopathologischen Einordnung der nodale Gesamtstatus eines Patienten determiniert: sowohl die drei Patienten mit histopathologisch positiven, aber KLK2/3-negativen LK in der RT-PCR als auch die drei Patienten mit histopathologisch positiven Befunden in LK unter 3mm (und folglich Fehlen einer parallelen molekularbiologischen Beurteilung) wiesen jeweils weitere LK mit sowohl histopathologisch als auch molekularbiologisch positiven Befunden auf, sodass der Gesamtstatus aller Patienten abschließend als histopathologisch und molekularbiologisch positiv zu bewerten waren (pN1/molN1).

Für 51 Patienten konnte mit keiner der Methoden eine lymphatische Metastasierung nachgewiesen werden (46,0%, pN0/molN0).

Molekularbiologisch positive (KLK2 u./o. 3), aber histopathologisch negative LK fanden sich häufiger bei Patienten mit sowohl histopathologisch als auch molekularbiologisch nachgewiesenen Metastasen (pN1/molN1-Patienten, 148 LK, im Mittel 5,3 LK/Patient) als im Patientenkollektiv ohne histopathologisch positive Befunde (pN0/molN1-Patienten, 77 LK bei im Mittel 2,4 LK/Patient), dies war auch bei isolierter Betrachtung der nur KLK2-positiven, nur KLK3-positiven und kombiniert KLK2+3-positiven Lymphknoten zu erkennen.

3.3 Topographische Verteilung der Lymphknoten

Die 2333 LK der insgesamt 3173 entnommenen LK, welche sowohl histopathologisch als auch molekularbiologisch aufgearbeitet wurden, entstammten den acht vordefinierten Regionen der Aa. iliaca externa und Fossae obturatoriae - im Sinne des Standard-LAE-Feldes - sowie darüber hinaus den Regionen der Aa. iliaca communis und interna als erweiterte Lymphadenektomie, schematisch dargestellt in Abbildung 9.

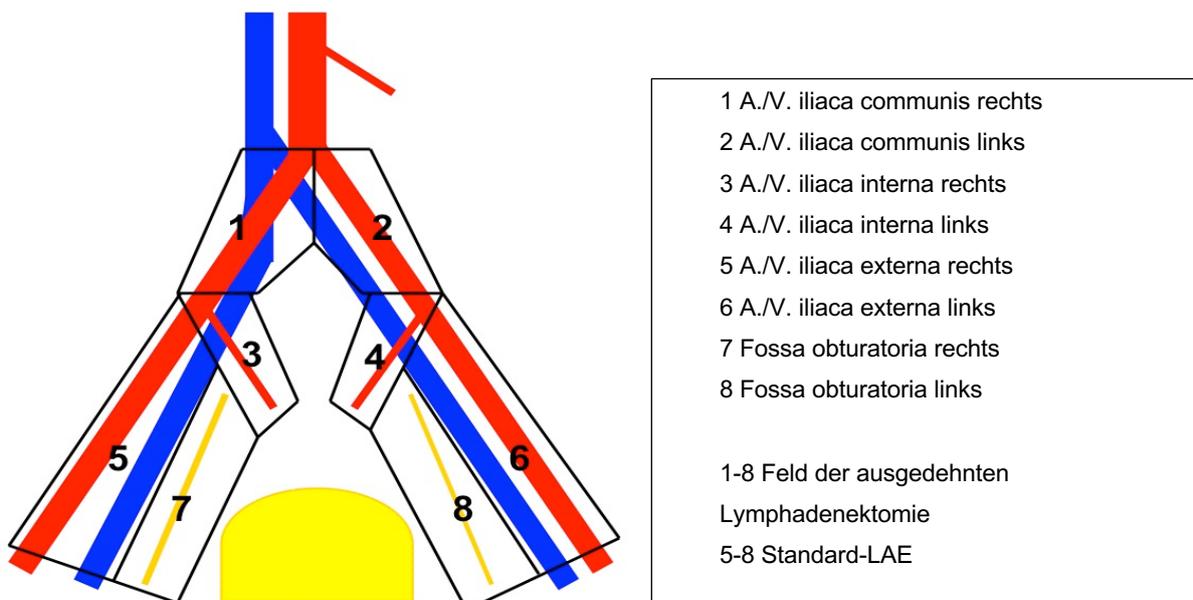


Abbildung 9: Anatomische Lage der Resektionsfelder

Die Verteilung aller resezierten Lymphknoten zeigt Abbildung 10. Im Standard-LAE-Feld fanden sich 1686 LK (entsprechend 72,3% aller Lymphknoten) mit einem Anteil von 659 LK (28,2%) im Bereich der externen Iliacalgefäße und 1027 LK (44,0%) im Bereich der Fossae obturatoriae. Konsekutiv verteilten sich die übrigen 647 LK (27,7%) auf die Regionen der internen Iliacalgefäße (338 LK, 14,5%) sowie Vv./Aa. iliaca communis (309 LK, 13,2%).

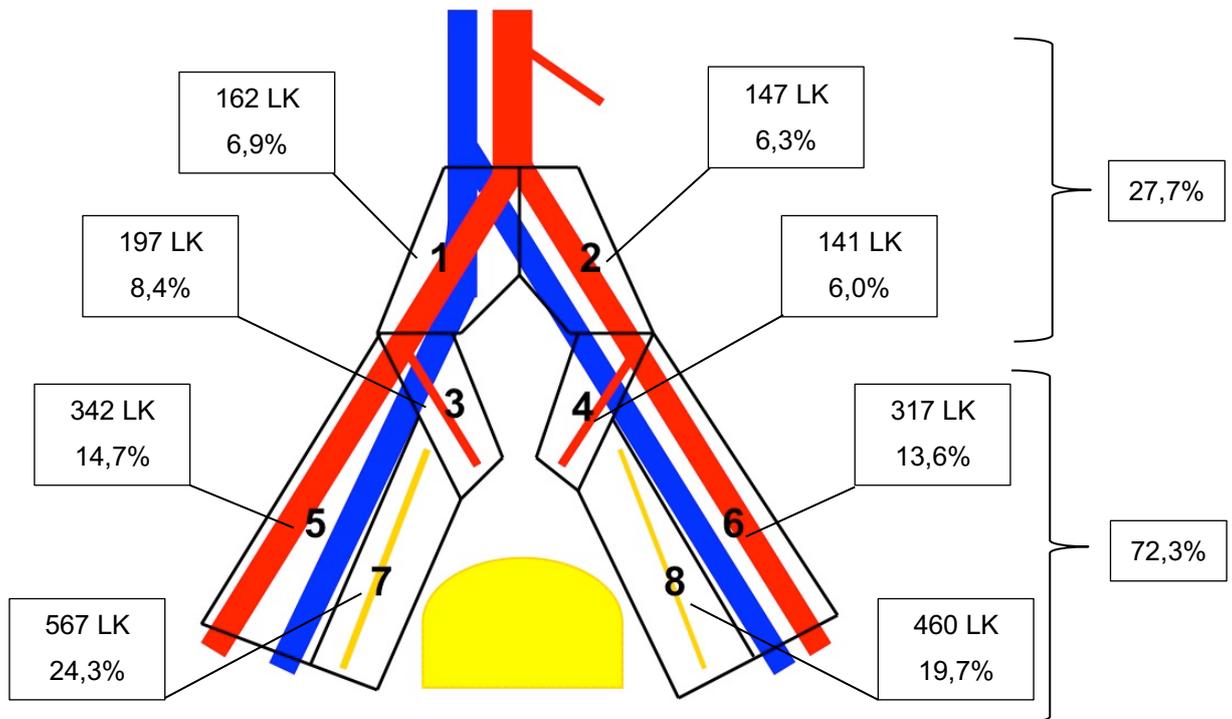


Abbildung 10: Verteilung aller resezierten Lymphknoten

Abbildung 11 verbildlicht die topographische Lage der 69 histopathologisch positiven Lymphknoten. Diese fanden sich zu 71,0% (49 LK) im Bereich der Standard-LAE-Felder mit 26 LK (37,7%) entlang der AA./Vv. Iliacae externae und 23 LK (33,3%) in den Fossae obturatoriae. Durch die erweiterte Lymphadenektomie konnten weitere 20 LK (29,0%) detektiert werden, von welchen 12 LK (17,4%) entlang der Aa./Vv. Iliacae internae und 8 LK (11,6%) im Bereich der Aa./Vv. Iliacae communis zu finden waren.

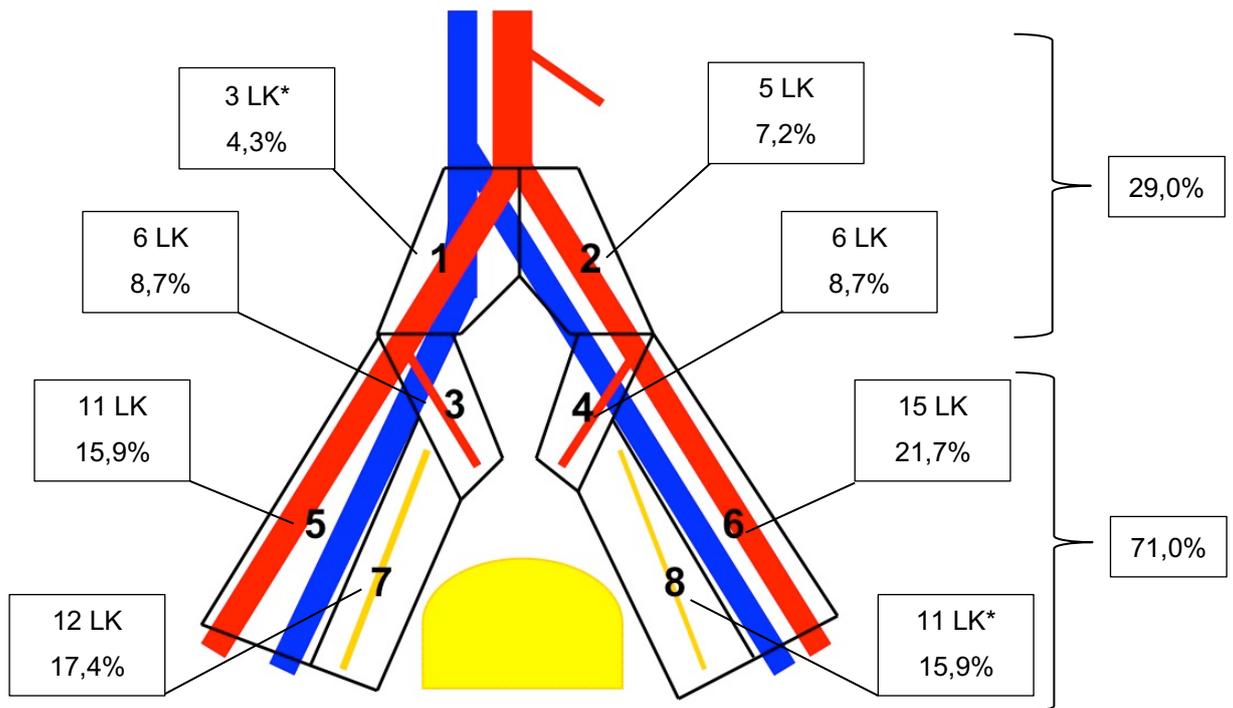


Abbildung 11: Topographie der histopathologisch positiven LK

Für die 291 KLK2- und/oder KLK3-positiven LK zeigt sich eine Verteilung mit 211 LK entsprechend einem Anteil von 72,5% in den Regionen 5-8 im Sinne des Standard-LAE-Feldes und 27,5% der Befunde (80 LK) außerhalb dieses Bereichs. 46% der positiven Lymphknoten finden sich in den Fossae obturatoriae, weitere annähernd 27% entlang der Aa./Vv. iliacaе externaе (Abbildung 12).

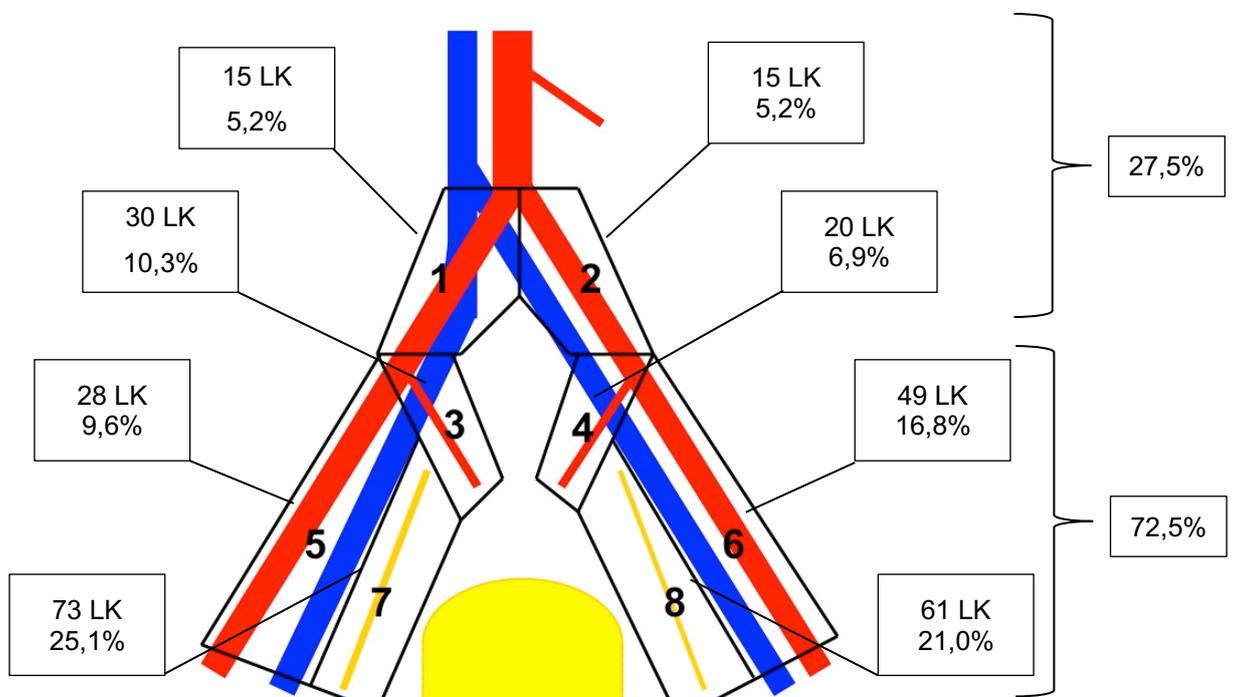


Abbildung 12: Topographische Verteilung aller molekularpositiven LK (KLK2 und/oder KLK3)

Die Unterteilung aller molekularbiologisch positiver Lymphknoten in die Untergruppen KLK2 mono (215 LK), KLK3 mono (290 LK) und KLK2/3 (214 LK) zeigt ein annähernd gleiches Verteilungsverhältnis auf die definierten Regionen (siehe Abbildung 13).

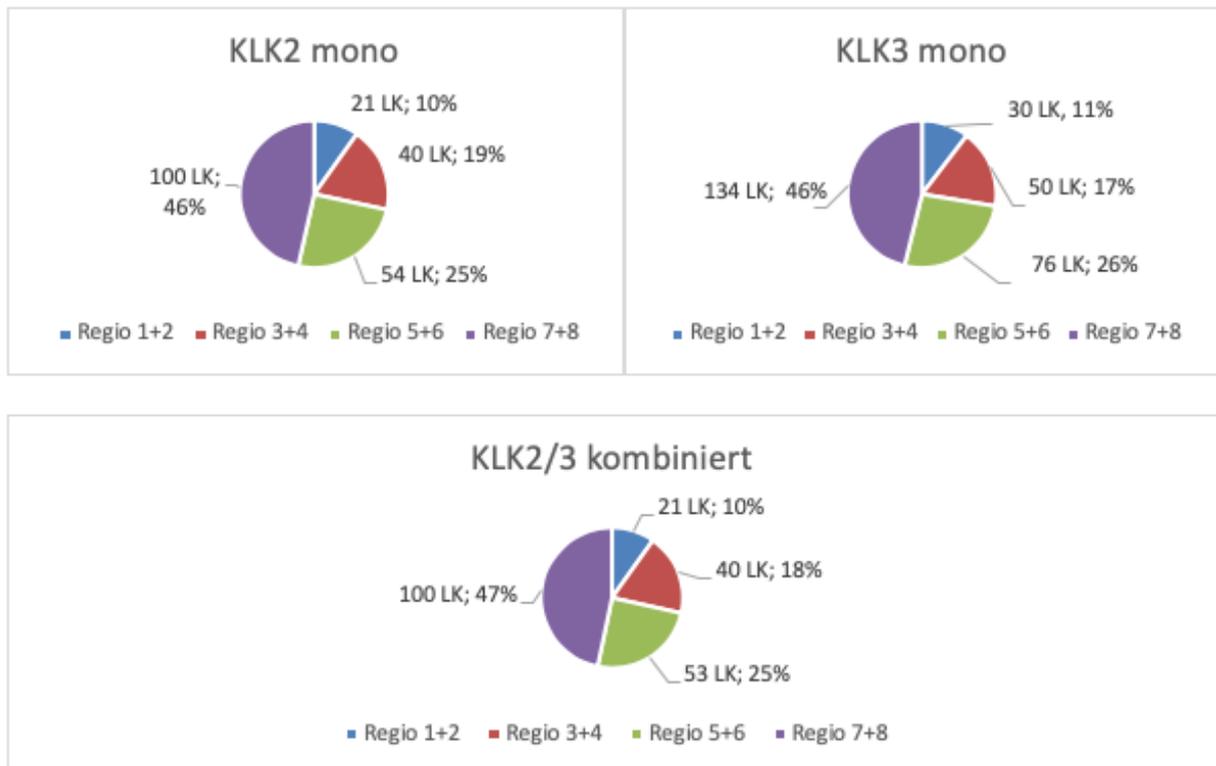


Abbildung 13: Marker-spezifische Verteilung der molekularbiologisch positiven Lymphknoten

Die in Abbildung 14 dargestellten 225 ausschließlich molekularbiologisch positiven LK verteilten sich zu 72,4% auf das Feld der Standard-LAE mit nahezu der Hälfte aller positiven LK in den Fossae obturatoriae (49,8%). Außerhalb der Standard-Regionen lagen 27,6% der LK, hiervon 16,9% im Bereich der Aa./Vv. Iliacae internae und noch 10,7% im Bereich der Aa./Vv. Iliacae communis.

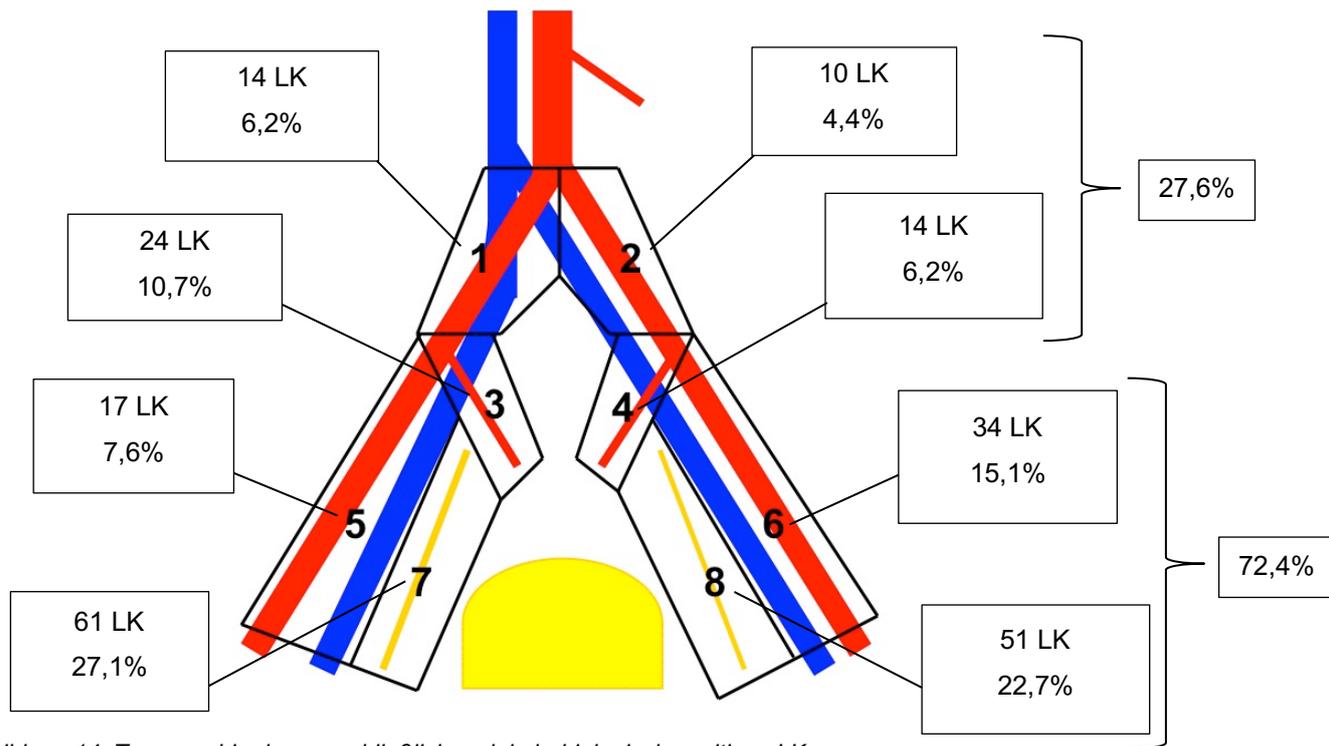


Abbildung 14: Topographie der ausschließlich molekularbiologisch positiven LK

Der Abbildung 15 ist analog hierzu die Unterteilung der ausschließlich molekularbiologisch positiven LK in die 153 KLK2-positiven, 224 KLK3-positiven und 152 kombiniert KLK2-/KLK3-positiven LK zu entnehmen, für welche sich eine ähnliche Verteilung zeigt. Im Gebiet der Standard-LAE liegen 71,2% (KLK2), 72,3% (KLK3) bzw. 72,3% (KLK2+KLK3), in den darüber hinaus gehenden Feldern 28% (KLK3) bzw. 29% (KLK2, KLK2+3).

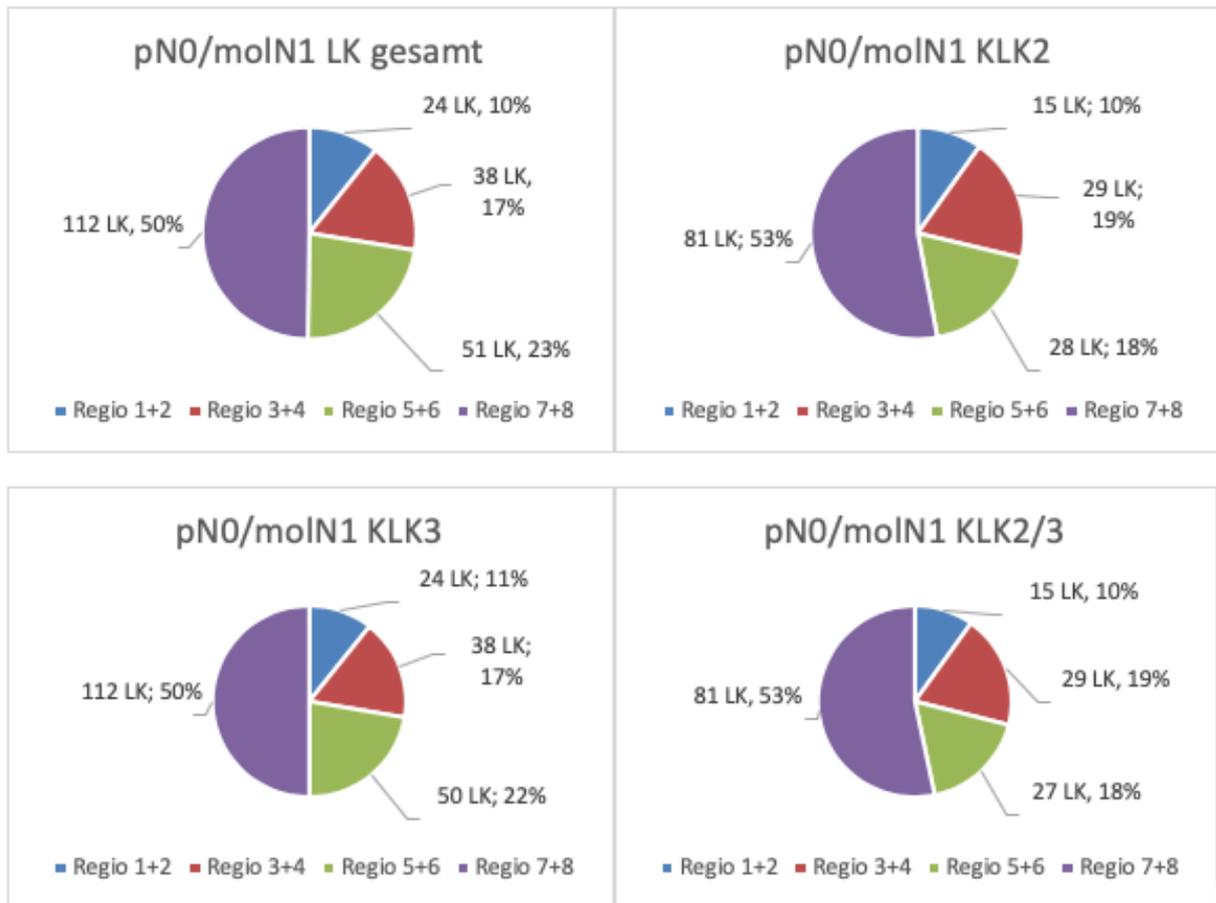


Abbildung 15: Marker-spezifische Verteilung der ausschließlich molekularbiologisch positiven Lymphknoten

Abbildung 16 stellt die topographische Verteilung der pN1/moIN1 Lymphknoten dar. Die 66 kombiniert histopathologisch und molekularbiologisch positiven LK verteilen sich mit einem Anteil von 72,7% auf die vier Felder der Standard-LAE mit dem prozentual größten Anteil von 39,4% entlang den Aa./Vv. iliacaе externaе. Die 27,3% der LK außerhalb der Regionen 5-8 verteilen sich zu zwei Dritteln im Bereich der Aa./Vv. iliacaе internaе und zu einem Drittel entlang den Aa./Vv. iliacaе communis.

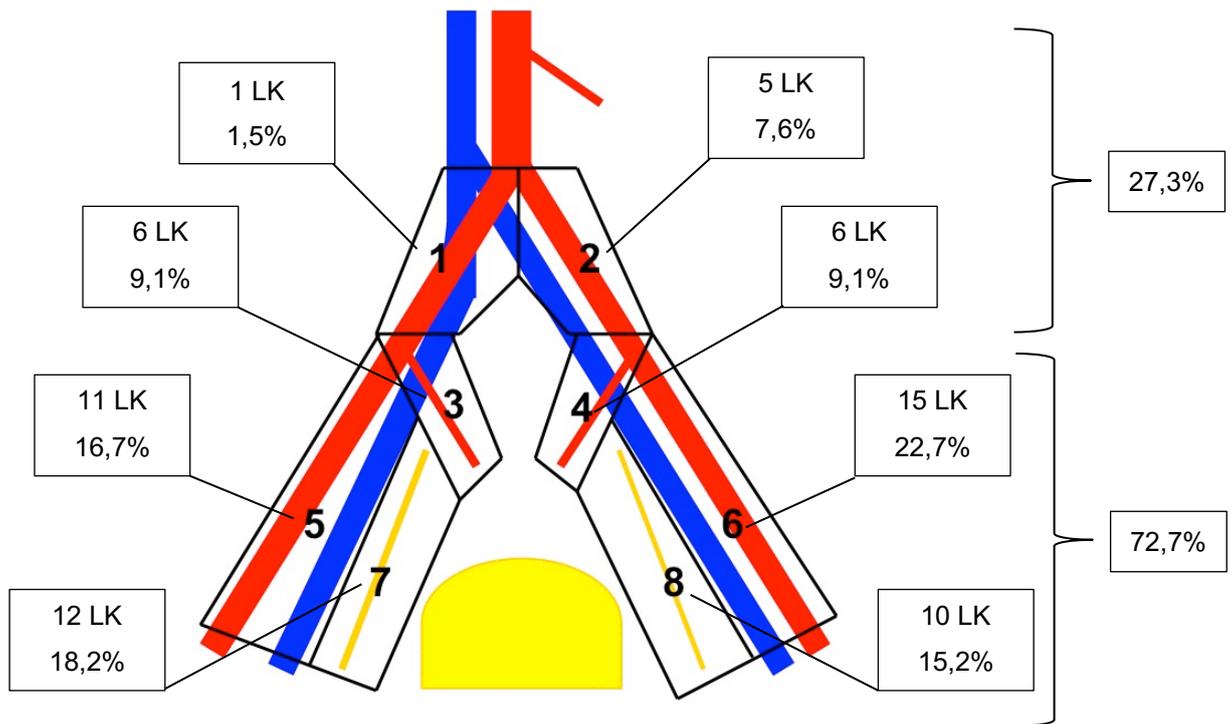


Abbildung 16: Topographische Verteilung der pN1/moIN1 Lymphknoten

Auch in der Gesamtauswertung aller 294 in einer der beiden Untersuchungsmethoden positiv determinierter LK (Abbildung 17) spiegelt sich eine ähnliche Aufteilung der Befunde innerhalb (72,1%) und außerhalb (27,9%) des Feldes der Standard-LAE wider. In abnehmender Anzahl finden sich die maligne infiltrierten Lymphknoten in den Regionen der Fossa obturatoria (45,9%), Aa./Vv. iliaca externa (26,2%), Aa./Vv. iliaca interna (17,0%) und Aa./Vv. iliaca communis (10,9%).

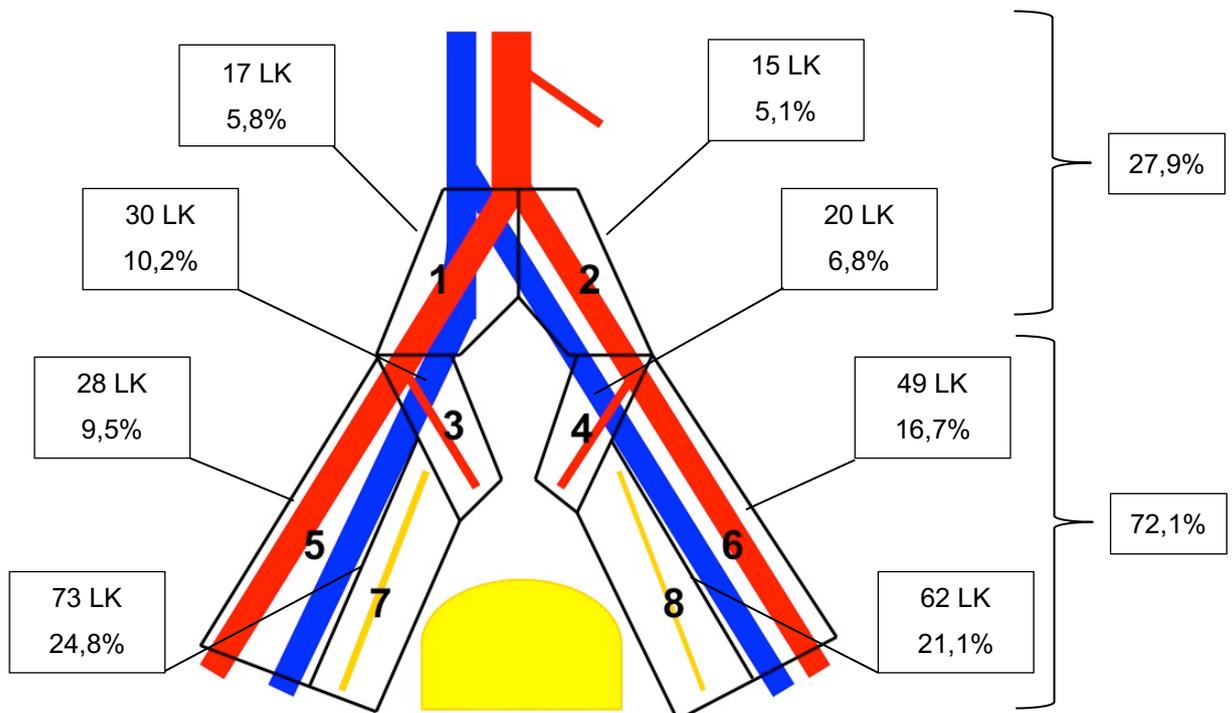


Abbildung 17: Topographie der molekularbiologisch und/oder histopathologisch positiven LK

Die topographische Lage zeigte folglich eine für alle Subgruppen vergleichbare prozentuale Verteilung der Lymphknoten auf die Resektionsfelder mit annähernd konstanter Aufteilung auf die Regionen der Standard-LAE bzw. darüberhinausgehende Resektionsfelder wie in Abbildung 18 dargestellt.

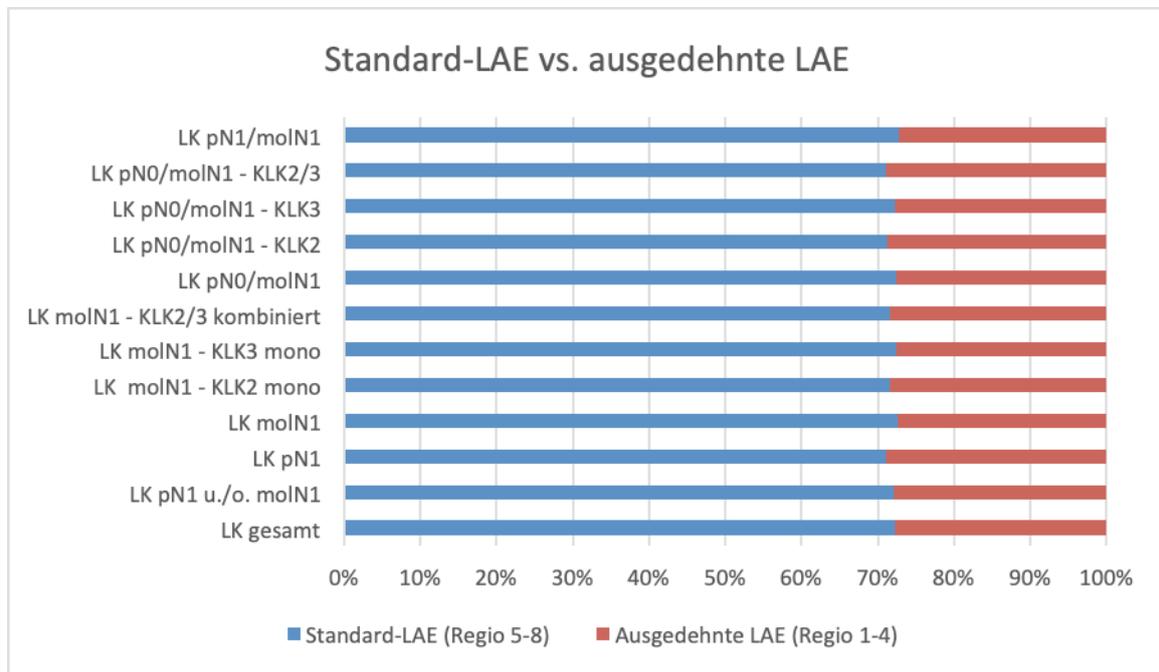


Abbildung 18: Prozentuale Verteilung der LK auf die Felder der Standard- und ausgedehnten Lymphadenektomie

Anhand der topographischen Aufschlüsselung können für 52 der 60 nodal positiven Patienten (86,7%) lymphonoduläre Metastasen in den Feldern der Standard-LAE (Regionen 5-8) gezeigt werden, 23 Patienten (38,3%) weisen ausschließlich innerhalb dieser vier Regionen positive Nodalbefunde auf.

Bei insgesamt 37 Patienten (61,7%) finden sich in den Feldern 1-4 metastasierte Lymphknoten, entlang der Aa./Vv. iliacaе internaе bei 30 Patienten (50%), entlang der Aa./Vv. iliacaе communis bei 18 Patienten (30%). Jeweils vier Patienten (6,7%) waren nur anhand eines positiven Befundes in einer dieser Regionen entsprechend zu klassifizieren. Diese acht Patienten (13,3%) weisen keine histopathologisch und/oder molekularbiologisch positiven LK im Gebiet der Standard-LAE auf und sind bzgl. ihres Nodalstatus somit mittels einer Standard-LAE nicht korrekt zu klassifizieren.

Bemerkenswert ist ferner, dass 15 Patienten (25%) anhand eines einzelnen LK-Befundes als nodulär positiv klassifiziert werden konnten, von welchen nur 60% im Standard-LAE-Feld (9 Patienten) und 40% in den darüber hinausgehenden Felder der ausgedehnten LAE (6 Patienten) lagen.

4. Diskussion

4.1 Studiendesign

Die durch das Ethikkomitee befürwortete Studie schloss nach entsprechender Aufklärung und Zustimmung Patienten mit einem lokal operablen, stanzbioptisch gesicherten Adenokarzinom der Prostata mit Vorhandensein von mittleren oder Hochrisikofaktoren (Gleason Score ≥ 7 , PSA > 10 ng/ml, cT $\geq T2b$) ohne vorangegangene Chemotherapie, präoperative antiandrogene Therapie oder pelvine Strahlentherapie ein. Hierdurch konnte ein Einfluss einer neoadjuvanten Therapie auf das zu untersuchende lymphatische Gewebe mit möglicherweise Induktion von Veränderung des Verteilungsmusters oder Einfluss auf die Vitalität der Zellen vermieden und der spontane Krankheitsverlauf abgebildet werden.

Das mittlere Patientenalter mit 66 Jahren (44 – 82 Jahren mit 55% der Patienten zwischen 65 – 75 Jahren) bildete das empirisch durchschnittliche Erkrankungsalter von 70 Jahren in der Allgemeinbevölkerung annähernd ab, der leichte Trend zu einem jüngeren Studienkollektiv kann durch die Einschlusskriterien der Studie mit Ausschluss von Patienten mit schweren kardiovaskulären, pulmonalen, renalen, hepatischen oder hämatopoetischen Erkrankungen sowie dem Vorhandensein eines Zweitmalignoms mitbedingt sein.

Durch die Klassifizierung in Risikogruppen anhand der Kriterien prätherapeutischer PSA-Wert, Gleason-Score und cTNM-Klassifikation im Sinne der D'Amico-Klassifikation (D'Amico et al., 1998) war eine Zuordnung von 32 der 111 eingeschlossenen Studienpatienten (29%) in die „intermediate risk“-Kategorie und 79 Patienten (71%) in die „high risk“-Gruppe möglich. Die Zugehörigkeit zu einer höheren Risikogruppe ist mit einer steigenden Wahrscheinlichkeit des Vorliegens einer lymphonodulären Metastasierung verbunden (Briganti et al., 2006) und hat auch prognostische Bedeutung. So konnten Eggener et al. in einem Patientenkollektiv von 11521 Patienten mit einer Prostatakrebs-spezifischen Mortalität nach RPE von 7% nach 15 Jahren für die Patientensubgruppe mit einer lymphonodulären Metastasierung ein deutlich erhöhtes Risiko von 22-30% zeigen (Eggener et al., 2011).

Bei nur eingeschränkter Sensitivität und Spezifität der bildgebenden Verfahren wird im Rahmen der präoperativen Stadiendiagnostik mit Hilfe von Nomogrammen (Partin et al., 2007, Briganti, MSKCC) die Wahrscheinlichkeit des Vorliegens befallener Lymphknoten zu determinieren versucht. Diese basieren analog zur Risikogruppierung nach D'Amico maßgeblich auf den Faktoren PSA-Wert, Gleason-Score und cTNM-Klassifikation. In einer revidierten Version des Briganti-Nomogramms aus dem Jahr 2012 wird neben den klassischen Risikofaktoren (Gleason-Score, PSA, TNM-Stadium) auch die Anzahl positiver Stanzbiopsien berücksichtigt (Briganti et al., 2012), bei einem negativ prädiktiven Wert von 98% und einer Sensitivität von 87.8% bzw. Spezifität von 70.3% wurde als Indikation zur Lymphadenektomie ein Cut-off bei einem Risiko von größer als 5% empfohlen. Diese Ergebnisse finden Abbildung in den Empfehlungen der EAU. Der Einfluss positiver Stanzbiopsie-Raten sowie auch die Korrelation zwischen Alter und Risiko einer systemischen Progression bzw. Mortalität (D'Amico et al., 2000; Siddiqui et al., 2006) fanden in der Studie zugrundeliegenden Risikogruppierung jedoch keine Berücksichtigung.

In einem anhand dieser Kriterien selektierten Patientenkollektiv mit 71% „high risk“-Patienten konnte folglich eine hohe Rate nodal positiver Patienten mit ausgedehntem Metastasierungsmuster erwartet werden.

4.2 Materialgewinnung

4.2.1 Operatives Vorgehen

Die RPE als primäre Therapieoption für Patienten mit klinisch lokal begrenztem Prostatakarzinom senkt signifikant die Häufigkeit einer Progression der Erkrankung, das Risiko einer Fernmetastasierung, die prostatakarzinomspezifische Mortalität und die Gesamtmortalität verglichen mit einem palliativen Vorgehen im Sinne einer „Watchful Waiting“-Strategie (ProtecT-Studie; Hamdy et al., 2016; Wilt et al., 2012; Bill-Axelson et al., 2011). Als Qualitätsindikatoren der RPE gelten neben dem tumorfreien Absetzungsrand die Erhaltung der erektilen Funktion sowie der Harnkontinenz; in unserer Studie erfolgte die operative Behandlung mittels offener radikaler retropubischer Prostatektomie durch vier erfahrene Operateure der Urologischen Klinik des Klinikums Rechts der Isar in München, welche in einem Drei-Jahres-Zeitraum (Februar 2010 bis Februar 2013) unter Beachtung des operativen Standards und der Anforderungen des Studienprotokolls die Lymphadenektomie entsprechend einem vorgegebenen Schema mit acht separiert zu entnehmenden Resektionsfeldern durchführten. Hierdurch konnten Einflüsse durch Umwelt oder interindividuell verschiedene personelle Fähigkeiten minimiert und die Vergleichbarkeit bzgl. Qualität des operativen Vorgehens sowie Quantität des resezierten Materials optimiert werden.

Die anhand des definierten Templates entnommenen Proben der bilateralen Fossae obturatoriae sowie der Bereiche um die externen, internen und communen Iliakalgefäße beider Seiten definierten ein zwischen Aortenbifurkation kranial, Leistenkanal distal und lateral durch die Harnleiter begrenztes Resektionsfeld mit insgesamt acht einzelnen Regionen, welche eine klare regionale Zuordnung jeder einzelnen Probe ermöglichten.

4.2.2 Präparation der Proben

Durch ein Team von vier Doktoranden erfolgte unverzüglich nach Entnahme der Lymphknoten die Präparation des Gewebes parallel zur fortlaufenden Operation. Durch den systematischen Ablauf entsprechend eines standardisierten Protokolls waren personenbezogene Einflüsse zu minimieren und Integrität der lymphonodulären Proben sowie Qualität der Aufarbeitung zu optimieren. Durch die Arbeit unter sterilen Bedingungen und die zeitnahe Kryokonservierung des Probenmaterials in flüssigem Stickstoff bei -80°C war eine bestmögliche Integritätswahrung der RNA zu gewährleisten.

Im Rahmen der Aufarbeitung der Proben für die beiden Nachweisverfahren - die Histopathologie entsprechend dem konventionellen, leitliniengerechten Vorgehen sowie der molekularbiologischen Bewertung mittels PCR im Rahmen unserer Studie - wurden die Lymphknoten innerhalb von 10 Minuten nach Entnahme aus dem anhaftenden Gewebe isoliert und entsprechend ihrer Größe prozessiert. Um eine möglichst homogene Beurteilung in beiden Untersuchungsverfahren zu gewährleisten, erfolgte die Aufteilung eines jeden Lymphknotens in drei Teile, von denen die lateralen Anteile mit einem Volumen von 10% bzw. 50% der Gesamtmasse in Formalin fixiert der Pathologischen Klinik des Klinikums Rechts der Isar zur histopathologischen Aufarbeitung zugeführt wurden, ein jeweils 40%iger Anteil wurde zur späteren Aufarbeitung mittels RT-PCR ummantelt von steriler Alufolie unverzüglich bei -80°C kryokonserviert. Lymphknoten über 20mm wurden zunächst zerteilt und jedes Teilstück entsprechend bearbeitet; lymphonoduläre Proben unter 3mm konnten ausschließlich histopathologisch bewertet

werden. Durch die abschnittsweise Aufteilung des Lymphknotens war die bestmögliche Darstellung des Gewebebildes in der histopathologischen Aufarbeitung sicherzustellen. Eine inhomogene Durchsetzung eines Lymphknotens mit lokalisierten metastatischen Zellabsiedlungen kann zu falsch-negativen Untersuchungsergebnissen führen, sollten diese in einem der präparierten Materialanteile nicht erfasst sein. Die histopathologische Untersuchung erfordert hierbei im direkten Vergleich zur molekularbiologischen Methode eine lokalisierte höhere Dichte maligner Zellen. Durch die exakte Bezeichnung und Katalogisierung der Proben war im Weiteren zu jedem Zeitpunkt eine exakte Zuordnung der Proben bzgl. Lokalisation und die Korrelation der Proben zwischen den Untersuchungsvarianten möglich.

4.2.3 Einflüsse auf die Probengewinnung und Qualität der angewandten Methoden der Detektion einzelner Tumorzellen im lymphatischen Gewebe

Verschiedene Faktoren führten zu einem Verlust von lymphonodulärem Material für die weitere Untersuchung. So konnte nicht bei allen Patienten Material aller acht Regionen entnommen werden, ursächlich hierfür war z. B. eine eingeschränkte Mobilisationsfähigkeit durch Verwachsungen im Operationsgebiet. Zudem konnten in der histopathologischen Untersuchung des entnommenen Restgewebes im Rahmen der perioperativen Präparation nicht isolierte Lymphknoten detektiert werden, welche jedoch aufgrund ihrer Größe einer Untersuchung in beiden Methoden ohnehin nicht zugänglich gewesen wären.

Lymphknoten unter einem Durchmesser von 3mm gingen für die molekularbiologische Begutachtung verloren, da ihr Volumen bei einer weiteren Unterteilung keine suffiziente Menge an Untersuchungsmaterial erlaubt hätte und im Sinne der Qualitätssicherung primär eine regelhafte histopathologische Beurteilung des Gewebes entsprechend den Empfehlungen der Leitlinien erfolgen musste. Neben der rein technischen Limitierung der Zerteilung sehr kleiner lymphonodulärer Proben muss auch die für die RT-PCR bzw. die Amplifikation mit Hilfe einer Taq-Polymerase sinnhafte Mindestmenge an Template vorzulegen sein. Die theoretische Kompetenz der PCR zur Amplifikation eines einzelnen Genproduktes ist in der Praxis bei Vorhandensein eines „Grund- bzw. Hintergrundrauschens“ eingeschränkt sensitiv. Durch die Standardisierung der Probenmenge und Normalisierung der Ergebnisse gegen Referenzgene konnten ein quantitativer Mangel an Probenmaterial oder eine zu geringe Sensitivität des Ansatzes jedoch ausgeschlossen werden.

Die höhere Sensitivität der PCR gegenüber konventionell-histopathologischer Methoden konnte jedoch in früheren Studien bereits belegt werden (Deguchi et al., 1993; Martínez-Piñeiro et al., 2003).

In den 762 LK (24%) mit ausschließlich histopathologischer Bewertung wiesen jedoch drei lymphonoduläre Proben bereits mikroskopisch eine Mikrometastasierung auf, sodass unter Berücksichtigung der höheren Sensitivität der PCR bzgl. der Detektion einer Mikrometastasierung retrospektiv sogar von einer höheren Rate eines histopathologisch nicht erkenntlichen Befalls auch dieser primär nicht suspekten LK auszugehen ist. Eine Optimierung der histopathologischen Methode durch die Untersuchung feinerer Schnitte oder Ergänzung immunhistochemischer Untersuchungen könnte auch hier die Detektionsrate sehr kleiner Absiedlungen metastatischer Zellen steigern, hierbei muss jedoch der erhebliche Personal- und Kostenmehraufwand berücksichtigt werden.

4.2.3.1 Degradierung der RNA

Entscheidend für die Qualität der RT-PCR ist der Erhalt der Probenintegrität im Rahmen der intra-/perioperativen Gewinnung und Weiterverarbeitung. Die als Ausgangsmatrize für die Synthese der cDNA dienende natürliche RNA der Zellen ist äußerst anfällig für den Abbau durch ubiquitär vorkommende Ribonukleasen (RNasen), welche eine Degradierung der RNA mit konsekutivem Verlust der Information zur Folge haben. Zum Schutz des empfindlichen Materials erfolgte daher nach Resektion der Proben deren umgehende Kühlung und rasche Weiterverarbeitung unter Verwendung ausschließlich RNase-freier Materialien. Die präparierten Lymphknoten wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C schockgefroren, alle weiteren Verarbeitungsschritte erfolgten bis zur Stabilisierung der RNA durch Inaktivierung der RNasen mittels RNA later im Rahmen der Guanidium-Thiocyanat-Phenol-Chloroform-Methode ebenso auf Eis. Die Durchsetzung des Gewebes durch RNA later bewirkt durch dessen hohe Konzentrationen an quartären Ammonium- und Caesiumsulfaten ein Ausfallen der RNasen sowie DNasen und Proteasen, sodass eine weitgehend zeitunabhängige Weiterverarbeitung unter Raumlufttemperatur möglich war. Somit war die Konservierung der maximalen Menge an RNA zu gewährleisten und konsekutiv ein Informationsverlust für die Ergebnisse der RT-PCR zu vermeiden.

4.2.3.2 Entdifferenzierung der Zellen

Unabhängig von der Qualität der Methodik haben jedoch auch die Tumorzellen selbst Einfluss auf das Ergebnis der PCR. Eine Entdifferenzierung der Zellen führt zu einer Veränderung der Zellstruktur bis zum Verlust der Zelltyp-definierenden Merkmale i. S. einer Anaplasie. Schlecht differenzierte Tumorzellen zeichnen sich unter Umständen durch eine niedrigere Produktion von PSA oder anderen zelltypischen Markern aus, sodass hier ein inverses Verhältnis zwischen Malignität bzw. Invasivität und Höhe der Expression der Zellproteine/Tumormarker besteht. Folglich resultieren falsch-negative Ergebnisse in der Aufarbeitung der Zellen. Aber auch andere Gewebe exprimieren PSA sowie KLK2 (Olsson et al., 2005), sodass in solchen eine Dysregulation mit Über-Expression von Zellmarkern durch nicht-prostatische Malignome oder andere Grund-/Nebenerkrankungen möglich wäre, welche falsch positive Ergebnisse bedingen können. Durch die Ausschlusskriterien des Studienprotokolls und eine selektive Markerauswahl wurden diese Fehlerquellen zu umgehen versucht.

4.2.4 Kontrolle, Sensitivität und Spezifität der RT-qPCR

Die Überprüfung der RT-PCR erfolgte anhand der Expression von Referenzgenen als ubiquitär unabhängig von Veränderungen der Zelle selbst oder äußeren Einflüssen exprimierte, nicht-regulierte Gene, deren Auswahl wir mit Hilfe der von Vandesompele et al. beschriebenen gNorm-Analyse-Software aus einer Testreihe mit insgesamt sechs Genen bestimmten. Aufgrund ihres weitgehend stabilen Expressionsmusters in lymphonodulärem Gewebe wurden hierfür Hypoxanthinphosphoryl-Transferase 1 (HPRT1) und Ubiquitin C (UBC) ausgewählt. Jeder Probenansatz wurde über die Expression von HPRT1 und UBC auf seine Plausibilität geprüft, beide Gene konnten in allen untersuchten Proben detektiert werden.

In LnCAP-Verdünnungsreihen konnte die Sensitivität des PCR-Ansatzes für die entsprechenden Marker als Detektion einer LnCAP-Zelle bzw. einer Anzahl von 10 KLK2/3-Kopien in je einer Millionen

mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (PBMC) bestimmt werden. Anhand der erwartungsgemäßen Expression der Marker KLK3 und KLK2 in den Positivkontrollen der einzelnen Reaktionsansätze unter Verwendung von LnCAP-Zellen war die korrekte Versuchsdurchführung zu kontrollieren. Eine falsch-positive Amplifikation der untersuchten Marker war durch eine Negativkontrolle (non-template-control) der Ansätze mittels Ersatzes der aus den lymphatischen Gewebeproben extrahierten cDNA durch Wasser zu detektieren. Der Nachweis eines Genprodukts in einem dieser Ansätze ohne Addition unserer cDNA als Replikationsgrundlage zeigt eine Kontamination der verwendeten Materialien oder Reagenzien durch fremde Nukleinsäuren an, dies konnte in den durchgeführten Reaktionen ausgeschlossen werden.

Die Spezifität der Methodik konnte durch den Vergleich der Ergebnisse gegen die entsprechenden Expressionslevels der Marker in Lymphknoten gesunder Probanden gezeigt werden. Als Kontrollgruppe dienten 143 nach Zystoprostektomie mit Lymphadenektomie bzgl. des Vorliegens eines Prostatakarzinoms histopathologisch negativ getestete Lymphknoten von 25 männlichen Blasen-tumor-Patienten. Im Vergleich zur Höhe der Expression von KLK3 und KLK2 in diesen in früheren Versuchen einer Arbeitsgruppe unserer Klinik anhand von CK20 auch bzgl. des Vorliegens eines Blasenkarzinoms negativ definierten Lymphknoten (Retz et al., 2001) wurde ein Grenzwert für den molekularen Nachweis des Vorliegens einer lymphatischen Metastasierung bestimmt, bei dessen Überschreiten eine N1-Situation zu definieren war.

4.3 Ergebnisbewertung

Neben den in der prätherapeutischen Diagnostik in Nomogrammen berücksichtigten Risikofaktoren kommt dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen eine hohe prognostische Bedeutung zu (Briganti et al., 2009). Hierbei spielen sowohl die Sensitivität der Detektionsmethode als auch die Ausdehnung der Lymphadenektomie und Anzahl untersuchter Lymphknoten eine entscheidende Rolle.

In einem Literatur-Review aus dem Jahr 2017 wurde die Lymphadenektomie als diagnostische Maßnahme zur Beurteilung des Ausbreitungsstadiums weiterhin als unumgänglich eingestuft (Fossati et al., 2017). Die therapeutische Bedeutung der Lymphadenektomie bleibt hierbei jedoch weiter unsicher, ein Einfluss auf das Gesamt-Überleben konnte nicht, eine Auswirkung auf das Prostatakrebs-spezifische Überleben nur in retrospektiven Studien gezeigt werden (Fossati et al., 2017; Chen et al., 2019). Potentiell kurativer Nutzen liegt jedoch in der Resektion metastatischer Lymphknoten bei Patienten mit einem nur limitierten, ergo vollständig resezierten nodalen Befall zum Zeitpunkt der Operation, zudem kann indirekt über die Auswahl und das Ausmaß der adjuvanten Therapie anhand der Erkenntnisse der Lymphadenektomie Einfluss auf den Krankheitsprogress (biochemisches Rezidiv, klinisch apparente Metastasierung) und die Prostatakrebs-spezifische Mortalität genommen werden (Fossati et al., 2017, Abdollah et al., 2014, Bader et al. 2003, Seiler et al., 2014).

4.3.1 Nachweis einer (Mikro-)Metastasierung

Die höhere Sensitivität der quantitativen RT-PCR im Vergleich zur konventionellen histopathologischen Aufarbeitung konnte in der vorliegenden Arbeit eindeutig gezeigt werden.

Die KLK3-spezifische RT-PCR identifizierte alle histopathologisch nodal positiven Patienten und korrigierte durch die Detektion okkulten Metastasen den Anteil nodal positiver Patienten von 25,2% auf 54,1% des Gesamtkollektivs. 99% aller metastasierten Lymphknoten waren molekularbiologisch, demgegenüber nur 23,5% auch in der konventionellen Histopathologie zu detektieren.

Dies bestätigt frühere Studienergebnisse, welche die höhere Sensitivität der RT-PCR bzgl. der Detektion okkulten Metastasen sowie deren Bedeutung als prognostischer Marker validiert hatten. Miyake et al. konnten bereits zeigen, dass mittels RT-PCR(KLK3/PSMA) mehr nodal positive Lymphknoten detektiert werden können als mittels der konventionellen histopathologischen Untersuchung und diese okkulten Metastasen einen unabhängigen prognostischen Marker bzgl. des biochemisch rezidivfreien Überlebens darstellen.

Neben KLK3 als etabliertem, Prostata-spezifischem Marker wurde in der vorliegenden Arbeit Kallikrein 2 als molekularer Tumormarker untersucht. KLK2 ist ein von prostatistischen Epithelzellen exprimiertes, Androgen-reguliertes Protein mit einer zu KLK3 zu etwa 80% identischen Aminosäurestruktur (Schedlich et al., 1987), dessen übersteigerte Expression bei Prostatakarzinompatienten neben dem Ausmaß der Zellentartung auch mit der Wahrscheinlichkeit des Vorliegens einer lymphnodalen Metastasierung korreliert (Darson et al., 1999; Slawin et al., 2000).

In früheren Arbeiten konnte für die Detektion von KLK2 mittels RT-PCR in histopathologisch unauffälligen Lymphknoten eine Assoziation mit einer Progression der Erkrankung sowie dem Prostatakrebs-spezifischen Überleben aufgezeigt werden, auch ein Einfluss auf das Ansprechen einer adjuvanten Radiotherapie war abzubilden (Shariat et al., 2003). Ein über die Informationen der KLK3-spezifischen PCR hinausgehender Erkenntnisgewinn war im Vergleich jedoch bislang nicht belegt worden (Kurek et al., 2004). Unsere Ergebnisse stehen in Kongruenz hierzu, die KLK2-spezifische RT-PCR verbessert die Detektionsrate metastasierter Lymphknoten und konsekutiv nodal positiver Patienten im Vergleich zur konventionellen Histopathologie. Gegenüber KLK3 zeigt es sich jedoch bezüglich der Identifikation histopathologisch positiver Lymphknoten (89,9% KLK2 vs. 95,7% KLK3), sowie histopathologisch negativer Metastasen (68,0% KLK2 vs 99,6% KLK3) unterlegen und identifiziert insgesamt eine geringere Anzahl nodal positiver Patienten (55 Patienten KLK2 vs. 60 Patienten KLK3). Demgegenüber identifiziert KLK3 99,3% der KLK2-positiven Lymphknoten und 100% der anhand von KLK2 detektierten Patienten. Für die Anwendung von KLK2 als molekularem Tumormarker kann demnach zwar eine hinreichende Sensitivität gezeigt werden, eine verbesserte Aussagekraft gegenüber oder durch Kombination mit KLK3 ergibt sich jedoch nicht.

Zu bemerken ist auch die höhere Nachweisrate molekularer Metastasen bei histopathologisch nodalpositiven Patienten (pN1). Unter Zusammenschau der Befunde muss somit bei histopathologischer Detektion einer nodalen Metastasierung von einer bereits deutlich ausgedehnteren molekularen Metastasierung ausgegangen und die Sensitivität der konventionellen Methode im Rahmen der Ausbreitungsdiagnostik konsekutiv als eingeschränkt bewertet werden. Eine Limitierung der Anwendung der RT-PCR zur Bestimmung des Nodalstatus bei Prostatakarzinompatienten stellt allerdings der hohe technische und materielle Aufwand ihrer Anwendung dar.

Zudem ist aufgrund der fehlenden topographischen Lageabbildung der Tumorzellen innerhalb des Lymphknotens bei der RT-PCR eine Detektion und konsekutive Fehlinterpretation von zirkulierenden Tumorzellen als lymphonodulär verankerte Mikrometastase möglich, unter Berücksichtigung der minimalen Kopienanzahl des zu exprimierenden Gens in der PCR als auch unter Zusammenschau der eindrucklichen Korrelation des Nachweises einer molekularen Metastasierung mit den Ergebnissen der histopathologischen Untersuchung erscheint dies als signifikante Fehlerquelle jedoch unwahrscheinlich.

4,3% der histopathologisch positiven Lymphknoten und 76,5% der molekularbiologisch positiven Lymphknoten zeigen kein entsprechendes Korrelat in der jeweils anderen Untersuchungsmethode. Ursache für eine Positivität in nur einer Untersuchungsmethode, RT-PCR oder Histopathologie, kann eine ungleichmäßige Verteilung der Tumorzellen im befallenen Lymphknoten mit unabsichtlicher Isolation des Befundes in einem Anteil des Lymphknotens im Rahmen der Zerteilung bei der perioperativen Lymphknotenpräparation sein. Ebenso denkbar sind Untersucher-bezogene oder technische Fehler i. S. falsch-negativer Befunde im Rahmen der weiteren Aufarbeitung. Die insgesamt hohe Korrelation zwischen histopathologischen und molekularbiologischen Ergebnissen spricht jedoch für eine sehr gute methodische Qualität.

4.3.2 Topographische Beurteilung und klinische Bedeutung

Gemäß S3-Leitlinie Prostatakarzinom sollten bei lokal begrenzten Karzinomen im Falle einer LAE mindestens 10 LK als Mittelmaß der Ergebnisse der Studien von Briganti und Joselyn (Briganti et al., 2006; Joslyn et al., 2006) im Standard-Feld der Fossae obturatoriae sowie der Aa./Vv. iliaca externa reseziert werden. Für lokal fortgeschrittene Tumoren wird unter Abwägung von Morbidität und Sensitivität die Durchführung einer extendierten LAE - die Regionen der Vena iliaca externa, Arteria iliaca interna und Fossa obturatoria sowie der Lymphknoten medial der A. Iliaca interna umfassend - empfohlen (Burkhard et al., 2005; Heidenreich et al., 2002; Stone et al., 1997). Bei Resektion von im Durchschnitt 27 LK/Patient, Entnahme von 97% der prädefinierten Resektionsfelder (68% der fehlenden LK-Felder betrafen den Bereich der Aa./Vv. iliaca communis) mit vollständiger extendierter LAE gemäß Resektionsschema der Studie bei 86,5% der Patienten wurden die Qualitätsstandards der S3-Leitlinie erfüllt. Unter Berücksichtigung der direkten Korrelation zwischen der Anzahl entnommener Lymphknoten und der Wahrscheinlichkeit des Nachweises einer lymphonodulären Metastasierung (Briganti et al., 2006) sind die Ergebnisse der Arbeit als repräsentativ zu erachten.

Mehrere Studien konnten zeigen, dass die Wahrscheinlichkeit der Detektion von Metastasen mit dem Ausmaß der Lymphadenektomie korreliert und eine Begrenzung des Eingriffs im Sinne einer „limited“ bzw. „Standard“-Lymphadenektomie nur einen Teil der möglichen Metastasierungsfelder umfasst (Touijer et al, 2007, Bader et al., 2002; Weckermann et al., 2007).

Auch in unserem Kollektiv lässt sich für bis zu 50% der Patienten eine Metastasierung außerhalb der als Standard-LAE bezeichneten Region darstellen, neben Befunden entlang den Aa./Vv. iliaca internae waren bei 30% aller Patienten auch im Bereich der Aa./Vv. iliaca externa positive Lymphknoten zu finden. Eine Rationale für die Ausdehnung der Standard-LAE auf die Bereiche der Aa./Vv. iliaca internae sowie communis stellen die therapeutisch relevante Identifikation weiterer nodal positiver

Patienten (jeweils 6,7% pro Region) sowie die potentielle Kuration für 40% der Patienten mit einer limitierten nodalen Metastasierung (singuläre Lymphknotenmetastase) durch eine erweiterte LAE (Fossati et al., 2017; Bader et al., 2003) dar.

Während die molekularbiologische Methode die Identifikation nodal positiver Patienten im Vergleich zu histopathologischen Untersuchung in den Regionen der Standard-LAE nicht verbessert, fällt in den Feldern der erweiterten LAE eine gesteigerte Detektion okkult Metastasen mit Nachweis einer hohen Anzahl ausschließlich molekularbiologisch positiver Lymphknoten auf. Durch Erweiterung der LAE in Kombination mit der RT-PCR zur Detektion okkult Metastasen können folglich falsch-negative Ergebnisse deutlicher als durch eine der Maßnahmen alleine reduziert werden.

Die weitere Bedeutung der ausgedehnten Lymphadenektomie hinsichtlich Overall Survival, Progression Free Survival und Cancer-specific Mortality außerhalb von Stadiendiagnostik und adjuvanter Therapieindikationsstellung muss weiter evaluiert werden, eine hinreichend sichere, einheitliche Studienlage zur Beantwortung dieser Fragen existiert aktuell nicht.

4.4 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der Detektion klinisch okkult Metastasen in regionalen Lymphknoten beim nicht-metastasierten Adenokarzinom der Prostata. Neben der Aufarbeitung in der konventionellen Histopathologie wurde mittels quantitativer RT-PCR die Expression von KLK3 sowie KLK2 in den lymphonodulären Proben untersucht; es wurde sowohl die Sensitivität der Methodik im Vergleich zur konventionell histopathologischen Beurteilung analysiert als auch die topographische Lage maligne infiltrierter Lymphknoten hinsichtlich ihrer Bedeutung für die Ausdehnung der Lymphadenektomie bewertet.

Die Arbeit konnte zeigen, dass der molekularbiologische Nachweis mittels RT-PCR Tumorzellabsiedelungen in lokoregionären Lymphknoten zuverlässig zu identifizieren vermag und eine im Vergleich zur konventionell histopathologischen Untersuchung verbesserte Detektionsrate aufweist. Neben KLK3 konnte auch KLK2 als geeigneter molekularer Tumormarker für diese Fragestellung determiniert werden, eine Kombination von KLK2 und KLK3 führte jedoch zu keiner signifikanten Steigerung der Sensitivität, bzgl. des Nutzens von KLK2 als prognostischer bzw. Verlaufsparemeter sind weitere Studien erforderlich.

Darüber hinaus war anhand der topographischen Verteilung der nachgewiesenen Mikrometastasen eine Rationale für die Durchführung einer ausgedehnten Lymphadenektomie innerhalb der anatomischen Grenzen der Aortenbifurkation nach kranial, der Harnleiter nach lateral und dem Canalis inguinalis distal im Vergleich zu einer Einschränkung der Resektionsfelder auf die klassischen Regionen der Fossae obturatoriae und den Bereich der Aa./Vv. iliacae externae aufzuzeigen. Durch die molekularbiologische Methodik kann insbesondere die Anzahl der detektierten okkult Metastasen in den Feldern der erweiterten LAE gesteigert werden. Auch unter der Annahme eines potentiell kurativen Effekts für Patienten mit nur sehr begrenzter lymphonodaler Metastasierung gewinnt eine frühzeitige radikale Lymphadenektomie Bedeutung.

Ein Einfluss des verbesserten nodalen Stagings zeigt sich darüber hinaus primär bei der Entscheidung über eine möglicherweise erforderliche adjuvante Therapie, der prognostische Einfluss ist nicht Inhalt der Fragestellung dieser Arbeit und erfordert weitere Forschung.

5. Anhang

5.1 Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
Aa.	Arteriae
Abb.	Abbildung
aLA	ausgedehnte Lymphadenektomie
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
AS	Active surveillance
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
cDNA	Copy-Desoxyribonukleinsäure
Cis	Carcinoma in situ
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratmeter
CP	Crossing Point
Ct	Cycle Threshold
CTC	zirkulierende Tumorzellen
CSS	cancer-specific survival, krebspezifische Überlebensrate
°C	Grad Celsius
Def.	Definition
dest.	destilliert
d. h.	das heißt
DHT	Dihydrotestosteron
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonucleosid-5'-Triphosphat
DRU	Digital-rektale Untersuchung
DTC	Disseminated tumor cells, isseminierte Tumorzellen
et al.	et alii
g	Gramm
g	„Schleuderziffer“, Zahl der mittleren Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
HKG	Housekeeping-Gen
H ₂ O	Wasser (Summenformel)
HPRT1	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1
IGRT	Image Guided Radiotherapy
IMRT	Intensity-modulated radiation therapy
int.	international
kb	Kilobasen
(h) KLK1/2/3/4	(humanes) Kallikrein 1/2/3/4
LAE	Lymphadenektomie

LK	Lymphknoten
μ	Mikro
M0	keine Fernmetastasierung
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
ml	Milliliter
min	Minute
mind.	mindestens
mm	Millimeter
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
NTC	non-template control
OD	optische Dichte
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PCa	Prostatakarzinom
pg	Pikogramm
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
qRT-PCR	quantitative Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
RGE	relative Genexpression
RNA	Ribonukleinsäure
RP	radikale Prostatektomie
RPL 13	Ribosomal Protein L13
RPM	revolution per minute
RT	Reverse Transkriptase
RT	radio therapy, Strahlentherapie
RT	Drehzahl (Zentrifuge)
s.	siehe
sec	Sekunde
s. o.	siehe oben
s. u.	siehe unten
Tab.	Tabelle
TNM	Tumor, Lymphknoten, Metastasen
TUR-P	Transurethrale Resektion der Prostata
TRUS	Transrektaler Ultraschall
u. a.	unter anderem
UBC	Ubiquitin C
UICC	Union internationale contre le cancer
vs.	versus
w&w	watch&wait
z. T.	zum Teil

5.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Resektionsfelder der Lymphadenektomie	Seite 24
Abbildung 2	Graphische Darstellung der Höhe des Fluoreszenzsignals	Seite 36
Abbildung 3	Vereinfachte Darstellung der Livak-Methode	Seite 37
Abbildung 4	Durchschnittliche Stabilität der Genexpression der Referenzgene	Seite 39
Abbildung 5	Darstellung der Sensitivität der Detektion von KLK2/3 in Verdünnungsreihen von LnCAP- Zellen in 107PBMC	Seite 40
Abbildung 6	Methodenzuordnung und histopathologische Ergebnisse	Seite 43
Abbildung 7	Marker-spezifische Identifikation molekularpositiver Patienten	Seite 44
Abbildung 8	Marker-spezifische Aufteilung ausgehend vom Molekularstatus	Seite 45
Abbildung 9	Anatomische Lager der Resektionsfelder	Seite 46
Abbildung 10	Verteilung aller resezierten Lymphknoten	Seite 47
Abbildung 11	Topographie der histopathologisch positiven LK, * Regionen mit ausschließlich pN1+ LK (Regio 1 2LK, Regio 8 1 LK)	Seite 48
Abbildung 12	Topographische Verteilung aller molekularpositiven LK (KLK2 und/oder KLK3)	Seite 48
Abbildung 13	Marker-spezifische Verteilung der molekularbiologisch positiven LK	Seite 49
Abbildung 14	Topographie der ausschließlich molekularbiologisch positiven LK	Seite 50
Abbildung 15	Marker-spezifische Verteilung der ausschließlich molekularbiologisch positiven Lymphknoten	Seite 51
Abbildung 16	Topographische Verteilung der pN1/molN1 Lymphknoten	Seite 52
Abbildung 17	Topographie der molekularbiologisch und/oder histopathologisch positiven LK	Seite 52
Abbildung 18	Prozentuale Verteilung der LK auf die Felder der Standard- und ausgedehnten Lymphadenektomie	Seite 53

5.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Schema zur TNM-/pTNM-Klassifikation [UICC 2017], 7. Auflage (aus S1- Leitlinie zur pathologisch-anatomischen Diagnostik des Prostatakarzinoms des Bundesverbandes Deutscher Pathologen e. V. © und der Deutschen Gesellschaft für Pathologie e. V. ©, 4. Auflage, 2017)	Seite 9
Tabelle 2	Prognostische Gruppierung (Prostata) nach dem Joint Comittee on Cancer, AJCC 2017 (aus S1- Leitlinie zur pathologisch-anatomischen Diagnostik des Prostatakarzinoms des Bundesverbandes Deutscher Pathologen e. V. © und der Deutschen Gesellschaft für Pathologie e. V. ©, 4. Auflage, 2017)	Seite 9
Tabelle 3	Präoperative Risikostratifizierung anhand PSA, Gleason Score und cT-Kategorie	Seite 20
Tabelle 4	Präoperative Patientendaten des Gesamtkollektivs von 111 Patienten	Seite 42

5.3 Literaturverzeichnis

Abdollah F, Karnes RJ, Suardi N, Cozzarini C, Gandaglia G, Fossati N, Vizziello D, Sun M, Karakiewicz PI, Menon M, Montorsi F, Briganti A., Impact of adjuvant radiotherapy on survival of patients with node-positive prostate cancer; *J Clin Oncol.*, 2014

Abuzallouf S, Dayes I, Lukka H., Baseline staging of newly diagnosed prostate cancer: a summary of the literature; *J Urol*, 2004

Ashworth, T., A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death; *Aust Med J*, 1869

Bachour DM, Chahin E, Al-Fahoum S., Human Kallikrein-2, Prostate Specific Antigen and Free-Prostate Specific Antigen in Combination to Discriminate Prostate Cancer from Benign Diseases in Syrian Patients; *APJCP*, 2015

Bader P, Burkhard FC, Markwalder R, Studer UE, Is a limited lymph node dissection an adequate staging procedure for prostate cancer?; *J Urol*, 2002

Bader P, Burkhard FC, Markwalder R, Studer UE, Disease progression and survival of patients with positive lymph nodes after radical prostatectomy. Is there a chance of cure?; *J Urol*, 2003

Bill-Axelson A, Holmberg L, Filén F, Ruutu M, Garmo H, Busch C, Nordling S, Häggman M, Andersson SO, Bratell S, Spångberg A, Palmgren J, Adami HO, Johansson JE, Radical prostatectomy versus watchful waiting in localized prostate cancer: the Scandinavian prostate cancer group-4 randomized trial; *J Natl Cancer Inst*, 2008

Bill-Axelson A, Holmberg L, Ruutu M, Garmo H, Stark JR, Busch C, Nordling S, Häggman M, Andersson SO, Bratell S, Spångberg A, Palmgren J, Steineck G, Adami HO, Johansson JE; SPCG-4 Investigators, Radical prostatectomy versus watchful waiting in early prostate cancer; *N Engl J Med*, 2011

Bolla M, de Reijke TM, Van Tienhoven G, Van den Bergh AC, Oddens J, Poortmans PM, Gez E, Kil P, Akdas A, Soete G, Kariakine O, van der Steen-Banasik EM, Musat E, Piérart M, Mauer ME, Collette L; EORTC Radiation Oncology Group and Genito-Urinary Tract Cancer Group, Duration of androgen suppression in the treatment of prostate cancer; *N Engl J Med*, 2009

Boorjian SA, Thompson RH, Siddiqui S, Bagniewski S, Bergstralh EJ, Karnes RJ, Frank I, Blute ML, Long-term outcome after radical prostatectomy for patients with lymph node positive prostate cancer in the prostate specific antigen era; *J Urol*, 2007

Bragado P, Sosa MS, Keely P, Condeelis J, Aguirre-Ghiso JA, Microenvironments dictating tumor cell dormancy; *Recent Results Cancer Res*, 2012

Braun S, Naume B, Circulating and Disseminated Tumor Cells; *Journal of Clinical Oncology*, 2005

Briganti A, Blute ML, Eastham JH, Graefen M, Heidenreich A, Karnes JR, Montorsi F, Studer UE, Pelvic Lymph Node Dissection in Prostate Cancer; *European Urology*, 2009

Briganti A, Larcher A, Abdollah F, Capitanio U, Gallina A, Suardi N, Bianchi M, Sun M, Freschi M, Salonia A, Karakiewicz PI, Rigatti P, Montorsi F, Updated nomogram predicting lymph node invasion in patients with prostate cancer undergoing extended pelvic lymph node dissection: the essential importance of percentage of positive cores; *Eur Urol*. 2012

Briganti A, Karnes JR, Da Pozzo LF, Cozzarini C, Gallina A, Suardi N, Bianchi M, Freschi M, Doglioni C, Fazio F, Rigatti P, Montorsi F, Blute ML, Two positive nodes represent a significant cut-off value for cancer specific survival in patients with node positive prostate cancer. A new proposal based on a two-institution experience on 703 consecutive N+ patients treated with radical prostatectomy, extended pelvic lymph node dissection and adjuvant therapy; *Eur Urol*, 2009

Briganti A, Chun FK, Salonia A, Zanni G, Scattoni V, Valiquette L, Rigatti P, Montorsi F, Karakiewicz PI, Validation of a nomogram predicting the probability of lymph node invasion among patients undergoing radical prostatectomy and an extended pelvic lymphadenectomy; *Eur Urol*, 2006

Burkhard FC, Schumacher M, Studer UE, The role of lymphadenectomy in prostate cancer; *Nat. Clin Pract Urol*, 2005

Castro E, Eeles R, The role of BRCA1 and BRCA2 in prostate cancer; *Asian J Androl*. 2012

Catalona WJ, Smith DS, Wolfert RL, Wang TJ, Rittenhouse HG, Ratliff TL, Nadler RB, Evaluation of percentage of free serum prostate-specific antigen to improve specificity of prostate cancer screening; *JAMA*, 1995

Catalona WJ, Miller DR, Kavoussi LR, Intermediate-term survival results in clinically understaged prostate cancer patients following radical prostatectomy; *J Urol*, 1988

Cimino S, Reale G, Castelli T, Favilla V, Giardina R, Russo GI, Privitera S, Morgia G, Comparison between Briganti, Partin and MSKCC tools in predicting positive lymph nodes in prostate cancer: a systematic review and meta-analysis; *Scandinavian Journal Of Urology*, 2017

D'Amico AV, Whittington R, Malkowicz SB, Schultz D, Blank K, Broderick GA, Tomaszewski JE, Renshaw AA, Kaplan I, Beard CJ, Wein A, Biochemical outcome after radical prostatectomy, external

beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer; JAMA 1998

D'Amico AV, Whittington R, Malkowicz SB, Weinstein M, Tomaszewski JE, Schultz D, Rhude M, Rocha S, Wein A, Richie JP, Predicting prostate specific antigen outcome preoperatively in the prostate specific antigen era; The Journal of urology. 2001

D'Amico AV, Hui-Chen M, Renshaw AA, Sussman B, Roehl KA, Catalona WJ, Identifying men diagnosed with clinically localized prostate cancer who are at high risk for death from prostate cancer; J Urol, 2006

D'Amico AV, Whittington R, Malkowicz SB, Schultz D, Fondurulia J, Chen MH, Tomaszewski JE, Renshaw AA, Wein A, Richie JP, Clinical utility of the percentage of positive prostate biopsies in defining biochemical outcome after radical prostatectomy for patients with clinically localized prostate cancer; J Clin Oncol, 2000

D'Amico AV, Moul J, Carroll PR, Sun L, Lubeck D, Chen MH, Cancer-specific mortality after surgery or radiation for patients with clinically localized prostate cancer managed during the prostate-specific antigen era; J Clin Oncol, 2003

Da Pozzo LF, Cozzarini C, Briganti A, Suardi N, Salonia A, Bertini R, Gallina A, Bianchi M, Fantini GV, Bolognesi A, Fazio F, Montorsi F, Rigatti P, Long-term follow-up of patients with prostate cancer and nodal metastases treated by pelvic lymphadenectomy and radical prostatectomy: the positive impact of adjuvant radiotherapy; Eur Urol, 2009

Darson MF, Pacelli A, Roche P, Rittenhouse HG, Wolfert RL, Saeid MS, Young CY, Klee GG, Tindall DJ, Bostwick DG, Human glandular kallikrein 2 expression in prostate adenocarcinoma and lymph node metastases; Urology, 1999

Deguchi T, Doi T, Ehara H, Ito S, Takahashi Y, Nishino Y, Fujihira S, Kawamura T, Komeda H, Horie M, Kaji H, Shimokawa K, Tanaka T, Kawada Y, Detection of micrometastatic prostate cancer cells in lymph nodes by reverse transcriptase-polymerase chain reaction; Cancer Res, 1993

Deutsche Gesellschaft Urologie, e.V., Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms; 2019

Diamandis EP, Yousef GM, Human Tissue Kallikreins: A Family of New Cancer Biomarkers; Clinical Chemistry, 2002

Dr. Thomas A. Schild Applied Biosystems GmbH Weiterstadt, 7700 SDS Workshop - Einführung in die Real-Time TaqMan™ PCR-Technologie, Vers. 2.1

Edelstein RA, Krane RJ, Babayan RK, de las Morenas A, Moreland RB, A rapid and simple method for the detection of prostate-specific antigen mRNA in archival tissue specimens using a reverse transcription-polymerase chain reaction assay; *Urology*, 1995

Egger SE, Scardino PT, Walsh PC, Han M, Partin AW, Trock BJ, Feng Z, Wood DP, Eastham JA, Yossepowitch O, Rabah DM, Kattan MW, Yu C, Klein EA, Stephenson AJ, Predicting 15-year prostate cancer specific mortality after radical prostatectomy; *The Journal of urology*, 2011

Epstein JI, Egevad L, Amin MB, Delahunt B, Srigley JR, Humphrey PA; Grading Committee, 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

Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H, Forman D, Bray F, Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012; *Eur J Cancer*, 2013

Ferrari AC, Stone NN, Eyer JN, Gao M, Mandeli J, Unger P, Gallagher RE, Stock R, Prospective analysis of prostate-specific markers in pelvic lymph nodes of patients with high-risk prostate cancer; *J Natl Cancer Inst*, 1997

Ferrari AC, Stone NN, Kurek R, Mulligan E, McGregor R, Stock R, Unger P, Tunn U, Kaisary A, Droller M, Hall S, Renneberg H, Livak KJ, Gallagher RE, Mandeli J, Molecular load of pathologically occult metastases in pelvic lymph nodes is an independent prognostic marker of biochemical failure after localized prostate cancer treatment; *J Clin Oncol.*, 2006

Fossati N, Willemse PM, Van den Broeck T, van den Bergh RCN, Yuan CY, Briers E, Bellmunt J, Bolla M, Cornford P, De Santis M, MacPepple E, Henry AM, Mason MD, Matveev VB, van der Poel HG, van der Kwast TH, Rouvière O, Schoots IG, Wiegel T, Lam TB, Mottet N, Joniau S, The benefits and harms of different extents of lymph node dissection during radical prostatectomy for prostate cancer: a systematic review; *European Urology*, 2017

Grauer LS, Charlesworth MC, Saedi MS, Finlay JA, Liu RS, Kuus-Reichel K, Young CY, Tindall DJ, Identification of human glandular kallikrein hK2 from LNCaP cells; *J Androl* 1996

Gressner AM, Arndt T, *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*, Springer Reference Medizin. 2019. Springer, Berlin, Heidelberg

Haas GP, Delongchamps N, Brawley OW, Wang CY, de la Roza G, The worldwide epidemiology of prostate cancer: perspectives from autopsy studies; *Can J Urol*, 2008

Haese A, Becker C, Noldus J, Graefen M, Huland E, Huland H, Lilja H, Human glandular kallikrein: 2 A potential serum marker for predicting the organ confined versus non organ confined growth of prostate cancer; J Urol. 2000

Hamdy FC, Donovan JL, Lane JA, Mason M, Metcalfe C, Holding P, Davis M, Peters TJ, Turner EL, Martin RM, Oxley J, Robinson M, Staffurth J, Walsh E, Bollina P, Catto J, Doble A, Doherty A, Gillatt D, Kockelbergh R, Kynaston H, Paul A, Powell P, Prescott S, Rosario DJ, Rowe E, Neal DE; ProtecT Study Group, 10-Year Outcomes after Monitoring, Surgery, or Radiotherapy for Localized Prostate Cancer; N Engl J Med, 2016

Heidenreich A, Bellmunt J, Bolla M, Joniau S, Mason M, Matveev V, Mottet N, Schmid HP, van der Kwast T, Wiegel T, Zattoni F; EAU guidelines on prostate cancer. Part 1: screening, diagnosis, and treatment of clinically localised disease. Eur Urol. 2011

Heidenreich, A., Z. Varga, and R. von Knobloch, Extended pelvic lymphadenectomy in patients undergoing radical prostatectomy: high incidence of lymph node metastasis; J Urol, 2002

Horwitz EM, Bae K, Hanks GE, Porter A, Grignon DJ, Brereton HD, Venkatesan V, Lawton CA, Rosenthal SA, Sandler HM, Shipley WU, Ten-year follow-up of radiation therapy oncology group protocol 92-02: a phase III trial of the duration of elective androgen deprivation in locally advanced prostate cancer; J Clin Oncol, 2008

Hoshino A, Costa-Silva B, Shen TL, Rodrigues G, Hashimoto A, Tesic Mark M, Molina H, Kohsaka S, Di Giannatale A, Ceder S, Singh S, Williams C, Soplop N, Uryu K, Pharmed L, King T, Bojmar L, Davies AE, Ararso Y, Zhang T, Zhang H, Hernandez J, Weiss JM, Dumont-Cole VD, Kramer K, Wexler LH, Narendran A, Schwartz GK, Healey JH, Sandstrom P, Labori KJ, Kure EH, Grandgenett PM, Hollingsworth MA, de Sousa M, Kaur S, Jain M, Mallya K, Batra SK, Jarnagin WR, Brady MS, Fodstad O, Muller V, Pantel K, Minn AJ, Bissell MJ, Garcia BA, Kang Y, Rajasekhar VK, Ghajar CM, Matei I, Peinado H, Bromberg J, Lyden D, Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis; Nature, 2015

Ilic D, Neuberger MM, Djulbegovic M, Dahm P, Screening for prostate cancer; Cochrane Database of Systematic Reviews, 2013

Jha SK, Rauniyar K, Chronowska E, Mattonet K, Maina EW, Koistinen H, Stenman UH, Alitalo K, Jeltsch M, KLK3/PSA and cathepsin D activate VEGF-C and VEGF-D; eLife, 2019

Joslyn SA, Konety BR, Impact of extent of lymphadenectomy on survival after radical prostatectomy for prostate cancer; Urology, 2006

Kalluri R, Weinberg RA, The basics of epithelial-mesenchymal transition; J Clinical Invest., 2010

Kareva I, Escape from tumor dormancy and time to angiogenic switch as mitigated by tumor-induced stimulation of stroma; J Theor Biol, 2016

Kattan MW, Eastham JA, Stapleton AM, Wheeler TM, Scardino PT, A preoperative nomogram for disease recurrence following radical prostatectomy for prostate cancer; J Natl Cancer Inst, 1998

Klein CA, Blankenstein TJ, Schmidt-Kittler O, Petronio M, Polzer B, Stoecklein NH, Riethmüller G, Genetic heterogeneity of single disseminated tumour cells in minimal residual cancer. Lancet, 2002

Klotz LH, Goldenberg SL, Jewett MA, Fradet Y, Nam R, Barkin J, Chin J, Chatterjee S; Canadian Uro-Oncology Group, Long-term followup of a randomized trial of 0 versus 3 months of neoadjuvant androgen ablation before radical prostatectomy; J Urol, 2003

Krause BJ, Souvatzoglou M, Treiber U, Imaging of prostate cancer with PET/CT and radioactively labeled choline derivatives; Urol Oncol, Epub 2011

Krishnamoorthy K, Mathew T, Mukherjee S, Normal-based methods for gamma distribution; Technometrics, 2008

Kristiansen, G., Diagnostic and prognostic molecular biomarkers for prostate cancer; Histopathology, 2012

Kumar A, Mikolajczyk SD, Goel AS, Millar LS, Saedi MS, Expression of pro form of prostate-specific antigen by mammalian cells and its conversion to mature, active form by human kallikrein 2; Cancer Research, 1997

Kurek R, Nunez G, Tselis N, Konrad L, Martin T, Roeddiger S, Aumüller G, Zamboglou N, Lin DW, Tunn UW, Renneberg H, Prognostic Value of Combined "Triple"-Reverse Transcription-PCR Analysis for Prostate-Specific Antigen, Human Kallikrein 2, and Prostate-Specific Membrane Antigen mRNA in Peripheral Blood and Lymph Nodes of Prostate Cancer Patients; Clin Cancer Research, 2004

Leitlinienprogramm Onkologie, S3-Leitlinie Prostatakarzinom, Version 5.1, Mai 2019

Lilleby W, Stensvold A, Mills IG, Nesland JM, Disseminated tumor cells and their prognostic significance in nonmetastatic prostate cancer patients; Int J Cancer. 2013

Livak KJ, Schmittgen TD, Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method; Methods 25.4, 2001

Lu X, Mu E, Wei Y, Riethdorf S, Yang Q, Yuan M, Yan J, Hua Y, Tiede BJ, Lu X, Haffty BG, Pantel K, Massagué J, Kang Y, Vcam-1 promotes osteolytic expansion of indolent bone micrometastasis of breast cancer by engaging alpha4beta1-positive osteoclast progenitors; *Cancer Cell*, 2011

Magbanua MJ, Das R, Polavarapu P, Park JW, Approaches to isolation and molecular characterization of disseminated tumor cells; *Oncotarget*, 2015

Makarov DV, Trock BJ, Humphreys EB, Mangold LA, Walsh PC, Epstein JI, Partin AW, Updated nomogram to predict pathologic stage of prostate cancer given prostate-specific antigen level, clinical stage, and biopsy Gleason score (Partin tables) based on cases from 2000 to 2005; *Urology*, 2007

Mao Z, Ji A, Yang K, He W, Hu Y, Zhang Q, Zhang D, Xie L, Diagnostic performance of PCA3 and hK2 in combination with serum PSA for prostate cancer; *Medicine (Baltimore)*, 2018

Martínez-Piñeiro L, Rios E, Martínez-Gomariz M, Pastor T, de Cabo M, Picazo ML, Palacios J, Perona R, Molecular Staging of Prostatic Cancer with RT-PCR Assay for Prostate-Specific Antigen in Peripheral Blood and Lymph Nodes: Comparison with Standard Histological Staging and Immunohistochemical Assessment of Occult Regional Lymph Node Metastases; *European Urology*, 2003

Miyake H, Hara I, Kurahashi T, Inoue TA, Eto H, Fujisawa M, Quantitative Detection of Micrometastases in Pelvic Lymph Nodes in Patients with Clinically Localized Prostate Cancer by Real-time Reverse Transcriptase-PCR; *Clin Cancer Res*, 2007

Olsson AY, Bjartell A, Lilja H, Lundwall A, Expression of prostate-specific antigen (PSA) and human glandular kallikrein 2 (hK2) in ileum and other extraprostatic tissues; *Int J Cancer*, 2005

Pan CC, Potter SR, Partin AW, Epstein JI, The prognostic significance of tertiary Gleason patterns of higher grade in radical prostatectomy specimens: a proposal to modify the Gleason grading system; *Am J Surg Pathol*, 2000

Pantel K, Woelfle U, Micrometastasis in breast cancer and other solid tumors; *J Biol Regul Homeost Agents*, 2004

Pantel K, Brakenhoff RH, Dissecting the metastatic cascade; *Nat Rev Cancer*, 2004

Partin AW, Catalona WJ, Finlay JA, Darte C, Tindall DJ, Young CY, Klee GG, Chan DW, Rittenhouse HG, Wolfert RL, Woodrum DL, Use of human glandular kallikrein 2 for the detection of prostate cancer: Preliminary analysis; *Urology*. 1999

Pentyala S, Whyard T, Pentyala S, Muller J, Pfail J, Parmar S, Helguero CG, Khan S, Prostate cancer markers: An update; Biomed Rep. 2016

Pfaffl, MW, "A-Z of quantitative PCR", 2004

Potter SR, Partin AW, Tumor markers: an update on human kallikrein 2; Rev Urol. 2000

Pound CR, Partin AW, Eisenberger MA, Chan DW, Pearson JD, Walsh PC, Natural history of progression after PSA elevation following radical prostatectomy; JAMA, 1999

Retz M, Lehmann J, Röder C, Weichert-Jacobsen K, Loch T, Romahn E, Lühl C, Kalthoff H, Stöckle M, Cytokeratin-20 reverse-transcriptase polymerase chain reaction as a new tool for the detection of circulating tumor cells in peripheral blood and bone marrow of bladder cancer patients; European Urology, 2001

Retz M, Lehmann J, Szysnik C, Zwank S, Venzke T, Röder C, Kalthoff H, Basbaum C, Stöckle M, Detection of occult tumor cells in lymph nodes from bladder cancer patients by MUC7 nested RT-PCR; EUR Urol, 2004

Rittenhouse HG, Finlay JA, Mikolajczyk SD, Partin AW, Human Kallikrein 2 (hK2) and Prostate-Specific Antigen (PSA): Two Closely Related, but Distinct, Kallikreins in the Prostate; Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences, 1998

Robert Koch Institut (Hrsg.): Krebs in Deutschland 2013/2014. 11. Ausgabe, Berlin 2017

Schedlich LJ, Bennetts BH, Morris BJ, Primary structure of a human glandular kallikrein gene; DNA, 1987

Seiler R, Studer UE, Tschan K, Bader P, Burkhard FC, Removal of limited nodal disease in patients undergoing radical prostatectomy: long-term results confirm a chance for cure. J Urol 2014

Shariat SF, Kattan MW, Erdamar S, Nguyen C, Scardino PT, Spencer DM, Wheeler TM, Slawin KM, Detection of clinically significant, occult prostate cancer metastases in lymph nodes using a splice variant-specific RT-PCR assay for human glandular kallikrein; J Clin Oncol, 2003

Siddiqui SA, Sengupta S, Slezak JM, Bergstralh EJ, Leibovich BC, Myers RP, Zincke H, Blute ML, Impact of patient age at treatment on outcome following radical retropubic prostatectomy for prostate cancer; J Urol. 2006

Slawin KM, Shariat SF, Nguyen C, Leventis AK, Song W, Kattan MW, Young CY, Tindall DJ, Wheeler TM, Detection of Metastatic Prostate Cancer Using a Splice Variant-specific Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction Assay for Human Glandular Kallikrein; Cancer Res, 2000

Stone NN, Stock RG, Unger P, Laparoscopic pelvic lymph node dissection for prostate cancer: comparison of the extended and modified techniques; J. Urol, 1997

Swanson GP, Thompson IM, Basler J, Treatment options in lymph node-positive prostate cancer; Cancer, 2006

Team RDC. R: A language and environment for statistical computing. The R Project for Statistical Computing Website. <http://www.R-project.org/>

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 CM; AUA Prostate Cancer Clinical Guideline Update Panel, Guideline for the management of clinically localized prostate cancer: 2007 update (confirmed 2009); J Urol, 2007

Touijer K, Rabbani F, Otero JR, Secin FP, Eastham JA, Scardino PT, Guillonneau B, Standard versus limited pelvic lymph node dissection for prostate cancer in patients with a predicted probability of nodal metastasis greater than 1%; J Urol, 2007

Ulmert D, O'Brien MF, Bjartell AS, Lilja H, Prostate kallikrein markers in diagnosis, risk stratification and prognosis; Nat Rev Urol. 2009

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F, Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes; Genome Biology, 2002

Weckermann D, Polzer B, Ragg T, Blana A, Schlimok G, Arnholdt H, Bertz S, Harzmann R, Klein CA, Perioperative activation of disseminated tumor cells in bone marrow of patients with prostate cancer; J Clin Oncol. 2009

Weckermann D, Dorn R, Trefz M, Wagner T, Wawroschek F, Harzmann R, Sentinel lymph node dissection for prostate cancer: experience with more than 1,000 patients; J Urol, 2007

Wilt TY, Brawer MK, Jones KM, Barry MJ, Aronson WJ, Fox S, Gingrich JR, Wie JT, Gilhooly P, Mayer Grob M, Nsouli I, Iyer P, Cartagena R, Snider G, Roehrborn C, Sharifi R, Blank W, Pandya P, Andriole GL, Culkin D, Wheeler T for the Prostate Cancer Intervention versus Observation Trial (PIVOT) Study Group, Radical prostatectomy versus observation for localized prostate cancer; N. Engl. J Med, 2012

Wittekind C, Klimpfinger M, Sobin LH, TNM: Klassifikation maligner Tumoren. 8th ed. 2017

Young CY, Andrews PE, Montgomery BT, Tindall DJ, Tissue-specific and hormonal regulation of human prostate-specific glandular kallikrein; Biochemistry, 1992

Young D, An R package for estimating tolerance intervals. J Stat Software, 2010

Zeegers MP, Jellema A, Ostrer H, Empiric risk of prostate carcinoma for relatives of patients with prostate carcinoma: a meta – analysis; Cancer, 2003

5.4 Danksagung

Ich danke Frau Prof. Dr. med. Margitta Retz, meiner Doktormutter, und Herrn Prof. Dr. med. Jürgen Gschwend, Direktor der Urologischen Klinik und Poliklinik des Klinikums Rechts der Isar, für die Überlassung des Themas und Schaffung der Grundvoraussetzungen für diese Arbeit.

In erster Linie gilt mein Dank aber Herrn PD Dr. med. Matthias Heck, der mir als Betreuer meiner Promotionsarbeit mit größter fachlicher Kompetenz und uneingeschränkter Hilfsbereitschaft stets unterstützend und beratend zur Seite stand. Sein persönliches Engagement und seine Zielstrebigkeit sind bewundernswert und inspirierend. Insbesondere seine schier unendliche Geduld über die vielen Jahre und Fragen hinweg weiß ich zu schätzen.

Für die Ermöglichung der Durchführung der praktischen Anteile dieser Arbeit möchte ich Herrn Dr. rer. nat. Roman Nawroth als Leiter des Urologischen Forschungslabor des Klinikums Rechts der Isar sowie stellvertretend für das gesamte Labor-Team Frau Monika Moissl danken. Viele größere oder kleinere Probleme und Fragen fanden schnelle und unkomplizierte Beantwortung, auch die wertvolle praktische Hilfestellung war unverzichtbar für den Erfolg dieser Arbeit.

Ferner gilt mein Dank den vier Operateuren, Herrn Prof. Dr. med. Jürgen Gschwend, Herrn PD Dr. med. Tobias Maurer, Herrn Dr. med. Michael Autenrieth und Herrn Prof. Dr. med. Hubert Kübler, für die unkomplizierte Zusammenarbeit sowie dem gesamten OP-Personal, dessen logistische und materielle Hilfestellung den Ablauf häufig vereinfachte.

Auch Herrn PD Dr. Gregor Weirich gilt mein Dank für die Kooperation hinsichtlich der veränderten Abläufe der Verarbeitung der Gewebeproben.

Des Weiteren möchte ich Herrn Tibor Schuster für seine Unterstützung bei der statistischen Datenauswertung danken.

Die Zeit der Tätigkeit in OP und Labor wurde vor Allem auch durch die Zusammenarbeit mit meinen Mit-Doktoranden Elisabeth Vitzthum und Marc Souchay positiv geprägt, Ihnen möchte ich für die gegenseitige Unterstützung und den Spaß bei und neben der Arbeit herzlich danken.

Persönlich liegt mir der Dank an meine Eltern besonders am Herzen, die mich zu jedem Zeitpunkt in meinen Aufgaben und Entscheidungen unterstützen und unerschütterlich an mich glauben. Sie und meine Geschwister sind die Basis von Allem.

Für tausend und eine Sache danke ich Maximilian Thoß.

Und last but not least: Alex, Bine, Franzi, Julia, Steffi und Tina – finally!

5.5 Publikationen

Matthias M. Heck, Margitta Retz, Miriam Bandur, Marc Souchay, Elisabeth Vitzthum, Gregor Weirich, Martin Mollenhauer, Tibor Schuster, Michael Autenrieth, Hubert Kübler, Tobias Maurer, Mark Thalgott, Kathleen Herkommera, Jürgen E. Gschwend, Roman Nawroth, Topography of Lymph Node Metastases in Prostate Cancer Patients Undergoing Radical Prostatectomy and Extended Lymphadenectomy: Results of a Combined Molecular and Histopathologic Mapping Study; *European Urology* 2014, Volume 66, Issue 2, 222 - 229

Matthias M. Heck, Margitta Retz, Miriam Bandur, Marc Souchay, Elisabeth Vitzthum, Gregor Weirich, Tibor Schuster, Michael Autenrieth, Hubert Kübler, Tobias Maurer, Mark Thalgott, Kathleen Herkommera, Jürgen E. Gschwend, Roman Nawroth, Molecular Lymph Node Status for Prognostic Stratification of Prostate Cancer Patients Undergoing Radical Prostatectomy with Extended Pelvic Lymph Node Dissection; *Clinical Cancer Research* 2018, Volume 24, Issue 10, 2342-2349

5.6 Curriculum vitae