

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Aus der urologischen Klinik und Poliklinik des Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Prof. Dr. Jürgen E. Gschwend)

Detektion und Topographie disseminierter Tumorzellen in Lymphknoten bei Prostatakrebspatienten mittels quantitativer Polymerasekettenreaktion und Nachweis des Markers Kallikrein 4

Elisabeth Maria Vitzthum

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. apl. Prof. Dr. Margitta Retz
2. Prof Dr. Jürgen E. Gschwend

Die Dissertation wurde am 28.03.2017 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 18.10.2017 angenommen.

Meiner Familie in tiefer Dankbarkeit.

I Inhaltsverzeichnis

I Inhaltsverzeichnis	3
II Abbildungsverzeichnis	6
III Tabellenverzeichnis	8
IV Abkürzungsverzeichnis	9
1 Einleitung	12
1.1 Das Prostatakarzinom.....	12
1.1.1 Epidemiologie.....	12
1.1.2 Ätiologie und Pathogenese	13
1.1.3 Klinik	14
1.1.4 Klassifikation.....	14
1.1.5 Screening Untersuchungen	16
1.1.6 Diagnostik.....	17
1.1.7 Therapie und Nachsorge	17
1.1.8 Prognose	22
1.2 Disseminierte Tumorzellen und molekulare Marker	23
1.2.1 Definition.....	23
1.2.2 Detektion von disseminierten Tumorzellen.....	24
1.2.3 Molekulare Tumormarker.....	24
1.2.4 Kallikrein 4	25
2 Fragestellung	27
3 Material und Methoden	28
3.1 Zellkulturen	28
3.1.1 Material für die Zellkulture	28
3.1.1.1 Verbrauchsmaterialien.....	28
3.1.1.2 Reagenzien	28
3.1.1.3 Laborgeräte.....	28
3.1.2 Kultivierung von permanenten Zelllinien.....	29
3.1.3 Erstellen einer neuen Zellpassage.....	29
3.1.4 Herstellung von Zelllysaten.....	29
3.2 Gewebe.....	30
3.2.1 Peripher venöses Blut	30
3.2.1.1 Material, Reagenzien und Laborgeräte für die Isolierung von PBMCs	30

3.2.1.2	Ablauf der Isolation der PBMCs	30
3.2.2	Lymphknotengewinnung	31
3.2.2.1	Verbrauchsmaterialien.....	31
3.2.2.2	Patienten	32
3.2.2.3	Lymphknotenisolierung.....	33
3.3	Herstellung des Lymphknotenlysats	34
3.3.1	Material für die Herstellung des Lysats.....	34
3.3.1.1	Verbrauchsmaterialien.....	34
3.3.1.2	Reagenzien	35
3.3.1.3	Geräte	35
3.3.2	Ablauf des Lysiervorgangs	35
3.4	RNA Extraktion und photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration.....	37
3.4.1	Material für die RNA Extraktion.....	37
3.4.1.1	Verbrauchsmaterialien.....	37
3.4.1.2	Reagenzien	37
3.4.1.3	Laborgeräte.....	37
3.4.2	Ablauf der RNA Extraktion.....	38
3.4.3	Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration	40
3.5	Quantitative reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR).....	41
3.5.1	Material für die reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)	41
3.5.1.1	Verbrauchsmaterialien.....	41
3.5.1.2	Reagenzien	41
3.5.1.3	Laborgeräte.....	41
3.5.2	Prinzip und Durchführung der Reverse Transkriptase Reaktion.....	42
3.5.3	Realtime Polymerase Kettenreaktion	43
3.5.3.1	Prinzip der Polymerase Kettenreaktion.....	43
3.5.3.2	Durchführung der quantitativen Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR).....	47
3.5.3.3	Auswertung der qRT-PCR	48
3.5.4	Überprüfung der Sensitivität.....	50
3.5.5	Überprüfung der Spezifität	50
4	Ergebnisse	51
4.1	Analytische Bewertung der qRT-PCR bezogen auf PSA und KLK4	51

4.1.1	Referenzgenauswahl	51
4.1.2	Charakterisierung der angewandten qRT-PCR-Methode	51
4.1.3	Sensitivität und Spezifität der qRT-PCR	52
4.2	Patientendaten	53
4.2.1	Allgemeine Patientendaten	53
4.2.2	Auswertung des Lymphknotenstatus	55
4.2.3	Topographie der Lymphknotenverteilung	61
5	Diskussion.....	66
5.1	Methodenkritik	66
5.1.1	Studiendesign.....	66
5.1.2	Gewebeprobengewinnung und Aufarbeitung	66
5.2	Bewertung der Methoden, Markerwahl und Kontrollgruppe	69
5.2.1	Bewertung der qRT-PCR.....	69
5.2.2	Markerauswahl	69
5.2.3	Auswahl der Kontrollgruppe	71
5.3	Auswertung des Lymphknotengewebes.....	71
5.3.1	Allgemeine Auswertung der Lymphknotenproben	71
5.3.2	Topographische Auswertung	75
6	Zusammenfassung	78
7	Literaturverzeichnis.....	79
8	Danksagung.....	90

II Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Feld der ausgedehnten pelvinen Lymphadenektomie; jeweils bilaterale Entnahme der Lymphknoten: 1+2= rechte und linke A. iliaca communis; 3+4= rechte und linke A.ilica interna; 5+6= rechte und linke A.ilica externa; 7+8= rechte und linke Fossa obturatoria. 5-8 sind die Regionen der Standard Lymphadenektomie	33
Abb. 2: Veranschaulichung der Halbierung des Lymphknotens. Der Lymphknoten wurde geteilt, eine Hälfte und das laterale Gegenstück wurde histopathologisch untersucht, die andere Hälfte wurde schockgefroren und mittels qRT-PCR untersucht.....	34
Abb. 3: Dreischichtung der Acid-Chloroform-Extraktion. Im wässrigen Überstand befindet sich die RNA, in der Interphase die DNA und in der untern unpolaren Chloroformschicht die Proteine.	39
Abb. 4: Darstellung des exponentiellen Wachstums bei der Polymerasekettenreaktion.....	45
Abb. 5: Aufbau der TaqMan Sonde.....	46
Abb. 6: Emittierung des Fluoreszenzsignals durch den Reporter durch die räumliche Trennung von Quencher und Reporter durch die Hydrolyse.....	46
Abb. 7: Graph der zur Auswertung der qRT-PCR.....	48
Abb. 8: Analyse der Stabilität der Referenzgene mittels Bioinformatik geNorm Analysis Software bei 14 Lymphknotenproben. HPRT1 und UBC zeigen die höchste Stabilität mit einer geNorm V Größe < 0,15 und einem geNorm Mittelwert M von $\leq 0,5$	51
Abb. 9: Verdünnungsreihe einer cDNA von LnCAP- Zellen in 10^6 PBMCs von 100ng bis 10pg. Cq-Werte für die Markergene PSA, KLK4 und die endogenen Referenzgene HPRT1, UBC. Das Untersuchungsmaterial weist eine lineare Korrelation von $r^2 = 0,997$ für PSA, $r^2 = 0,994$ für KLK4, $r^2 = 0,991$ für HPRT1 und $r^2 = 0,993$ für UBC auf.	52
Abb. 10: Darstellung der Sensitivität von PSA und KLK4.....	53
Abb. 11: Einteilung der Lymphknoten in die Untergruppen.....	56
Abb. 12: Aufteilung der Lymphknoten <3mm.....	56
Abb. 13: Überblick über die Patienten- und Lymphknotenverteilung nach histopathologischer und molekularer Untersuchung mittels PSA. (aLA = ausgedehnte Lymphadenektomie).	57

Abb. 14: Überblick über die Patienten- und Lymphknotenverteilung nach histopathologischer und molekularer Untersuchung mittels KLK4.	58
Abb. 15: Differenzierung zwischen den einzelnen Markern.	59
Abb. 16: Einteilung der 57 histopathologisch positiven Lymphknoten.	59
Abb. 17: Überblick über die Patienten und Lymphknoten der unterschiedlichen Gruppen. Als molN1 wurden Lymphknoten gezählt, die PSA und/oder KLK 4 positiv waren.	60
Abb. 18: Übersicht über die Topographie der histopathologisch und molekular ausgewerteten Lymphknoten.	61
Abb. 19: Übersicht über die 57 histopathologischen Lymphknoten.	62
Abb. 20: Topographische Verteilung der PSA positiven Lymphknoten.	62
Abb. 21: Topographische Verteilung der KLK4 positiven Lymphknoten.	63
Abb. 22: Übersicht über die ausschließlich molekularpositiven Lymphknoten.	63
Abb. 23: Übersicht über die histopathologisch und/oder molekular positiven Lymphknoten.	64

III Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	TNM Klassifikation des Prostatakarzinoms UICC 7 th ed.....	15
Tab. 2:	Übersicht über die Marker und Referenzgene	41
Tab. 3:	Übersicht über die Patientencharakteristika; T=Tumorstadium, c=klinisch	54
Tab. 4:	Einteilung der Patienten in die D'Amico Risikogruppen intermediäres und hohes Risiko.....	55
Tab. 5:	Übersicht über die molekular positiven Patienten und Lymphknoten. pN0/molN1*: Anzahl der histopathologisch negativen jedoch molekular positiven Lymphknoten in der Gruppe der 20 histopathologisch positiven Lymphknoten.....	60
Tab. 6:	Übersicht über die jeweilige Patientenanzahl, den Metastasierungstyp und die Lokalisation der Lymphknotenmetastasen.	65

IV Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
Abb.	Abbildung
aLA	ausgedehnte Lymphadenektomie
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
AS	Active surveillance
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
CSS	Krebsspezifische Überlebensrate (cancer-specific survival)
cDNA	Copy-Desoxyribonukleinsäure
Cis	Carcinoma in situ
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratmeter
CP	Crossing Point
Ct	Cycle Threshold
CTC	zirkulierende Tumorzellen
°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	disseminierte Tumorzellen
et al.	et alii
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
g	Gramm
HKG	Housekeepinggen
H ₂ O	Wasser
HPRT1	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1
IGRT	Image Guided Strahlentherapie

IMRT	Intensitätsmodulierte Strahlentherapie
kb	Kilobasen
KLK1	Kallikrein 1
KLK2	Kallikrein 2
KLK3	Kallikrein 3
KLK4	Kallikrein 4
LAE	Lymphadenektomie
Lk	Lymphknoten
μ	Mikro
M0	keine Fernmetastasen
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
ml	Milliliter
min	Minute
mind.	mindestens
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
-nr.	-nummer
NTC	non-template control
OD	optische Dichte
PBMC	peripher blood monoclear cells
PCa	Prostatakarzinom
pg	Pikogramm
PSA	Prostata Spezifisches Antigen
qRT-PCR	quantitative reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion
RGE	relative Genexpression
RNA	Ribonukleinsäure
RP	radikale Prostatektomie
RPL 13	Ribosomal Protein L 13
RPM	revolution per minute
RT	Reverse Transkriptase
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
vs	versus
ww	watch waiting
z.T.	zum Teil

1 Einleitung

Das Prostatakarzinom (PCa) ist die häufigste Krebserkrankung des Mannes in Deutschland, vor Darm- und Lungenkrebs. Das Lebenszeitrisko des Mannes an Prostatakrebs zu erkranken liegt bei 18%, an ihm zu sterben bei 3% (LAG et al., 2004). Da durch verbesserte Früherkennungsmaßnahmen der Anteil an kurativ behandelbarem und lokal begrenztem Prostatakarzinom steigt, sollten neue diagnostische Methoden entwickelt werden, die Risiko- und Prognoseeinschätzung sowie Therapieentscheidungen verbessern und unterstützen können.

Das Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen nach radikaler Prostatektomie stellt einen wesentlichen prognostischen Faktor für ein biochemisches Rezidiv dar. Als Standarduntersuchung erfolgt eine histopathologische Untersuchung der bei der radikalen Prostatektomie entnommenen Lymphknoten. Da pro Lymphknoten in der Regel maximal 1-2 histologische Schnitte begutachtet werden, besteht das Risiko eines Stichprobenfehlers. Kleinere Zellverbände von Tumorzellen, die einen Fokus für ein biochemisches Rezidiv bieten, könnten bei der histopathologischen Standarduntersuchung übersehen werden. Mittels molekularbiologischer Untersuchungen könnten solche Tumorherde in Zukunft routinemäßig detektiert werden und durch entsprechende Behandlung ein Rezidiv frühzeitig verhindert werden.

Aus diesem Grund beschäftigt sich folgende Arbeit mit der Detektion von disseminierten Tumorzellen in Lymphknoten bei lokalbegrenztem, klinisch nicht metastasiertem Prostatakarzinom mittels quantitativer reverser Transkriptase Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR).

1.1 Das Prostatakarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Das Prostatakarzinom ist in Europa die weitverbreitetste Neoplasie mit einer Inzidenz von 214 Fällen pro 100000 Männer pro Jahr und die zweithäufigste Krebstodesursache des Mannes (Heidenreich et al., 2012). Obwohl seit 1999 die Inzidenz um rund 50% gestiegen ist, ist die Sterberate hingegen seit 2003 leicht rückläufig (RKI & GEKID, 2012). Der starke Anstieg der Inzidenz in den westlichen Ländern während der letzten Dekade, lässt sich zum einem durch die demografische Entwicklung mit Überalterung der Bevölkerung sowie durch verbesserte Früherkennungsmaßnahmen erklären. Hierzu zählt die seit den 1990er Jahren eingeführte PSA-Tumormarkerbestimmung im Rahmen der

Vorsorgeuntersuchungen, wodurch Tumore vermehrt und früher erkannt werden (Hsing, Tsao, & Devesa, 2000; Majeed & Burgess, 1994; Mercer et al., 1997; Potosky, Miller, Albertsen, & Kramer, 1995; Weller, Pinnock, Silagy, Hiller, & Marshall, 1998). Darüber hinaus werden durch das verbesserte Screening nun auch vermehrt asymptomatische Prostatatumore in frühen Stadien entdeckt (Hsing et al., 2000). Bei Erstdiagnose nehmen das T1- und T2-Stadium zusammen einen Anteil von 76% ein, wohingegen der Anteil an T4-Stadien nur bei 3% liegt. Der Gipfel der altersspezifischen Erkrankungsrate liegt zwischen dem 75. und 79. Lebensjahr (RKI & GEKID, 2012). Daher ist der Anteil an Prostatakreberkrankungen in entwickelten Ländern viel höher als in Entwicklungsländern mit niedriger Lebenserwartung (Parkin, Bray, & Devesa, 2001).

1.1.2 Ätiologie und Pathogenese

Die Risikofaktoren des Prostatakarzinoms sind immer noch weitgehend unbekannt. Zu den Faktoren, welche eng mit dem PCa assoziiert sind, zählen Alter, ethnische Rasse sowie genetische Faktoren (Heidenreich et al., 2012). Ist zum Beispiel ein erstgradig Verwandter an Prostatakrebs erkrankt verdoppelt sich das Risiko. Bei zwei oder mehr betroffenen Verwandten ersten Grades, erhöht sich das Erkrankungsrisiko um den Faktor fünf bis elf (Gronberg, Damber, & Damber, 1996; Steinberg, Carter, Beaty, Childs, & Walsh, 1990). Bei ca. 9% der Erkrankten wird eine hereditäre Form mit autosomal dominantem Vererbungsweg angenommen. Es wird durch das Vorliegen von einem der folgenden Kriterien definiert: Erstens mindestens drei Verwandte sind betroffen oder zweitens mindestens zwei der betroffenen Verwandten erkranken sehr früh, beispielsweise vor dem 55. Lebensjahr (Carter, Beaty, Steinberg, Childs, & Walsh, 1992). Patienten mit hereditärem Prostatakarzinom werden im Median zwei Jahre früher als Patienten mit sporadischem Prostatakarzinom diagnostiziert (Heck, Kron, Gschwend, & Herkommer, 2012). Insgesamt unterscheidet sich aber der klinische Verlauf jedoch nicht von der sporadischen Form. Als mögliche Ursache wurden unterschiedliche Genloci in Familien mit hereditärem Prostatakarzinom nachgewiesen. Diese ließen sich in Bestätigungsstudien jedoch nicht verifizieren (Bratt, 2002).

Exogene Faktoren wie Ernährung, chronische Entzündungen, Sexualverhalten, etc. scheinen ebenfalls einen Einfluss auf die Pathogenese des Prostatakarzinoms zu haben (W. G. Nelson, De Marzo, & Isaacs, 2003). So ist beispielsweise auffallend, dass bei Japanern, welche nach Hawaii übersiedelten das Risiko, an einem PCa zu erkranken, anstieg. Bei einer Übersiedelung nach Kalifornien stieg dieses sogar über das

durchschnittliche Erkrankungsrisiko der Amerikaner (Zaridze, Boyle, & Smans, 1984). Daher geht man bei der Entstehung des Prostatakarzinoms von einem multifaktoriellen Geschehen mit genetischen Einflüssen und Umwelteinflüssen aus. Zu den ernährungsbedingten Faktoren, welche die Entwicklung der Krankheit beeinflussen können, gehören die Gesamtkalorienaufnahme (gespiegelt am Body Mass Index), Nahrungsfette, Fleisch, Spurenelemente und Vitamine (Carotinoide, Retinoide, Vitamin C, D und E), Obst und Gemüse, Mineralien und Phytoöstrogene. Die ersten vier Faktoren können die Entstehung eines Prostatakarzinoms bei zu hohem Konsum fördern, letztere wirken protektiv. Diese Aussagen sind kritisch zu betrachten, da zu diesem Ergebnis bisher nur Fall-Kontroll-Studien geführt haben. Es müssen weitere Untersuchungen veranlasst werden, um den Einfluss der Ernährung genauer charakterisieren zu können (Schmid, Engeler, Pummer, & Schmitz-Drager, 2007). Sexualsteroid, vor allem Testosteron und Dihydrotestosteron (DHT) tragen wesentlich zur Entstehung des Prostatakarzinoms bei (Madersbacher & Studer, 2002).

1.1.3 Klinik

Im Frühstadium verursacht das Prostatakarzinom in der Regel keine Beschwerden. Selten können bei Einengung der Harnröhre Beschwerden ähnlich dem benignen Prostatasyndrom bei der Miktion auftreten. Hierzu gehören schwacher Harnstrahl, Pollakisurie, Nykturie, Dysurie, Algurie und Überlaufinkontinenz (DGHO, 2011).

Im Spätstadium der Erkrankung können Schmerzen im Bereich der Wirbelsäule und des Beckens durch Knochenmetastasen hervorgerufen werden. In diesem Fall besteht das Risiko für pathologische Frakturen (Deutsche Krebshilfe, 2011). In den meisten Fällen stellen Knochenmetastasen sogar die vorherrschende klinische Manifestation der Erkrankung dar und sind die Hauptursache für Morbidität und Mortalität. (Apolo, Pandit-Taskar, & Morris, 2008). Treten Lymphknotenmetastasen auf, so kann es zu peripheren Lymphödemen kommen.

1.1.4 Klassifikation

Die UICC (International Union Against Cancer) verfasste für das Prostatakarzinom folgende TNM-Klassifikation, wobei T für die Ausdehnung des Primärtumors, N für den Lymphknotenstatus und M für die Metastasierung steht (Sobin, 1999). Wird das Staging klinisch ermittelt wird ein „c“ für klinisch vorangestellt. Ein vorangestelltes „p“ bedeutet, dass das Staging durch eine Untersuchung des Pathologen ermittelt wurde.

<u>T</u> Ausdehnung des Primärtumors	
TX	Primärtumor kann nicht bewertet werden
T0	Kein Anhalt für einen Primärtumor
T1	Klinisch inapparenter Tumor, nicht tastbar oder durch bildgebende Verfahren darstellbar (Inzidentalumor)
	T1a Tumor befällt <5% des resezierten Gewebes
	T1b Tumor befällt >5% des resezierten Gewebes
	T1c Tumor wurde durch Nadelbiopsie diagnostiziert
T2	Tumor überschreitet die Prostatakapsel nicht
	T2a Tumor <50% eines Seitenlappens
	T2b Tumor >50% eines Seitenlappens
	T2c Tumor befällt beide Seitenlappen
T3	Tumor überschreitet die Prostatakapsel
	T3a extrakapsulär ohne Befall der Samenblase
	T3b extrakapsulär mit Befall der Samenblase
T4	Tumor ist fixiert oder infiltrierte Nachbargewebe
<u>N</u> Regionale Lymphknoten	
NX	Keine Aussage zu regionären Lymphknoten möglich
N0	Keine Metastasen in regionären Lymphknoten
N1	Regionäre Lymphknotenmetastasen
<u>M</u> Fernmetastasen	
MX	Keine Aussage zu Fernmetastasen möglich
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen
	M1a Metastasen in nicht regionären LK
	M1b Knochenmetastasen
	M1c Metastasen in anderen Organen und/oder Strukturen

Tab. 1: TNM Klassifikation des Prostatakarzinoms UICC 7thed

Der Gleason Score, welcher am histopathologischen Präparat nach Prostatastanziobiospien oder Prostatektomie festgelegt wird kann als Maß für die Aggressivität des Adenokarzinoms der Prostata herangezogen werden. Hierbei werden die beiden häufigsten vorkommenden Wachstumsmuster der Prostatakarzinomzellen addiert (Score 1 – 5), wodurch sich ein Gleason Score zwischen 2 und 10 ergibt. Dabei stellt 2 die am

wenigsten aggressive Form und 10 die aggressivste dar (Epstein, Allsbrook, Amin, Egevad, & Committee, 2005).

Das lokal begrenzte Prostatakarzinom kann mittels klinischer Tumorausdehnung, PSA-Wert und Gleason-Score in drei Risikogruppen eingeteilt werden. Diese Einteilung stellt eine wichtige Orientierungshilfe bezüglich der Therapieentscheidung, Metastasierungsrisiko, Rezidivrisiko und Prognose dar (D'Amico et al., 1998).

- Niedriges Risiko: $cT1c/cT2a$ und $PSA \leq 10\text{ng/ml}$ und Gleason ≤ 6
- Intermediäres Risiko: $cT2b-c$ oder $PSA > 10 \leq 20\text{ng/ml}$ oder Gleason 7
- Hochrisiko: $\geq cT3a$ oder $PSA > 20\text{ng/ml}$ oder Gleason ≥ 8

1.1.5 Screening Untersuchungen

Die Frage bezüglich der Screening Untersuchungen wird immer wieder kontrovers in vielen Studien bezüglich Überdiagnostik und Nutzen diskutiert. So ergab die amerikanische PLCO-Studie, dass kein signifikanter Unterschied bezüglich der Mortalität bezogen auf das Prostatakarzinom zwischen einer Kontrollgruppe ohne PSA-Screening bzw. digitale rektale Untersuchung (DRU) und der Screening Gruppe bestand (Andriole et al., 2009). Wesentliche Kritikpunkte an dieser Studie sind allerdings ein kurzer Nachsorgezeitraum und eine studienabhängige PSA-Wertbestimmung in der Kontrollgruppe.

In der europäischen ERSPC-Studie um Schroder et al. hingegen ergab sich ein Nutzen eines PSA-Screenings. Hierbei ließ sich die Sterberate des PCa um 21% senken (Schroder, Roobol, & Bangma, 2015).

Diese beiden großen Studien wurden immer wieder diskutiert und mögliche Fehlerquellen, wie zum Beispiel eine zu kurze Nachbeobachtungszeit oder eine mangelnde Compliance bei den Probanden gesucht. Die Ergebnisse daraus machte man sich zunutze um eine sinnvolle Lösung bezüglich einer Screening Untersuchung zu finden. So setzte man nun eine Altersgrenze von 40 Jahren, ab welcher ein anschließendes PSA-Screening für sinnvoll erachtet wird. Es soll dann risikoadaptiert fortgesetzt werden bis zu einer Restlebenserwartung von zehn Jahren (Borgermann et al., 2010). Bei Männern, die das 75. Lebensjahr bereits überschritten haben, ist von einer

Früherkennungsuntersuchung abzusehen, da diese keine klinischen Konsequenzen nach sich ziehen würde (Schaeffer et al., 2009)

1.1.6 Diagnostik

Die drei Hauptsäulen der Diagnose sind die DRU, der PSA-Wert und der transrektale Ultraschall. Bei suspektem Tastbefund oder PSA-Wert besteht die Indikation zur Prostatabiopsie zur weiteren histopathologischen Abklärung.

Ca. 18% der Prostatakarzinome werden durch eine suspekte DRU diagnostiziert, der PSA-Wert alleine weist ca. 45% aller Prostatakarzinome nach. Demnach verspricht die Kombination der beiden Methoden die höchste Diagnoserate in jeglichen Altersgruppen (Richie et al., 1993). Prostatakarzinome lassen sich bei peripherer Lage in der Regel ab einem Volumen von 0,2 ml oder größer durch eine DRU ertasten (Heidenreich et al., 2012). Ist ein Prostatakarzinom vorhanden so steigt der PSA-Wert in der Regel an. Der PSA-Wert ist organspezifisch jedoch nicht tumorspezifisch. Zu einer PSA-Werterhöhung führen ebenfalls eine benigne Prostatahyperplasie oder einer Prostatitis (Stamey et al., 1987). Weiterhin können Manipulationen wie z.B. DRU oder Zystoskopie kurz vor Blutentnahme den PSA-Wert erhöhen. Liegt der PSA-Wert im Graubereich von 4 – 10 ng/ml sollte dieser als erstes in einer zweiten Abnahme nach vier bis sechs Wochen verifiziert werden. Dabei ist es wichtig, dass die PSA-Wertbestimmung mit der gleichen Methodik standardisiert erfolgt (Eastham Ja & et al., 2003). Eine suspekte DRU und/oder ein erhöhter PSA-Wert ergeben die Indikation zu einer Prostatastanziopsie, welche transrektal oder transperineal erfolgen kann. Die Höhe des PSA-Wertes, welcher die Biopsie rechtfertigt ist noch nicht vollständig geklärt. Bei jüngeren Männern wird aber bereits ab einem PSA-Wert von 2 – 3 ng/ml eine Biopsie empfohlen. Die Anzahl der dabei entnommenen Stenzen sollte mindestens zehn sein, bei größerem Volumen kann die Anzahl erhöht werden (Heidenreich et al., 2012).

1.1.7 Therapie und Nachsorge

Bei der Behandlung des Prostatakarzinoms gibt es verschiedene Therapieansätze: „watchful waiting“, „active surveillance“, radikale Prostatektomie und Radiotherapie. Welche Therapie angewandt wird muss im Einzelfall entschieden werden.

„watchful waiting“

„watchful waiting“ was so viel bedeutet wie „beobachtendes Abwarten“ wurde vor allem in der Prä-PSA-Screening-Ära geprägt (vor 1990). Das PCa wird zunächst nur

konservativ behandelt. Bei klinischen Beschwerden leitet man eine palliative Behandlung ein, zum Beispiel eine transurethrale Resektion der Prostata (TUR-P) bei Harnwegsverschluss oder eine Hormontherapie bzw. Strahlentherapie bei Metastasen bedingten Beschwerden (Heidenreich et al., 2012). Diese Art der Behandlung wird vor allem bei älteren Männern mit wenig aggressivem Prostatakarzinom und vielen Begleiterkrankungen und einer damit verbundenen verminderten Lebenserwartung von weniger als zehn Jahren angewandt (Heidenreich et al., 2012). Tumore mit einem hohem Differenzierungsgrad, welche langsam wachsen und wenig aggressiv sind, werden bevorzugt mit dieser Methode behandelt (Adolfsson, 2008).

„active surveillance“

„active surveillance“ ist gleichbedeutend mit „aktiver Überwachung“. Der Begriff wurde vor allem in der letzten Dekade geprägt und beinhaltet die aktive Entscheidung nicht sofort zu behandeln. Diese Methode ist geeignet für Patienten mit einem klinisch lokal begrenztem PCa (cT1c – cT2a), einem Gleason Score ≤ 6 , einem PSA ≤ 10 ng/ml, Tumor in ≤ 2 Stanzbiopsien und $\leq 50\%$ Tumor in einer Stanzbiopsie (Klotz, 2005). In den ersten beiden Jahren soll der Tumor durch PSA-Wertbestimmung und DRU alle drei Monate kontrolliert werden, dann halbjährlich. Alle zwölf bis 18 Monate soll eine Biopsie durchgeführt werden. Ein Verlassen der „active surveillance“ ist bei folgenden Kriterien gerechtfertigt:

- Verdoppelungszeit des PSA-Wertes weniger als drei Jahre
- PSA-Wertanstieg > 10 ng/ml
- Verschlechterung des Gleason Score auf ≥ 6
- Patientenwunsch (Deutsche Gesellschaft Urologie, 2009)

Bei der „active surveillance“ handelt es sich im Gegensatz zum „watchful waiting“ um einen kurativen Behandlungsansatz. „active surveillance“ ist nur zur Behandlung einer selektierten oben definierten „low-risk“ Patientengruppe geeignet (Heidenreich et al., 2012).

Radikale Prostatektomie

Patienten, die in dieser Arbeit als Probanden teilgenommen haben, unterzogen sich alle einer radikalen Prostatektomie mit einer ausgedehnten Lymphadenektomie.

Bei der radikalen Prostatektomie wird die Prostata mit Samenbläschen zwischen der Harnröhre und der Harnblase entfernt. Ziel der radikalen Prostatektomie sollte bei

Männern mit einer Lebenserwartung von mindestens zehn Jahren die komplette Eradikation der Krankheit sein, während sowohl die Kontinenz als auch die erektile Funktion durch nervenschonende Verfahren erhalten bleiben sollte (Bianco, Scardino, & Eastham, 2005). Bei den meisten Männern mit einem lokal begrenztem PCa kann eine nervenschonende RP durchgeführt werden (Gontero & Kirby, 2005; Sokoloff & Brendler, 2001). Immer häufiger wird die Bildgebung in Form einer Kernspintomographie verwendet, um Patienten zu selektieren, bei denen ein nervenerhaltendes Vorgehen sinnvoll ist (Park et al., 2014; Roethke et al., 2013). Trotzdem gibt die EAU-Leitlinie von 2014 folgende „Kontraindikationen“ für ein nervenerhaltendes Vorgehen vor:

- hohes Risiko für extrakapsuläres Wachstum, d.h. cT3, cT2c
- Gleason-Score ≥ 7 oder mehr als eine positive Biopsie mit Gleason-Score ≥ 6 auf ipsilateraler Seite (Heidenreich et al., 2012)

Grundsätzlich gibt es keine festgelegte Altersgrenze, ab der eine radikale Prostatektomie nicht mehr durchgeführt werden darf (Droz et al., 2010). Dennoch ist es von Bedeutung, Ko-Morbiditäten richtig zu beurteilen. Bei multimorbiden Patienten ist das Risiko an Komplikationen und an Prostatakrebs-unabhängigen Ursachen zu versterben erhöht (Albertsen et al., 2011). Bei der Aufklärung des Patienten bezüglich einer möglichen chirurgischen Therapie ist es wichtig eine Abschätzung seiner Lebenserwartung zu berücksichtigen (Walz et al., 2007). Das Patientenalter von mehr als 80 Jahren bzw. eine klinische Lebenserwartung von weniger als zehn Jahren aufgrund von Komorbiditäten spricht gegen eine radikale Prostatektomie.

Die erste retropubische Prostatektomie wurde von Memmelaar und Millin durchgeführt (Memmelaar, 1949). Als Walsh und Donker die Anatomie des dorsalen venösen Komplexes und der neurovaskulären Bündel beschrieben, verbesserte sich der Blutverlust und die Rate an Potenz und Kontinenz erheblich (Walsh & Donker, 1982).

In jüngster Zeit wurden neben der retropubischen bzw. der perinealen radikalen Prostataektomie minimal invasive Verfahren entwickelt. So gelten in den USA die laparoskopische radikale Prostatektomie und die Roboter-assistierte laparoskopische Prostatektomie bei lokalisierten Prostatatumoren als Methode der Wahl. Auch in Europa finden diese Methoden zunehmend Anklang. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass Blutverluste und Transfusionsraten geringer waren als unter den herkömmlichen Methoden. Ob jedoch auch eine Verbesserung bezüglich onkologischer

und funktioneller Ergebnisse auftritt, ist noch nicht ausreichend geklärt (Coelho et al., 2010; Ficarra et al., 2009; Kang, Hardee, Fesperman, Stoffs, & Dahm, 2010).

Lymphadenektomie bei radikaler Prostatektomie

Die kurative Therapie steht bei lokal begrenztem Prostatakarzinom an erster Stelle. Der Lymphknotenbefall stellt einen wesentlichen prognostischen Faktor dar.

Es werden bei der Lymphadenektomie eine eingeschränkte Standard- und eine ausgedehnte Lymphadenektomie (LAE) unterschieden. Bei der Standard-LAE werden die Lymphknoten in der Fossa obturatoria und an der A. iliaca externa beidseits entfernt. Für die ausgedehnte Lymphadenektomie wurde bisher kein Standard festgelegt. Es gibt Meinungsverschiedenheiten darüber, ob die A. iliaca communis und die A. iliaca interna beidseits mit eingeschlossen werden sollten oder nicht (Bader P Fau - Burkhard, Burkhard Fc Fau - Markwalder, Markwalder R Fau - Studer, & Studer; Gil-Vernet, 1996; Heidenreich, Ohlmann, & Polyakov, 2007; Weckermann et al., 2007).

Eine Lymphadenektomie kann Komplikationen wie Lymphozelen, Thrombosen oder Lymphödeme hervorrufen, weshalb die Indikation und das Ausmaß der Lymphadenektomie streng gestellt werden sollte.

Bei Patienten mit Prostatakarzinomen und niedrigem Risikoprofil (cT1c und PSA < 10 ng/ml und Gleason-Score \leq 6) kann auf eine Lymphadenektomie verzichtet werden, da dieses Patientenkollektiv ein geringes Risiko für einen Lymphknotenbefall aufweist (Deutsche Gesellschaft Urologie, 2009).

Patienten mit einem lokalisierten Prostatakarzinom sollten ab einem intermediären Risiko eine ausgedehnte LAE erhalten. Bei einem intermediären Risiko ist eine Lymphknotenbeteiligung in ca. 15-25% der Fälle zu erwarten, bei einem Hochrisiko Karzinom sogar in 25-40% der Fälle (Briganti et al., 2012; Heidenreich et al., 2012).

Aufgrund der positiven Lymphknoten außerhalb der Standard-LAE wird derzeit nur eine ausgedehnte LAE empfohlen (Deutsche Gesellschaft Urologie, 2009). So konnte Bader et al. zeigen, dass bei Patienten mit klinisch lokalisiertem Prostatakarzinom und präoperativ keinem Hinweis auf eine Lymphknotenmetastasierung in 24% der Fälle ein pN1-Stadium diagnostiziert werden konnte. In über der Hälfte der Fälle (58%) fand man Lymphknotenmetastasen entlang der A. iliaca interna und in 19% der Fälle fand man Metastasenherde sogar nur an der A. iliaca interna. Im Falle einer Standard-LAE hätte man damit ca. ein Fünftel der nodalpositiven Fälle übersehen. Ohne eine ausgedehnte Lymphadenektomie wären in mehr als der Hälfte der Fälle Lymphknotenmetastasen in

situ verblieben (Bader P Fau - Burkhard et al.). Aktuell gibt es jedoch noch keine einheitlichen Angaben bezüglich der kranialen Grenze des ausgedehnten LAE-Feldes.

Im Falle einer Lymphadenektomie müssen mindestens zehn Lymphknoten entfernt werden, da die Anzahl der positiven Befunde mit der Zahl der entnommenen Lymphknoten korreliert (Deutsche Gesellschaft Urologie, 2009). Joslyn et al. konnten in einer retrospektiven Studie einen statistisch signifikanten Vorteil im tumorspezifischem Überleben bei Patienten zeigen, denen mindestens zehn Lymphknoten entnommen wurden (Joslyn & Konety, 2006). Allaf et al. konnten ähnliche Ergebnisse nachweisen (Allaf, Palapattu, Trock, Carter, & Walsh, 2004). Di Marco et al. konnte hingegen keinen Zusammenhang zwischen der Zahl der entfernten Lymphknoten und dem tumorspezifischen Überleben zeigen (DiMarco et al., 2005). Aufgrund dieser uneinheitlichen Datenlage ist ein Überlebensvorteil für nodalpositive oder nodalnegative durch eine ausgedehnte Lymphadenektomie ohne adjuvante Therapie zurzeit nicht gesichert (Deutsche Gesellschaft Urologie, 2009).

Radiotherapie

Grundsätzlich bietet die externe Strahlentherapie vergleichbare Langzeitüberlebensraten wie die radikale Prostatektomie. Zudem bietet die externe Strahlentherapie eine vergleichbare Lebensqualität (Fowler, Barry, Lu-Yao, Wasson, & Bin, 1996). Goldstandard sind im Moment die Intensitätsmodulierte Strahlentherapie (IMRT) und Image Guided Strahlentherapie (IGRT) (Heidenreich et al., 2012). Die IMRT ist dabei ein Verfahren, das zu einer verbesserten Zielvolumenerfassung (Konformalität) führt, d. h. niedrigere Strahlendosen am Normalgewebe bei optimierter Dosierung an Tumor und Bestrahlungszielgewebe. Klinische Studien haben eine bessere Schonung der relevanten Risikoorgane (Hüftkopf, Harnblase, Enddarm) gezeigt (Paulsen, Belka, Alber, Budach, & Bamberg, 2003). Sobald von einem Befall der Lymphknoten ausgegangen wird, muss eine zusätzliche medikamentöse Therapie eingeleitet werden, da eine alleinige Radiotherapie nutzlos ist (Bolla et al., 2009).

Eine weitere Möglichkeit ist die transperineale Brachytherapie. Hierbei werden Radioisotope implantiert. Die „low-dose rate“ Brachytherapie ist eine geeignete Therapiemöglichkeit für „low-risk“ Patienten. Um den genauen Stellenwert festzulegen, fehlen jedoch randomisierte Studien, die die Brachytherapie mit anderen Therapiemodalitäten vergleichen (Heidenreich et al., 2012).

Nachsorge

Die Nachsorge ist ein wichtiger Bestandteil der Therapie. Sie ermöglicht unter anderem, dass ein Rezidiv frühzeitig erkannt wird und weitere Therapiemaßnahmen rechtzeitig eingeleitet werden können. Die Nachsorge besteht dabei in der Bestimmung des PSA-Wertes und einer DRU in regelmäßigen Abständen. Anfangs nach drei, sechs und zwölf Monaten postoperativ, dann alle sechs Monate drei Jahre lang und ab diesem Zeitpunkt jährlich. Grundsätzlich richtet sich die Tumornachsorge nach dem Tumorstadium und dem Risikoprofil jedes einzelnen Patienten. (Heidenreich et al., 2012)

1.1.8 Prognose

Die relative Überlebensrate des Prostatakarzinoms bis fünf Jahre nach Diagnose liegt bei 92% (RKI & GEKID, 2012). Nach einer radikalen retropubischen Prostatektomie mit kurativer Zielsetzung haben 75% der Patienten mit einem lokalisierten Prostatakarzinom ein langfristig rezidivfreies Intervall (>10 Jahre). Auch Patienten mit einem Hochrisiko Karzinom profitieren von einer radikalen Prostatektomie (Hull et al., 2002). Die Prognose bezüglich der Rezidivwahrscheinlichkeit korreliert im pN0-Stadium und fehlender Samenblaseninfiltration streng mit dem Gleason-Score. Bei einem Gleason-Score 2 - 4 beträgt die zehnjahres Rezidivwahrscheinlichkeit 4%, bei Gleason-Score 5-6 19%, bei Gleason-Score 7 50% und bei Gleason-Score 8-10 sogar 66% (Epstein, Pizov, & Walsh, 1993).

Der Lymphknotenstatus spielt bezüglich der Prognose eine entscheidende Rolle. So sind Lymphknotenmetastasen der wichtigste prognostische Faktor bei klinisch lokalisiertem Prostatakarzinom für ein Rezidiv (Miyake et al., 2007). Die Anzahl der positiven Lymphknoten ist für die krebspezifische Überlebensrate (CSS) von Bedeutung. So konnten Briganti et al. zeigen, dass Patienten mit ≤ 2 Lymphknotenmetastasen eine signifikant bessere CSS gegenüber Patienten mit >2 positiven Lymphknoten hatten (84% vs. 62%) (Briganti et al., 2009).

Bei ca. 10% der Patienten tritt trotz kurativem Therapieansatz und nodalnegativem Status ein biochemisches Rezidiv auf (Walsh, Partin, & Epstein, 1994)(Catalona & Smith, 1998). Es gibt Hinweise, dass kleine Ansammlungen von metastatischen Prostatakrebszellen in Lymphknoten, welche durch die routinemäßige histopathologische Untersuchung übersehen werden, einen Einfluss auf die Rezidivwahrscheinlichkeit haben (Ferrari et al., 1997; Miyake et al., 2007). Aus diesem Grund untersuchten Ferrari et al. Lymphknotengewebe von Prostatakrebspatienten mittels quantitativer Polymerase

Kettenreaktion (qPCR) und ebneten den Weg zu einem molekularem Verfahren, durch das Hochrisiko Patienten für ein biochemisches Rezidiv identifiziert werden sollen. Sie setzten einen Grenzwert für PSA in Lymphknotengewebe und konnten Patienten detektieren, die eine erhöhte Wahrscheinlichkeit haben, ein biochemisches Rezidiv bis hin zu einem Tumorrezidiv zu erleiden. Diese Patienten könnten von einer zusätzlichen Therapie profitieren (Ferrari et al., 2006). Diese „molekulare Metastasierung“ gilt als mögliche Ursache, dass Tumorrezidive nach radikaler Prostatektomie trotz lokaler R0-Resektion und histopathologisch negativem Lymphknotenstatus auftreten. Diese sogenannten disseminierten Tumorzellen lassen sich durch sensitivere Methoden nachweisen und könnten eine genauere individuelle Aussage im Hinblick auf die Prognose des Patienten haben. Durch die Beschreibung ihrer Topographie ließe sich die Ausdehnung der Lymphadenektomie in Zukunft näher definieren.

1.2 Disseminierte Tumorzellen und molekulare Marker

1.2.1 Definition

Der wichtigste prognostische Faktor einer Krebserkrankung ist das Vorhandensein einer Metastasierung. Disseminierte Tumorzellen werden als Surrogat für die frühe Metastasierung der Krankheit angesehen. Sie sind definiert als einzelne Zellen oder kleine Zellverbände und können im Knochenmark, in Lymphknoten oder im peripheren Blut vorkommen. Im peripheren Blut werden sie auch als zirkulierende Tumorzellen bezeichnet (Balic, Williams, Dandachi, & Cote, 2010).

Histopathologisch lassen sich drei Arten von metastatischen Absiedlungen der Größe nach bestimmen. Isolierten Tumorzellen mit einer Größe $\leq 0,2$ mm, Mikrometastasen mit einer Größe von $\geq 0,2$ mm und < 2 mm und Makrometastasen ≥ 2 mm (Singletary, Greene, & Sobin, 2003).

„Tumor Cell Dormancy“

Luzzi et al. fand heraus, dass nur ca. 0,01% der Krebszellen, die in den Körperkreislauf injiziert werden tatsächlich Metastasen auslösen. Metastatische Prozesse sind auf den ersten Blick betrachtet äußerst ineffizient (Luzzi et al., 1998). Wie diese disseminierten Tumorzellen jedoch vernichtet werden, ist noch weitgehend unbekannt. Zurzeit geht man von einer Reaktion des Immunsystems (Hanna, 1982) oder hämodynamischen Kräften aus (Weiss, 1991). Jedoch werden nicht immer alle disseminierten Tumorzellen, die sich

im Körper befinden vernichtet. Überleben nur einige dieser Zellen können sie nach Absiedlung in unterschiedlichen Regionen manifeste Metastasen bilden.

Dies kann auch noch Jahre nach Entfernung des Primärtumors passieren. In diesen Jahren findet man keinen klinischen Hinweis auf das Vorhandensein solcher disseminierter Tumorzellen. Diese Tatsache wird auch „tumor cell dormancy“ bezeichnet (Meng et al., 2004). Die Tumorzellen befinden sich in diesem Stadium in einem Ruhezustand, auch G0 Phase (mitotisch inaktive Phase) genannt. Es findet weder Zellproliferation noch Apoptose statt. Eine Behandlung dieser disseminierten Tumorzellen ist in diesem Ruhezustand äußerst schwierig, da typische Chemotherapeutika Zellen angreifen, die sich gerade in der Proliferationsphase befinden (Pantel, Cote, & Fodstad, 1999). Aus diesem Grund können auch nach adjuvanter Chemo- oder Radiotherapie disseminierte Tumorzellen vorhanden sein (Riethdorf, Wikman, & Pantel, 2008)

1.2.2 Detektion von disseminierten Tumorzellen

Die beiden meist angewandten Methoden zur Detektion von disseminierten Tumorzellen sind die Immunzytochemie und die Polymerasekettenreaktion. Sie ermöglichen das Erkennen von einzelnen Tumorzellen aus Millionen normaler Zellen (Pantel et al., 1999). Bei der Immunzytochemie bedient man sich immunologischer Zelleigenschaften wie zum Beispiel dem Anfärben bestimmter Zellbestandteile mit spezifischen monoklonalen Antikörpern (Schlimok et al., 1987). Ein bedeutender Nachteil bei diesem Verfahren stellt die Kreuzreaktivität einiger Antikörper mit normalen Körperzellen dar, wodurch falsch positive Ergebnisse hervorgerufen werden können (Ghossein & Bhattacharya, 2000).

Zu den molekularen Methoden zählt die Reverse-Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-PCR), welche auf der reversen Transkription von RNA in cDNA und schließlich deren Amplifikation beruht. Ein Nachteil dieser Methode ist, dass Tumorzellen nicht morphologisch identifiziert und isoliert werden können (Riethdorf et al., 2008).

1.2.3 Molekulare Tumormarker

Molekulare Tumormarker sind körpereigene Substanzen (z.B. Proteine, Nukleinsäuren), die bei Krebserkrankungen vermehrt oder in veränderter Form produziert werden können. Sie können im Rahmen der Primärdiagnostik oder der Tumornachsorge genutzt werden und im Falle einer Erkrankung bzw. eines Rezidivs in ansteigender Konzentration gemessen werden (Müller, Goessl, Krause, & Miller, 2003). So dient z.B. die Messung

des PSA-Wertes im Blut des Patienten beim Prostatakarzinom sowohl dem Tumor-Screening als auch der Tumornachsorge (Heidenreich et al., 2012).

Um Diagnose, Therapie und Nachsorge weiterhin zu verbessern ist man bemüht neue molekulare Tumormarker im klinischen Alltag zu etablieren. Diese Arbeit beschäftigt sich näher mit dem Gen Kallikrein 4 (KLK4), welches eine dem PSA ähnliche Serinprotease und dessen RNA-Expression in Lymphknoten beim Prostatakarzinom kodiert.

1.2.4 Kallikrein 4

Kallikreine sind Serinproteasen die eine wichtige Rolle in einer Vielzahl von physiologischen und pathologischen Prozessen spielen. Die Kallikrein-Familie ist auf Chromosom 19 lokalisiert und zählt bisher 15 „Mitglieder“, welche allesamt Enzyme mit extrazellulären Substraten und Funktionen sind (Xi et al., 2004). Kallikreine kommen in unterschiedlichen Spezies (z. B. Maus, Mensch, Schwein) vor. Gemeinsames Merkmal aller Gewebe-Kallikreine ist die ähnliche genomische Organisation von fünf Exons, die spezielle Anordnung von Aminosäuren, die für die katalytische Aktivität der Serinprotease verantwortlich ist und ein Signalpeptid, welches bei allen im ersten Exon codiert ist (Korkmaz, Korkmaz, Pretlow, & Saatcioglu, 2001). Die am besten erforschten Kallikreine sind KLK1 (und dessen Protein hK1), welches vor allem im Gewebe, im Pankreas und in den Nieren vorkommt, KLK2 (hK2), das vor allem in Drüsen gefunden wird und KLK3, auch bekannt als PSA/hK3 (Obiezu et al., 2002). KLK4 ist ein Bestandteil dieser Kallikrein-Familie. Es ist beim Menschen wie alle Kallikreine auf Chromosom 19 lokalisiert und beinhaltet 5,2 kb mit fünf Exons und vier Introns (Stephenson, Verity, Ashworth, & Clements, 1999). Die drei auf dem Chromosom benachbarten Kallikreine 2-4 sind gewebespezifisch für die Prostata. Werden alle drei stark exprimiert, weist dies auf eine Veränderung der Prostata hin (Clements, Hooper, Dong, & Harvey, 2001; Obiezu et al., 2002).

In der Literatur findet man einige Synonyme für KLK4 und dessen Protein hK4, da es durch verschiedene unabhängige Gruppen entdeckt wurde (Dong et al., 2005). So wird es auch KLK-Like1, Prostase, androgen-related message 1/ARM1 oder enamel matrix serine protease 1/EMSP1 genannt (P. S. Nelson et al., 1999; Stephenson et al., 1999; Yousef & Diamandis, 2001). Anders als bei den anderen Kallikreinen fehlt dem KLK4 das Signalpeptid und die primäre Funktion dieser Serinprotease spielt sich innerhalb der Zelle ab. Im Gegensatz hierzu agieren die restlichen Kallikreine hauptsächlich außerhalb

der Zelle. Es gibt mindestens zwei unterschiedliche Splice-Varianten von KLK4 (Korkmaz et al., 2001). Welche dieser Isoformen für das Prostatakarzinom im Sinne eines möglichen Tumormarkers eine Rolle spielt ist noch nicht hinreichend geklärt. Die Isoformen KLK4-254/hK4-254 und KLK4-205/hK4-205 sollen aber die zwei wichtigsten sein (Dong et al., 2005). Eine androgenabhängige Transkription wurde bei Isoformen von KLK4 in mehreren Studien beschrieben (Avgeris, Stravodimos, & Scorilas, 2011; P. S. Nelson et al., 1999; Yousef & Diamandis, 2001). Vor allem mit der Hilfe der RT-PCR konnte gezeigt werden, dass KLK4 mRNA-Spiegel im Primärtumor deutlich erhöht sind (Day et al., 2002; Obiezu et al., 2002). Avgeris et al. fanden heraus, dass neben dieser Hochregulation im Primärtumor in fortgeschrittenen Stadien auch eine Assoziation mit dem präoperativen PSA-Spiegel besteht.

So kann es als unabhängiger Biomarker für die Unterscheidung zwischen malignen und benignen Prostatatumoren im Prostatagewebe dienen (Avgeris et al., 2011).

Wie sich KLK4 in Lymphknoten bei Prostatakarzinom Patienten verhält, ist bisher nicht hinreichend geklärt. Diese Arbeit soll Aufschluss über die Expression von KLK4 in Lymphknoten bei PCa-Patienten geben.

2 Fragestellung

Die Detektion von Lymphknotenmetastasen ist ein wichtiger Prognosefaktor bezüglich eines biochemischen Rezidivs nach radikaler Prostatektomie (Cheng et al., 2001).

Ein Ziel dieser Arbeit ist es bei Patienten mit lokalisiertem Prostatakarzinom molekular Lymphknotenmetastasen nachzuweisen. Hierfür dient die qRT-PCR-Diagnostik mit Bestimmung der Expression von PSA und KLK4 bei der Durchführung in Korrelation mit der histopathologischen Standarduntersuchung.

Hierzu wird folgende Fragestellung untersucht:

- Ist die qRT-PCR eine geeignete Methode um Lymphknotenmetastasen molekular nachzuweisen?
- Wie viele histopathologisch positive Lymphknoten können gefunden werden?
- Wie viele molekularpositive Lymphknoten können gefunden werden?
- Besteht eine Korrelation zwischen histopathologisch positiven und molekularpositiven Lymphknoten?
- Ist KLK4 ein geeigneter Marker um Lymphknotenmetastasen molekular nachzuweisen?

Ein weiteres Problem ist, dass es keine einheitliche Definition einer ausgedehnten Lymphadenektomie gibt.

Daher beinhaltet diese Arbeit die Topographie der extrahierten Lymphknoten mit folgenden Fragen:

- In welchen Regionen des Lymphadenektomiefeldes treten histopathologische Metastasen bevorzugt auf?
- In welchen Regionen des Lymphadenektomiefeldes treten molekulare Metastasen bevorzugt auf?
- Besteht eine Korrelation zwischen ihnen?
- Hätte eine Standard-Lymphadenektomie ausgereicht?
- Wie weit sollte in Zukunft Lymphadenektomie durchgeführt werden?

Untersucht wurden 84 Patienten mit Prostatakarzinom, die mit einer radikalen Prostatektomie und einer ausgedehnten Lymphadenektomie behandelt wurden. Das ausgedehnte Lymphadenektomiefeld wurde definiert durch die anatomischen Regionen Fossa obturatoria, A. iliaca externa, A. iliaca interna und A. iliaca communis.

3 Material und Methoden

3.1 Zellkulturen

3.1.1 Material für die Zellkulture

3.1.1.1 Verbrauchsmaterialien

Zellkulturschalen 100x200 mm	BD Falcon™
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
Neubauer Zählkammer Tiefe 0,100 mm, 0,0025 mm ²	Superior Marienfeld
Handschuhe Senso Skin	Medika Medizintechnik GmbH
Pipettenspitzen 1250 µl	Biozym

3.1.1.2 Reagenzien

RPMI 1640 Medium mit Phenolrot	Biochrom AG™
Dulbecco's Mod Eagle Medium (DMEM)	Biochrom AG™
Fötale Kälberserum	Biochrom AG™
PBS Dulbecco	Biochrom AG™
Antibiotikagemisch: 1000U Penicillin + 10mg Streptomycin	
mirVana™ miRNA isolation kit, Lysepuffer	Ambion®
Trypsin/EDTA Solution: 0,5 g/l EDTA in PBS ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺	

3.1.1.3 Laborgeräte

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

3.1.2 Kultivierung von permanenten Zelllinien

Für die Zellkultur wurden LNCaP Tumorzellen verwendet, die im weiteren Verlauf als Positivkontrolle bei der quantitativen Reversen Transkriptase Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) und zur Sensitivitätsuntersuchung der verwendeten Marker mittels Verdünnungsreihen dienen. Die Kultivierung erfolgte in RPMI 1640 Zellkulturmedium. Dieses Medium enthält 10% fötales Kälberserum, 1% nichtessentielle Aminosäuren und 1% eines Antibiotikagemisches aus Penicillin und Streptomycin. Die Tumorzellen wurden bei 37°C und einer 5% CO₂ Atmosphäre kultiviert.

3.1.3 Erstellen einer neuen Zellpassage

Sobald die Zellen eine ausreichende Konfluenz unter dem Mikroskop zeigten, wurde das Nährmedium abpipettiert und verworfen. Anschließend wurde 10 ml PBS zur Reinigung von Mediumrückständen hinzugefügt, sogleich wieder abpipettiert, 2,5 ml Trypsinlösung hinzugefügt und für 5 min bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert.

Die Zellen sollten sich vom Boden der Petrischale ablösen. Dies wurde mikroskopisch kontrolliert. Waren die Zellen vollständig abgelöst, wurde 7,5 ml Nährmedium zugegeben und die Zellsuspension in 10 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Anschließend wurde bei 250 RPM (revolution per minute) 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet wurde in 10 ml Nährmedium resuspendiert und in eine neue Petrischale gegeben.

3.1.4 Herstellung von Zelllysaten

Die Petrischalen sollten bei Herstellung von Zelllysaten ca. zu 75% bewachsen sein. Das Nährmedium wurde verworfen und die Zellen mit 10 ml PBS/EDTA-Lösung gewaschen. Daraufhin wurde 600 µl Lysepuffer hinzugegeben und die Zellen vorsichtig mit einem Zellschaber vom Boden der Petrischale gelöst. Die Suspension wurde in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und durch mehrmaliges auf- und abpipettieren lysiert. Die Zellen wurden bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C zwischengelagert.

3.2 Gewebe

3.2.1 Peripher venöses Blut

3.2.1.1 Material, Reagenzien und Laborgeräte für die Isolierung von PBMCs

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, Volumen 0.0025 mm ²	Superior Marienfeld
Deckgläser	

Reagenzien

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

Laborgeräte

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

3.2.1.2 Ablauf der Isolation der PBMCs

Zur Effizienzbestimmung der verschiedenen Marker in der qRT-PCR wurden cDNA-Verdünnungsreihen von LnCAP-Zellen in peripheren mononuklearen Zellen (PBMC) vorgenommen. Die PBMCs wurden hierfür aus Vollblut von gesunden Spendern mittels Dichtezentrifugation über einen kolloidalen Gradienten isoliert. Da der Ficoll-Dichtegradient temperaturabhängig ist erfolgte die Lagerung aller Proben bei Raumtemperatur.

Vollblut von gesunden Spendern wurde mittels PBS-Puffer im Verhältnis von 1:1,5 auf ein Volumen von 25 ml ergänzt und anschließend mit 20 ml Ficoll-Lösung überschichtet. Nach 20 min Zentrifugation bei 25°C mit 800g zeigte der Inhalt des Röhrchens eine

Dreischichtung: eine untere Schicht aus Ficoll-Lösung und Erythrozyten, eine mittlere trübe Schicht bestehend aus PBMCs und eine klare obere Plasmaschicht. Die PBMC-enthaltende Interphase wurde in 45 ml PBS-Puffer überführt und bei 500g für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde anschließend mit 1 ml PBS in einem sterilen 1,5 ml Cup resuspendiert.

Anschließend erfolgte eine Auszählung der Zellen in einer Neubauer Zählkammer. Auf die Zählkammer wurde ein Gemisch aus 10 µl des PBMC-PBS-Gemisches und 90 µl Türksche Lösung, welche eventuell verbliebene Erythrozyten lysiert, aufgetragen und bei 100fachen Vergrößerung unter dem Mikroskop betrachtet.

Über den Verdünnungsfaktor sowie den Mittelwert der peripher mononukleären Zellen in den vier Quadranten der Zählkammer konnte dann die Zellzahl im PBMC-PBS-Gemisch errechnet werden.

Die gewünschte Zellzahl war 10^6 Zellen in einer PBS-Zellsuspension. Das entsprechende Volumen wurde bei 500g und 4°C für 10 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 600 µl Lysepuffer lysiert.

Zur Erstellung einer Zellverdünnungsreihe wurden die aus 10^6 PBMCs hergestellten Lysate mit 1000, 100, 10, 1 und 0 Zellen LnCAP versetzt. Diese Ansätze wurden bei -20°C zwischengelagert und dienten der Sensitivitätstestung.

3.2.2 Lymphknotengewinnung

3.2.2.1 Verbrauchsmaterialien

Pathologieröhrchen

Formalin

Handschuhe SensoSkin

Medika Meizintechnik GmbH

Einwegskalpell Nr. 21

Feather®

Einmal Pinzetten – steril

servoprax® GmbH

Klebetuch Raucodrape® 75cmx75cm

Lohmann & Rauscher GmbH und Co. KG

Farben:

rot, gelb, blau, grün

Fixierlösung

Sterilisierte Aluminiumfolie

Patientenetiketten

Mullfix

Flüssigstickstoff

Hausinterne Apotheke

Stickstoffbehälter

Styroporbox mit Eis

3.2.2.2 Patienten

Als Gewebeproben dienten Lymphknoten von 84 Prostatatumorpatienten der urologischen Klinik des Universitätsklinikums Rechts der Isar, die sich zwischen Februar 2010 und Dezember 2011 einer radikalen Prostatektomie unterzogen. Die Aufklärung der Patienten erfolgte gemäß den Richtlinien der Ethikkommission und alle Patienten gaben die Einwilligung zur Entnahme und Untersuchung der Gewebeproben. Eingeschlossen wurden Prostatakarzinom-Patienten ohne neoadjuvante Behandlung mit mittlerem Risiko (Gleason-Score 7 oder PSA 10 – 20 ng/ml oder ein klinische T-Stadium \geq cT2b – c) oder hohem Risiko (Gleason-Score 8 – 10 oder PSA \geq 20 ng/ml oder klinisches T-Stadium \geq cT3a).

Die Operation wurde von vier erfahrenen Urologen durchgeführt. Als Operationsmethode wurde eine offene radikale Prostatektomie in Verbindung mit einer standardisierten ausgedehnten Lymphadenektomie durchgeführt. Die ausgedehnte Lymphadenektomie umfasste die Fossa obturatoria sowie Lymphknoten entlang der Arteria iliaca communis, der Arteria iliaca interna sowie der Arteria iliaca externa beidseits, wodurch sich acht Regionen ergaben. Das Feld erstreckte sich vom Canalis femoralis bis zur Bifurcatio aortae (Abb. 1). Jede Region wurde bei der chirurgischen Präparation einzeln entnommen, so dass am Ende ein Lymphknoten genau einer Region zugewiesen werden konnte.

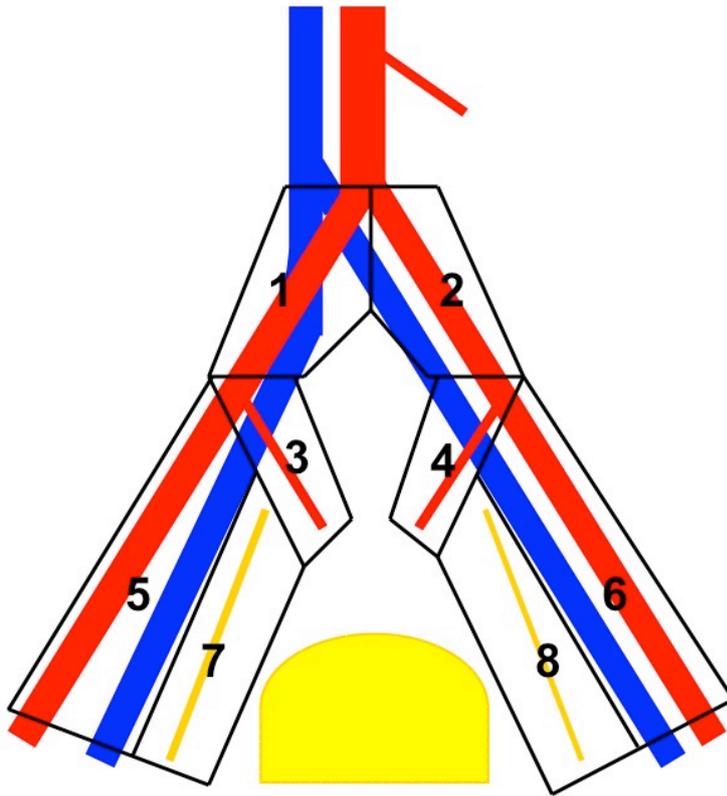


Abb. 1: Feld der ausgedehnten pelvinen Lymphadenektomie; jeweils bilaterale Entnahme der Lymphknoten: 1+2= rechte und linke A. iliaca communis; 3+4= rechte und linke A. iliaca interna; 5+6= rechte und linke A. iliaca externa; 7+8= rechte und linke Fossa obturatoria. 5-8 sind die Regionen der Standard Lymphadenektomie

3.2.2.3 Lymphknotenisolierung

Das während der Operation entnommene Gewebe wurde innerhalb von 20 min verarbeitet. Hierfür wurde es auf Eis zwischengelagert und die darin enthaltenen Lymphknoten vom umliegenden Fett und Gefäßen getrennt. Lymphknoten ≥ 3 mm wurden zur histopathologischen und molekularbiologischen Untersuchungen in zwei Hälften geteilt (Abb. 2). Die eine Hälfte und der laterale Rand der zweiten Hälfte wurden eingefärbt, in Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet und mittels Hämatoxyllin & Eosin-Färbung (H&E) gefärbt und histopathologisch auf Metastasen untersucht (pN0 oder pN1). Die zweite Lymphknotenhälfte wurde in sterilisierter Aluminiumfolie verpackt und in Flüssigstickstoff schockgefroren. Die Zwischenlagerung der Lymphknoten erfolgte bei -80°C bis zur späteren Aufarbeitung für die molekularbiologische Untersuchung.

Lymphknoten > 2 cm wurden geteilt, die Ergebnisse aber wie die eines einzelnen Lymphknoten sowohl histopathologisch als auch molekular beurteilt. Lymphknoten < 3 mm wurden nur histopathologisch untersucht. Als TNM Klassifikation diente die Klassifikation der „Union international contre le cancer“ (UICC) Version 2010.

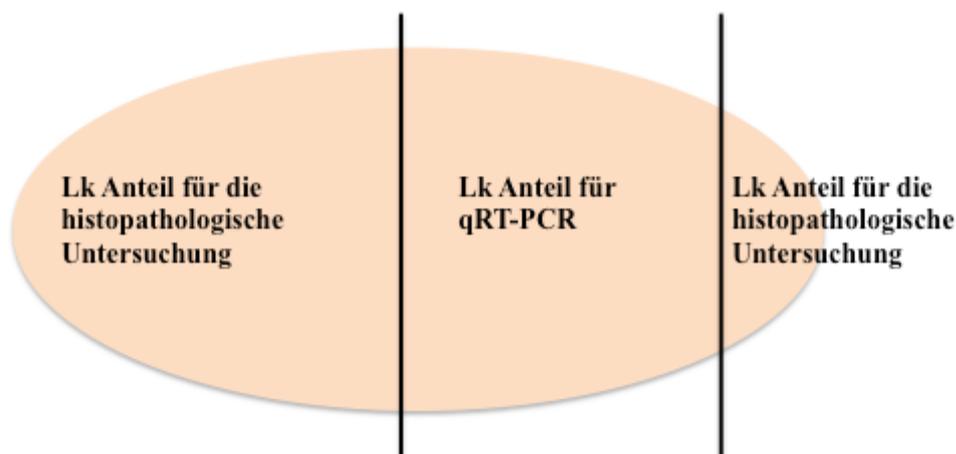


Abb. 2: Veranschaulichung der Halbierung des Lymphknotens. Der Lymphknoten wurde geteilt, eine Hälfte und das laterale Gegenstück wurde histopathologisch untersucht, die andere Hälfte wurde schockgefroren und mittels qRT-PCR untersucht.

3.3 Herstellung des Lymphknotenlysats

3.3.1 Material für die Herstellung des Lysats

3.3.1.1 Verbrauchsmaterialien

Mundschutz Sentinex® Lite EL	Lohmann & Rauscher International GmbH & Co. KG
OP Haube Sentinex® Trend	Lohmann & Rauscher International GmbH & Co. KG
Einwegskalpell Nr. 21	Feather®
Einmal Pinzetten	servoprax® GmbH
„Überführungsstäbchen“	
Handschuhe SensoSkin	Medika Medizintechnik GmbH
0,5 ml Reaktionsgefäße	VWR
1,5 ml Eppendorf nucleasefreie Reaktionsgefäße	SLG® Süd Laborbedarf GmbH
5 ml und 10 ml Röhrchen RNase frei	
1250 µl Pipettenspitzen	Biozym®
5 ml Pipettenspitzen	Ritter GmbH
2 ml Fast-Prep® Reaktionsgefäße	MP Biomedicals
2 ml Fast-Prep® Deckel	MP Biomedicals
Kugeln Ceramic Shpere 1/4“	MP Biomedicals

Garnet Matrix A Bulk (Sand)	MP Biomedicals
Rotilabo®-Wägeschälchen hexagonal 20 ml	Carl Roth GmbH + Co. KG
1250µl Pipettenspitzen	Biozym

3.3.1.2 Reagenzien

Trockeneis	Hausinterne Apotheke
Flüssigstickstoff	Hausinterne Apotheke
RNA-Later	Ambion®
mirVana™ miRNA isolation kit,	Ambion®
Lysepuffer	

3.3.1.3 Geräte

FastPrep®-24 Instrument	MP Biomedicals Eschwege, Hessen
24x2 ml CoolPrep™ Sample Holder	MP Biomedicals Eschwege, Hessen
Derwargefäß für Flüssigstickstoff	
Zentrifuge 5415R	Eppendorf
Pipettierhilfe	Eppendorf
Waage AT250	Mettler
Lange Metallpinzette	
1000 µl Pipette	Eppendorf

3.3.2 Ablauf des Lysiervorgangs

Um ein Auftauen der Proben zu jeder Zeit zu verhindern, wurden die in Aluminiumfolie verpackten Lymphknoten sofort nach Entnahme aus dem -80°C Kühlschrank in einen mit Flüssigstickstoff gefüllten Derwarbehälter zwischengelagert. Pro Lymphknoten wurde ein 1,5 ml Eppendorfröhrchen mit je 500 µl RNAlater vorbereitet und beschriftet. Für größere Lymphknoten standen 5 ml Röhrchen mit je 1000 µl RNAlater bereit. Der RNAlater stabilisiert die RNA in den Lymphknoten, indem er alle Enzyme, wie zum Beispiel RNasen im Gewebe inaktiviert. Ein Arbeiten auf Eis war nicht mehr notwendig, sobald die Lymphknoten in RNAlater überführt waren. Von Bedeutung ist dabei, dass der Lymphknoten in mindestens dem fünffachen Volumen des Probengewichts schwimmt und die Flüssigkeit schnell in alle Zellen des Gewebes diffundiert, weshalb die maximale

Dicke der Probe 5 cm nicht überschreiten sollte. Um eine ausreichende Diffusion zu gewährleisten, sollten sich die Proben auch mindestens 10 min in RNAlater befinden.

Zum Überführen der Gewebeproben in den RNAlater wurde steril und auf Trockeneis gearbeitet. Zudem wurden eine OP-Haube, Mundschutz und Handschuhe getragen. Pro Lymphknoten wurde eine sterile Einmalpinzette verwendet. Nachdem alle Lymphknoten in RNAlater waren, wurden die Proben gewogen und das Gewicht notiert. Überschritt das Gewicht 120 mg, wurde dieser Lymphknoten mit einem sterilen Skalpell geteilt und auf zwei FastPrep-Röhrchen verteilt, welche mit je einer CeramicSphere Kugel und 1000 µl Lysepuffer zuvor befüllt und beschriftet worden waren. Auch alle anderen Proben wurden mit je einem sterilen Spatel in das FastPrep-Röhrchen überführt. Der Lysepuffer stabilisiert zum einen die RNA und inaktiviert RNAsen, zum anderen hat er die Aufgabe, die Zellen aufzuspalten und die im Zellkern befindlichen Proteine, DNA, RNA, etc. freizusetzen. Als nächstes wurde der CoolPrep™ Sample Holder mit den Röhrchen bestückt, in den unteren Hohlraum wurden circa vier Sticks Trockeneis gelegt, das Ganze wurde in den FastPrep®-24 gesetzt und Programm 1 gestartet, welches folgendermaßen programmiert war:

Δ ▼ S (Geschwindigkeit)	(4,5-)6,5
Δ ▼ TH (Aufsatz)	CY
Δ ▼ T (Zeit)	40 sec

Der Vorgang wurde dreimal wiederholt, dann wurde ca. 200 mg Sand hinzugegeben und der Vorgang erneut dreimal durchgeführt, bzw. so lange wiederholt, bis die Flüssigkeit homogen erschien. Durch die vertikal abgewinkelten Bewegungen treffen beim FastPrep® sämtliche Partikel des Lysepuffer gleichzeitig und von allen Richtungen auf die aufzulösenden Nukleinsäuren und Proteine, wodurch ein schnelleres und gleichmäßigeres Lysieren ermöglicht wird. Als nächstes wurden die Lysate bei 1000g für 30-60sec zentrifugiert, so dass ein Überstand klar zu erkennen war.

Pro Lymphknotenprobe wurden je zwei 1,5 ml Eppendorfröhrchen beschriftet (jeweils mit Patientenummer, Lymphknotennummer, Datum, I bzw. II und einem „L“ für Lysat). Für jeden geteilten Lymphknoten wurde zusätzlich ein 10 ml Röhrchen bereitgestellt. Der Überstand wurde auf die vorbereiteten Röhrchen verteilt, in das erste je 500 µl, in das zweite der restliche Überstand. War der Lymphknoten vorher geteilt worden, wurden die

Lysate eines Lymphknotens vor dem Befüllen der Röhren in einem 10 ml Röhren gemischt und dann verteilt. Die Lysate wurden bei -80°C tiefgefroren.

3.4 RNA Extraktion und photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration

3.4.1 Material für die RNA Extraktion

3.4.1.1 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 Meizintechnik GmbH

3.4.1.2 Reagenzien

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

3.4.1.3 Laborgeräte

Zentrifuge 5415R Eppendorf	Eppendorf, Germany, Hamburg
NanoDrop 2000c Spectrophometer	+ Peqlab, Erlangen
Software	
Pipetten 1000 µl, 200 µl, 10µl peqpette	Peqlab
Blockthermostat BT100	Kleinfeld
Tischzentrifuge Qik Spin	Süd-Laborbedarf GmbH
Vortex MS1 Minishaker	IKA®

3.4.2 Ablauf der RNA Extraktion

Weiterverarbeitet wurden die Lymphknotenlysate und die Lysate der LnCAP-Zellen. Das Ausgangsvolumen der Lymphknotenlysate war je 500 µl. Die Proben wurden auf Eis aufgetaut. Nach dem Auftauen wurde zu jedem Lysat 1/10 des Ausgangsvolumens, sprich 50 µl Homogenate Additive aus dem mirVana™ kit hinzugefügt, gut durchmischt und für 10 min auf Eis stehengelassen.

In dieser Zeit wurde pro Probe Folgendes vorbereitet: zwei 1,5 ml Eppendorfröhrchen (erstes nur mit Lymphknotennummer, zweites mit Patientennummer, Lymphknotennummer, Datum und „E“ für Eluat beschriftet), je ein Röhrchen inklusive Filter aus dem mirVana® kit (mit Lymphknotennummer beschriftet) und ein zusätzliches Tube aus dem mirVana™ kit, in welches letztendlich die largeRNA am Schluss gefüllt wird, beschriftet mit Patientennummer, Lymphknotennummer, Datum und „RNA“ (sobald die RNA Konzentration gemessen wurde, wurde diese zusätzlich auf dem Tube vermerkt).

Als nächstes wurde zu den Lysaten Acid-Phenol-Chloroform hinzu pipettiert. Das zugegebene Volumen soll dabei dem Ausgangsvolumen entsprechen, sprich 500 µl. Dabei ist darauf zu achten, dass das Acid-Phenol-Chloroform unbedingt aus der unteren Schicht zu entnehmen ist, da die obere Schicht nur aus wässriger Pufferlösung besteht. Die Röhrchen wurden nun für mindestens 30 Sekunden kräftig geschüttelt um eine gute Durchmischung zu gewährleisten.

Zu diesem Zeitpunkt befanden sich im Lysat RNA, DNA und Proteine. Anschließend wurde das Ganze bei Raumtemperatur, wie auch bei allen folgenden Zentrifugationen, bei 12000g mindestens 5 min zentrifugiert, so dass sich eine klare Dreischichtung finden konnte. War dies nicht der Fall wurde weitere 5 min bei 12000g zentrifugiert.

Bei der Phenol-Chloroform Extraktion handelt es sich um eine flüssig-flüssig Extraktion. Man macht sich die Tatsache zu nutze, dass RNA, DNA und Proteine ein unterschiedliches Lösungsverhalten zeigen in einer zweiphasigen Emulsion. Die Säure ist notwendig, damit der pH-Wert der Lösung zwischen 4 und 6 liegt. So wird gewährleistet, dass nach dem Zentrifugieren sich nur die polare RNA in der obigen wässrigen Phase befindet. DNA ist grundsätzlich durch die Phosphatgruppe auch negativ geladen, damit polar und würde sich ebenfalls in der wässrigen Phase befinden. Durch den niedrigen pH-Wert erhält sie aber ein Proton, wird neutralisiert und lagert sich dadurch in der organischen Phase ab. RNA hingegen wird in Säure nicht neutralisiert, sie enthält eine stickstoffhaltige Base und kann so mit Wasser Wasserstoffbrückenbindungen aufbauen

und bleibt dadurch in der wässrigen Phase. Würde also der pH-Wert höher liegen, etwa zwischen 7,5 und 8, würde sich auch DNA, die dann nicht neutralisiert werden würde, in der obigen Phase befinden. Durch den niedrigen pH wird also ein Fehlen von DNA in der obigen Phase gewährleistet. Chloroform ist ein hydrophobes Agens, das zugleich dichter als Wasser ist, wodurch es nach dem Zentrifugieren die untere Phase bildet. Es ruft eine schärfere Trennung der organischen von der wässrigen Lösung hervor als Phenol. Werden Chloroform und Phenol zusammen verwendet, ist die Wirkung bezogen auf die Denaturierung von Proteinen höher. Außerdem wird durch die Kombination der Anteil an RNA in der organischen Phase nochmals reduziert, genauso wie die Bildung von unlöslichen RNA-Protein-Komplexen in der Interphase. Die hydrophoben Enden der Proteine interagieren mit Phenol, wodurch sie ausfallen und in der organischen Phase bleiben. Guanidiniumsalze, die sich ebenfalls in der Lösung befinden, wurden hinzugefügt, um die Wirkung der Nucleasen zu verringern (Zumbo, 2012).

Nach dem Zentrifugieren entstand also eine Dreischichtung: oben befand sich die wässrige Phase mit der wasserlöslichen RNA, dazwischen die Interphase mit der weniger wasserlöslichen DNA und in der unteren Chloroformphase befanden sich die Proteine (Abb. 3). Als nächstes wurde vorsichtig die obere wässrige Phase in ein vorher beschriftetes 1,5 ml Eppendorfröhrchen abpipetiert, wobei darauf geachtet wurde, die Interphase nicht zu zerstören. Das Volumen wurde abgelesen.

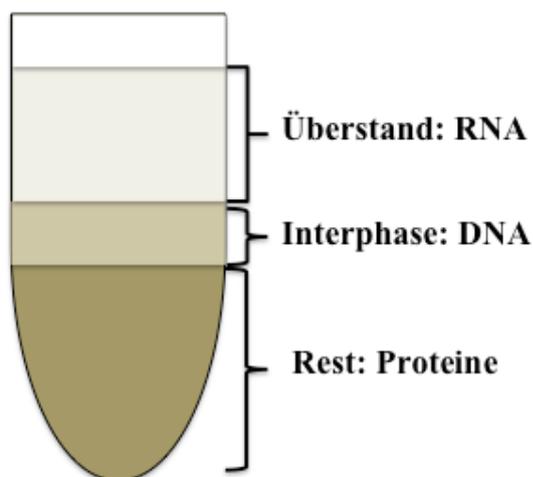


Abb. 3: Dreischichtung der Acid-Chloroform-Extraktion. Im wässrigen Überstand befindet sich die RNA, in der Interphase die DNA und in der untern unpolaren Chloroformschicht die Proteine.

Zu jeder Probe wurde 1/3 des Volumens der wässrigen Phase an Ethanol absolut zugegeben (Bsp.: 450 µl wässrige Lösung → 150 µl Ethanol absolut) und das Röhrchen mehrmals gekippt. Hierdurch wurde eine Teilpräzipitation der RNA vorgenommen.

Dieses Gemisch wurde auf die Tubes mit den Glasfaserfiltern des mirVana™ gegeben. Dabei ist darauf zu achten, dass nicht mehr als 700 µl auf ein Säulchen pipettiert werden dürfen. Falls dieses Volumen überschritten wird, muss es schrittweise auf das Säulchen pipettiert werden. Wurde dieses Volumen überschritten, waren mehrere Wiederholungen nötig. Die Röhrchen wurden anschließend bei 1000g für 15 Sekunden abzentrifugiert. Die largeRNA gelangte so auf den Filter und in den Röhrchen befand sich das Eluat mit der smallRNA. Dieses wurde in die dafür vorgesehenen Röhrchen pipettiert, das Volumen abgelesen und 2/3 des Volumens des Eluats an Alkohol zugegeben (Bsp.: 600 µl Eluat → 400 µl Ethanol absolut), die Proben mehrmals gekippt, auf Eis gestellt und am Ende zusammen mit der isolierten RNA bei -80°C tiefgefroren.

Als nächstes wurden 700 µl der Waschlösung 1 des mirVana™ kit auf das Säulchen pipettiert und bei 10000g für 15 Sekunden zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen. Daraufhin wurde 500 µl Waschlösung 2/3 des mirVana™ kits auf das Säulchen pipettiert und wiederum bei 10000g für 15 Sekunden zentrifugiert, das Filtrat verworfen und der Schritt wiederholt. Dabei soll durch die Waschschritte die RNA so rein wie möglich auf dem Filter bleiben und der Rest (z.B. Proteine) gelangt ins Filtrat.

Nach dreimaligem Waschen wurde der Filter nun getrocknet und von Restrückständen gereinigt, indem er bei 12000g 1 min ohne jegliches Reagenz zentrifugiert wurde. Der Filter wurde als nächstes in ein Röhrchen des mirVana™ kits gesetzt. Sogleich wurde in die Mitte des Filters 100 µl 95°C heißes, nucleasefreies Wasser pipettiert und für 5 min inkubiert. Das Wasser soll noch vorhandene Sekundärstrukturen der RNA lösen, und die 95°C sorgen dafür, dass eventuell noch vorhandene Proteinstrukturen denaturiert werden. Daraufhin wurde bei 12000g für 30 Sekunden zentrifugiert und anschließend das Eluat mit der RNA reeluiert und nochmals bei 12000g für 30 Sekunden zentrifugiert. Der Filter wird anschließend verworfen. Die Konzentrationsmessung der RNA folgte direkt im Anschluss.

Analog erfolgte die RNA-Extraktion der LnCAP Lysate.

3.4.3 Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte mittels Nanodrop 2000c Spectrophometer. Auf diese Weise kann neben der Konzentration auch die Qualität der RNA gemessen werden. Dies erfolgt im ultravioletten Licht bei 260nm und 280nm. Die optische Dichte bei 260nm (OD_{260}) erlaubt Rückschlüsse bezüglich der Konzentration, während die optische Dichte bei 280nm (OD_{280}) ein Maß für die Verunreinigung der

Proben, z.B. mit Proteinen darstellt. Ausschlaggebend für den Reinheitsgrad ist vor allem der Quotient OD_{260}/OD_{280} . Lag die Reinheit unter 1,8 und/oder die Konzentration unter $0,037 \text{ ng}/\mu\text{l}$, so wurden diese Proben in den nächsten Schritten nicht weiterverarbeitet. Zur Messung wurde jeweils $1 \mu\text{l}$ der RNA auf den Sensor des Biophotometers gegeben. Die RNA wurde bis zur weiteren Verarbeitung wieder bei -80°C gelagert.

3.5 Quantitative reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)

3.5.1 Material für die reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)

3.5.1.1 Verbrauchsmaterialien

0,5 ml Softube	Biozym
1,5 ml Tube	SLG® Süd Laborbedarf GmbH
10 μl , 20 μl , 200 μl (lang + kurz), 1250 μl	Corning
Filter tips	
96-Well Hard-Shell®	BioRad
Microseals®“B“ Film	BioRad

3.5.1.2 Reagenzien

Aqua bidest.	GIBCO Invitrogen
High-Capacity cDNA reverse	Applied Biosystems
TaqMan® Gene expression master mix	Applied Biosystems
Marker/Referenzgene für die qRT-PCR	(s. Tab. 2)

Referenzgen	Bestellnummer Applied Biosystems™	Basenpaare Amplicon/Markierung
KLK3	Hs03063374_m1	64bp/FAM
KLK4	Hs00191772_m1	112bp/FAM
UBC	Hs00824723_m1	71bp/VIC
HPRT1	Hs01003267_m1	72bp/VIC

Tab. 2: Übersicht über die Marker und Referenzgene

3.5.1.3 Laborgeräte

Thermocycler MJ-Research PTC-200	Biorad
RealTime PCR Thermocycler CFX96 + Software	Biorad

Zentrifuge 5810 Eppendorf	Eppendorf
Pipetten 1000 µl, 200 µl, 10 µl peqette	Peqlab

3.5.2 Prinzip und Durchführung der Reverse Transkriptase Reaktion

Ribonukleinsäure (RNA) ist weniger stabil als Desoxyribonukleinsäure (DNA), was zum einen daran liegt, dass RNA einzelsträngig vorliegt und zum anderen wird durch die fehlende Hydroxygruppe an der 2'Position im Pentose Ring eine Hydrolyse durch Basen ermöglicht. Zudem ist das Enzym RNase ubiquitär vorhanden. Das Enzym Reverse Transkriptase (RT) ermöglicht die Transkription von RNA in doppelsträngige cDNA, welche wesentlich stabiler ist. Sie stellt zugleich das Ausgangsmaterial für die qRT-PCR dar (s.u.).

Bei diesem Schritt wurde permanent auf Eis gearbeitet, Enzyme wurden bei -20°C gelagert bzw. nur in einer Thermobox dem Gefrierschrank entnommen und alle Verbrauchsmaterialien waren RNase frei.

Um nun aus der gewonnenen RNA cDNA zu synthetisieren wurde das High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit verwendet. Das Kit besteht aus einem Puffer, einem Random Primer, einem dNTP Mix, einer Multiscribe Reverse Transkriptase und einem RNase Inhibitor. Der Random Primer besteht aus zufällig zusammengesetzten Nukleotiden und ermöglicht die Bindung der Reversen Transkriptase an die RNA. Diese katalysiert dann die Umschreibung eines RNA-Stranges zu einem komplementären cDNA-Strang, welcher mit der RNA hybridisiert ist. Der cDNA-Strang dient nach Abbau der RNA als Matrize für die DNA-abhängige DNA-Polymerase. So entsteht eine stabilere Kopie der RNA, mit welcher weitergearbeitet werden kann.

Im Einzelnen wurden 20 µl mit je 100 ng/µl cDNA hergestellt. Als erstes wurde der Mastermix wie folgt pipettiert:

10x RT Puffer	2 µl
25x dNTP Mix (100mM)	0,8 µl
10x RT Random Primer	2 µl
MultiScribe Reverse Transcriptase	1 µl
RNase Inhibitor	1 µl
Gesamtvolumen	6,8 µl

Diese 6,8 µl Mastermix wurden in ein 0,5 ml Softröhrchen vorgelegt. Hinzu kam ein Gemisch aus RNA und Aqua bidest von 13,2 µl, wobei 2 µg RNA eingesetzt wurde, so dass das gewünschte Volumen von 20 µl mit einer Konzentration von 100 ng/µl cDNA entstand. Nachdem alles gründlich gemischt und zentrifugiert war, wurden die Proben in den Thermocycler mit folgender Einstellung gesetzt:

	Temperatur °C	Dauer
Stufe 1	25	10 min
Stufe 2	37	120 min
Stufe 3	85	5 Sekunden
Stufe 4	4	∞

Die synthetisierte cDNA wurde bei -20°C zwischengelagert.

3.5.3 Realtime Polymerase Kettenreaktion

3.5.3.1 Prinzip der Polymerase Kettenreaktion

Bei der RT-PCR kann man prinzipiell zwischen der qualitativen RT-PCR und der quantitativen RT-PCR unterscheiden. Bei der qualitativen RT-PCR, auch Endpunkt-PCR, wird erst ganz am Ende aller Amplifikationsschritte das Vorhandensein einer spezifischen cDNA mittels Gelelektrophorese bestimmt. Bei der quantitativen RT-PCR findet hingegen nach jedem Amplifikations-Zyklus eine quantitative Messung der entstandenen Produkte statt. In dieser Arbeit wurde die quantitative Reverse-Transkriptase Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) verwendet. Mit ihrer Hilfe soll die Genexpression der einzelnen Marker nachgewiesen werden. Die Nukleotidsequenz der verwendeten Marker wurde dabei so gewählt, dass sie komplementär zu einer Gensequenz des zu untersuchenden Gens sind und so spezifisch binden. Die zuvor hergestellte cDNA wurde als Ausgangsmaterial verwendet. Wird das Markergen vom Lymphknoten exprimiert, so kann diese Gensequenz amplifiziert und nachgewiesen werden.

Bei der Polymerasekettenreaktion benötigt man neben der DNA-Matrize (=Template, mit der Zielsequenz) eine DNA-Polymerase. Diese soll möglichst hitzestabil sein, weshalb unter anderem Taq-Polymerasen, die aus dem Bakterium *Thermophilus aquaticus* isoliert wurde und sehr hohe Temperaturen toleriert bevor sie denaturiert, eingesetzt werden. Die DNA-Polymerase benötigt weiterhin zwei Primer, dNTPs

(=Desoxyribonukleosidtriphosphate), Puffer und $MgCl_2$, die eine geeignete Umgebung für die DNA-Polymerase gewährleisten. Ein Primer ist ein Oligonukleotid, der aus 18-30 Basen besteht und die zu amplifizierende Sequenz von beiden Seiten einschließt. Durch die mehrfache Wiederholung (zwischen 30 und 50 mal) folgender Schritte in einem Thermocycler wird schließlich die Amplifikation des Templates erreicht:

- Denaturierung: Die doppelsträngig vorhandene DNA wird auf ca. $95^{\circ}C$ erhitzt. Dadurch werden die Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb der DNA gelöst und die DNA denaturiert. Es liegen am Ende zwei Einzelstränge vor. In dieser Phase werden die Primer, die hybridisiert vorliegen können, ebenfalls denaturiert und so funktionsfähig gemacht.
- Annealing: Je nach verwendetem Primer wird für ca. 30 Sekunden eine gewisse Temperatur ($37 - 65^{\circ}C$) gehalten und so die Anlagerung der Primer an die DNA gewährleistet.
- Elongation: In diesem Schritt kommt die DNA-Polymerase zum Einsatz. Sie bindet am 3'-OH-Ende der Primer und komplementiert mit Hilfe der dNTPs die Matrize. Die Temperatur soll dabei im Optimum der verwendeten Polymerase liegen (oft ca. $72^{\circ}C$).

Somit ergibt sich ein exponentielles Wachstum des Amplikons (Abb. 4).

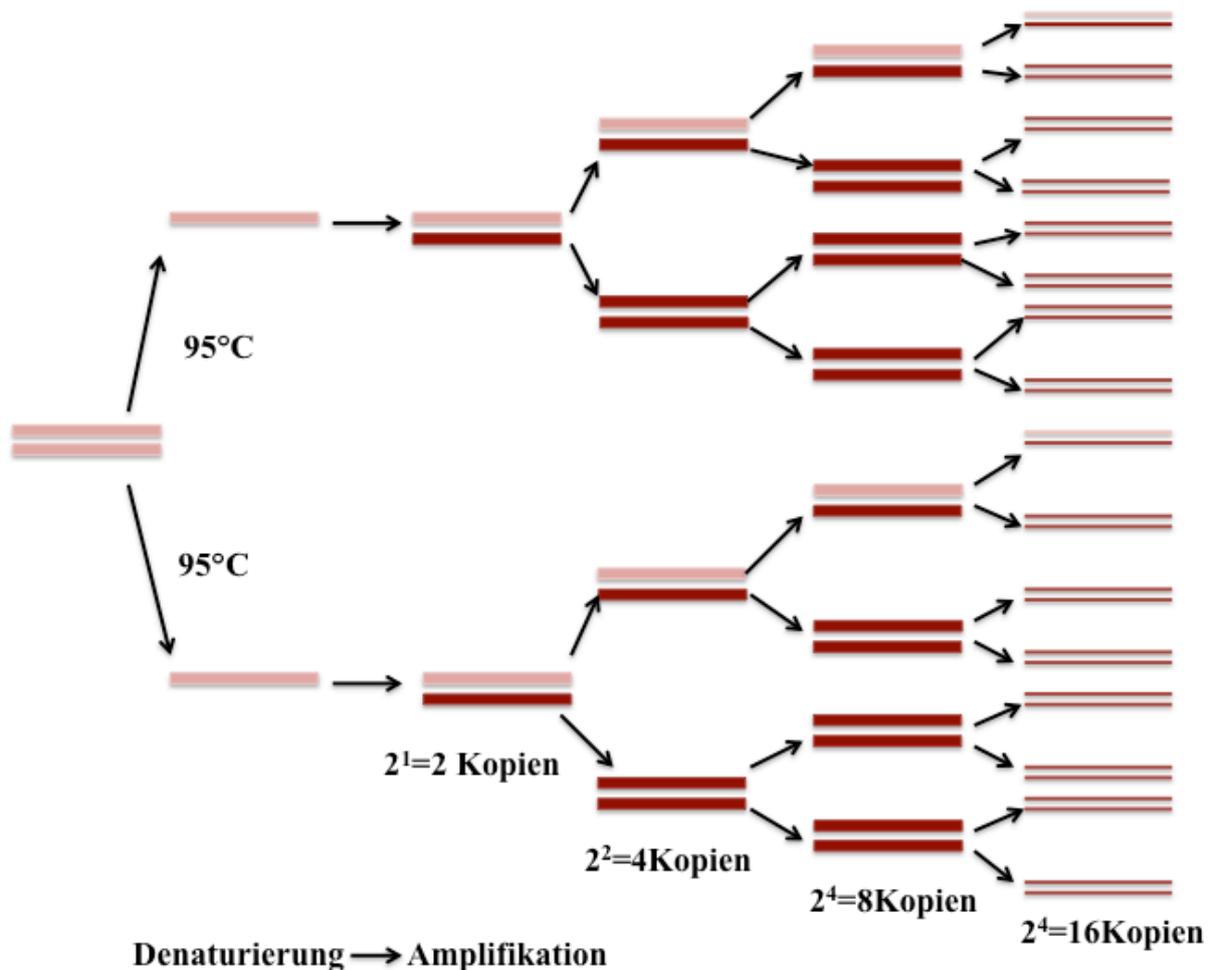


Abb. 4: Darstellung des exponentiellen Wachstums bei der Polymerasekettenreaktion.

Die Effizienz ist ein Beurteilungskriterium, mit dem geprüft werden kann, ob eine Maßnahme geeignet ist, ein vorgegebenes Ziel zu erreichen. In unserem Falle wäre eine 100%ige Effizienz eine Verdoppelung der Matrize bei jedem Amplifikationsschritt. In der Realität wird die Effizienz jedoch von verschiedensten Faktoren beeinflusst. So wirkt zu Beginn der Reaktion zum Beispiel die geringe Template Menge begrenzend weshalb keine 100%ige Effizienz erreicht werden kann.

Die Messung der entstandenen Produkte findet bei der qRT-PCR am Ende jedes Zyklus mit Hilfe fluoreszierender Farbstoffe statt. Der Anstieg des Fluoreszenzsignals bei Vorhandensein der Zielsequenz ist dabei direkt proportional zur neusynthetisierten DNA-Konzentration. Es werden hierzu vor allem zwei verschiedene Methoden verwendet.

Interkalierende Farbstoffe wie zum Beispiel SYBR Green binden an die neugebildete DNA und die Fluoreszenz steigt an wenn die Farbstoffe eingebaut sind. Es ist jedoch zu beachten, dass bei Verwendung interkalierender Farbstoffe und steigender Anzahl der Zyklen die Wahrscheinlichkeit von Primerdimerbildungen steigt und somit unspezifische

Produkte entstehen können, welche wiederum das Ergebnis verfälschen (Brownie et al., 1997).

Eine weitere Methode besteht in der Nutzung fluorophormarkierter Oligonukleotide, die spezifisch an die Zielsequenz binden. Diese Tatsache stellt einen Vorteil gegenüber der interkalierenden Farbstoffen dar, da falsch positive Ergebnisse durch Primerdimerbildung verhindert werden (Gordanpour, Nam, Sugar, Bacopulos, & Seth, 2012).

In dieser Arbeit wurde letztere Methode durch die Verwendung von TaqMan-Sonden genutzt. TaqMan-Sonden sind einzelsträngige 15-30 Basen lange DNA-Fragmente, an deren 3'-Ende ein sogenannter Quencher sitzt, der durch die räumliche Nähe das fluoreszenzmarkierte 5'-Ende (=Reporter) unterdrückt, wodurch zunächst kein Signal gemessen werden kann (Abb. 5). Die Sonde bindet in der Nähe des Primers an die Matrize. Die Taq-Polymerase besitzt neben der Polymerase noch eine 5'-3'-Exonucleaseaktivität mit welcher sie den Quencher vom Reporter trennt und die Sonde abbaut. Aufgrund der fehlenden Unterdrückung durch den Quencher kann nun der Reporter ein Fluoreszenzsignal emittieren, das gemessen werden kann (Abb. 6). Durch die Höhe des Signals kann auf die Menge der neugebildeten DNA geschlossen werden, da ein Signal nur dann entstehen kann, wenn die TaqMan-Sonde zuvor an eine Matrize gebunden hat.

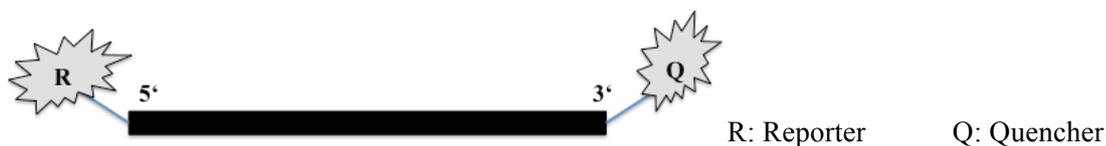


Abb. 5: Aufbau der TaqMan Sonde

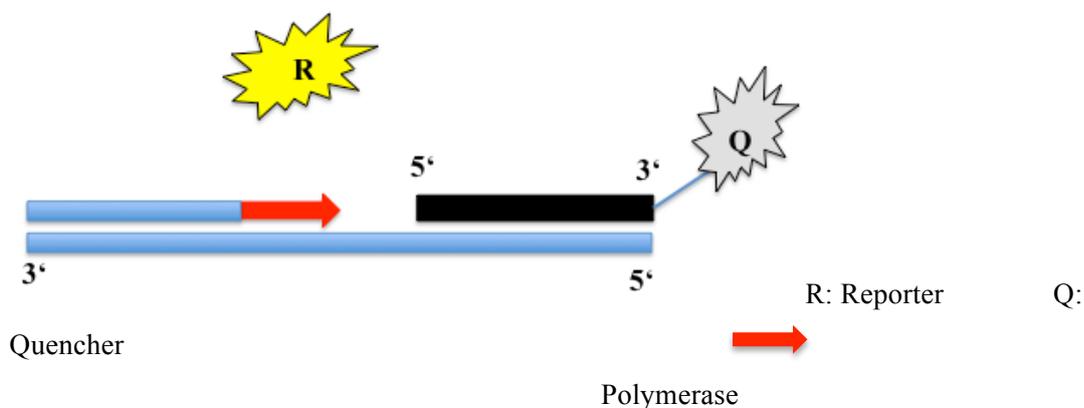


Abb. 6: Emittierung des Fluoreszenzsignals durch den Reporter durch die räumliche Trennung von Quencher und Reporter durch die Hydrolyse.

4. GOTO 2. → 3.: 44mal

Nach dem ersten Ablauf dieses Zyklus werden die Punkte 2./3. weitere 44mal wiederholt.

3.5.3.3 Auswertung der qRT-PCR

Die Auswertung erfolgte automatisiert über die Software des Biorad-Cyclers. Es wurde ein Graph erstellt, bei welchem auf der x-Achse die Anzahl der Amplifikations-Zyklen abgebildet wurde und auf der y-Achse die Intensität des Fluoreszenzsignals (Abb. 7). Zudem wird automatisiert ein Schwellenwert (threshold) für die Fluoreszenz der Proben ermittelt, welcher über dem Basalrauschen der Fluoreszenzmarker liegt. Den Punkt, an dem das Fluoreszenzsignal zum ersten Mal über dem Schwellenwert liegt, nennt man C(q)- (quantification cycle value) oder C(t)-Wert.

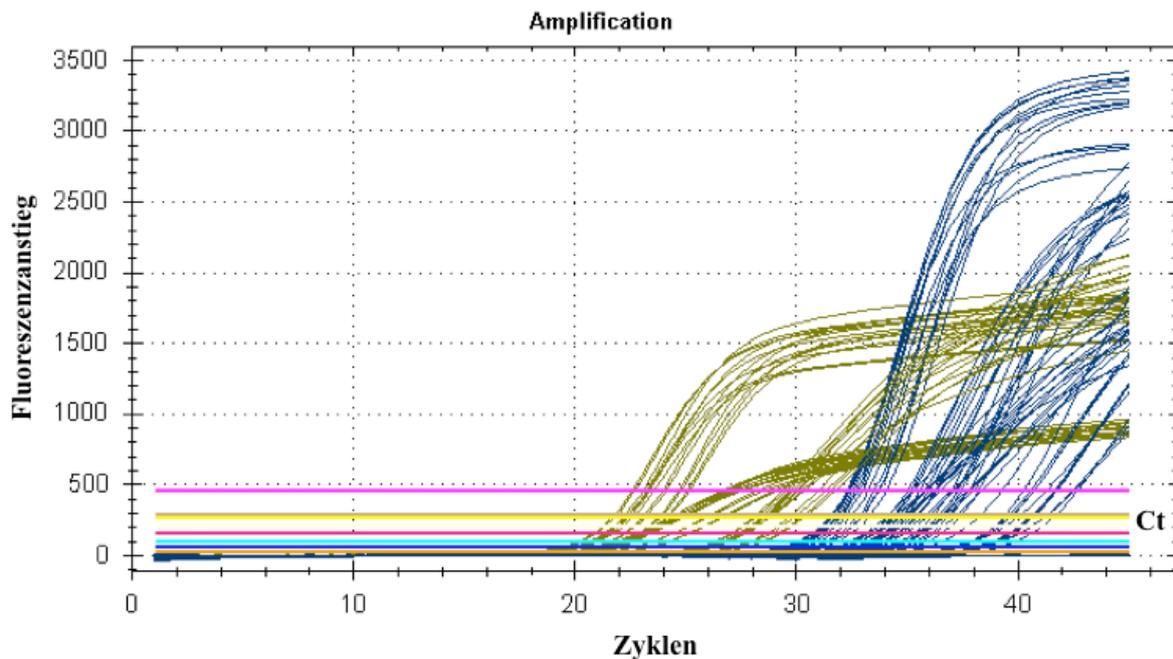


Abb. 7: Graph der zur Auswertung der qRT-PCR

Es gibt zwei Quantifizierungsstrategien um die Expressionslevel der einzelnen Marker zu bewerten: die absolute und die relative Quantifizierung.

Bei der absoluten Quantifizierung wird die Konzentration des Genfragments als absoluter Messwert als Kopienanzahl angegeben, die an einer externen Standardkurve bestehend aus definierten Mengen an Genkopien gemessen wird (Holzapfel & Wickert, 2007). Ein Vorteil dieser Methode ist, dass Kalibrierungskurven es ermöglichen hochspezifische, sensitive und reproduzierbare Daten zu erzeugen. Nachteilig ist, dass sie abhängig von

der Genauigkeit der Validierung des Standards ist. Dass die Standardkurve über eine lange Zeit stabil bleibt kann problematisch sein (Michael W. Pfaffl & Hageleit, 2000).

Im Unterschied dazu wird bei der relativen Quantifizierung die Genexpression des zu untersuchenden Zielgens auf ein oder mehrere Referenzgene bezogen (Normalisierung der Expressionsergebnisse, relative Genexpression) (M.W. Pfaffl, 2004). Fehlerquellen wie Gewebe- und Matrixeffekte betreffen sowohl das zu untersuchende Gewebe als auch Referenzgene gleichermaßen. Matrix-Effekte sind die Summe der Störeffekte aller Komponenten. Dadurch, dass also Störfaktoren gleichermaßen auf Probenmaterial und Referenzgene wirken, werden Messschwankungen zwischen den unterschiedlichen Messungen ausgeglichen und können vernachlässigt werden. Dies ist ein bedeutender Vorteil der relativen Quantifizierung gegenüber der absoluten Quantifizierung.

Bei Referenzgenen handelt es sich um Gene, deren Produkte für den Zellerhalt unabdingbar sind. Sie werden dadurch idealerweise weitgehend unabhängig von äußeren Einflüssen exprimiert und unterliegen keiner Regulation. Für die relative Quantifizierung ist eine Normalisierung der Genexpression gegenüber den Referenzgenen wichtig. Daher sollte ein ideales Referenzgen unter experimentellen Bedingungen stabil exprimiert werden (Wang et al., 2012). Es wurden sechs Referenzgene getestet. Diese wurden dem Vandesompele Paper „Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes 2002“ entnommen. Diese sechs Gene waren für Leukozyten und Knochenmark getestet worden. Wir haben die Referenzgene für Lymphknoten getestet in der Vorstellung, dass sie dem Knochenmark und den Leukozyten ähnlich sind. Das Verfahren zur Auswahl des optimalen Referenzgens ist in diesem Paper beschrieben (Vandesompele et al., 2002). Im Rahmen dieser Arbeit haben wir das GeNorm Programm zur Ermittlung der optimalen Referenzgene verwendet. Das beste Ergebnis zeigte sich für Hypoxanthine phosphoryltransferase 1 (HPRT1) und Ubiquitin C (UBC), welche schließlich als Referenzgene verwendet wurden.

Als Maß für die Quantifizierung der Startmenge wird der sogenannte Ct (= Cycle Threshold) anstatt der DNA-Produktmenge bzw. -Konzentration verwendet. Dieser entspricht der Anzahl der Zyklen bis ein konstant definiertes Fluoreszenzniveau erreicht ist. In der Regel ist die Menge neusynthetisierter DNA am C(t) in allen Gefäßen gleich. Der Ct spielt eine große Rolle bei der Berechnung des Expressionsunterschiedes (Ratio) zwischen dem Zielgen und dem Referenzgen (M.W. Pfaffl, 2004).

Die Berechnung des Expressionsunterschiedes kann dann über die sogenannte $\Delta\Delta C(t)$ Methode erfolgen:

Zunächst wird eine Normierung vorgenommen, bei welcher der $C(t)$ -Wert des Referenzgens vom $C(t)$ -Wert des zu untersuchenden Gens abgezogen wird ($\Delta C(t) = C(t)\text{-Zielgen} - C(t)\text{-Referenzgen}$). Daraufhin wird diese relative Genexpression auf ein Kontrollprobenmaterial (sog. Kalibrator) bezogen, indem man vom Ergebnis den $\Delta C(t)$ -Wert der Kontrolle subtrahiert. So gelangt man zum $\Delta\Delta C(t)$ Berechnungsmodell. (M.W. Pfaffl, 2004) In dieser Arbeit diente als Kalibrator eine Verdünnung von 10 LNCaP Zellen bezogen auf 1 Mio. PBMCs. Der Expressionswert daraus wird gleich 1 gesetzt und die Ergebnisse der Zielgenexpression der Lymphknotenproben relativ zu 1 angegeben.

Aus der arithmetischen Formel $2^{-\Delta\Delta C(t)}$ erhält man schließlich den relativen Expressionswert eines Zielgens normalisiert zum Referenzgen und bezogen auf eine Standardprobe (Livak & Schmittgen, 2001).

Bei dieser Berechnungsmethode geht man von einer Effizienz von 100% in allen Proben aus, bei welcher sich bei jedem Zyklus die Menge der DNA verdoppeln würde.

3.5.4 Überprüfung der Sensitivität

Zur Überprüfung der Sensitivität für PSA und KLK4 wurden Verdünnungsreihen mit LNCaP- Zellen durchgeführt. Es wurden Verdünnungsreihen von 1000 bis 0 LNCaP-Zellen in 10^6 PBMCs verdünnt und mittels qRT-PCR die Expression der Zielgene für die einzelnen Verdünnungsreihen bestimmt. Jede Zell-Verdünnung wurde dabei dreifach pipettiert.

3.5.5 Überprüfung der Spezifität

Zur Überprüfung der Spezifität wurden 144 Lymphknoten von 25 männlichen Blasen-Tumor-Patienten verwendet, welche mittels Zystoprostatektomie behandelt wurden und bei welchen histopathologisch ein Prostatakarzinom ausgeschlossen wurde. Mit deren Hilfe wurde für die Marker PSA und KLK4 der maximale Expressionswert in gesunden Lymphknoten ermittelt, welcher als Grenzwert zur Unterscheidung zwischen molekular positiven (molN1) und molekular negativen Lymphknoten (molN0) verwendet wurde.

4 Ergebnisse

4.1 Analytische Bewertung der qRT-PCR bezogen auf PSA und KLK4

4.1.1 Referenzgenauswahl

Zur Auswahl der richtigen Referenzgene wurde die Bioinformatik geNorm Analysis Software verwendet. Mit ihrer Hilfe wurden insgesamt sechs verschiedene Referenzgene (GAPDH= Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase, RPL 13A = Ribosomal Protein L13, YWHAZ = 14-3-3 Protein zeta/delta, Actin, HPRT1 und UBC) auf ihre Stabilität in 14 Lymphknotenproben getestet. Das Resultat ist in Abbildung 8 zu sehen.

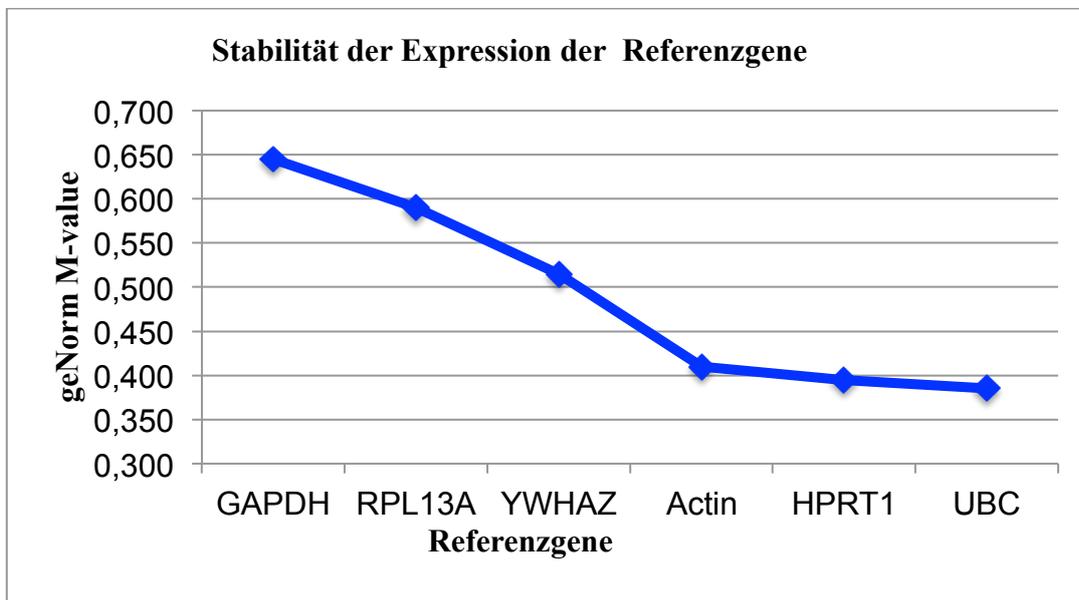


Abb. 8: Analyse der Stabilität der Referenzgene mittels Bioinformatik geNorm Analysis Software bei 14 Lymphknotenproben. HPRT1 und UBC zeigen die höchste Stabilität mit einer geNorm V Größe $< 0,15$ und einem geNorm Mittelwert M von $\leq 0,5$.

Die Kombination aus HPRT1 und UBC zeigte die geringste Schwankungsbreite zwischen den unterschiedlichen Lymphknotenproben. Aufgrund dieser Eigenschaften wurden HPRT1 und UBC als Referenzgene ausgewählt.

4.1.2 Charakterisierung der angewandten qRT-PCR-Methode

Jede einzelne Lymphknotenprobe wurde bei der qRT-PCR als Duplikat pipettiert. Zur Ergebnisermittlung wurde der Mittelwert verwendet.

In einer LnCAP Verdünnungsreihe wurde die Dynamik der zu untersuchenden Markergene und Referenzgene getestet. Über die gesamte Verdünnungsreihe mit

Konzentrationen von 10pg bis 100ng zeigten die Zielgene und die Referenzgene eine stabile Expression mit einem linearen Korrelationskoeffizienten von $r^2 = 0,997$ für PSA, $r^2 = 0,994$ für KLK 4, $r^2 = 0,991$ für HPRT1 und $r^2 = 0,993$ für UBC. Die Effizienz von PSA und KLK4 sowie den Referenzgenen wurde als gleichwertig betrachtet, da die Differenz der Steigung der Kurven $< 0,06$ war. Die Dynamik der Marker und der Referenzgene ist in Abbildung 9 dargestellt.

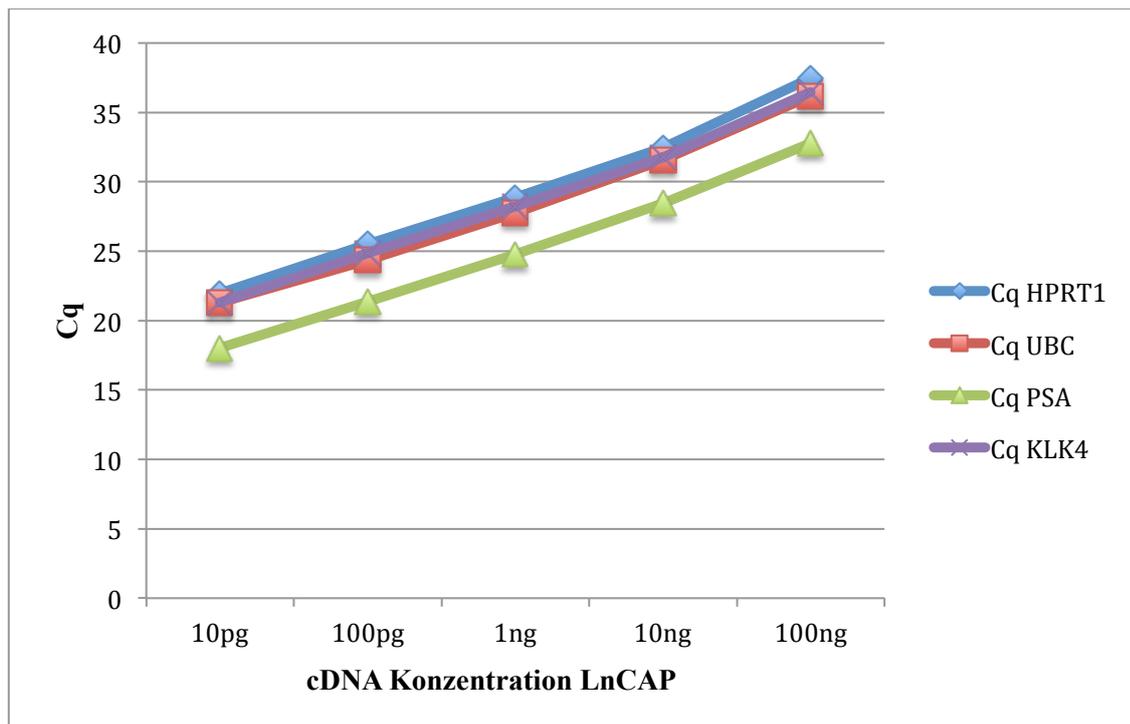


Abb. 9: Verdünnungsreihe einer cDNA von LnCAP- Zellen in 10^6 PBMCs von 100ng bis 10pg. Cq-Werte für die Markergene PSA, KLK4 und die endogenen Referenzgene HPRT1, UBC. Das Untersuchungsmaterial weist eine lineare Korrelation von $r^2 = 0,997$ für PSA, $r^2 = 0,994$ für KLK4, $r^2 = 0,991$ für HPRT1 und $r^2 = 0,993$ für UBC auf.

4.1.3 Sensitivität und Spezifität der qRT-PCR

Um eine reproduzierbare Sensitivität festlegen zu können, wurde eine Verdünnungsreihe von 0, 1, 10, 100 und 1000 LnCAP-Zellen in 10^7 PBMCs durchgeführt. PBMCs wurden als Modell für eine Markerexpression in Lymphknoten verwendet.

Der Marker PSA ließ sich frühestens bei der Verdünnungsstufe 10 Zellen LnCAP in 10^7 PBMCs nachweisen. Der Marker KLK4 wurde auch in Abwesenheit von LnCAP-Zellen in PBMCs exprimiert. Ab einer Konzentration von 100 Zellen LnCAP in 10^7 PBMCs ließ sich jedoch ein Anstieg der KLK4-Expression nachweisen (s. Abb. 10). Somit beträgt die

Sensitivität für den Marker PSA 10 Zellen LnCAP und für den Marker KLK4 100 Zellen LnCAP in 10^7 PBMCs.

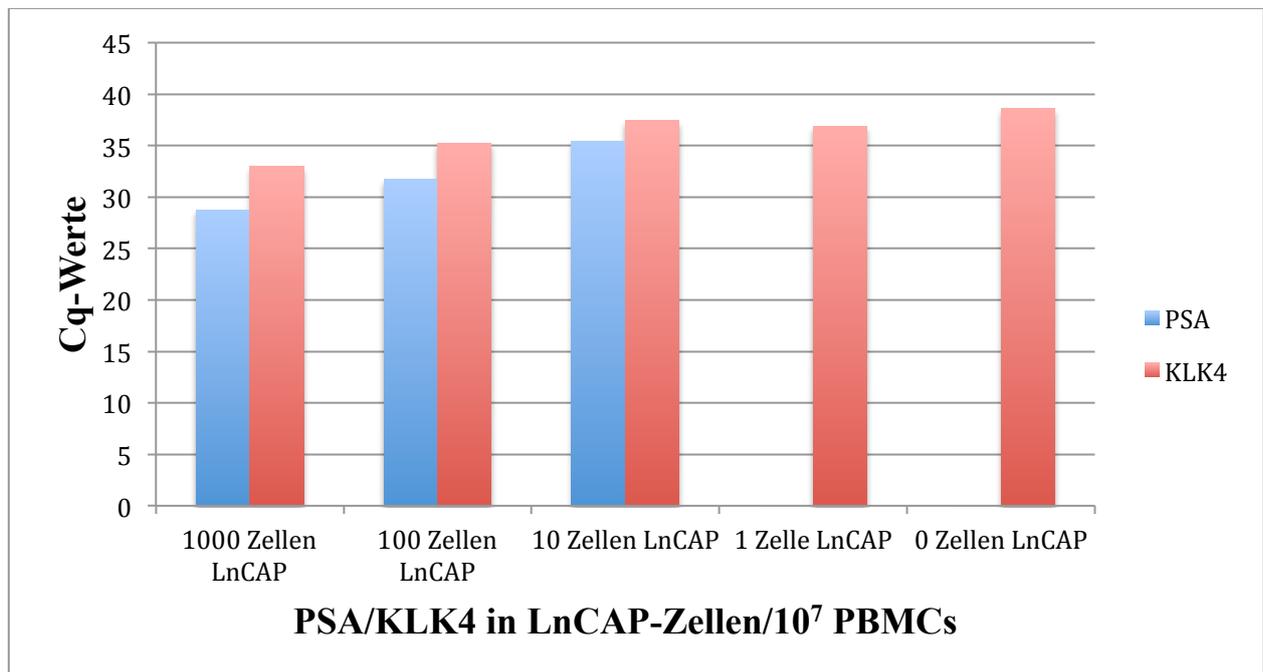


Abb. 10: Darstellung der Sensitivität von PSA und KLK4

Zur Überprüfung der Spezifität wurde auf eine Kontrollgruppe von 144 Lymphknoten von 25 männlichen Blasen-tumor-Patienten mit histopathologisch ausgeschlossenem Prostatakarzinom zurückgegriffen. Basierend auf den Werten der Kontrollgruppe konnte ein Grenzwert für die Marker PSA und KLK4 definiert werden, ab welcher Lymphknoten als molekular positiv (molN1) oder als molekular negativ (molN0) angesehen werden. Als Grenzwert wurde der höchste Expressionswert der Kontrollgruppe als Cutoff verwendet. Für PSA betrug dieser 0,62 und für KLK4 war es 3,42. Alle Lymphknoten, die Werte $> 0,62$ bzw. $3,42$ aufwiesen, wurden als molekular positiv (molN1) gewertet. Unter Verwendung dieser Grenzwerte kann man theoretisch von einer Spezifität von 100% ausgehen.

4.2 Patientendaten

4.2.1 Allgemeine Patientendaten

Insgesamt konnten 84 Patienten in die Auswertung aufgenommen werden. Das mittlere Patientenalter zum Operationszeitpunkt betrug 64,7 Jahre, die Altersspanne lag zwischen 43 und 79 Jahren. Der präoperative PSA-Wert lag im Mittel bei 24,2 ng/ml (Median 10 ng/ml). 42 (50%) Patienten hatten einen PSA Wert < 10 ng/ml, bei 19 (23%) Patienten lag der PSA-Wert zwischen 10 und 20 ng/ml und bei 23 (27%) Patienten über 20 ng/ml. Der

präoperative Gleason-Score war bei 5 (6%) Patienten 6 und bei 36 (43%) Patienten 7. 43 (51%) Patienten hatten einen Gleason-Score zwischen 8 und 10. 40 (48%) Patienten hatten ein klinisches Tumorstadium 1c – 2a. cT2b – c hatten 42 (50%) Patienten und 2 (2%) Patienten hatten ein klinisches Tumorstadium >3a (s. Tab. 3). Somit lag bei 26 (31%) Patienten ein intermediäres und bei 58 (69%) Patienten ein hohes Risiko für das Vorliegen von Lymphknotenmetastasen vor (s. Tab. 4).

Alter	(%)
Mittelwert (Median)	64,7 (65)
Spannweite	43 – 79
Patientenanzahl (%)	
< 65	39 (46)
65 – 75	42 (50)
> 75	3 (4)
PSA ng/ml	
Mittelwert (Median)	24,2 (10,2)
Spannweite	1,01 – 367,5
Patientenanzahl (%)	
< 10	42 (50)
10 – 20	19 (23)
> 20	23 (27)
Gleason-Score	
Mittelwert (Median)	7,7 (8)
Spannweite	6 – 10
Patientenanzahl (%)	
6	5 (6)
7	36 (43)
8 – 10	43 (51)
Klinisches Tumorstadium	
cT1c – 2a	40 (48)
cT2b – c	42 (50)
cT3a – b	2 (2)

Tab. 3: Übersicht über die Patientencharakteristika; T=Tumorstadium, c=klinisch

intermediäres Risiko (Gleason 7 od PSA 10-20ng/ml od T \geq cT2b-c)	Hohes Risiko (Gleason 8-10 od PSA >20ng/ml od T \geqcT3a)
26 Patienten (31%)	58 Patienten (69%)

Tab. 4: Einteilung der Patienten in die D'Amico Risikogruppen intermediäres und hohes Risiko

4.2.2 Auswertung des Lymphknotenstatus

Insgesamt wurden 659 vordefinierte Lymphknotenregionen entnommen (Median 8 Lymphknotenfelder pro Patient, Spannweite 5 – 8). Bei 11 (13%) Patienten wurden weniger als 8 Regionen entfernt. Gründe hierfür waren entweder Adhäsionen durch vorherige Operationen oder es war nicht ausreichend resektables fibrolipomatöses Gewebe vorhanden.

Insgesamt befanden sich 2341 Lymphknoten im entnommenem Gewebe (Mittelwert: 28 Lymphknoten/Patient). Alle Lymphknoten ≥ 3 mm wurden histopathologisch und molekular mittels qRT-PCR untersucht. Dies waren 1829 (78%, Mittelwert 21,8, Median 21, Range 6 – 48) Lymphknoten. Hiervon waren 1772 (96,9%) Lymphknoten histologisch negativ (pN0) und 57 (3,1%) Lymphknoten histologisch positiv. Somit hatten 64 (76,2%) Patienten unauffällige Lymphknoten (pN0) und 20 (23,8%) Patienten Lymphknotenmetastasen (pN1) (s. Abb. 11).

512 (22%, Mittelwert 6,8, Median 5, Range 0 – 30) Lymphknoten hatten eine Größe < 3 mm und wurden im weiteren Verlauf ausschließlich histopathologisch untersucht. Bei der histopathologischen Untersuchung der Lymphknoten < 3 mm wurden drei Mikrometastasen entdeckt. Diese Metastasen waren ausschließlich bei Patienten vorhanden, welche weitere histopathologische Metastasen in Lymphknoten > 3 mm hatten (s. Abb. 12).

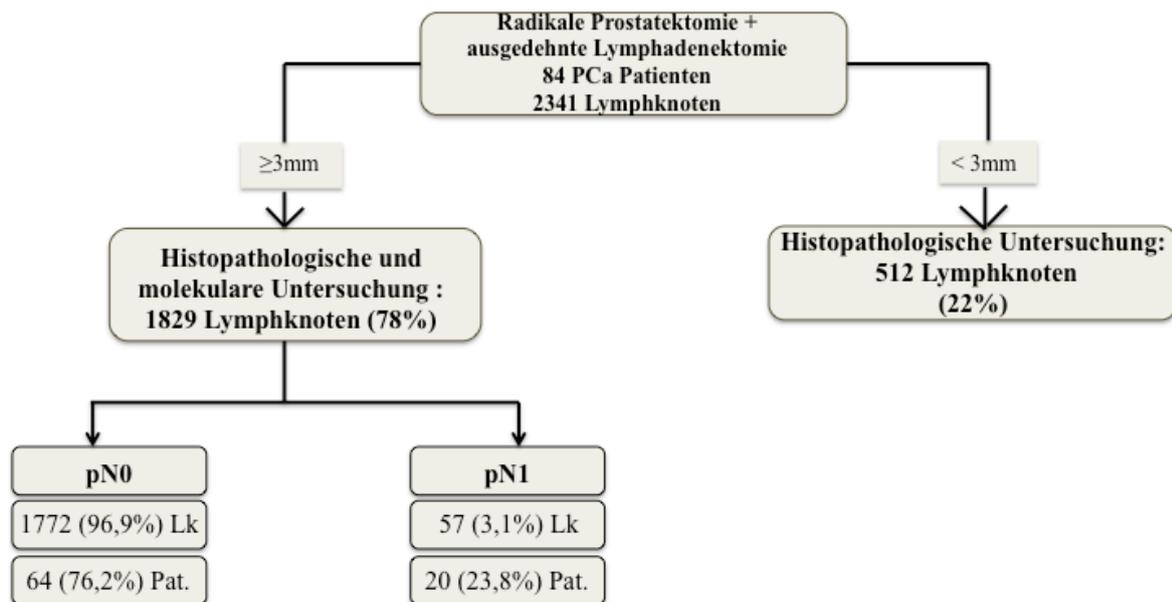


Abb. 11: Einteilung der Lymphknoten in die Untergruppen

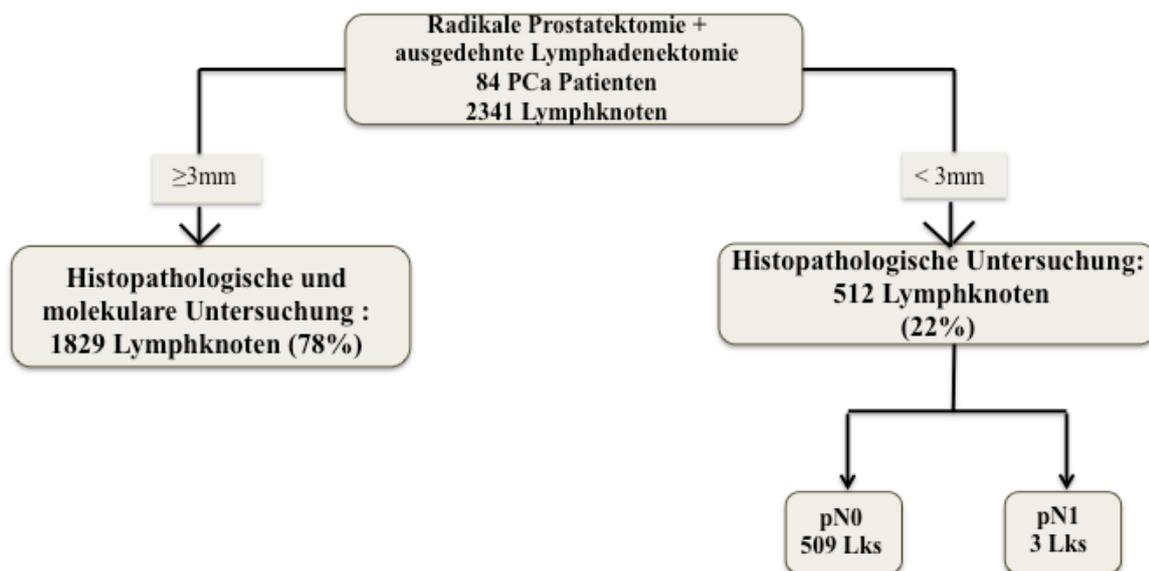


Abb. 12: Aufteilung der Lymphknoten <3mm.

Molekulare Lymphknotenuntersuchung mittels PSA

Bei der molekularen Lymphknotenuntersuchung bezüglich einer Expression des Markers PSA ergab sich folgendes Ergebnis. Von den 64 histopathologisch negativen Patienten waren 31 (37%) Patienten molekular negativ (pN0/molN0) und 33 (39%) Patienten ausschließlich molekular positiv (pN0/molN1). Alle 20 (24%) histopathologisch positiven Patienten waren auch molekular positiv (pN1/molN1). In Bezug auf die Lymphknoten ergab sich folgendes Bild: 1533 (83,8%) Lymphknoten waren histopathologisch und molekular negativ (pN0/molN0), 239 (13,1%) waren

histopathologisch negativ, aber molekular positiv (pN0/molN1), 4 (0,2%) waren zwar histopathologisch positiv, jedoch molekular negativ (pN1/molN0) und 53 (2,9%) waren sowohl histopathologisch als auch molekular positiv (pN1/molN1) (s. Abb. 13).

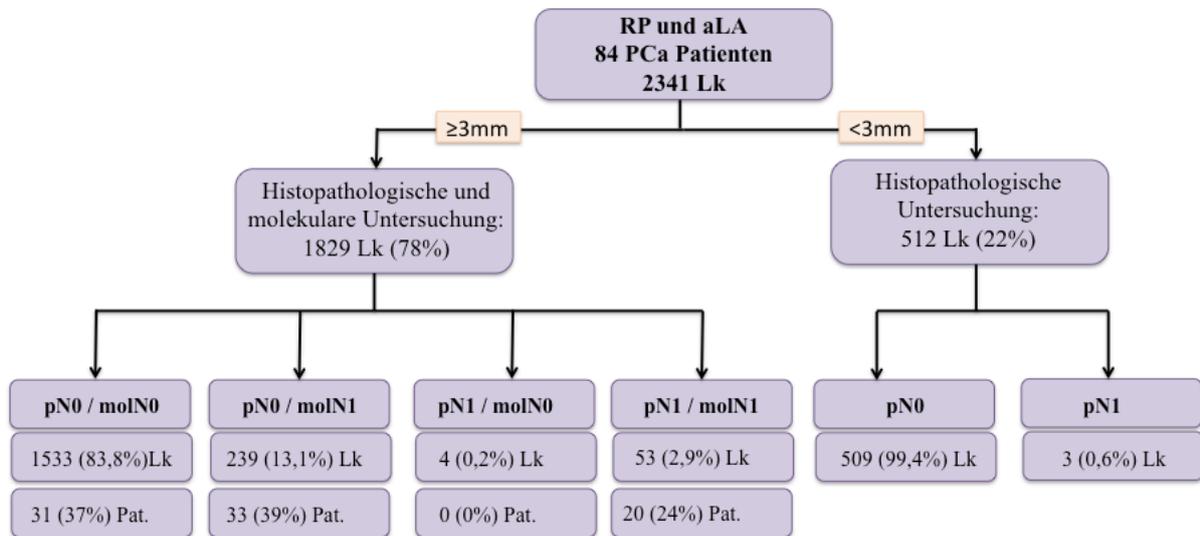


Abb. 13: Überblick über die Patienten- und Lymphknotenverteilung nach histopathologischer und molekularer Untersuchung mittels PSA. (aLA = ausgedehnte Lymphadenektomie).

Molekulare Lymphknotenuntersuchung mittels KLK4

Die gleiche Auswertung erfolgte auch für den molekularen Marker KLK4. Betrachtet man die Patientenverteilung in den unterschiedlichen Gruppen so waren unter den 64 histopathologisch negativen (pN0) Patienten 25 (29,8%) molekular negativ (pN0/molN0) und 39 (46,4%) molekular positiv (pN0/molN1). Von den 20 histopathologisch positiven Patienten (pN1) war 1 (1,2%) molekular negativ (pN1/molN0) und 19 (22,6%) waren molekular positiv (pN1/molN1). 1541 (84,3%) der Lymphknoten waren weder histopathologisch noch molekular positiv (pN0/molN0) und 231 (12,6%) Lymphknoten waren zwar molekular positiv, jedoch histopathologisch negativ (pN0/molN1). Unter den histopathologischen Lymphknoten waren 49 (2,7%) zugleich auch molekular positiv (pN1/molN1) und bei 8 (0,4%) wurden zwar histopathologische Metastasen entdeckt, jedoch keine molekularen (pN1/molN0). Abbildung 14 veranschaulicht die Ergebnisse der molekularen Lymphknotenuntersuchung mittels KLK4.

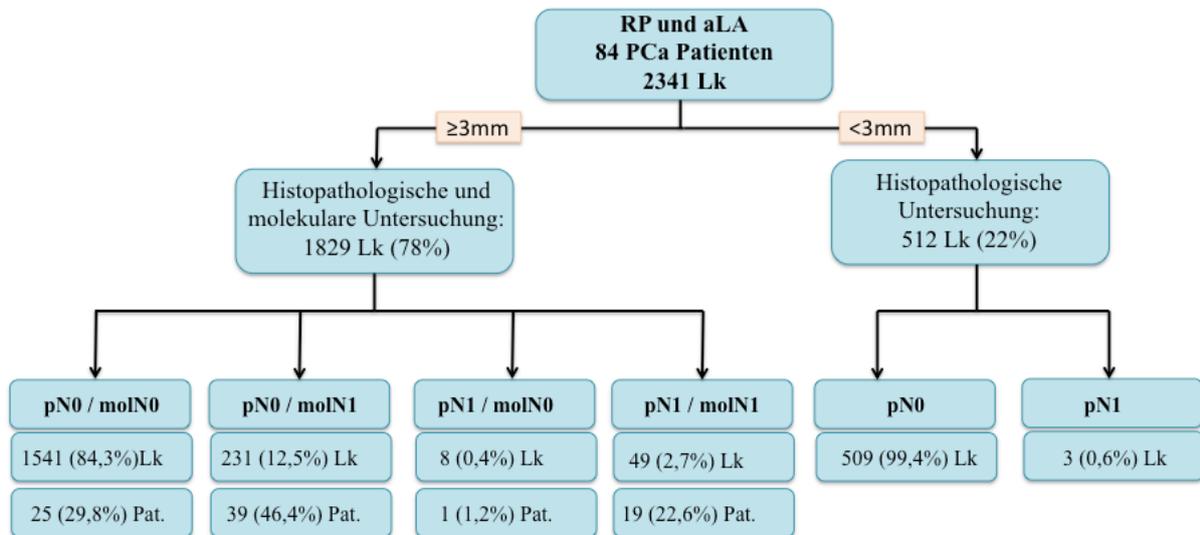


Abb. 14: Überblick über die Patienten- und Lymphknotenverteilung nach histopathologischer und molekularer Untersuchung mittels KLK4.

Kombination von PSA und KLK4 zur molekularen Lymphknotenuntersuchung

Als nächstes wurden alle molekular positiven Lymphknoten auf die gemeinsame oder alleinige Expression eines oder beider Marker untersucht.

Von den 66 molekular positiven Patienten, waren 13 (19,7%) Patienten bei der qRT-PCR ausschließlich KLK4-positiv und 9 (13,6%) Patienten ausschließlich PSA-positiv. Für die übrigen 44 (66,7%) Patienten ergab sich eine positive molekulare Lymphknotenuntersuchung sowohl für PSA als auch für KLK4.

Insgesamt fand man 438 molekular positive Lymphknoten, was einem Anteil von 23,9% an den histopathologisch und molekular ausgewerteten Lymphknoten entspricht. 146 (33,3%) dieser 438 Lymphknoten zeigten in der qRT-PCR nur für KLK4 eine erhöhte Expression, 157 (35,8%) nur für PSA und 135 (30,8%) waren zugleich für KLK4 und PSA positiv (s. Abb. 15).

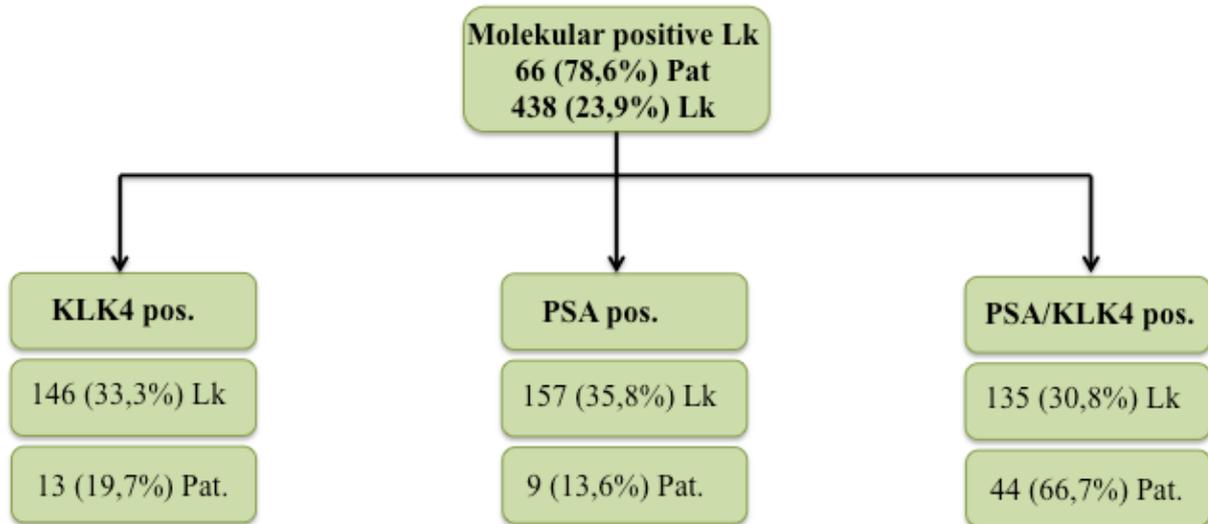


Abb. 15: Differenzierung zwischen den einzelnen Markern.

Betrachtet man nur die 57 histopathologisch positiven Lymphknoten von den 20 Patienten, so waren 50 (87,7%) Lymphknoten sowohl für PSA als auch für KLK4 positiv, 1 (1,8%) Lymphknoten waren negativ für beide Marker, fünf (8,7%) waren nur PSA-positiv und ein (1,8%) Lymphknoten nur KLK4-positiv (s. Abb. 16).

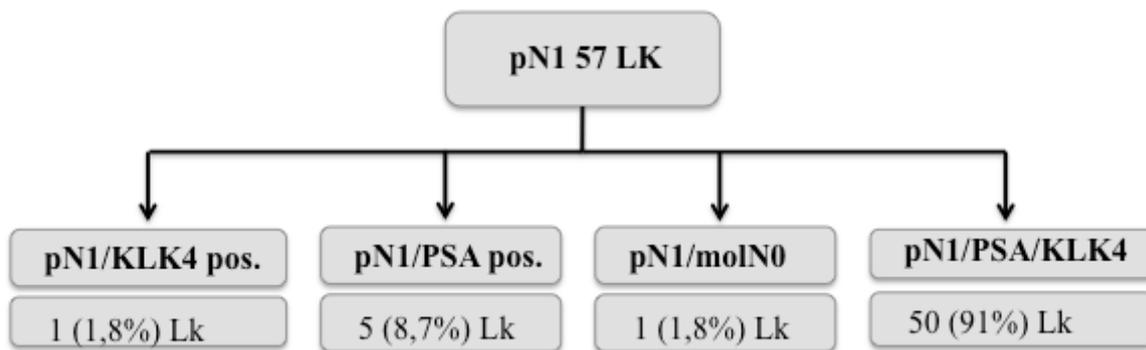


Abb. 16: Einteilung der 57 histopathologisch positiven Lymphknoten.

In den weiteren Auswertungen wurde eine erhöhte Expression von PSA und/oder KLK4 als molekular positiv (molN1) gewertet (s. Abb. 17).

Von den 84 Patienten waren 18 (21,4%) Patienten sowohl histopathologisch als auch molekular negativ (pN0/molN0). 46 (54,8%) Patienten waren zwar histopathologisch negativ, aber molekular positiv (pN0/molN1). Von den 20 histopathologisch positiven Patienten hatten alle 20 (23,8%) Patienten mindestens einen molekular positiven Lymphknoten (pN1/molN1).

1388 (75,9%) der Lymphknoten waren histopathologisch und molekular negativ (pN0/molN0). 384 (21%) Lymphknoten zeigten nur molekulare Metastasen (pN0/molN1). 53 (2,9%) Lymphknoten waren sowohl histopathologisch als auch

molekular positiv (pN1/molN1) und 4 (0,2%) Lymphknoten waren nur histopathologisch positiv (pN1/molN0).

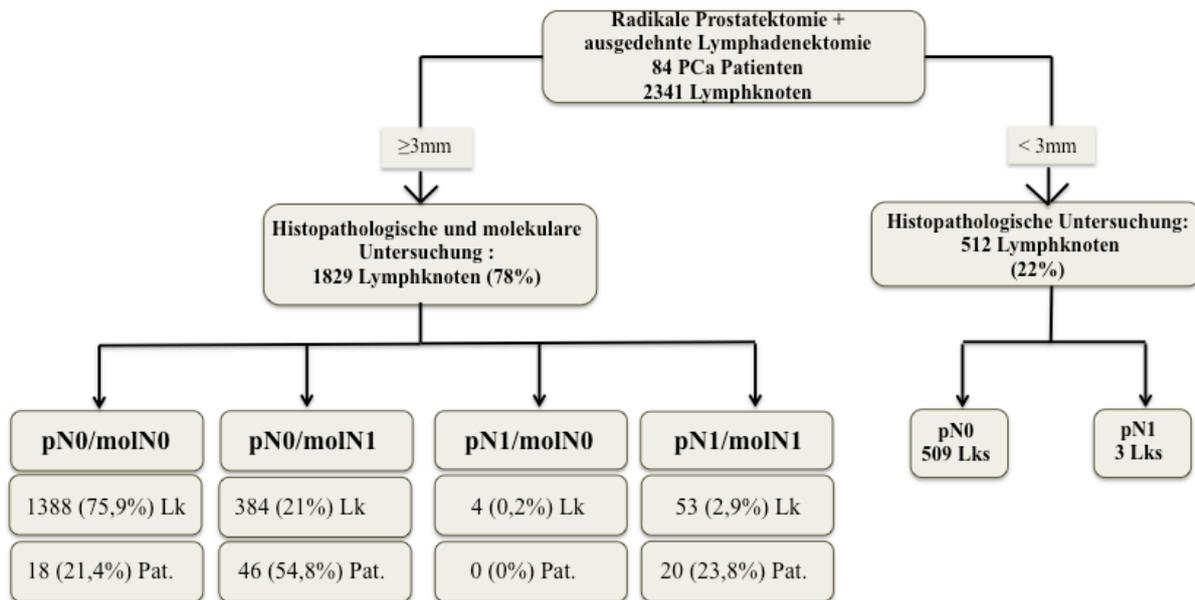


Abb. 17: Überblick über die Patienten und Lymphknoten der unterschiedlichen Gruppen. Als molN1 wurden Lymphknoten gezählt, die PSA und/oder KLK 4 positiv waren.

Tabelle 5 gibt einen Überblick über die molekular positiven Patienten. In der Gruppe der 20 histopathologisch und molekular positiven Patienten (pN1/molN1) lagen im Mittel 2,9 histopathologisch positive Lymphknotenmetastasen pro Patient (Anzahl 57, Median 2, Spannweite 1 – 11) und 10,7 ausschließlich molekular positive Lymphknoten pro Patient (Anzahl 214, Median 8, Spannweite 1 – 29) vor. In der Gruppe mit 46 ausschließlich molekular positiven Patienten (pN0/molN1) lagen im Mittel 4,9 ausschließlich molekular positive Lymphknoten pro Patient (Anzahl 225, Median 3, Spannweite 1 – 21) vor.

pN0/molN1	pN1/molN1	
46 Patienten	20 Patienten	
pN0/molN1	pN1/molN1	pN0/molN1*
225 Lymphknoten	57 Lymphknoten	214 Lymphknoten
Mittelwert: 4,9 Lk/Patient	Mittelwert: 2,9 Lk/Patient	Mittelwert: 10,7 Lk/Patient
Median: 3	Median: 2	Median: 8
Range: 1 – 21	Range: 1 – 11	Range: 1 – 29

Tab. 5: Übersicht über die molekular positiven Patienten und Lymphknoten. pN0/molN1*: Anzahl der histopathologisch negativen jedoch molekular positiven Lymphknoten in der Gruppe der 20 histopathologisch positiven Lymphknoten

4.2.3 Topographie der Lymphknotenverteilung

Die insgesamt 1829 entnommenen Lymphknoten waren wie folgt auf die vordefinierten anatomischen Regionen verteilt (s. Abb. 18). Im Standard-Lymphadenektomiefeld lagen 1310 (71,6%) der 1829 entnommenen Lymphknoten, wovon 813 (44,4%) Lymphknoten in der Fossa obturatoria und 497 (27,2%) Lymphknoten entlang der A. iliaca externa lagen. Außerhalb des Standardfeldes wurden 519 (28,4%) Lymphknoten reseziert, wovon 273 (15%) entlang der A. iliaca interna und 246 (13,4%) entlang der A. iliaca communis lagen.

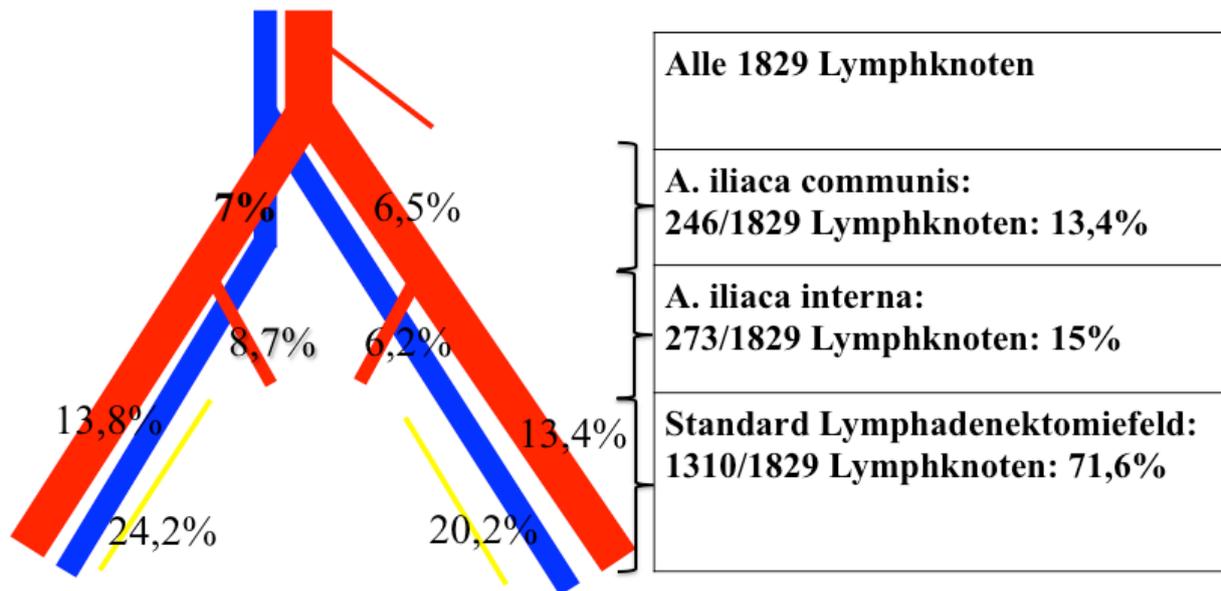


Abb. 18: Übersicht über die Topographie der histopathologisch und molekular ausgewerteten Lymphknoten.

Die Topographische Verteilung von 57 histopathologisch positiven Lymphknoten ist in Abbildung 19 wiedergegeben. Im Standardfeld befanden sich 69% der Lymphknotenmetastasen, wovon 36,2% entlang der A. iliaca externa und 32,7% in der Fossa obturatoria lagen. Außerhalb des Standardlymphadenektomiefeldes befanden sich 31% der histopathologisch positiven Lymphknoten, wovon jeweils 15,5% entlang der A. iliaca communis und entlang der A. ilica interna lokalisiert waren.

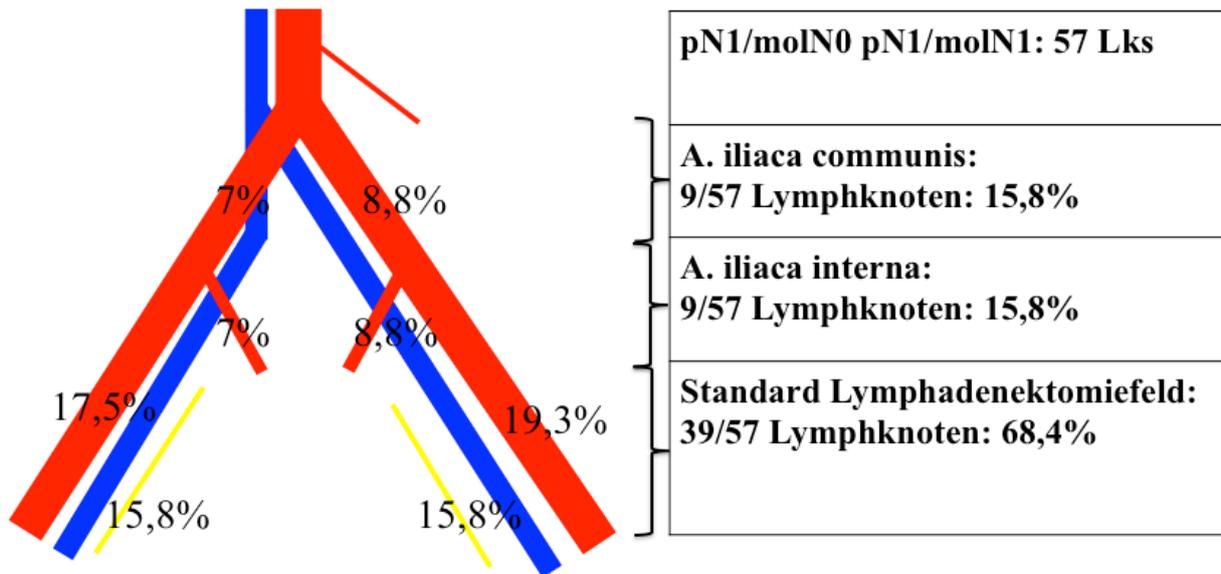


Abb. 19: Übersicht über die 57 histopathologischen Lymphknoten.

Eine ähnliche Verteilung ergab sich für die ausschließlich molekular positiven Lymphknoten (pN0/molN1) mit den Markern PSA (s. Abb. 20) oder KLK4 (s. Abb. 21) sowie eine Kombination aus PSA und/oder KLK4 (s. Abb. 22).

Innerhalb des Standardfeldes lagen 71,3% der PSA-positiven Lymphknoten, 69,3% der KLK4-positiven sowie 70,1% der PSA und/oder KLK4-positiven Lymphknoten. Entlang der A. iliaca interna waren 16,7% der PSA-positiven Lymphknoten, 13,4% der KLK4-positiven Lymphknoten sowie 14,0% der PSA und/oder KLK4-positiven Lymphknoten lokalisiert. Entlang der A. iliaca communis lagen 12,0% der PSA-positiven Lymphknoten, 17,3% der KLK4-positiven sowie 15,9% der PSA und/oder KLK4-positiven Lymphknoten.

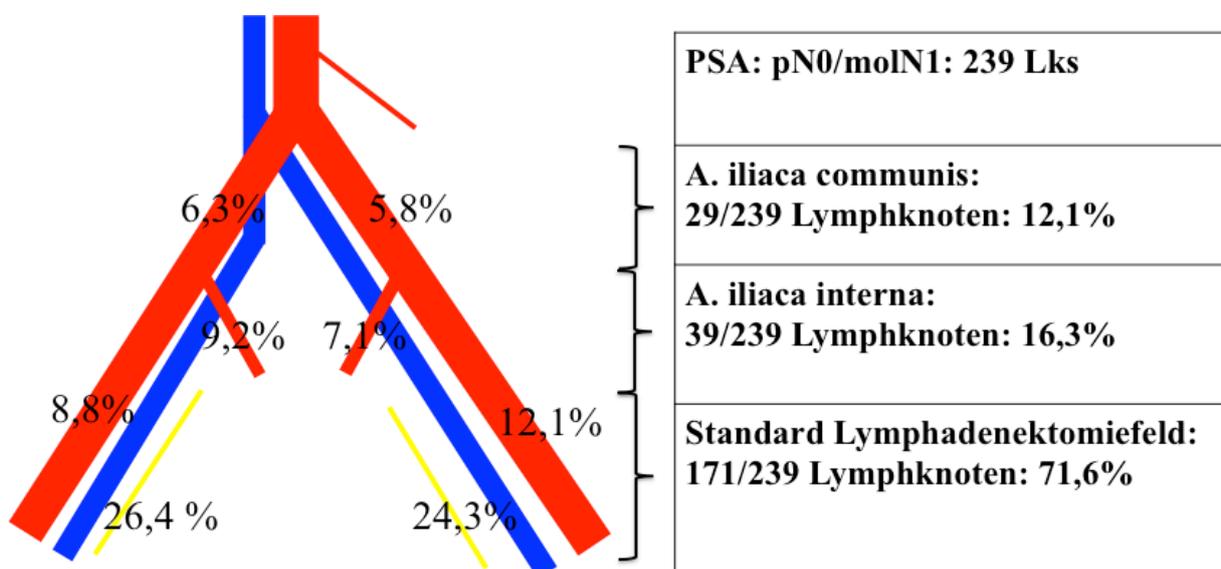


Abb. 20: Topographische Verteilung der PSA positiven Lymphknoten.

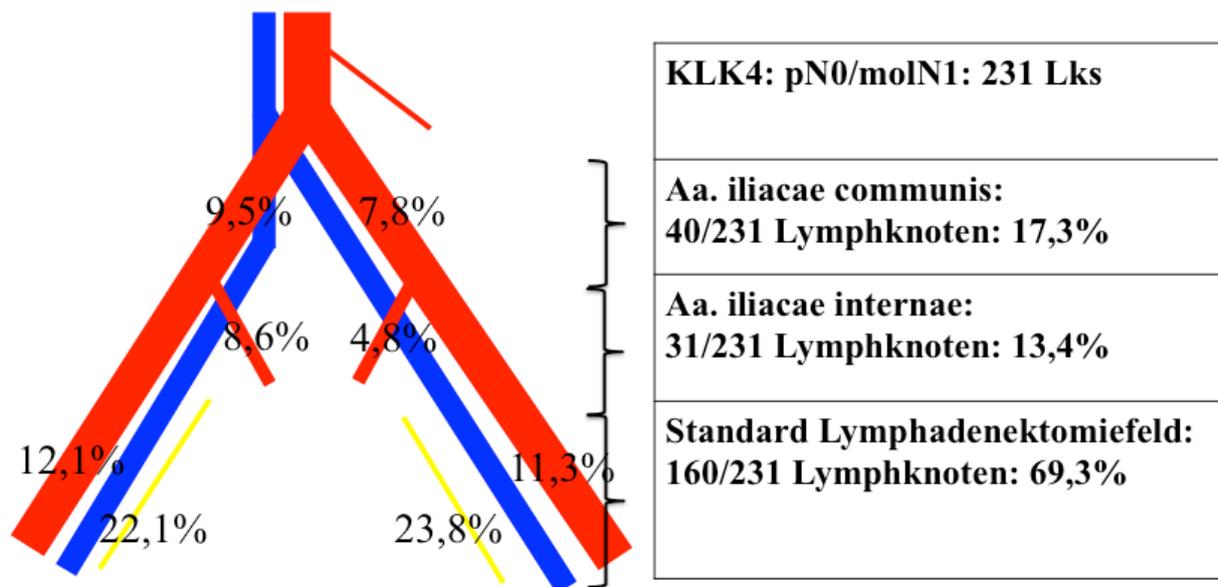


Abb. 21: Topographische Verteilung der KLK4 positiven Lymphknoten.

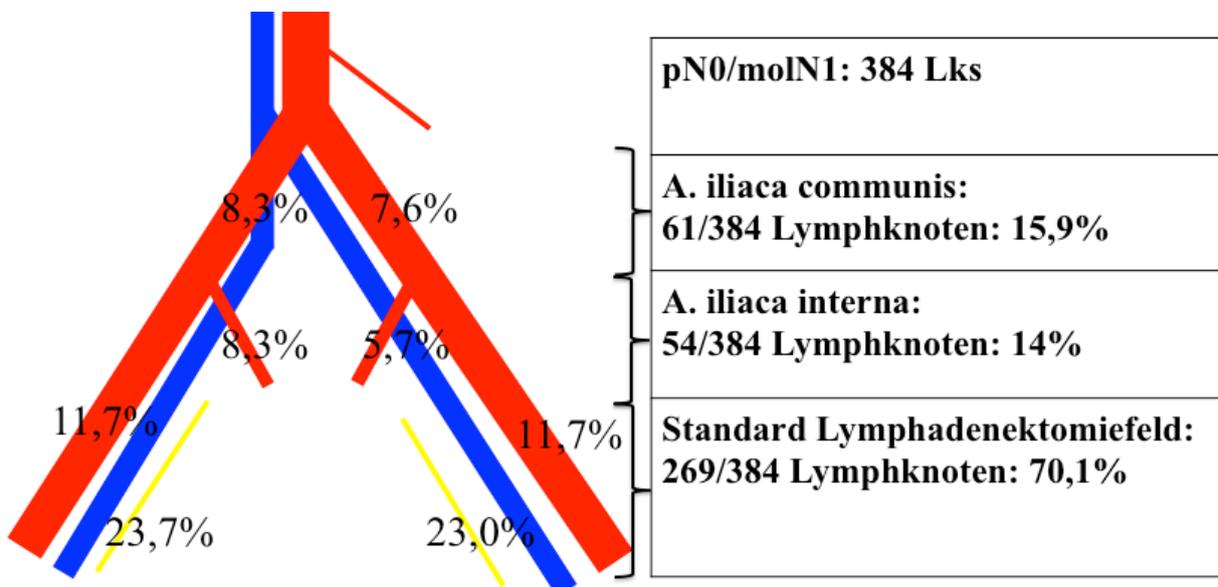


Abb. 22: Übersicht über die ausschließlich molekularpositiven Lymphknoten.

Da sowohl ausschließlich histopathologisch positive als auch ausschließlich molekular positive Lymphknoten vorhanden waren, ist in Abbildung 23 als Gesamtergebnis die Verteilung von histopathologisch und/oder molekular positiven Lymphknoten für die Marker PSA und/oder KLK4 dargestellt.

Es lagen 70,2% der histopathologisch und/oder molekular positiven Lymphknoten innerhalb des Standardfeldes. Entlang der A. iliaca communis waren 15,8% und entlang der A. iliaca interna 14% der histopathologisch und/oder molekular positiven Lymphknoten.

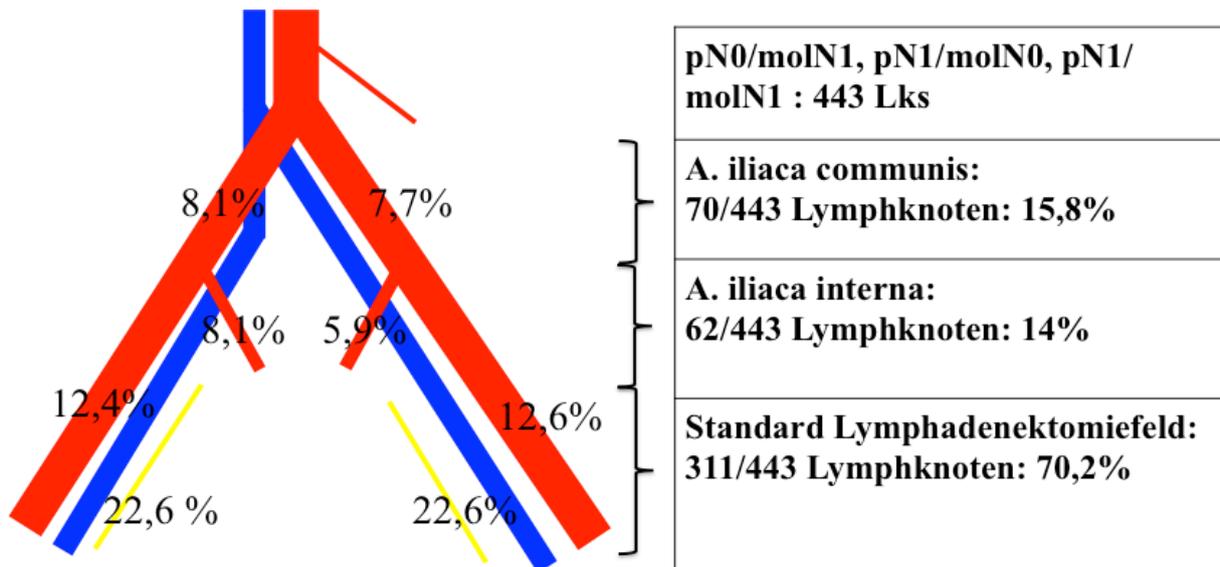


Abb. 23: Übersicht über die histopathologisch und/oder molekular positiven Lymphknoten.

Tabelle 6 stellt eine Übersicht der Beteiligung anatomischer Regionen bei Patienten mit histopathologisch und/oder molekular positiven Lymphknoten dar.

Die Patienten-Gruppe mit histopathologischen Lymphknotenmetastasen (pN1/molN0 und pN1/molN1) enthielt insgesamt 20 Patienten. Im Standardlymphadenektomiefeld fanden sich bei 18 (90%) Patienten und außerhalb des Standardfeldes bei 10 (50%) Patienten histopathologische Lymphknotenmetastasen. Die Lymphknoten der A. iliaca interna und der A. iliaca communis waren hierbei bei jeweils 6 (30%) Patienten betroffen. Bei 10 (50%) Patienten war nur das Standardfeld von Lymphknotenmetastasen betroffen und bei 2 (10%) Patienten ausschließlich Lymphknoten außerhalb des Standardfeldes. Bei beiden Patienten war nur das Gebiet der A. iliaca communis betroffen.

Betrachtet man nur die molekularpositiven Lymphknoten erhält man folgendes Verteilungsmuster: Im Standardfeld fanden sich bei 39 (46%) Patienten und außerhalb des Standardfeldes bei 32 (38%) Patienten molekular positive Lymphknoten. Davon waren bei 19 (23%) Patienten die molekularpositiven Lymphknoten um die A. iliaca int. lokalisiert und bei 23 (27%) um die A. iliaca communis. Nur im Standardlymphadenektomiefeld molekular positive Lymphknoten fand man bei 14 (17%) Patienten und außerhalb des Standardlymphadenektomiefeldes bei 6 (7%) Patienten, welche bei 2 (2%) Patienten um die A. iliaca interna und bei 4 (5%) Patienten um die A. iliaca communis lokalisiert waren.

Betrachtet man alle histopathologisch und/oder molekular positiven (pN0/molN1, pN1/molN0, pN1/molN1) Lymphknoten für die Marker PSA und/oder KLK4, so ergibt sich als Ergebnis folgendes Verteilungsmuster: Positive Lymphknoten waren bei 59

(70%) der Patienten im Standardfeld und bei 46 (55%) Patienten außerhalb des Standardfeldes lokalisiert. Hierbei hatten 33 (39%) Patienten positive Lymphknoten entlang der A. iliaca interna und 33 (39%) Patienten entlang der A. iliaca communis. Betrachtet man die Patienten, welche ausschließlich in einem der Felder positive Lymphknoten aufwiesen, so waren Lymphknoten des Standardlymphadenektomiefeldes als einzige bei 20 (24%) Patienten und Lymphknoten außerhalb des Lymphadenektomiefeldes als einzige bei 7 (8%) betroffen. Die Region entlang der A. iliaca interna war bei 2 (2%) Patienten und entlang der A. iliaca communis bei 5 (6%) Patienten als einzige betroffen.

Metastasierungstyp	Lokalisation			
	StandardLA Pat. Anzahl (%)	Außerhalb Standardfeld Pat. Anzahl (%)	A. iliaca int Pat. Anzahl (%)	A. iliaca communis Pat. Anzahl (%)
pN1/molN1, pN1/molN0	18/20 (90)	10/20 (50)	6/20 (30)	6/20 (30)
ausschließlich in dieser Region	10/20 (50)	2/20 (10)	0/20 (0)	2/20 (10)
pN0/molN1	39/84 (46)	32/84 (38)	19/84 (23)	23/84 (27)
ausschließlich in dieser Region	14/84 (17)	6/84 (7)	2/84 (2)	4/84 (5)
pN0/molN1, pN1/molN0, pN1/molN1	59/84 (70)	46/84 (55)	33/84 (39)	33/84 (39)
ausschließlich in dieser Region	20/84 (24)	7/84 (8)	2/84 (2)	5/84 (6)

Tab. 6: Übersicht über die jeweilige Patientenzahl, den Metastasierungstyp und die Lokalisation der Lymphknotenmetastasen.

5 Diskussion

5.1 Methodenkritik

5.1.1 Studiendesign

Alle Teilnehmer dieser Studie hatten ein lokal begrenztes Prostatakarzinom ohne vorangehende neoadjuvante Behandlung. So konnte ein Einfluss einer anderen Therapie auf histopathologische und molekulare Ergebnisse z.B. durch vorherige Chemo- oder Hormontherapie ausgeschlossen werden. Zudem war Voraussetzung ein intermediäres oder ein Hochrisiko-Prostatakarzinom, was mittels PSA-Wert, Gleason-Score und/oder klinischem Tumorstadium (Def. s. 4.2.1) definiert wird. Partin et al. konnte bereits 1993 zeigen, dass mittels dieser drei Marker eine Aussagekraft bezüglich des pathologischen Tumor- und Nodalstadiums getroffen werden kann. Je höher die Risikogruppe, desto wahrscheinlicher ist eine Lymphknotenbeteiligung und/oder ein höheres Tumorstadium (Partin et al., 1993). Heidenreich et al. konnte bei Patienten, die radikal prostatektomiert und ausgedehnt lymphadenektomiert wurden zeigen, dass bei niedrigem Risiko in 5 - 6%, bei intermediärem Risiko 20 – 25% und bei hohem Risiko 30 – 40% Lymphknotenmetastasen histopathologisch detektiert werden konnten (Heidenreich et al., 2007). Die Einstufung der Patienten in die intermediäre oder Hochrisikogruppe mit dem entsprechend erhöhten Risiko für eine lymphogene Metastasierung war zudem Grundlage für die leitliniengerechte Durchführung einer radikalen Prostatektomie zusammen mit einer ausgedehnten Lymphadenektomie (Heidenreich et al., 2012). Die Anzahl der eingeschlossenen Patienten in den jeweiligen Gruppen war zufällig. Aus diesem Grund wiesen knapp 70% der Patienten ein Hochrisiko-Karzinom auf, während nur 30% ein intermediäres Risiko hatten. Wie schon erwähnt, verhält sich die Anzahl nodalpositiver Patienten konkordant zum erhöhten Risiko. Je höher das Risiko, desto wahrscheinlicher sind Lymphknotenmetastasen (Cagiannos et al., 2003). Diese Tatsache erwies sich für diese Arbeit als sehr vorteilhaft, da hierdurch eine relevante Anzahl an Patienten mit Lymphknotenmetastasen detektiert werden konnte.

5.1.2 Gewebeprobengewinnung und Aufarbeitung

Der Zeitraum von Rekrutierung und Operation der Patienten beschränkte sich auf nur ein Jahr und zehn Monate (Feb 2010 – Dez 2011), so wurden alle Patienten nach der gleichen Methode ohne Veränderungen der Operationsstandards operiert, was eine Lymphknotenprobengewinnung unter gleichen Bedingungen ermöglichte. Die Operation

wurde von vier erfahrenen Chirurgen durchgeführt, womit eine vergleichbare Technik und Entnahme der Gewebeprobe gewährleistet werden konnte. Als Operationsmethode wurde die offene radikale retropubische Prostatektomie festgelegt, was wiederum gleiche Voraussetzungen für die Entnahme der Proben schuf.

Die Entnahme der pelvinen Lymphknoten erfolgte standardisiert unter sterilen Bedingungen nach vordefinierten Lymphknotenfeldern (s. o. Abb. 1). So konnte gewährleistet werden, dass die Lymphadenektomie bei allen Patienten auf die gleiche Weise durchgeführt wurde. Die Lymphknotenpräparation unmittelbar nach operativer Entnahme wurde von drei Doktoranden ebenfalls standardisiert durchgeführt. Die Proben wurden sofort auf Eis gelagert und die Aufarbeitung der Lymphknoten erfolgte innerhalb von ca. 20 Minuten, um eine RNA-Degradation zu verhindern. Jeweils eine Lymphknotenhälfte wurde in Flüssigstickstoff schockgefroren, die andere in Formalin fixiert und in die Pathologie gesandt. Die Proben wurden einheitlich beschriftet, so dass jeder histopathologisch untersuchte Lymphknoten exakt seinem Gegenstück zugeordnet werden konnte, welches molekular untersucht wurde. Aus diesen Gründen kann davon ausgegangen werden, dass zwischen den verschiedenen Lymphknotenproben keine Qualitätsunterschiede bestanden.

Eine mögliche Fehlerquelle in der angewandten Lymphknotenuntersuchung mittels Histopathologie der einen Lymphknotenhälfte und molekularer Untersuchung der anderen könnte in der Metastasenlokalisation innerhalb eines Lymphknotens liegen. Wird der Lymphknoten halbiert, könnte nur eine Hälfte eine Metastase beherbergen. Das daraus resultierende Ergebnis wäre in der einen Hälfte positiv und in der jeweils anderen falsch negativ. Um diese Fehlerquelle zu minimieren wurde der Lymphknoten nicht nur halbiert, sondern der laterale Bereich des Gegenstücks (ca. 10%) wurde ebenfalls in Formalin fixiert und in die Pathologie gesandt. So konnten zumindest sehr laterale Metastasen die nur in der molekularer Untersuchung auffällig geworden wären, auch histopathologisch entdeckt werden.

Ein weiteres Problem könnte die Größe der Lymphknoten darstellen. Es wurden nur Lymphknoten sowohl histopathologisch als auch molekular untersucht, die ≥ 3 mm waren. Kleinere wurden nur histopathologisch untersucht. Jedoch ist eine Metastasierung schon bei kleinen Lymphknoten möglich. So wurden in dieser Arbeit drei (0,6% der Lymphknoten ≤ 3 mm) histopathologische Metastasen bei Lymphknoten ≤ 3 mm entdeckt. Würden diese Lymphknoten geteilt werden, so würden Teilstücke resultieren, die für eine Untersuchung mit beiden Methoden insuffizient wären. Bereits in anderen Studien konnte

gezeigt werden, dass ab einer gewissen Größe die Lymphknoten entweder zu klein zum Teilen sind oder aber die RNA Extraktion insuffizient ist, so dass die gewonnene RNA Konzentration zu gering für eine qRT-PCR gewesen ist (Branagan, Hughes, Jeffrey, Crane-Robinson, & Perry, 2002; Liefers et al., 1998). Die qRT-PCR benötigt zur Durchführung eine effiziente RNA-Extraktion mit einer ausreichenden RNA-Menge, die in cDNA transkribiert werden kann. Bei kleinen Lymphknoten kann aufgrund der zu geringen RNA Menge oft keine cDNA hergestellt werden. Diese Lymphknoten können dann nicht molekular ausgewertet werden.

Ein weiterer Grund für eine zu geringe RNA-Konzentration könnte eine vorzeitige Zersetzung der RNA durch ubiquitär vorkommende RNAsen darstellen. In dieser Arbeit erfolgte, wie bereits erwähnt, die Aufarbeitung der Lymphknoten nach Entnahme innerhalb von 20 min. Die Proben wurden sogleich in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80°C zwischengelagert. Zudem wurden nur RNase freie Materialien verwendet und die Lymphknoten wurden in RNAlater aufgetaut. RNAlater enthält unter anderem Ammoniumsulfat, welches die darin enthaltene RNA stabilisiert und vor einem Zerfall schützt, indem es die darin enthaltenen Proteine (u.a. RNAsen) aussalzt und somit funktionslos macht. Bei der Anwendung ist es wichtig, dass das Probenmaterial möglichst klein ist, damit es von der Lösung durchdrungen werden kann. Somit kann ein Zerfall der RNA praktisch vernachlässigt werden.

Die Histopathologie ist eine gute Methode um Metastasen zu detektieren. Jedoch können kleine Metastasen mikroskopisch übersehen werden, wenn nur ein Schnitt betrachtet wird (Stichprobenfehler). So ist ein Schnitt aus dem Gewebe nicht repräsentativ für das gesamte Gewebe. Ein falsch negativer Nodalstatus könnte die Folge sein. Eine Lösung hierfür könnten Stufenschnitte mit geringem Abstand (z.B. 1 mm) sein. Weiterhin könnte es sein, dass bei einer geringen Anzahl an Tumorzellen im Abschnitt für die histopathologische Untersuchung diese mikroskopisch übersehen werden. Durch eine zusätzliche immunhistochemische Untersuchung könnte man diese Fehlerquelle minimieren. Im Gegensatz zur Standardhistopathologie und Immunhistochemie ist die PCR eine sensitivere Methode zur Evaluation des Lymphknotenstatus bei soliden Tumoren wie zum Beispiel dem Prostatakarzinom (Bilchik et al., 2007; Denninghoff et al., 2008; Ikeda et al., 2008; Shariat et al., 2003; Verbanac et al., 2010). Dass der molekulare Nodalstatus eine bedeutende Rolle bezüglich der Rezidivrate spielt, wurde bereits in zwei prospektiven Studien nachgewiesen (Ferrari et al., 2006; Miyake et al., 2007).

5.2 Bewertung der Methoden, Markerwahl und Kontrollgruppe

5.2.1 Bewertung der qRT-PCR

Die Polymerase Kettenreaktion ermöglicht die Amplifikation und den Nachweis einer spezifischen DNA-Sequenz. Durch die hohe Sensitivität der PCR können bereits minimale Nukleinsäure-Kontaminationen zu falsch positiven Ergebnissen führen. Aus diesem Grund wurde bei jeder PCR-Reaktion eine Negativkontrolle (NTC) parallel durchgeführt. Hierzu wurde statt der 4 µl Proben-cDNA 4 µl Aqua bidest. zum Reaktionsansatz pipettiert. Bei allen Negativkontrollen konnte kein PCR-Produkt nachgewiesen werden, so dass Kontaminationen ausgeschlossen werden konnten.

Weiterhin ist die PCR sensibel bezüglich Quantität und Qualität der RNA. Einen Einfluss darauf hat zum einen eine Beschädigung der RNA im Sinne einer Degradation, zum anderen kann bei der RT-Reaktion oder PCR ein Fehler auftreten. RNA ist, wie bereits bekannt, weniger stabil als DNA, was daran liegt, dass RNA einzelsträngig vorliegt und an der 2'Position im Pentose Ring eine Hydroxygruppe weniger hat, wodurch eine Hydrolyse der Basen ermöglicht wird. Aus diesem Grund ist es notwendig, RNA in eine stabilere Form, wie zum Beispiel cDNA umzuschreiben. Dies erfolgte mit dem Enzym Reverse Transkriptase.

Zur Kontrolle für eine korrekte und erfolgreiche RT-Reaktion wurden Referenzgene eingesetzt. Zur Auswahl der Referenzgene für die qRT-PCR wurde mittels Bioinformatik geNorm Analysis Software die Stabilität sechs verschiedener Referenzgene (GAPDH, RPL 13, YWHAZ, HPRT1 und UBC) in 14 Lymphknotenproben getestet. Dabei zeigte sich die geringste Schwankungsbreite für die Referenzgene HPRT1 und UBC, weshalb diese verwendet wurden. Sie wurden zu jedem Reaktionsansatz pipettiert. Die Amplifikation von HPRT1 und UBC diente so als Kontrolle für eine korrekte und erfolgreiche RT-Reaktion. Die Referenzgene waren in allen untersuchten cDNA-Proben nachweisbar.

Um Pipettierfehler zu detektieren und die qRT-PCR-Reaktion zu kontrollieren, wurde bei jeder Versuchsreihe eine Positivkontrolle durchgeführt. Hierzu wurden LnCAP-Zellen verwendet. Alle Reaktionsansätze zeigten eine konstante und regelrechte PSA und KLK4 Genexpression in den Positivkontrollen.

5.2.2 Markerauswahl

Das Auftreten von Lymphknotenmetastasen ist einer der bedeutendsten prognostischen Faktoren für ein biochemisches Rezidiv oder das krebsspezifische Überleben bei

Patienten mit einem lokalisiertem Prostatakarzinom (Briganti et al., 2009; Cheng et al., 2001). Edelstein et al. konnte bereits 1996 eine mögliche klinische Relevanz der molekularen Metastasierung mit folgender Arbeit zeigen: Er führte eine retrospektive Studie mit RT-PCR zur PSA-Marker-Detektion an archivierten, fixierten pathologisch negativen Lymphknoten von 36 Prostatakarzinompatienten, die mit einer radikalen Prostatektomie behandelt worden waren, durch. Bei 16 (44%) Patienten wurde eine erhöhte PSA Genexpression festgestellt und 14 (88%) dieser 16 Patienten hatten ein Rezidiv innerhalb von fünf Jahren. Bei den 20 molekular negativen Patienten entwickelten nur sechs (30%) ein Rezidiv (Edelstein et al., 1996). Auch in zwei prospektiven Studien konnte gezeigt werden, dass die Detektion von molekular positiven, jedoch histopathologisch negativen Lymphknoten als ein unabhängiger prognostischer Faktor bezüglich eines rezidivfreien Überlebens unter anderem nach radikaler Prostatektomie angesehen werden kann (Ferrari et al., 2006; Miyake et al., 2007).

So nimmt die Bedeutung molekularer Marker in der Diagnostik, Therapie und Nachsorge immer mehr zu (Müller et al., 2003). PSA ist als Protein im Serum zur Primärdiagnostik und Nachsorge beim Prostatakarzinom als spezifischer Marker etabliert (Heidenreich et al., 2012). Das Gen Kallikrein 3, welches das Protein PSA codiert, gehört zur Kallikreinfamilie, welche insgesamt 15 Mitglieder hat. Die Biomarker und therapeutischen Targets der Kallikreinfamilie spielen eine bedeutende Rolle bei Entzündungen, neurodegenerativen Erkrankungen und Krebs (Yoon, Blaber, Li, Scarisbrick, & Blaber, 2013). Die drei auf Chromosom 19 benachbarten Kallikreine 2 – 4 sind gewebespezifisch für die Prostata. Eine starke, gleichzeitige Expression dieser drei Marker lässt eine Veränderung bezüglich der Prostata vermuten (Clements et al., 2001; Obiezu et al., 2002). In allen vorangegangenen Arbeiten zur molekularen RNA-basierten Detektion wurde PSA als spezifischer Marker verwendet (Ferrari et al., 1997; Miyake et al., 2007). Aus diesem Grund wurde es auch in der vorliegenden Arbeit als Standardmarker eingesetzt.

KLK 4 als molekularer Marker in Lymphknoten bei Prostatakarzinom wurde in der Literatur bisher noch nicht beschrieben. Es konnte jedoch mit Hilfe der RT-PCR gezeigt werden, dass KLK4-mRNA-Spiegel im Primärtumor des Prostatakarzinoms deutlich erhöht sind (Day et al., 2002; Obiezu et al., 2002), weshalb das Gen für diese Studie ausgewählt wurde.

In Vorversuchen wurden PSA und KLK 4 auf Sensitivität getestet. Hierzu wurde eine Verdünnungsreihe von 0 Zellen LnCAPs in 10^7 PBMCs angesetzt. Dies wurde dann als

Modell für eine Markerexpression in Lymphknoten verwendet. PSA wurde erst exprimiert, wenn genügend LnCAPs und damit PSA-Kopien zur Verfügung standen. Dies war bei 10 LnCAP-Zellen in 10^7 PBMCs der Fall, was im Vergleich zu bestehenden Veröffentlichungen zur PCR-Methodik auf eine ausreichende Sensitivität hindeutet (Pavlov et al., 2013).

Eine basale Expression von KLK 4 wurde auch in PBMCs festgestellt, was eine eingeschränkte Sensitivität des Markers bedeutet. Ein deutlicher Expressionsanstieg über die Basalexpression von PBMCs war ab einer Konzentration von 100 Zellen LnCAP in 10^7 PBMCs nachweisbar. Ein möglicher Vorteil im Vergleich zu PSA besteht darin, dass nur höhere Konzentrationen an Tumorzellen mit KLK4 nachweisbar sind und somit durch beide Marker unterschiedliche klinische Aussagen in Bezug auf Tumorlast oder Rezidivrate denkbar sind.

5.2.3 Auswahl der Kontrollgruppe

Die Kontrollgruppe bestand aus 25 männlichen Blasen tumorpatienten mit insgesamt 144 Lymphknotenproben. Alle Patienten wurden mittels radikaler Zystoprostatektomie und Lymphadenektomie behandelt. Das Gewebe wurde anschließend histopathologisch aufgearbeitet. So konnte bei allen Patienten der Kontrollgruppe mit Sicherheit ein Prostatakarzinom ausgeschlossen werden und Homogenität der Kontrollgruppe gewährleistet werden. Zusätzlich wurden in der Kontrollgruppe nur histopathologisch negative Lymphknoten und nur solche, welche negativ für Blasen tumor marker Cytokeratin 20 waren, verwendet (Retz et al., 2001; Retz et al., 2011). Damit wurde sichergestellt, dass zur Schwellenwertermittlung für PSA und KLK4 nur tumorfreie Lymphknoten verwendet wurden. Als Grenzwert zur Unterscheidung von molekular positiven und negativen Lymphknoten im Patientenkollektiv wurde der jeweils höchste Wert für PSA und KLK4 an tumorfreien Lymphknoten in der Kontrollgruppe verwendet. Damit liegt die anhand der Kontrollgruppe definierte Spezifität für beide Marker bei 100%.

5.3 Auswertung des Lymphknotengewebes

5.3.1 Allgemeine Auswertung der Lymphknotenproben

Nach einer radikalen Prostatektomie sind Lymphknotenmetastasen die wichtigsten prognostischen Faktoren bezüglich rezidivfreier Überlebensraten (Briganti et al., 2009; Cheng et al., 2001). Basierend auf klinischen Studien werden histopathologische

Lymphknotenmetastasen signifikant häufiger bei einer ausgedehnten Lymphadenektomie entdeckt, als bei einer eingeschränkten (Allaf et al., 2004; Heidenreich, Varga, & Von Knobloch, 2002; Stone, Stock, & Unger, 1997). Bei 58 – 63% der PCa Patienten sind die Metastasen außerhalb des Standardfeldes lokalisiert (Bader P Fau - Burkhard et al.; Weckermann et al., 2007). Im Gegensatz zu einer eingeschränkten Lymphadenektomie scheint es, dass bei der ausgedehnten Lymphadenektomie mehr Patienten mit positivem Nodalstatus identifiziert werden. Allaf et al. konnten im Rahmen einer retrospektiven Studie einen signifikanten Vorteil bezüglich eines biochemisch rezidivfreien Überlebens nach ausgedehnter Lymphadenektomie nachweisen (Allaf et al., 2004). Schiavina et al. zeigte, dass Patienten ohne nachgewiesene pathologische Metastasen bezüglich der rezidivfreien Überlebensrate profitierten, je mehr Lymphknoten entfernt werden. Dies könnte daran liegen, dass Metastasen entfernt wurden, die histopathologisch nicht detektiert wurden (Schiavina et al., 2010). Diese Studien unterstreichen, dass nur eine ausgedehnte Lymphadenektomie die Lymphabflussgebiete des PCa respektiert.

Weiter wurde in einem Review von Heidenreich et al. der Zusammenhang zwischen der D'Amico Risikoklassifizierung und dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen verdeutlicht. Bei niedrigem, mittlerem bzw. hohem Risiko können demnach in 5 – 6%, 20 – 25% bzw. 30 – 40% der Fälle Lymphknotenmetastasen detektiert werden (Heidenreich et al., 2007). Da das Risiko für eine Metastasierung in der Niedrigrisikogruppe gering ist, kann laut europäischer Leitlinie für Urologie auf eine ausgedehnte Lymphadenektomie verzichtet werden. Die Indikation für eine ausgedehnte Lymphadenektomie besteht bei intermediärem und Hochrisiko-PCa (Heidenreich et al., 2012).

Diese Arbeit beschäftigt sich erneut mit dem Thema der ausgedehnten Lymphadenektomie und der Detektion von Lymphknotenmetastasen beim Prostatakarzinom. Augenmerk liegt hierbei nicht nur auf der Anzahl der histopathologischen Metastasen, sondern auch auf der Anzahl der detektierten molekularen Metastasen. Zudem wird untersucht, ob und wie weit eine Korrelation besteht und ob die molekulare Untersuchung wirklich die sensitivere Methode ist.

Ausgewertet wurden die Lymphknoten aus acht vordefinierten Regionen. Jede Probe konnte genau einer Region und einem histopathologischen Ergebnis zugeordnet werden. Ein Problem war jedoch, dass bei immerhin 13% der Patienten weniger als 8 Regionen entfernt werden konnten. Dies betraf in allen Fällen die Regionen 1 – 4. Allerdings

wurden insgesamt 659 von 672 möglichen Feldern reseziert, was 98% entspricht. Daher kann die Lymphadenektomie als repräsentativ erachtet werden.

Patienten dieser Studie hatten alle ein Prostatakarzinom entweder vom intermediären oder vom Hochrisikotyp. Durch diese Auswahl hatten alle Patienten ein ähnliches klinisches Risikoprofil bezüglich einer Metastasierung. Insgesamt wurden 84 Patienten in diese Studie eingeschlossen. Es wurden im Durchschnitt pro Patient 27,9 Lymphknoten entfernt. Dies entspricht den derzeitigen Empfehlungen bei einer Lymphadenektomie mindestens zehn Lymphknoten zu entfernen (Allaf et al., 2004; Deutsche Gesellschaft Urologie, 2009; Joslyn & Konety, 2006). Eine Autopsie-Studie von Weingärtner et al. empfiehlt die Entfernung von mind. 20 Lymphknoten pro Patient, um repräsentative Ergebnisse zu erhalten (Weingärtner et al., 1996).

Betrachtet man nur die histopathologische Auswertung, so sind 76,2% der Patienten und 96,9% der Lymphknoten nodalnegativ und 23,8% der Patienten und 3,1% der Lymphknoten nodalpositiv (s. Abb. 11). Die Auswertung der molekularen Untersuchung bestärkt die höhere Sensitivität der qRT-PCR gegenüber der standardhistopathologischen Untersuchung, da durch diese mehr positive Patienten und Lymphknoten gefunden werden können. Durch den Einsatz der molekularen Lymphknotenuntersuchung mittels PSA konnten 33 (38,8%) Patienten und 239 (12,9%) Lymphknoten zusätzlich zu den histopathologisch positiven als Lymphknotenmetastasen-positiv identifiziert werden (pN0/molN1) (s. Abb. 13). Durch den Einsatz von KLK 4 konnten zusätzlich 39 (45,9%) Patienten und 231 (12,5%) Lymphknoten als Lymphknotenmetastasen-positiv identifiziert werden (pN0/molN1) (s. Abb. 14). Bezüglich der histopathologisch positiven Patienten waren von den 20 detektierten Patienten alle molekular positiv bezüglich des Markers PSA. Von den 57 histopathologisch positiven Lymphknoten waren 53 (93%) Lymphknoten PSA-molekular positiv (pN1/molN1). 19 (95%) der 20 histopathologisch positiven Patienten und 49 (86%) der 57 histopathologisch positiven Lymphknoten waren molekular positiv (pN1/molN1) bezüglich des Markers KLK4. Diese Ergebnisse bestärken wiederum die Sensitivität des Vorgehens. Dass nicht alle histopathologisch positiven Lymphknoten als molekular positiv bestätigt wurden, kann durch die Teilung der Lymphknoten erklärt werden. Metastasen die nur in der einen Hälfte des Lymphknotens sitzen können nur von der Methode detektiert werden, die genau diese Hälfte des Lymphknotens untersucht. Dies gilt sowohl für Lymphknoten die als pN1/molN0 klassifiziert wurden, als auch für Lymphknoten, die als pN0/molN1 ausgewertet wurden.

Jeder Lymphknoten wurde mit beiden Biomarkern PSA und KLK4 untersucht (pN0/molN1, pN1/molN1). 44 (66,7%) Patienten und 135 (30,8%) Lymphknoten zeigten sowohl eine erhöhte Expression für PSA als auch für KLK4. Durch die Kombination der beiden Marker erhöhte sich die Sensitivität und es konnten zusätzlich 22 (33%) Patienten und 303 (69%) Lymphknoten als molekular positiv identifiziert werden. Somit waren insgesamt 66 (78,6% der Gesamtpatienten) Patienten und 438 (23,9% der Gesamtlymphknoten) Lymphknoten für mindestens einen der beiden Marker positiv (s. Abb. 15).

Bei den 20 Patienten die sowohl histopathologisch als auch molekular positiv waren (pN1/molN1), betrug der Durchschnitt der molekularen Metastasen 10,7 Lymphknoten pro Patient, während bei den ausschließlich molekularen Patienten (pN0/molN1) der Durchschnitt 4,9 Lymphknoten pro Patient war. Daraus lässt sich schließen, dass eine geringere Metastasierung bei ausschließlich molekular-positiven Patienten vorliegt.

Insgesamt konnten durch den Einsatz der qRT-PCR 46 (54%) Patienten und 384 (21%) Lymphknoten detektiert werden, die eine erhöhte Expression für PSA und/oder KLK4 zeigten, aber histopathologisch negativ waren (pN0/molN1) (s. Abb. 17). Nimmt man nun auch die 20 histopathologisch positiven Patienten und deren Lymphknoten hinzu, so waren 66 (78,6%) Patienten und 438 (23,9%) Lymphknoten molekular positiv (pN0/molN1 und pN1/molN1). In dieser Gruppe waren 44 Patienten (66,7%) und 135 (30,8%) sowohl für PSA als auch für KLK4 positiv. 9 (13,6%) Patienten und 157 (35,8%) Lymphknoten zeigten eine alleinige PSA Expression. Für KLK4 waren es 13 (19,7%) Patienten und 146 (33,3%) Lymphknoten. Durch den zusätzlichen Einsatz von KLK4 zu PSA konnten also knapp 20% mehr Patienten und ein Drittel mehr Lymphknoten als molekular positiv entdeckt werden, wodurch wiederum eine höhere Sensitivität gewährleistet wird. Desweiteren ist es denkbar, dass sich die Prognoseeinschätzung und die Nachsorge durch den routinemäßigen Einsatz von molekularen Zusatzuntersuchungen im Allgemeinen und durch den Einsatz von KLK4 im Speziellen verbessert.

Ein Nachteil der qRT-PCR ist es, dass zwischen disseminierten Tumorzellen (DTC), die in Lymphknoten sitzen, und zirkulierenden Tumorzellen (CTC), welche sich zufällig zum Zeitpunkt der Entnahme in Lymphknotengefäßen befanden und detektiert wurden, nicht unterschieden werden kann. Gegen eine zufällige Detektion von CTCs sprechen jedoch die hohe Übereinstimmung von histopathologischen Metastasen und molekularen Metastasen in den Lymphknotenproben. Weiterhin kann mittels molekularer Diagnostik

im Gegensatz zur Histopathologie keine Aussage über die Größe der Lymphknotenmetastase getroffen werden, was ein Vorteil der Histopathologie ist. Der Nachteil der Histopathologie wird darin deutlich, dass durch den Einsatz der molekularen Lymphknotendiagnostik 20% mehr Patienten und ein Drittel mehr Lymphknoten als positiv detektiert werden können. Mögliche Verbesserungen der Histopathologie wurden bereits in der Methodenkritik diskutiert.

5.3.2 Topographische Auswertung

Nach der im Rahmen dieser Arbeit getätigten Recherche des Stands der Technik ist die vorliegende Arbeit die Erste, die eine molekulare Diagnostik zur Detektion von Lymphknotenmetastasen bei PCa-Patienten nach radikaler Prostataektomie und ausgedehnter Lymphadenektomie angewendet hat, um eine exakte Topographie der Lymphknotenmetastasen zu ermitteln.

Alle Lymphknoten wurden mittels einer vorher festgelegten, ausgedehnten und standardisierten Lymphadenektomie entnommen und ausgewertet. Im Standardfeld befanden sich 1310 (71,6%) Lymphknoten. Die Erweiterung um die Dissektion von Aa. iliaca interna und Aa. iliaca communes brachte einen Gewinn von 519 (28,4%) Lymphknoten (s. Abb. 18).

Mittels PSA wurden um die Aa. iliaca interna und Aa. iliaca communes 68 (28,4%) molekular positive Lymphknoten entdeckt (s. Abb. 20), mittels KLK4 71 (30,7%) Lymphknoten (s. Abb. 21). Durch die Kombination der beiden Marker wurden außerhalb des Standardfeldes 115 (30%) positive Lymphknoten mit molekularen Metastasen (pN0/molN1) entdeckt. Diese wären ohne eine ausgedehnte Lymphadenektomie in situ belassen worden (s. Abb. 22).

Die 57 histopathologisch positiven Lymphknoten (pN1/molN1) der 20 Patienten waren folgendermaßen verteilt: 39 (68,4%) Lymphknotenmetastasen befanden sich im Standardfeld. 18 (31,6%) Lymphknotenmetastasen waren außerhalb dieser Regionen, je 9 (15,8%) Lymphknotenmetastasen um die Aa. iliaca interna und communes. Diese wären bei einer Standardlymphadenektomie in situ belassen worden (s. Abb. 19).

Insgesamt wurden 84 Patienten in die Studie einbezogen, von denen 20 histopathologisch positiv waren (pN1/molN1 und/oder pN1/molN0). Bei 10 (50%) Patienten fanden sich histopathologische Metastasen außerhalb des Standardfeldes, wobei bei jeweils 6 (30%) Patienten Lymphknoten entlang der A. iliaca interna und der A. iliaca communis betroffen waren. Bei 18 (90%) Patienten befanden sich Lymphknotenmetastasen im

Standardfeld, jedoch nur bei 10 (50%) Patienten ausschließlich in diesem. Das heißt, wäre nur das Standardfeld entfernt worden, so wären 8 (55%) Patienten zwar richtigerweise als pN1 klassifiziert worden, jedoch wären histopathologische Lymphknotenmetastasen in situ belassen worden. Bei 2 (10%) Patienten waren die Metastasen sogar ausschließlich außerhalb des Standardfeldes um die Aa. iliaca communes lokalisiert. Diese Patienten wären fälschlicherweise als pN0 klassifiziert worden (s. Tab. 6).

Betrachtet man die Patienten mit ausschließlich molekularen Metastasen (pN0/molN1) bezogen auf alle 84 Patienten, so kann folgende Aussage getroffen werden: Bei exklusiver Betrachtung des Standardfeldes wären bei 32 (38%) Patienten molekulare Metastasen in situ belassen worden. Nämlich bei 23 (27%) Patienten entlang der Aa. iliaca communes und bei 9 (11%) entlang der Aa. iliaca internae. Nur bei 14 (17%) Patienten befanden sich die molekularen Metastasen ausschließlich im Standardlymphadenektomiefeld. 6 (7%) der Patienten wären sogar fälschlicherweise als molekular negativ klassifiziert worden. Molekular positive Lymphknoten waren hier bei 2 (2%) Patienten um die A. iliaca communis und bei 2 (2%) Patienten um die A. iliaca interna (s. Tab. 6).

Bezieht man nun alle Patienten mit histopathologisch und/oder molekular positiven (pN0/molN1, pN1/molN0, pN1/molN1) Lymphknoten auf die 84 Patienten erhält man Folgendes:

Bei 46 (55%) Patienten wären positive Lymphknoten bei alleiniger Entnahme aus dem Standardfeld in situ belassen worden, bei je 33 (39%) Patienten um die Aa. iliaca communes und Aa. iliaca internae. Nur 20 (24%) Patienten wären mit einer alleinigen Standardlymphadenektomie richtig behandelt worden, im Sinne einer Entnahme aller positiven Lymphknoten. Bei 7 (8%) Patienten befanden sich positive Lymphknoten ausschließlich außerhalb des Standardfeldes, davon bei 2 (2%) um die Aa. iliaca internae und bei 5 (6%) um die Aa. iliaca communes. Bei diesen Patienten wären nicht nur positive Lymphknoten in situ belassen worden, sondern sie wären fälschlicherweise als histopathologisch bzw. molekular negativ klassifiziert worden (s. Tab. 6).

In vorliegender Studie haben beide Methoden unabhängig voneinander das Auftreten von Metastasen entlang der Aa. iliaca internae und Aa. iliaca communes bei einem relevanten Anteil von Patienten gezeigt.

Basierend auf diesen Ergebnissen, schlagen wir vor, die Iliakalgefäße bis zur Aortenbifurkation in das ausgedehnte Feld der Lymphadenektomie aufzunehmen, um das

Lymphknotenstaging zu optimieren und Lymphknoten mit potentiellen Metastasen zu entfernen.

Eine prospektive, randomisierte, multizentrische Studie von der Deutschen Gesellschaft für urogenitale Onkologie (AUO) wurde bereits initiiert (SEAL-Studie). Diese soll zeigen, ob es einen Benefit bei ausgedehnter Lymphadenektomie im Vergleich zur eingeschränkten Lymphadenektomie in Bezug auf das PSA-rezidivfreie Überleben gibt. Die Ergebnisse werden in den nächsten Jahren erwartet (AUO, 2012).

6 Zusammenfassung

Als erstes ist zu erwähnen, dass sich die qRT-PCR als eine zuverlässige Methode erwiesen hat, um molekulare Metastasen in Lymphknoten bei PCa-Patienten zu detektieren. PSA und KLK4 stellen geeignete Biomarker dar, die in der qRT-PCR zu diesen Zwecken eingesetzt werden können.

Weiterhin konnten die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass bei der ausgedehnten Lymphadenektomie die Entnahme von Lymphknoten bis zur Aortenbifurkation erforderlich ist um ein das Lymphknotenstaging zu optimieren und relevante Lymphknotenmetastasen zu entfernen.

Um die klinischen Auswirkungen von molekularen Metastasen durch eine ausgedehnte Lymphadenektomie und deren Auswirkungen auf die Rezidivrate und das Überleben bei PCa-Patienten zu bestimmen, ist zum einen ein größeres Patientenkollektiv sinnvoll und zum anderen ist eine längere Nachbeobachtungszeit notwendig. Dies ist zum jetzigen Zeitpunkt noch ausstehend und erfordert weitergehende Forschung.

7 Literaturverzeichnis

- Adolfsson, J. (2008). Watchful waiting and active surveillance: the current position. *BJU Int*, 102(1), 10-14. doi: 10.1111/j.1464-410X.2008.07585.x
- Albertsen, P. C., Moore, D. F., Shih, W., Lin, Y., Li, H., & Lu-Yao, G. L. (2011). Impact of comorbidity on survival among men with localized prostate cancer. *J Clin Oncol*, 29(10), 1335-1341. doi: 10.1200/JCO.2010.31.2330
- Allaf, M. E., Palapattu, G. S., Trock, B. J., Carter, H. B., & Walsh, P. C. (2004). Anatomical extent of lymph node dissection: impact on men with clinically localized prostate cancer. *J Urol*, 172(5 Pt 1), 1840-1844.
- Andriole, G. L., Crawford, E. D., Grubb, R. L., 3rd, Buys, S. S., Chia, D., Church, T. R., Fouad, M. N., Gelmann, E. P., Kvale, P. A., Reding, D. J., Weissfeld, J. L., Yokochi, L. A., O'Brien, B., Clapp, J. D., Rathmell, J. M., Riley, T. L., Hayes, R. B., Kramer, B. S., Izmirlian, G., Miller, A. B., Pinsky, P. F., Prorok, P. C. Gohagan, J. K., Berg, C. D., Team, Plco Project. (2009). Mortality results from a randomized prostate-cancer screening trial. *N Engl J Med*, 360(13), 1310-1319. doi: 10.1056/NEJMoa0810696
- Apolo, A. B., Pandit-Taskar, N., & Morris, M. J. (2008). Novel tracers and their development for the imaging of metastatic prostate cancer. *J Nucl Med*, 49(12), 2031-2041. doi: 10.2967/jnumed.108.050658
- AUO, Deutsche Gesellschaft für urogenitale Onkologie. (2012). Prospective Study to Compare a Limited Versus Extended Pelvic Lymphadenectomy During Prostatectomy (SEAL). Retrieved 21.01.2013, from <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT01555086>
- Avgeris, M., Stravodimos, K., & Scorilas, A. (2011). Kallikrein-related peptidase 4 gene (KLK4) in prostate tumors: quantitative expression analysis and evaluation of its clinical significance. *Prostate*, 71(16), 1780-1789. doi: 10.1002/pros.21395
- Bader P Fau - Burkhard, Fiona C., Burkhard Fc Fau - Markwalder, Regula, Markwalder R Fau - Studer, Urs E., & Studer, U. E. Is a limited lymph node dissection an adequate staging procedure for prostate cancer? (0022-5347 (Print)).
- Balic, M., Williams, A., Dandachi, N., & Cote, R. J. (2010). Micrometastasis: detection methods and clinical importance. *Cancer Biomark*, 9(1-6), 397-419. doi: 10.3233/CBM-2011-0161
- Bianco, F. J., Jr., Scardino, P. T., & Eastham, J. A. (2005). Radical prostatectomy: long-term cancer control and recovery of sexual and urinary function ("trifecta"). *Urology*, 66(5 Suppl), 83-94. doi: 10.1016/j.urology.2005.06.116

- Bilchik, A. J., Hoon, D. S., Saha, S., Turner, R. R., Wiese, D., DiNome, M., Koyanagi, K., McCarter, M., Shen, P., Iddings, D. Chen, S. L., Gonzalez, M., Elashoff, D., Morton, D. L. (2007). Prognostic impact of micrometastases in colon cancer: interim results of a prospective multicenter trial. *Ann Surg*, 246(4), 568-575; discussion 575-567. doi: 10.1097/SLA.0b013e318155a9c7
- Bolla, M., de Reijke, T. M., Van Tienhoven, G., Van den Bergh, A. C., Oddens, J., Poortmans, P. M., Gez, E., Kil, P., Akdas, A., Soete, G., Kariakine, O., van der Steen-Banasik, E. M., Musat, E., Pierart, M., Mauer, M. E., Colette, L., Eortc Radiation Oncology Group, Genito-Urinary Tract Cancer, Group. (2009). Duration of androgen suppression in the treatment of prostate cancer. *N Engl J Med*, 360(24), 2516-2527. doi: 10.1056/NEJMoa0810095
- Borgermann, C., Loertzer, H., Hammerer, P., Fornara, P., Graefen, M., & Rubben, H. (2010). [Problems, objective, and substance of early detection of prostate cancer]. *Urologe A*, 49(2), 181-189. doi: 10.1007/s00120-010-2234-7
- Branagan, G., Hughes, D., Jeffrey, M., Crane-Robinson, C., & Perry, P. M. (2002). Detection of micrometastases in lymph nodes from patients with breast cancer. *Br J Surg*, 89(1), 86-89. doi: 10.1046/j.0007-1323.2001.01970.x
- Bratt, O. (2002). Hereditary prostate cancer: clinical aspects. *J Urol*, 168(3), 906-913. doi: 10.1097/01.ju.0000024402.67529.ca
- Briganti, A., Karnes, J. R., Da Pozzo, L. F., Cozzarini, C., Gallina, A., Suardi, N., Bianchi, M., Freschi, M., Doglioni, C., Fazio, F., Rigatti, P., Montorsi, F., Blute, M. L. (2009). 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*, 55(2), 261-270. doi: 10.1016/j.eururo.2008.09.043
- Briganti, A., Larcher, A., Abdollah, F., Capitanio, U., Gallina, A., Suardi, N., Bianchi, M., Sun, M., Freschi, M., Salonia, A., Karakiewicz, P. I., Rigatti, P., Montorsi, F. (2012). 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*, 61(3), 480-487. doi: 10.1016/j.eururo.2011.10.044
- Brownie, J., Shawcross, S., Theaker, J., Whitcombe, D., Ferrie, R., Newton, C., & Little, S. (1997). The elimination of primer-dimer accumulation in PCR. *Nucleic Acids Res*, 25(16), 3235-3241.
- Cagiannos, I., Karakiewicz, P., Eastham, J. A., Ohori, M., Rabbani, F., Gerigk, C., Reuter, V., Graefen, M., Hammerer, P. G., Erbersdobler, A., Huland, H., Kupelian, P., Klein, E., Quinn, D. I., Henshall, S. M., Grygiel, J. J., Sutherland, R. L., Stricker, P. D., Morash, C. G., Scardino, P. T., Kattan, M. W. (2003). A preoperative nomogram identifying decreased risk of positive pelvic lymph nodes

in patients with prostate cancer. *J Urol*, 170(5), 1798-1803. doi: 10.1097/01.ju.0000091805.98960.13

- Carter, B. S., Beaty, T. H., Steinberg, G. D., Childs, B., & Walsh, P. C. (1992). Mendelian inheritance of familial prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(8), 3367-3371.
- Catalona, W. J., & Smith, D. S. (1998). Cancer recurrence and survival rates after anatomic radical retropubic prostatectomy for prostate cancer: intermediate-term results. *J Urol*, 160(6 Pt 2), 2428-2434.
- Cheng, L., Zincke, H., Blute, M. L., Bergstralh, E. J., Scherer, B., & Bostwick, D. G. (2001). Risk of prostate carcinoma death in patients with lymph node metastasis. *Cancer*, 91(1), 66-73.
- Clements, J., Hooper, J., Dong, Y., & Harvey, T. (2001). The expanded human kallikrein (KLK) gene family: genomic organisation, tissue-specific expression and potential functions. *Biol Chem*, 382(1), 5-14. doi: 10.1515/BC.2001.002
- Coelho, R. F., Rocco, B., Patel, M. B., Orvieto, M. A., Chauhan, S., Ficarra, V., Melegari, S., Palmer, K. J., Patel, V. R. (2010). Retropubic, laparoscopic, and robot-assisted radical prostatectomy: a critical review of outcomes reported by high-volume centers. *J Endourol*, 24(12), 2003-2015. doi: 10.1089/end.2010.0295
- D'Amico, A. V., Whittington, R., Malkowicz, S. B., Schultz, D., Blank, K., Broderick, G. A., Tomaszewski, J. E., Renshaw, A. A., Kaplan, I., Beard, C. J., Wein, A. (1998). Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer. *JAMA*, 280(11), 969-974.
- Day, C. H., Fanger, G. R., Retter, M. W., Hylander, B. L., Penetrante, R. B., Houghton, R. L., Zhang, X., McNeill, P. D., Filho, A. M., Nolasco, M., Badaro, R., Cheever, M. A., Reed, S. G., Dillon, D. C., Watanabe, Y. (2002). Characterization of KLK4 expression and detection of KLK4-specific antibody in prostate cancer patient sera. *Oncogene*, 21(46), 7114-7120. doi: 10.1038/sj.onc.1205786
- Denninghoff, V. C., Falco, J., Kahn, A. G., Troughot, V., Curutchet, H. P., & Elsner, B. (2008). Sentinel node in melanoma patients: triple negativity with routine techniques and PCR as positive prognostic factor for survival. *Mod Pathol*, 21(4), 438-444. doi: 10.1038/modpathol.3801020
- Deutsche Gesellschaft Urologie, e.V. (2009). Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms. *I.01*, 1- 694.
- Deutsche Krebshilfe, e.V. (2011). Prostatakrebs. *Deutsche Krebshilfe Helfen. Forschen. Informieren*, 17(7), 61.

- DGHO, Deutsche Gesellschaft für Onkologie und Hämatologie. (2011). Prostatakrebs. from [http://www.dgho-onkopedia.de/de/mein-onkopedia/leitlinien/prostatakrebs-prostatakarzinom/index_html - krankheitszeichen](http://www.dgho-onkopedia.de/de/mein-onkopedia/leitlinien/prostatakrebs-prostatakarzinom/index_html-krankheitszeichen)
- DiMarco, D. S., Zincke, H., Sebo, T. J., Slezak, J., Bergstralh, E. J., & Blute, M. L. (2005). The extent of lymphadenectomy for pTXNO prostate cancer does not affect prostate cancer outcome in the prostate specific antigen era. *J Urol*, *173*(4), 1121-1125. doi: 10.1097/01.ju.0000155533.93528.4c
- Dong, Y., Bui, L. T., Odorico, D. M., Tan, O. L., Myers, S. A., Samaratunga, H., Gardiner, R. A., Clements, J. A. (2005). Compartmentalized expression of kallikrein 4 (KLK4/hK4) isoforms in prostate cancer: nuclear, cytoplasmic and secreted forms. *Endocr Relat Cancer*, *12*(4), 875-889. doi: 10.1677/erc.1.01062
- Droz, J. P., Balducci, L., Bolla, M., Emberton, M., Fitzpatrick, J. M., Joniau, S., Kattan, M. W., Monfardini, S., Moul, J. W., Naeim, A., van Poppel, H., Saad, F., Sternberg, C. N. (2010). Background for the proposal of SIOG guidelines for the management of prostate cancer in senior adults. *Crit Rev Oncol Hematol*, *73*(1), 68-91. doi: 10.1016/j.critrevonc.2009.09.005
- Eastham Ja, Riedel E. Scardino P. T., & et al. (2003). Variation of serum prostate-specific antigen levels: An evaluation of year-to-year fluctuations. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, *289*(20), 2695-2700. doi: 10.1001/jama.289.20.2695
- Edelstein, R. A., Zietman, A. L., de las Morenas, A., Krane, R. J., Babayan, R. K., Dallow, K. C., Traish, A., Moreland, R. B. (1996). Implications of prostate micrometastases in pelvic lymph nodes: an archival tissue study. *Urology*, *47*(3), 370-375. doi: 10.1016/S0090-4295(99)80455-5
- Epstein, J. I., Allsbrook, W. C., Jr., Amin, M. B., Egevad, L. L., & Committee, Isup Grading. (2005). The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. *Am J Surg Pathol*, *29*(9), 1228-1242.
- Epstein, J. I., Pizov, G., & Walsh, P. C. (1993). Correlation of pathologic findings with progression after radical retropubic prostatectomy. *Cancer*, *71*(11), 3582-3593.
- Ferrari, A. C., Stone, N. N., Eyler, J. N., Gao, M., Mandeli, J., Unger, P., Gallagher, R.E., Stock, R. (1997). Prospective analysis of prostate-specific markers in pelvic lymph nodes of patients with high-risk prostate cancer. *J Natl Cancer Inst*, *89*(20), 1498-1504.
- Ferrari, A. C., Stone, N. N., Kurek, R., Mulligan, E., McGregor, R., Stock, R., Unger, P., Kaisary, A., Droller, M., Hall, S., Renneberg, H., Livak, K. J., Gallagher, R., E., Mandeli, J. (2006). 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*, 24(19), 3081-3088. doi: 10.1200/JCO.2005.03.6020
- Ficarra, V., Novara, G., Artibani, W., Cestari, A., Galfano, A., Graefen, M., Guazzoni, G., Guillonnet, B., Menon, M., Montorsi, F., Patel, V., Rasseweiler, J., Van Poppel, H. (2009). Retropubic, laparoscopic, and robot-assisted radical prostatectomy: a systematic review and cumulative analysis of comparative studies. *Eur Urol*, 55(5), 1037-1063. doi: 10.1016/j.eururo.2009.01.036
- Fowler, F. J., Jr., Barry, M. J., Lu-Yao, G., Wasson, J. H., & Bin, L. (1996). Outcomes of external-beam radiation therapy for prostate cancer: a study of Medicare beneficiaries in three surveillance, epidemiology, and end results areas. *J Clin Oncol*, 14(8), 2258-2265.
- Ghossein, R. A., & Bhattacharya, S. (2000). Molecular detection and characterisation of circulating tumour cells and micrometastases in solid tumours. *Eur J Cancer*, 36(13 Spec No), 1681-1694.
- Gil-Vernet, J. M. (1996). Prostate cancer: anatomical and surgical considerations. *Br J Urol*, 78(2), 161-168.
- Gontero, P., & Kirby, R. S. (2005). Nerve-sparing radical retropubic prostatectomy: techniques and clinical considerations. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 8(2), 133-139. doi: 10.1038/sj.pcan.4500781
- Gordanpour, A., Nam, R. K., Sugar, L., Bacopulos, S., & Seth, A. (2012). MicroRNA detection in prostate tumors by quantitative real-time PCR (qPCR). *J Vis Exp*(63), e3874. doi: 10.3791/3874
- Gronberg, H., Damber, L., & Damber, J. E. (1996). Familial prostate cancer in Sweden. A nationwide register cohort study. *Cancer*, 77(1), 138-143. doi: 10.1002/(SICI)1097-0142(19960101)77:1<138::AID-CNCR23>3.0.CO;2-5
- Hanna, N. (1982). Role of natural killer cells in control of cancer metastasis. *Cancer Metastasis Rev*, 1(1), 45-64.
- Heck, M. M., Kron, M., Gschwend, J. E., & Herkommer, K. (2012). Effect of family history on outcome in German patients treated with radical prostatectomy for clinically localised prostate cancer. *Eur J Cancer*, 48(9), 1312-1317. doi: 10.1016/j.ejca.2011.10.002
- Heidenreich, A., Bastian, P.J., Bellmunt, J., Bolla, M., Joniau, S., Mason, M.D., Mateveev, V., Mottet, N., van der Kwast, T. H., Wiegelt, T., Zattoni, F. (2012). Guidelines on Prostate Cancer. 132-295.
- Heidenreich, A., Ohlmann, C. H., & Polyakov, S. (2007). Anatomical extent of pelvic lymphadenectomy in patients undergoing radical prostatectomy. *Eur Urol*, 52(1), 29-37. doi: 10.1016/j.eururo.2007.04.020

- Heidenreich, A., Varga, Z., & Von Knobloch, R. (2002). Extended pelvic lymphadenectomy in patients undergoing radical prostatectomy: high incidence of lymph node metastasis. *J Urol*, *167*(4), 1681-1686.
- Holzapfel, Bianca, & Wickert, Lucia. (2007). Methoden und Anwendungsgebiete Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). *Biologie in unserer Zeit*, *37*(2), 120-126. doi: 10.1002
- Hsing, A. W., Tsao, L., & Devesa, S. S. (2000). International trends and patterns of prostate cancer incidence and mortality. *Int J Cancer*, *85*(1), 60-67.
- Hull, G. W., Rabbani, F., Abbas, F., Wheeler, T. M., Kattan, M. W., & Scardino, P. T. (2002). Cancer control with radical prostatectomy alone in 1,000 consecutive patients. *J Urol*, *167*(2 Pt 1), 528-534.
- Ikeda, S., Funakoshi, N., Usui, S., Takiguchi, N., Hiranuma, S., & Shibata, T. (2008). Prognostic significance of gastric cancer metastasis in second-tier lymph nodes detected on reverse transcriptase-polymerase chain reaction and immunohistochemistry. *Pathol Int*, *58*(1), 45-50. doi: 10.1111/j.1440-1827.2007.02187.x
- Joslyn, S. A., & Konety, B. R. (2006). Impact of extent of lymphadenectomy on survival after radical prostatectomy for prostate cancer. *Urology*, *68*(1), 121-125. doi: 10.1016/j.urology.2006.01.055
- Kang, D. C., Hardee, M. J., Fesperman, S. F., Stoffs, T. L., & Dahm, P. (2010). Low quality of evidence for robot-assisted laparoscopic prostatectomy: results of a systematic review of the published literature. *Eur Urol*, *57*(6), 930-937. doi: 10.1016/j.eururo.2010.01.034
- Klotz, L. (2005). Active surveillance for prostate cancer: for whom? *J Clin Oncol*, *23*(32), 8165-8169. doi: 10.1200/JCO.2005.03.3134
- Korkmaz, K. S., Korkmaz, C. G., Pretlow, T. G., & Saatcioglu, F. (2001). Distinctly different gene structure of KLK4/KLK-L1/prostase/ARM1 compared with other members of the kallikrein family: intracellular localization, alternative cDNA forms, and Regulation by multiple hormones. *DNA Cell Biol*, *20*(7), 435-445. doi: 10.1089/104454901750361497
- Liefers, G. J., Cleton-Jansen, A. M., van de Velde, C. J., Hermans, J., van Krieken, J. H., Cornelisse, C. J., & Tollenaar, R. A. (1998). Micrometastases and survival in stage II colorectal cancer. *N Engl J Med*, *339*(4), 223-228. doi: 10.1056/NEJM199807233390403
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C(T)$) Method. *Methods*, *25*(4), 402-408. doi: 10.1006/meth.2001.1262

- Luzzi, K. J., MacDonald, I. C., Schmidt, E. E., Kerkvliet, N., Morris, V. L., Chambers, A. F., & Groom, A. C. (1998). Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *Am J Pathol*, *153*(3), 865-873. doi: 10.1016/S0002-9440(10)65628-3
- Madersbacher, S., & Studer, U.E. (2002). Prostatakarzinom. *Schweiz Med Forum*(46), 1096-1100.
- Majeed, F. A., & Burgess, N. A. (1994). Trends in death rates and registration rates for prostate cancer in England and Wales. *Br J Urol*, *73*(4), 377-381.
- Memmlaar, J. (1949). Total prostatovesiculectomy; retropubic approach. *J Urol*, *62*(3), 340-348.
- Meng, S., Tripathy, D., Frenkel, E. P., Shete, S., Naftalis, E. Z., Huth, J. F., Beitsch, P. D., Leitch, M., Hoover, S., Euhus, D., Haley, B., Morrison, L., Fleming, T. P., Herlyn, D., Terstappen, L. W., Fehm, T., Tucker, T. F., Lane, N., Wang, J., Uhr, J. W. (2004). Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy. *Clin Cancer Res*, *10*(24), 8152-8162. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-1110
- Mercer, S. L., Goel, V., Levy, I. G., Ashbury, F. D., Iverson, D. C., & Iscoe, N. A. (1997). Prostate cancer screening in the midst of controversy: Canadian men's knowledge, beliefs, utilization, and future intentions. *Can J Public Health*, *88*(5), 327-332.
- Miyake, H., Hara, I., Kurahashi, T., Inoue, T. A., Eto, H., & Fujisawa, M. (2007). Quantitative detection of micrometastases in pelvic lymph nodes in patients with clinically localized prostate cancer by real-time reverse transcriptase-PCR. *Clin Cancer Res*, *13*(4), 1192-1197. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-2706
- Müller, M., Goessl, C., Krause, H., & Miller, K. (2003). Molekulare Diagnostik in der urologischen Onkologie. *Der Urologe, Ausgabe A*, *42*(5), 660-668. doi: 10.1007/s00120-003-0350-3
- Nelson, P. S., Gan, L., Ferguson, C., Moss, P., Gelinas, R., Hood, L., & Wang, K. (1999). Molecular cloning and characterization of prostase, an androgen-regulated serine protease with prostate-restricted expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *96*(6), 3114-3119.
- Nelson, W. G., De Marzo, A. M., & Isaacs, W. B. (2003). Prostate cancer. *N Engl J Med*, *349*(4), 366-381. doi: 10.1056/NEJMra021562
- Obiezu, C. V., Soosaipillai, A., Jung, K., Stephan, C., Scorilas, A., Howarth, D. H., & Diamandis, E. P. (2002). Detection of human kallikrein 4 in healthy and cancerous prostatic tissues by immunofluorometry and immunohistochemistry. *Clin Chem*, *48*(8), 1232-1240.

- Pantel, K., Cote, R. J., & Fodstad, O. (1999). Detection and clinical importance of micrometastatic disease. *J Natl Cancer Inst*, 91(13), 1113-1124.
- Park, B. H., Jeon, H. G., Jeong, B. C., Seo, S. I., Lee, H. M., Choi, H. Y., & Jeon, S. S. (2014). Influence of magnetic resonance imaging in the decision to preserve or resect neurovascular bundles at robotic assisted laparoscopic radical prostatectomy. *J Urol*, 192(1), 82-88. doi: 10.1016/j.juro.2014.01.005
- Parkin, D. M., Bray, F. I., & Devesa, S. S. (2001). Cancer burden in the year 2000. The global picture. *Eur J Cancer*, 37 Suppl 8, S4-66.
- Partin, A. W., Yoo, J., Carter, H. B., Pearson, J. D., Chan, D. W., Epstein, J. I., & Walsh, P. C. (1993). The use of prostate specific antigen, clinical stage and Gleason score to predict pathological stage in men with localized prostate cancer. *J Urol*, 150(1), 110-114.
- Paulsen, F., Belka, C., Alber, M., Budach, W., & Bamberg, M. (2003). Intensitätsmodulierte Strahlentherapie. *Der Onkologe*, 9(3), 315-327. doi: 10.1007/s00761-003-0495-0
- Pavlov, K. A., Shkoporov, A. N., Khokhlova, E. V., Korchagina, A. A., Sidorenkov, A. V., Grigor'ev, M. E., Pushkar' Dlu, Chekhonin, V. P. (2013). [Development of a diagnostic test system for early non-invasive detection of prostate cancer based on PCA3 mRNA levels in urine sediment using quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR)]. *Vestn Ross Akad Med Nauk*(5), 45-51.
- Pfaffl, M.W. (2004). Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOspektrum, Sonderausgabe PCR*, 10 (2004), S. 92-95.
- Pfaffl, Michael W., & Hageleit, M. (2000). Validities of mRNA quantification using recombinant RNA and recombinant DNA external calibration curves in real-time RT-PCR. *Biotechnology Letters*, 23, 275-282.
- Potosky, A. L., Miller, B. A., Albertsen, P. C., & Kramer, B. S. (1995). The role of increasing detection in the rising incidence of prostate cancer. *JAMA*, 273(7), 548-552.
- Ries L. A. G., Eisner, M. P., Kosary, C. L., Hankey, B. F., Miller, B. A., Clegg, L., Mariotto, A., Feuer, E. J., Edwards, B. K., (eds) (2004). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2001. Retrieved 23.11.12, from http://seer.cancer.gov/csr/1975_2001/results_merged/sect_22_prostate.pdf
- Retz, M., Lehmann, J., Röder, C., Weichert-Jacobsen, K., Loch, T., Romahn, E., Lühl, C., Kalthoff, H., Stöckle, M. (2001). 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. *Eur Urol*, 39(5), 507-515; discussion 516-507. doi: 52496

- Retz, M., Roterling, J., Nawroth, R., Buchner, A., Stockle, M., Gschwend, J. E., & Lehmann, J. (2011). Long-term follow-up of bladder cancer patients with disseminated tumour cells in bone marrow. *Eur Urol*, *60*(2), 231-238. doi: 10.1016/j.eururo.2010.12.014
- Richie, J. P., Catalona, W. J., Ahmann, F. R., Hudson, M. A., Scardino, P. T., Flanigan, R. C., deKernion, J. B., Ratliff, T. L., Kacoussi, L. R., Dalkin, B. L., et al. (1993). Effect of patient age on early detection of prostate cancer with serum prostate-specific antigen and digital rectal examination. *Urology*, *42*(4), 365-374.
- Riethdorf, S., Wikman, H., & Pantel, K. (2008). Review: Biological relevance of disseminated tumor cells in cancer patients. *Int J Cancer*, *123*(9), 1991-2006. doi: 10.1002/ijc.23825
- RKI, Robert Koch Institut, & GEKID, Zentrum für Krebsdaten. (2012). Krebs in Deutschland 2007/2008. (8), 80-83.
- Roethke, M. C., Lichy, M. P., Kniess, M., Werner, M. K., Claussen, C. D., Stenzl, A., Schlemmer, H. P., Schilling, D. (2013). Accuracy of preoperative endorectal MRI in predicting extracapsular extension and influence on neurovascular bundle sparing in radical prostatectomy. *World J Urol*, *31*(5), 1111-1116. doi: 10.1007/s00345-012-0826-0
- Schaeffer, E. M., Carter, H. B., Kettermann, A., Loeb, S., Ferrucci, L., Landis, P., Trock, B., J., Metter, E. J. (2009). Prostate specific antigen testing among the elderly--when to stop? *J Urol*, *181*(4), 1606-1614; discussion 1613-1604. doi: 10.1016/j.juro.2008.11.117
- Schiavina, R., Bertaccini, A., Franceschelli, A., Manferrari, F., Vagnoni, V., Borghesi, M., Morselli-Labate, A. M., Martorana, G. (2010). The impact of the extent of lymph-node dissection on biochemical relapse after radical prostatectomy in node-negative patients. *Anticancer Res*, *30*(6), 2297-2302.
- Schlimok, G., Funke, I., Holzmann, B., Gottlinger, G., Schmidt, G., Hauser, H., Swierkot, S., Warnecke, H. H., Schneider, B., Koprowski, H., et al. (1987). Micrometastatic cancer cells in bone marrow: in vitro detection with anti-cytokeratin and in vivo labeling with anti-17-1A monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *84*(23), 8672-8676.
- Schmid, H. P., Engeler, D. S., Pummer, K., & Schmitz-Drager, B. J. (2007). Prevention of prostate cancer: more questions than data. *Recent Results Cancer Res*, *174*, 101-107.
- Schroder, F. H., Roobol, M. J., & Bangma, C. H. (2015). [Early detection of prostate cancer--recommendations after 13 years of follow-up in the European randomised study]. *Ned Tijdschr Geneesk*, *159*, A8677.

- Shariat, S. F., Roudier, M. P., Wilcox, G. E., Kattan, M. W., Scardino, P. T., Vessella, R. L., Erdamer, S., Nguyen, C., Wheeler, T. M., Slawin, K. M. (2003). Comparison of immunohistochemistry with reverse transcription-PCR for the detection of micrometastatic prostate cancer in lymph nodes. *Cancer Res*, *63*(15), 4662-4670.
- Singletary, S. E., Greene, F. L., & Sobin, L. H. (2003). Classification of isolated tumor cells: clarification of the 6th edition of the American Joint Committee on Cancer Staging Manual. *Cancer*, *98*(12), 2740-2741. doi: 10.1002/cncr.11865
- Sobin, L. H. (1999). Frequently asked questions regarding the application of the TNM classification. TNM/Prognostic Factors Project (International Union Against Cancer [UICC]). *Cancer*, *85*(6), 1405-1406.
- Sokoloff, M. H., & Brendler, C. B. (2001). Indications and contraindications for nerve-sparing radical prostatectomy. *Urol Clin North Am*, *28*(3), 535-543.
- Stamey, Thomas A., Yang, Norman, Hay, Alan R., McNeal, John E., Freiha, Fuad S., & Redwine, Elise. (1987). Prostate-Specific Antigen as a Serum Marker for Adenocarcinoma of the Prostate. *New England Journal of Medicine*, *317*(15), 909-916. doi: doi:10.1056/NEJM198710083171501
- Steinberg, G. D., Carter, B. S., Beaty, T. H., Childs, B., & Walsh, P. C. (1990). Family history and the risk of prostate cancer. *Prostate*, *17*(4), 337-347.
- Stephenson, S. A., Verity, K., Ashworth, L. K., & Clements, J. A. (1999). Localization of a new prostate-specific antigen-related serine protease gene, KLK4, is evidence for an expanded human kallikrein gene family cluster on chromosome 19q13.3-13.4. *J Biol Chem*, *274*(33), 23210-23214.
- Stone, N. N., Stock, R. G., & Unger, P. (1997). Laparoscopic pelvic lymph node dissection for prostate cancer: comparison of the extended and modified techniques. *J Urol*, *158*(5), 1891-1894.
- Vandesompele, Jo, Preter, Katleen De, Pattyn, Filip, Poppe, Bruce, Roy, Nadine Van, Paepe, Anne De, & Speleman, Frank. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 2002, *3*(7), 1-12.
- Verbanac, K. M., Min, C. J., Mannie, A. E., Lu, J., O'Brien, K. F., Rosman, M., Taft, L., Group, Ecu Aamc Sentinel Node Study Group. (2010). Long-term follow-up study of a prospective multicenter sentinel node trial: molecular detection of breast cancer sentinel node metastases. *Ann Surg Oncol*, *17 Suppl 3*, 368-377. doi: 10.1245/s10434-010-1262-2
- Walsh, P. C., & Donker, P. J. (1982). Impotence following radical prostatectomy: insight into etiology and prevention. *J Urol*, *128*(3), 492-497.

- Walz, J., Gallina, A., Saad, F., Montorsi, F., Perrotte, P., Shariat, S. F., Jeldres, C., Graefen, M., Benard, F., McCormack, M., Valiquette, L., Karakiewicz, P. I. (2007). A nomogram predicting 10-year life expectancy in candidates for radical prostatectomy or radiotherapy for prostate cancer. *J Clin Oncol*, 25(24), 3576-3581. doi: 10.1200/JCO.2006.10.3820
- Wang, T., Liang, Z. A., Sandford, A. J., Xiong, X. Y., Yang, Y. Y., Ji, Y. L., & He, J. Q. (2012). Selection of Suitable Housekeeping Genes for Real-Time Quantitative PCR in CD4(+) Lymphocytes from Asthmatics with or without Depression. *PLoS One*, 7(10), e48367. doi: 10.1371/journal.pone.0048367
- Weckermann, D., Dorn, R., Trefz, M., Wagner, T., Wawroschek, F., & Harzmann, R. (2007). Sentinel lymph node dissection for prostate cancer: experience with more than 1,000 patients. *J Urol*, 177(3), 916-920. doi: 10.1016/j.juro.2006.10.074
- Weingartner, K., Ramaswamy, A., Bittinger, A., Gerharz, E. W., Voge, D., & Riedmiller, H. (1996). Anatomical basis for pelvic lymphadenectomy in prostate cancer: results of an autopsy study and implications for the clinic. *J Urol*, 156(6), 1969-1971.
- Weiss, L. (1991). Deformation-driven, lethal damage to cancer cells. Its contribution to metastatic inefficiency. *Cell Biophys*, 18(2), 73-79.
- Weller, D., Pinnock, C., Silagy, C., Hiller, J. E., & Marshall, V. R. (1998). Prostate cancer testing in SA men: influence of sociodemographic factors, health beliefs and LUTS. *Aust N Z J Public Health*, 22(3 Suppl), 400-402.
- Xi, Z., Klokk, T. I., Korkmaz, K., Kurys, P., Elbi, C., Risberg, B., Danielsen, H., Loda, M., Saatcioglu, F. (2004). Kallikrein 4 is a predominantly nuclear protein and is overexpressed in prostate cancer. *Cancer Res*, 64(7), 2365-2370.
- Yoon, H., Blaber, S. I., Li, W., Scarisbrick, I. A., & Blaber, M. (2013). Activation profiles of human kallikrein-related peptidases by matrix metalloproteinases. *Biol Chem*, 394(1), 137-147. doi: 10.1515/hsz-2012-0249
- Yousef, G. M., & Diamandis, E. P. (2001). The new human tissue kallikrein gene family: structure, function, and association to disease. *Endocr Rev*, 22(2), 184-204.
- Zaridze, D. G., Boyle, P., & Smans, M. (1984). International trends in prostatic cancer. *Int J Cancer*, 33(2), 223-230.
- Zumbo, P. (2012). Phenol-chloroform Extraction. Retrieved 21.12.2012, from <http://physiology.med.cornell.edu/faculty/mason/lab/zumbo/files/PHENO L-CHLOROFORM.pdf>

8 Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. med. Margitta Retz für die freundliche Überlassung des hochinteressanten Themas. Ihr und Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Jürgen Gschwend, dem Klinkleiter der Urologischen Klinik rechts der Isar, verdanke ich die Ermöglichung dieser Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer Dr. med. Matthias Heck. Ohne ihn wäre diese Doktorarbeit nie zustande gekommen. Zu jeder Zeit unterstützte er mich bei der Planung, Durchführung und Auswertung der vorliegenden Arbeit mit außerordentlichem Engagement und Fachwissen. Zur Erstellung dieser Arbeit haben seine wegweisenden und kreativen Ideen wesentlich beigetragen. Ganz herzlich möchte ich mich auch für die mühevollen Arbeit des Korrekturlesens bedanken.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Dr. rer. nat. Roman Nawroth, dem Leiter des urologischen Forschungslabors, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, die wissenschaftliche Förderung und die organisatorische Einbindung in sein Team bedanken. Jede Phase des experimentellen Teils dieser Arbeit wurde von ihm professionell und intensiv begleitet, zusammen mit Frau Monika Moissl, bei der ich mich an dieser Stelle auch herzlich, vor allem für ihre Geduld und die vielen sehr nützlichen Ratschläge bedanken möchte. Sie war immer offen für jede Frage und half bei der Lösung so vieler Probleme.

Auch möchte ich mich herzlich bei Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Jürgen Gschwend, Herrn PD Dr. med. Tobias Maurer, Herrn Dr. med. Michael Autenrieth und Herrn Prof. Dr. med. Hubert Kübler bedanken, welche die Gewebegewinnung ermöglichten, in dem sie sich bei der Entnahme an das ausgearbeitete Schema der Lymphadenektomie hielten.

Bei Herrn Tibor Schuster möchte ich mich für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Daten bedanken.

Als nächstes möchte ich mich bei meinen Mitdoktoranden Miriam Bandur und Marc Souchay für die freundliche Arbeitsatmosphäre und die gute Zusammenarbeit bedanken. Durch die unkomplizierte Zusammenarbeit konnte diese Arbeit wachsen.

Ein ganz besonderer Dank geht an Kathrin Rathgeber. Durch sie wurden nicht nur die vielen Stunden im Labor zu einer Freude, sondern es entwickelte sich auch außerhalb des Arbeitsfeldes eine wunderbare Freundschaft, für die ich ihr hier danken möchte.

Als letztes möchte ich mich herzlich bei meiner Familie bedanken. Bei meinen Eltern, die mir das Medizinstudium ermöglichten und mich auch während der Zeit der Doktorarbeit mit liebevoller Fürsorge unterstützt haben. Bei meinen Geschwistern bedanke ich mich für die geschwisterliche Freundschaft und die Unterstützung, die sie mir zu jederzeit bereit sind zu geben.