

**Expressionsmuster des Apoptoseproteins Programmed Cell
Death Protein 4 (Pdcd4) in urologischen Tumoren**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Vera Renate Splittstößer

aus Oberhausen

2014

Angefertigt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Professor Dr. med. Dr. h.c. Stefan C. Müller
2. Gutachter: Prof. Dr. med. G. Kristiansen

Tag der Mündlichen Prüfung: 20.01.2014

Aus der Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie
Direktor: Professor Dr. med. Dr. h.c. Stefan C. Müller

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis.....	8
1.	Einleitung.....	10
1.1	Blasenkarzinom.....	10
1.1.1	Allgemeines.....	10
1.1.2	Klassifikation und Diagnostik.....	11
1.1.3	Therapie und Prognose.....	14
1.2	Nierenzellkarzinom.....	15
1.2.1	Allgemeines.....	15
1.2.2	Klassifikation und Diagnostik.....	15
1.2.3	Therapie und Prognose.....	17
1.3	Prostatakarzinom	18
1.3.1	Allgemeines.....	18
1.3.2	Klassifikation und Diagnostik.....	19
1.3.3	Therapie und Prognose.....	23
1.4	Hodenkarzinom.....	24
1.4.1	Allgemeines.....	24
1.4.2	Klassifikation und Diagnostik.....	24
1.4.3	Therapie und Prognose.....	28
1.5	Peniskarzinom.....	28
1.5.1	Allgemeines.....	28
1.5.2	Klassifikation und Diagnostik.....	29
1.5.3	Therapie und Prognose.....	30
1.6	Das Programmed cell death 4 Protein	31
1.6.1	Struktur.....	31
1.6.2	Lokalisation	32
1.6.3	Expression und Regulation	32
1.6.4	Funktion	35
2.	Ziel dieser Arbeit	40
3.	Material und Methoden.....	41
3.1	Materialien.....	41
3.1.1	Geräte	41
3.1.2	Labor- und Verbrauchsmaterialien	41
3.1.3	Chemikalien und Lösungen.....	41
3.1.4	Chemikalien für den DAKO TechMate™ 500	42
3.1.5	Antikörper.....	42
3.1.6	PCR Kits.....	42
3.1.7	Primer.....	43

3.1.8	Zellkulturen.....	43
3.1.9	Software	43
3.2	Methoden	43
3.2.1	Probengewinnung	43
3.2.2	Proben des Blasenkarzinoms.....	44
3.2.3	Proben des Nierenzellkarzinoms.....	46
3.2.4	Proben des Prostatakarzinoms	47
3.2.5	Proben des Hodenkarzinoms	48
3.2.6	Proben des Peniskarzinoms.....	49
3.2.7	Tissue Microarrays	49
3.2.8	Entparaffinierung	50
3.2.9	Mikrowellenbehandlung.....	50
3.2.10	Immunhistochemische Färbung	51
3.2.11	RNA Aufreinigung	51
3.2.11.1	Isolation der RNA aus Gewebeproben	51
3.2.11.2	Entparaffinierung	52
3.2.11.3	Proteaseverdau	52
3.2.11.4	Nukleinsäureisolation	52
3.2.12	Reverse Transkription	53
3.2.13	Quantitative Realtime-PCR	54
3.2.14	Statische Analyse.....	56
4.	Ergebnisse.....	58
4.1	Blasenkarzinom.....	58
4.1.1	Pdcd4-Expression in Korrelation zu der Differenzierung des Gewebes	58
4.1.2	Pdcd4-Expression in Korrelation zu den klinisch-pathologischen Parametern.....	58
4.1.2.1	Alter, Geschlecht und Raucherstatus	58
4.1.2.2	T-Stadium	58
4.1.2.3	Grading	60
4.1.2.4	Metastasen.....	61
4.1.3	Pdcd4-Expression in Korrelation zum Progressionsfreien und Krebsspezifischen Überleben.....	61
4.1.4	Unterschied zwischen NMIBC und MIBC	62
4.1.5	Pdcd4-Expression in Korrelation zur miR-21 Expression	64
4.2	Nierenzellkarzinom.....	67
4.2.1	Pdcd4-Expression in Korrelation zur Differenzierung des Gewebes	67
4.2.2	Pdcd4-Expression in Korrelation zu den Tumorentitäten.....	68
4.2.3	Pdcd4-Expression in Korrelation zu den klinisch-pathologischen Parametern.....	69
4.2.3.1	T-Stadium	69
4.2.3.2	V-Stadium.....	71
4.2.3.3	Weitere klinisch-pathologische Parameter	71
4.2.4	Pdcd4-Expression in Korrelation zum Progressionsfreien und Krebsspezifischen Überleben.....	72
4.2.5	Membranfärbung.....	72

4.3	Prostatakarzinom	73
4.3.1	Pdcd4-Expression in Korrelation zu der Differenzierung des Gewebes	73
4.3.2	Pdcd4-Expression in Korrelation zu den klinisch-pathologischen Parametern.	75
4.4	Hodenkarzinom	76
4.4.1	Pdcd4-Expression in Korrelation zur Differenzierung des Gewebes	76
4.4.2	Pdcd4-Expression in Korrelation zu den klinisch-pathologischen Parametern.	76
4.5	Peniskarzinom.....	77
4.5.1	Pdcd4-Expression in Korrelation zur Differenzierung des Gewebes	78
4.5.2	Pdcd4-Expression in Korrelation zu den klinisch-pathologischen Parametern.	80
4.5.2.1	T-Stadium	80
4.5.2.2	Grading	80
4.5.2.3	Pdcd4-Expression in Korrelation zum Progressionsfreien und Krebsspezifischen Überleben.....	81
5.	Diskussion.....	82
5.1	Blasenkarzinom.....	82
5.2	Nierenzellkarzinom.....	85
5.3	Prostatakarzinom	87
5.4	Hodentumoren	89
5.5	Peniskarzinom.....	90
6.	Zusammenfassung.....	92
7.	Bildanhang.....	93
8.	Literaturverzeichnis.....	95
9.	Danksagung.....	102
10.	Lebenslauf.....	103

Abkürzungsverzeichnis

ABL	Abelson Murine Leukemia Viral Oncogene Homolog 1
AFP	Alpha Fetoprotein
Akt	Proteinkinase B
AML	Akut myeloische Leukämie
ANNA-TRUS	Artificial neural network analysis of Transrectal Ultrasound
AP-1	Activating Protein-1
Ara-c	Arabinofuranosyl Cytidine
ATRA	All-Trans-Retinoic Acid
BCG	<i>Bacillus Calmette-Guérin</i>
<i>BCR-abl-Kinase</i>	<i>Breakpoint Cluster Region</i> Abelson-Leukämie-Protoonkogen Kinase
CA II	Carboanhydrase II
CDK4/6 und 2	Cyclin-dependent Kinase 4/6 und 2
CDK1/cdc2	Cyclin-dependent Kinase 1
CIS	Carcinoma in Situ
c-Jun	cellular Jun
JNK	Jun N-terminal kinase (MAPK)
CML	Chronisch Myeloische Leukämie
c-myb	cellular myeloblastosis oncogene homolog
COX 2	Cyclooxygenase 2
cRCC	clear cell Renal Cell Carcinoma
CT	Computertomographie
DSMO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribo-nucleic Acid
E-Cadherin	epithelial calcium-dependent adhesion Protein
E2F/DP	Elongationsfaktor 2F
EGF	Epidermal Growth Factor
eIF4A und 4F	Eukaryoter Initiationsfaktor 4A und 4F
eIF4G I und II	Eukaryoter Initiationsfaktor 4G I und II
EORTC	European Organisation for Research and Treatment of Cancer
FAS	Apoptosis Stimulating Fragment
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
β -HCG	β Humanes Choriongonadotropin
Her2/neu	human epidermal growth factor receptor 2
HIFU	High-intensity focused ultrasound
HSP90	Hitzeschockprotein 90
IGCCCG	International Germ Cell Cancer Classification Group
IL	Interleukin
JNK	N-terminal Kinases
K-ras-	Kirsten Rat Sarcoma
LDH	Laktatdehydrogenase
MAPK = ERK	Mitogen-activated protein kinase
MAP4K1	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 1
MIBC	muscle-invasive bladder cancer
miR-21	MicroRNA 21
MMP	Matrixmetalloproteinasen
mRNA	messenger Ribo-Nucleic Acid

MRT	Magnetresonanztomographie
mTOR	mammalian target of rapamycin
NFκB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NMIBC	Non muscle-invasive bladder cancer
NSCLC	Non Small Cell Lung Cancer
p21 ^{Waf1/Cip1}	cyclin-dependent kinase inhibitor 1
pAkt	phosphorylierte Proteinkinase B
PCA	Prostate Cancer
PCR	Polymerase Chain Reaction
Pdcd4	Programmed cell death 4
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PMA	Phorbol Myristate Acetate
pRCC	papillary Renal Cell Carcinoma
RAR	Retinsäure-Rezeptor
RCC	Renal Cell Carcinoma
Rb	Retinoblastom-Protein
RLA	Retroperitoneale Lymphadenektomie
RNA	Ribo-Nucleic Acid
RT-PCR	Real Time Polymerase Chain Reaction
RXR	retinoid X receptor
S6K1	Ribosomal protein S6 kinase
Ser	Serin
SOX 15	SRY-related HMG-box 15
TBS	Tris Buffered Saline
Tcf	T-cell Faktor
TGF-β1	Transforming Growth Factor-β1
TIMP-2	Tissue Inhibitor of Metalloproteinases 2
TMA	Tissue Microarray
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
TUR	Transurethrale Resektion
Twist-1	Twist transcription factor 1
TZB	Tumorzentrale Berlin e.V.
UICC	Union for International Cancer Control
uPAR	Urokinase Rezeptor
UTR	Untranslated Region
UV	Ultra Violet
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
v-myb	myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)
YB-1	Y box binding protein 1
5-FU	5-Fluoruracil

1. Einleitung

1.1 Blasenkarzinom

1.1.1 Allgemeines

Das Blasenkarzinom ist, zusammenfassend für Männer und Frauen, der fünfthäufigste maligne Tumor in Europa (Ferlay et al., 2007). In 2006 erkrankten in Deutschland 8.090 Frauen und 19.360 Männer an einem Blasenkarzinom und 1.893 Frauen und 3.549 Männer verstarben daran. Während die Inzidenz bei Männern seit den 1990er Jahren kontinuierlich abnimmt, ist sie bei Frauen nahezu konstant. Die Mortalität sank seit 1980 bei Männern um 20 % und bei Frauen um 40 %. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei Männern bei 72 Jahren und bei Frauen bei 74 Jahren (Robert Koch Institut (RKI) und Gesellschaft für epidemiologische Krebsregister in Deutschland e.V. (GEKID), 2010).

Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei 70 % der Frauen und 75 % der Männer (RKI und GEKID, 2010), schwankt jedoch zwischen 70-80 % bei T2 und 20-36 % bei T3 Karzinomen (Rübben et al., 2007). Die klinische Unterteilung der EORTC der nicht muskelinvasiven Karzinome in „high-“, „intermediate-“ und „low-risk“ Tumore berücksichtigt die sechs wichtigsten klinischen und pathologischen Faktoren und ist entscheidend für das Rezidivrisiko.

Der Tabakkonsum ist der Hauptrisikofaktor, der zur Entwicklung eines Blasenkarzinoms führt. 50-65 % der männlichen und 20-30 % der weiblichen Blasenkarzinompatienten lassen sich auf diesen Risikofaktor zurückführen. Zudem haben rauchende Blasenkrebspatienten eine signifikant schlechtere Prognose, als vom Blasenkrebs betroffene Nichtraucher (European Association of Urology (EAU), 2013). Die meisten Stoffe, denen ein karzinogenes Potential im Zusammenhang mit der Blasenkarzinomentstehung nachgewiesen wurde, sind im Tabakrauch oder in industriellen Chemikalien enthalten. Zu diesen Stoffen zählen 2-Naphthylamine, 4-Aminobiphenyl, 4-Nitrobiphenyl, 4-Diaminobiphenyl und 2-Amino-1-Naphthol, Steinkohleruß, bestimmte Aldehyde wie Acrolein und chlorierte aliphatische Kohlenwasserstoffe. Außerdem spielen chronisch entzündliche Schädigungen der Blasenschleimhaut, insbesondere durch Schistosoma haematobium, eine Rolle. Dieser Parasit kommt in Ländern des Nahen Ostens endemisch vor und stellt dort einen Risikofaktor dar, der bedeutender ist als der Tabakkonsum. In Deutschland ist die Inzidenz von Schistosoma bedingten Entzündungen

dagegen sehr gering (EAU, 2013). Blasenkarzinome können auch sekundär durch eine Chemo- oder Strahlentherapie eines anderen Malignoms (z.B. bei gynäkologischen Tumoren oder einem PCA) entstehen (Chrouser et al., 2005). Ein Patient, der mit dem Zytostatikum Cyclophosphamid therapiert wurde, hat ein neunfach erhöhtes Risiko ein Blasenkarzinom zu entwickeln (Morrison, 1984), und zwar innerhalb von 6 bis 13 Jahren (Habs et al, 1983). Familiäre Häufungen von Blasenkarzinomen sind in der Literatur beschrieben (z.B.: Klemeney et al., 1996) aber noch nicht auf molekularer Ebene nachgewiesen worden.

1.1.2 Klassifikation und Diagnostik

Das Blasenkarzinom wird klinisch anhand der TNM-Klassifikation der UICC von 2004 und histologisch nach dem Grading nach Fuhrmann der WHO von 1973 eingeteilt.

In der TMN-Klassifikation beschreibt das T-Stadium den Primärtumor, N den Lymphknotenstatus, M die möglichen Fernmetastasen und L und V geben Auskunft über die Invasion in Lymph- bzw. Blutgefäße. Des Weiteren wird differenziert zwischen Tumoren, die im Gesunden entfernt wurden (R0) und solchen, die mikroskopisch (R1) oder makroskopisch (R2) maligne Zellen im Absetzungsrand des Operationsmaterials zeigen. Folgende Tabelle zeigt die Einteilungskriterien der TNM-Klassifikation beim Blasenkarzinom:

TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für einen Primärtumor
Ta	Nicht invasives papilläres Karzinom des Urothels
Tis	Nicht invasives Carcinoma in situ (CIS)
T1	Tumor wächst in die Submucosa <ul style="list-style-type: none"> • T1a: oberhalb der Muscularis mucosa • T1b: unterhalb der Muscularis mucosa
T2	Tumor wächst in die Muscularis der Harnblase <ul style="list-style-type: none"> • T2a: innere Hälfte • T2b: bis in die äußere Hälfte
T3	Tumor infiltriert das perivesikale Gewebe <ul style="list-style-type: none"> • T3a: nur mikroskopisch erkennbar • T3b: makroskopisch sichtbar
T4	Tumor infiltriert Nachbarorgane <ul style="list-style-type: none"> • T4a: Prostata, Uterus, Vagina • T4b: Becken- oder Bauchwand
NX	Lymphknotenbefall kann nicht geklärt werden
N0	Keine Lymphknoten befallen
N1	Ein befallener Lymphknoten < 2 cm
N2	Einer oder mehrere befallene Lymphknoten < 5 cm
N3	Befallene Lymphknoten > 5 cm
MX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	Kein Nachweis von Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen nachgewiesen

Tab. 1: TNM-Klassifikation des Blasenkarzinoms der UICC von 2009

Die Einteilung des Blasenkarzinoms erfolgt nach Tumorausdehnung (T), Lymphknotenbefall (N) und Metastasen (M) anhand der TNM-Klassifikation. Die genaue Unterteilung ist in der Tabelle dargestellt

Darüber hinaus wird zwischen nicht-muskelinvasiven (NMIBC) und muskelinvasiven (MIBC) Blasenkarzinomen unterschieden, was sehr wichtig und entscheidend für das therapeutische Vorgehen ist. Die Unterscheidung wird anhand der TNM-Klassifikation und des Grading-Systems getroffen.

In der Pathologie wird das Tumorgewebe lichtmikroskopisch analysiert und nach dem Gradingssystem klassifiziert, die die mitotische Aktivität, Kerngröße, Kernpleomorphie sowie die Ähnlichkeit zum Ursprungsgewebe berücksichtigt und somit Informationen über den Differenzierungsgrad des Gewebes liefert. Folgende Tabelle stellt die Einteilung in die verschiedenen Grade dar:

GX	Differenzierungsgrad nicht bestimmbar
G1	Regelmäßige runde Kerne von normaler Größe, kleine nicht vergrößerte Nukleoli, fast keine Mitosen
G2	Kerne größer als normal, Anisonukleose, Chromatinverdichtung, vergrößerte Nukleoli, vereinzelt Mitosen, ggf. mehrkernige Riesenzellen
G3	Ausgeprägte Kernpleomorphie, stark vergrößerte Nukleoli, Tumorroiesenzellen, zahlreiche und auch atypische Mitosen
G4	Anaplastische Zellen

Tab. 2: Gradingssystem der WHO von 1973

Das Gradingssystem der WHO dient der Differenzierung des Tumors. Es berücksichtigt die mitotische Aktivität, Kerngröße, Kernpleomorphie sowie die Ähnlichkeit zum Ursprungsgewebe

Die schmerzlose Makrohämaturie ist das Leitsymptom des Blasenkarzinoms, das bei bis zu 85 % der betroffenen Patienten auftritt (Varkarakis, 1974). Jede schmerzlose Mikro- und Makrohämaturie ist somit bis zum Beweis des Gegenteils karzinomverdächtig und sollte abgeklärt werden. In der Diagnostik hat die Urinzytologie eine hohe Spezifität und für hochmaligne Tumore auch eine hohe Sensitivität, während sie bei niedrigmalignen Karzinomen eine zu niedrige Sensitivität aufweist. Dabei spielt insbesondere der Differenzierungsgrad des Tumors eine Rolle. Es muss somit zur Diagnosesicherung zusätzlich eine Zystoskopie durchgeführt werden. Da Blasenkarzinome zunächst oberflächlich auf das Urothel beschränkt wachsen, ist die Zystoskopie besonders sensitiv für die Diagnose in einem frühen Tumorstadium. Sie kann durch fluoreszierende Stoffe unterstützt werden (ALA / Hexvix). Urinmarker, wie NMP22, BTA, Urovysion und Immunocyt haben sich aufgrund mangelnder Sensitivität für die Diagnostik sowohl nicht invasiver als auch invasiver Karzinome nicht als Alternative zur Zystoskopie in der Klinik etablieren können. Zur Optimierung des Stagings mit Hilfe der TNM-Klassifikation dienen bildgebende Ver-

fahren wie die Computertomographie und Magnetresonanztomographie. Die meisten Urothelkarzinome sind in der Blase lokalisiert (92 %). Es ist jedoch zu beachten, dass diese Tumorentität auch in den Ureteren (2 %) und im Nierenbecken (6 %) auftreten kann (Wein et al., 2006). Differentialdiagnostisch sollte bei einer schmerzlosen Makrohämaturie neben Urothelkarzinomen auch an Harnwegsobstruktionen, Urolithiasis, Traumen, Zystitiden, entzündliche Erkrankungen und Störungen der Blutgerinnung gedacht werden (Rübben et al., 2007).

1.1.3 Therapie und Prognose

Die Therapie besteht in der transurethralen Resektion mit fakultativer intravesikaler Rezidivprophylaxe mit Mytomycin C, Doxorubicin oder mit BCG für nicht muskelinvasive Tumore. BCG weist eine bessere Wirksamkeit in der Rezidivprophylaxe auf, ist jedoch auch toxischer als die alternativen Chemotherapeutika. Die intravesikale BCG-Instillation verhindert bei Cis bei 70-80 % der Patienten eine Progression, während sich die Erkrankung bei Therapieunwirksamkeit in 60 % der Fälle zum invasiven Karzinom entwickelt. Bei Karzinomen ohne CIS reduziert die Therapie weder die Progression noch verbessert sie die Überlebenschance. Ist eine kurative Behandlung per TUR nicht möglich, so besteht die Möglichkeit einer radikalen Zystektomie. Eine neoadjuvante Chemotherapie verbessert für nur 5-7 % der Zystektomiepatienten die 5-Jahres-Überlebensrate, während eine neoadjuvante Radiotherapie keinen nachweislichen Nutzen bringt. Ein Drittel aller MIBC-Patienten weisen bereits zu Therapiebeginn Fernmetastasen und ein Viertel Lymphknotenmetastasen auf (EAU, 2013). Daher besteht ein großes Interesse an neuen Therapiemöglichkeiten, um besonders die hohe Rezidivrate zu vermindern. Zudem erhofft man sich organschonende Therapieansätze zu verbessern, die eine Alternative zur radikalen Zystektomie darstellen. Auch die diagnostischen Möglichkeiten, um zwischen einem NMIBC und einem MIBC zu differenzieren und somit die richtige Therapie zu wählen, sind noch zu fehlerbehaftet. Ein weniger untersucherabhängiges Kriterium als das Grading der WHO könnte zu einer deutlichen Verbesserung der Qualität der klinischen Therapieentscheidung führen.

1.2 Nierenzellkarzinom

1.2.1 Allgemeines

In Europa liegt der Anteil des Nierenzellkarzinoms aller soliden Tumore bei bis zu 2-3 % mit einem Verhältnis Männer: Frauen von 1,5:1 (EAU, 2013). Im Jahr 2006 erkrankten in Deutschland 10.050 Männer und 6.440 Frauen an einem Nierenzellkarzinom, 4.086 Männer und 2.629 Frauen verstarben daran. Während die Inzidenz konstant bleibt, sinkt die Mortalität seit den 1990er Jahren stetig. Bei Männern liegt das mittlere Erkrankungsalter bei 72, bei Frauen bei 74 Jahren. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei 65-75 % (RKI und GEKID, 2010).

95 % der Nierentumore sind Nierenzellkarzinome, welche aus dem Tubulusepithel entstehen. Die übrigen 5 % setzen sich zusammen aus Wilmstumoren, Onkozytomen, Sarkomen und Urothelkarzinomen (Rübben et al., 2007). In dieser Forschungsarbeit wurden nur die Nierenzellkarzinome mit ihren Untergruppen: Klarzelliges- (80-90 %, Anteil an Nierenzellkarzinomen), papilläres- (10-15 %) und chromophobes (4-5 %) Karzinom, sowie Onkozytome (3-7 % Anteil an Nierentumoren) untersucht, weshalb im Weiteren auf dessen Risikofaktoren und Therapien eingegangen wird (EAU, 2013).

Sowohl aktiv- als auch passiv- Rauchen und die arterielle Hypertonie sind Risikofaktoren für die Entstehung eines Nierenzellkarzinoms (EAU, 2013). Vom Markt genommene Phenacetin-haltige Schmerzmittel, Halogenkohlenwasserstoff und Cadmium können, besonders bei niereninsuffizienten Patienten, karzinogene Wirkungen auf die Niere haben. Bei Frauen wurde ein Zusammenhang mit Übergewicht beschrieben. Ein deutlich erhöhtes Risiko haben Patienten, die am Hippel-Lindau-Syndrom leiden (RKI und GEKID 2010).

1.2.2 Klassifikation und Diagnostik

Das Nierenzellkarzinom wird nach der TNM-Klassifikation der UICC von 2009 und dem Grading nach Fuhrmann klinisch und histologisch klassifiziert. Folgende Tabellen verdeutlichen die tumorspezifischen Klassifikationskriterien:

TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
T1	Tumor auf Niere begrenzt und < 7 cm <ul style="list-style-type: none"> • T1a: Tumor < 4 cm • T1b: Tumor > 4 cm
T2	Tumor auf Niere begrenzt und > 7 cm <ul style="list-style-type: none"> • T2a: Tumor < 10 cm • T2b: Tumor > 10 cm
T3	Tumor breitet sich in größere Venen aus oder infiltrierte direkt perirenales Gewebe, jedoch nicht über Gerota-Faszie hinaus und nicht in ipsilaterale Nebenniere <ul style="list-style-type: none"> • T3a: makroskopische Ausbreitung in die Nierenvene oder ihre segmentalen Äste (mit muskulärer Wand) oder Infiltration des perirenal und/oder peripelvinen Fettgewebes • T3b: makroskopische Ausbreitung in die Vena cava unterhalb des Zwerchfells • T3c: makroskopische Ausbreitung in die Vena cava oberhalb des Zwerchfells oder Infiltration der Wand der Vena cava
T4	Tumor infiltrierte über die Gerota-Faszie hinaus
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N1	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N2	Metastase(n) in einem regionären Lymphknoten
N3	Metastasen in mehr als einem Lymphknoten
MX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	Kein Nachweis von Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen nachgewiesen

Tab. 3: TNM-Klassifikation des Nierenzellkarzinoms der UICC von 2009

Die Einteilung des Nierenzellkarzinoms erfolgt nach Tumorgröße und Tumorausdehnung (T), Lymphknotenbefall (N) und Metastasen (M) der TNM-Klassifikation. Die genaue Unterteilung ist in der Tabelle dargestellt

GX	Differenzierungsgrad nicht bestimmbar
G1	kleine Kerne ($\sim 10 \mu\text{m}$), keine oder unscheinbare Nukleoli
G2	größere Kerne ($\sim 15 \mu\text{m}$), leicht unregelmäßig, kleine Nukleoli
G3	noch größere Kerne ($\sim 20 \mu\text{m}$), deutlich irregulär, große Nukleoli
G4	pleomorphe, bizarre Kerne, polylobuliert oder spindelig

Tab 4: Gradingssystem des Nierenzellkarzinoms nach Fuhrmann von 1973

Das Gradingssystem nach Fuhrmann dient der Differenzierung des Nierenzellkarzinoms. Es berücksichtigt die mitotische Aktivität, Kerngröße, Kernpleomorphie sowie die Ähnlichkeit zum Ursprungsgewebe

Die Symptomtrias von Flankenschmerz, Hämaturie und palpablem Tumor haben seit der breiten Einführung des Ultraschalls und der CT nur 6-10 % der Patienten. Paraneoplastische Symptome, wie Hypertonus, Anämie, Kachexie, Neuromyopathien, Gewichtsverlust und Amyloidose treten bei 20-30 % der Betroffenen auf. Somit werden Nierenzellkarzinome in 50 % der Fälle zufällig bei bildgebenden Untersuchungen diagnostiziert oder erst in einem späten Stadium, wenn bereits 20-30 % der Patienten Metastasen aufweisen, erkannt. Die sensitivsten Untersuchungen sind die CT unter Verwendung von Kontrastmitteln, die MRT und die Sonographie. Zur Abklärung von Metastasen wird zusätzlich die Knochenszintigraphie eingesetzt. Typische Tumormarker oder Laborwerte, die eine Therapieverlaufsbewertung ermöglichen, gibt es nicht. Die Diagnose eines Onkozytoms kann nur histologisch gestellt werden, wobei zu beachten ist, dass die Spezifität einer histologisch untersuchten Stanzbiopsie für ein Onkozytom gering ist, da auch klarzellige Nierenzellkarzinome (cRCC) und papilläre Nierenzellkarzinome (pRCC) onkozytäre Zellen aufweisen können (EAU, 2013).

1.2.3 Therapie und Prognose

Die Therapie eines lokal begrenzten Nierenzellkarzinoms besteht in der organerhaltenden Enukleation des Tumors. Dies ist besonders bei beidseitigem Befall und Patienten mit kontralateral eingeschränkter Nierenfunktion oder bei einem Von-Hippel-Lindau-Syndrom erstrebenswert und stellt grundsätzlich keine schlechtere Prognose als eine komplette Nephrektomie dar. Bei Tumoren, die größer als 7 cm sind oder deren Lokalisation

eine funktionelle Organerhaltung nicht ermöglicht und bei einseitigem Tumorbefall mit kontralateraler gesunder Niere gilt die Nephrektomie als Therapie der Wahl. Als organschonende Alternative zur chirurgischen Therapie kommen perkutane Radiofrequenz-, Kryo-, Ultraschallwellen-, Laser- oder HIFU-Ablation zum Einsatz. Diese sind bei chirurgischen Hochrisikopatienten und kleinen peripheren Tumoren indiziert. TKO und mTOR Inhibitoren zeigten bei metastasierten RCC's eine Verlängerung des Rezidivfreien Überlebens. Die Wirkung von Interferonen wird in Fachkreisen kontrovers diskutiert und die Lymphadenektomie ist ausschließlich von diagnostischem Nutzen. Die Radiotherapie wird lediglich zur Schmerzlinderung bei Metastasen eingesetzt. Bei histologisch als Onkozytom diagnostizierten Tumoren ist die Therapie der Wahl das so genannte „watchful waiting“ (EAU, 2013).

Die gute Prognose der auf die Niere beschränkten T1/T2 Tumore sinkt drastisch bei Vorliegen einer Metastasierung. Ein Patient mit Fernmetastasen hat eine mittlere Überlebenszeit von weniger als 12 Monaten (Rübben et al., 2007), während die 5-Jahres-Überlebensrate bei Grad I Tumoren bei 76 % liegt (Bretheau et al., 1995).

Insgesamt besteht noch ein hoher Forschungsbedarf für Alternativen zur chirurgischen Tumorthherapie und speziell zur Behandlung der häufig vorkommenden Fernmetastasen. Zudem würden mögliche Tumormarker die Nierenzellkarzinomdiagnostik revolutionieren.

1.3 Prostatakarzinom

1.3.1 Allgemeines

Das Prostatakarzinom ist in Deutschland der zweithäufigste maligne Tumor des Mannes. Es macht 26 % aller männlichen Krebserkrankungen und 10 % der Krebssterbefälle aus. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 69 Jahren und ist seit 1980 um 4 Jahre gesunken, was vor allem auf die verbesserte Früherkennung zurückzuführen ist. Dennoch starben in der Bundesrepublik Deutschland im Jahr 2006 11.577 Männer an einem Prostatakarzinom, Tendenz sinkend. Die Inzidenz lag bei 60.120 Neuerkrankungen. Dies entspricht einer Neuerkrankungsrate von 149,1/100.000 Einwohnern. Das Risiko an einem Prostatakarzinom zu erkranken steigt mit dem Alter. Während ein 40-Jähriger zu 0,1 % Wahrscheinlichkeit in den nächsten 10 Jahren an einem Prostatakarzinom erkranken

wird, liegt das Risiko für einen 70 Jährigen bei 6 % (RKI und GEKID 2010).

Im Wesentlichen ist die Ätiologie des Prostatakarzinoms noch nicht geklärt. Gesichert ist der Zusammenhang mit Alter, Rasse, androgener und genetischer Prädisposition. Als weitere Risikofaktoren werden Ernährung, Sexualverhalten, Alkoholkonsum und UV-Strahlenexposition diskutiert (EAU, 2013). Die genetische Prädisposition scheint eine große Rolle zu spielen. So erhöht sich die Wahrscheinlichkeit an einem PCA zu erkranken um das fünf- bis elffache, wenn ein oder zwei Verwandte ersten Grades ein PCA haben (Steinberg et al., 1990; Gronberg et al., 1996). Bei ca. 9 % der PCA Patienten spricht man vom hereditären PCA. Dies ist der Fall, wenn drei Verwandte oder mindestens zwei Verwandte vor ihrem 55. Lebensjahr an einem PCA erkranken (EAU, 2013). Bei dieser genetischer Prädisposition entwickelt sich die Erkrankung ca. 6-7 Jahre früher (Bratt et al., 2002). Während die Rate der im Rahmen von Autopsien diagnostizierten Prostatakarzinome Weltweit gleichmäßig verteilt ist, zeigt sich bei sich klinisch manifestierenden PCAs eine deutlich höhere Inzidenz in den USA und Nordeuropa im Vergleich zu Südostasien (Quinn et al., 2002). Studien mit asiatischen Probanden, die in die USA immigrierten und dort gleichhohe Inzidenzen für ein PCA zeigten, verdeutlichen, dass dieses Ungleichgewicht nicht auf genetische sondern auf exogene Faktoren zurückzuführen ist (Zaridze et al., 1984). Unter anderem scheint die Ernährung eine Rolle in der Ätiologie zu spielen. Es wird angenommen, dass eine tierfettarme, vitamin-, mineralien- und phytoöstrogenreiche Diät protektive Auswirkungen hat. Diese These muss aber noch durch weitere Studien belegt werden (EAU, 2013).

1.3.2 Klassifikation und Diagnostik

Zur Klassifikation werden die TNM-Klassifikation der UICC von 2009 und das *Grading* nach *Gleason*, 2005 modifiziert durch die International Society of Urological Pathology, verwendet. Folgende Tabelle stellt die tumorspezifische TNM-Klassifikation des PCA dar:

T1	Klinisch nicht verifizierbarer Tumor T1a: zufälliger histologischer Befund in 5 % oder weniger des resezierten Materials T1b: zufälliger histologischer Befund in 5 % oder mehr des resezierten Materials T1c: Tumor durch Nadelbiopsie diagnostiziert
T2	Tumor begrenzt auf Prostata T2a: Tumor befällt einen halben Prostatalappen T2b: Tumor befällt mehr als einen halben Prostatalappen T2c: Tumor befällt beide Prostatalappen
T3	Tumor durchbricht die Kapsel und breitet sich in extrakapsuläres Gewebe aus T3a: Uni- und bilaterale Ausbreitung T3b: Tumor infiltriert Samenblase
T4	Tumor ist fixiert und/oder infiltriert – z.B. Blasenhal, Sphinkter externus usw.
N0	Keine Metastasen in den regionären Lymphknoten vorhanden
N1	regionäre Lymphknoten sind befallen
M0	Keine Fernmetastasen vorhanden
M1	Fernmetastasen vorhanden M1a: Metastasen in nicht regionären Lymphknoten M1b: Knochenmetastasen M1c: Metastasen in anderen Organen

Tab. 5: TNM-Klassifikation des Prostatakarzinoms der UICC von 2009

Die Einteilung des Prostatakarzinoms erfolgt nach Tumorausdehnung (T), Lymphknotenbefall (N) und Metastasen (M) anhand der TNM-Klassifikation. Die genaue Unterteilung ist in der Tabelle dargestellt

Die Differenzierung des Prostatakarzinoms erfolgt nach dem *Gleason-Grading*. Dabei wird zwischen 5 Differenzierungsgraden (*Gleason-Grade*) unterschieden. Der sogenannte *Gleason-Score* errechnet sich aus der Summe der beiden im Präparat häufigsten Grade, so dass ein *Score* von 2 bis 10 erreicht werden kann. Liegt ein einheitlicher Differenzierungsgrad vor, so wird dieser verdoppelt. Der undifferenzierteste Grad muss dabei immer in die Berechnung eingehen, selbst dann, wenn er weniger als 5 % des Biopsiematerials ausmacht. Gut differenzierte Tumore weisen einen *Gleason-Score* von 2 bis 4 auf, ein *Score* von 5 bis 6 steht für mäßig differenziertes Tumorgewebe, ein *Score* von 7 beschreibt mäßig bis schlecht differenzierte und ein *Score* von 8 bis 10 schlecht- bis undifferenzierte Tumore. Da ein *Gleason-Score* von 7 entscheidend für die

Therapiewahl ist, unterscheidet man hier zwischen 3+4 und den schlechter differenzierten 4+3 Tumoren.

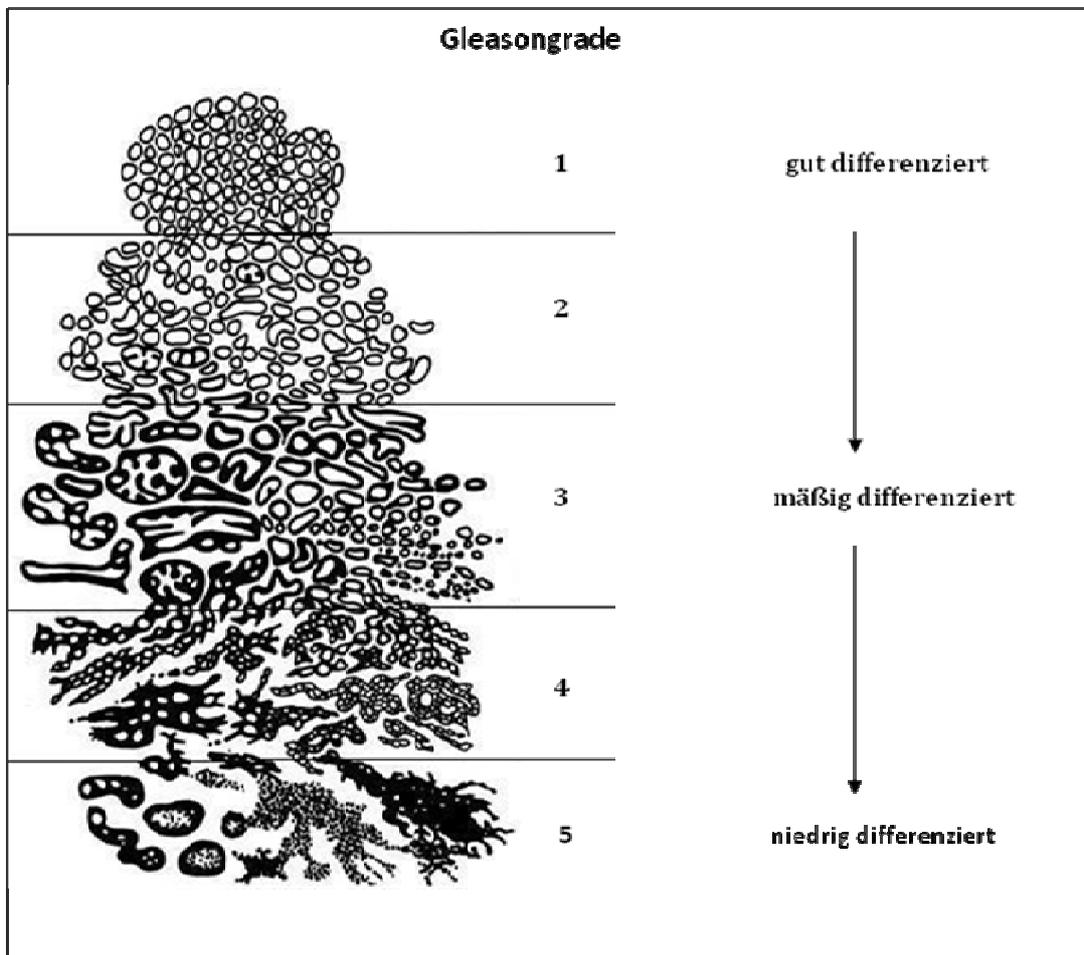


Abb. 1: Schematische Darstellung der histopathologischen Klassifizierung nach dem Grading nach Gleason von 2005

(modifiziert aus Quelle: http://www.coreoncology.com/patient/pc_about_stages.aspx , 20.10.2011)

Die klinische Diagnostik eines Prostatakarzinoms basiert auf der digitalrektalen Untersuchung, der Rektalsonographie, der Bestimmung des prostataspezifischen Antigens (PSA) und der Biopsie. Letztere wird nur bei verdächtigem Tastbefund oder erhöhtem Wert des Prostataspezifischen Antigens durchgeführt, da die Biopsieentnahme mit Komplikationen wie z. B. einem 1 % Risiko für eine Prostatitis verbunden ist. Die digitalrektale Untersuchung weist für organüberschreitende Karzinome einen hohen positiven Vorhersagewert von 80-93 % auf, allerdings sind Karzinome im Frühstadium oft nicht tastbar (Leiber, 2002). Das Prostataspezifische Antigen ist ein organspezifischer und

kein karzinomspezifischer Marker und kann somit auch bei benignen Prostataerkrankungen wie der benignen Prostatahyperplasie und der Prostatitis und auch durch mechanische Reizung erhöht sein. Zudem können auch Prostatakarzinome ohne erhöhtes PSA auftreten. Zur Verbesserung der Aussagekraft der PSA-Werte werden deren Anstiegsgeschwindigkeit, Verdopplungszeit und das Verhältnis zwischen freiem und gebundenem PSA bei PSA-Werten zwischen 2,5-10ng/ml berücksichtigt. Zudem können die PSA-Dichte, altersspezifische Vergleichswerte und die Anstiegs- und Verdopplungsgeschwindigkeit bestimmt werden. Letztere haben jedoch lediglich einen prognostischen Aussagewert für die Verlaufskontrolle therapierter Karzinome. Seit Erhebung der PSA-Werte werden viele Prostatakarzinome in einem früheren Stadium erkannt und können somit besser therapiert werden. Andererseits wird auch über den Effekt der Überdiagnostizierung diskutiert (EAU, 2013). Die Konsequenz einer Überdiagnostizierung sind therapeutische Maßnahmen bei Patienten, deren Karzinom so langsam wächst, dass es zu Lebzeiten nicht klinisch signifikant geworden wäre (Schroder et al., 2003). Bis heute konnte die Mortalität des Prostatakarzinoms in Deutschland nicht durch den Einsatz der PSA-Kontrolluntersuchung als Vorsorgeprogramm gesenkt werden (Karim-Kos et al., 2008). Radiologische Untersuchungen wie das CT haben aufgrund mangelnder Sensitivität nur einen geringen diagnostischen Stellenwert und werden lediglich bei Verdacht auf Knochenmetastasen in Form von Knochenszintigraphien eingesetzt (Wolf et al., 1995). Die Forschung zur Verbesserung der Diagnostik stützt sich auf neue Biopsieverfahren, die insbesondere die falsch-negative Ergebnisse vermindern sollen. So wurde die ANNA-TRUS, ein Analysesystem, das sich auf eine Datenbank mit Daten aus einem histopathologisch verifizierten Vergleich zwischen Prostatektomieproben und Ultraschallbildern zur Lokalisierung auffälliger Areale stützt, bereits erfolgreich erprobt (Loch et al., 1999). Zudem werden MRT gesteuerte Punktionsverfahren, Elastographie und das Histoscanning getestet. Ein anderer Forschungsschwerpunkt ist die Suche nach einem Biomarker, der aussagekräftiger als das PSA ist. In diesem Zusammenhang ist die mit der Genfamilie des PSA verwandte Serinprotease, die Human Kallikrein-related Peptidase 2 (hK2) zu nennen. Da es mit dem Grade und dem Volumen des PCAs korreliert, könnte es als prognostischer Marker verwendet werden, die diagnostische Aussagekraft ist jedoch begrenzt (Steuber et al., 2005). Epigenetische Veränderungen wie DNA Methylierung und Histonveränderungen scheinen eine Rolle in der Tumorgene-

se des PCA zu spielen. Eine Studie mit verschiedenen acetylierten oder methylierten Histone markern konnte eine hochsignifikant spezifische und sensitive verminderte Expression dieser Histone in Prostatakarzinomgewebe im Vergleich zu gesundem Gewebe finden. Zudem zeigten sich auch signifikante Korrelationen mit klinisch-pathologischen Parametern, so dass diese Histone eine zukünftige Rolle für Diagnostik, Prognostik und Therapie des PCAs spielen könnten (Ellinger et al., 2010). Bisher konnte jedoch neben dem PSA noch kein Biomarker in die klinische Routine integriert werden. Somit besteht ein großes Interesse in der weiteren Erforschung neuer potentieller Biomarker, die vor allem spezifischer für das Prostatakarzinom sind.

1.3.3 Therapie und Prognose

Radikale Prostatektomie, Strahlentherapie, Brachytherapie, Active Surveillance, Hormontherapie und „Watchfull waiting“ sind die Behandlungsmöglichkeiten des Prostatakarzinoms. Letztere wird bei T1a Karzinomen mit einem *Gleason-Score* unter 6 und bei multimorbiden alten Patienten mit einer Lebenserwartung unter 10 Jahren in Betracht gezogen, beinhaltet jedoch eine regelmäßige PSA-Kontrolle. Für jüngere Patienten ist die radikale Prostatektomie die Therapie der Wahl. Bestehen Kontraindikationen, so therapiert man mit Strahlentherapie oder in einer Kombination mit Hormonen. Eine Monohormontherapie kommt nur bei palliativen Therapiestrategien in Frage. Durch neoadjuvante Radio-Hormon-Therapie konnten bei Hochrisikopatienten bessere Ergebnisse erzielt werden. Dennoch ist anzumerken, dass diese Patienten eine nur 35 % 5-Jahresüberlebensrate haben, während diese Rate bei Patienten mit nicht gestreuten Tumoren bei 80-99 % liegt (Porter et al., 2006). Zunehmend gewinnt auch die Active Surveillance bei low-risk Prostatakarzinomen an Bedeutung. Die multifaktorielle Prognose kann mit Hilfe der Partin-Tabellen, die das PSA, den *Gleason-Score* und das TNM-Stadium berücksichtigt, abgeschätzt werden.

Mit der radikalen Prostatektomie ist ein hohes Risiko für Folgekomplikationen wie Impotenz (30-100 %) und Stressinkontinenz (4-50 %) verbunden. Die Brachytherapie ist eine Option für Patienten im cT1-T2a Stadium, einem *Gleason-Score* < 7 (3 + 4), PSA < 10 ng/mL und einem Prostatavolumen < 50 mL (EAU, 2013). Insgesamt sind die therapeutischen Maßnahmen, um ein Prostatakarzinom zu behandeln, mit erheblichen Nebenwirkungen wie z.B. Impotenz, Harn- und Stuhlinkontinenz, Osteoporose bei Hormonent-

zugstherapie und den für Chemotherapien bekannten lebensqualitätseinschränkenden Nebenwirkungen verbunden. Neue therapeutische Innovationen mit weniger drastischen Nebenwirkungen wären von großem Nutzen.

1.4 Hodenkarzinom

1.4.1 Allgemeines

Hodentumore sind im Gegensatz zum Prostatakarzinom Tumore des jungen Mannes. Im Mittel ist ein Hodentumorpatient bei Diagnosestellung 38 Jahre alt. In der Altersgruppe der 25-45-Jährigen ist es das häufigste Malignom, macht insgesamt jedoch nur 2 % der männlichen Krebserkrankungen aus. 4.960 Männer erkrankten 2006 an einem Hodentumor, während 154 daran verstarben. Während die Inzidenz einem steigenden Trend folgt, sinkt die Mortalität dank der verbesserten Chemotherapie. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei über 95 % (RKI und GEKID 2010).

Etwa 90-95 % der Hodentumore sind Keimzelltumore, weshalb in dieser Arbeit nur diese Tumorentität untersucht wurde. Keimzelltumore können in Seminome und Nicht-Seminome, mit den Untergruppen Embryonales Karzinom, Dottersackkarzinom, Chorionkarzinom und Teratom oder gemischtes Nicht-Seminom gegliedert werden (EAU, 2013).

Während Kryptorchismus, familiäre Häufung, Infertilität, Klinefelter-Syndrom und Hodenkrebs in der Vorgeschichte der Gegenseite als Risikofaktoren bewiesen sind (EAU, 2013) , wird über den Zusammenhang mit einer Puberta praecox, Hochwuchs und Subfertilität noch diskutiert (RKI und GEKID 2010).

1.4.2 Klassifikation und Diagnostik

Hodentumore werden nach der TNM Klassifikation und Tumormarker in drei klinische Stadien der UICC von 2003 eingeteilt. Die IGCCCG unterscheidet zusätzlich zwischen guter, intermediärer und schlechter Prognose für Nicht-Seminome und zwischen guter und mittlerer Prognose für Seminome (TZB, 2003).

Tis	Intratubulärer Tumor (Carcinoma in situ)
T1	Tumor begrenzt auf Hoden und Nebenhoden ohne Gefäß- oder Lymphgefäßinfiltration, Tumor kann die Tunica albuginea, nicht jedoch die Tunica vaginalis infiltrieren
T2	Tumor begrenzt auf Hoden und Nebenhoden mit Gefäß- oder Lymphgefäßinfiltration oder durch die Tunica albuginea in die Tunica vaginalis
T3	Tumor infiltriert Samenstrang mit oder ohne Gefäß/Lymphgefäßinfiltration
T4	Tumor infiltriert Skrotum mit oder ohne Gefäß/Lymphgefäßinfiltration
N1	Metastasen mit Lymphknoten < 2 cm in größter Ausdehnung oder multiple LK, keiner > 2 cm in größter Ausdehnung
N2	Metastasen in Lymphknoten, > 2 cm aber < 5 cm in größter Ausdehnung oder multiple LK, jeder > 2 cm aber < 5 cm
N3	Metastasen in Lymphknoten > 5 cm in größter Ausdehnung
M1	Fernmetastasen M1a: Fernmetastasen in nicht-regionären Lymphknoten oder pulmonal M1b: andere Fernmetastasen

Tab. 6: TNM-Klassifikation des Hodenkarzinoms der UICC von 2009

Die Einteilung des Hodenkarzinoms erfolgt nach Tumorausdehnung (T), Lymphknotenbefall (N) und Metastasen (M). anhand der TNM-Klassifikation. Die genaue Unterteilung ist in der Tabelle dargestellt

Klinisches Stadium	LDH (mIU/ml)	β-HCG (mIU/ml)	AFP (ng/ml)
SX	Serummarker nicht verfügbar oder nicht bestimmt		
S0	Serummarker im Normbereich		
S1	< 1,5 x N und	< 5.000	< 1.000
S2	1,5 -10 x N oder	5.000 - 50.000	1.000 - 10.000
S3	> 10 x N oder	> 50.000	> 10.000

Tab. 7: S-Kategorie der TNM-Klassifikation des Hodenkarzinoms der UICC von 2009

Die S-Kategorie der TNM-Klassifikation des Hodenkarzinoms erfolgt nach den Serumspiegeln der Marker LDH, β-HCG und AFP. Die genaue Unterteilung ist in der Tabelle dargestellt. N, obere Grenze des Normbereichs; LDH, Laktatdehydrogenase; β-HCG, β Humanes Choriongonadotropin; AFP, Alfa-Fetoprotein

0	pTis	N0	M0	S0,Sx
I	pT1-T4	N0	M0	SX
IA	pT1	N0	M0	S0
IB	pT2-4	N0	M0	S0
IS	Jeder Patient	N0	M0	S1-S3
II	Jeder Patient	N1-N3	M0	SX
IIA	Jeder Patient	N1	M0	S0
	Jeder Patient	N1	M0	S1
IIB	Jeder Patient	N2	M0	S0
	Jeder Patient	N2	M0	S1
IIC	Jeder Patient	N3	M0	S0
	Jeder Patient	N3	M0	S1
III	Jeder Patient	Jedes N	M1a	SX
IIIA	Jeder Patient	Jedes N	M1a	S0
	Jeder Patient	Jedes N	M1a	S1
IIIB	Jeder Patient	N1-N3	M0	S2
	Jeder Patient	Jedes N	M1a	S2
IIIC	Jeder Patient	N1-N3	M0	S3
	Jeder Patient	Jedes N	M1a	S3
	Jeder Patient	Jedes N	M1b	Jedes S

Tab. 8: Klinische Einteilung des Hodenkarzinoms der UICC von 2009

Die klinische Einteilung des Hodenkarzinoms erfolgt in Abhängigkeit vom TNM- Stadium nach Tumorausdehnung (T), Lymphknotenbefall (N) und Metastasen (M)

Prognose	Nicht-Seminome	Seminome
“good prognosis“	Testikulärer oder retroperitonealer Primärtumor ohne nichtpulmonale oder viszerale Metastasen AFP < 1,000 ng/mL β-HCG < 5,000 IU/L (1,000 ng/mL) LDH < 1.5 x N	Jede primäre Lokalisation ohne Metastasen, Normales AFP, jedes β-HCG, jedes LDH
5-JÜR	92 %	86 %
“intermediate prognosis“	Testikulärer oder retroperitonealer Primärtumor ohne nichtpulmonale oder viszerale Fernmetastasen AFP 1,000 - 10,000 ng/mL oder β-HCG 5,000 - 50,000 IU/L oder LDH 1.5 - 10 x N	Jede primäre Lokalisation mit nichtpulmonalen viszeralen Metastasen Normales AFP jedes β-HCG jedes LDH
5-JÜR	80 %	72 %
“poor prognosis“	Testikulärer, retroperitonealer oder mediastinaler Primärtumor mit nichtpulmonalen viszeralen Metastasen oder AFP > 10,000 ng/mL oder β-HCG > 50,000 IU/L (10,000 ng/mL) oder LDH > 10 x N	Es gibt keine Seminome mit hohem Risiko
5-JÜR	48 %	

Tab. 9: IGCCCG-Klassifikation des Hodenkarzinoms nach Mead 1995

Die prognostische Klassifikation des Hodenkarzinoms erfolgt anhand Tumorausdehnung und der Serummarker. Die Tabelle zeigt die genauen Kriterien für die Einteilung in gute, intermediäre und schlechte Prognose, sowie die 5-Jahresüberlebensrate der jeweiligen Prognosegruppen. 5-JÜR, 5-Jahresüberlebensrate (Tabelle modifiziert nach TBZ, 2003 und EAU, 2013)

Die Diagnostik basiert auf der Palpation und Sonografie des Hodens und der Bestimmung der Tumormarker β-HCG, AFP, und LDH. Zum Staging erfolgt bei Hodentumoren regelhaft ein CT Thorax und Abdomen, in Einzelfällen auch ein MRT Kopf. Darüber hinaus können in Ausnahmefällen bei unklarer Diagnose offene Biopsien weiter helfen. Einen endgültigen Beweis für Malignität kann lediglich der Pathologe durch die Analyse des Hodengewebes erbringen, welches in einer inguinalen Orchiektomie zuvor gewonnenen wurde. Besonders bei Hochrisikopatienten ist eine Biopsie zum Ausschluss einer ITGCN (Intratubular germ cell neoplasia) kontralateralen Hodens angezeigt (EAU, 2013).

1.4.3 Therapie und Prognose

Die Therapie des Hodenkarzinoms richtet sich nach der Tumorentität und dem klinischen Stadium. Seminome und Nicht-Seminome im klinischen Stadium I werden nur bei Vorliegen von Risikofaktoren für eine okkulte Metastasierung adjuvant chemotherapeutisch behandelt. Die retroperitoneale Lymphadenektomie (RLA) ist beim Nicht-Seminom im Stadium I optional und wird in den Stadien IIA/B mit Chemotherapie ggf. kombiniert oder komplett durch diese ersetzt. Die Seminome sind hingegen strahlen-sensibel und werden daher in den Stadien IIA und IIB strahlentherapiert. Tumore der Stadien IIC/III werden chemotherapeutisch behandelt, zum Teil unter dem Einsatz hochdosierter Chemotherapeutika (TZB, 2003). Insgesamt gehören das Seminom und das Nicht-Seminom, mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von über 95 %, zu den gut therapierbaren und prognostisch günstigen Malignomen (RKI und GEKID, 2010). Diese hocheffektive Therapie basiert jedoch auf einer hohen Strahlen- bzw. Chemotherapeutikabelastung, die gerade bei den im Durchschnitt jungen Hodenkarzinompatienten ein hohes Risiko für Folgeschäden wie Zweitmalignome birgt. Da Hodentumore eine hohe Teilungsfrequenz haben, wäre es von großem Nutzen, effizientere Biomarker zu finden, die eine frühere Diagnostik, ein besseres Staging und eine klarere Prognostik ermöglichen. Folglich wäre eine frühere Therapie mit eventuell niedrigeren Dosen oder Zyklen an Strahlen bzw. Chemotherapeutika möglich.

1.5 Peniskarzinom

1.5.1 Allgemeines

Das Peniskarzinom ist mit einer Inzidenz von weniger als 1 von 100.000 Männern in Europa und den USA in den Industriestaaten ein seltener Tumor, während er z. B. in Uganda 10 % aller Malignome ausmacht (EAU, 2013). Generell erkranken jedoch Asiaten und Südamerikaner häufiger als Afrikaner und Europäer (Schöber et al., 1999). Dank der verbesserten Diagnostik und Therapie ist die Heilungsrate von 50 % 1990 auf heute 80 % gestiegen (EAU, 2013).

Gesichert gilt ein Zusammenhang der Ätiologie des Plattenepithelkarzinoms, welches 95 % der Peniskarzinome ausmacht, mit Humanpapillomaviren, Phimose, Rauchen und

schlechter Genitalhygiene. Als weitere Einflussfaktoren werden Rasse, Geographie, sozialkulturelle und religiöse Praktiken sowie allgemeine Hygiene diskutiert. Als Präkanzerosen einzustufen sind der Morbus Bowen, die Leukoplakie, die Erythroplasie (de Queyrat) und das Carcinoma in situ. Patienten mit Riesenkonnylomen (Buschke – Löwenstein), Balanitis sclerotica obliterans und chronischen Irritationen haben ein erhöhtes Erkrankungsrisiko (Schöber et al., 1999). Das Peniskarzinom ist vorwiegend auf dem inneren Präputialblatt und der Glans lokalisiert. Ein großes Problem stellt die frühe lymphogene Metastasierung dar. Bereits bei Diagnosestellung haben ein Drittel der Patienten inguinale Lymphknotenmetastasen (Fraleley et al., 1989).

1.5.2 Klassifikation und Diagnostik

Das Peniskarzinom wird nach dem TNM-System der UICC von 2002 klassifiziert:

Tis	Carcinoma in situ
Ta	nichtinvasives verruköses Karzinom
T1	Tumor infiltriert subepitheliales Bindegewebe
T2	Tumor infiltriert Corpus spongiosum oder cavernosum
T3	Tumor infiltriert Urethra oder Prostata
T4	Tumor infiltriert andere Nachbarstrukturen
N1	Metastasen in solitärem oberflächlichen Leistenlymphknoten
N2	Metastasen in multiplen oder bilateralen Leistenlymphknoten
N3	Metastasen in tiefen Leisten- oder Beckenlymphknoten (uni- oder bilateral)

Tab. 10: TNM-Klassifikation des Peniskarzinoms der UICC von 2002

Die Klassifikation des Peniskarzinoms erfolgt nach Tumorausdehnung (T), Lymphknotenbefall (N) und Metastasen (M) durch das TNM-Schema. Die genaue Unterteilung ist in der Tabelle dargestellt

Für die Wahl der richtigen Therapie ist eine präzise histologische Untersuchung einer Biopsie des Primärtumors sowie der lokalen Lymphknoten notwendig (EAU, 2013). Die Mehrzahl der Peniskarzinome kann bereits durch Palpation und Begutachtung einer meist nicht verschieblichen Vorhaut diagnostiziert werden. Bereits bei 35 % - 60 % der Patienten finden sich vergrößerte Lymphknoten, wovon jedoch ca. 50 % auf eine entzündungsbedingte Vergrößerung zurückzuführen sind (Fraleley et al., 1989). Andererseits liegen in schon 20 % der unauffälligen Lymphknoten Metastasen vor. Dies verdeutlicht

die problematische und für die Therapiewahl sehr wichtige Klassifizierung des Lymphknotenstatus (Lont et al., 2003).

1.5.3 Therapie und Prognose

Das therapeutische Vorgehen sollte so schonend wie möglich durchgeführt werden. So gibt es für Karzinome im Frühstadium (Tis-Ta) die Möglichkeit der Laserchirurgie oder lokalen Exzision (EAU, 2013). Alternativ kann topisch ein 5-Fluoruracil Chemotherapeutikum appliziert werden (Orengo et al., 2002). Laut der EAU-Leitlinien dient die Chemotherapie jedoch ausschließlich neoadjuvanten oder palliativen Zwecken. Während Bei T2 Tumoren eine partielle Amputation möglich ist, müssen Patienten mit T3 Tumoren radikal penisamputiert werden. Im T4 Stadium wird neoadjuvant chemotherapiert. Eine Strahlentherapie kann bei Tumoren <4cm oder zu palliativen Zwecken eingesetzt werden (EAU, 2013). Neben der Therapie des Primärtumors liegt ein großes Augenmerk auf der Behandlung der befallenen Lymphknoten. Die bereits im vorherigen Kapitel erwähnte Problematik der Lymphknotendiagnostik, die nur durch invasive Maßnahmen in Form von Biopsien zufriedenstellend getroffen werden kann, stellt ebenfalls ein Problem für die richtige Wahl der Therapie dar. So wird unterschieden zwischen unilateralen inguinalen Lymphadenektomien und solchen, die auch die kontralateralen und zentralen inguinalen Lymphknoten miteinschließen. Bereits ab zwei befallenen inguinalen Lymphknoten wird eine pelvine Lymphadenektomie durchgeführt, die ein hohes Komplikationsrisiko birgt. Bei Patienten mit positivem Lymphknotenstatus trotz Lymphadenektomie wird adjuvant chemotherapiert (EAU, 2013). Aufgrund der hohen postoperativen Morbiditätsrate wird zunehmend versucht, die Lymphadenektomie zu begrenzen, ohne dabei die Rezidiv-Wahrscheinlichkeit zu erhöhen. Eine Verbesserung der Diagnostik, insbesondere im Hinblick auf die frühe lymphogene Metastasierung, würde dazu beitragen, dass Karzinome in früheren Stadien erkannt und schonender therapiert werden könnten. Zudem könnte die desolante prognostische Situation der Patienten mit bereits metastasierten Karzinomen, die nur eine 5 % 5- Jahresüberlebenschance haben, deutlich verbessert werden (Preis et al., 2007). Da beim Peniskarzinom leicht Biopsiematerial des Primärtumors gewonnen werden kann, wären diagnostisch und prognostisch relevante histologische Veränderungen, die durch immunhistochemische Färbungen nachzuweisen sind, klinisch effektiv verwertbar.

1.6 Das Programmed cell death 4 Protein

Das Programmed cell death 4, kurz Pdc4, ist ein Protein, das während der Apoptose hoch reguliert wird. Es wurde 1995 entdeckt (Shibahara et al., 1995). Der Einfluss auf die Transkription, Translation und verschiedene Signaltransduktionsketten, sowie verminderte Expression in verschiedenen malignen Geweben konnte nachgewiesen werden. Dadurch wurde postuliert, dass Pdc4 eine tumorsuppressive Wirkung über die Einleitung der Apoptose hat. Somit ist die Erforschung der Funktion und Regulation von Pdc4 als mögliches Tumorsuppressorgen von großem Interesse. Insbesondere sind damit neue Erkenntnisse über die Tumorentstehung sowie Verbesserungen der onkologischen Diagnose-, Prognose- und Therapieansätze verbunden.

1.6.1 Struktur

Pdc4 ist ein 469 Aminosäuren langes Protein, welches sich auf Chromosom 10q24 befindet (Soejima et al., 1999). Es verfügt über zwei basische Domäne am N- und C-Terminus, sowie über zwei „conserved“ alphahelikale MA-3 Domänen (Matsushashi et al., 1997; Göke et al., 2002; Kang et al., 2002). Diese MA-3 Domänen scheinen eine wichtige Rolle für die Protein-Protein-Interaktion bei den eukaryotischen Translationsinitiationsfaktoren eIF4G I und eIF4G II mit der ATP-abhängigen RNA-Helikase eIF4A zu spielen (Ponting, 2000). Mit Hilfe einer Co-Immunoprecipitation, dem Yeast-two-hybrid-system (Y2H) und konfokaler Immunfluoreszenz-mikroskopie zeigte sich eine Interaktion zwischen eIF4A und Pdc4, in der Pdc4 translationshemmend wirkt (Göke, 2002; Yang, 2003). Zudem wurde nachgewiesen, dass Pdc4 die Helikaseaktivität von eIF4A konzentrationsabhängig inhibiert. Nachweislich verliert eIF4G unter Verlust der MA-3 Domänen des Pdc4-Proteins fast komplett seine Bindungsfähigkeit (Yang, 2003). Nach Entschlüsselung der Struktur der C-Terminalen MA-3 Domäne (MA-3c) konnte gezeigt werden, dass diese Struktur mit dem Translationsinitiationsfaktor eIF4G konkurriert und folglich über Wirkung auf die eIF4A-Domäne die Translation unmöglich macht (LaRonde-LeBlanc et al., 2007). Die Struktur der N-terminalen MA-3 Domäne (MA-3n) ist der der MA-3c sehr ähnlich. Funktionell unterstützt sie die Wirkung der MA-3c-Domäne und bewirkt somit eine höhere Affinität zur Bindung an eIF4A (Suzuki et al., 2008).

Pdcd4 wird an den Aminosäuresequenzen Ser⁶⁷ und Ser⁴⁵⁷ spezifisch von der Akt/Protein kinase B phosphoryliert (Palamarchuk et al., 2005), wodurch zum einen seine inhibitorische Wirkung auf die AP-1 gesteuerte Transkription gesenkt und zum anderen sein Zellkerntransport ermöglicht wird. Eine weitere Struktur, die eine wichtige Rolle in der Regulation des Pdcd4 zu spielen scheint, ist eine Bindungsstelle auf mRNA-Ebene für miR-21 an Position 228-249 im 3'- nicht translatierten Bereich (3'-UTR) (Asangani et al., 2008).

1.6.2 Lokalisation

Die Lokalisation von Pdcd4 wird noch kontrovers diskutiert. Studien mit Ovarial-, Hautplattenepithel- und Kolorektalkarzinomen belegten, dass es sich in gesunden Zellen im Zellkern bzw. im perinukleären Zytoplasma und in malignen Tumorzellen im Zytoplasma befindet (Wei et al. 2009; Matsushashi et al., 2007; Mudduluru et al., 2007). Diese Beobachtungen werden nicht von allen Arbeitsgruppen geteilt. In benignem Brustgewebe zeigt sich eine vorwiegende Zytoplasmafärbung bei nur 10 % leicht positiven Kernen, während die Cis-Tumore eine deutlichere Kernfärbung und die duktaalen Mammakarzinome wieder eine vermehrte Zytoplasmafärbung bei insgesamt verminderter Intensität zeigten (Wen et al., 2007). In Hepatozellulären Karzinomen und Gliomen konnte bei den gesunden Kontrollgeweben eine Zytoplasmalokalisation von Pdcd4 gezeigt werden (Zhang et al., 2006; Gao et al., 2007). Die Theorie einer Shuttle-Funktion zwischen Zellkern und Zytoplasma, die in unterschiedlichem Gewebe auch unterschiedlich arbeitet, könnte diese konträren Forschungsergebnisse erklären (Böhm et al., 2003; Lankat-Buttgereit et al., 2008a). Die Phosphorylierung scheint ebenfalls Einfluss auf die Lokalisation zu haben. So konnte gezeigt werden, dass phosphoryliertes Pdcd4 im Nukleus und nicht phosphoryliertes Pdcd4 eher im Zytoplasma vorzufinden ist (Palamarchuk et al., 2005).

1.6.3 Expression und Regulation

Pdcd4 wird in allen Geweben des menschlichen Körpers exprimiert. Die Regulation der Expression scheint sich auf verschiedenen Ebenen mit unterschiedlichsten Mechanismen abzuspielen. Höchste Werte wurden in der Leber gemessen (Lankat-Buttgereit und

Göke, 2003). Thymus, Gehirn, Niere, Lunge, Milz und Haut gehören ebenfalls zu stark Pcd4 exprimierenden Geweben, während Herz- und Skelettmuskulatur geringe Expressionen zeigten (Shibahara et al., 1995; Onishi et al., 1998). Es wird während der Apoptose vermehrt exprimiert und durch pro-apoptotische Substanzen wie Dexamethason, Ionomycin und PMA ebenfalls hochreguliert (Shibahara et al., 1995). Topoisomeraseinhibitoren, UV-Irradiation und Cytarabin konnten keine Effekte nachgewiesen werden, obwohl diese als Apoptoseinitiatoren bekannt sind (Onishi et al., 1998). Endogene Substanzen, wie z.B. Zytokine zeigen je nach Interleukin unterschiedliche Auswirkungen auf Pcd4. IL-12 verstärkt die Genexpression von Pcd4, während IL-2 und IL-15 sie hemmen (Azzoni et al., 1998). Eine erhöhte Expression konnte während der Granulozyten-differenzierung von AML-Zellen jedoch nicht in der Monozyten- und Makrophagendifferenzierung festgestellt werden (Ozpolat et al., 2007). Eine Überproduktion von FAS-Liganden (Göke et al., 2002) und SOX15 (Yan et al., 2007) und die Differenzierungsstimulatoren ATRA, DMSO und Arsentrioxid konnten die Pcd4-Expression steigern (Ozpolat et al., 2007). Beispiele für benigne, sich schnell teilende Zellen mit erhöhter Pcd4-Expression sind die Epidermis und die Haarfollikel (Matsushashi et al., 2007). Erhöhte Pcd4-Werte zeigten Zellen mit fortgeschrittenem zellulären Alterungsprozess (Kang et al., 2007) sowie ein Mäuseembryo, das sich im 8-Zellstadium befand (Jurisicova et al., 1998). Cox-2-Inhibitoren und RAR-Agonisten, die eine antikanzerogene Wirkung aufweisen, stimulieren die Pcd4-Expression (Zhang und DuBois, 2001; Afonja et al., 2004), was auf eine mögliche Rolle in der Tumorthherapie hinweist. Zudem konnten Studien mit Antiöstrogenen, HER2/neu Antagonisten, 5-Flururacil (Lankat et al., 2008; Afonja et al., 2004; Wen et al., 2007; Zhang und DuBois, 2001) und dem Linolsäuremetaboliten 13-Hydroxy-10-Oxo-*trans*-11-6-Octadecenoic-acid (13-HOA) (Yasuda et al., 2007) eine gesteigerte Pcd4-Expression indizieren.

Ein schon deutlich besser erforschter Regulationsmechanismus auf der Translations-ebene ist die hemmende Wirkung der micro-RNA 21 (miR-21) in der TGF- β Signalkette, die bei malignen Prozessen vermehrt vorliegt. Als Micro-RNAs bezeichnet man nicht-co-dierende RNAs, die Einfluss auf die Translation der Ziel-mRNA, Prozesse der Differenzierung, Proliferation und Apoptoseinhibition, sowie auf die Karzinogenese und Tumorpheression haben (Wang und Lee, 2009). Unter Einfluss des TGF- β wird miR-21 vermehrt exprimiert, was eine verminderte Expression von Pcd4 impliziert (Davis et al.,

2008). Die Regulation scheint auf translationaler Ebene durch Bindung der miR-21 an die 3'-UTR-Region des Pdc4 abzulaufen. Vermehrte miR-21 Expression führt zudem zu einer Induktion der Invasion, Intravasation und Metastasierung von Tumorzellen in der Probenkultur (Asangani et al., 2008). Dieser Wirkmechanismus konnte schon durch viele weitere Versuche bestätigt werden (Frankel et al., 2008; Lu et al., 2008; Zhu et al., 2008). Während beim Prostatakarzinom keine Regulierung von Pdc4 durch miR-21 gezeigt werden konnte (Folini et al., 2010), ergaben Untersuchungen von Plattenepithelkarzinomen des Kopfes und Halses neben einer Korrelation der Pdc4-Expression mit der miR-21 auch einen Zusammenhang mit der miR-103 und miR-107 (Ramdas et al., 2009). Zudem könnte auch die miR-155 eine regulatorische Rolle für die Expression von Pdc4 spielen (Matsushashi et al., 2007).

Auf Proteinebene konnte der inhibitorische Einfluss von Phosphorylierungsprozessen durch die pAkt und S6K1 nachgewiesen werden, was zu einer Ubiquitinmarkierung durch die Ubiquitin Ligase SCF β TRCP führt und die anschließende proteosomale Zersetzung des Pdc4 einleitet (Dorrello et al., 2006; Schmid et al., 2008). Durch Fluvostatin wurde die Expression der pAkt und S6K1 in klarzelligen Nierenzellkarzinomzellen gehemmt, was eine vermehrte Expression von Pdc4 zur Folge hatte (Woodard et al., 2008). Den gleichen Effekt konnte eine Arbeitsgruppe bei CML-Zellen durch Hemmung der BCR-abl-Kinase und der mTOR-Kaskade nachweisen (Carayol et al., 2008).

Die Transkription von Pdc4 wird durch Transkriptionsfaktoren wie v-myb (Schlichter et al., 2001) und c-myb (Appl und Klempnauer, 2002) induziert. Der Demethylierung von DNA konnte in Leberkarzinomzellen eine stimulierende Wirkung auf Pdc4 nachgewiesen werden (Fan et al., 2007), während diese in Mammakarzinomzellen keine Rolle zu spielen scheint (Wen et al., 2007).

Unabhängig von den uneinheitlichen Expressionsmuster in benignen Zellen wurden in verschiedensten malignen Geweben verminderte Pdc4-Expressionen gefunden. Dazu gehören das kleinzellige Bronchialkarzinom (Chen et al., 2003), Gliome (Gao et al., 2007,2008), Niere (Jansen et al., 2004), Zunge (Carinci et al., 2004), Leber (Zhang et al., 2006), Haut (Matsushashi, et al.,2007), invasiv-duktales Mammakarzinom (Wen et al., 2007), Nasopharyngealkarzinom (Fang et al., 2007) und Kolonkarzinom (Mudduluru et al., 2007).

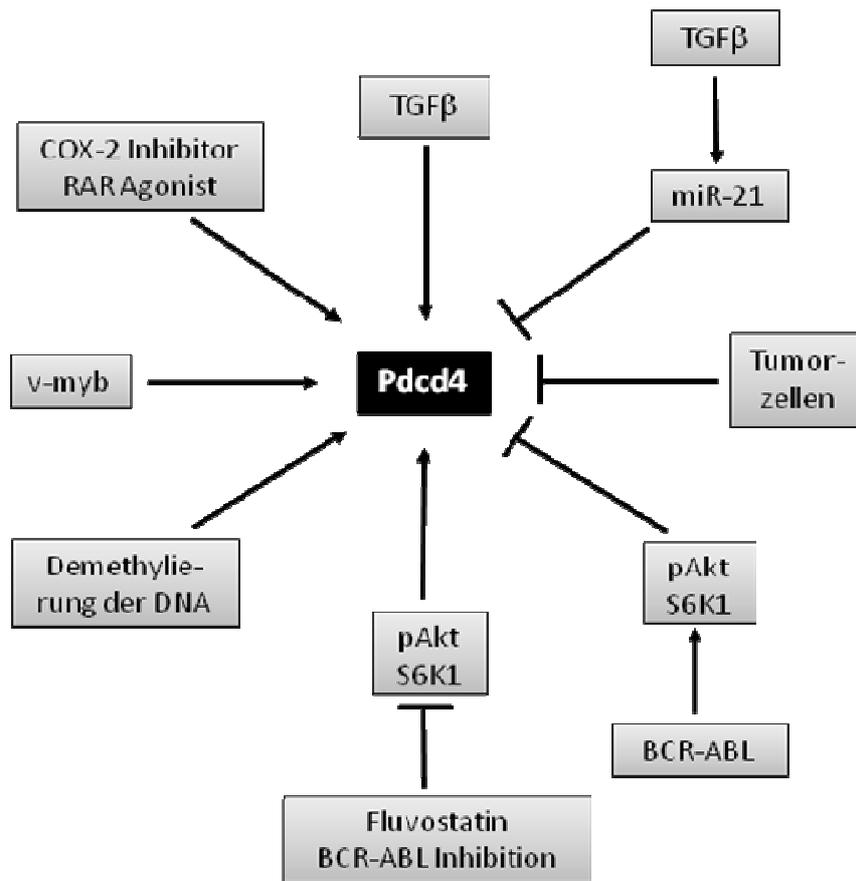


Abb. 2: Schematische Darstellung der Regulationsmechanismen von Pdc4

Die Abbildung stellt die wichtigsten Regulationsmechanismen, die Einfluss auf die Expression und Wirkung von Pdc4 haben, dar (modifiziert nach Lankat-Buttgereit et al., 2010)

1.6.4 Funktion

Pdc4 scheint an unterschiedlichen Stellen des Zellzyklus das Zellwachstum zu regulieren. Die translationsinhibitorische Wirkung der MA-3 Domänen von Pdc4 konnte bereits vielfach nachgewiesen werden. Erste Nachweise auf eine Tumorsuppressorgenaktivität erbrachte der Transformationsversuch von Promotorresistenten JB6 Zellen (P-) zu Promotorsensitiven (P+) durch Knockdown von Pdc4 über eine Transfektion mit rRNA Pdc4. Die Pdc4-Expression war, im Gegensatz zu den P+ Sub-Klonen, in den P-Klonen erhöht (Cmarik et al., 1999). Zudem reichte die Überexpression von Pdc4 in P+ Zellen aus, um PMA-induzierte Transformation zu hemmen (Yang et al., 2001). Die Überexpression von Pdc4 in einer anderen JB6 Zellreihe (RT101) ergab weniger unabhängige Kolonien (Yang et al., 2003b). Diese PMA-induzierte Transformation ist von den

Transkriptionsfaktoren AP-1 und -NF κ B abhängig (Hsu et al., 2000), die in ihrer Aktivität durch Pdcd4 gehemmt werden konnten (Yang et al., 2001). Dieser Effekt konnte zudem durch verminderte Phosphorylierung der c-Jun durch die Jun N-terminale Kinase (JNK) (MAPK) erzielt werden (Bitomsky et al., 2004), da Pdcd4 die Expression der MAP4K1, einer, der JNK in der Signaltransduktionskette vorgeschaltete Kinase, inhibiert (Yang et al., 2006). Zudem konnte sowohl in Pdcd4 „knockdown“ Zellreihen des Kolonkarzinoms als auch durch Phosphorylierung von Pdcd4 eine Stimulation der AP-1 abhängigen Transkription gezeigt werden. Des Weiteren initiiert die verminderte Expression von Pdcd4 über erhöhte β -Catenin/ Tcf-abhängig Transkription und verminderte E-Cadherinbildung die Zellinvasion, Intravasation und Metastasenbildung von Tumoren (Wang et al., 2008). Die Expression des Urokinase-Rezeptors (uPAR), der ein wichtiger Promoter für die Tumorzellinvasion und Metastasierung ist, wird ebenfalls durch Pdcd4 positiv reguliert. Der genaue Mechanismus ist noch nicht verstanden. Man geht von einer Inhibition durch Phosphorylierung der uPAR-Gen Promotorregion Sp1/Sp3, von Phosphorylierung von Sp1/SP3 Transkriptionsfaktoren oder von direkter Interaktion auf Translations-ebene der Sp1-Region aus (Leupold et al., 2007). Ein für die Tumorentstehung, den Zellzyklus und die Zelldifferenzierung wichtiges Protein, das auf transkriptionaler oder translationaler Ebene von Pdcd4 reguliert wird, ist die Carboanhydrase Typ II (CA II), welche von Tumorzellen in erhöhten Mengen zum Wachstum benötigt wird. Da sich unter Pdcd4-Einfluss nur die Proteinkonzentration des CAII verminderte, nicht jedoch ihre mRNA Konzentration, ist von einer Regulation, die sich nur auf der Translationsebene abspielt, auszugehen (Lankat-Buttgereit et al., 2004). Das Protein TIMP-2, das die Zellinvasion hemmt, wird unter Pdcd4-Einfluss vermehrt exprimiert (Nieves et al., 2009). In neuroendokrinen Tumorzelllinien zeigte sich bei erhöhtem Pdcd4-Gehalt eine Vermehrung des p21^{Waf1/Cip1}. Dieses vermindert CDK4/6 und CDK2 und ermöglicht somit die Bindung von Rb an E2F/DP, das durch Reprimierung des CDK1/cdc2 Promotors die Zellproliferation inhibiert (Göke et al., 2004). In anderen Experimenten wurden bei anderen Zellentitäten gegensätzliche Ergebnisse erzielt, was wieder auf die bereits erwähnte Zellspezifität von Pdcd4 hindeutet. Hier korrelierte eine Hemmung der Pdcd4-Expression mit vermehrten p53-abhängigen Proteinen, wie p21^{Waf1/Cip1}, die in Zellen mit DNA-Schäden die Apoptose verhinderten (Bitomsky et al., 2008; Ozpolat et al., 2007). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Pdcd4 die Freisetzung von Chromogranin A

(CgA), einem diagnostischen Marker neuroendokriner Tumoren, und Secretogranin II (Sg II) hemmt und die intrazelluläre Konzentration von Proprotein Convertase 1/3 (PC1) senkt. Das aktivierte pAkt scheint in diesem Mechanismus eine entscheidende regulatorische Rolle zu spielen. Akt wird durch die Phosphoinositide-3-Kinase (PI3K) aktiviert, was zu einer höheren Phosphorylierung und somit Inaktivierung von Pdc4 und mangelnder Interaktion von Pdc4 mit dem Transkriptionsfaktor AP-1 führt. Es scheint ein autokriner Regulationsmechanismus zu sein (Lankat-Buttgereit et al., 2008b). Eine negative Korrelation von pAkt und Pdc4-Konzentration konnte bereits im Kolonkarzinom und Adenom im Vergleich zu gesunder Darmmukosa gefunden werden (Mudduluru et al., 2007). In AML-Zellen konnte nachgewiesen werden, dass ein Mangel an Pdc4 über die PI3K/Akt/mTOR-Kaskade das für die Granulozytendifferenzierung wichtige ATRA (all-trans-retinoic acid) Protein hemmt (Lankat-Buttgereit et al., 2008b). In Monozyten und Makrophagen konnte bis jetzt noch kein Einfluss von Pdc4 nachgewiesen werden. Pdc4 interagiert mit dem Transkriptionsfaktor Twist1, indem es dessen Funktion hemmt und die Transkription der Folgeprodukte wie YB-1 und das damit verbundene Zellwachstum hemmt (Shiota et al., 2009).

Die meisten Erkenntnisse über Pdc4 wurden aus in-vitro Experimenten gewonnen. Es gibt jedoch auch schon aussagekräftige Tierversuche. Zum Beispiel zeigten Mäuse mit erhöhter Pdc4-Konzentration in der Epidermis im Vergleich zum Wildtyp signifikant geringere Bildung von Papillomen sowie verminderte Konversion von Papillom zu Karzinom und eine niedrigere Karzinominzidenz. In den Keratinozyten dieser Mäuse konnte eine verminderte AP-1 Aktivität sowie eine verminderte Konzentration an Ornithindecaboxylase und CDK4 nachgewiesen werden (Jansen et al., 2005). Unter Verwendung eines Pdc4-Aerosols konnte in K-ras-Null Mäusen und AP-1 Luciferase-Reporter-Mäusen die Zellproliferation, die Tumorangiogenese und die AP-1 Aktivität inhibiert sowie die Apoptose in den Lungen erleichtert und wichtige proangiogenetische Faktoren (VEGF und EGF-2) unterdrückt werden (Jin et al., 2006; Hwang et al., 2007). Pdc4-defiziente Tiere entwickelten spontan Lymphome, was vermutlich auf die erhöhte Expression von IL4 und/oder IL10 durch die Splenozyten zurückzuführen ist (Hilliard et al., 2006). Die Beobachtung, dass Pdc4-knockout Mäuse resistent gegen inflammatorische Krankheiten und Streptozotocin-induzierten Diabestes Mellitus sind ist auf die erhöhte PC1 Konzentration, die in den Insulinstoffwechsel eingreift, zurückzuführen und lässt vermu-

ten, dass Pdc4 nicht nur in die Tumorentstehung interagiert, sondern auch in anderen Krankheitsprozessen eine Rolle spielen könnte (Lankat-Buttgereit et al., 2008b). In verschiedenen Studien konnte eine Pdc4 abhängige Sensitivität verschiedenster Tumore für Chemotherapeutika gefunden werden. Bei höheren Pdc4-Werten zeigte sich eine bessere Wirksamkeit von Geldanamycin bei Mamma- und Nierenzellkarzinomen. Mammakarzinome waren zusätzlich sensitiver für Tamoxifen. Da beide Medikamente über das Hitzeschockprotein 90 (HSP90) wirken, wird ein regulatorischer Zusammenhang von diesem HSP90 mit Pdc4 vermutet (Jansen et al., 2004). Des Weiteren konnte in Nierenzellkarzinomen durch Rapamycin, das bekanntlich mTOR hemmt, eine vermehrte Pdc4-Expression gemessen werden (Woodart et al., 2008). In neuroendokrinen Pankreas- und Mammakarzinomzellen erhöhte sich die Sensitivität für 5-Fluoruracil und Farnesol bei erhöhter Pdc4-Expression und gleichzeitig verminderter dUTPase Konzentration. Es wird angenommen, dass Pdc4 über eine Hemmung der dUTPase die Sensitivität für bestimmte Chemotherapeutika erhöht (Lankat et al., 2008). In einer anderen Studie konnte eine Pdc4-abhängige höhere Sensitivität für Paclitaxel und Cisplatin in der Prostatakarzinomtherapie nachgewiesen werden (Shiota et al, 2009). Darüber hinaus konnten bereits in einigen Tumorentitäten signifikante Korrelationen von niedriger Pdc4-Expression und schlechterer Differenzierung, geringerem Überleben und Tumorprogression gefunden werden, was auf die Funktion eines unabhängigen Prognosefaktors hinweist. Dazu gehörten das Ovarialkarzinom (Wei et al., 2009), Gliomatumore (Gao et al., 2008), sowie Kolonkarzinome (Mudduluru et al., 2007). In hepatozellulären Karzinomen konnte zudem gezeigt werden, dass hohe Pdc4-Expression mit geringerer Metastasierung einhergeht (Zang et al., 2006).

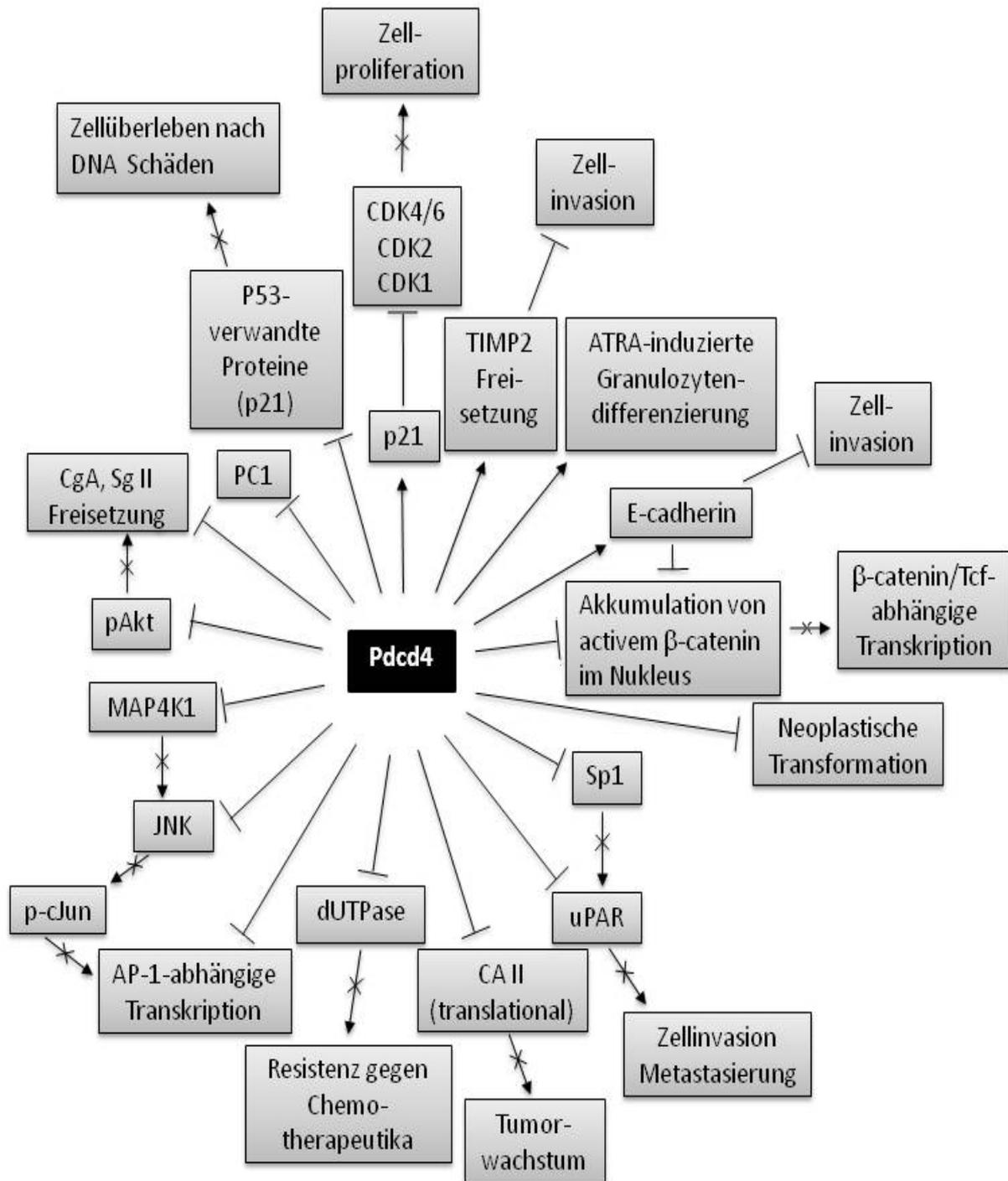


Abb. 3: Schematische Darstellung der Funktionsmechanismen von Pcd4

Die Abbildung zeigt eine Auswahl der wichtigsten Funktionen von Pcd4. (Modifiziert nach Lankat-Buttgereit et al., 2010)

2. Ziel dieser Arbeit

Die Funktion und Regulation von Pdc4 ist trotz intensiver Forschung nicht ausschöpfend geklärt. Die aktuelle Studienlage belegt eine tumorsuppressive Funktion des aktiven Gens auf Transkriptions- und Translationsebene. Da von einer tumorspezifischen Wirkungsweise ausgegangen wird, ist es wichtig, Pdc4 in verschiedenen Tumoren zu erforschen. Bisweilen gibt es keine Studie, die alle urologischen Tumoren im Zusammenhang mit Pdc4 untersucht.

Ziel dieser Arbeit ist es, anhand von immunhistochemischer Färbung die Expression von Pdc4 in urologischen Tumoren zu untersuchen und eine mögliche Bedeutung von Pdc4 für deren Diagnostik, Prognose und Therapie zu finden. Denn die urologische Onkologie verfügt zum Teil über keine oder teils unspezifische Tumormarker und auch die therapeutischen und prognostischen Mittel zeigen Verbesserungsbedarf.

Zunächst soll untersucht werden, ob Pdc4 in Blasen-, Nieren-, Hoden-, Prostata- und Peniskarzinom im Vergleich zu gesundem Gewebe herunterreguliert ist und somit die These einer tumorsuppressiven Wirkung stützen kann. Zudem soll sich zeigen, ob die Pdc4-Expression mit der Tumordinvasivität nach TNM-Klassifikation und der Zelldifferenzierung, analysiert durch das Grading, korreliert und inwiefern Pdc4 als diagnostisches Mittel eingesetzt werden kann. Dies ist besonders bei dem Blasenkarzinom von großer Bedeutung. Wie bereits erwähnt, fehlt ein diskriminativer Marker für die Unterscheidung zwischen MIBC und NMIBC. Da Pdc4 in der Literatur schon als Prognosefaktor für verschiedenste Malignome beschrieben wurde, sollte auch bei den urologischen Tumoren diese Funktion anhand von Vergleichen der Pdc4-Expression mit dem Rezidivfreien- und dem Tumorspezifischen Überleben untersucht werden. Da die Lokalisation von Pdc4 in der Zelle kontrovers diskutiert wird, ist die Beobachtung der zytoplasmatischen bzw. nukleären Färbung in dieser Arbeit ein interessanter Teilaspekt.

Aufgrund hochsignifikanter immunhistochemischer Expressionsmuster der Blasenkarzinomproben verglichen wir zusätzlich diese Ergebnisse mit der miR-21 Expression, um somit eine Pdc4-Regulationskaskade, die sich bereits in einigen Tumorentitäten zeigte, nachzuweisen.

3. Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Geräte

Grundschlittenmikrotom	Fa. Leica, Wetzlar, Deutschland
Analysenwaage BP 2100S	Fa. Sartorius, Göttingen, Deutschland
Mikrowelle HMT 702A	Fa. Bosch, München, Deutschland
Laborkühlschrank	Fa. Siemens, München, Deutschland
Brutschrank	Fa. Heraeus, Hanau, Deutschland
DAKO TechMate™ 500	Fa. DAKO, Glostrup, Dänemark
Pannoramic MIDI Scanner	Fa. 3DHISTECH, Budapest, Ungarn
Nanodrop 2000	Fa. Peqlab, Erlangen, Deutschland
ABIPrism 7900HT	Fa. Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
UNO Thermoblock	Fa. Biometra, Göttingen, Deutschland
Multi-Tissue-Stanze LD120 SM5-X,	Fa. Lika Electronic, Carré, Italien
Thermocycler UNO-Thermoblock,	Fa. Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland

3.1.2. Labor- und Verbrauchsmaterialien

Kapillarspalt-Objektträger ChemMate™	
Capillary Gap Mikroskope Slides 75µm	Fa. Dako, Glostrup, Dänemark
diverse Pipetten	Fa. Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen mit Filter gestopft	Fa. Axygen Inc., Ca 94587, USA

3.1.3 Chemikalien und Lösungen

Die im Folgenden aufgeführten Chemikalien wurden in Analysequalität und im höchsten erhältlichen Reinheitsgrad erworben. Ihre Lagerung erfolgte gemäß Herstellerangaben.

Xylol	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol 98 %	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol 90 %	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol 70 %	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Trispuffer	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Citratpuffer pH 6,0	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland

Antibody Diluent	Nr. S0809, Fa. Dako, Glostrup, Dänemark
Mayers Hämalaun-Lösung	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland Eindeckmittel
Aquatex	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland

3.1.4 Chemikalien für den DAKO TechMate™ 500

Dako REAL™ Detection Systems (LSAB+)	Nr. K5003, Fa. Dako, Glostrup, Dänemark
--------------------------------------	--

(bestehend aus:

Dako REAL™ Biotinylated Secondary Antibodies (AB2)

Dako REAL™ Streptavidin Peroxidase (HRP)

Dako REAL™ AEC/H₂O₂ Substrate Solution (CHROM))

Buffer-Kit	Katalog-Nr. K5006
------------	-------------------

Blockingsolution	Katalog-Nr. S2023
------------------	-------------------

Hematoxylin	Katalog-Nr. S2020
-------------	-------------------

Antibody Diluent	Katalog-Nr. S2022
------------------	-------------------

3.1.5 Antikörper

Anti - Pdcd4	Katalog-Nr. 600-401-965 Rockland, Philadelphia, USA bezogen über Biomol, Hamburg, Deutschland
--------------	---

3.1.6 PCR Kits

Die Kits wurden entsprechend der Herstellervorschriften gelagert. Zur Vermeidung von Verunreinigungen und mehrfachem Einfrieren wurden Aliquots hergestellt.

Recover All™ Total Nucleic Acid Isolation Kit	AM1975, Ambion, Carlsbad, Kalifornien, USA
miScript Reverse Transcription Kit	Nr. 218061, Qiagen, Hilden, Deutschland
miScript SYBR® Green PCR Kit	Nr. 218073, Qiagen, Hilden, Deutschland

3.1.7 Primer

miR21:	MS00009079, Qiagen, Hilden, Deutschland
RNU1A-1:	MS00013986, Qiagen, Hilden, Deutschland
RNU6B:	MS00014000, Qiagen, Hilden, Deutschland

3.1.8 Zellkulturen

TCC-SUPP, RT4, T24 und RT112	American Type Culture Collection (ATCC), Wesel, Deutschland
------------------------------	--

(Zelllinien stammen aus humanen Urothelkarzinomen)

3.1.9 Software

Microsoft Office Word 2007	Fa. Microsoft, Redmond, USA
Microsoft Office Excel 2007	Fa. Microsoft, Redmond, USA
Package for the Social Sciences 19	SPSS, ©IBM Corporation, Somer NY, USA
Pannoramic Viewer	Fa. 3DHISTECH, Budapest, Ungarn
DataAssist Software	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
SDS 2.4	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
RQ Manager 1.2.1	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA

3.2 Methoden

3.2.1 Probengewinnung

Die Gewebeproben für die Blasen-, Nieren-, Hoden-, Prostata- Tissue Microarrays wurden während Operationen in der Urologie des Universitätsklinikums Bonn gesammelt. Die Peniskarzinom Tissue Microarrays basieren auf urologischem Operationsmaterial der Universitätskliniken Bonn und Regensburg. Die Fixierung in Formalin und die Einbettung in Paraffin erfolgte innerhalb von 48 Stunden. Die Verwendung der Gewebeproben wurde von der Ethikkommission der Universität Bonn unter der Ethiknummer 199/10 genehmigt und die Untersuchungen wurden auf Grundlage der revidierten Deklaration von Helsinki des Weltärztebundes 1983 und den entsprechenden gesetzlichen Grundlagen durchgeführt.

3.2.2 Proben des Blasenkarzinoms

Für die immunhistochemische Untersuchung wurden 122 nicht muskelinvasive, 119 muskelinvasive und 25 Metastasen von Blasenkarzinomen, sowie 28 benigne Urothelproben als Kontrollgruppe verwendet.

Klinisch-pathologische Parameter	NMIBC	MIBC	NU
n (%)	122 (45,3)	119 (44,2)	28 (10,4)
Alter: Mi, (Intervall)	66 (51-81)	68,17 (38-94)	66,46 (51-81)
Geschlecht (%)			
Männlich	99 (36,8)	86 (32)	19 (7,1)
Weiblich	23 (8,6)	33 (12,3)	9 (3,3)
Rauchverhalten (%)			
Raucher	34 (16,3)	49 (23,6)	1 (0,5)
Ehemaliger Raucher	9 (4,3)	6 (2,9)	0
Nicht-Raucher	58 (27,9)	47 (22,6)	4 (1,9)
Tumor Staging (%)			
Kontrollen	n.v.	n.v.	28 (10,4)
Ta	67 (24,9)	0	n.v.
Tis	22 (8,2)	0	n.v.
T1	33 (12,3)	0	n.v.
T2	0	41 (15,2)	n.v.
T3	0	50 (18,6)	n.v.
T4	0	28 (10,4)	n.v.
N0	122 (50,6)	79 (32,8)	n.v.
N+	0	40 (16,6)	n.v.
M0	122 (51,3)	116 (48,7)	n.v.
M+	0	5 (2,1)	n.v.
Tumor Grading (%)			
G1	47 (19,5)	0	n.v.
G2	46 (19,1)	39 (16,2)	n.v.
G3	29 (12)	80 (33,2)	n.v.

Tab. 11: Klinisch-pathologische Parameter der Blasenkarzinom-Patienten und der gesunden Kontrollgruppe

Die Tabelle zeigt eine Übersicht über die klinisch-pathologischen Parameter des untersuchten Patientenkollektivs, aufgeteilt in muskelinvasive- (MIBC), nichtmuskelinvasive Blasenkarzinome (NMIBC) und normales Urothel (NU). In Klammern stehen jeweils die Anteile am Gesamtkollektiv in Prozent. Mi, Mittelwert; T, Tumorausdehnung; N, Lymphknotenbefall; M, Metastasen; G, histologischer Differenzierungsgrad

Die Analyse der miR-21 führten wir bei 11 Patienten mit muskelinvasivem und 8 Patienten mit nicht-muskelinvasivem Blasenkarzinom durch. Von 3 der muskelinvasiven und 8 der nicht-muskelinvasiven Präparate wurde zusätzlich histologisch geprüfetes gesundes Gewebe, möglichst tumorfern, untersucht.

Klinisch-pathologische Parameter	NMIBC	MIBC	NU
n (%)	11 (25,6)	11 (25,6)	21 (48,8)
Alter: Mi, (Intervall)	70,27 (52-84)	67,91 (50-80)	47,81 (36-83)
Geschlecht (%)			
Männlich	9 (20,9)	11 (25,6)	7 (16,3)
Weiblich	2 (4,7)	0	14 (32,4)
Tumor Staging (%)			
Ta	7 (31,8)	0	n.v.
T1	4 (18,2)	0	n.v.
T2	0	2 (9,1)	n.v.
T3	0	5 (22,7)	n.v.
T4	0	4 (18,2)	n.v.
N0	11 (50)	5 (22,7)	n.v.
N+	0	6 (27,3)	n.v.
L0	11 (50)	4 (18,2)	n.v.
L1	0	7 (31,8)	n.v.
Tumor Grading (%)			
G1	4 (18,2)	0	n.v.
G2	7 (31,8)	3 (13,6)	n.v.
G3	0	8 (36,4)	n.v.

Tab. 12: Klinisch-pathologische Parameter der Blasenkarzinom-Patienten und der gesunden Kontrollgruppe für die miR-21 Untersuchung

Die Tabelle zeigt eine Übersicht über die klinisch-pathologischen Parameter des untersuchten Patientenkollektivs. In Klammern stehen jeweils die Anteile am Gesamtkollektiv in Prozent. NMIBC, Nichtmuskelinvasives Blasenkarzinom; MIBC, muskelinvasives Blasenkarzinom; NU, normales Urothel Mi, Mittelwert; T, Tumorausdehnung; N, Lymphknotenbefall; L, Lymphgefäßbefall; G, histologischer Differenzierungsgrad

3.2.3 Proben des Nierenzellkarzinoms

Das Patientenkollektiv für die TMA's der Niere umfasste 216 Patienten. Davon stammen 188 Proben aus malignem, 9 aus onkozytärem und 19 aus normalem Gewebe. Die Gruppe der Malignome setzt sich wie folgt zusammen:

Epidemiologische Parameter	Gesamt	Malignom	Onkozytom	Normal
n (%)	216 (100)	188 (87)	9 (4,2)	19 (8,8)
Alter: Mi, (Intervall)	60,23 (26-85)	60,43 (27-85)	59,11 (26-73)	58,74 (39-77)
Geschlecht (%)				
Männlich	140 (64,8)	128 (68,1)	0 (0)	12 (63,2)
Weiblich	76 (35,2)	60 (31,9)	9(100)	7 (36,8)
Tumor Staging (%)				
T1	n.v.	81 (44,8)	n.v.	n.v.
T2	n.v.	40 (22,1)	n.v.	n.v.
T3	n.v.	57 (31,5)	n.v.	n.v.
T4	n.v.	3 (1,7)	n.v.	n.v.
N0	n.v.	96 (52,5)	n.v.	n.v.
N1	n.v.	6 (3,3)	n.v.	n.v.
N2	n.v.	9 (4,9)	n.v.	n.v.
NX	n.v.	72 (39,3)	n.v.	n.v.
M0	n.v.	114 (63,0)	n.v.	n.v.
M1	n.v.	24 (13,3)	n.v.	n.v.
M2	n.v.	1 (0,6)	n.v.	n.v.
MX	n.v.	42 (23,2)	n.v.	n.v.
Tumor Grading (%)				
G1	n.v.	56 (30,9)	n.v.	n.v.
G2	n.v.	111 (61,3)	n.v.	n.v.
G3	n.v.	12 (6,6)	n.v.	n.v.
G4	n.v.	2 (1,1)	n.v.	n.v.
Subtypen				
ccRCC	n.v.	128 (59,3)	n.v.	n.v.
pRCC	n.v.	38 (17,6)	n.v.	n.v.
chRCC	n.v.	8 (3,7)	n.v.	n.v.
sRCC	n.v.	9 (4,2)	n.v.	n.v.
Andere	n.v.	4 (1,9)	n.v.	n.v.

Tab. 13: Klinisch-pathologische Parameter der Nierenzellkarzinom-Patienten

Die Tabelle zeigt eine Übersicht über die klinisch-pathologischen Parameter des untersuchten Patientenkollektivs. In Klammern stehen jeweils die Anteile am Kollektiv in Prozent. Mi, Mittelwert; T, Tumorausdehnung; N, Lymphknotenbefall; M, Metastasen; G, histologischer Differenzierungsgrad

3.2.4 Proben des Prostatakarzinoms

Die TMA's der Prostatakarzinome wurden aus Gewebeproben von 76 Prostatakarzinompatienten, 12 gesunden Kontrollen und 2 Patienten mit benigner Prostatahyperplasie erstellt.

Klinisch-pathologische Parameter	PCA	Gesund	BPH
n (%)	76 (84,4)	12 (13,3)	2 (2,2)
Alter: Mi, (Intervall)	74,14 (57-91)	66,92 (57-79)	74,5 (71-78)
PSA präoperativ (%)			
<4	9 (12,3)	2 (16,7)	0
4-10	33 (45,2)	8 (66,7)	2(100)
>10	31 (42,5)	2 (16,7)	0
Tumor Staging (%)	71 (100)	n.v.	n.v.
T1	1 (1,4)	n.v.	n.v.
T2	44 (62,0)	n.v.	n.v.
T3	24 (33,8)	n.v.	n.v.
T4	2 (2,6)	n.v.	n.v.
Gleasongrade (%)	69 (100)	n.v.	n.v.
1	0 (0)	n.v.	n.v.
2	7(10,1)	n.v.	n.v.
3	25 (36,2)	n.v.	n.v.
4	22 (29,3)	n.v.	n.v.
5	15(20,0)	n.v.	n.v.
Gleasonscore (%)	63 (100)	n.v.	n.v.
3	1 (1,6)	n.v.	n.v.
4	4 (6,3)	n.v.	n.v.
5	6 (7,6)	n.v.	n.v.
6	15 (23,8)	n.v.	n.v.
7	15 (23,8)	n.v.	n.v.
8	9 (14,3)	n.v.	n.v.
9	6 (9,5)	n.v.	n.v.
10	7 (11,1)	n.v.	n.v.

Tab. 14: Klinisch-pathologische Parameter der Prostatapatienten

Dargestellt sind ausgewählte klinisch-pathologische Parameter der in die Untersuchung einbezogenen Prostatapatienten. In Klammern stehen jeweils die Anteile am Gesamtkollektiv in Prozent. Anhand der PSA-Werte wurden die Patienten jeweils prä- und postoperativ in drei Gruppen mit den Intervallen <4, 4-10 und >10 ng/ml unterteilt. Tumorstaging, Gleasongrade und Gleasonscore geben Auskunft über die Malignität des Tumors. PCA, Prostatakarzinom; Mi, Mittelwert; PSA, Prostata spezifisches Antigen

3.2.5 Proben des Hodenkarzinoms

Die Hodenkarzinom-TMA's bestehen aus Proben von 11 Seminom-, 14 Nicht-seminompatienten und 5 gesunden Kontrollgeweben. Das Patientenkollektiv der Nicht-Seminome setzt sich zusammen aus 7 Embryonal-, 4 Chorion- und 3 Dottersackkarzinomen. Da die Mehrheit der Nicht-Seminome Mischtumoren sind, wurden teilweise von demselben Patienten Tumorproben von unterschiedlichen Entitäten gewonnen.

Klinisch-pathologische Parameter	Seminom	Nicht-Seminom	Gesund
n (%)	11 (36,7)	14 (46,7)	5 (16,7)
Alter: Mi, (Intervall)	47,1 (33-61)	27,6 (24-42)	31,6 (24-42)
Tumor Staging (%)	11 (100)	14 (100)	n.v.
T1	7 (63,6)	5 (38,5)	n.v.
T2	2 (18,2)	5 (38,5)	n.v.
T3	2 (18,2)	3 (23,1)	n.v.
NX	1 (9,1)	7 (50)	n.v.
N0	7 (63,6)	4 (28,6)	n.v.
N1	1 (9,1)	0 (0)	n.v.
N2	2 (18,2)	0 (0)	n.v.
N3		3 (21,4)	n.v.
β-HCG (%)	11 (100)	14 (100)	n.v.
Negativ	6 (54,5)	1 (7,1)	n.v.
<5000	5 (45,5)	9 (64,3)	n.v.
5000-50000	0 (0)	4 (28,6)	n.v.
AFP (%)	0	14 (100)	n.v.
0	0	2 (14,3)	n.v.
<1000	0	12 (85,7)	n.v.
Klinisches Stadium (%)	11 (100)	13 (100)	n.v.
IA	5 (45,5)	0 (0)	n.v.
IB	1 (9,1)	0 (0)	n.v.
IS	3 (27,3)	8 (61,5)	n.v.
IIA		2 (15,4)	n.v.
IIB		0 (0)	n.v.
IIC	2 (18,2)	3 (23,1)	n.v.
IGCCCG Prognose (%)	11 (100)	13 (100)	n.v.
good	11 (100)	9 (69,2)	n.v.
intermediate	0 (0)	4 (30,8)	n.v.
poor	----	0 (0)	n.v.

Tab. 15: Klinisch-pathologische Parameter der Hodenkarzinom-Patienten

Die Tabelle zeigt eine Übersicht über die klinisch-pathologischen Parameter des untersuchten Patientenkollektivs. Mi, Mittelwert; β-HCG, β-humanes Choriongonadotropin; AFP, Alphafetoprotein; T, Tumorausdehnung; N, Lymphknotenbefall

3.2.6 Proben des Peniskarzinoms

Für die Peniskarzinomstudie wurden insgesamt 100 Proben entnommen. Dabei handelte es sich um Gewebe von 63 Karzinomen, 24 gesunden Penisproben und 13 Milzbiopsien, die als Kontrollgewebe zur Verifizierung der Färbung verwendet wurden.

Klinisch-pathologische Parameter	Peniskarzinom	Gesund
n (%)	63 (72,4)	24 (27,6)
Alter: Mi,(Intervall)	11-97 (54)	
Tumor Staging (%)		
Cis	4 (6,3)	n.v.
T1	27 (42,9)	n.v.
T2	17 (27,0)	n.v.
T3	14 (22,0)	n.v.
T4	1 (1,6)	n.v.
N0	54 (83,1)	n.v.
N+	11 (16,9)	n.v.
M0	63 (96,9)	n.v.
M+	2 (3,1)	n.v.
Tumor Grading (%)		n.v.
G1	10 (16,9)	n.v.
G2	38 (64,4)	n.v.
G3	11 (18,6)	n.v.
Überleben		n.v.
Rezidivfreies Überleben	34(59,6%)	n.v.
Rezidiv	11(19,3%)	n.v.

Tab. 16: Klinisch-pathologische Parameter der Peniskarzinom-Patienten

Die Tabelle zeigt eine Übersicht über die klinisch-pathologischen Parameter des untersuchten Patientenkollektivs. Mi, Mittelwert; T, Tumorausdehnung; N, Lymphknotenbefall; M, Metastasen; G, histologischer Differenzierungsgrad

3.2.7 Tissue Microarrays

Aus den ausgewählten, paraffinierten Gewebeproben wurden Tissue Microarrays erstellt. Hierzu wurden zunächst 5 µm dicke Schnitte angefertigt und im Routinelabor der Pathologie mit der HE Färbung gefärbt. Unter lichtmikroskopischer Betrachtung dieser gefärbten Gewebeschnitte wurden Tumorgewebe bzw. Normalgewebe repräsentierende Bereiche des Präparates von einem Pathologen markiert. Diese dienten folgend als Vorlage für die Entnahme der 2 mm großen Stanzen aus dem Gewebeblock. Aus jedem Block wurden drei Proben ausgestanzt und in einen, mit passenden Löchern versehen-

en, leeren Paraffinblock eingebettet. Eine Stanze aus einem Milzgewebe in einer Ecke dient der Orientierung zur richtigen Zuordnung der Patientendaten.

Anschließend wurden die Tissue Microarrays mit dem Mikrotom in 5 μm dünne Schichten geschnitten und auf Kapillarspalt-Objektträger (Chem Mate™ Capillary Gap Mikroskope Slides 75 μm) aufgelegt. Somit konnten je drei Gewebeproben von bis zu 45 Patienten auf einem Schnitt gleichzeitig angefärbt werden. Dies bedeutet nicht nur eine material- und zeitsparende Arbeitserleichterung, sondern vermindert auch die möglichen Fehlerquellen durch unterschiedliche Färbeergebnisse aufgrund Inter Assay Varianzen. Es werden nur die für die Fragestellung relevanten Gewebeareale als definierte Fläche angefärbt, was die lichtmikroskopische Auswertung erleichtert. Zudem wird durch die Wahl von drei verschiedenen Stanzstellen die biologische Varianz des Tumorgewebes berücksichtigt. Für folgende Tumorentitäten wurden bereits bestehende TMA's verwendet: Blasenkarzinom (Schneider et al., 2011), Nierenzellkarzinom (Ellinger et al., 2010), Peniskarzinom (Rogenhofer et al., 2013) und Teile des Prostatakollektivs (Rogenhofer et al., 2012).

3.2.8 Entparaffinierung

Vor der immunhistochemischen Färbung musste das Paraffin vollständig von den Schnitten entfernt werden. Diese Entparaffinierung erfolgte in drei Arbeitsschritten. Zunächst wurden die Schnitte drei Mal für 10 min in Xylol inkubiert. Anschließend durchliefen sie eine absteigende Alkoholreihe von 100% nach 0% (Wasser) und wurden abschließend mit Tris-Puffer gespült.

3.2.9 Mikrowellenbehandlung

Um die Färbeergebnisse zu optimieren, wurden die Gewebeschnitte in der Mikrowelle bei 600 Watt für 2 Mal 15 min vorbehandelt und anschließend, nach einer zwanzigminütigen Abkühlphase, mit Tris-Puffer gespült. Dieses Verfahren macht die Aldehydvernetzungen und Demaskierung der Antigenstrukturen rückgängig.

3.2.10 Immunhistochemische Färbung

Die Immunhistochemie nach der Avidin-Biotin-Methode beruht auf dem Prinzip der Antikörper/Antigen-Verbindung. Zunächst bindet ein Primärantikörper fest an ein für ihn typisches Epitop der Gewebeprobe. Dieser Primärantikörper kann im nächsten Schritt von einem biotinylierten Sekundärantikörper erkannt werden. Die Biotinmarkierung dieses Sekundärantikörpers ermöglicht eine Bindung und Verstärkung des Färbesignals. Jede Biotin-Antikörper-Einheit reagiert mit dem Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Komplex. Der Komplex hat drei Bindungsstellen mit Biotin-Peroxidase Molekülen belegt, was zu einer Verstärkung des Signales führt. Das AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol) wird von der Peroxidase umgesetzt und bildet einen roten Farbniederschlag.

Mit dem DAKO TechMate TM 500 wurden die Gewebeschnitte semiautomatisch mittels der Streptavidin-Avidin-Methode gefärbt. Die 30-minütige Primärantikörperinkubation erfolgte bei Raumtemperatur mit 250 μ l einer Antikörper-Verdünnung im Verhältnis 1:400 pro Schnitt. Die Verdünnung wurde mit Antibody Diluent (Dako, S2022) durchgeführt. Nach einem Waschschrift mit Tris-Puffer wurden die Gewebeschnitte mit dem biotinylierten Sekundärantikörper (Dako REAL™ Biotinylated Secondary Antibodies (AB2)) für 30 min inkubiert und anschließend erneut mit Tris-Puffer gespült. Die darauffolgende Inkubation mit Streptavidin (Dako REAL™ Streptavidin Peroxidase (HRP)) dauerte ebenfalls 30 min und wurde mit einer Tris- Puffer-Spülung beendet.

Nach 5-minütiger Einwirkzeit der 3-Amino-9-Ethylcarbazol- Lösung (Dako REAL™ AEC/H₂O₂ Substrate Solution (CHROM)) erfolgte die Gegenfärbung der Zellkerne mit Hämalaun. Abschließend wurden die gefärbten Schnitte mit dem wasserlöslichen Eindeckmittel Aquatax eingedeckt und mit dem Panoramic MIDI Scanner (3DHISTECH) digitalisiert.

3.2.11 RNA Aufreinigung

3.2.11.1 Isolation der RNA aus Gewebeproben

Die RNA wurde aus formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Gewebeproben des Blasenkarzinoms, entnommen. Die bereits angefertigten HE-gefärbten Schnitte dienten der exakten Lokalisation der malignen und benignen Areale. Es wurden jeweils mindestens fünf 20 μ m dicke Schnitte angefertigt, von denen, mit Hilfe eines Skalpell und einer

Sektionsnadel, die als maligne oder benigne identifizierten Areale abgetragen und in ein Eppendorf-Gefäß gegeben wurden.

3.2.11.2 Entparaffinierung

Die RNA wurde unter Verwendung des Recover All™ Total Nucleic Acid Isolation Kit isoliert. Zunächst erfolgte eine Behandlung mit Xylol und Ethanol um die Probe zu entparaffinieren. Es wurde je 1 ml 100 % Xylol zu den Proben hinzugegeben und kurz gemischt, gefolgt von einer 3-minütigen Inkubation bei 50 °C um das Paraffin zu schmelzen. Danach wurde die Probe für 2 min bei Raumtemperatur zur Pelletbildung bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Anschließend wurde vorsichtig das Xylol abgekippt, ohne dabei das Pellet zu zerstören. Die Xylolbehandlung wurde noch einmal in gleicher Weise wiederholt, dann folgte die Waschung mit Ethanol. Hierzu wurden je 1 ml 100 % Ethanol zur Probe hinzugefügt und bei Raumtemperatur 2 min zentrifugiert. Das Ethanol wurde anschließend abgekippt, ohne das Pellet zu zerstören und die Probe noch einmal mit Ethanol gewaschen. Nach der zweiten Waschung wurde erneut zentrifugiert, das Ethanol abgekippt und, um die letzten Rückstände des Ethanols aus den Proben zu entfernen, für 120 min luftgetrocknet.

3.2.11.3 Proteaseverdau

Nach der Entparaffinierung erfolgt der Verdau mit der Protease. Hierfür werden 200 µl Digestionspuffer und 4 µl Protease zur Probe gegeben und leicht vermischt. Danach wurde diese für 60 min bei 50°C und anschließend für 15 min bei 80°C inkubiert. Es folgte eine 5 minütige Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit. Anschließend wurden 200µl Überstand in eine neue Eppendorf-Kappe überführt.

3.2.11.4 Nukleinsäureisolation

Um die Nukleinsäure isolieren zu können, muss die Probe so behandelt werden, dass die Nukleinsäure an das Silicagel der Glasfaseraufreinigungssäule bindet. Dafür wurde ein Mix aus 790 µl Additive/Ethanol (240 µl Isolation additive, 550 µl Ethanol) zur Probe hinzugegeben, der zum einen die für die Bindung der RNA benötigten kaotropen Ionen einbringt und zum anderen die Löslichkeit der RNA mittels Ethanol einstellt. Durch Auf- und Abpipettieren wurde die Probe mit dem Mix vermischt. Anschließend wurden 700 µl

dieser Mischung auf einen Filter in einem neuen Eppendorf-Gefäß pipettiert. Um die Mischung komplett auf die Säule aufzutragen, wurde das Gefäß für 30 s bei 10.000 U/min zentrifugiert und der Durchfluss anschließend verworfen. Dieser Arbeitsschritt wurde so lange wiederholt, bis die komplette Mischung gefiltert war. Danach wurde 700 μ l Wash 1 Lösung auf den Filter gegeben, die Probe bei 10.000 U/min für 30 s zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Diese drei Arbeitsschritte erfolgten danach mit Wash 2/3 Lösung. Um die auf dem Filter haftenden Nukleinsäuren von eventuellen DNA-Resten zu befreien, wurde ein DNase-Mix aus 6 μ l 10x DNase Buffer, 4 μ l DNase und 50 μ l Nuclease-freiem Wasser hergestellt und 60 μ l davon auf das Zentrum des Filters gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei Raumtemperatur war der Nukleaseverdau abgeschlossen und es folgte die Waschung zur Eliminierung der DNA-Abbauprodukte. Die Probe wurde mit 700 μ l Wash 1 Lösung bei Raumtemperatur 30-60 s inkubiert, 30 s bei 10.000 U/min zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Darauf folgte eine Waschung mit 500 μ l Wash 2/3 Lösung, anschließender Zentrifugation für 30 s bei 10.000 U/min und Verwerfen des Durchflusses. Um die Waschung abzuschließen, wurde die Probe erneut mit 500 μ l Wash 2/3 Lösung inkubiert und für 1 min bei 10.000 U/min trocken zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Zur RNA-Elution wurde der Filter in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt. 50 μ l einer auf 95 °C erwärmten Elutionslösung wurden auf die Säule gegeben, wo sie 1 min lang inkubierte. Abschließend wurde das Gefäß 30 s lang bei 10.000 U/min zentrifugiert und der Durchfluss, der die isolierte miRNA und mRNA enthält, bei -80 °C gelagert. Die Quantifizierung der isolierten RNA wurde photometrisch mit dem Nanodrop 2000 durchgeführt. Zunächst wurde das Gerät mit RNase-freiem Wasser kalibriert. Anschließend wurde die Elutionslösung hinzugegeben und die Absorption von je 2 μ l Probenmaterial bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen und deren Konzentration über die gemessene optische Dichte und dem RNA-Faktor 40 ng/ μ l berechnet. Für die Reinheitsprüfung wurde das Adsorptionsverhältnis von 260 nm/280 nm gebildet. Dieses sollte für reine RNA nahezu 2:0 sein.

3.2.12 Reverse Transkription

Die PCR arbeitet mit der Taq-Polymerase. Sie ist eine DNA-Polymerase und benötigt eine DNA-Vorlage. Deshalb wird die RNA in einen komplementären DNA-Strang über-

führt. Dieser Vorgang, der als reverse Transkription bezeichnet wird, erfolgt mit Hilfe eines Oligonukleotidprimers, dem oligo-dT Primer, der am Poly(A)-Schwanz der mRNA bindet und in 3'-5' Richtung hybridisiert. Anders als die mRNA verfügt die miRNA über keinen Poly(A)-Schwanz und muss daher zunächst von einer Poly(A)-Polymerase polyadenyliert werden. Eine weitere Besonderheit ist der „universal tag“, eine Nucleinsäuresequenz, die am 5'-Ende des Oligonukleotidprimers angehängt ist. Sie verlängert die neu gebildete cDNA um den Bereich, an dem in der Realtime PCR der Reverse Primer bindet. Dadurch werden die ca. 20 Basenpaar-kurzen miRNAs erst messbar.

In dieser Arbeit wurde der miScript Reverse Transcription Kit nach Herstellerangaben verwendet. Zunächst wurden die tiefgefrorenen RNA-Proben, der miScript RT Puffer und das RNase-freie Wasser bei Raumtemperatur aufgetaut, zentrifugiert und anschließend auf Eis gelegt. Danach wurde ein Mix, wie in Tabelle 18 angegeben, hergestellt, welcher alle für die Bildung des ersten cDNA-Strangs benötigten Substanzen enthielt. Die Lösungen wurden für 60 min bei 37 °C inkubiert und anschließend für 5 min auf 95 °C erhitzt um die Enzyme zu inaktivieren. Im Anschluss wurde die gebildete cDNA im Verhältnis 1:2 mit destilliertem Wasser verdünnt. Danach wurden die Eppendorf-Gefäße wieder auf Eis gelegt und direkt mit der RT-qPCR begonnen.

Komponenten	Volumen
miScript RT Puffer 5x	4 μ l
RNase-freies Wasser	variabel
miScript Reverse Transcriptase Mix	1 μ l
Proben-RNA 0,5 μ g	variabel
Gesamtvolumen	20 μ l

Tab. 17: Teilvolumina des 20 μ l Reverse Transkription-Reaktionsansatzes

Die Tabelle zeigt die Teilvolumina der zur Reverse Transkription – Reaktion eingesetzten Reaktionspartner

3.2.13 Quantitative Realtime-PCR

Die Quantitative Echtzeit qPCR beruht auf den Grundprinzipien der PCR, die das Standardverfahren zur Vervielfältigung spezifischer DNA-Sequenzen darstellt. Im Reaktionsansatz werden außer der DNA-Vorlage eine hitzestabile DNA-Polymerase, Nucleotide und Pufferlösungen sowie zwei Oligonukleotid-Primer benötigt. Eine Verdopplung besteht aus drei Schritten (ein kompletter Zyklus), die in einem Thermocycler stattfinden: Denaturierung, Primer Anlagerung (Annealing) und Verlängerung (Elongation).

In diesem Kit wird eine Hotstart-Taq-Polymerase verwendet, die erst durch das Erhitzen aktiviert wird. Zu Beginn der PCR, der Initialisierung, wird die Reaktionsmischung für 15 min lang erhitzt, um sicherzustellen, dass sich die komplette DNA sowie die Primer in Einzelstränge lösen und die Taq-Polymerase aktiv wird.

1. Denaturierung: Die Matrizen-DNA wird durch Erhitzen auf 95 °C durch Lösung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den beiden DNA-Strängen in ihre Einzelstränge geteilt. In den folgenden Zyklen reicht eine 15-sekündige Erwärmung auf 94 °C zur Denaturierung aus.

2. Annealing (Hybridisierung der Primer): Die beiden spezifischen Oligonukleotid-Primer lagern sich durch Abkühlung der Lösung auf Temperaturen zwischen 40-70 °C an den komplementären Einzelstrang an. Die optimale Temperatur hängt unter anderem von der Länge der Primer und deren Basenzusammensetzung ab. In unserem Fall lag sie bei 55 °C für 30 s. Da die Primer spezifisch für die erwünschten DNA-Sequenzen sind, lenken sie die DNA-Polymerase so, dass nur komplementäre Stränge dieser Ziel-DNA synthetisiert werden.

3. Elongation (DNA-Synthese): Danach wird die Probe auf die optimale Temperatur für die Taq-Polymerase (70 °C) erhitzt. Diese füllt vom 3'-Ende des Primers aus die Lücken am DNA-Strang mit freien Nukleotiden auf. Für kurze PCR-Produkte sind dafür 30 s ausreichend. Ein neuer Reaktionszyklus beginnt, indem man nach der Elongationsphase die Probe wieder auf die Denaturierungstemperatur erhitzt. Normalerweise umfasst eine PCR ca. 40 Zyklen. Diese Zahl ist jedoch variabel und hängt vor allem von der DNA-Ausgangskonzentration ab.

Der Vorteil der Quantitativen Echtzeit PCR ist, dass zeitgleich zur Vervielfältigung die DNA mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen quantifiziert werden kann. Es werden spezielle Farbstoffe verwendet (z.B.: SYBR green), die sich an die Doppelstrang-DNA anlagern und somit proportional zur steigenden DNA-Menge von Zyklus zu Zyklus ein immer stärkeres Fluoreszenzresultat liefern.

Die Messung wurde in 10 µl Reaktionslösung, wie in Tabelle 18 dargestellt, als Dreifachbestimmung durchgeführt. Das Versuchsprotokoll ist in Tabelle 19 beschrieben. Für jeden Primer wurden neben den Gewebeproben, die Zelllinien (TCC-SUPP, RT4, T24 und RT112 Zellreihen) als Positiv- und reines Wasser als Negativkontrolle bearbeitet.

zu amplifizierende DNA	1 μ l (12,5 ng/ μ l)
SYBR green master mix	5 μ l
Universal reverser Primer	1 μ l
miR-21 oder RNU spezifischer Primer	1 μ l
RNase freies Wasser	2 μ l
Gesamtvolumen	10 μ l

Tab. 18: Teilvolumina des 10 μ l PCR- Reaktionsansatzes

Die Tabelle zeigt die Teilvolumina der zur PCR- Reaktion eingesetzten Reaktionspartner

Einzelne Arbeitsschritte der RT-PCR	Dauer und Temperatur der Einzelschritte
Initialisierung	15 min 95 °C
Denaturierung	15 sek 94 °C
Annealing (Hybridisierung der Primer)	30 sek 55 °C
Elongation	30 sek 70 °C
Anzahl der Zyklen	40

Tab. 19: Versuchsprotokoll der RT-PCR

Die Tabelle zeigt die Temperatur und Zeiteinstellungen der Einzelschritte der RT-PCR

Mit Hilfe der DataAssist Software wurde die miR-21 Expression nach der $\Delta\Delta$ -Ct-Methode berechnet. Mit dem RQ Manager 1.2.1 wurde relative Quantifizierung mit einem Normalgewebe als Kalibrator berechnet. Gegen die Referenzgene RNU6 und RNU1 wurden die Ergebnisse mit der DataAssist Software normalisiert. Als Referenzprobe wurde die Expression der miR-21 in einer gesunden Gewebeprobe als 1 definiert und die Ergebnisse des restlichen Patientenkollektivs daran relativiert. Die Werte werden als „fold change“ dargestellt. Somit zeigen Werte größer 1 eine stärkere und Werte kleiner 1 eine schwächere miR-21 Expression als gesundes Gewebe.

3.2.14 Statistische Analyse

Unter Verwendung des Panoramic Viewer (3DHISTECH) wurden die Färbeergebnisse der Immunhistochemie in Kooperation mit Pathologen der Universität Bonn ausgewertet. Es wurde unterschieden zwischen der Intensität und der Quantität der Färbung von Zellkernen bzw. des Zytoplasmas. Bei der Auswertung der Nierenzellkarzinome wurde zusätzlich eine Membranfärbung erkannt und ausgewertet, während beim Blasenkarzinom aufgrund von homogenen Färbeergebnissen des Zytoplasmas auf die Zyto-

plasmaquantität verzichtet wurde. Folgende Tabelle stellt die Punktezuordnung zu den Färbeergebnissen dar, aus denen sich eine Gesamtpunktzahl errechnen lässt.

Punkte	Intensität	Quantität
0	Nicht angefärbt	0 %
1	Leicht angefärbt	< 30 %
2	Mittel angefärbt	> 30 %
3	Stark angefärbt	> 70 %

Tab. 20: Bewertungskriterien der immunhistochemischen Färbeergebnisse

Die Tabelle zeigt die Kriterien für die Intensitäts- und Quantitätsbewertung der immunhistochemischen Färbeergebnisse

Diese, die Pdc4-Expression beschreibenden Färbeergebnisse, wurden mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests mit den klinisch-pathologischen Daten der Patienten korreliert, wobei das Signifikanzniveau auf $p < 0,05$ festgelegt wurde. Eine Aussage über den Zusammenhang der Pdc4-Expression mit der Zeit bis zu einem Karzinomrezidiv bzw. bis zum Eintritt eines Karzinomspezifischen Todes konnte anhand von Cox-Regressions-Analysen und Kaplan-Meier-Analysen getroffen werden. Der Kruskal-Wallis-Test wurde verwendet, um die Expressionen von miR-21 und Pdc4 miteinander zu korrelieren. Um die Spezifität und Signifikanz der Pdc4-Expression zur Diskrimination zwischen zwei Merkmalen zu bestimmen, wurden Receiver Operating Characteristics (ROC) Kurven erstellt. Alle statistischen Tests wurden mit Hilfe der Statistical Package for the Social Sciences 19 Software (SPSS) durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1 Blasenkarzinom

4.1.1 Pcd4-Expression in Korrelation zu der Differenzierung des Gewebes

Die Expression des Pcd4 ist in benignem Gewebe deutlich höher als im Karzinomgewebe. Dabei sieht man eine signifikante Abnahme der Färbung von gesundem Gewebe über NMIBC, MIBC, bis hin zu den Metastasen, die die geringste Färbung aufweisen (siehe Tabelle 24). Die Kernquantität und die Kern- und Zytoplasmaintensität zeigen jeweils eine Signifikanz von $p < 0,0001$.

4.1.2 Pcd4-Expression in Korrelation zu den klinisch-pathologischen Parametern

4.1.2.1 Alter, Geschlecht und Raucherstatus

Es lässt sich kein Zusammenhang zwischen dem Alter, Geschlecht und Raucherstatus und der Pcd4-Expression nachweisen ($p > 0,2$).

4.1.2.2 T-Stadium

Sowohl Kernintensität, Kernquantität als auch die Zytoplasmaintensität korrelieren mit dem T-Stadium hochsignifikant ($p < 0,0001$), und auch unter separater Betrachtung der MIBC und NMIBC können signifikante Korrelationen gefunden werden. Zum Beispiel korreliert die Kernquantität beim NMIBC mit einer Signifikanz von $p = 0,002$ mit dem T-Stadium. Noch deutlicher ist die Verminderung der Kernfärbung in den MIBC vorzufinden. Dort liegt die Signifikanz der Kernintensität und Quantität bei $p = 0,001$, während die Zytoplasmaintensität in NMIBC ($p = 0,004$) deutlicher mit dem T Stadium korreliert als in MIBC ($p = 0,032$). Wie aus Abbildung 4 deutlich wird, steigt der Anteil der nicht angefärbten Kerne von 0 % bei gesundem Gewebe auf über 90 % bei T4 Tumoren, während sich die Anteile der stark angefärbten Kerne konträr dazu bei T4 Tumoren nicht und bei der gesunden Kontrollgruppe zu 57 % wiederfinden. Die Kernintensität zeigt einen ähnlichen Trend. Während sich die Pcd4-Expression zwischen Tis und Ta Tumoren nicht signifikant unterscheiden lässt, zeigen die Kernfärbungen bereits zwischen Tis und T1 Tumoren einen signifikanten Unterschied von $p = 0,015$ (Intensität) bzw. $p = 0,005$ (Quantität). Ta und T1 Tumore unterscheiden sich in ihrer Zytoplasmafärbung signifikant ($p = 0,001$). Für die Unterscheidung zwischen hochmalignen

Tumoren im T3 und T4 Stadium kann keine Signifikanz gefunden werden, da die Pcd4-Expression bereits im Stadium T3 stark vermindert ist.

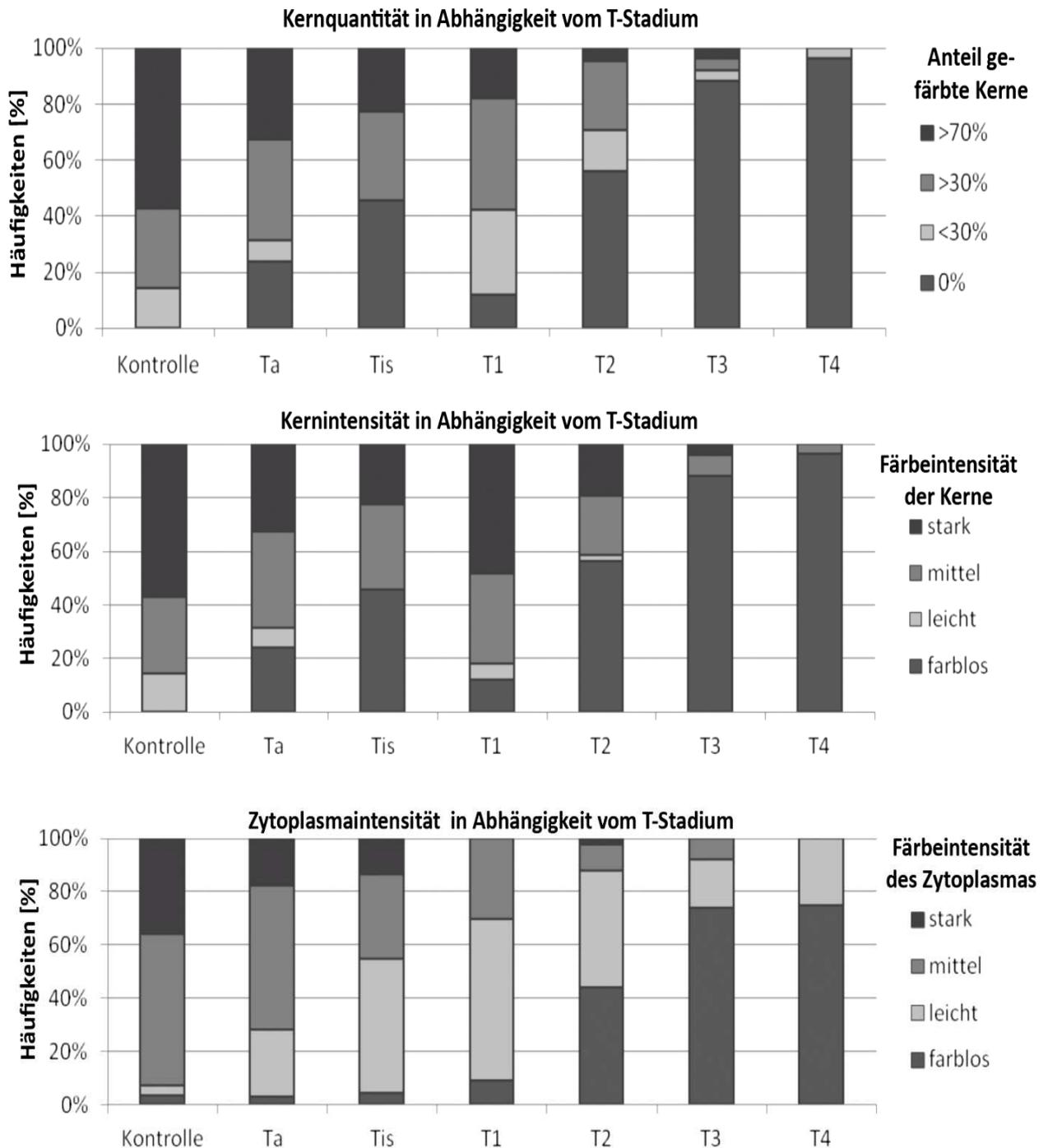


Abb. 4: Kernquantität, Kernintensität und Zytoplasmaintensität in Abhängigkeit vom T-Stadium

Die drei Diagramme stellen, von oben nach unten sortiert, die Kernquantitäts- und -intensitätsergebnisse, sowie der Zytoplasmaintensität in Abhängigkeit vom T-Stadium als prozentualen Anteil des Blasenkarzinompatientenkollektivs dar

4.1.2.3 Grading

Das Grading korreliert ebenfalls hochsignifikant ($p < 0,0001$) mit der Pcd4-Expression. Vergleicht man die Expression bei G1 Tumoren mit solchen, die G3 eingestuft sind, so ergibt sich ebenfalls eine Signifikanz von $p < 0,0001$ für Kernquantität und Kern- und Zytoplasmaintensität. Dieselbe hohe Signifikanz zeigt sich bereits zwischen G1 und G2 Tumoren für die Intensität der Kern- und Zytoplasmafärbung (siehe Tab. 24).

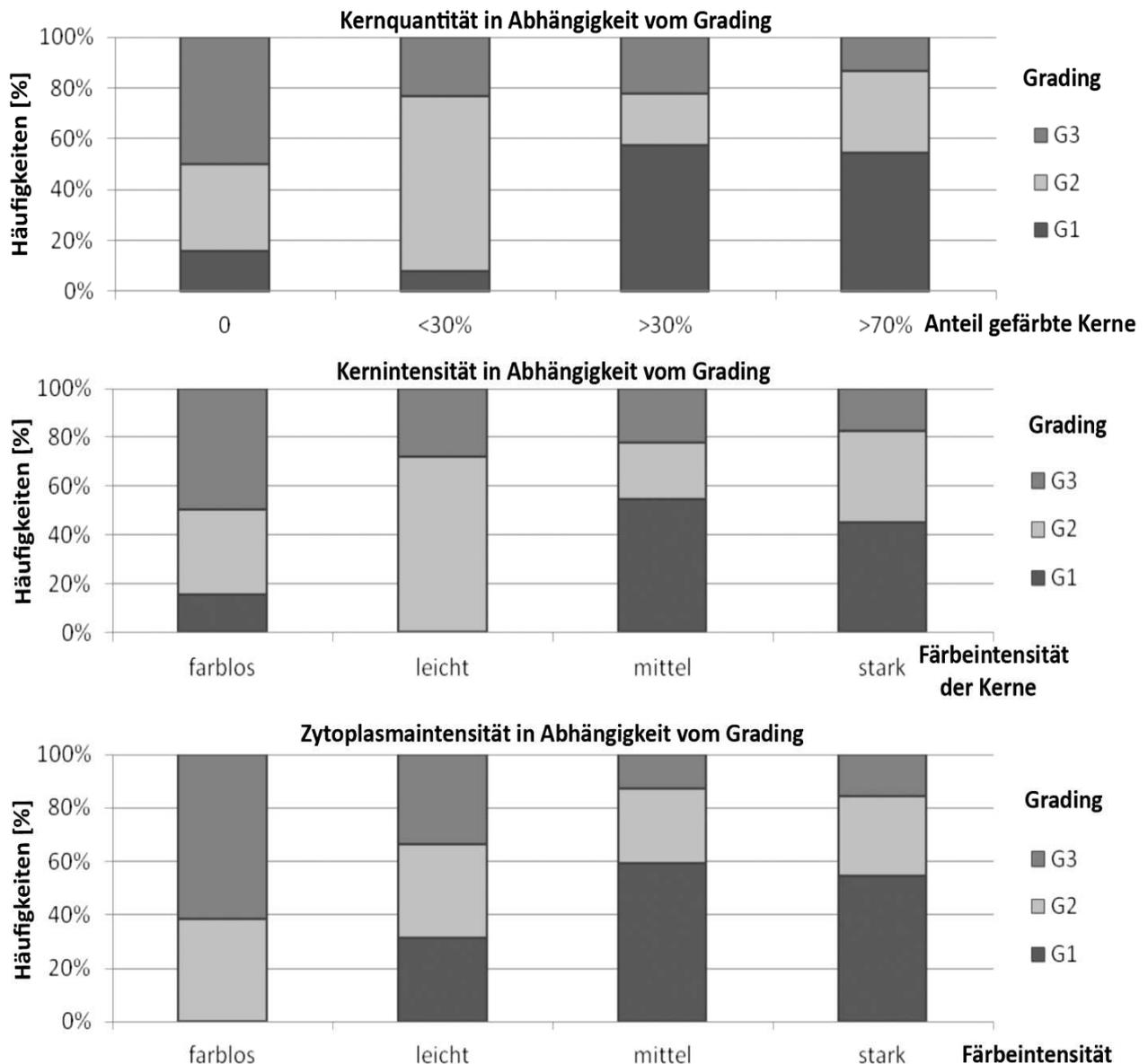


Abb. 5: Kernquantität, Kernintensität und Zytoplasmaintensität in Abhängigkeit vom Grading

Die drei Diagramme stellen, von oben nach unten sortiert, die Ergebnisse der Kernquantität und-intensität, sowie der Zytoplasmaintensität in Abhängigkeit vom G-Stadium als prozentualer Anteil des Blasenkarzinompatientenkollektivs dar

4.1.2.4 Metastasen

Der Befall der regionalen Lymphknoten korreliert hochsignifikant ($p < 0,0001$) mit der Kernquantität und der Kern- und Zytoplasmaintensität. Bei den Fernmetastasen lässt sich ein Trend zur verminderten Pcd4-Expression erkennen. So sind in 72 % der Proben die Kerne nicht angefärbt. Das Zytoplasma ist in 60 % der Fälle farblos, während nur eine Metastase eine starke Färbung zeigt. Für eine relevante Signifikanzberechnung sollten mehr Gewebeproben vorliegen.

Parameter	KI (%)	KQ (%)	ZI (%)
Negativ / 0 %	18 (72)	18 (72)	15 (60)
Mittel/ >30 %	3 (12)	5 (20)	9 (36)
Stark/ >70 %	4 (16)	2 (8)	1 (4)

Tab. 21: Färbeergebnisse der Metastasen der Blasenkarzinome

Die Tabelle zeigt die absoluten und prozentualen Häufigkeiten der Metastasenanfärbung des Blasenkarzinompatientenkollektivs. KI, Kernintensität; KQ, Kernquantität, ZI, Zytoplasmaintensität. Die Prozentangaben beziehen sich auf die Kernquantität

4.1.3 Pcd4-Expression in Korrelation zum Progressionsfreien und Krebspezifischen Überleben

Um die Pcd4-Expression mit der Progressionsfreien bzw. Krebspezifischen Überlebenszeit der Patienten zu vergleichen, verwendete ich die Cox-Regressionsanalyse. Hierfür stehen Daten von 111 Patienten mit NMIBC und 119 Patienten mit MIBC zur Verfügung. 104 NMIBC und 87 MIBC Patienten erkrankten an einem Rezidiv, während 34 MIBC und 7 NMIBC Patienten an ihrem Blasenkarzinom verstarben. Für die Gruppe der NMIBC und der MIBC Patienten kann keine Korrelation zwischen Progressionsfreiem Überleben und T-, N- und M-Stadium, Grading und Pcd4-Expression gefunden werden. Bei den MIBC zeigt sich hingegen zumindest eine hohe Korrelation zwischen T- und M-Stadium und der Überlebenszeit.

	Krebsspezifisches Überleben			Progressionsfreies Überleben		
	p-Wert	HR	95 %-KI	p-Wert	HR	95 %-KI
T-Stage	0,888	1,712	0,36-3,248	0,793	1,654	0,737-1,262
Grading	0,62	1,865	0,379-5,089	0,419	1,808	0,824-1,592
N0 /N+	n.v.			n.v.		
Kernintensität	0,144	1,919	0,256-1,221	0,46	1,962	0,888-1,3
Kernquantität	0,267	1,613	0,247-1,473	0,778	1,663	0,845-1,253
Zytoplasmaintensität	0,8	1,604	0,061-1,173	0,5	1,644	0,647-1,237
M0/M1	n.v.			n.v.		
	Krebsspezifisches Überleben			Progressionsfreies Überleben		
	p-Wert	Mittelwert	95 %-KI	p-Wert	Mittelwert	95 %-KI
T-Stage	<0.0001	4,891	1,438-3,606	0,015	4,865	1,083-2,120
Grading	0,44	2,672	1,023-5,031	0,358	2,64	0,477-1,307
N0 /N+	0,217	0,336	0,775-3,070	0,426	0,315	0,463-1,384
Kernintensität	0,535	0,496	0,804-1,519	0,821	0,438	0,747-1,261
Kernquantität	0,077	0,378	0,963-2,092	0,676	0,326	0,756-1,538
Zytoplasmaintensität	0,767	0,445	0,571-1,512	0,209	0,416	0,515-1,157
M0/M1	<0.0001	0,043	4,537-6,824	0,549	0,011	0,251-13,430

Tab. 22: COX-Regressionsanalyse der Pcd4-Färbung für NMIBC und MIBC

Die Tabelle zeigt die Ergebnisse der COX-Regressionsanalyse zur Korrelationsbestimmung zwischen ausgewählten klinisch - pathologischen Parametern und den Färberegebnissen auf der einen Seite und dem Krebspezifischen und Progressionsfreien Überleben auf der anderen Seite. Signifikanzen sind grafisch hervorgehoben. KI, Konfidenzintervall; HR, Hazardratio; T, Tumorausdehnung; N, Lymphknotenbefall; M, Metastasen; G, histologischer Differenzierungsgrad

4.1.4 Unterschied zwischen NMIBC und MIBC

Mit Hilfe der ROC (Receiver Operating Characteristic) Kurvenanalyse können eine hohe Sensitivität und Spezifität der Pcd4-Expression für die Unterscheidung zwischen MIBC und NMIBC gezeigt werden. Am sensitivsten ist die Zytoplasmaintensität mit einem positiv prädiktiven Wert von 95,1 % und einer AUC (area under the curve) von 0,862, was für eine gute Trennschärfe spricht. Kernintensität und Quantität weisen beide eine Spezifität von 79 % auf.

	Sensitivität	Spezifität	AUC	95 %-KI
Zytoplasmaintensität	95,1 %	63,9 %	0,862	0,815-0,909
Kernintensität	75,4 %	79,0 %	0,790	0,732-0,849
Kernquantität	75,4 %	79,0 %	0,795	0,737-0,853

Tab. 23: ROC-Kurvenanalyse von Pcd4-Färbeergebnissen für Blasenkarzinompatienten

Die Tabelle zeigt die Ergebnisse der ROC-Kurvenanalyse zur Sensitivitäts- und Spezifitätsbestimmung der Färbeergebnisse für die Unterscheidung zwischen NMIBC und MIBC. AUC, Area Under the Curve, KI, Konfidenzintervall

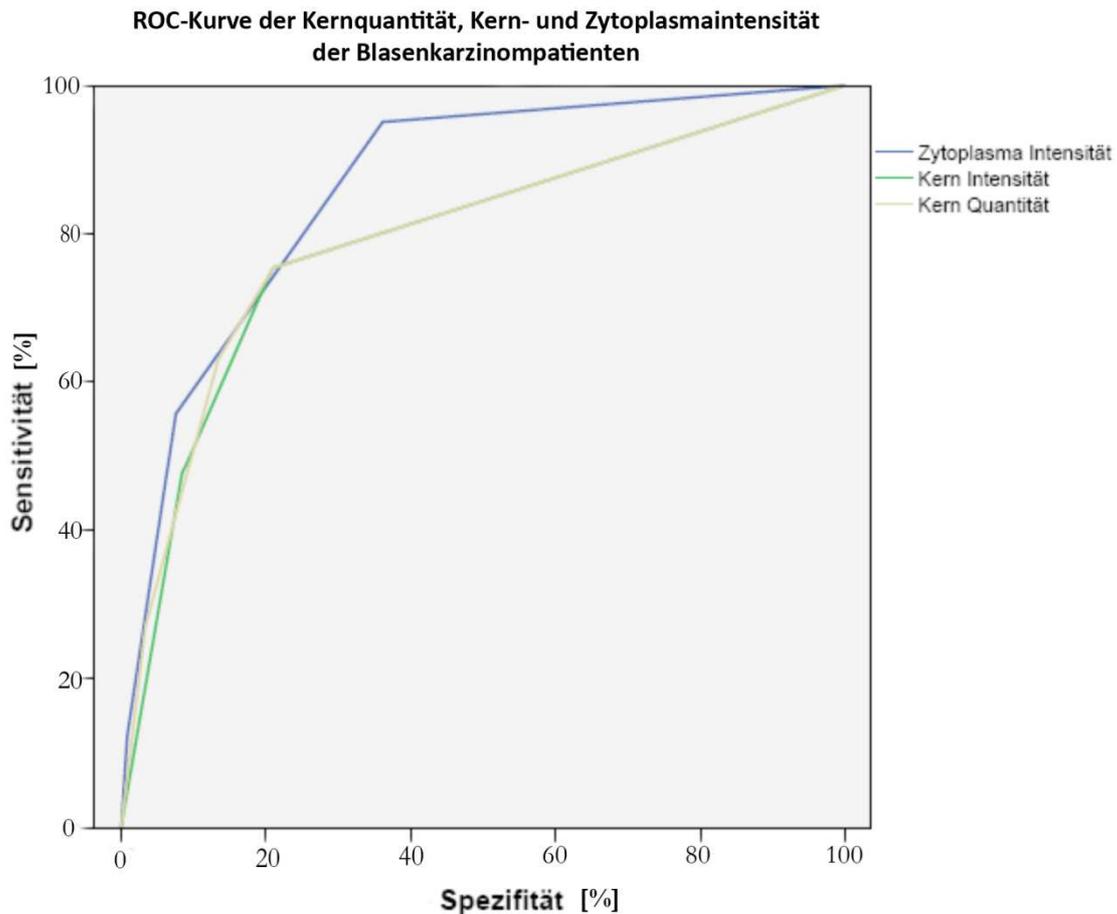


Abb. 4: ROC-Kurve der Blasenkarzinompatienten

In der Abbildung ist die Spezifität gegen die Sensitivität der Zytoplasmaintensität, Kernintensität und Kernquantität zur Differenzierung zwischen NMIBC und MIBC dargestellt. Die hohe Sensitivität und Spezifität stellt sich in einem großen Abstand der Kurven von einem diagonalen Graphen durch den Ursprung dar, aus der sich die AUC berechnen lässt, die ein Maß für die Trennschärfe darstellt

4.1.5 Pcd4-Expression in Korrelation zur miR-21 Expression

Die MiR-21-Expression steigt in Abhängigkeit vom T-Stadium und korreliert invers mit der Pcd4-Expression mit einer Signifikanz von $p = 0,01$ für die Kern- und $p = 0,018$ für die Zytoplasmafärbung. So ergeben die Pcd4-kernnegativen Tumoren eine Vervielfältigung der Ausgangskonzentration der miR-21-Expression um Faktoren zwischen 1,6735 und 4,4659, während das PCR-Intervall für die Pcd4-kernpositiven Proben zwischen 0,3624 und 1,2308 liegt (siehe Abb. 5). Somit wird deutlich, dass alle Tumoren, die keine Pcd4-Expression zeigen, eine höhere miR-21-Expression, als das gesunde Gewebe aufweisen. Im Gegensatz dazu zeigen fast alle Pcd4-positiven Karzinome eine herabregulierte miR-21-Expression im Vergleich zum gesunden Normwert 1.

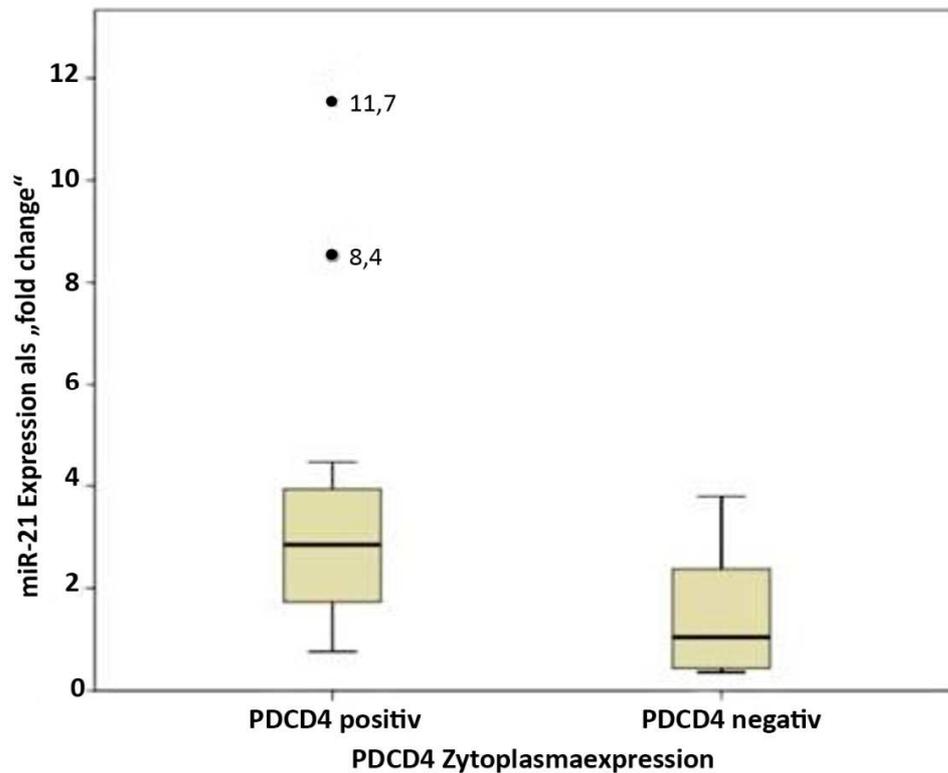
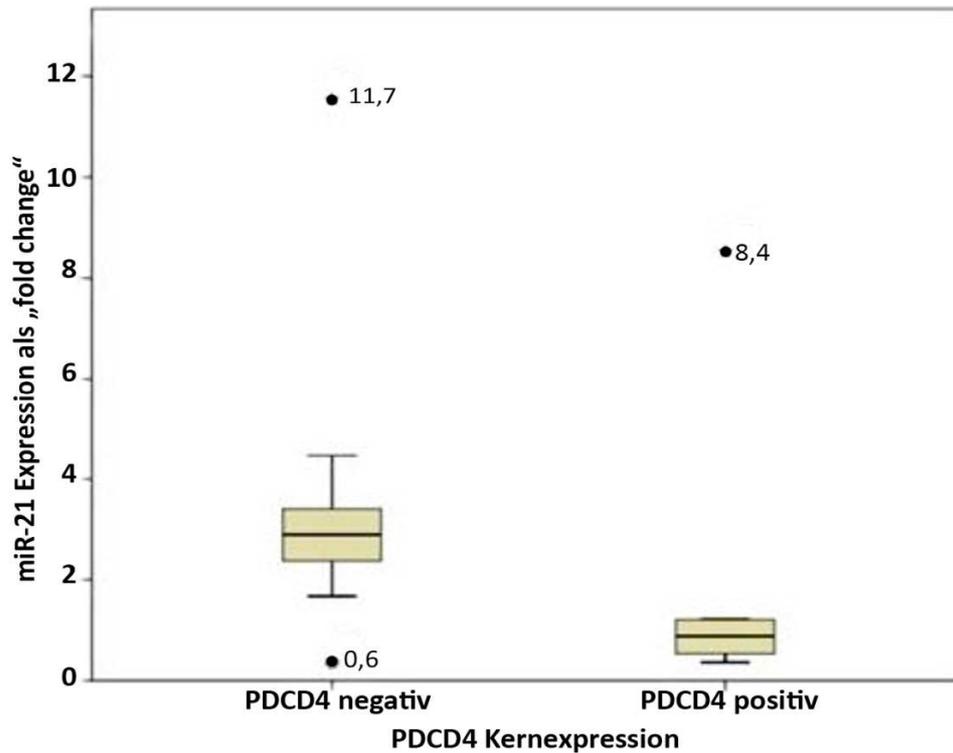


Abb. 5: Inverse Korrelation von miR-21-Expression und Pdc4-Kernfärbung und Zytoplasmafärbung in Blasenkarzinomen

Die Abbildung stellt die „fold change“ als Vielfaches der miR-21 Expression in Korrelation zur immunhistochemischen Pdc4-Kern- und Zytoplasmafärbung des jeweiligen Patienten des Blasenkarzinomkollektivs dar. Ausreißer sind mit • markiert

Parameter	p für Kernintensität	p für Kernquantität	p für Zytoplasmaintensität
NMIBC			
T-Stage	0,023	0,002	0,004
Grading	0,131	0,004	0,069
N0 /N+	n.v.	n.v.	n.v.
Raucher	0,268	0,171	0,276
Geschlecht	0,279	0,105	0,578
MIBC			
T-Stage	0,001	0,001	0,032
Grading	0,448	0,802	0,377
N0 /N+	0,068	0,054	0,068
Raucher	0,66	0,845	0,141
Geschlecht	0,441	0,232	0,927
M0/M1	0,691	0,165	0,384
Alle Patienten			
BCA/Met/Kontrolle	<0,0001	<0,0001	<0,0001
NMIBC vs. MIBC	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Geschlecht	0,405	0,201	0,364
Raucher	0,094	0,137	0,267
T-Stage	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Grading	<0,0001	<0,0001	<0,0001
M0/M1	0,565	0,451	0,144
N-Stage	<0,0001	<0,0001	<0,0001
N0/N+	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Stadien & Grade			
Ta vs. Tis	0,072	0,178	0,162
Tis vs. T1	0,015	0,005	0,161
Ta vs. T1	0,123	0,012	0,001
T2 vs. T3	0,006	0,004	0,021
T2 vs. T4	0,003	0,003	0,048
T3 vs. T4	0,405	0,496	0,236
M vs. T2	0,533	0,220	0,507

M vs. T3	0,149	0,086	0,210
M vs. T4	0,036	0,042	0,352
G1 vs. G2	0,005	<0,0001	<0,0001
G1 vs. G3	<0,0001	<0,0001	<0,0001
G2 vs. G3	0,012	0,003	0,017
MIR-21	0,01	0,01	0,018

Tab. 24: P-Werte (Chi-Quadrat Test) von Pcd4- und miR-21-Expression und klinisch-pathologischen Parametern der Blasenkarzinompatienten

Die Tabelle zeigt die p-Werte des Chi-Quadrat Tests zur Korrelation von den Versuchsergebnissen und den klinisch-pathologischen Daten insgesamt, aufgeteilt in MIBC und NMIBC, sowie Vergleiche zwischen einzelnen Merkmalen eines Parameters. Des Weiteren sind die p-Werte der negativen Korrelation zwischen Pcd4-Expression und miR-21-Expression aufgelistet. Signifikanzen sind grafisch hervorgehoben. BCA, Blasenkarzinom; T, Tumorausdehnung; N, Lymphknotenbefall; M, Metastasen; G, histologischer Differenzierungsgrad

4.2 Nierenzellkarzinom

4.2.1 Pcd4-Expression in Korrelation zur Differenzierung des Gewebes

Das Zytoplasma der Nierenzellkarzinome ist signifikant seltener PDCD4 positiv (36,6 %) als das gesunde Nierengewebe (52,6 %) und das Onkozytom (55,6 %; $p = 0,04$). Die Quantität der Zytoplasmafärbung beträgt in den meisten gesunden Kontrollen (52,6 %) und Onkozytomen (66,7 %) über 70 %, während bei Malignomen die Mehrzahl farblos ist und somit eine Quantität von 0 aufweist (siehe Abb. 7).

Die Kernfärbung eignet sich weder, um zwischen malignem und benignem Gewebe noch zwischen Malignom, Onkozytom und gesundem Gewebe zu unterscheiden, da insgesamt in den drei Gruppen in der Mehrzahl der Proben (88,0 %) die Kerne nicht angefärbt sind.

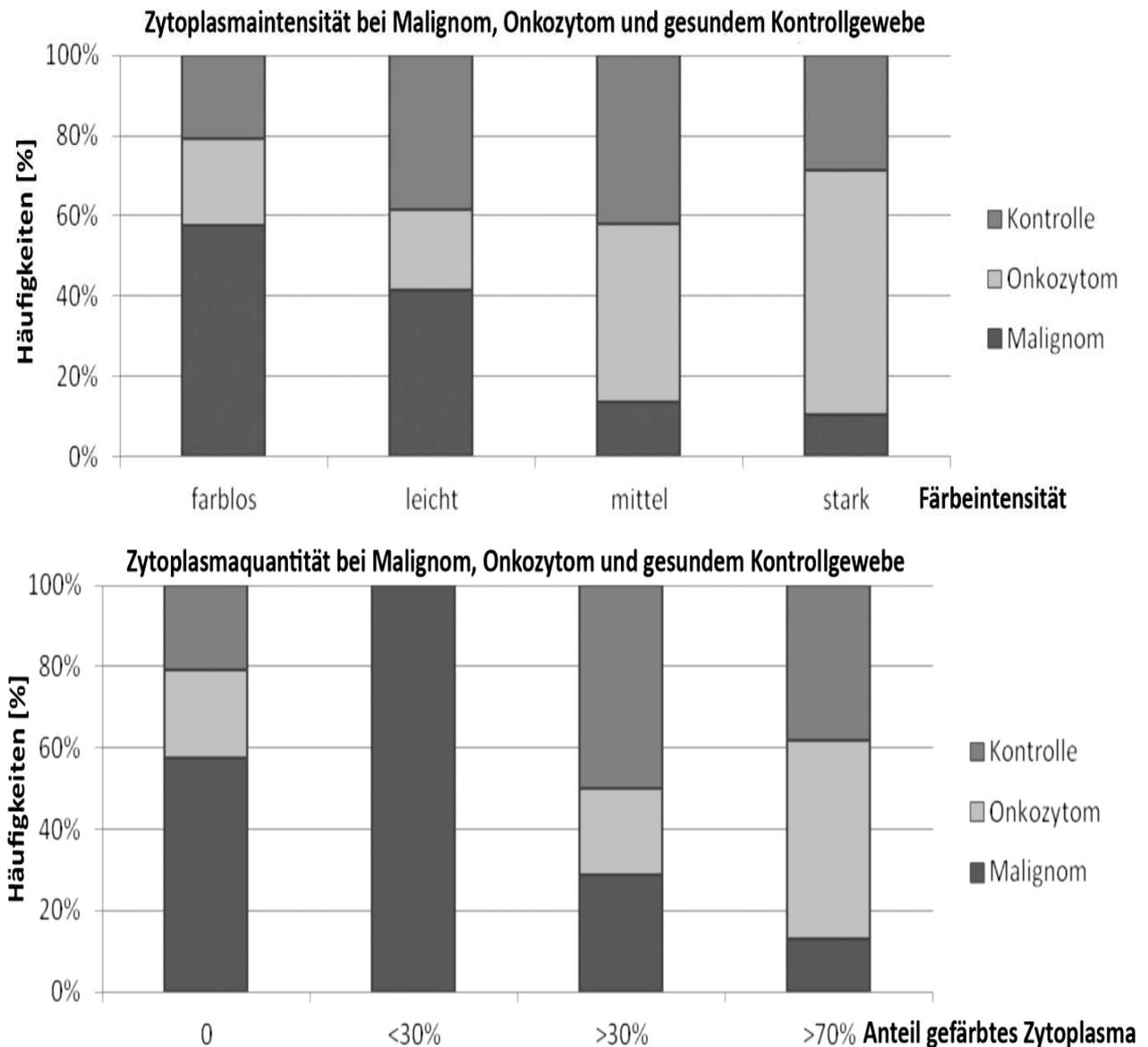


Abb. 6: Zytoplasmaintensität und -quantität bei Nierenzellkarzinom, Onkozytom und gesundem Kontrollgewebe

Die Diagramme stellen die Ergebnisse der Zytoplasmaintensität und -quantität in Abhängigkeit von der Gewebedifferenzierung des Nierenzellkarzinompatientenkollektivs dar

4.2.2 Pcd4-Expression in Korrelation zu den histologischen Subtypen

Im Vergleich der Pcd4-Expression mit den einzelnen Tumorentitäten ergeben sich sowohl für die Kern- als auch für die Zytoplasmafärbung in Intensität, Quantität und in der Unterscheidung zwischen positivem und negativem Färberesultat signifikante Korrelationen (siehe Tab. 26). Dabei zeigen die ccRCC und sRCC in der Mehrzahl der Fälle (63,8 % bzw. 66,7 %) keine Pcd4-Anfärbung, während pRCC und chRCC zu 68,4 %

bzw. zu 62,5 % Pdc4-Expression aufweisen. Die Gruppe der ccRCC zeigt mit nur 9,4 % positiven Kernen, bei einem Anteil der stark gefärbten Kerne von 1,6 % und maximaler Quantität von 0 %, die geringste Kernanfärbung. Davon abzugrenzen ist das Bild der chRCC, die 37,5 % positive Kernfärbung aufweisen, wovon 25 % die maximale Intensität und 12,5 % die maximale Quantität zeigen. Das pRCC zeigt die stärkste Zytoplasmafärbung aller Entitäten (65,8 %), die sowohl in Intensität als auch in ihrer Quantität im mittleren bis starken Bereich liegt. Alle anderen Entitäten zeigen mehrheitlich negative Zytoplasmaergebnisse. Auch hier ist das ccRCC mit 74,2 % farblosem Zytoplasma die am schwächsten angefärbte Entität.

Darüber hinaus lässt sich das sRCC signifikant in der Quantität ($p = 0,009$) und Intensität ($p = 0,019$) des Zytoplasmas vom gesunden Gewebe unterscheiden. Eine noch signifikantere Abgrenzung zum gesunden Gewebe ist für das ccRCC möglich. Dieses weist ein hochsignifikantes Ergebnis ($p < 0,0001$) für Zytoplasmaintensität- und Quantität auf. Der Parameter Zytoplasma positiv/negativ ist ebenfalls signifikant ($p = 0,029$).

Die immunhistochemische Pdc4-Färbung zeigt zudem signifikante Unterschiede zwischen ccRCCs und Onkozytomen (Zytoplasmaintensität: $p < 0,0001$; Zytoplasmaquantität: $p = 0,002$). Weitere Subgruppenanalysen ergaben keine Signifikanzen.

4.2.3 Pdc4-Expression in Korrelation zu den klinisch-pathologischen Parametern

4.2.3.1 T-Stadium

Wie bereits beschrieben, ist die Mehrzahl der Kerne in den untersuchten Nierengeweben nicht angefärbt. Ist das Färbeergebnis positiv, so lässt sich eine signifikante Korrelation ($p = 0,036$) zu den Tumorstadien treffen. Während bei T1 Tumoren 26,3 % der Proben stark angefärbte Kerne aufweisen, liegt dessen Anteil bei T2 Tumoren nur noch bei 6,9 %, bei T3 Tumoren bei 2,8 % und T4 Tumoren weisen überhaupt keine stark angefärbten Kerne mehr auf (siehe Abb. 8). Parallel dazu stellt sich auch die Kernquantität dar ($p = 0,039$). Die maximale Färbung von über 70 % kommt nur bei T1 Tumoren vor und der Anteil der mehr als 30 % gefärbten Gewebe nimmt von T1 (26,3 %) stetig ab (siehe Abb. 8). Unterteilt man die Färberesultate der Kerne in Pdc4-positiv und negativ, so ergibt sich eine signifikante Korrelation von $p = 0,006$.

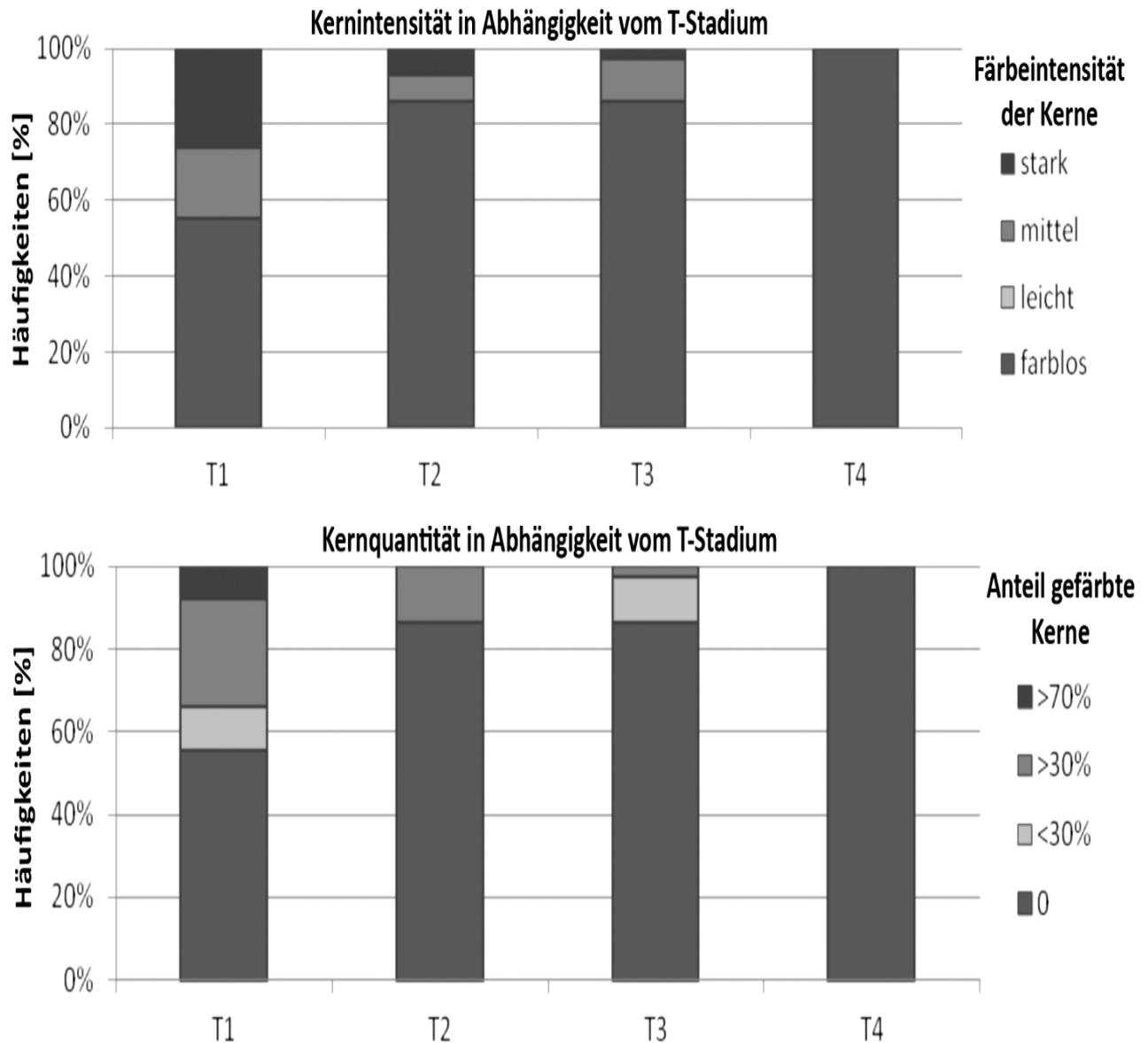


Abb. 7: Kernintensität und -quantität im Vergleich zwischen den verschiedenen T-Stadien der Nierenzellkarzinome

Die Diagramme stellen die Ergebnisse der Kernintensität bzw. -quantität in Abhängigkeit vom T-Stadium als prozentualen Anteil des Nierenzellkarzinompatientenkollektivs dar

Die Zytoplasmafärbung zeigt in Intensität und Quantität einen Trend zur negativen Korrelation mit dem steigenden T-Stadium. Vergleicht man insgesamt Pcd4-positives mit negativem Zytoplasma, so ergibt sich eine Signifikanz von $p = 0,010$. Signifikant ist auch das Ergebnis der Korrelationsanalyse zwischen Pcd4-positiven Proben und dem T-Stadium (siehe Tab. 26)

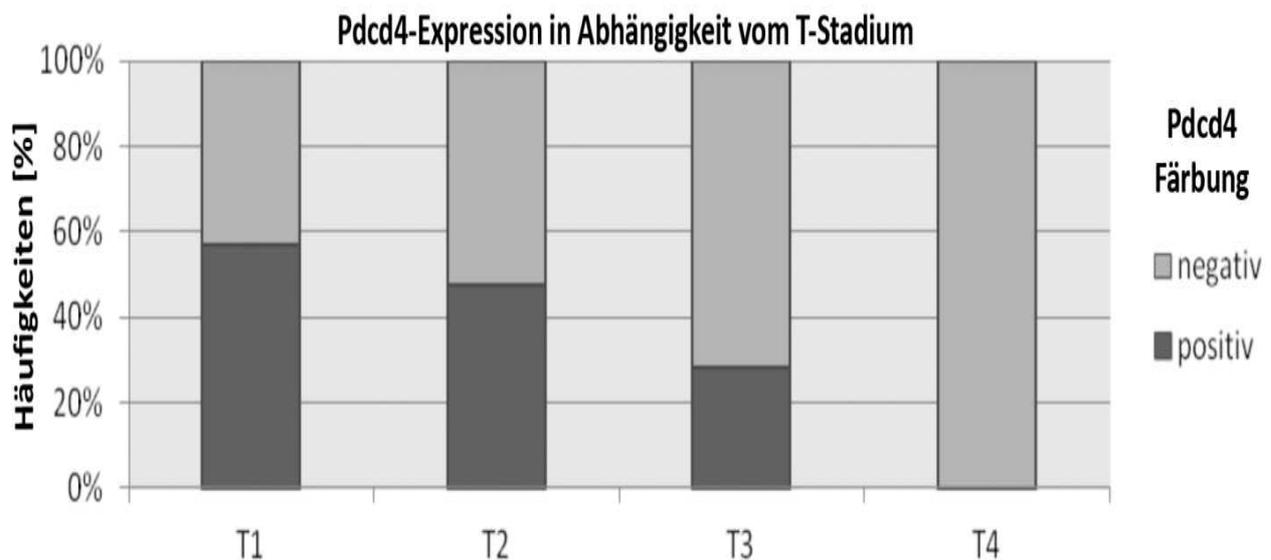


Abb. 8: Pdcd4-Expression im Vergleich zwischen den verschiedenen T-Stadien der Nierenzellkarzinome

Das Diagramm stellt die Ergebnisse der Pdcd4-positiven vs. negativen Proben in Abhängigkeit vom T-Stadium als prozentualen Anteil des Nierenzellkarzinompatientenkollektivs dar

Die Korrelation zum T-Stadium wird gestützt durch die Korrelation zur Tumorgroße (Pdcd4-positiv/negativ: $p = 0,011$; Kernintensität: $p = 0,011$; Kern-positiv/negativ: $p = 0,018$), die Einfluss auf die T-Klassifikation hat (siehe Tab. 3).

4.2.3.2 V-Stadium

Das V-Stadium korreliert mit der Zytoplasmaquantität und -intensität. Auch die Differenzierung der Ergebnisse in Zytoplasma-, Kern- und Pdcd4-positiv und negativ korreliert jeweils signifikant mit dem V-Stadium. Es wurde die Signifikanz für die Unterscheidung zwischen V-positiven und V-negativen Geweben sowie für die genauere Unterteilung in V0-V2 errechnet. In beiden Fällen ergeben sich signifikante Korrelationen, wobei anzumerken ist, dass die Signifikanz bei der feineren Unterscheidung größer ist (siehe Tab. 26).

4.2.3.4 Weitere klinisch-pathologische Parameter

Es kann keine Korrelation zwischen der Expression und den Parametern Alter, Geschlecht, M-, N-, R- und G-Stadium gefunden werden.

4.2.4 Pcd4-Expression in Korrelation zum Progressionsfreien und Krebspezifischen Überleben

Sowohl das Krebspezifische als auch das Progressionsfreie Überleben des Patientenkollektivs korrelieren hochsignifikant mit dem T-Stadium, dem Grading und der Unterscheidung zwischen positivem und negativem N- und M-Stadium. Für die Pcd4-Färberegebnisse ergeben sich keine signifikanten Korrelationen zu den Überlebensdaten der Patienten.

	Krebspezifisches Überleben			Progressionsfreies Überleben		
	p-Wert	HR	95 %-KI	p-Wert	HR	95 %-KI
T-Stadium	0,005	2,618	1,320 – 4,853	<0,0001	2,607	1,347 – 2,730
Grading	<0,0001	1,732	4,506 – 33,630	<0,0001	1,730	1,915 – 7,241
N0 /N+	<0,0001	1,073	5,733 – 50,114	0,009	1,074	1,728 – 12,092
M0/M+	<0,0001	1,146	9,248 – 97,937	<0,0001	1,139	4,471 – 20,037
Kern pos. vs. neg.	0,554	0,130	0,071 – 4,128	0,169	0,228	0,100 – 1,733
ZP pos. vs neg.	0,706	0,390	0,278 – 2,381	0,097	0,393	0,248 – 1,122
Pcd4-pos. vs. neg.	0,284	0,472	0,190 – 1,627	0,130	0,475	0,299 – 1,168

Tab. 25: COX-Regressionsanalyse der Pcd4-Färbung für Nierenzellkarzinome

Die Tabelle zeigt die Ergebnisse der COX-Regressionsanalyse zur Korrelationsbestimmung zwischen ausgewählten klinisch-pathologischen Parametern und den Färberegebnissen auf der einen Seite und dem Krebspezifischen und Progressionsfreien Überleben auf der anderen Seite. Signifikanzen sind grafisch hervorgehoben. ZP, Zytoplasma; KI, Konfidenzintervall; HR, Hazardratio; ; T, Tumorausdehnung; N, Lymphknotenbefall; M, Metastasen

4.2.5 Membranfärbung

Im Gegensatz zu allen anderen untersuchten urologischen Geweben, zeigt sich im Nierengewebe eine Pcd4-positive Membranfärbung. Dieses Phänomen tritt selten (6,7 %), aber ausschließlich in malignem Gewebe auf und korreliert in seiner Quantität hochsignifikant mit dem L-Stadium ($p < 0,0001$) und der Unterscheidung zwischen L-positiven und negativen Tumoren ($p = 0,009$).

Klinisch-pathologische Parameter	p für Pdc4-pos./neg.	p für K pos./neg.	p für Z pos./neg.	p für KI	p für KQ	p für ZI	p für ZQ	P für MQ
Maligne vs. Gesund	0,415	0,092	0,410	0,312	0,402	0,040	0,058	0,652
Maligne/ Onkoztom/ Gesund	0,781	0,311	0,587	0,685	0,810	0,022	0,091	0,879
Tumorentität	0,003	0,043	<0,0001	0,002	0,001	<0,0001	<0,0001	0,789
T-Stadium	0,003	0,006	0,010	0,036	0,039	0,070	0,064	0,947
N-Stadium	0,458	0,113	0,548	0,510	0,638	0,581	0,617	0,811
M-Stadium	0,127	0,828	0,715	0,957	0,795	0,633	0,541	0,531
V-Stadium	<0,0001	0,010	0,001	0,006	0,114	0,020	<0,0001	0,168
V neg./pos.	0,060	0,199	0,034	0,172	0,547	0,013	0,003	0,281
L-Stadium	0,727	0,916	0,527	0,711	0,905	0,680	0,258	<0,001
L neg./pos.	0,913	0,292	0,672	0,524	0,714	0,116	0,070	0,009
R Status	0,129	0,311	0,074	0,754	0,843	0,198	0,176	0,814
G-Stadium	0,599	0,284	0,621	0,405	0,172	0,051	0,085	0,543
Tumorgröße (cm)	0,011	0,018	0,188	0,011	0,139	0,498	0,356	0,173

Tab. 26: P-Werte (Chi-Quadrat Test) von Pdc4-Expression und klinisch-pathologischen Parameter der Nierenzellkarzinompatienten

Die Tabelle zeigt die p-Werte des Chi-Quadrat Tests zur Korrelation von den Versuchsergebnissen und den klinisch-pathologischen Daten, sowie Vergleiche zwischen einzelnen Merkmalen eines Parameters. Signifikanzen sind grafisch hervorgehoben. KI, Kernintensität; KQ, Kernquantität; ZI, Zytoplasmaintensität; MQ, Membranquantität; ; T, Tumorausdehnung; N, Lymphknotenbefall; M, Metastasen; V, Gefäßeinbruch; L, Lymphgefäßeinbruch; G, histologischer Differenzierungsgrad

4.3 Prostatakarzinom

4.3.1 Pdc4-Expression in Korrelation zu der Differenzierung des Gewebes

Die Pdc4-Expression erlaubt eine Unterscheidung von malignem und benignem Prostatagewebe (siehe Tab. 28). Während beim gesunden Gewebe 83,6 % der Kerne stark angefärbt und 8,6 % farblos sind, zeigt das maligne Gewebe ein konträres Färbeverhalten mit 74,6 % farblosen und 15,6 % stark gefärbten Kernen. Auch die Zytoplasmaintensität stellt einen signifikanten Unterschied zwischen Malignom und gesundem Gewebe dar. Während beim gesunden Gewebe nur 6,7 % ein farbloses

Zytoplasma aufweisen, sind es im Prostatakarzinom 37,5 % der untersuchten Proben. Auch die Kern-, Zytoplasma- und die gesamte Pdc4-Färbung war signifikant im Prostatakarzinom reduziert (siehe Tab. 28); insbesondere die Kernfärbung unterscheidet sich stark zwischen benignem und malignem Prostatagewebe ($p < 0,0001$). So sind in der Gruppe der PCA 25 % und in der gesunden Kontrollgruppe 80 % der Kerne positiv. In der ROC-Kurvenanalyse zeigt sich eine hohe Sensitivität und Spezifität der Pdc4-Expression für die Unterscheidung zwischen PCA und gesundem Gewebe. Hervorzuheben ist die Kernintensität mit einer Sensitivität von 71,4 % und einer Spezifität von 81,6 %.

	Sensitivität	Spezifität	AUC	95 % KI
Kern pos./neg.	85,7 %	68,4 %	0,771	0,645-0,897
Kernintensität	71,4 %	81,6 %	0,802	0,676-0,928
Kernquantität	14,3 %	92,1 %	0,783	0,657-0,908
Zytoplasmaintensität	28,6 %	76,3 %	0,624	0,487-0,761
Zytoplasma pos./neg.	35,5 %	92,9 %	0,642	0,504-0,780
Pdc4-pos./neg.	92,9 %	30,3 %	0,616	0,472-0,759

Tab. 27: ROC-Kurvenanalyse von Pdc4-Färbeergebnissen für Prostatakarzinompatienten

Die Tabelle zeigt die Ergebnisse der ROC Kurvenanalyse zur Sensitivitäts- und Spezifitätsbestimmung der Ergebnisse für die Unterscheidung zwischen PCA und gesundem Gewebe. AUC, Area Under the Curve; KI, Konfidenzintervall

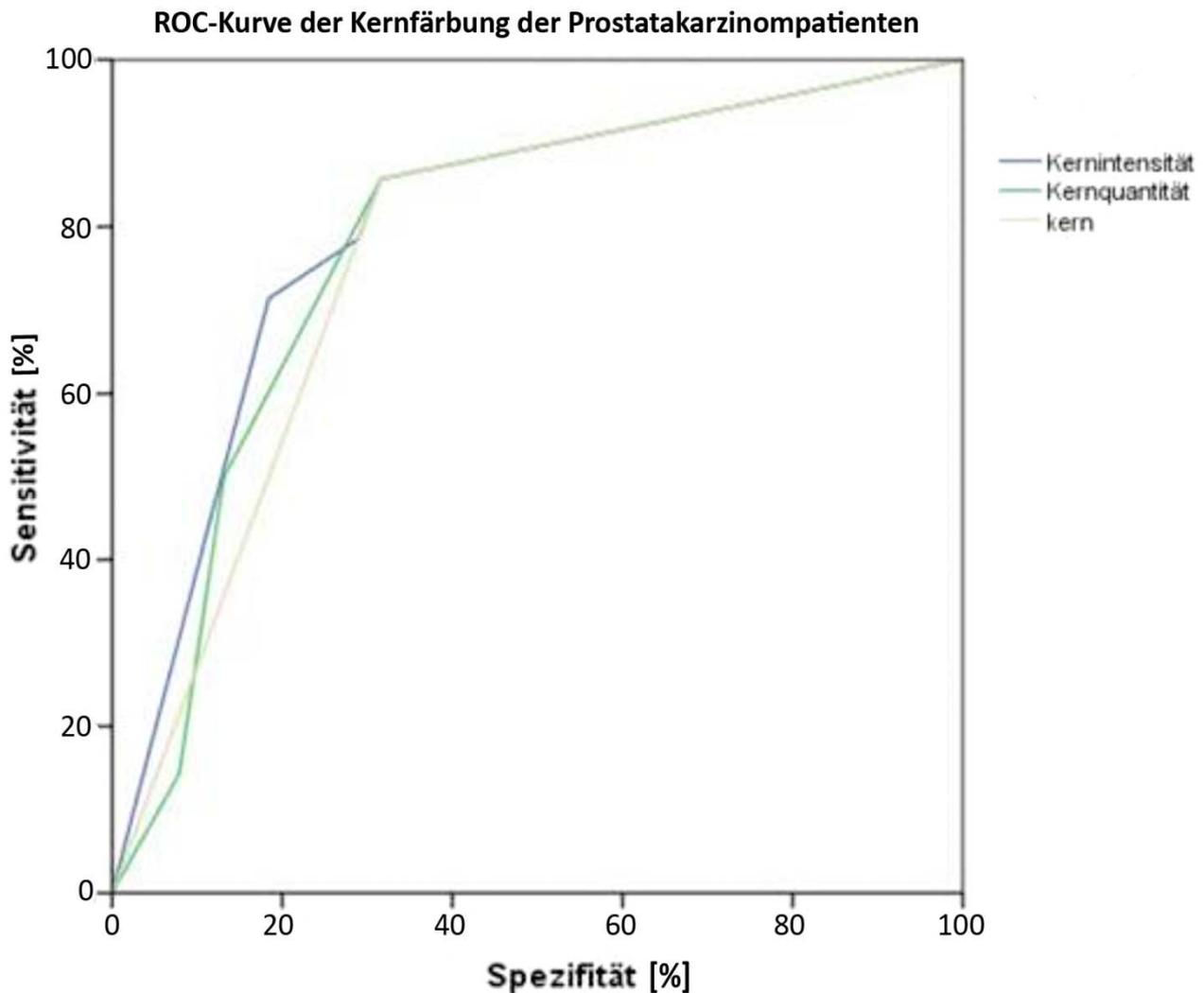


Abb. 10: ROC-Kurve der Kernfärbung der Prostatakarzinompatienten

In der Abbildung ist die Spezifität gegen die Sensitivität der Kernintensität, Kernquantität und Kern pos./neg. zur Differenzierung zwischen Malignom und gesundem Kontrollgewebe dargestellt. Die hohe Sensitivität und Spezifität stellt sich in einem großen Abstand der Kurven von einem diagonalen Graphen durch den Ursprung dar, aus der sich die AUC berechnen lässt, die ein Maß für die Trennschärfe darstellt

4.3.2 Pdc4-Expression in Korrelation zu den klinisch-pathologischen Parametern

Das T-Stadium korreliert signifikant ($p = 0,030$) mit dem positiven oder negativen Zytoplasmaresultat. Für die anderen untersuchten Parameter wie das N-Stadium, der Gleason Grade und Score und die präoperativen PSA-Werte ergeben sich keine Signifikanzen. Die Analyse der Überlebensdaten ergibt keinen Zusammenhang der Pdc4-Expression und dem Tumorfrem und Krebspezifischen Überleben ($p = 0,132$, 95 % -Konfidenzintervall 48,581 - 86,352).

Klinisch-pathologische Parameter	p für KI	p für KQ	p für Kern pos. vs. neg.	p für ZI	p für Zytoplasma pos. vs. neg.	p für Pdc4-pos. vs. neg.
Maligne/Gesund	<0,0001	0,002	<0,0001	0,039	0,021	0,052
T-Stadium	0,229	0,401	0,201	0,116	0,030	0,158
N-Stadium	0,966	0,966	0,499	0,460	0,175	0,166
Gleason Grade	0,540	0,606	0,470	0,589	0,473	0,603
Gleason Score	0,294	0,585	0,253	0,870	0,733	0,833
PSA absolut	0,424	0,424	0,440	0,433	0,440	0,440
PSA Gruppen	0,819	0,269	0,738	0,931	0,424	0,987

Tab. 28: P-Werte (Chi-Quadrat Test) der Pdc4-Expression und klinisch-pathologischen Parameter bei Prostatakarzinompatienten

Die Tabelle zeigt die p-Werte des Chi-Quadrat Tests zur Korrelation der Versuchsergebnisse und der klinisch-pathologischen Daten sowie im Vergleich zwischen Malignom und gesundem Kontrollgewebe. Die absoluten PSA-Werte wurden zusätzlich in 3 Gruppen mit den Intervallen < 4, 4-10 und > 10 ng/ml eingeteilt. Signifikanzen sind grafisch hervorgehoben. KI, Kernintensität; KQ, Kernquantität; ZI, Zytoplasmaintensität, T, Tumorausdehnung; N, Lymphknotenbefall; PSA, Prostataspezifisches Antigen; Gleason Grade, histologischer Differenzierungsgrad

4.4 Hodenkarzinom

4.4.1 Pdc4-Expression in Korrelation zur Differenzierung des Gewebes

Die untersuchten Seminome zeigen in ihrer Pdc4-Expression keine signifikanten Unterschiede zu den gesunden Kontrollgeweben. Es ergibt sich ein negatives Färbeergebnis sowohl für die Kerne als auch für das Zytoplasma des benignen Gewebes. Im Gegensatz zu den anderen urologischen Karzinomen zeigt sich beim Nicht-Seminom, im Vergleich zum gesunden Gewebe, ein signifikant ($p = 0,047$) stärkeres zytoplasma-tisches Färbeergebnis. So sind 57,1 % der Nicht-Seminome im Zytoplasma leicht, 7,2 % stark und 35,7 % nicht angefärbt.

4.4.2 Pdc4-Expression in Korrelation zu den klinisch-pathologischen Parametern

Das T-Stadium korreliert weder beim Seminom noch beim Nicht-Seminom signifikant mit der Pdc4-Expression. Dennoch ist zu erwähnen, dass bei T3 Tumoren die Kerne und das Zytoplasma komplett farblos sind, während niedriger maligne Tumoren leichte bis mittlere Färbeergebnisse zeigen. Insgesamt finden sich beim kompletten Patientenkollektiv der Hoden keine intensive Kern- oder Zytoplasmafärbung. Beim Nicht-Seminom korreliert die Zytoplasmaintensität ($p = 0,047$) mit dem klinischen N-Stadium. Beim Se-

minom korrelieren das klinische Stadium und der β -HCG-Wert nicht mit der Pcd4-Expression. Dagegen zeigt sich bei den Nicht-Seminomen mit einer Signifikanz von $p = 0,034$ für die Kernintensität und Quantität eine Tendenz zur verminderten Färbung mit steigendem β -HCG-Wert. So sind bei β -HCG negativen Tumoren keine Kerne farblos, während bei β -HCG-Werten von 5000-50000 mIU/ml alle Tumoren farblose Kerne zeigen. Bei AFP-negativen Nicht-Seminomen zeigt sich eine signifikant stärkere Zytoplasmafärbung ($p = 0,032$) als bei solchen mit einem $\text{AFP} < 1000$ ng/ml. Während sich bei AFP-negativen Tumoren kein farbloses Zytoplasma zeigt, ist bei den AFP-positiven Tumoren das Zytoplasmafärbeergebnis in 41,7 % der Fälle negativ. In der Gruppe der Nicht-Seminome kann weder eine signifikante Korrelation für das V-, L-, oder R- Stadium noch für das klinische Stadium oder die Prognose getroffen werden. Betrachtet man die einzelnen Tumorentitäten des Nicht-Seminoms, so ergeben sich keine Zusammenhänge mit dem Färbeergebnis. Aussagekräftige Überlebensdaten konnten aufgrund des kurzen Verlaufintervalls des Patientenkollektivs nicht erhoben werden, sodass auf die Durchführung von Kaplan-Meier-Analysen bzw. Cox-Regressionsanalysen verzichtet wurde.

Klinisch pathologische Parameter:	p für KI Seminom	p für KI Nicht-seminom	p für KQ Seminom	p für KQ Nicht-seminom	p für ZI Seminom	p für ZI Nicht-seminom
T-Stadium	0,381	0,420	0,659	0,420	0,207	0,102
N-Stadium	0,050	0,350	0,481	0,350	0,671	0,047
β -HCG	0,231	0,034	0,060	0,034	0,098	0,368
AFP		0,533		0,533		0,032
Klinisches Stadium	0,291	0,713	0,242	0,713	0,534	0,124
Maligne/ Gesund	0,191	0,372	0,191	0,372	0,064	0,047
Entitäten		0,463		0,463		0,129
Risiko		0,659		0,659		0,646
Rezidiv		0,011		0,011		0,668

Tab. 29: P-Werte (Chi-Quadrat Test) von Pcd4-Expression und klinisch-pathologischen Parametern der Hodenkarzinompatienten

Die Tabelle zeigt die p-Werte des Chi-Quadrat Tests zur Korrelation der Versuchsergebnisse und der klinisch-pathologischen Daten, sowie im Vergleich zwischen Malignom und gesundem Kontrollgewebe. Signifikanzen sind grafisch hervorgehoben. KI, Kernintensität; KQ, Kernquantität; ZI, Zytoplasmaintensität; ; T, Tumorausdehnung; N, Lymphknotenbefall; β -HCG, β humanes Choriogonadotropin; AFP, Alphafetoprotein

4.5 Peniskarzinom

4.5.1 Pcd4-Expression in Korrelation zur Differenzierung des Gewebes

Die Pcd4-Expression ist in den untersuchten Peniskarzinomen im Vergleich zum gesunden Gewebe signifikant herunter-reguliert (siehe Tab. 31). Während beim gesunden Gewebe 91,7 % der Kerne stark und nur 4,2 % schwach angefärbt sind, zeigen 41,3 % der Malignome keine Kernfärbung. Die Kernquantität korreliert noch signifikanter mit der Unterscheidung zwischen malignem und benignem Gewebe ($p < 0,0001$). Wie aus folgender Grafik deutlich wird, ist im malignem Gewebe die Mehrzahl der Kerne farblos und nur 7,9 % weisen eine Quantität von $> 70\%$ auf. Im gesunden Gewebe findet sich hingegen bei 62,5 % die maximale Kernquantität. In der ROC-Kurvenanalyse ergeben sich signifikante Ergebnisse für die Unterscheidung zwischen Malignom und gesundem Gewebe (siehe Tab. 30).

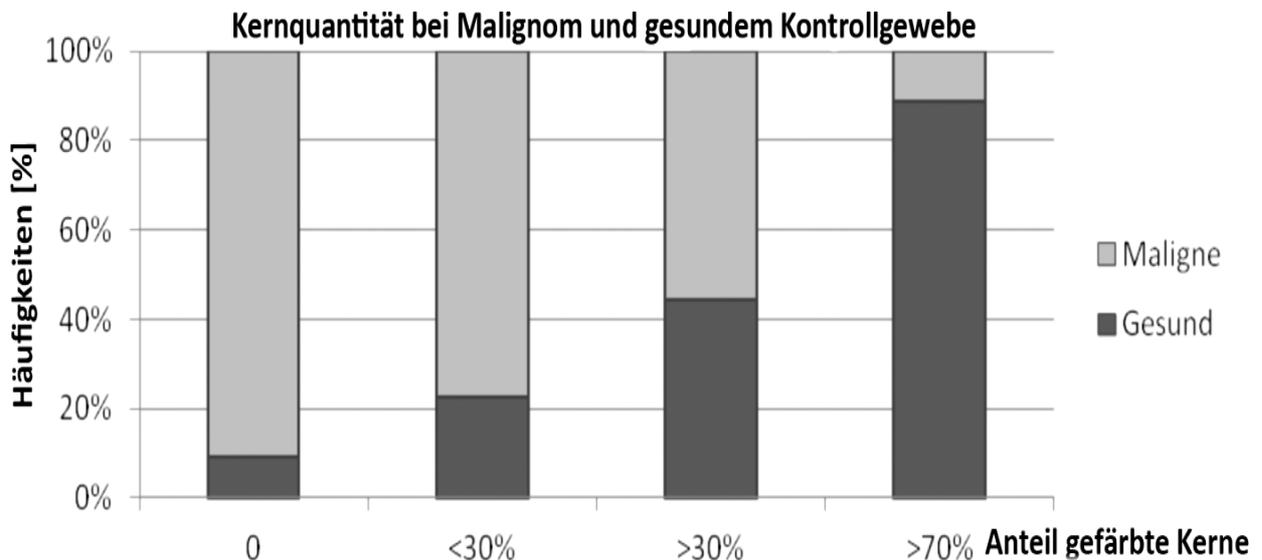


Abb. 11: Kernquantität bei Malignomen und gesundem Gewebe der Peniskarzinompatienten

Das Diagramm stellt die Pcd4-Kernquantität bei malignen und gesundem Gewebe als prozentualen Anteil des Patientenkollektivs dar

Kernquantität	Sensitivität	Spezifität	AUC	95%KI
Maligne/ Gesund	72,75 %	92,2 %	0,894	0,807-0,981

Tab. 30: ROC-Kurvenanalyse von Pcd4-Färbeergebnissen für Peniskarzinompatienten

Die Tabelle zeigt die Ergebnisse der ROC-Kurvenanalyse zur Sensitivitäts- und Spezifitätsbestimmung der Kernquantität für die Unterscheidung zwischen malignem und gesundem Gewebe. AUC, Area Under the Curve; KI, Konfidenzintervall.

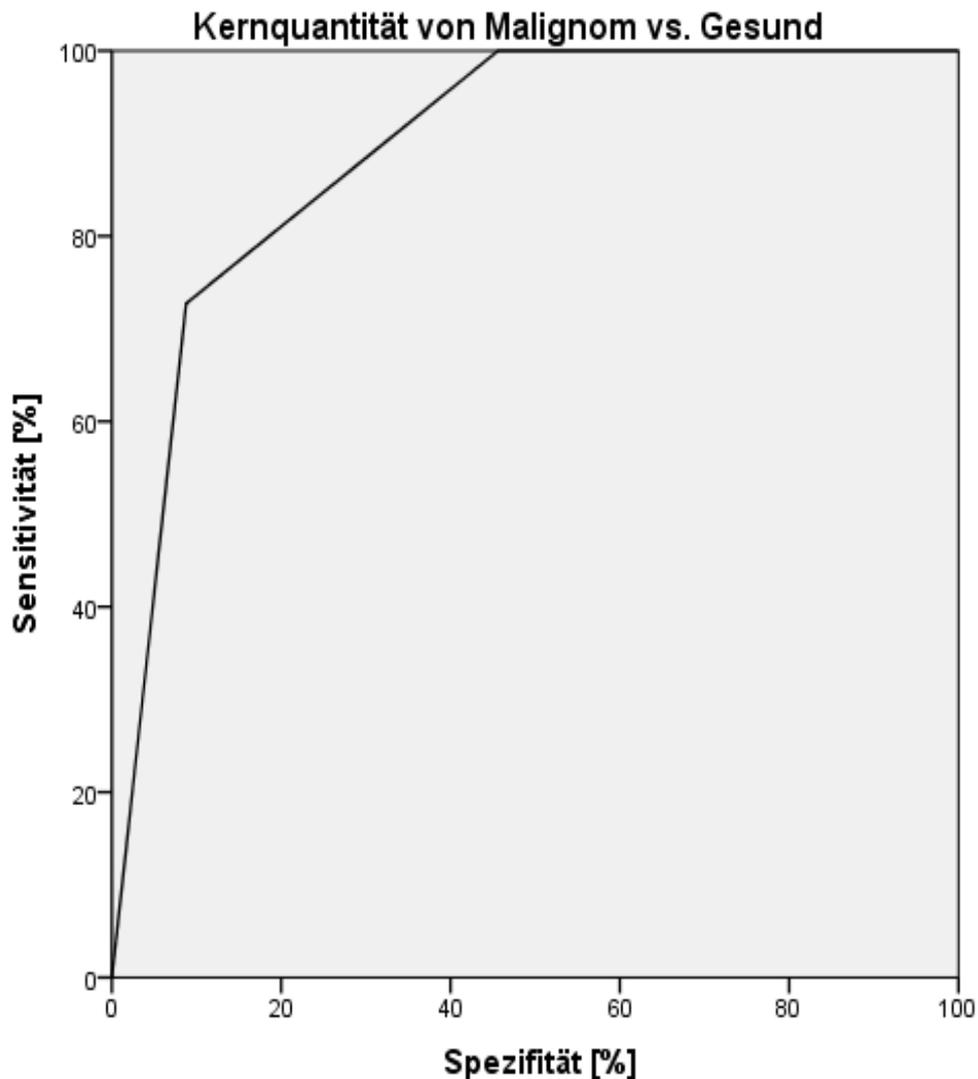


Abb. 12: ROC-Kurve der Kernquantität der Peniskarzinompatienten

In der Abbildung ist die Spezifität gegen die Sensitivität der Kernquantität zur Differenzierung zwischen Malignom und gesundem Kontrollgewebe dargestellt. Die hohe Sensitivität und Spezifität stellt sich in einem großen Abstand der Kurven von einem diagonalen Graphen durch den Ursprung dar, aus der sich die AUC berechnen lässt, welche ein Maß für die Trennschärfe darstellt

Die Zytoplasmaintensität korreliert signifikant ($p = 0,049$) mit dem untersuchten Parameter. In gesundem Gewebe sind 62,5 % der Proben mittelstark angefärbt und keine farblos. Die Malignome weisen hingegen in 12,7 % der Fälle ein farbloses Ergebnis auf, die Mehrzahl ist jedoch wie beim gesunden Gewebe mit mittlerer (44,4 %) bis schwacher (39,7 %) Intensität angefärbt.

4.5.2 Pcd4-Expression in Korrelation zu den klinisch-pathologischen Parametern

4.5.2.1 T-Stadium

Das T-Stadium korreliert mit der Kernquantität ($p = 0,021$) und Zytoplasmaintensität ($p = 0,023$) der immunhistochemischen Färbung des Pcd4. Während bei den Cis-Tumoren ausschließlich Kernquantitäten von >30 bzw. >70 % zu erkennen sind, haben bereits T1-Tumoren zu 33,3 % farblose Kerne und nur bei 3,7 % eine Quantität von >70 %. Ähnliche Verteilungen finden sich für das T2-Stadium. Im Stadium T3 zeigt sich eine deutliche Mehrheit farbloser Kerne von 78,6 %. Es finden sich bei diesen Stadien keine Kerne mit höchster Quantität (über 70 %). Das T4-Stadium ergibt ein farbloses Ergebnis für die Kernfärbung. Ähnliche Ergebnisse zeigen sich bei der Zytoplasmafärbung. Auch sie nimmt mit wachsendem T-Stadium ab. Die Cis-Tumoren zeigen mit 75 % mittlerer Färbintensität die stärkste Zytoplasmafärbung, während bei T3-Tumoren die Mehrzahl farblos (28,6 %) bis leicht angefärbt (42,9 %) ist.

4.5.2.2 Grading

Das Grading korreliert signifikant mit der Kernfärbung in Intensität und Quantität (siehe Tab. 31). Im G1-Stadium sind 70 % stark angefärbt und 20 % farblos. Dagegen zeigen G3 Tumore zu 90,9 % keine Kernfärbung und starke Intensitäten können gar nicht gefunden werden. Das folgende Diagramm verdeutlicht die Ergebnisse der Kernintensität. Einen ähnlichen Trend zeigt auch die Kernquantität, während sich für die Zytoplasmafärbung keine Signifikanzen zeigten.

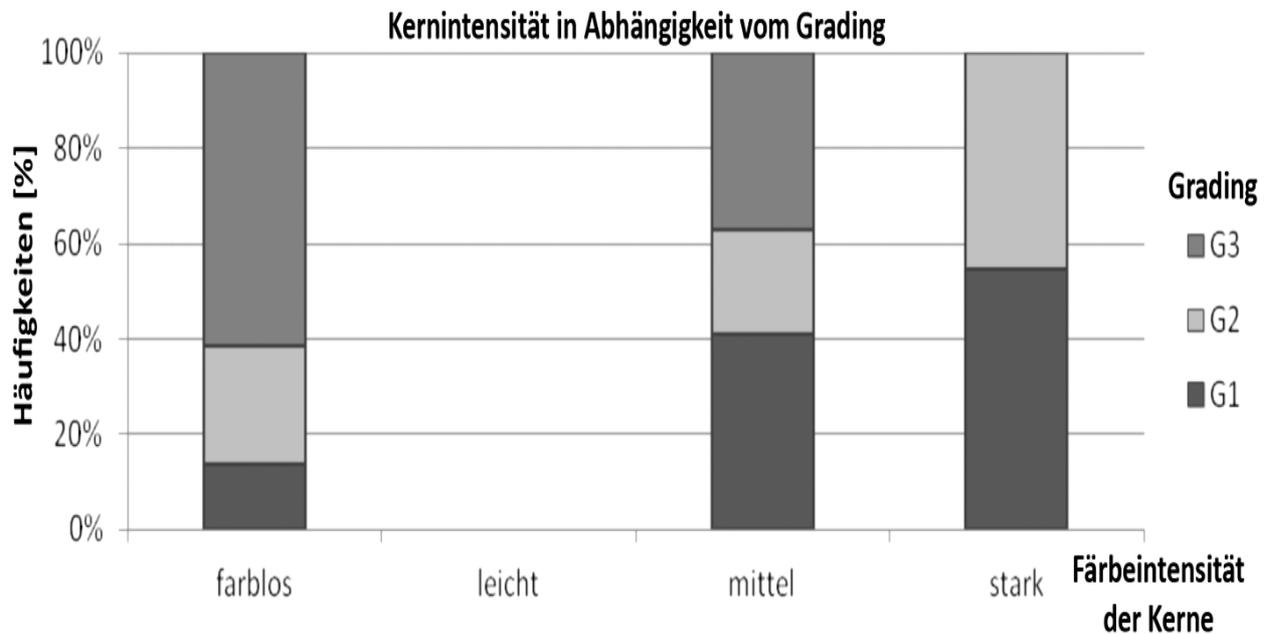


Abb. 12: Kernintensität in Abhängigkeit vom Grading der Peniskarzinompatienten
Das Diagramm stellt die Kernintensität in Abhängigkeit vom Grading des Patientenkollektivs in prozentualen Anteilen dar

Klinisch-pathologische Parameter	p für KI	p für KQ	p für Kern pos. vs. neg.	p für ZI	p für Zytoplasma pos. vs. neg.	p für Pcd4-pos. vs. neg.
Malignom/Gesund	0,002	<0,0001	0,001	0,049	0,067	0,067
T-Stadium	0,051	0,021	0,007	0,023	0,010	0,010
N-Stadium	0,181	0,344	0,079	0,703	0,515	0,515
Grading	0,006	0,029	0,002	0,337	0,049	0,049

Tab. 31: P-Werte (Chi-Quadrat Test) von Pcd4-Expression und klinisch-pathologischen Parametern der Peniskarzinompatienten

Die Tabelle zeigt die p-Werte des Chi-Quadrat Tests zur Korrelation von den Versuchsergebnissen und den klinisch-pathologischen Daten sowie im Vergleich zwischen Malignom und gesundem Kontrollgewebe. Signifikanzen sind grafisch hervorgehoben. KI, Kernintensität; KQ, Kernquantität; ZI, Zytoplasmaintensität; ; T, Tumorausdehnung; N, Lymphknotenbefall; G, histologische Differenzierung

4.5.2.3 Pcd4-Expression in Korrelation zum Progressionsfreien und Krebs-spezifischen Überleben

In der Cox-Regressionsanalyse zeigen sich keine signifikanten Korrelationen zwischen dem Progressionsfreien Überleben und der Pcd4-Expression ($p = 0,963$, Mittelwert = 1,036, 95 %-Konfidenzintervall = 0,229-4,692).

5. Diskussion

Nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind Krebserkrankungen mit 25 % die häufigste Todesursache in der Bundesrepublik Deutschland. Die Tumorgenese ist ein komplexer Entartungsprozess, in dem viele verschiedene Proteine eingreifen, deren Funktionen noch nicht alle geklärt sind. Eines dieser Proteine ist das Pdc4, das tumorsuppressive Eigenschaften aufweist und in verschiedenen Tumorgeweben auf RNA- oder Proteinebene im Vergleich zu gesundem Kontrollgewebe vermindert exprimiert nachgewiesen wurde. Da die Ergebnisse in verschiedenen Organen, besonders in Hinblick auf die Lokalisation von Pdc4 divergieren, geht man von einer zelltypspezifischen Wirkungsweise aus (Lankat et al., 2008), die eine Erforschung der Pdc4-Expression in verschiedenen Tumoren impliziert. Bislang ist die Expression von Pdc4 bei Patienten mit „urologischen“ Malignomen noch nicht umfassend analysiert worden.

5.1 Blasenkarzinom

Die Studie zeigt, dass die nukleäre und zytoplasmatische Pdc4-Expression in Blasenkarzinomen hochsignifikant herabreguliert ist. Zudem korreliert sie mit der Invasivität und Differenzierung des Tumors, was auf eine prognostische Bedeutung von Pdc4 beim Blasenkarzinom hindeutet. Andere immunhistochemische Studien an vergleichbar großen Kohorten von Lungen- und Kolonkarzinompatienten belegten ebenfalls die Korrelation der Pdc4-Expression mit dem T- und G-Stadium (Chen et al., 2003; Mudduluru et al., 2007). Sie konnten zudem keinen Zusammenhang zwischen Pdc4 und dem Geschlecht, dem Alter und der Tumorgöße finden, was sich mit unseren Ergebnissen deckt. Sie beschreiben eine Korrelation zum M-Stadium, die in unserer Blasenkarzinomstudie lediglich als negativ korrelierender Trend beschrieben werden kann. Die prognostische Aussagekraft des Pdc4 für die Fernmetastasensuche ist jedoch von untergeordnetem Interesse, da hier die bildgebenden Verfahren ein sensitives diagnostisches Mittel darstellen.

Die Suche nach einem diskriminativen Marker für die Unterscheidung zwischen MIBC und NMIBC ist hingegen von großer Bedeutung (Denzinger et al., 2008). Es konnte gezeigt werden, dass Pdc4 mit einer hohen Spezifität von bis zu 95,1 % und einer ebenfalls hohen Sensitivität von bis zu 79 % ein MIBC von einem NMIBC unterscheiden

kann. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Pdc4 ein potentieller diagnostisch diskriminativer Marker für das Blasenkarzinom sein könnte. Dies sollte anhand prospektiver Studien verifiziert werden. Das auf der TUR-Biopsie beruhende Staging wird bei 30 % der Patienten nach Zystektomie zu einem maligneren Staging korrigiert (Denzinger et al., 2008). Eine immunhistochemische Anfärbung des Pdc4 im Biopsiematerial könnte die Sensitivität und Spezifität der Tumordiagnostik zur Unterscheidung zwischen NMIBC und MIBC mittels TUR verbessern. Dies hätte auch positive Auswirkungen auf Therapie und Prognostik. Es würde die Zahl der unnötigen, mit einer hohen Morbidität einhergehenden, radikalen Zystektomien bei NMIBC reduzieren. Auf der anderen Seite würde der Anteil der durch die erste Biopsie richtig diagnostizierten MIBC steigen, was eine frühere Zystektomie und folglich eine bessere Prognose implizieren würde.

In kolorektalen Karzinomen konnte eine Korrelation zwischen der Pdc4-Expression und den prognostischen Parametern Rezidivfreies Überleben und Tumorspezifisches Überleben und in Ovarialkarzinomen für Rezidivfreies Überleben (Mudduluru et al., 2007; Allgayer et al., 2009; Wei et al., 2009) gezeigt werden. Des Weiteren zeigte sich in Lungenkarzinomen eine Durchschnittsüberlebenszeit von 47 Monaten für Pdc4-positive Tumoren im Vergleich zu 22 Monaten für Pdc4-negative Tumoren (Chen et al., 2003). Diese Studien verfügten über vergleichbar große Kohorten wie die Blasenkarzinomstudie. Den Veröffentlichungen ist jedoch nicht klar zu entnehmen, ob für das gesamte Patientenkollektiv Überlebensdaten vorlagen. Die guten Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Forscher über Überlebensdaten von Patienten mit Tumoren unterschiedlicher Malignität verfügten. Im Gegensatz dazu korrelieren unsere Überlebensdaten nicht mit der Pdc4-Expression. Dies ist vor allem darauf zurückzuführen, dass die Mehrheit der bereits verstorbenen Patienten ein MIBC hatte, das sich jedoch zu selten Pdc4-positiv darstellte um daraus diskriminative Schlüsse ziehen zu können.

Trotz intensivster Forschung sind Lokalisation, Regulation und Funktion des Pdc4 nicht endgültig geklärt. In verschiedenen Studien zeigte sich eine vermehrte Zellkernlokalisation des Pdc4 in gesunden Geweben. Maligne Proben stellten hingegen eine im Zytoplasma lokalisierte Pdc4-Anreicherung dar (Yoshinaga et al., 1999; Matsushashi et al., 2007; Mudduluru et al., 2007). Weiterführende Untersuchungen legen nahe, dass es eine Shuttlefunktion zwischen Kern und Zytoplasma geben muss (Böhm et al., 2003; Palamarchuk et al., 2005; Lankat-Buttgereit et al., 2008a). Aufgrund der Molekülgröße

von 60kDa muss von einem aktiven Transportmechanismus ausgegangen werden. Böhm et al. fanden zwei potentielle nukleäre Exportsequenzen (NES). Zudem zeigten sie, dass Pdc4 unter Serumentzug in Zellkulturen Leptomycin B-sensitiv aus dem Kern ins Zytoplasma transportiert wird. Im Blasengewebe ist Pdc4 sowohl in benignem als auch in malignem Gewebe nukleäre und zytoplasmatische lokalisiert. Bei genauer Betrachtung der Ergebnisse zeigt sich jedoch, dass die Kernfärbung mit zunehmender Aggressivität des Tumors schneller abnimmt als die Zytoplasmafärbung. Im gesunden Gewebe ist die Kernfärbung intensiver ausgeprägt als die Zytoplasmafärbung (siehe Abbildung 4). Bereits im Tis-Stadium ist die Kernentfärbung von 0 % auf 45,4 % angestiegen, während nur 4,5 % des Zytoplasmas negativ sind. Im Endstadium T4 liegt der Anteil der farblosen Kerne mit 96,4 % ebenfalls über dem des farblosen Zytoplasmas (75 %). Diese Beobachtung kann nicht durch die Shuttlehypothese erklärt werden, da sich die zytoplasmatische Pdc4-Konzentration nicht steigert. Es ist jedoch möglich, dass das Pdc4 zunächst vom Kern in das Zytoplasma transportiert und dort abgebaut wird. Denkbar ist auch eine Modifizierung des Pdc4, die die Bindungseigenschaften des Proteins für den immunhistochemischen Antikörper beeinflusst. In dieser Frage könnte eine Analyse auf mRNA Ebene zielführend sein. In kolorektalen Karzinomen konnte beobachtet werden, dass sich nur die Kerne in den obersten Schleimhautschichten anfärbten (Göke et al., 2004). Im Urothel hingegen färben sich sowohl die Kerne der Schirmzellen als auch die der darunter liegenden Zellschichten an.

Nachdem die immunhistochemischen Untersuchungen zeigten, dass Pdc4 in der Karzinogenese des Blasenkarzinoms eine Rolle spielt, stellte sich die Frage, wie seine Expression in der Blase reguliert wird. Viele Studien belegten in vitro und in vivo eine negative Regulation der Pdc4-Expression durch die Mikro-RNA miR-21 (Gaur et al., 2011; Allgayer et al., 2009; Wang und Lee, 2009). Es gibt jedoch auch Organe, in denen die miR-21 ihre onkogene Wirkung über andere Signalwege, z.B. durch Regulierung des PI3K Antagonisten PTEN in hepatozellulären Karzinomen, vermittelte. Dies deutet auf eine organ- bzw. zelltypspezifische Wirkung der miR-21 hin (Frankel et al., 2008). Daher bestand ein großes Interesse darin, zu überprüfen, ob die miR-21 eine Rolle in der Pdc4-Expressionsregulation im Blasenkarzinom spielt. Die RT-PCR Studie zeigt erstmals, dass auch im Blasenkarzinom die Pdc4-Expression durch miR-21 gehemmt zu werden scheint. Die miR-21 wird in Abhängigkeit vom T-Stadium vermehrt exprimiert und

korreliert hochsignifikant negativ mit der nukleären und zytoplasmatischen Pdc4-Expression ($p = 0,01$ bzw. $p = 0,018$). Die Hypothese der miR-21 abhängigen Negativregulation des Pdc4s wird weiter durch die Beobachtung gestützt, dass immunhistochemisch stark angefärbte Proben eine deutlich verminderte miR-21 Konzentration aufweisen. Somit kann von einer hohen Pdc4-Konzentration auf eine niedrige miR-21-Konzentration und andersherum geschlossen werden. Die Regulierung zwischen Pdc4 und miR-21 ist ein für die zukünftige Krebsforschung interessanter Mechanismus. So könnten inhibitorische Strategien gegen die miR-21 oder gegen die Interaktion der miR-21 und des Pdc4 einen möglichen antikanzerogenen Therapieansatz darstellen.

5.2 Nierenzellkarzinom

Eine mögliche regulatorische Rolle des Pdc4 im Nierenzellkarzinom war bis zum Beginn dieser Forschungsarbeiten noch nicht nachgewiesen. Es wurde jedoch in klarzelligen Nierenzellkarzinomzelllinien vermehrt Pdc4 gemessen, nachdem man durch Flavostatin die Expression der pAkt und S6K1, die bekanntlich die Pdc4-Expression hemmen, inhibierte (Woodard et al., 2008). Des Weiteren zeigte sich in Nierenzellkarzinomen eine erhöhte Geldanamycinsensitivität bei erhöhter Pdc4-Expression (Jansen et al., 2004). Beide Studien weisen darauf hin, dass Pdc4 eine Rolle in der Tumorentstehung dieser Tumorentität spielt. Diese These konnte durch unsere Untersuchung bestätigt werden. Im März 2012 veröffentlichten Li et al. eine Studie zur Pdc4-Expression in Nierenzellkarzinomen. Sie verwendeten ebenfalls die Immunhistochemie. Mit 66 Malignomen und 18 gesunden Kontrollgeweben fiel ihre Kohorte jedoch deutlich kleiner aus als unsere. Zudem unterschieden sie nicht zwischen den einzelnen histologischen Subklassen des Nierenzellkarzinoms, verfügten nicht über Onkozytomproben, teilten die Färbeergebnisse nicht nach Zytoplasma -und Kernsignalen auf und verwendeten für manche Korrelationsanalysen sehr grob gefasste Einteilungen nach schwachen- und starken Pdc4-Färbungen, was die Aussagekraft der Ergebnisse deutlich mindert. Damit ist eine Vergleichbarkeit ihrer Ergebnisse mit den unseren nur bedingt möglich. Mit einer genaueren Differenzierung der unterschiedlichen Tumorarten kann in dieser Arbeit auf die sehr unterschiedliche Tumorbilogie der Nierenzellkarzinome eingegangen werden.

Anders als in den Plattenepithelkarzinomen, in denen die Pdc4-Expression hauptsächlich nukleär lokalisiert ist, befindet sich das Pdc4 in Nierengewebe auch im Zytoplasma. Diese Beobachtung stützt die Hypothese der zelltypspezifischen Lokalisation und Regulation. Li et al. beschreiben hingegen eine ausschließlich nukleäre Pdc4-Lokalisation in malignen Gewebe. Im gesunden Probematerial seien sowohl im Kern als auch im Zytoplasma Pdc4-Expressionen gemessen worden. Diese divergierenden Forschungsergebnisse könnten mit den Unterschieden in der Methodik in Verbindung gebracht werden. Li et al. verwendeten einen anderen Antikörper, Farbstoff und ein anderes Versuchsprotokoll. Dennoch ist festzuhalten, dass beide Pdc4-Studien des Nierenzellkarzinoms eine signifikante Abnahme der Zytoplasmafärbung vom gesunden Gewebe zum Malignom nachweisen. Da die Pdc4-Konzentration im Kern nicht parallel dazu steigt, muss eher von einem zytoplasmatischen Abbaumechanismus, als von einem Transport in den Nukleus ausgegangen werden. Zudem stützt die Studie von Li et al., 2012 unsere Ergebnisse der signifikanten Korrelation der Pdc4-Expression mit dem T-Stadium und zur Unterscheidung zwischen Malignom und benignem Gewebe und unterstreicht so die Funktion als Tumorsuppressor. Auch wenn sich die Kernfärbung signifikant zwischen den einzelnen T-Stadien unterscheidet, so eignet sie sich jedoch nicht als deskriptiver Marker, da die Mehrzahl der Proben farblose Kerne aufweist. Die Zytoplasmafärbung hingegen könnte für diagnostische Zwecke von Interesse sein, da sie nicht nur zwischen Malignom und gesundem Gewebe signifikante Unterschiede zeigt, sondern auch das benigne Onkozytom klar vom Malignom abgrenzt. Die Differenzialdiagnostik zwischen cRCC und pRCC auf der einen und Onkozytomen auf der anderen Seite kann im klinischen Alltag schwierig sein, so dass die nähere Erforschung der Sensitivität und Spezifität von Pdc4 als eventueller diskriminativer Marker in diesem Kontext von großem Interesse ist. Unsere Daten belegen signifikante Unterschiede zwischen der Pdc4-Färbung des Onkozytoms und des ccRCC. Darüber hinaus grenzt sich das sRCC und ccRCC hochsignifikant von gesundem Gewebe ab. Als möglicher diskriminativer Marker könnte Pdc4 die Differenzialdiagnostik verbessern. Darüber hinaus könnte Pdc4 helfen, zwischen den einzelnen histologischen Gruppen des Nierenzellkarzinoms zu unterscheiden.

Die Korrelation der Gefäßinvasion mit der Pdc4-Expression lässt sich ohne vergleichende Bestimmung von Angioinvasionsmolekülen sowie einer Subgruppenanalyse nicht

eindeutig interpretieren. Zum Progressionsfreien und Krebspezifischen Überleben zeigten sich keine Korrelationen, während Li et al., 2012 eine 10 Monate geringere mittlere Gesamt-Überlebenszeit für Patienten mit starker Pdc4-Expression im Vergleich zu solchen, mit schwacher Expression nachwies; es handelte sich in dieser Studie jedoch um ein kleines Mischkollektiv von Patienten mit einem metastasierten (n = 30) und lokal begrenzten Nierenzellkarzinom (n = 36), so dass die Studien nur bedingt miteinander verglichen werden können.

5.3 Prostatakarzinom

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen eine signifikante Korrelation von Pdc4 zur Unterscheidung zwischen benignem und malignem Prostatagewebe für Kernquantität und Kern- und Zytoplasmaintensität. Die Kernintensität änderte sich am deutlichsten ($p < 0,0001$) von 83,6 % stark angefärbten und 8,6 % farblosen Kernen zu 74,6 % farblosen und 15,6 % stark gefärbten Kernen im Karzinom. Die Kernintensität stellt sich mit einer hohen Sensitivität von 71,4 % und einer Spezifität von 81,6 % als potentieller diskriminativer Marker dar. Eine Kombination mit der Bestimmung der Pdc4-positiven vs. negativen Proben könnte mit einer Sensitivität von 92,9 % die Treffsicherheit erhöhen. Die Beobachtung, dass im prostatistischen Gewebe sowohl die Kern- als auch die Zytoplasmafärbung im Karzinom herab reguliert wird, machten bereits Göke et al. (2004). In ihrer Studie waren drei von sieben Karzinomen leicht angefärbt und 4 farblos. Die drei leicht angefärbten Proben stammten von Patienten mit einem niedrigeren Gleasongrade als die vier Farblosen, woraus sich eine Korrelation zwischen Pdc4-Expression und Gleasongrade ergibt, die wir in unserer 76 Karzinompatienten umfassenden Studie nicht nachweisen konnten. Es sei anzumerken, dass ein Patientenkollektiv von 7 und mangelnde gesunde Vergleichsgewebe eine eingeschränkte Aussagekraft im Vergleich zu dieser Studie haben. Auch für die anderen klinisch-pathologischen Parameter ergaben sich hier keine signifikanten Korrelationen. Im Blasenkarzinom zeigte sich eine signifikant erhöhte miR-21-Expression, verbunden mit einer verminderten Pdc4-Konzentration. Die Studienlage zur Regulation von miR-21 in Prostatakarzinomzellen ist kontrovers: Folini et al. konnten keine unterschiedliche miR-21 Konzentration zwischen gesunden und 36 malignen Prostatageweben per qRT-PCR oder Northern Blot messen. Diese

Ergebnisse legen nahe, dass die miR-21-Hochregulierung keine Rolle in der Tumorentstehung der Prostata spielt. Eine miR-21 knockout Zelllinie zeigte keine erhöhte Chemosensitivität (Folini et al., 2010). Im Gegensatz dazu fanden Jansen et al. (2004) eine Pcd4-abhängig erhöhte Geldanamycinsensitivität von Nieren- und Mammakarzinomen. Li et al. (2009) zeigten hingegen erhöhte miR-21-Expressionen in drei verschiedenen PCA-Zellreihen in Abhängigkeit vom Malignitätsgrad und den Androgenen. Sie untersuchten die gleichen Zellreihen wie Folini et al. (2010). Zudem zeigten sie in miR-21 knockout Zellreihen eine erhöhte Apoptosesensitivität der PCA-Zellen, was auf die apoptoseaktivierende Wirkung des Pcd4 zurückgeführt werden kann. Ferner postulierten sie eine dosisabhängige Regulation von Pcd4 in diesen anti-miR-21 Zellreihen. Shiota et al. (2009) fanden in Prostatazellen die inhibitorische Wirkung von Pcd4 auf den Transkriptionsfaktor Twist-1. Somit kam es zu einer verminderten Expression des Folgeproduktes YB-1, was eine Wachstumshemmung zur Folge hatte. Zudem belegten sie in einem Plasmidversuch durch Überexpression von Pcd4 eine erhöhte Sensibilität für Cisplatin und Paclitaxel bei gleichzeitig verlangsamtem Wachstum. Eine andere Studie zeigte mit Hilfe von Docetaxel resistenten PCA-Zellreihen einen Zusammenhang von miR-21, Pcd4 und der Sensitivität für dieses Chemotherapeutikum: Die Expression von miR-21 korrelierte negativ mit der Chemosensitivität und der Pcd4-Expression. Erhöhte Pcd4-Konzentrationen gingen mit einer erhöhten Docetaxelsensitivität einher (Shi et al., 2010). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass Pcd4 eine Rolle in der Tumorgenese in Prostatagewebe zu spielen scheint und stimmen somit mit den Resultaten der aktuellen Prostatakarzinomstudie überein. Mitverantwortlich für die teils gegensätzlichen Forschungsergebnisse könnte die Verwendung unterschiedlicher Pcd4-Antikörper sein, die es erschwert, die Studien miteinander zu vergleichen. Die Funktion der miR-21 und ihre regulierende Wirkung auf Pcd4 in PCAs sind nicht eindeutig erwiesen. Dies stützt die Hypothese, dass die Regulation von Pcd4 zelltypspezifisch variiert. Die Klärung des Regulationsmechanismus ist weiteren Studien vorbehalten. Sie ist von großem Nutzen, um die Pcd4 bedingte erhöhte Chemosensitivität zukünftig für neue therapeutische Strategien verwenden zu können. Eine immunhistochemische Untersuchung diente Shiota et al. (2009), um eine negative Korrelation zwischen der Pcd4-Expression und dem YB-1 Protein nachzuweisen. Aus der Veröffentlichung dieser Studie gehen jedoch keine näheren Informationen über den Differenzierungsgrad und die Aggressivi-

tät der verwendeten 37 Prostatakarzinome hervor, so dass sie keine Vergleichsdaten zu unserer Kernfrage, wie sich die Pdc4-Expression in Abhängigkeit von Aggressivität und Differenzierung darstellt, liefert. Die Beobachtung, dass sowohl Kern als auch Zytoplasma in Prostatagewebe angefärbt werden, kann jedoch durch diese Studie bestätigt werden. Somit ist unsere Studie die erste, die mit einer statistisch relevanten Fallzahl den Einfluss von Pdc4 auf die Klinik des Prostatakarzinoms untersucht, während alle anderen zitierten Veröffentlichungen sich auf die Klärung der Regulation durch die miR-21 konzentrierten bzw., wie Göke et al. (2004), ein sehr kleines Patientenkollektiv aufwiesen.

5.4 Hodentumoren

Dies ist die erste Studie, die die Pdc4-Expression in Hodentumoren untersucht. Die Hodentumore sind eine heterogene Gruppe und wurden für diese Studie in Seminome und Nicht-Seminome unterteilt. Der Versuch, die Nicht-Seminome nochmals in ihre Unterentitäten Embryo-, Chorion-, Dottersackkarzinom und Teratom zu unterteilen, war aufgrund der teilweise histologisch nicht klar räumlich abzugrenzenden Mischtumore nicht möglich. Generell unterscheidet sich das Hodengewebe in seiner Zellbiologie deutlich von Schleimhaut- oder Plattenepithelien, was die Vergleichbarkeit mit anderen Geweben erschwert. Die Studien über Pdc4-Expressionen in Ovarialtumoren beziehen sich ausschließlich auf Adenome und Karzinome, ohne Keimzelltumore zu berücksichtigen (Wang et al., 2008, Wie et al., 2009), so dass keine Studien an vergleichbaren Geweben vorliegen.

Im gesunden Gewebe zeigte sich keine Pdc4-Expression, während sich in den Seminomen zum Teil sowohl Kerne als auch Zytoplasma anfärbten. Der Anteil der farblosen Seminome ist mit 68,8 % für die Kerne und 50 % für das Zytoplasma jedoch sehr hoch. Die Nicht-Seminome zeigen eine signifikant höhere Zytoplasmafärbung im Vergleich zum Normalgewebe. Die Spezifität und Sensitivität des verwendeten Antikörpers konnte verifiziert werden. Zudem muss jedoch berücksichtigt werden, dass die als gesund eingestuft Proben aus tumorfreien Arealen von Tumorpatienten entnommen wurden und durchaus erste Störungen im Zellzyklus ohne bereits histologisch sichtbare Manifestation aufweisen könnten. Die negative Korrelationen der Pdc4-Expression mit dem β -HCG- bzw. dem AFP- Spiegel weist mögliches prognostisches Potential auf, da hohe β -

HCG- und AFP-Werte mit einer schlechten Prognose assoziiert sind. Aufgrund der guten Therapieerfolge ist eine Erhebung aussagekräftiger Überlebensdaten bei dem jungen Patientenkollektiv nicht möglich. Dem Pdc4-Protein kann beim aktuellen Forschungsstand keine regulierende Rolle in der Tumorgenese in Seminomen und Nicht-Seminomen im Gegensatz zu den Forschungsergebnissen an anderen Tumorentitäten zugeschrieben werden. An dieser Stelle sei nochmals auf die komplexe Zellbiologie des Hodengewebes und seiner Entartungsformen hingewiesen. Interessant wäre eine vergleichbare Pdc4-Studie an anderen Keimzelltumoren um zu evaluieren, ob Pdc4 grundsätzlich in Keimzelltumoren keinen zellzyklusregulierenden Einfluss hat.

5.5 Peniskarzinom

Die Pdc4-Expression ist bisher im Peniskarzinomgewebe nie untersucht worden, es gibt jedoch schon einige Studien, die andere Plattenepithelkarzinome erforscht haben. Die Kernfärbung in unseren Proben stellte sich im gesunden Gewebe, wie in der Literatur für Plattenepithel beschrieben (Matsushashi et al., 2006; Ramdas et al., 2009, Reis et al., 2010, Fassan et al., 2010), in 91,7 % der Fälle sehr intensiv und vor allem in den suprabasalen Schichten dar, während sich das Zytoplasma nur leicht bis mittelstark anfärbte. Im Peniskarzinom war die Kernexpression im Vergleich zum gesunden Gewebe in Intensität ($p = 0,002$) und Quantität ($p < 0,001$) signifikant vermindert, was darauf hindeutet, dass Pdc4 eine regulatorische Rolle in der Tumorentstehung des Penis hat. Diese Hypothese wird durch die Korrelationen der Pdc4-Expression und dem T- und G-Stadium untermauert. Mit einer hohen Spezifität (91,2 %) und Sensitivität (72,2 %) stellt die Kernquantitätsbestimmung einen möglichen diskriminativen Marker für die Unterscheidung zwischen benignem und malignem Gewebe dar. Die Abnahme der Zytoplasmafärbung stellt sich ebenfalls signifikant dar. Sie ist jedoch weniger aussagekräftig als die der Kerne, was zum einen auf die bereits im gesunden Gewebe nur geringe Zytoplasmaexpression zurückzuführen ist. Zum anderen verdeutlicht diese Beobachtung, dass, im Einklang mit vorherigen Studien histologisch vergleichbarer Gewebe, die Shuttlehypothese für Plattenepithelkarzinome nicht zu gelten scheint. Ähnlich wie beim Blasenkarzinom ist die Pdc4-Expression zur Unterscheidung der T-Stadien in niedrig malignen Tumoren sensitiver als in höher entarteten T-Stadien. Auffällig ist, dass die untersuchten CIS-Tumoren in keinem Fall eine negative Kernfärbung aufweisen, während

sich bereits im T1-Stadium 33,3 % farblose Kerne zeigen. Die Korrelation von Pdc4-Färbung und Differenzierungsgrad deutet auf eine prognostische Bedeutung von Pdc4 für das Peniskarzinom hin. So zeigte sich z. B. im G3 Stadium keine einzige Probe mit intensiver Kernfärbung, wobei 90,9 % farblos waren. In einer Studie mit 63 Adeno- und 48 Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus zeigte sich ebenfalls eine verminderte Pdc4-Expression beim steigendem T-Stadium (Fassan et al., 2010). Die genaue Analyse der Ösophagusplattenepithelkarzinome zeigte immunhistochemisch eine ebenfalls mit meinen Daten korrelierende starke Kern- und leichte bis mittlere Zytoplasmafärbung im gesunden Gewebe und eine 60 % farblose Kerndarstellung bei Entartung (Fassan et al., 2011). Zudem konnte eine negative Korrelation der miR-21 und der Pdc4-Expression in Plattenepithelkarzinomen von Ösophagus (Fassan et al., 2011), Mundboden (Ramdas et al., 2009; Reis et al., 2010), Laryngopharynx und Zunge (Ramdas et al., 2009) nachgewiesen werden. Dies lässt vermuten, dass dieser Regulationsmechanismus auch im Peniskarzinom nachzuweisen sein könnte. Die Cox-Regressionsanalyse konnte keine signifikante Korrelation der Pdc4-Expression mit dem Progressionsfreien Überleben nachweisen. Da die Analysen jedoch auch keine Signifikanzen für etablierte Variablen wie das T-Stadium und das Grading zeigten, ist anzunehmen, dass die Aussagekraft aufgrund der geringen Fallzahl eingeschränkt ist und sich somit eine Multivariablenanalyse erübrigt. Signifikante Korrelationen zu Überlebensdaten in anderen Plattenepithelkarzinomen konnten bereits nachgewiesen werden, wobei anzumerken ist, dass Fassan et al., 2010 in ihrer Ösophaguskarzinomstudie das Überleben der Plattenepithel- und Adenokarzinompatienten nicht getrennt voneinander untersuchten. Wie einleitend erörtert, ist mit der momentanen chirurgischen Therapie eine häufig hohe Morbidität verbunden.

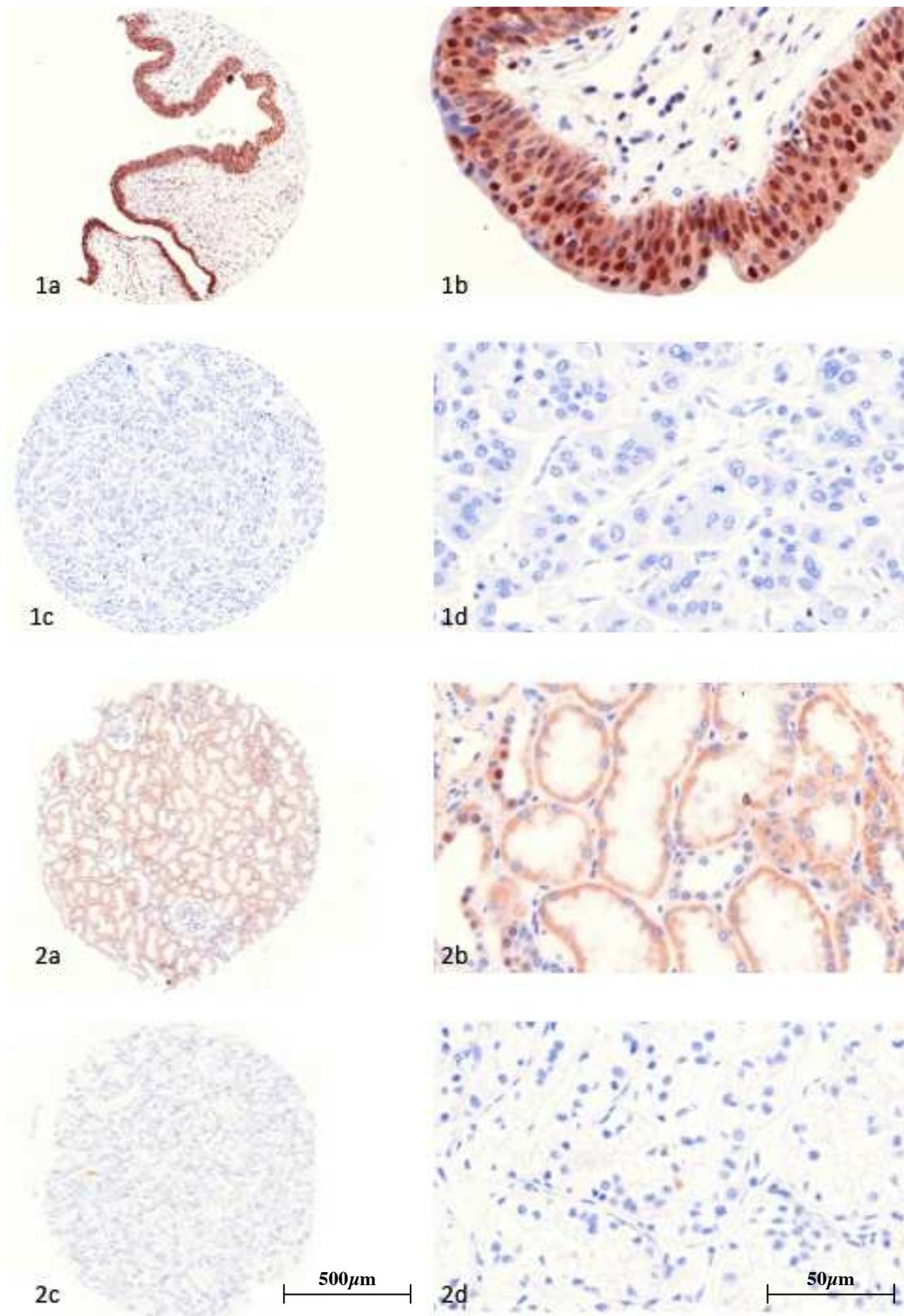
6. Zusammenfassung

Die Tumorsuppressive Wirkung des Pcd4 durch Einleitung der Apoptose wurde bereits in vielen Tumorentitäten nachgewiesen und birgt großes Potential zur Verbesserungen der onkologischen Diagnose-, Prognose- und Therapieansätze. Beim Mammakarzinom z.B. weiß man bereits, dass ein hoher Pcd4-Spiegel mit einer höheren Sensitivität für Tamoxifen einhergeht. In urologischen Tumoren ist Pcd4 hingegen zum Teil noch gar nicht oder nur unzureichend untersucht. Daher war das Ziel dieser Arbeit, die immunhistochemischen Expressionsmuster und die klinische Relevanz des Apoptoseproteins Pcd4 in urologischen Tumoren erstmals an großen Kollektiven immunhistochemisch zu erforschen.

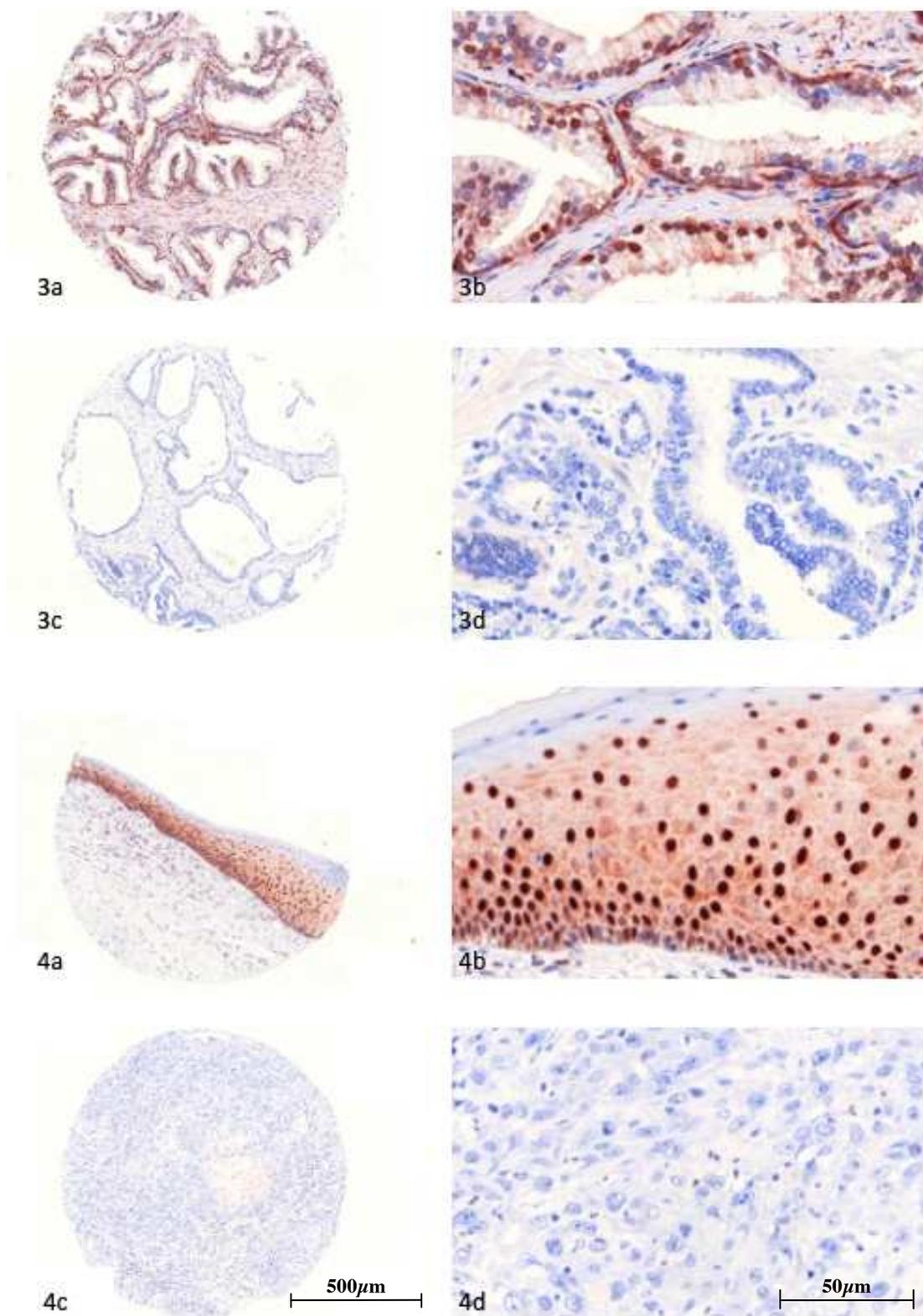
Anhand großer Patientenkollektive von Blasen-, Nierenzell-, Prostata-, Penis- und Hodentumoren konnte gezeigt werden, dass Pcd4 als Tumorsuppressor in der urologischen Tumorgenese von Bedeutung ist, wenn auch auf zelltypspezifische Weise. Insbesondere die Lokalisation des Pcd4 konnte durch die vorliegende Arbeit näher beleuchtet werden: So stützt sie die Hypothese, dass es eine Shuttlefunktion zwischen Kern und Zytoplasma geben muss, da eine zelltyp- und entartungsgradabhängige Veränderung der Expressionsmuster in den beiden Zellkompartimenten zu beobachten ist. In Blasen-, Nierenzell-, Prostata- und Peniskarzinomen ist die Pcd4-Expression im Vergleich zu gesunden Gewebe signifikant erniedrigt. Darüber hinaus ist Pcd4 ein möglicher diskriminativer Marker für die bis weilen stark fehlerbehaftete Unterscheidung zwischen NMIBC und MIBC, zwischen Onkozytom und RCC und zwischen den histologischen Subklassen des RCCs. Somit könnte Pcd4 zur Verbesserung der Tumordiagnostik in der Urologie beitragen.

Aufgrund der klinisch relevanten Ergebnisse der Blasenkarzinomstudie untersuchte ich zusätzlich einen bereits in vielen Tumorentitäten nachgewiesenen translationalen Regulationsmechanismus des Pcd4 durch die miR-21. Die Untersuchung von Blasengewebe mittels RT-PCR zeigte im Einklang mit der aktuellen Studienlage eine deutlich vermehrte miR-21-Expression in Karzinomen, die mit einer verminderten Pcd4-Expression einherging. Dieser negativ regulatorische Einfluss der miR-21 auf die Pcd4-Expression spielt somit auch in der Genese des Blasenkarzinoms eine Rolle und stellt einen möglichen neuen therapeutischen Angriffspunkt dar.

7. Bildanhang



Die Abbildungen zeigen eine Auswahl der immunhistochemischen Färberegebnisse mit Pcd4-Antikörper jeweils in 5x (a,c) und 20x (b,d) Vergrößerung, sortiert nach Organ und TNM-Stadium. Ein rotes Färberegebnis steht für eine Pcd4-Expression. Diese variiert in Intensität, Quantität und Lokalisation. 1: Blase: a-b: gesundes Gewebe, c-d: T4. 2: Niere: a-b: gesundes Gewebe, c-d: T2.



Die Abbildungen zeigen eine Auswahl der immunhistochemischen Färberegebnisse mit Pcd4-Antikörper jeweils in 5x (a,c) und 20x (b,d) Vergrößerung, sortiert nach Organ und TNM-Stadium. Ein rotes Färberegebnis steht für eine Pcd4-Expression. Diese variiert in Intensität, Quantität und Lokalisation. 3: Prostata: a-b: gesundes Gewebe, c-d: T2 (*Gleason-Score* 8). 4: Penis: a-b: Carcinoma in situ, c-d: T3.

8. Literaturverzeichnis

- Afonja O**, Juste D, Das S, Matsushashi S, Samuels HH. Induction of PDCD4 tumor suppressor gene expression by RAR agonists, antiestrogen and HER-2/neu antagonist in breast cancer cells. Evidence for a role in apoptosis. *Oncogene* 2004; 23: 8135-8145
- Appl H**, Klemmner KH. Targeted disruption of c-myb in the chicken pre B-cell line DT40. *Oncogene* 2002; 21.19: 3076-3081
- Asangani IA**, Rasheed SA, Nikolova DA, Leupold JH, Colburn NH, Post S, Allgayer H. MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene* 2008; 27: 2128-2136
- Asangani IA**, Rasheed SA, Nikolova DA, Leupold JH, Colburn NH, Post S, Allgayer H. MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene* 2008; 27: 2128-2136
- Azzoni L**, Zatssepina O, Abebe B, Bennett IM, Kanakaraj P, Perussia B. Differential transcriptional regulation of CD161 and a novel gene, 197/15a, by IL-2, IL-15, and IL-12 in NK and T cells. *J Immunol* 1998; 161: 3493-3500
- Bitomsky N**, Bohm M, Klemmner KH. Transformation suppressor protein Pcd4 interferes with JNK-mediated phosphorylation of c-Jun and recruitment of the coactivator p300 by c-Jun. *Oncogene* 2004; 23.45: 7484-7493
- Böhm M**, Sawicka K, Siebrasse JP, Brehmer-Fastnacht A, Peters R, Klemmner KH. The transformation suppressor protein Pcd4 shuttles between nucleus and cytoplasm and binds RNA. *Oncogene* 2003; 22: 4905-4910
- Bratt O**. Hereditary prostate cancer: Clinical aspects. *J Urol* 2002; 168: 906-913
- Brethau D**, Lechevallier E, de Fromont M, Sault MC, Rampal M, Coulange C. Prognostic value of nuclear grade of renal cell carcinoma. *Cancer* 1995; 76: 2543-2549
- Carayol N**, Katsoulidis E, Sassano A, Altman JK, Druker BJ, Plataniias LC. Suppression of programmed cell death 4 (PDCD4) protein expression by BCR-ABL-regulated engagement of the mTOR/p70 S6 kinase pathway. *J Biol Chem* 2008; 283: 8601-8610
- Carinci F**, Lo Muzio L, Piattelli A, Rubini C, Chiesa F, Ionna F, Palmieri A, Maiorano E, Pastore A, Laino G, Dolci M, Pezzetti F. Potential markers of tongue tumor progression selected by cDNA microarray. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2005; 18: 513-524
- Chen Y**, Knösel T, Kristiansen G, Pietas A, Garber ME, Matsushashi S, Ozaki I, Petersen I. Loss of PDCD4 expression in human lung cancer correlates with tumour progression and prognosis. *J Pathol* 2003; 200.5: 640-646
- Chrouser K**, Leibovich B, Bergstralh E, Zincke H, Blute M. Bladder cancer risk following primary and adjuvant external beam radiation for prostate cancer. *J Urol* 2005; 174: 107-110
- Cmarik JL**, Min H, Hegamyer G, Zhan S, Kulesz-Martin M, Yoshinaga H, Matsushashi S, Colburn NH. Differentially expressed protein Pcd4 inhibits tumor promoter-induced neoplastic transformation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 14037-14042
- Coreoncology**, 2006: Prostate cancer stages. http://www.coreoncology.com/patient/pc_about_stages.aspx (20.10.2011)
- Davis BN**, Davis BN, Hilyard AC, Lagna G, Hata A. SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation. *Nature* 2008; 454: 56-61
- Denzinger S**, Fritsche HM, Otto W, Blana A, Wieland WF, Burger M. Early versus deferred cystectomy for initial high-risk pT1G3 urothelial carcinoma of the bladder: do risk factors define feasibility of bladder-sparing approach? *Eur Urol* 2008; 53: 146-152

- Dorrello NV**, Peschiaroli A, Guardavaccaro D, Colburn NH, Sherman NE, Pagano M. S6K1- and betaTRCP-mediated degradation of PDCD4 promotes protein translation and cell growth. *Science* 2006; 314: 467-471
- Ellinger J**, Kahl P, von der Gathen J, Rogenhofer S, Heukamp LC, Gütgemann I, Walter B, Hofstädter F, Büttner R, Müller SC, Bastian PJ, von Ruecker A. Global levels of histone modifications predict prostate cancer recurrence. *Prostate* 2010; 70: 61-69
- Ellinger J**, Kahl P, Mertens C, Rogenhofer S, Hauser S, Hartmann W, Bastian PJ, Büttner R, Müller SC, von Ruecker A. Prognostic relevance of global histone H3 lysine 4 (H3K4) methylation in renal cell carcinoma. *Int J Cancer* 2010; 127 :2360-2366
- European Association of Urology**, 2011: Online Guidelines. <http://www.uroweb.org> (20.10.2011)
- Fan H**, Zhao Z, Quan Y, Xu J, Zhang J, Xie W. DNA methyltransferase 1 knockdown induces silenced CDH1 gene reexpression by demethylation of methylated CpG in hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2007; 19: 952-961
- Fang W**, Li X, Jiang Q, Liu Z, Yang H, Wang S, Xie S, Liu Q, Liu T, Huang J, Xie W, Li Z, Zhao Y, Wang E, Marincola FM, Yao K. Transcriptional patterns, biomarkers and pathways characterizing nasopharyngeal carcinoma of Southern China. *J Transl Med* 2008; 6: 32
- Fassan M**, Pizzi M, Battaglia G, Giacomelli L, Parente P, Bocus P, Ancona E, Rugge M. Programmed cell death 4 (PDCD4) expression during multistep Barrett's carcinogenesis. *J Clin Pathol* 2010; 63: 692-696
- Ferlay J**, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol* 2007; 18: 581-592
- Folini M**, Gandellini P, Longoni N, Profumo V, Callari M, Pennati M, Colecchia M, Supino R, Veneroni S, Salvioni R, Valdagni R, Daidone MG, Zaffaroni N. miR-21: an oncomir on strike in prostate cancer. *Mol Cancer* 2010; 21: 12
- Fraley EE**, Zhang G, Manivel C, Niehans GA. The role of ilioinguinal lymphadenectomy and significance of histological differentiation in treatment of carcinoma of the penis. *J Urol* 1989; 142: 1478-1482
- Frankel LB**, Christoffersen NR, Jacobsen A, Lindow M, Krogh A. Programmed cell death 4 (PDCD4) is an important functional target of the microRNA miR-21 in breast cancer cells. *J Biol Chem* 2008; 283: 1026-1033
- Gao F**, Wang X, Zhu F, Wang Q, Zhang X, Guo C, Zhou C, Ma C, Sun W, Zhang Y, Chen YH, Zhang L. PDCD4 gene silencing in gliomas is associated with 5'CpG island methylation and unfavorable prognosis. *J Cell Mol Med* 2009; 13: 4257-4267
- Gao F**, Zhang P, Zhou C, Li J, Wang Q, Zhu F, Ma C, Sun W, Zhang L. Frequent loss of PDCD4 expression in human glioma: possible role in the tumorigenesis of glioma. *Oncol Rep* 2007; 17.1: 123-128
- Göke A**, Göke R, Knolle A, Trusheim H, Schmidt H, Wilmen A, Carmody R, Göke B, Chen YH. DUG is a novel homologue of translation initiation factor 4G that binds eIF4A. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 297: 78-82
- Göke R**, Barth P, Schmidt A, Samans B, Lankat-Buttgereit B. Programmed cell death protein 4 suppresses CDK1/cdc2 via induction of p21(Waf1/Cip1). *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; 287: C1541-C1546
- Gronberg H**, Damber L, Damber JE. Familial prostate cancer in Sweden - A nationwide register cohort study. *Cancer* 1996; 77: 138-143
- Habs MR**, Schmahl D. Prevention of urinary bladder tumors in cyclophosphamide-treated rats by additional medication with uroprotectors sodium 2-mercaptoethane

- sulfonate (Mesna[®]) and disodium 2,2'-dithio-bis-ethane sulfonate (Demesne). *Cancer* 1983; 51: 606
- Hilliard A**, Hilliard B, Zheng SJ, Sun H, Miwa T, Song W, Göke R, Chen YH. Translational regulation of autoimmune inflammation and lymphoma genesis by programmed cell death 4. *J Immunol* 2006; 177: 8095–8102
- Hsu TC**, Young MR, Cmarik J, Colburn NH. Activator protein 1 (AP-1)- and nuclear factor kappaB (NF-kappaB)-dependent transcriptional events in carcinogenesis. *Free Radic Biol Med* 2000; 28: 1338-1348
- Hwang SK**, Jin H, Kwon JT, Chang SH, Kim TH, Cho CS, Lee KH, Young MR, Colburn NH, Beck Jr GR, Yang HS, Cho MH. Aerosol-delivered programmed cell death 4 enhanced apoptosis, controlled cell cycle and suppressed AP-1 activity in the lungs of AP-1 luciferase reporter mice. *Gene Ther* 2007; 14: 1353–1361
- Jansen AP**, Camalier CE, Stark C, Colburn NH. Characterization of programmed cell death 4 in multiple human cancers reveals a novel enhancer of drug sensitivity. *Mol Cancer Ther* 2004; 3.2: 103-110
- Jansen AP**, Camalier CE, Colburn NH. Epidermal expression of the translation inhibitor programmed cell death 4 suppresses tumorigenesis. *Cancer Res* 2005; 65: 6034–6041
- Jin H**, Kim TH, Hwang SK, Chang SH, Kim HW, Anderson HK, Lee HW, Lee KH, Colburn NH, Yang HS, Cho MH, Cho CS. Aerosol delivery of urocanic acid-modified chitosan/programmed cell death 4 complex regulated apoptosis, cell cycle, and angiogenesis in lungs of K-ras null mice. *Mol Cancer Ther* 2006; 5: 1041–1049
- Juriscova A**, Latham KE, Casper RF, Casper RF, Varmuza SL. Expression and regulation of genes associated with cell death during murine preimplantation embryo development. *Mol Reprod Dev* 1998; 51: 243-253
- Kang MJ**, Ahn HS, Lee JY, Matsushashi S, Park WY. Up-regulation of PDCD4 in senescent human diploid fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 293: 617-621
- Karim-Kos HE**, de Vries E, Soerjomataram I, Lemmens V, Siesling S, Coebergh JWW. Recent trends of cancer in Europe: A combined approach of incidence, survival and mortality for 17 cancer sites since the 1990s. *Eur J Cancer* 2008; 44: 1345-1389
- Klemeny LA**, Schoenberg M. Familial transitional cell carcinoma. *J Urol* 1996; 156: 867
- Lankat-Buttgereit B**, Gregel C, Knolle A, Hasilik A, Arnold R, Göke R. Pcd4 inhibits growth of tumor cells by suppression of carbonic anhydrase type II. *Mol Cell Endocrinol* 2004; 214: 149-153
- Lankat-Buttgereit B**, Lenschen B, Schmidt H, Göke R. The action of Pcd4 may be cell type specific: evidence that reduction of dUTPase levels might contribute to its tumor suppressor activity in Bon-1 cells. *Apoptosis* 2008; 13: 157-164
- Lankat-Buttgereit B**, Müller S, Schmidt H, Parhofer KG, Gress TM, Göke R. Knockdown of Pcd4 results in induction of proprotein convertase 1/3 and potent secretion of chromogranin A and secretogranin II in a neuroendocrine cell line. *Biol Cell* 2008; 100: 703-715
- LaRonde-LeBlanc N**, Santhanam AN, Baker AR, Wlodawer A, Colburn NH. Structural basis for inhibition of translation by the tumor suppressor Pcd4. *Mol Cell Biol* 2007; 27: 147-156
- Leiber C**. Diagnostik bei Prostataerkrankungen. In: Schultze-Seemann W, Hrsg. Therapieleitfaden Prostataerkrankungen, 1. Auflage. Bremen: UNI-MED, 2002: 58-69
- Leupold JH**, Yang HS, Colburn NH, Asangani I, Post S, Allgayer H. Tumorsuppressor Pcd4 inhibits invasion/intravasation and regulates urokinase receptor(u-PAR) gene expression via Sp-transcription factors. *Oncogene* 2007; 26: 4550-4562

- Li T**, Li D, Sha J, Sun P, Huang Y. MicroRNA-21 directly targets MARCKS and promotes apoptosis resistance and invasion in prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 383: 280-285
- Li X**, Xin S, Yang D, Li X, He Z, Che X, Wang J, Chen F, Wang X, Song X. Down-regulation of PDCD4 expression is an independent predictor of poor prognosis in human renal cell carcinoma patients. *J Cancer Res Clin Oncol* 2012; 138: 529-535
- Liedl B**, Zaak D, Schwaibold H, Hungerhuber E, Zimmermann F, Treiber U, Weiss M. Empfehlung zur Therapie, Diagnostik und Nachsorge. In: Treiber U, Hrsg. *MANUAL Urogenitale Tumoren*. München: Zuckschwerdt Verlag, 2003: 1-49
- Loch T**, Leuschner I, Genberg C, Weichert-Jacobsen K, Küppers F, Yfantis E, Evans M, Tsarev V, Stöckle M. Artificial neural network analysis (ANNA) of prostatic transrectal ultrasound. *Prostate* 1999; 39: 198-204
- Lont AP**, Besnard AP, Gallee MP, Van Tinteren H, Horenblas S. A comparison of physical examination and imaging in determining the extent of primary penile carcinoma. *BJU Int* 2003; 91: 493-495
- Lu Z**, Liu M, Stribinskis V, Klinge CM, Ramos KS, Colburn NH, Lu Y. MicroRNA-21 promotes cell transformation by targeting the programmed cell death 4 gene. *Oncogene* 2008; 27: 4373-4379
- Matsuhashi S**, Narisawa Y, Ozaki I, Mizuta T. Expression patterns of programmed cell death 4 protein in normal human skin and some representative skin lesions. *Exp Dermatol* 2007; 16: 179-184
- Morrison AS**. Advances in the etiology of urothelial cancer. *Urol Clin North Am* 1984; 11: 557
- Mudduluru G**, Medved F, Grobholz R, Jost C, Gruber A, Leupold JH, Post S, Jansen A, Colburn NH, Allgayer H. Loss of programmed cell death 4 expression marks adenoma-carcinoma transition, correlates inversely with phosphorylated protein kinase B, and is an independent prognostic factor in resected colorectal cancer. *Cancer* 2007; 110: 1697-1707
- Nieves-Alicea R**, Colburn NH, Simeone AM, Tari AM. Programmed cell death 4 inhibits breast cancer cell invasion by increasing tissue inhibitor of metalloproteinases-2 expression. *Breast Cancer Res Treat* 2009; 114: 203-209
- Onishi Y**, Hashimoto S, Kizaki H. Cloning of the TIS gene suppressed by topoisomerase inhibitors. *Gene* 1998; 215: 453-459
- Orengo I**, Rosen T, Guill CK. Treatment of squamous cell carcinoma in situ of the penis with 5% imiquimod cream: a case report. *J Am Acad Dermatol* 2002; 47: S225-228
- Ozpolat B**, Akar U, Steiner M, Zorrilla-Calanca I, Tirado-Gomez M, Colburn N, Danilenko M, Kornblau S, Berestein GL. Programmed cell death-4 tumor suppressor protein contributes to retinoic acid-induced terminal granulocytic differentiation of human myeloid leukemia cells. *Mol Cancer Res* 2007; 5: 95-108
- Palamarchuk A**, Efanov A, Maximov V, Aqeilan RI, Croce CM, Pekarsky Y. Akt phosphorylates and regulates Pdc4 tumor suppressor protein. *Cancer Res* 2005; 65: 11282-11286
- Porter CR**, Kodama K, Gibbons RP, Correa R Jr, Chun FK, Perrotte P, Karakiewicz PI. 25-year prostate cancer control and survival outcomes: a 40-year radical prostatectomy single institution series. *J Urol* 2006; 176: 569-574
- Preis E**, Jakse G. Optionen der palliativen Therapie des Peniskarzinoms. *Der Urologe* 2007; 46: 49-53
- Quinn M**, Babb P. Patterns and trends in prostate cancer incidence, survival, prevalence and mortality. Part I: international comparisons. *BJU Int* 2002; 90: 162-173

- Ramdas L**, Giri U, Ashorn CL, Coombes KR, El-Naggar A, Ang KK, Story MD. miRNA expression profiles in head and neck squamous cell carcinoma and adjacent normal tissue. *Head Neck* 2009; 31: 642-654
- Robert Koch Institut** und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.. Harnblase. In: *Krebs in Deutschland 2005/2006 Häufigkeiten und Trends* 2010; 7: 84-87
- Rogenhofer S**, Ellinger J, Kahl P, Stoehr C, Hartmann A, Engehausen D, Wieland WF, Müller SC, Hofstädter F, Walter B. Enhanced expression of peroxisome proliferate-activated receptor gamma (PPAR- γ) in advanced prostate cancer. *Anticancer Res* 2012; 32:3479-3483
- Rogenhofer S**, Miersch H, Göke F, Kahl P, Wieland WF, Hofstädter F, Kristiansen G, von Ruecker A, Müller SC, Ellinger J. Histone methylation defines an epigenetic entity in penile squamous cell carcinoma. *J Urol* 2013; 189: 1117-1122
- Rübben H**. *Uroonkologie*. Heidelberg: Springer, 2001
- Schlichter U**, Burk O, Worpenberg S, Klempnauer KH. The chicken Pcd4 gene is regulated by v-Myb. *Oncogene* 2001; 20: 231-239
- Schmid T**, Jansen AP, Baker AR, Hegamyer G, Hagan JP, Colburn NH. Translation inhibitor Pcd4 is targeted for degradation during tumor promotion. *Cancer Res* 2008; 68: 1254-1260
- Schneider AC**, Heukamp LC, Rogenhofer S, Fechner G, Bastian PJ, von Ruecker A, Müller SC, Ellinger J. Global histone H4K20 trimethylation predicts cancer-specific survival in patients with muscle-invasive bladder cancer. *BJU Int* 2011; 108: E290-296
- Schöber C**, Dempke W, Schmoll HJ. Peniskarzinom. In: Schmoll HJ, Höffken K, Possinger K, ed. *Kompendium internistische Onkologie*. Berlin, Heidelberg: Springer, 1999: 1894–1913
- Schroder FH**, Hugosson J, Roobol MJ, Tammela TL, Ciatto S, Nelen V. Screening and prostate-cancer mortality in a randomized European study. *N Engl J Med* 2009; 360: 1320-1328
- Shi GH**, Ye DW, Yao XD, Zhang SL, Dai B, Zhang HL, Shen YJ, Zhu Y, Zhu YP, Xiao WJ, Ma CG. Involvement of microRNA-21 in mediating chemo-resistance to docetaxel in androgen-independent prostate cancer PC3 cells. *Acta Pharmacol Sin* 2010; 31: 867-873
- Shibahara K**, Asano M, Ishida Y, Aoki T, Koike T, Honjo T. Isolation of a novel mouse gene MA-3 that is induced upon programmed cell death. *Gene* 1995; 12: 297-301
- Shiota M**, Izumi H, Tanimoto A, Takahashi M, Miyamoto N, Kashiwagi E, Kidani A, Hirano G, Masubuchi D, Fukunaka Y, Yasuniwa Y, Naito S, Nishizawa S, Sasaguri Y, Kohno K. Programmed cell death protein 4 down-regulates Y-box binding protein-1 expression via a direct interaction with Twist1 to suppress cancer cell growth. *Cancer Res* 2009; 69: 3148-3156
- Soejima H**, Miyoshi O, Yoshinaga H, Masaki Z, Ozaki I, Kajiwara S, Niikawa N, Matsuhashi S und Mukai T. Assignment of the programmed cell death 4 gene (PDCD4) to human chromosome band 10q24 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 1999; 87: 113–114
- Steinberg GD**, Carter BS, Beaty TH, Childs B, Walsh PC. Family History and the Risk of Prostate-Cancer. *Prostate* 1990; 17: 337-347
- Steuber T**, Niemela P, Haese A. Association of free-prostate specific antigen subfractions and human glandular kallikrein 2 with volume of benign and malignant prostatic tissue. *Prostate* 2005; 63: 13

- Suzuki C**, Garces RG, Edmonds KA, Hiller S, Hyberts SG, Marintchev A, Wagner G. PDCD4 inhibits translation initiation by binding to eIF4A using both its MA3 domains. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 3274-3279
- Tumorzentrum Berlin e.V.**, 2003: Diagnostik und Therapie germinaler Hodentumore. http://hodenkrebs.tzb.de/graphische_leitlinie_hodentumoren.pdf (20.10.2011)
- Varkarakis MJ**, Gaeta J, Moore RH. Superficial bladder tumor. Aspects of clinical progression. *Urology* 1974; 4: 414
- Wang Q**, Sun Z, Yang HS. Downregulation of tumor suppressor Pcd4 promotes invasion and activates both beta-catenin/Tcf and AP-1-dependent transcription in colon carcinoma cells. *Oncogene* 2008; 27: 1527-1535
- Wang X**, Wei Z, Gao F, Zhang X, Zhou C, Zhu F, Wang Q, Gao Q, Ma C, Sun W, Kong B, Zhang L. Expression and prognostic significance of PDCD4 in human epithelial ovarian carcinoma. *Anticancer Res* 2008; 28: 2991-2996
- Wei NA**, Liu SS, Leung TH, Tam KF, Liao XY, Cheung AN, Chan KK, Ngan HY. Loss of Programmed cell death 4 (Pcd4) associates with the progression of ovarian cancer. *Mol Cancer* 2009; 8: 70
- Wein AJ**, Kavoussi LR, Novick AC, Partin AW, Peters CA. *Campbell - Walsh Urology 4 Vol. Set (Campbell's Urology (4 Vols.))*. Philadelphia: Saunders, 2006
- Wen YH**, Shi X, Chiriboga L, Matsahashi S, Yee H, Afonja O. Alterations in the expression of PDCD4 in ductal carcinoma of the breast. *Oncol Rep* 2007; 18: 1387-1393
- Wolf JS Jr**, Cher M, Dall'era M. The use and accuracy of cross-sectional imaging and fine needle aspiration cytology for detection of pelvic lymph node metastases before radical prostatectomy. *J Urol* 1995; 153: 993
- Woodard J**, Sassano A, Hay N, Plataniias LC. Statin-dependent suppression of the Akt/mammalian target of rapamycin signaling cascade and programmed cell death 4 up-regulation in renal cell carcinoma. *Clin. Cancer Res* 2008; 14: 4640-4649
- Yan HT**, Shinka T, Sato Y, Yang XJ, Chen G, Sakamoto K, Kinoshita K, Aburatani H, Nakahori Y. Overexpression of SOX15 inhibits proliferation of NT2/D1 cells derived from a testicular embryonal cell carcinoma. *Mol Cells* 2007; 24: 323-328
- Yang HS**, Jansen AP, Nair R, Shibahara K, Verma AK, Cmarik JL, Colburn NH. A novel transformation suppressor, Pcd4, inhibits AP-1 transactivation but not NF-kappaB or ODC transactivation. *Oncogene* 2001; 20: 669-676
- Yang HS**, Knies JL, Stark C, Colburn NH. Pcd4 suppresses tumor phenotype in JB6 cells by inhibiting AP-1 transactivation *Oncogene* 2003; 22: 3712-3720
- Yang HS**, Matthews CP, Clair T, Wang Q, Baker AR, Li CC, Tan TH, Colburn NH. Tumorigenesis suppressor Pcd4 down-regulates mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1 expression to suppress colon carcinoma cell invasion. *Mol Cell Biol* 2006; 26: 1297-1306
- Yasuda M**, Nishizawa T, Ohigashi H, Tanaka T, Hou DX, Colburn NH, Murakami A. Linoleic acid metabolite suppresses skin inflammation and tumor promotion in mice: possible roles of programmed cell death 4 induction. *Carcinogenesis* 2009; 30: 1209-1216
- Yoshinaga H**, Matsushashi S, Fujiyama C, Masaki Z. Novel human PDCD4 (H731) gene expressed in proliferative cells is expressed in the small duct epithelial cells of the breast as revealed by an anti-H731 antibody. *Pathol Int* 1999; 49: 1067-1077
- Zaridze DG**, Boyle P, Smans M. International trends in prostatic cancer. *Int J Cancer* 1984; 33: 223-230
- Zhang H**, Ozaki I, Mizuta T, Hamajima H, Yasutake T, Eguchi Y, Ideguchi H, Yamamoto K, Matsushashi S. Involvement of programmed cell death 4 in transforming growth factor-

beta1-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2006; 25: 6101-6112

Zhang Z, DuBois RN. Detection of differentially expressed genes in human colon carcinoma cells treated with a selective COX-2 inhibitor. *Oncogene* 2001; 20: 4450-4456

Zhu S, Wu H, Wu F, Nie D, Sheng S, Mo YY. MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis. *Cell Res* 2008; 18: 350-359

9. Danksagung

Für die Unterstützung bei der Entstehung dieser Arbeit möchte ich mich ganz herzlich bedanken bei:

- Professor Dr. med. Dr. h.c. Stefan C. Müller für die Überlassung des Themas und dafür, dass er mir die Arbeit im Labor seiner Klinik ermöglicht hat
- Dr. med. Nicolas Fischer für die hervorragende Betreuung und den großen Zeiteinsatz
- Dr. med. Friederike Göke für die große Hilfe bei der Projektentwicklung und Auswertung
- meiner Familie und meinen Freunden für die moralische Unterstützung
- Doris Schmidt, PD Dr. med. Jörg Ellinger und dem gesamten Laborteam für die hervorragende Atmosphäre und die unzähligen Hilfestellungen
- Prof. Dr. med. Philip Kahl, PD Dr. Jörg Ellinger und Herdis Mertes für die kollegiale Unterstützung bei der Zusammentragung des Patientenkollektivs
- Frau Steiner für ihre kompetente Hilfe bei der Durchführung der Immunhistochemischen Experimente
- PD Dr. Sebastian Franke für die konstruktive Kritik meiner Arbeit aus Sicht eines Biochemikers
- Dieter Braune für die sprachliche Korrektur der Arbeit