

Aus dem Institut für Pathologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. med. Helmut Erich Gabbert

**Expression und prognostische Relevanz von
Gas6 und Axl im humanen Prostatakarzinom**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Elena Stenzel

2012

**Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf
Dekan

Referent: Prof. Dr. med. R. Engers
Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. W.A. Schulz

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	2
Darstellungsverzeichnis	4
1 Einleitung	5
1.1 Die Prostata	6
1.2 Das Prostatakarzinom.....	7
1.2.1 Epidemiologie	7
1.2.2 Ätiologie.....	8
1.2.3 Pathologie.....	9
1.2.4 Diagnostik	18
1.2.5 Therapie.....	20
1.2.6 Prognosekriterien des Prostatakarzinoms.....	24
1.3 Der Gas6/Axl-Signalweg	25
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	30
2 Material und Methoden	31
2.1 Patientenkollektiv	31
2.2 Immunhistochemie	32
2.3 Der Axl-Antikörper	33
2.4 Der Gas6-Antikörper.....	33
2.5 Beurteilung der immunhistochemischen Anfärbung.....	33
2.6 Statistische Analysen.....	34
3 Ergebnisse	35
3.1.1 Axl-Expression im Prostatakarzinom und Assoziation mit wichtigen klinisch- pathologischen Parametern	35
3.1.2 Univariate Analyse	39
3.1.3 Multivariate Analyse	40
3.2.1 Gas6-Expression im Protatakarzinom und Assoziation mit wichtigen klinisch- pathologischen Parametern	41
3.2.2 Univariate Analyse	45
4 Diskussion	46
5 Zusammenfassung	52
6 Literaturverzeichnis	53
7 Danksagung	62
8 Eidesstattliche Versicherung	63

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACTH	adrenocorticotropes Hormon
Ark	adhesion related kinase
BPH	benigne Prostatahyperplasie
BVI	blood vessel invasion = Blutgefäßinvasion
cDNA	complementary DNA
DAB	Diaminobenzidin
EGF(R)	epidermal growth factor (receptor)
ERK	extracellular signal-regulated kinase
Gas6	growth arrest-specific protein 6
GIST	gastrointestinaler Stromatumor
GS	Gleason Score
HDR	High-Dose-Rate-Brachytherapie
HER2/neu	human epidermal growth factor receptor 2
HG-PIN	high-grade prostatistische intraepitheliale Neoplasie
IG	Immunglobulin-ähnliche Domänen des Axl-Rezeptors
IRS	immunreaktiver Score
i.v.	intravenös
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kDa	Kilodalton
LDR	Low-Dose-Rate-Brachytherapie
LHRH	luteinisierendes Hormon Releasing-Hormon
LVI	lymphatic vessel invasion = Lymphgefäßinvasion
MAPK	mitogen-activated protein kinase
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
NaOH	Natriumhydroxid
NF-κB	nukleärer Faktor kappa B
PAP	prostatic acid phosphatase = prostataspezifische saure Phosphatase
PCR	Polymerasekettenreaktion
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIN	prostatistische intraepitheliale Neoplasie
PKB	Proteinkinase B

PNI	perineural invasion = Perineuralscheideninvasion
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
PTEN	phosphatase and tensin homolog
p38 MAPK	p38 mitogen-activated protein kinase
Ras	Ras Protein
RTK	Rezeptortyrosinkinase
S6K	S6 ribosomal kinase
Tab.	Tabelle
TAM-RTK	Rezeptortyrosinkinase der TAM-Familie (Ty ro3/ Ax l/ Mer)
TBS	Tris-buffered Saline
Tiam1	T-Lymphoma invasion and metastasis 1
TNF α	Tumornekrosefaktor α
(p)TNM	(pathologische) TNM-Klassifikation (Tumor, Node, Metastasis)
TRUS	transrektaler Ultraschall
TURP	transurethrale Resektion der Prostata
VEGF	vascular endothelial growth factor
Vgl.	Vergleich
Z.n.	Zustand nach

Darstellungsverzeichnis

Abbildungen:

- Abb.1: Schematische Darstellung des Gleason Gratings, modifiziert nach ISUP 2005
- Abb.2: Aufbau, Bindung und Aktivierung der TAM-Rezeptortyrosinkinasen und ihrer Liganden
- Abb.3: Analyse der Axl-Expression im Prostatakarzinom, in der HG-PIN und im normalen sekretorischen Epithel mittels semiquantitativer Immunhistochemie
- Abb.4: Prognostische Relevanz der Axl-Überexpression in der Kaplan-Meier-Analyse
- Abb.5: Analyse der Gas6-Expression im Prostatakarzinom, in der HG-PIN und im normalen sekretorischen Epithel mittels semiquantitativer Immunhistochemie
- Abb.6: Prognostische Relevanz der Gas6-Überexpression in der Kaplan-Meier-Analyse

Tabellen:

- Tab.1: TNM-Klassifikation des Prostatakarzinoms
- Tab.2: Berechnungsgrundlage der immunreaktiven Scores (IRS) von Axl und Gas6
- Tab.3: Klinisch-pathologische Charakteristika der Axl-Überexpression im Prostatakarzinom
- Tab.4: Klinisch-pathologische Charakteristika der Gas6-Überexpression im Prostatakarzinom

1 Einleitung

Das Prostatakarzinom ist das häufigste Karzinom des Mannes und stellt in Deutschland die dritthäufigste krebsbedingte Todesursache beim männlichen Geschlecht dar [RKI 2008].

Die Entstehungsmechanismen des Prostatakarzinoms sind bislang nur unvollständig aufgeschlüsselt. Verschiedene chromosomale Veränderungen sind beim Prostatakarzinom gehäuft vorzufinden, darunter Verluste von Chromosomenabschnitten auf 6q, 7q, 8p, 9p, 10q, 12p, 13q, 16q, 17p, 18q bzw. Zugewinne der Chromosomen 7 und 8q [De Marzo 2001]. Derartige genetische Alterationen führen zu zahlreichen molekularen Veränderungen, unter anderem Mutation bzw. Verlust der Tumorsuppressorgene p53 und PTEN, Aktivierung der Telomerase, Herunterregulierung des Zelladhäsionsmoleküls E-Cadherin oder Inaktivierung der Glutathion-S-Transferase und des Östrogenrezeptors α [Foley 2004].

Die sehr unterschiedlichen Verlaufsformen der Erkrankung sind bislang kaum zu erklären. Während einige Karzinome latent bleiben und bei den Betroffenen lebenslang zu keinerlei Beschwerden führen, zeigen andere einen sehr aggressiven Verlauf mit frühzeitiger Metastasierung. Insgesamt verstirbt etwa jeder 5. Patient an seinem Prostatakarzinom [Jemal 2008]. Die bislang etablierten Prognosefaktoren des Prostatakarzinoms können den Verlauf der Erkrankung nicht präzise vorhersagen [Ross 2003]. Es besteht daher ein Bedarf an neuen Prognosefaktoren, um Entscheidungen hinsichtlich der Notwendigkeit aggressiver Therapiemaßnahmen zielsicherer treffen zu können.

Seit der Entdeckung des Gas6/Axl-Signalwegs im Jahre 1995 konnten zahlreiche Funktionen des Tyrosinkinase-Rezeptors Axl und seines Liganden Gas6 nachgewiesen werden wie z.B. Regulation von Zellproliferation, -migration, -adhäsion, Apoptose und Onkogenese. Über die Expression von Gas6 und Axl sowie deren prognostische Relevanz im Prostatakarzinom ist bislang jedoch noch wenig bekannt.

1.1 Die Prostata

Die Prostata gehört zusammen mit den Hoden, den Nebenhoden und den Samenblasen zum inneren Genitale des Mannes. Die Prostata des Erwachsenen ist ungefähr kastaniengroß und wiegt etwa 20 g. Sie liegt kaudal der Harnblase und umschließt den ersten Abschnitt der Harnröhre, die Pars prostatica urethrae [Benninghoff 2003, Hautmann 2006a, Sökeland 2004a]. Die Symphyse befindet sich ventral, die Rektumampulle dorsal der Prostata. Von hier aus lässt sich die Prostata bei der rektalen Untersuchung ertasten.

Das Organ besteht aus 30 – 50 tubuloalveolären Einzeldrüsen, die von Bindegewebe und glatten Muskelzellen umgeben sind und am Colliculus seminalis in das Lumen der prostatistischen Harnröhre münden [Sökeland 2004a]. Die Prostata besitzt keine durchgängige, histologisch klar abgrenzbare Organkapsel. In einigen Arealen existiert eine fibromuskuläre Begrenzung (im Folgenden als „Kapsel“ bezeichnet) zur Umgebung, insbesondere im Bereich des Apex und der Basis reichen die Prostatadrüsen jedoch bis unmittelbar an die Organgrenze heran [Ayala 1989, Jocham 2007].

Nach McNeal wird die Prostata in vier Zonen gegliedert [McNeal 1981]:

- Die *periphere Zone* liegt kaudal und peripher und hat mit über 70% den größten Anteil am Prostatagewebe. Die meisten Prostatakarzinome entstehen in dieser Region.
- Die *zentrale Zone* ist um die Ductus ejaculatorii lokalisiert und macht etwa 25% des Organs aus.
- Die *Transitionalzone* nimmt ca. 5 – 10% des Drüsengewebes ein. Dort entsteht durch Proliferation von Drüsengewebe und Stroma die benigne Prostatahyperplasie (BPH).
- Die *anteriore Zone* aus fibromuskulärem Stroma bildet die gesamte Vorderfläche der Prostata.

Die Prostata produziert ein dünnflüssiges, farbloses, leicht saures Sekret, welches etwa 15 – 30% der Flüssigkeitsmenge des Ejakulats ausmacht. Dieses Sekret enthält zahlreiche Substanzen, die u.a. die Motilität und Befruchtungsfähigkeit der Spermatozoen beeinflussen und das Ejakulat verflüssigen.

Die Prostata ist ein hormonsensitives Organ. Durch das Enzym 5 α -Reduktase, welches insbesondere im Stroma eine hohe Aktivität aufweist, wird Testosteron in das stärker wirksame Dihydrotestosteron (DHT) umgewandelt. Die periurethralen Anteile der Prostata sind stärker östrogensensitiv, weshalb die altersbedingte Erhöhung des 17- β -Östradiol/ Testosteron-Quotienten zu einer Hyperplasie dieses Areals führt, während die testosteronsensitiven peripheren Anteile der Prostata atrophieren [Böcker 2001].

Der histologische Aufbau der Drüsen ist durch ein zwei- bis mehrreihiges hochprismatisches Epithel gekennzeichnet. Die Drüsenzellen exprimieren und sezernieren u.a. saure Phosphatase (PAP) und Prostata-spezifisches Antigen (PSA). Die an der Basalmembran gelegenen Basalzellen stellen Vorläuferzellen der Drüsenzellen dar, von denen aus die Regeneration des Prostataepithels erfolgt. Weitere Zelltypen sind die endokrinen Zellen, die u.a. Serotonin enthalten und eine wichtige Rolle bei der lokalen Steuerung der Sekretionsprozesse spielen [Benninghoff 2003].

1.2 Das Prostatakarzinom

1.2.1 Epidemiologie

Das Prostatakarzinom ist das häufigste Karzinom des Mannes und macht ca. 25% der malignen Neuerkrankungen beim männlichen Geschlecht aus. In Deutschland stellt es nach dem Bronchial-/Lungenkarzinom und dem Darmkrebs die dritthäufigste krebsbedingte Todesursache bei Männern dar, in den USA liegt es mit einem Anteil von 10% sogar auf Platz zwei [Jemal 2008, RKI 2008]. Jährlich werden über 58 000 Prostatakarzinome in Deutschland diagnostiziert. Das Prostatakarzinom ist mit einem mittleren Erkrankungsalter von 69 Jahren als Malignom des älteren Mannes anzusehen. Vor dem 50. Lebensjahr ist es nur selten vorzufinden [RKI 2008], in dieser Altersgruppe verhält sich das Malignom jedoch häufig sehr aggressiv und ist daher mit einer schlechteren Prognose assoziiert [Johnson 1972, Kerr 1994]. In den USA entwickelt ungefähr jeder 3. Mann ein Prostatakarzinom, jeder 6. Mann erkrankt an einem Prostatakarzinom und jeder 30. Mann verstirbt daran [Jemal 2008]. Die jährliche weltweite Inzidenz des Prostatakarzinoms lag 2002 bei 25,3 pro 100 000 [Parkin 2005]. In Deutschland lassen sich jährlich stetig zunehmende Inzidenzzahlen nachweisen, was zu einem großen Teil auf die neuen diagnostischen Möglichkeiten zur Früherkennung wie das PSA-Screening zurückgeführt werden kann [RKI 2008]. Die geografische Verteilung des Prostatakarzinoms ist heterogen: Während die Inzidenz in den USA, Kanada, Australien/Neuseeland und Nord-West-Europa hoch ist, finden sich niedrige Zahlen insbesondere in Asien. Das Erkrankungsrisiko weist auch ethnische Unterschiede auf. Bei Amerikanern afrikanischen Ursprungs ist die Inzidenz deutlich höher als bei Weißen und bei diesen wiederum höher als bei Asiaten [Parkin 2005].

Das Prostatakarzinom hat eine relativ gute Prognose. Trotz steigender Inzidenzzahlen in den vergangenen Jahren hat die Mortalität in Deutschland abgenommen [RKI 2008]. Im Jahr 2002 lag die weltweite Mortalität bei 8,2 pro 100 000 [Parkin 2005]. Demzufolge führt nur ein kleiner Teil der diagnostizierten Prostatakarzinome tatsächlich zum Tod. Lediglich jeder 5.

Patient mit klinisch manifestem Prostatakarzinom verstirbt letztendlich daran. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt mittlerweile bei 87% [RKI 2008]. Ähnlich wie bei der Inzidenz zeigen sich auch bei der Mortalität geografische Unterschiede: So betrug im Jahr 2002 die Überlebensrate in den USA 87%, in den Entwicklungsländern hingegen lediglich 45%. Diese Diskrepanz ist hauptsächlich darauf zurückzuführen, dass Früherkennungsmaßnahmen in den westlichen Industrienationen stärker verbreitet sind [Parkin 2005].

1.2.2 Ätiologie

Die genauen Ursachen des Prostatakarzinoms sind bislang nicht bekannt. Ein wichtiger Risikofaktor ist jedoch das Alter. Nach dem 50. Lebensjahr nehmen Inzidenz und Mortalität des Prostatakarzinoms fast exponentiell zu. Kein anderes Karzinom zeigt eine solch starke Korrelation mit dem Alter [Pienta 1993]. Die deutlichen geographischen Unterschiede bezüglich der Inzidenz des klinischen Prostatakarzinoms lassen sich bei den latenten, histologischen Prostatakarzinomen nicht nachweisen [Dhom 1983]. Dieser Aspekt legt nahe, dass die Entstehung des histologisch nachweisbaren Prostatakarzinoms altersabhängig ist, die Progression zum klinisch relevanten Karzinom jedoch eher von anderen Faktoren abhängen könnte [Pienta 1993]. Auch die Tatsache, dass in die USA immigrierte Japaner eine deutlich erhöhte Prostatakarzinominzidenz im Vergleich zu ihren in Asien lebenden Landsmännern aufweisen, lässt vermuten, dass insbesondere Umwelt- und Ernährungsfaktoren bei der Entstehung des Prostatakarzinoms eine entscheidende Rolle spielen [Cook 1999, Shimizu 1991, Tominaga 1985]. So scheint z.B. eine fettreiche Ernährung einen Risikofaktor für das Prostatakarzinom darzustellen. Insbesondere der Konsum in rotem Fleisch enthaltener tierischer Fette korreliert positiv mit dem Risiko eines fortgeschrittenen Prostatakarzinoms [Giovannucci 1993]. Hingegen wird dem Lycopin, einem potenten Antioxidans aus der Klasse der Carotinoide, welches in hohen Konzentrationen insbesondere in Tomaten vorzufinden ist, ein protektiver Effekt zugeschrieben [Giovannucci 1995, Sonn 2005]. Ähnliches nimmt man für die in Sojaprodukten enthaltenen Phytoöstrogene an, was ein Grund für die niedrige Inzidenz und Mortalität des Prostatakarzinoms in Asien sein könnte [Vij 2004]. Hinweise auf eine Risikoreduktion gibt es auch für Vitamin E, Hülsenfrüchte und Selen [Chan 2005, Dagnelie 2004]. In mehreren Studien konnte eine Korrelation zwischen einer Cadmium-Exposition und einem erhöhten Prostatakarzinom-Risiko nachgewiesen werden. Auch die Vasektomie stellt einen potentiellen Risikofaktor dar [Pienta 1993]. Die Tatsache, dass z.B. Eunuchen kein Prostatakarzinom entwickeln, weist auf die Bedeutung hormoneller Faktoren hin. So steigern einerseits hohe Testosteronspiegel sowie andererseits

niedrige Spiegel von „sex hormone-binding globulin“, insbesondere in Kombination mit niedrigen Östradiol-Spiegeln, das Risiko, ein Prostatakarzinom zu entwickeln [Gann 1996]. Weiterhin können Entzündung und Infektionen der Prostata die Karzinogenese fördern [Klein 2008]. Darüber hinaus sind auch genetische Einflüsse von wesentlicher Bedeutung. So ist das Risiko für Männer mit von einem Prostatakarzinom betroffenen Verwandten, insbesondere Vater oder Bruder, deutlich erhöht [Steinberg 1990]. Etwa 5% der Prostatakarzinome sind hereditär. Hier sind Veränderungen auf dem Chromosom 1 und dem X-Chromosom nachweisbar [Narod 1999]. Die Relevanz der ethnischen Zugehörigkeit ist an der Tatsache abzulesen, dass die Inzidenz des Prostatakarzinoms bei afrikanisch-stämmigen Amerikanern deutlich höher liegt als bei Weißen [Baquet 1991].

1.2.3 Pathologie

Klinisch sind vier verschiedene Erscheinungsformen des Prostatakarzinoms voneinander abzugrenzen: das manifeste, das inzidente, das okkulte und das latente Prostatakarzinom [Mostofi 1992].

Diagnostische Möglichkeiten zur Detektion eines *manifesten Prostatakarzinoms* sind rektale Untersuchung, PSA/PAP-Wert-Bestimmung und/oder Ultraschall. Der klinische Verdacht muss durch eine Biopsie bestätigt werden.

Das *inzidente Prostatakarzinom* ist eine Zufallsdiagnose des Pathologen nach einer transurethralen Resektion der Prostata im Rahmen einer BPH. Das meist gut differenzierte Karzinom ist periurethral lokalisiert. 6 – 20% der Resektate weisen ein inzidenten Prostatakarzinom auf [Mostofi 1992].

Das *okkulte Prostatakarzinom* zeigt keinerlei Symptome eines Primärtumors und wird erst infolge der Metastasierung entdeckt.

Das *latente Prostatakarzinom* ist zu Lebzeiten vollkommen asymptomatisch und wird erst nach dem Tod des Patienten zufällig im Rahmen einer Autopsie nachgewiesen. Diese Karzinome sind häufig gut differenziert und in der zentralen oder peripheren Zone zu finden. Die Häufigkeit des latenten Prostatakarzinoms wird mit bis zu 73% angegeben, was verdeutlicht, dass trotz der sehr hohen Prävalenz nur ein geringer Anteil der Karzinome klinisch relevant wird bzw. zum Tode führt.

70 – 75% der Prostatakarzinome entstehen in der peripheren Zone, 15 - 20% in der Transitionalzone. Die zentrale Zone ist lediglich in 10% der Fälle der Ursprungsort. Das Prostatakarzinom entsteht meist multizentrisch und breitet sich zunächst intraprostatatisch aus, wobei die periurethrale Zone erst relativ spät befallen wird, so dass eine Harnwegsobstruktion im Rahmen eines Prostatakarzinoms i.d.R. ein Spätsymptom ist. Bereits im Frühstadium kann es zu einer Invasion der Kapsel kommen, eine Kapselpenetration hingegen erfolgt erst später [Riede 2004]. Das Karzinom breitet sich häufig entlang der Nerven in der Prostatakapsel aus und befällt in späteren Stadien die umliegenden Organe wie Samenblasen, Harnblase und Rektum. Die Metastasierung erfolgt zum einen lymphogen in die iliakalen und retroperitonealen Lymphknoten, zum anderen hämatogen ins Skelettsystem, seltener hingegen in Leber und Lunge [Böcker 2001].

Die Stadieneinteilung des Prostatakarzinoms, das sog. Staging, erfolgt anhand der TNM-Klassifikation (Tab.1). Diese berücksichtigt die lokale Ausbreitung des Primärtumors (T), den Befall der regionären Lymphknoten (N) und die hämatogenen Fernmetastasen (M). Die TNM-Klassifikation stellt eine wichtige Grundlage für die Behandlungsstrategie und die Prognoseabschätzung dar. In Abgrenzung zur klinischen (prätherapeutischen) TNM-Klassifikation bezeichnet der Begriff pTNM die pathologische Klassifikation des Tumors nach dessen chirurgischer Resektion.

TNM-Klassifikation des Prostatakarzinoms

T - Primärtumor	
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
T1	Klinisch nicht erkennbarer Tumor (weder tastbar noch in bildgebenden Verfahren sichtbar)
T1a	Tumor zufälliger histologischer Befund („incidental carcinoma“) in $\leq 5\%$ des resezierten Gewebes
T1b	Tumor zufälliger histologischer Befund („incidental carcinoma“) in $> 5\%$ des reseziertes Gewebes
T1c	Tumor durch Nadelbiopsie diagnostiziert (z.B. wegen erhöhtem PSA)
T2	Tumor begrenzt auf Prostata
T2a	Tumor befällt die Hälfte eines Lappens oder weniger
T2b	Tumor befällt mehr als die Hälfte eines Lappens
T2c	Tumor in beiden Lappen
T3	Tumor durchbricht die Prostatakapsel
T3a	Extrakapsuläre Ausbreitung (einseitig oder beidseitig) eingeschlossen mikroskopisch nachweisbare Infiltration des Blasenhales
T3b	Tumor infiltriert Samenblase(n)
T4	Tumor ist fixiert oder infiltriert andere benachbarte Strukturen als Samenblasen, z.B. Sphincter externus, Rektum, und/oder Levatormuskel und/oder ist an Beckenwand fixiert
N - Regionäre Lymphknoten	
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Regionäre Lymphknotenmetastasen
M - Fernmetastasen	
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen
M1a	Nichtregionäre(r) Lymphknoten
M1b	Knochen
M1c	Andere Lokalisation(en)

Tab.1: TNM-Klassifikation des Prostatakarzinoms [UICC 2010]

Histologisch handelt es sich beim Prostatakarzinom in ca. 95% der Fälle um ein Adenokarzinom [Jocham 2007]. Die folgende Übersicht gibt die histologische Klassifikation der Prostatatumoren nach WHO wieder [Eble 2004]:

Epitheliale Tumoren

Glanduläre Neoplasmen

Adenokarzinom (azinär)

Atroph

Pseudohyperplastisch

Schaumzellig

Muzinös

Siegelringzellig

Onkozytisch

Lymphoepitheliomähnlich

Karzinom mit spindelzelliger Differenzierung

(Karzinosarkom, sarkomatoides Karzinom)

Prostatische intraepitheliale Neoplasie (PIN)

Prostatische intraepitheliale Neoplasie, Grad III (PIN III)

Duktales Adenokarzinom

Kribriform

Papillär

Solide

Urotheliale Tumoren

Urothelkarzinom

Plattenepitheliale Tumoren

Adenosquamöses Karzinom

Plattenepithelkarzinom

Basalzelltumoren

Basalzelladenom

Basalzellkarzinom

Neuroendokrine Tumoren

Endokrine Differenzierung in Adenokarzinomen

Karzinoidtumor

Kleinzelliges Karzinom

Paragangliom

Neuroblastom

Prostatische Stromatumoren

Stromatumor mit unklarem malignem Potential

Stromasarkom

Mesenchymale Tumoren

Leiomyosarkom

Rhabdomyosarkom

Chondrosarkom

Angiosarkom

Malignes fibröses Histiozytom

Maligner peripherer Nervenscheidentumor

Hämangiom

Chondrom

Leiomyom

Granularzelltumor

Hämangioperizytom

Solitärer fibröser Tumor

Hämatologische Tumoren und Lymphome

Lymphome

Leukämien

Sonstige Tumoren

Zystadenom

Nephroblastom (Wilmstumor)

Rhabdoidtumor

Keimzelltumoren

 Dottersacktumor

 Seminom

 Embryonales Karzinom und Teratom

 Choriokarzinom

Klarzelliges Adenokarzinom

Melanom

Das Grading dient der Bestimmung des Malignitätsgrades von Tumoren mit Hilfe von je nach Grading-System unterschiedlichen histologischen oder zytologischen Beurteilungskriterien. Das Grading stellt einen der wichtigsten prognostischen Parameter für das „outcome“ von Prostatakarzinom-Patienten dar [Bostwick 1994].

Das histopathologische Grading nach WHO umfasst folgende Grade [UICC 2010]:

GX	Differenzierungsgrad kann nicht bestimmt werden
G1	Gut differenziert (leichte Anaplasie)
G2	Mäßig differenziert (mäßige Anaplasie)
G3-4	Schlecht differenziert / undifferenziert (ausgeprägte Anaplasie)

Das weltweit am meisten verbreitete Grading-System des Prostatakarzinoms ist das im Jahre 1966 von Gleason anhand von architektonischen Wachstumsmustern entwickelte Grading ohne Berücksichtigung zytologischer Kriterien. Fünf verschiedene Wachstumsmuster werden dabei unterschieden (Abb.1). Der Gleason Score setzte sich ursprünglich aus dem vorherrschenden und dem zweithäufigsten Wachstumsmuster zusammen. Liegt nur ein einziges Wachstumsmuster vor, so wird der entsprechende Wert mit zwei multipliziert [Humphrey 2004]. Dieses System wurde aktuellen Modifikationen unterworfen (s.u.).

Der Gleason Score umfasst Werte von 2 bis 10. Ein Prostatakarzinom mit einem Gleason Score von 2-4 gilt als gut differenziert, ein Gleason Score von 5-6 entspricht einem mäßig differenzierten und ein Score von 7-10 einem schlecht differenzierten bzw. undifferenzierten Karzinom [UICC 2010].

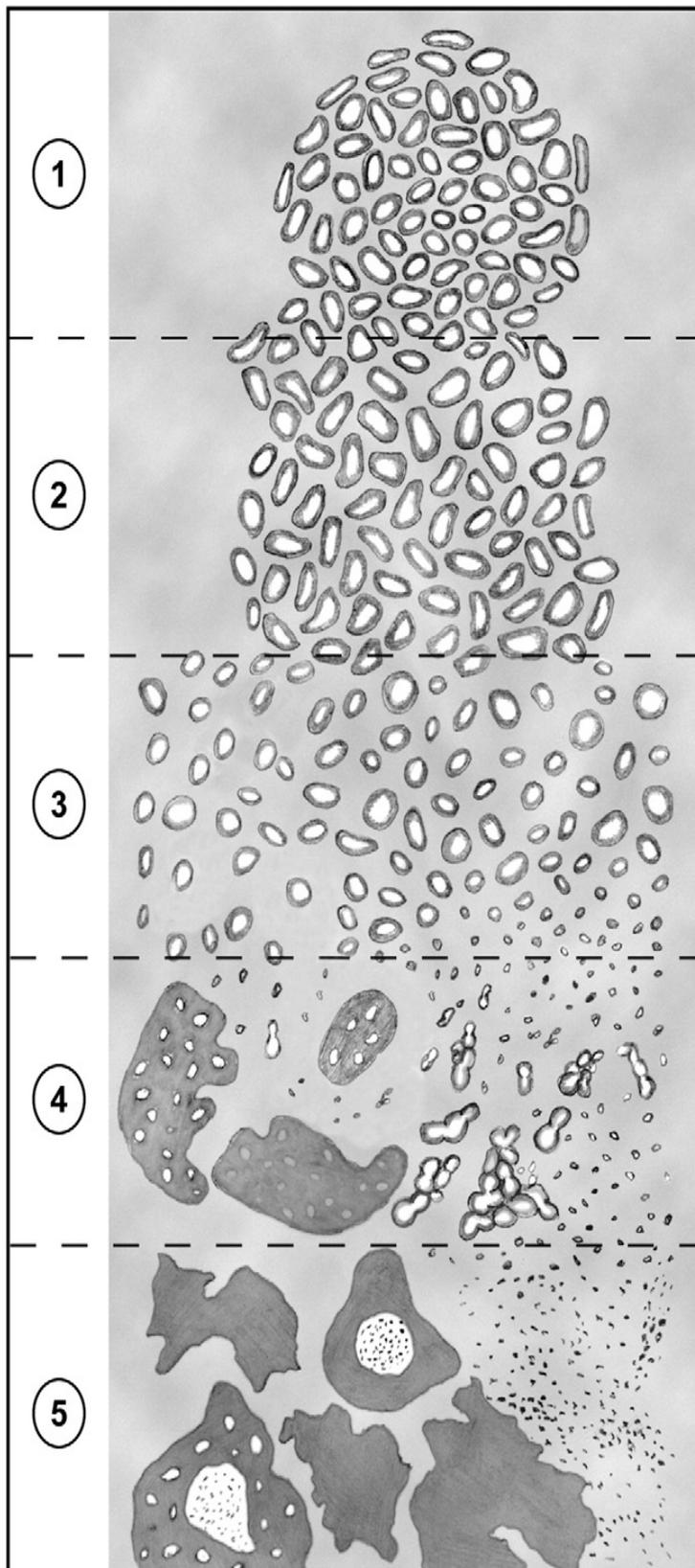
Seit seiner Einführung sind im Laufe der Jahre wichtige Neuerungen zum Gleason-Grading festgelegt worden, zunächst durch Gleason selbst und zuletzt im Jahr 2005 durch die Konsensuskonferenz der Internationalen Gesellschaft für Urologische Pathologie (ISUP) [Lotan 2010]. Diese Weiterentwicklungen des Gleason-Gradings tragen den zahlreichen Fortschritten in der klinischen Urologie und Pathologie Rechnung, zu denen z.B. die PSA-Wert-Bestimmung, die Vielfachstanzbiopsie, die Einführung der Immunhistochemie und die seit den 60er Jahren deutlich vermehrte Rate an radikalen Prostatektomien zählen. PSA-Wert-Bestimmung und Vielfachstanzbiopsie mit feinen Nadeln ermöglichen bereits die Detektion auch kleiner Tumoren und konfrontieren den Pathologen mit entsprechend kleineren Gewebeprobe. Die immunhistochemische Anfärbung von Basalzellen bietet Möglichkeiten zur Unterscheidung von gutartigen Gewebeveränderungen wie Adenose oder kribriforme HG-PIN und dem Prostatakarzinom [Epstein 2010, Lotan 2010].

Folgende wesentliche Änderungen des Gleason-Gradings wurden von der ISUP festgelegt [Epstein 2005]:

- Die Diagnose eines Gleason Scores 2-4 ist an Prostatastanzen praktisch nicht möglich.
- Kribriforme Tumordrüsen werden nur dann noch zum Gleason-Muster 3 gezählt, wenn die Drüsen rund, glatt begrenzt und gleich groß wie die normalen Drüsen sind. In allen übrigen Fällen werden sie dem Gleason-Muster 4 zugeordnet. In der praktischen Umsetzung bedeutet dies, dass nahezu alle kribriformen Wachstumsmuster dem Gleason-Muster 4 zugeschlagen werden.
- Nicht voneinander abgrenzbare Drüsen mit schlecht entwickelten Drüsenlumina werden ebenfalls dem Gleason-Muster 4 zugeordnet.
- Niedriggradige Gleason-Muster werden bei der Bestimmung des Gleason Scores an Stanzbiopsien zugunsten des Tumoranteils mit höherem Malignitätsgrad vernachlässigt, wenn sie weniger als 5% des Tumors ausmachen. Tumoranteile mit höherem Malignitätsgrad gehen hingegen unverändert ohne Berücksichtigung des prozentualen Anteils in die Berechnung des Gleason Scores mit ein.
- Bei Prostatastanzen setzt sich der Gleason Score nicht mehr aus dem häufigsten und zweithäufigsten Wachstumsmuster, sondern aus dem häufigsten und dem aggressivsten Wachstumsmuster zusammen. Damit wird der Tatsache Rechnung getragen, dass ein Gleason-Muster 4 oder 5 auf einen insgesamt höhergradigen Tumor hinweist und der geringe prozentuale Anteil im Stanzpräparat am ehesten auf einen „sampling error“ zurückzuführen ist.

- In Prostatektomie-Präparaten wird jedem einzelnen Tumorherd ein separater Gleason Score zugeordnet. Hier basiert der Gleason Score auf dem primären und sekundären Wachstumsmuster mit einer Anmerkung zum tertiären Wachstumsmuster.

Diese Änderungen des Gleason-Systems hatten vor allem eine stärkere Einschränkung der Definition des Gleason-Musters 3 zugunsten des Gleason-Musters 4 zur Folge. De facto erfolgte somit ein „Upgrading“ der Biopsie-Präparate [Lotan 2010]. Helpap et al. konnten für das modifizierte Gleason-Grading eine von 58 % auf 72 % zunehmende Übereinstimmung des ermittelten Gleason Scores aus Stanzbiopsien und Prostatektomie-Präparaten nachweisen [Helpap 2006].



Muster 1:
 Umschriebener Tumorherd mit dicht beieinander liegenden, gut voneinander abgrenzbaren, gleichförmigen, runden bis ovalären, mittelgroßen Drüsenzazi.

Muster 2:
 Wie Muster 1, weitestgehend umschriebener Tumorherd, jedoch am Rand bereits mit minimaler Infiltrationsneigung. Die Drüsen sind weniger dicht beieinander und weniger gleichförmig konfiguriert als in Muster 1.

Muster 3:
 Diskrete glanduläre Einheiten mit deutlicher Variation in Größe und Form. Drüsen typischerweise kleiner als in Muster 1 und 2, Tumordrüsen mit infiltrativem Wachstum zwischen nichttumoralen Drüsen. Kribriforme Herde klein und glatt begrenzt.

Muster 4:
 Verschmolzene mikroazinäre Drüsen, Drüsen nicht voneinander abgrenzbar mit schlecht entwickelten Drüsenlumina, große kribriforme Drüsen mit unregelmäßiger Randkontur, hypernephromatoides Wachstumsmuster.

Muster 5:
 Im Wesentlichen keine drüsige Differenzierung mehr, Wachstumsmuster teils solide, teils in Strängen, teils als Einzelzellen. Komedokarzinom mit zentraler Nekrose, umgeben von papillären, kribriformen oder soliden Tumormassen.

Brumbaugh

Abb.1: Schematische Darstellung des Gleason Gradings, modifiziert nach ISUP 2005 (nach Epstein 2005 und Jochem 2007)

Einen besonderen Stellenwert in der Histopathologie des Prostatakarzinoms hat die prostatistische intraepitheliale Neoplasie (PIN). Sie ist vor allem in der peripheren Zone der Prostata häufig multifokal lokalisiert vorzufinden und nimmt, wie auch das Prostatakarzinom, mit fortschreitendem Alter an Häufigkeit zu [Bostwick 1992]. Die sekretorischen Epithelzellen sind entlang der prostatistischen Drüsen und Gänge mehrschichtig angeordnet und weisen Polymorphien, vergrößerte, hyperchromatische Kerne und prominente Nucleolen auf. Basalzellschicht und Basalmembran sind im Gegensatz zum invasiven Karzinom prinzipiell intakt [Montironi 2000, Riede 2004]. Die PIN ist als Präkanzerose anzusehen, aus der heraus sich das invasive Adenokarzinom entwickelt. Je nach Ausmaß der Dysplasie wird zwischen einer low-grade-PIN und einer high-grade-PIN (HG-PIN) unterschieden. HG-PIN und invasives Prostatakarzinom weisen folgende Gemeinsamkeiten auf [Bostwick 1992, Montironi 2000]:

- Zellproliferation und Apoptose sind in beiden Läsionen im Vergleich zum normalen Prostataepithel gesteigert.
- Die Läsionen sind phänotypisch und morphometrisch ähnlich.
- Es lassen sich gemeinsame genetische Alterationen nachweisen.
- In der HG-PIN ist die Basalzellschicht teilweise unterbrochen, im Prostatakarzinom fehlt sie.
- Beide Läsionen weisen eine erhöhte Neovaskularisation im Vergleich zum normalen Prostatagewebe auf.

Die HG-PIN korreliert mit dem Auftreten von Prostatakarzinomen und wird daher als Vorläuferläsion des invasiven Prostatakarzinoms betrachtet. Im Falle eines Auftretens im Biopsat erfordert die HG-PIN eine besonders sorgfältige Diagnostik zum Ausschluss eines invasiven Karzinoms [Bostwick 1987].

1.2.4 Diagnostik

Das Prostatakarzinom bleibt klinisch lange Zeit symptomlos. Erst im fortgeschrittenen Stadium kann es zu Hämaturie, Miktionsbeschwerden, Hämatospermie sowie Rückenschmerzen und Ischialgien infolge ossärer Metastasen kommen. Aus diesem Grund ist eine frühzeitige, effektive Diagnostik unerlässlich und für die Prognose des Patienten oft entscheidend. In Deutschland wird Männern ab dem 45. Lebensjahr eine jährliche digitale rektale Untersuchung zum Ausschluss tastbarer Veränderungen der Prostata empfohlen und von den Krankenkassen bezahlt. Die Aussagekraft der rektalen Untersuchung ist jedoch sehr

eingeschränkt und stark abhängig vom Untersucher [Smith 1995]. Zahlreiche Tumoren können auf diese Weise nicht erfasst werden [Flanigan 1994]. Außerdem ist bei niedrigen PSA-Spiegeln der positiv prädiktive Wert gering. Jedoch erhöht sich der positiv prädiktive Wert der Untersuchung deutlich in Kombination mit einem erhöhten PSA-Wert [Schröder 1998]. Ein suspekter Palpationsbefund ist mit einer höheren Tumoraggressivität (Gleason-Score > 7) assoziiert [Gosselaar 2008]. Insgesamt ist die Wahrscheinlichkeit eines Prostatakarzinoms bei positivem Palpationsbefund erhöht [Thompson 2006], weshalb hier die Biopsie indiziert ist. In einigen Fällen lassen sich auf diesem Wege Karzinome diagnostizieren, die im PSA-Screening nicht erfasst werden [Schröder 1998]. Daher hat die digitale rektale Untersuchung nach wie vor einen bedeutenden Stellenwert in der Karzinomprophylaxe und -diagnostik.

Die PSA-Wert-Bestimmung ist in der heutigen Prostatakarzinom-Diagnostik von herausragender Bedeutung. PSA ist eine Glykoprotein-Serin-Protease von 33 kDa aus der Familie der Kallikreine, die von der Prostata sezerniert wird und für die Verflüssigung des Ejakulats eine Rolle spielt. Beim PSA handelt es sich um einen organspezifischen Marker, der bei der BPH und bei Vorliegen eines Prostatakarzinoms, aber auch bei einer Prostatitis, nach Prostatapalpation, TURP und Biopsie erhöhte Serumwerte aufweist. Die höchsten Konzentrationen finden sich bei fortgeschrittenen Prostatakarzinomen. Zwischen lokalisierten Prostatakarzinomen und BPH kann anhand von PSA-Bestimmung jedoch nicht zuverlässig unterschieden werden [Monda 1994]. Aufgrund der mangelnden Spezifität wird bei unauffälligem Tastbefund erst ab dem etablierten PSA-Schwellenwert von 4 ng/ml routinemäßig die Indikation zu einer Biopsie gestellt [Catalona 1994], wobei jedoch die altersabhängigen Referenzwerte zu berücksichtigen sind [Oesterling 1993]:

Altersgruppe	Serum-PSA (ng/ml)
40 - 49	0,0 - 2,5
50 - 59	0,0 - 3,5
60 - 69	0,0 - 4,5
70 - 79	0,0 - 6,5

Mit Hilfe dieser altersabhängigen Referenzwerte soll einerseits die Sensitivität der Prostatakarzinom-Detektion bei jüngeren Männern erhöht, andererseits die Spezifität zur Detektion klinisch signifikanter Prostatakarzinome verbessert werden [Oesterling 1993].

Die PSA-Kontrolle ist der Goldstandard zur frühzeitigen Erkennung eines Rezidivs nach radikaler Prostatektomie infolge eines Karzinoms, da der PSA-Spiegel nach Prostatektomie

bei R0-Resektion auf Werte $< 0,1$ ng/ml abfällt und im Falle eines Tumorrezidivs wieder ansteigt [De Angelis 2007]. Die Einführung der PSA-Bestimmung hat in den vergangenen Jahren zu der weltweit stetig zunehmenden Inzidenz des Prostatakarzinoms entscheidend beigetragen [RKI 2008]. Zudem werden heutzutage Prostatakarzinome häufig in einem früheren Stadium entdeckt. Jedoch vermag der PSA-Wert nicht zwischen aggressiven und weniger aggressiven Karzinomen zu differenzieren, so dass die Gefahr von „Overdetection“ und „Overtreatment“ besteht [De Angelis 2007, Etzioni 2002].

Im transrektalen Ultraschall (TRUS) stellt sich ein Prostatakarzinom meist unspezifisch als echoarmes Areal in der peripheren Zone dar. Bei einem solchen Befund besteht die Indikation zur Biopsie als weitere Abklärungsmaßnahme [Hautmann 2006b].

Die Biopsie dient der endgültigen Diagnosesicherung und wird unter TRUS-Kontrolle durchgeführt. Hierbei sollten 10-12 Stenzen vor allem aus der peripheren Zone der Prostata entnommen und anschließend histologisch beurteilt werden. Da eine negative Biopsie jedoch ein Prostatakarzinom nicht ausschließt, sollte bei weiter bestehendem klinischem Verdacht nach spätestens sechs Monaten erneut biopsiert werden [DGU 2009, Hofstetter 2004].

1.2.5 Therapie

Therapeutische Optionen des lokalisierten Prostatakarzinoms sind radikale Prostatektomie, Strahlentherapie und „active surveillance“ bzw. „watchful waiting“.

Die radikale Prostatektomie umfasst die vollständige Entfernung der Prostata inklusive Kapsel und Samenblasen. Bei Patienten mit Karzinomen mittleren und hohen Risikos wird zusätzlich eine erweiterte pelvine Lymphadenektomie empfohlen, weil in diesen Fällen die Wahrscheinlichkeit eines Lymphknotenbefalls erhöht ist [Heidenreich 2007]. Die radikale Prostatektomie ist die Therapie der Wahl beim klinisch lokal begrenzten (T1-2 N0 M0) Prostatakarzinom, da sie zur Zeit das einzige Behandlungsverfahren mit einem Überlebensvorteil für die Patienten darstellt. Eine klare Indikation für dieses Therapieverfahren liegt vor bei Tumoren im Stadium T1b-2 N0 M0, wenn der PSA-Wert unter 50 ng/ml liegt und die Lebenserwartung mehr als 10 Jahre beträgt [DGU 2009]. Optional kann eine Prostatektomie vorgenommen werden bei T1a-Tumoren und hoher Lebenserwartung sowie bei lokal fortgeschrittenen Prostatakarzinomen (T3-4 N0 M0) [DGU 2009, Heidenreich 2008].

Ein wichtiges Kriterium für die weitere Prognose der prostatektomierten Patienten ist das Vorhandensein eines Residualtumors. Hierfür gilt folgendes Graduierungssystem:

RX: Vorhandensein eines Residualtumors kann nicht beurteilt werden.

R0: Kein Residualtumor vorhanden.

R1: Mikroskopischer Nachweis eines Residualtumors.

R2: Makroskopischer Nachweis eines Residualtumors.

Ein Residualtumor kann zu einem Rezidiv führen, welches sich durch eine PSA-Erhöhung in der Verlaufskontrolle bemerkbar macht. Aus diesem Grund soll die radikale Prostatektomie vor allem bei Prostatakarzinomen eingesetzt werden, bei denen mit hoher Wahrscheinlichkeit eine R0-Resektion erreicht werden kann [DGU 2009].

Eine therapeutische Alternative zur radikalen Prostatektomie bei lokalisierten Prostatakarzinomen stellt die Strahlentherapie dar, die als perkutane Strahlentherapie oder als Brachytherapie erfolgen kann. Die perkutane Strahlentherapie des Prostatakarzinoms wird als 3D-konformale Mehrfelderbestrahlung durchgeführt. Patienten mit Tumoren des niedrigen Risikoprofils werden mit einer Dosis von mindestens 70 – 72 Gy bestrahlt. Bei Patienten mit Tumoren höheren Risikoprofils wird eine Dosiserhöhung und / oder eine Kombination mit einer hormonablativen Therapie empfohlen [DGU 2009]. Bei der Brachytherapie ist zwischen einer Low-Dose-Rate (LDR)-Therapie und einer High-Dose-Rate (HDR)-Therapie zu unterscheiden. Bei der LDR-Brachytherapie werden radioaktive Jod- bzw. Palladium-Seeds transperineal dauerhaft in die Prostata implantiert [Jocham 2007]. Durch diese lokale Applikation kann eine besonders zielgerichtete Therapie erfolgen, die umliegende Gewebe wie Blase und Rektum schont. Gegenwärtig ist die LDR-Brachytherapie ausschließlich bei lokal begrenzten Tumoren niedrigen Risikoprofils als therapeutische Option etabliert [DGU 2009]. Bei der HDR-Brachytherapie werden radioaktive Iridium-Seeds in Afterloading-Technik vorübergehend in die Prostata appliziert. Durch eine anschließende externe Strahlentherapie kommt es zu einer Dosisaufsättigung. Der Vorteil dieser Methode liegt in der Möglichkeit zur Dosisescalation [Jocham 2007]. Die HDR-Brachytherapie ist eine Therapieoption bei lokal begrenzten und lokal fortgeschrittenen Prostatakarzinomen mittleren und hohen Risikoprofils [DGU 2009].

„Active surveillance“ bezeichnet die engmaschige und sorgfältige Überwachung der Patienten mittels PSA-Untersuchungen sowie digitaler rektaler Untersuchung und Biopsien, ohne dass zunächst weitere therapeutische Maßnahmen ergriffen werden, die das Risiko von Komplikationen und Nebenwirkungen bergen. Auf diese Weise wird eine kurative Therapie so lange hinausgezögert, bis sich die Tumorbiologie oder der Wunsch des Patienten ändern [DGU 2009]. Dieses Vorgehen ist gerechtfertigt, wenn folgende Kriterien erfüllt sind [DGU 2009]:

- PSA-Wert ≤ 10 ng/ml
- Gleason-Score ≤ 6
- T1c und T2a
- Tumor in ≤ 2 Stanzen
- $\leq 50\%$ Tumor in einer Stanze

Eine besondere Herausforderung ist in diesem Zusammenhang also die Gratwanderung zwischen frühzeitiger Therapie eines potentiell kurativ behandelbaren Karzinoms und dem Verzicht auf ebendiese Therapie samt resultierender Nebenwirkungen und Belastungen bei Patienten mit sog. insignifikanten Karzinomen, die zeitlebens klinisch inapparent bleiben.

In Abgrenzung dazu beinhaltet die „watchful waiting“-Strategie ausschließlich palliative Maßnahmen im Fall einer symptomatischen Tumorprogression. Dieses Vorgehen ist bei einer Lebenserwartung von unter 10 Jahren gerechtfertigt [DGU 2009].

Bei Patienten mit symptomatisch metastasiertem Prostatakarzinom ist die sofortige Hormontherapie Standard, die bei einem solchen Befund eine Verlängerung des progressionsfreien Überlebens gewährleistet [DGU 2009]. Bei asymptomatischen Patienten liegt keine einheitliche Empfehlung zur Hormontherapie vor, so dass hier in Abhängigkeit vom Einzelfall eine Entscheidung über das weitere Vorgehen getroffen werden muss [DGU 2009]. Das androgenabhängige Tumorwachstum kann mittels Orchiektomie, LHRH-Agonisten oder Antiandrogenen unterdrückt werden. Die Östrogentherapie findet aufgrund des Nebenwirkungsprofils mit kardiovaskulären Komplikationen und Mammahyperplasie heutzutage kaum noch Anwendung [Hautmann 2006b]. Nach 2-3 Jahren kommt es i.d.R. trotz antiandrogener Therapie zur Tumorprogression, der mit einer maximalen Androgenblockade entgegengewirkt werden kann. Diese beinhaltet neben der chirurgischen / medikamentösen Kastration die zusätzliche Gabe von Androgenrezeptorantagonisten. Auf diese Weise wird die Hormonproduktion der Nebenniere, die einen Anteil von 5- 10 % an der gesamten Androgenproduktion hat, ausgeschaltet [Jocham 2007].

In einigen Fällen kann auch das Absetzen der Medikation oder eine chemotherapeutische Behandlung sinnvoll sein [Sökeland 2004b]. Das Prostatakarzinom galt lange Zeit als chemotherapieresistenter Tumor, insbesondere weil es im Vergleich zu anderen Karzinomen eine eher niedrige Zellproliferationsrate aufweist [Barmoshe 2006]. Im Jahr 1996 konnten Tannock et al. in einer Phase-III-Studie eine verbesserte Schmerzreduktion von Mitoxantron/Prednison vs. Prednison alleine bei symptomatischen Patienten mit hormonrefraktärem Prostatakarzinom nachweisen [Tannock 1996]. Mitoxantron gehört zur Gruppe der Anthrazykline, welche die DNA/RNA-Synthese durch Interkalation hemmen. Die palliative Wirkung der Corticosteroide beim metastasierten Prostatakarzinom ist seit langem bekannt. Zum einen bewirken sie eine Schmerzreduktion, zum anderen üben sie einen direkten antineoplastischen Effekt auf die Karzinomzellen aus, der auf die Inhibition der Androgenproduktion durch die Nebennierenrinde infolge der negativen Rückkopplung auf die ACTH-Ausschüttung der Hypophyse zurückzuführen ist [Hotte 2010]. Im Jahr 2004 konnte in zwei unterschiedlichen Studien erstmals eine zwar geringe, jedoch signifikante Lebenszeitverlängerung durch Docetaxel nachgewiesen werden [Petrylak 2004, Tannock 2004]. Docetaxel gehört zur Gruppe der Taxane, welche die Mikrotubuli-Aktivität während der Zellteilung blockieren und auf diese Weise zur Apoptose führen. Im Vergleich zu Mitoxantron/Prednison konnten durch Docetaxel/Prednison außerdem eine verbesserte Schmerzreduktion, eine Absenkung des PSA-Spiegels und eine Steigerung der Lebensqualität nachgewiesen werden [Tannock 2004]. Aufgrund dieser Datenlage gilt die zytostatische Therapie mit Docetaxel 75 mg/m² i.v. alle drei Wochen in Kombination mit 5 mg Prednisolon oral zweimal täglich als Standardschema bei Patienten mit symptomatischer progredienter Erkrankung unter medikamentöser Kastration und in gutem Allgemeinzustand [DGU 2009]. In bisherigen Studien konnte kein Benefit einer Docetaxel-basierten Kombinationstherapie nachgewiesen werden, teilweise kam es sogar zu einer Toxizitätssteigerung. Zahlreiche Studienergebnisse stehen hierzu jedoch noch aus [Galsky 2010].

Eine effektive Schmerztherapie ist als symptomatische Maßnahme zur Besserung der Lebensqualität der Patienten von essentieller Bedeutung. Bei Knochenmetastasen stehen lokale Bestrahlung, Applikation von Radionukliden, Chemotherapie und Gabe von Bisphosphonaten als Therapioptionen zur Verfügung [DGU 2009].

1.2.6 Prognosekriterien des Prostatakarzinoms

Das Prostatakarzinom ist hinsichtlich seines biologischen Verhaltens ein sehr heterogener Tumor. Während es in einigen Fällen lebenslang unbemerkt bleibt, zeigt es in anderen Fällen ein sehr aggressives Wachstumsverhalten mit frühzeitiger Metastasierung und entsprechend verkürzter Überlebenszeit für den Patienten [Joniau 2008]. Aus diesem Grund ist es von besonderem Interesse, mittels Prognosefaktoren zwischen den klinisch bedeutungslosen und den aggressiven Karzinomen zu differenzieren und daraus die entsprechenden therapeutischen Konsequenzen abzuleiten. Das College of American Pathologists teilt die Prognosekriterien des Prostatakarzinoms in drei Kategorien ein [Bostwick 2000]:

Kategorie 1 beinhaltet Faktoren mit eindeutig nachgewiesener prognostischer Relevanz, deren Anwendung im klinischen Alltag empfohlen wird. Dazu zählen der präoperative PSA-Serumspiegel, das TNM-Stadium, das histologische Grading anhand des Gleason Scores und der chirurgische Resektionsrand.

In *Kategorie 2* werden Faktoren zusammengefasst, die bereits intensiv klinisch und biologisch untersucht wurden, deren Bedeutung jedoch noch in validen statistischen Studien bestätigt werden muss. Hierunter fallen das Tumolvolumen, der histologische Tumortyp und die DNA-Ploidie.

Zu *Kategorie 3* gehören alle anderen Faktoren, die hinsichtlich ihres prognostischen Wertes bislang nicht ausreichend untersucht wurden, darunter Perineuralscheideninvasion, neuroendokrine Differenzierung, Mikrogefäßdichte, Kernrundheit, Chromatintextur, Proliferationsmarker, PSA-Derivate, Onkogene, Tumorsuppressorgene und Apoptose-Gene. Diese letzte Kategorie könnte in Zukunft immer mehr an Bedeutung gewinnen, da die bisherigen etablierten Prognosekriterien den Krankheitsverlauf oft nicht präzise genug vorhersagen können [Kehinde 2008, Ross 2003].

1.3 Der Gas6/Axl-Signalweg

Axl (Ufo, Ark, Tyro7) gehört zu einer Familie von Rezeptortyrosinkinasen (RTKs), die außerdem noch die Mitglieder Sky (Tyro3, Rse, Brt, Tif, Dtk, Etk-2) und Mer (Eyk, Nyk, Tyro2) umfasst [Wu 2004]. Diese werden auch unter dem Begriff TAM (Tyro3/Axl/Mer)-Rezeptortyrosinkinasen zusammengefasst. Die TAM-Rezeptortyrosinkinasenfamilie zeichnet sich durch eine extrazelluläre Domäne aus, die aus zwei Immunglobulin(IG)-ähnlichen und zwei folgenden Fibronectin-Typ3-ähnlichen Domänen besteht (Abb.2A) und somit Zelladhäsionsmolekülen wie NCAM (neural cell adhesion molecule) ähnelt [O'Bryan 1991, Sasaki 2006].

Axl wurde ursprünglich als transformierendes Gen aus der DNA von Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie identifiziert [Janssen 1991, O'Bryan 1991]. Der Name ist von dem griechischen Wort „anexelekto“ (= unkontrolliert) abgeleitet [O'Bryan 1991]. Axl ist ubiquitär in zahlreichen Geweben epithelialen, mesenchymalen und hämatopoetischen Ursprungs sowie in Endothelzellen exprimiert [Hafizi 2006]. Eine Überexpression von Axl kann außer in leukämischen Blutzellen auch in multiplen humanen Malignomen wie dem malignem Melanom [Quong 1994], dem Magenkarzinom [Sawabu 2007], dem Ovarialkarzinom [Sun 2004], dem Nierenzellkarzinom [Chung 2003], dem Endometriumkarzinom [Sun 2003], dem Schilddrüsenkarzinom [Ito 1999], dem Mammakarzinom [Zhang 2008] und Gliomen [Hutterer 2008] nachgewiesen werden.

Im Jahr 1995 konnten sowohl Stitt et al. als auch Varnum et al. zeitgleich erstmals Gas6 (growth arrest-specific protein 6) als gemeinsamen Liganden der Axl-RTK-Familie identifizieren [Stitt 1995, Varnum 1995], wobei die Affinität zum Axl-Rezeptor am größten ist [Nagata 1996]. Gas6 ist das Produkt des growth arrest-specific gene 6, welches in hohem Maße in Zellen im Wachstumsstillstand nachweisbar ist [Manfioletti 1993]. Gas6 ist zu 44% identisch mit Protein S, dem Inhibitor der Blutgerinnung, das die Axl-RTKs unter bestimmten nicht-physiologischen Bedingungen aktivieren kann [Godowski 1995]. Gas6 setzt sich zusammen aus der für Vitamin-K-abhängige Proteine typischen γ -Carboxyglutamat-Domäne, welche die Bindung an Phospholipidmembranen reguliert, sowie aus vier EGF-ähnlichen Domänen (Abb.2B). Die C-terminale Region weist Ähnlichkeit mit dem humanen „sex hormone-binding protein“ (SHBP) auf [Manfioletti 1993]. Die Bindung von Gas6 erfolgt über die erste von zwei C-terminalen Laminin-G-ähnlichen Domänen an die IG-Domänen des Axl-Rezeptors (Abb.2C) [Sasaki 2006]. Dadurch kommt es zu einer Aktivierung des PI3K (Phosphoinositid-3-Kinase)/Akt-Signalwegs sowie des ERK (extracellular signal-regulated kinase)-Signalwegs [Wu 2004]. Auch über eine vorübergehende Aktivierung von JNK (c-Jun

N-terminale Kinase) und p38 MAPK (mitogen-activated protein kinase) wird berichtet [Goruppi 1999]. Ein relativ neuer Aspekt ist die Interaktion des Axl-Rezeptors mit dem Interleukin-Rezeptor 15 α , wodurch eine indirekte Aktivierung des Axl-Signalwegs über Interleukin 15, das die Zelle vor dem TNF α -induzierten Zelltod schützt, möglich ist [Budagian 2005]. Weitere mögliche Aktivierungsmechanismen der TAM-RTKs sind in Abb.2D dargestellt.

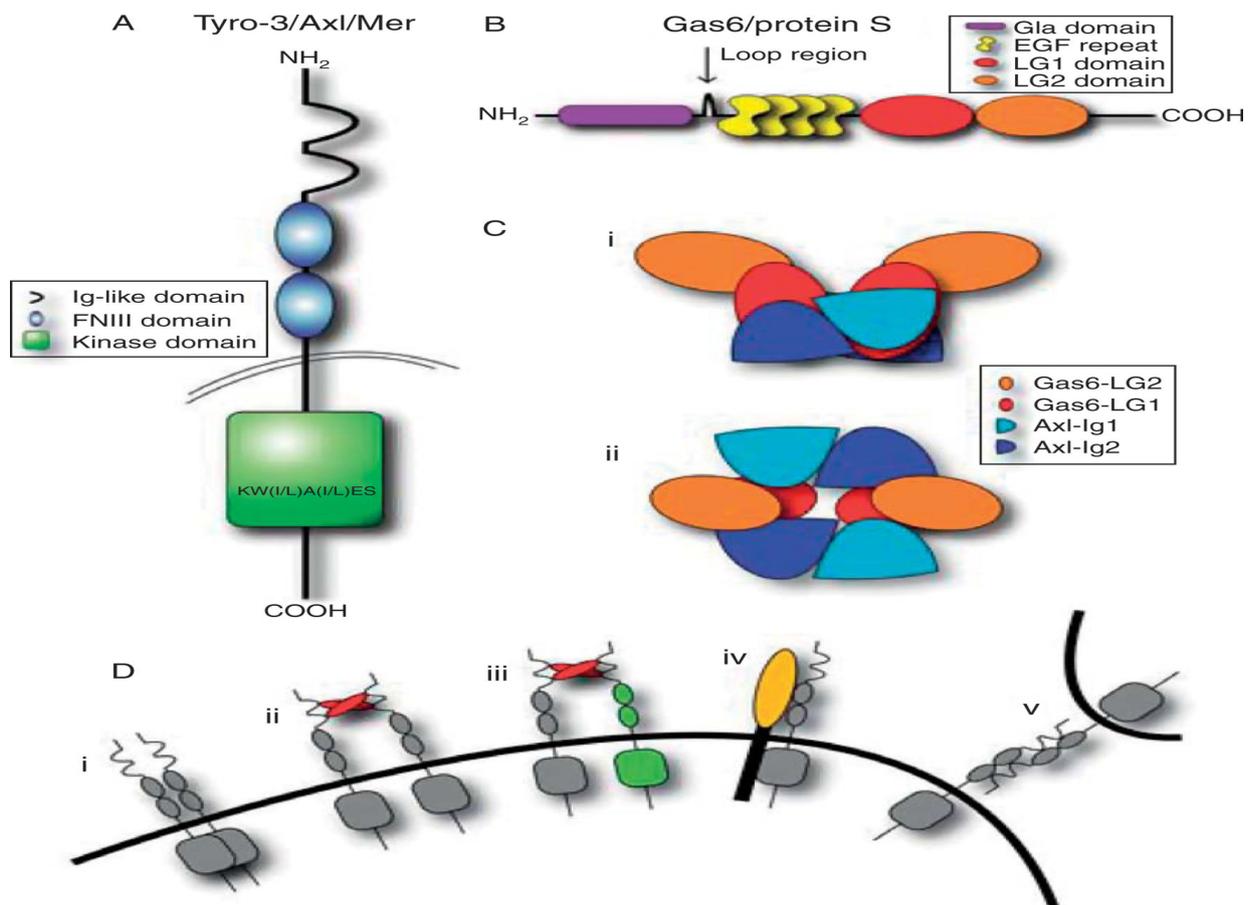


Abb.2: Aufbau, Bindung und Aktivierung der TAM-Rezeptortyrosinkinasen und ihrer Liganden (nach Linger 2008)

- A Aufbau der TAM-Rezeptortyrosinkinasen Axl, Tyro3 und Mer
- B Aufbau der TAM-Rezeptor-Liganden Gas6/Protein S
- C Bindung von Gas6 an Axl
 - i Seitliche Ansicht
 - ii Ansicht von oben
- D Mögliche Aktivierungsmechanismen der TAM-RTKs
 - i Liganden-unabhängige Dimerisierung
 - ii Liganden-abhängige Dimerisierung
 - iii Heteromere Dimerisierung von zwei verschiedenen TAM-Rezeptoren
 - iv Heterotype Dimerisierung mit einem nicht der TAM-Familie angehörenden Rezeptor
 - v Transzelluläre Bindung extrazellulärer Domänen

Über diese Signalwege ist die Gas6/Axl-Interaktion eingebunden in die Regulation von Karzinogenese, Zellproliferation, -migration, -adhäsion, -überleben, Apoptose und Neovaskularisation. O'Bryan et al. wiesen 1991 die maligne Transformation von Axl-cDNA-transfizierten NIH3T3-Fibroblasten nach. Diese Transformation konnte bei Axl-überexprimierenden Zellen ohne Bindung des Liganden erfolgen [O'Bryan 1991]. McCloskey et al. beobachteten, dass die Stimulation und Aktivierung von Axl in einer myeloischen Zelllinie (32D-Zellen) zur malignen Entartung dieser Zellen führt [McCloskey 1994]. Dennoch scheint Axl ein eher geringes onkogenes Potential aufzuweisen, da eine Transformation nur in Zellen nachgewiesen wurde, die eine sehr starke Expression des Axl-Rezeptors zeigten [O'Bryan 1991]. Eine Stimulation Axl-exprimierender NIH3T3-Zellen mit Gas6 bewirkt unter Serummangelbedingungen den Eintritt in die Teilungsphase des Zellzyklus und in Folge ein Fortschreiten der Proliferation. Im Falle einer Axl-Überexpression ist dieser Effekt bereits bei äußerst niedrigen Gas6-Konzentrationen nachweisbar [Goruppi 1996]. In Schwannzellen stimuliert Gas6 ebenfalls die Proliferation und wirkt synergistisch mit bekannten Mitogenen wie Heregulin/Glial growth factor und Forskolin [Li 1996]. Insgesamt ist die mitogene Aktivität von Gas6 jedoch eher als gering einzustufen [Burchert 1998].

Ein weiterer Effekt des Gas6/Axl-Signalwegs ist die Apoptosehemmung. Gas6 wird in Zellen im Wachstumsstillstand hochreguliert und fördert das Zellüberleben in dieser Phase. Bellosta et al. beobachteten, dass die Aktivierung des Axl-Rezeptors durch Gas6 NIH3T3-Fibroblasten unter Serummangelbedingungen vor Apoptose schützt, ohne das Zellwachstum zu stimulieren. Die hierfür benötigte Gas6-Konzentration war zehnmal niedriger als diejenige, die zur Stimulation der Zellteilung benötigt wurde, und scheint eher einem physiologischen Expressionslevel zu entsprechen. Bellosta et al. folgern aus dieser Beobachtung, dass die Förderung des Zellüberlebens die zentrale Funktion des Gas6/Axl-Signalwegs darstellen könnte, während die Stimulation zur Proliferation unter unphysiologischen Bedingungen künstlich erzeugt wird [Bellosta 1997].

Die mitogene und antiapoptotische Wirkung der Gas6/Axl-Interaktion wird abhängig vom jeweiligen Zelltyp über unterschiedliche Signalwege vermittelt. In NIH3T3-Fibroblasten erfolgt sie über die PI3K mit anschließender Aktivierung von Akt/PKB und S6K sowie über die Src-Tyrosinkinase [Goruppi 1997]. In anderen Zelllinien wird auch der ERK-Signalweg aktiviert [Sainaghi 2005]. Des Weiteren ist eine vorübergehende Steigerung der nukleären NF- κ B-Bindungsaktivität über PI3K/Akt im Rahmen der Apoptosehemmung bekannt [Demarchi 2001].

Über die Expression und Funktion von Gas6 und Axl im Prostatakarzinom ist bislang nur relativ wenig bekannt. Jacob et al. wiesen im Jahr 1999 mittels Differential-Display-PCR erstmals eine Axl-mRNA-Überexpression im Prostatakarzinom sowie in den Prostatakarzinom-Zelllinien DU145 und PC-3 nach. Besonders hohe Expressionslevel waren in der metastatischen Zelllinie DU145 vorzufinden, während die nicht-metastatische Zelllinie PC-3 eine weniger starke Axl-Überexpression zeigte. Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass ein Zusammenhang zwischen Axl-Gen-Überexpression und Karzinogenese bzw. Metastasierung besteht. Als potentielle Ursache für die Überexpression in DU145-Zellen wird ein Rearrangement des Axl-Onkogens in Betracht gezogen [Jacob 1999].

Sainaghi et al. untersuchten 2005 die Wirkung von Gas6 auf Axl-exprimierende Prostatakarzinom-Zelllinien (DU145 und PC-3). Dabei wurde eine mitogene Aktivität der Gas6/Axl-Interaktion beobachtet, die zur Axl-Expression in den Zelllinien proportional und demzufolge in DU145-Zellen am größten war. Die Stimulation der Proliferation über den Gas6/Axl-Signalweg erfolgte über Akt- und MAPK-Phosphorylierung und könnte eine Rolle bei der Progression von Prostataneoplasien spielen [Sainaghi 2005].

In einer 2010 veröffentlichten Studie von Shiozawa et al. wurde die Bedeutung des Gas6/Axl-Signalwegs hinsichtlich der ossären Metastasierung von Prostatakarzinomen untersucht. Es wurde nachgewiesen, dass die Bindung von Annexin II, welches an der Zelloberfläche von Osteoblasten exprimiert wird und eine entscheidende Rolle bei der Adhäsion von hämatopoetischen Stammzellen an die „Stammzellnische“ im Knochenmark spielt, an Prostatakarzinomzellen die Expression der Axl-Tyrosinkinase-Rezeptoren induziert. Des Weiteren stellten Shiozawa et al. fest, dass die Axl-Expression in höhermalignen Tumoren und in Knochenmetastasen deutlich erhöht war. Im Gegensatz zu der vorgenannten Studie von Sainaghi et al. konnten Shiozawa et al. keine Stimulation der Proliferation von Prostatakarzinomzellen über den Gas6/Axl-Signalweg nachweisen. Im Gegenteil – die Stimulation von Prostatakarzinomzellen mit Gas6 führte in dieser Studie zu einer Inhibition der Zellproliferation. Weitere Effekte der Gas6-Stimulation waren die Regulation der Zellinvasion, die Förderung des Zellüberlebens, die Protektion der Karzinomzellen vor chemotherapieinduzierter Apoptose und der Einfluss auf den Zellzyklus der Karzinomzellen. Die Autoren folgerten daraus eine bedeutende regulatorische Rolle des Gas6/Axl-Signalwegs beim Wachstum von Prostatakarzinomzellen im Knochenmark, welches durch Annexin II und Gas6 beeinflusst wird. Dabei scheint nicht die Stimulation der Proliferation, sondern vielmehr die Induktion der Tumorzellruhephase eine wichtige Rolle zu spielen [Shiozawa 2010].

1.4 Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wird die Expression von Gas6 und Axl mittels semiquantitativer Immunhistochemie im Prostatakarzinom und in der HG-PIN im Vergleich zum normalen Prostatagewebe analysiert. Des weiteren wird untersucht, ob die Expression im Prostatakarzinom eine prognostische Relevanz hinsichtlich des rezidivfreien Überlebens der Patienten aufweist. Schließlich wird überprüft, ob die Gas6/Axl-Expression im Prostatakarzinom mit wichtigen klinisch-pathologischen Parametern und molekularen Veränderungen korreliert, um so Hinweise auf mögliche weitere Funktionen und Implikationen des Signalwegs erhalten zu können.

2 Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die von Engers et al. [Engers 2006] beschriebene Kohorte von initial 60 R0-resezierten Prostatektomiepräparaten auf 89 R0-resezierte Fälle erweitert. Sämtliche Patientendaten waren anonymisiert und es handelte sich bei den Präparateschnitten um für Diagnosezwecke nicht mehr benötigtes Material. Alle Patienten sind in der Urologischen Klinik der Universität Düsseldorf operiert worden. Das Patientenalter lag zwischen 52 und 79 Jahren, der Mittelwert betrug 65,11 Jahre. Patienten mit Z.n. neoadjuvanter Hormontherapie, positiven Resektionsrändern und/oder postoperativen PSA-Werten $> 0,3$ ng/ml wurden aus der Studie ausgeschlossen.

Als Krankheitsrezidiv wurde ein Wiederanstieg des PSA-Wertes auf $> 0,3$ ng/ml und/oder ein radiologischer oder histologischer Nachweis lokaler Rezidive oder Metastasen gewertet. Follow-up Daten waren für alle 89 Patienten vorhanden. Der durchschnittliche Beobachtungszeitraum betrug 88,26 Monate (3 – 255 Monate).

23 Patienten (25,8%) entwickelten ein Rezidiv, bei den übrigen 66 Patienten (74,2%) wurde bis zum letzten Follow-up-Termin kein Rezidiv festgestellt. Der Zeitraum bis zum Auftreten eines Rezidivs lag zwischen 3 Monaten und 21,3 Jahren. 6 Patienten verstarben an ihrem Prostatakarzinom.

Der prätherapeutische PSA-Wert war für 81 der 89 Patienten (91%) bekannt und lag im Mittel bei 12,343 ng/ml (1,3- 44,3 ng/ml). Bei 46 Patienten (56,8%) betrug der PSA-Wert < 10 ng/ml, bei 35 (43,2%) ≥ 10 ng/ml.

54 Prostatakarzinom-Patienten (60,7%) hatten nach der pTNM-Klassifikation einen organbegrenzten Tumor im Stadium pT2a, pT2b oder pT2c, während in 35 Fällen (39,3%) ein organübergreifendes Stadium (pT3a oder pT3b) vorlag.

26 der mikroskopierten Prostatakarzinom-Präparate (29,2%) wiesen einen Gleason Score von 2-6 auf, bei 63 Präparaten (70,8%) lag der Gleason Score zwischen 7 und 10.

In 56 der 89 Präparate war eine HG-PIN vorzufinden. Lymphknotenmetastasen und eine Blutgefäßinvasion waren lediglich jeweils in zwei Fällen (2,2%) nachweisbar. In acht Fällen (9%) hatte das Karzinom die Lymphgefäße infiltriert, in 69 Fällen (78,4%) die Perineuralscheiden.

Bei keinem Patienten waren zum Zeitpunkt der Prostatektomie Fernmetastasen nachweisbar. Ein Teil der Kohorte wurde bereits in vorangegangenen Untersuchungen hinsichtlich der Expression von Tiam1 und Rac analysiert. Für beide Proteine konnte in diesen Studien eine

prognostische Relevanz der Überexpression im Prostatakarzinom für das rezidivfreie Überleben der Patienten nachgewiesen werden [Engers 2006, Engers 2007].

2.2 Immunhistochemie

Die immunhistochemische Färbung erfolgte mit der LSAB (Labelled Streptavidin-Biotin) – Methode. Von den ausgewählten Paraffinblöcken wurden 2-4 µm dicke Schnitte angefertigt, diese auf silanisierte Adhäsions-Objektträger (HistoBond, Fa. Marienfeld) aufgezogen, im Brutschrank bei 100°C 10 Minuten lang getrocknet und anschließend zur besseren Haftung über Nacht im Brutschrank bei 58°C belassen. Danach folgten das Entparaffinieren mit Xylol über 15 Minuten und die Rehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 96%, 70%). Anschließend wurden die Schnitte mit Leitungswasser gespült. Zur Epitop-Demaskierung wurden die Schnitte in Citratpuffer pH 6 (21g Citronensäure, 25 ml NaOH ad 10 l Aqua dest.) 15 Minuten lang im Schnellkochtopf erhitzt und danach 5 Minuten lang mit kaltem Wasser abgespült. Es folgte die Inkubation mit 3%iger Wasserstoffperoxidlösung (H₂O₂) für 10 Minuten, um die endogene Peroxidase zu blockieren. Für die folgenden Schritte wurde das UltraTek Reagent (Fa. ScyTek) verwendet:

Anti-Polyvalent (mouse, rabbit, rat, guinea pig)	biotinylierter Sekundärantikörper	ABN999
Horseshoe Peroxidase	Tertiärreagenz (labelled streptavidin)	ABL999
Bulk DAB Reagent	(Substrat)	ACK999
Normal Antibody Diluent	(TBS-Puffer)	ADT999

Zur Blockade des endogenen Biotins wurden die Schnitte 15 Minuten lang mit Avidinlösung (1 Hühnereiweiß + 100 ml Aqua dest.) inkubiert, anschließend mit Leitungswasser gespült und zur Blockade des Avidins wiederum 15 Minuten lang mit Biotinlösung (0,02% d-Biotin in TBS-Puffer) inkubiert. Nach erneutem Spülen mit Leitungswasser und Triton-Aqua dest. wurden in einer feuchten Kammer 150 µl des Axl-Primärantikörpers in einer Verdünnung von 1:100 in TBS-Puffer aufgetragen. Diesen ließ man über Nacht bei 6°C einwirken. Der Gas6-Antikörper wurde in gleicher Menge und Verdünnung, allerdings nur für 2 Stunden bei Raumtemperatur, auf die Objektträger gegeben. Anschließend wurden der biotinylierte Sekundärantikörper und das Meerrettich-Peroxidase-markierte Streptavidin für je 15 Minuten, das mittels eines Faltenfilters (595 ½ O 150mm, Schleicher & Schuell) filtrierte Diaminobenzidin (DAB) für 10 Minuten aufgetragen. Zwischen diesen einzelnen Schritten wurde immer mit Leitungswasser und Triton-Aqua dest.

gespült. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämalaun für 6 Minuten. Zum Schluss wurden die Schnitte nochmals mit Leitungswasser gespült, dann in aufsteigender Alkoholreihe dehydriert, mit Xylol inkubiert und eingedeckt.

Zum Ausschluss unspezifischer Bindungen des Sekundärantikörpers wurde bei jedem Färbedurchgang ein Schnitt als Negativkontrolle mitgeführt, bei dem lediglich auf die Applikation des Primärantikörpers verzichtet wurde.

2.3 Der Axl-Antikörper

Als Primärantikörper gegen Axl wurde der monoklonale Maus anti-Human-Axl-Antikörper MAB 423-36 verwendet, der freundlicherweise von Prof. Dr. A. Ullrich (Abteilung Molekularbiologie des Max-Planck-Instituts für Biochemie, Martinsried/München) zur Verfügung gestellt wurde.

2.4 Der Gas6-Antikörper

Zum Nachweis von Gas6 wurde der polyklonale Ziege anti-Human-Gas6-Antikörper PAB C-20 (Santa Cruz Biotechnology) als Primärantikörper verwendet.

2.5 Beurteilung der immunhistochemischen Anfärbung

Sämtliche Gewebeschnitte wurden gemeinsam mit Herrn Prof. Dr. R. Engers (Institut für Pathologie) am Mikroskop ausgewertet. Zur semiquantitativen Bestimmung der Expressionslevel von Axl und Gas6 im Prostatakarzinom, in der präneoplastischen HG-PIN und im korrespondierenden normalen sekretorischen Epithel wurde jeweils ein Scoring-System wie bei der routinemäßigen Bestimmung des Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus beim Mammakarzinom verwendet [Engers 2007]. Dabei wurde einerseits der Prozentsatz der immunhistochemisch angefärbten (positiven) Zellen bestimmt, andererseits die Färbintensität der positiven Zellen beurteilt (Tab.2).

Prozentsatz positiver Zellen

0	keine positiven Zellen
1	< 10% positive Zellen
2	10-50% positive Zellen
3	51-80% positive Zellen
4	> 80% positive Zellen

Färbeintensität

0	keine Färbereaktion
1	schwache Färbereaktion
2	mäßige Färbereaktion
3	starke Färbereaktion

Tab.2: Berechnungsgrundlage der immunreaktiven Scores (IRS) von Axl und Gas6

Der immunreaktive Score (IRS) errechnet sich jeweils als Produkt der Werte für den Anteil positiver Zellen (Skala 0-4) und dem Wert für die Färbeintensität (Skala 0-3) und reicht von 0 bis 12. Bei jedem Prostatektomiepräparat wurde in der vorliegenden Arbeit sowohl für Axl als auch für Gas6 der IRS im Karzinom, in der HG-PIN und im korrespondierenden normalen sekretorischen Epithel bestimmt.

Für die statistischen Analysen wurden statt der absoluten Expressionslevel von Axl und Gas6 jeweils die Quotienten der Expressionslevel im Tumor- und Normalgewebe bestimmt, um so fixierungs- oder methodisch bedingte Schwankungen der Färbeintensitäten zu eliminieren.

2.6 Statistische Analysen

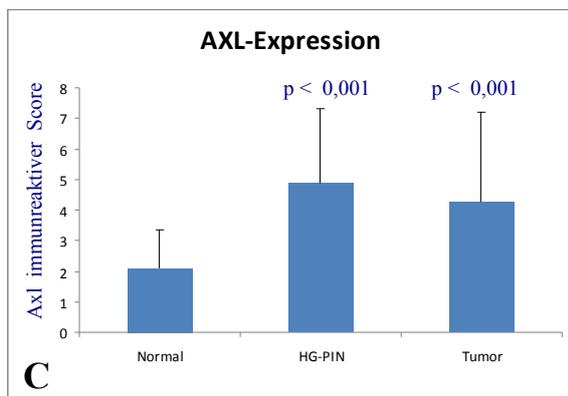
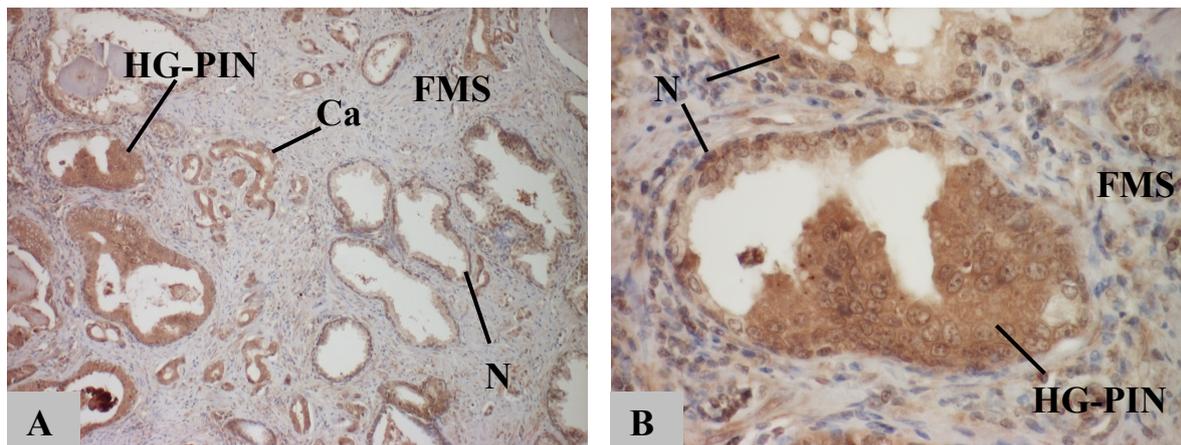
Die statistischen Analysen erfolgten mit dem Programm SPSS 12.0 und wurden in Analogie zu den in Kooperation mit Herrn Dr. R. Willers (Rechenzentrum der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) vorgenommenen statistischen Berechnungen für die bereits publizierten Arbeiten über die Expression und prognostische Relevanz von Tiam1 [Engers 2006] und Rac [Engers 2007] durchgeführt. Als Signifikanzniveau wurde eine 2-seitige Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% angenommen. Für den Vergleich der Expression von Axl und Gas6 im Tumorgewebe, in der HG-PIN und im korrespondierenden normalen sekretorischen Epithel wurde der Wilcoxon-Test verwendet. Für Korrelationsuntersuchungen zwischen der Gas6-/Axl-Expression und klinisch-pathologischen Parametern sowie anderen molekularen Parametern fand der Exakte Fisher-Test Anwendung. Die grafische Darstellung des rezidivfreien Überlebens, welches als Zeitraum zwischen radikaler Prostatektomie und Nachweis eines Rezidivs definiert wurde, erfolgte mit Kaplan-Meier-Überlebenskurven. Die univariate Analyse erfolgte mit dem Log-Rank-Test, die multivariate Analyse mit dem Cox-Regressionsmodell.

3 Ergebnisse

3.1.1 Axl-Expression im Prostatakarzinom und Assoziation mit wichtigen klinisch-pathologischen Parametern

Da die Axl-Expression im Prostatakarzinom, in der präneoplastischen HG-PIN und im korrespondierenden normalen sekretorischen Epithel z.T. sehr heterogen verteilt war, erfolgte die Bestimmung der Expression mittels semiquantitativer Immunhistochemie. Dabei lag der IRS für Axl im Normalgewebe zwischen 1 und 8 (Mittelwert: 2,11), im Tumor und in der HG-PIN jeweils zwischen 0 und 12 (Mittelwert im Tumor: 4,26, Mittelwert in der HG-PIN: 4,89). So war Axl in einem Teil der Fälle im Prostatakarzinom und in der HG-PIN deutlich stärker exprimiert als im jeweiligen Normalgewebe (Abb.3A/B). In anderen Fällen hingegen war nur eine geringgradige oder keine Überexpression im Tumorgewebe bzw. der HG-PIN nachweisbar. Eine Axl-Überexpression im Karzinom zeigte sich insgesamt in 53 von 89 Fällen (59,6%), in 10 Fällen (11,2%) war Axl im Tumor weniger stark exprimiert als im Normalgewebe und in 26 Fällen (29,3%) fand sich kein Unterschied in der Expression zwischen Tumorgewebe und normalem sekretorischen Epithel. In der HG-PIN war Axl in 47 von 56 Fällen (84,1%) überexprimiert, in 2 Fällen (3,6%) war die Expression im Normalgewebe stärker und in 7 Fällen (12,5%) zeigte sich kein Unterschied in der Expression zwischen HG-PIN und normalem sekretorischen Epithel.

Über die gesamte Kohorte gesehen ergab sich jedoch eine hochsignifikante Axl-Überexpression im Tumorgewebe (durchschnittlich Faktor 2,48; $p < 0,001$) und in der HG-PIN (durchschnittlich Faktor 2,58; $p < 0,001$) im Vergleich zum Normalgewebe (Abb.3C). Kein signifikanter Unterschied war zwischen der Expression von Axl im Tumorgewebe und in der HG-PIN nachweisbar.



N = Normalgewebe
 HG-PIN = High-grade prostatiche intra-
 epitheliale Neoplasie
 Ca = Karzinom
 FMS = fibromuskuläres Stroma

Abb.3: Analyse der Axl-Expression im Prostatakarzinom, in der HG-PIN und im normalen sekretorischen Epithel mittels semiquantitativer Immunhistochemie

- Immunhistochemische Darstellung der Axl-Überexpression im Prostatakarzinom im Vergleich zum korrespondierenden normalen sekretorischen Epithel (100x Vergrößerung)
- Immunhistochemische Darstellung der Axl-Überexpression in der prä-neoplastischen HG-PIN im Vergleich zum korrespondierenden normalen sekretorischen Epithel (400x Vergrößerung), Ausschnitt aus A
- Vergleich der Axl-Expressionslevel (Mittelwert +/- Standardabweichung) im normalen sekretorischen Epithel, in der HG-PIN und im Prostatakarzinom

Für die Korrelationsberechnungen zwischen der Axl-Expression und wichtigen klinisch-pathologischen Parametern wurde aus praktischen Gründen heraus eine Einteilung der Expressionslevel im Verhältnis zum Normalgewebe in ≤ 1 (keine Überexpression) und > 1 (Überexpression) vorgenommen.

Beim Vergleich mit wichtigen klinisch-pathologischen Parametern (Tab.3) korrelierte die Axl-Überexpression signifikant mit dem Auftreten eines Tumorrezidivs ($p = 0,048$), mit einem hohen pT-Stadium ($p = 0,008$) und mit einem hohen Gleason Score ($p = 0,004$). In Bezug auf molekulare Veränderungen ergab sich eine Korrelation mit einer starken Überexpression des Tiam1 (T-Lymphoma invasion and metastasis)-Proteins ($p = 0,023$), welches von Engers et al. kürzlich als unabhängiger prognostischer Faktor für Prostatakarzinom-Patienten identifiziert wurde [Engers 2006].

Keine signifikanten Korrelationen ergaben sich hingegen mit dem Patientenalter, mit dem prätherapeutischen PSA-Wert, mit dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen, Blutgefäß-, Lymphgefäß- und Perineuralscheideninvasion und mit einer Überexpression von Gas6 und Rac.

Tab. 3: Klinisch-pathologische Charakteristika der Axl-Überexpression im Prostatakarzinom¹

Faktor	Axl-Expression im Vergleich zum Normalgewebe		P-Wert ²
	≤ 1-fach (n = 36) Anzahl (%)	> 1-fach (n = 53) Anzahl (%)	
Alter in Jahren			
< 65	16 (18)	22 (25)	0,829
≥ 65	20 (22)	31 (35)	
Präoperativer PSA³ (ng/ml)			
< 10	20 (25)	26 (32)	0,493
≥ 10	12 (15)	23 (28)	
Rezidiv			
nein	31 (35)	35 (39)	0,048 *
ja	5 (6)	18 (20)	
LVI			
nein	33 (37)	48 (54)	1,000
ja	3 (3)	5 (6)	
BVI			
nein	34 (38)	53 (59)	0,161
ja	2 (2)	0 (0)	
PNI			
nein	9 (10)	10 (11)	0,602
ja	27 (31)	42 (48)	
pT			
pT2	28 (31)	26 (29)	0,008 *
pT3	8 (9)	27 (30)	
pN			
pN0	34 (38)	53 (59)	0,161
pN1	2 (2)	0 (0)	
GS			
< 7	17 (19)	9 (10)	0,004 *
≥ 7	19 (21)	44 (49)	
Tiam1⁴			
< 3,5-fach	10 (23)	8 (18)	0,023 *
≥ 3,5-fach	5 (11)	21 (48)	
Rac⁵			
≤ 1-fach	11 (25)	12 (27)	0,060
> 1-fach	4 (9)	17 (39)	
Gas6⁶			
≤ 1-fach	26 (29)	28 (32)	0,080
> 1-fach	10 (11)	25 (28)	

* Statistisch signifikant. LVI, Lymphgefäßinvasion; BVI, Blutgefäßinvasion; PNI, Perineuralscheideninvasion; GS, Gleason Score.

¹ Aufgrund von Rundungen ergeben sich nicht immer exakt 100%.

² Zweiseitiger Fisher's Exakt Test

³ Der präoperative PSA-Wert war für 81 der 89 Patienten bekannt.

⁴ Expression im Vgl. zum Normalgewebe. Der Tiam1-Expressionswert war für 44 der 89 Patienten bekannt.

⁵ Expression im Vgl. zum Normalgewebe. Der Rac-Expressionswert war für 44 der 89 Patienten bekannt.

⁶ Expression im Vgl. zum Normalgewebe.

3.1.2 Univariate Analyse

Für die prognostischen Untersuchungen wurden sowohl die etablierten Prostatakarzinom-Prognosefaktoren Gleason Score, prätherapeutischer PSA-Wert und pT-Stadium als auch die Expressionslevel von Gas6 und Axl jeweils in zwei Kategorien eingeteilt. So wurde der Gleason Score in die Kategorien 2-6 sowie 7-10 dichotomisiert. Der prätherapeutische PSA-Wert wurde in die Gruppen < 10 ng/ml und ≥ 10 ng/ml unterteilt, während für das pT-Stadium die klinisch relevante Einteilung in organbegrenzte Tumore (pT2a,2b,2c) und organüberschreitende Tumore (pT3a,3b) vorgenommen wurde. Die Expressionslevel von Gas6 und Axl im Prostatakarzinom wurden im Verhältnis zum Normalgewebe bestimmt und in die Kategorien ≤ 1 (keine Überexpression) und > 1 (Überexpression) eingeteilt.

In der Kaplan-Meier-Analyse ergab sich für die bekannten und etablierten Prognosefaktoren des Prostatakarzinoms Gleason Score, prätherapeutischer PSA-Wert und pT-Stadium eine signifikante Assoziation mit einem verkürzten rezidivfreien Überleben der Patienten, was die Repräsentativität des vorliegenden Kollektivs unterstreicht:

Gleason Score: < 7 vs. ≥ 7 ; $p = 0,001$

Prätherapeutischer PSA: < 10 vs. ≥ 10 ; $p = 0,003$

pT-Stadium: pT2 vs. pT3; $p = 0,043$

In der univariaten Analyse war die Assoziation zwischen der Axl-Überexpression im Tumor im Vergleich zum Normalgewebe und einem verkürzten rezidivfreien Überleben der Patienten grenzwertig signifikant ($p = 0,050$). Im Falle einer Axl-Überexpression im Tumor lag die mittlere rezidivfreie Überlebenszeit bei 149 Monaten (123 – 176 Monate; 95%-Konfidenzintervall), während das rezidivfreie Überleben bei fehlender Axl-Überexpression mit durchschnittlich 209 Monaten (172 - 246 Monate; 95%-Konfidenzintervall) deutlich länger war (Abb.4).

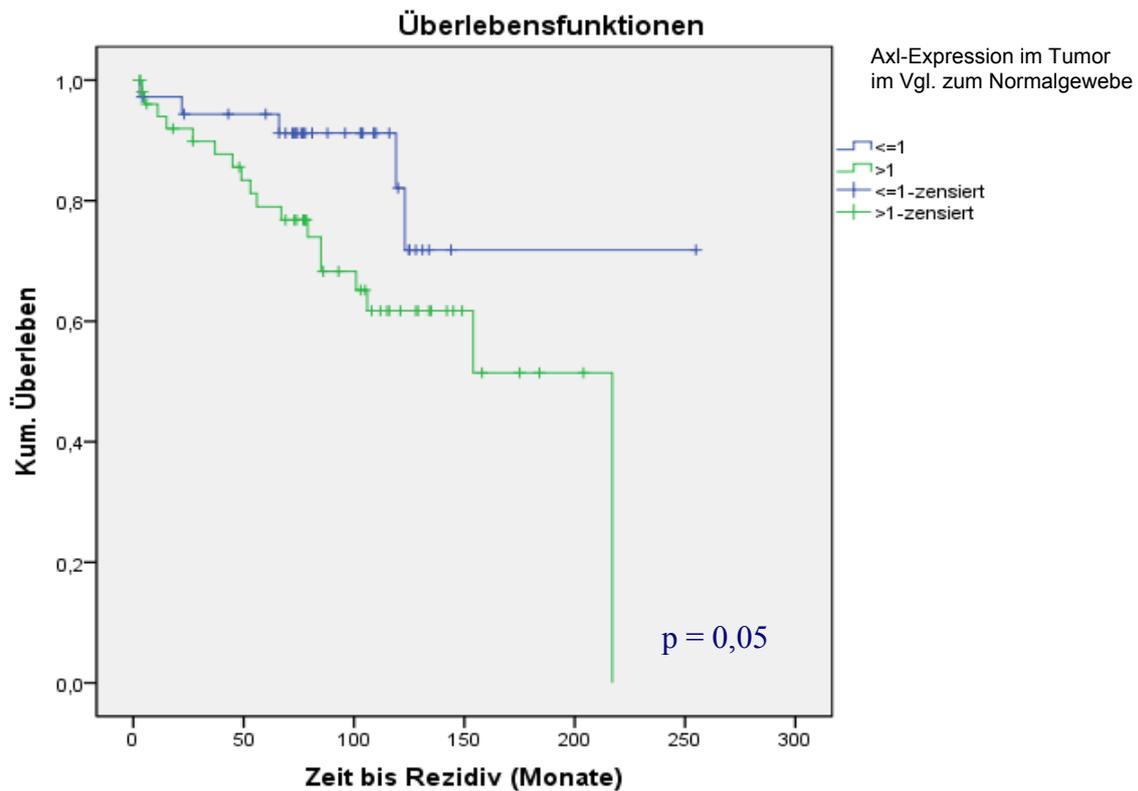


Abb.4: Prognostische Relevanz der Axl-Überexpression in der Kaplan-Meier-Analyse

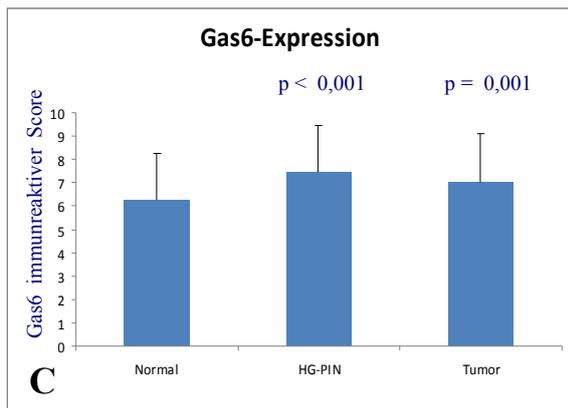
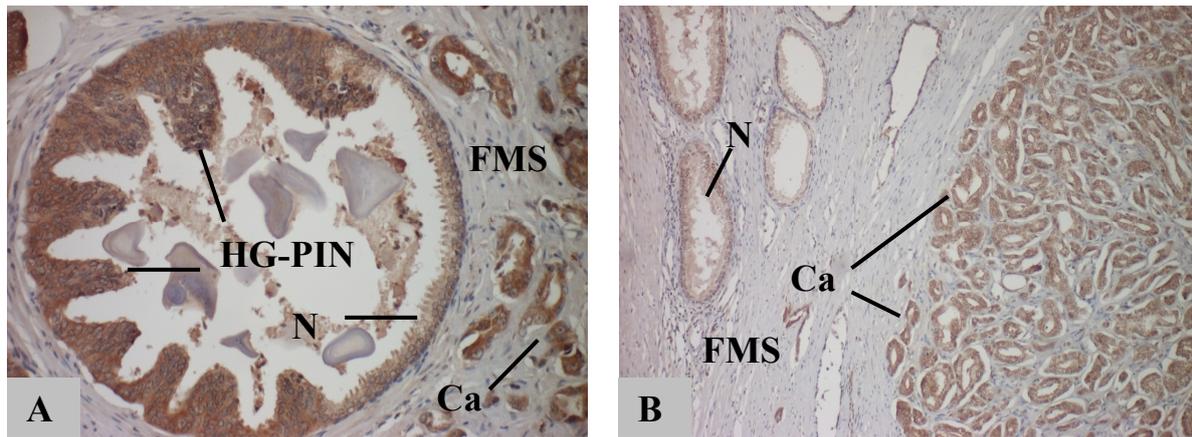
3.1.3 Multivariate Analyse

Um die Unabhängigkeit der in der univariaten Analyse identifizierten prognostischen Parameter (prätherapeutischer PSA-Wert, Gleason Score, pT-Stadium und Axl-Überexpression) zu untersuchen, wurde eine multivariate Analyse mit dem Cox Proportional Hazard-Modell durchgeführt. Dabei erwies sich das Ausmaß der Axl-Expression im Prostatakarzinom nicht als unabhängiger prognostischer Parameter für das rezidivfreie Überleben der Patienten ($p = 0,643$).

3.2.1 Gas6-Expression im Prostatakarzinom und Assoziation mit wichtigen klinisch-pathologischen Parametern

Für die Beurteilung der Gas6-Expression im Prostatakarzinom, in der HG-PIN und im normalen sekretorischen Epithel wurde ebenfalls jeweils der IRS bestimmt. Dieser lag im Normalgewebe zwischen 1 und 9 (Mittelwert: 6,28), im Tumorgewebe und in der HG-PIN jeweils zwischen 2 und 12 (Mittelwert im Tumor: 7,03, Mittelwert in der HG-PIN: 7,48). Auch im Fall von Gas6 war die Expression z.T. sehr heterogen. Während in einigen Fällen im Karzinom und in der HG-PIN eine deutliche Überexpression vorhanden war (Abb.5A/B), war Gas6 in anderen Fällen nicht oder nur geringgradig überexprimiert. Insgesamt zeigte sich eine Gas6-Überexpression im Tumor in 35 von 89 Fällen (39,3%), in 16 Fällen (18%) war Gas6 im Tumor weniger stark exprimiert als im normalen sekretorischen Epithel und in 38 Fällen (42,7%) zeigte sich kein Unterschied in der Expression zwischen Tumor und Normalgewebe. In der HG-PIN fand sich eine Gas6-Überexpression in 22 von 42 Fällen (52,5%), in 2 Fällen (4,8%) war die Gas6-Expression im Normalgewebe etwas stärker und in 18 Fällen (42,9%) war kein Unterschied zwischen der Expression in der HG-PIN und im Normalgewebe nachweisbar.

Über die gesamte Kohorte gesehen ergab sich jedoch eine hochsignifikante Überexpression von Gas6 sowohl in der HG-PIN ($p < 0,001$) als auch im Prostatakarzinom ($p = 0,001$), verglichen mit dem korrespondierenden Normalgewebe. Im Mittel betrug die Expression von Gas6 im Tumor das 1,28-fache und in der HG-PIN das 1,49-fache der Expression im normalen sekretorischen Epithel (Abb.5C). Der Vergleich der Expression von Gas6 im Karzinom und in der HG-PIN ergab keinen signifikanten Unterschied.



N = Normalgewebe
 HG-PIN = High-grade prostatiche intra-epitheliale Neoplasie
 Ca = Karzinom
 FMS = fibromuskuläres Stroma

Abb.5: Analyse der Gas6-Expression im Prostatakarzinom, in der HG-PIN und im normalen sekretorischen Epithel mittels semiquantitativer Immunhistochemie

- A) Immunhistochemische Darstellung der Gas6-Überexpression in der prä-neoplastischen HG-PIN im Vergleich zum korrespondierenden normalen sekretorischen Epithel (200x Vergrößerung)
- B) Immunhistochemische Darstellung der Gas6-Überexpression im Prostatakarzinom im Vergleich zum korrespondierenden normalen sekretorischen Epithel (100x Vergrößerung)
- C) Vergleich der Gas6-Expressionslevel (Mittelwert +/- Standardabweichung) im normalen sekretorischen Epithel, in der HG-PIN und im Prostatakarzinom

Für die Korrelationsberechnungen zwischen der Gas6-Expression und wichtigen klinisch-pathologischen Parametern (Tab.4) wurde das Verhältnis der Gas6-Expression im Tumor und im Normalgewebe bestimmt und in die Kategorien ≤ 1 (keine Überexpression) und > 1 (Überexpression) dichotomisiert. Interessanterweise fand sich dabei im Prostatakarzinom eine Korrelation der Gas6-Überexpression mit einer Überexpression des Rac-Proteins ($p = 0,017$), dessen prognostische Relevanz für Prostatakarzinompatienten erstmalig von Engers et al. [Engers 2007] nachgewiesen wurde.

Keine signifikanten Korrelationen ergaben sich mit dem pT-Stadium, dem prätherapeutischen PSA-Wert, dem Gleason Score, dem Auftreten eines Rezidivs, dem Patientenalter, dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen, mit einer Blutgefäß-, Lymphgefäß- oder Perineuralscheideninvasion und einer Überexpression von Tiam1.

Tab.4: Klinisch-pathologische Charakteristika der Gas6-Überexpression im Prostatakarzinom¹

Faktor	Gas6-Expression im Vergleich zum Normalgewebe		P-Wert ²
	≤ 1-fach (n = 54) Anzahl (%)	> 1-fach (n = 35) Anzahl (%)	
Alter in Jahren			
< 65	23 (26)	15 (17)	1,000
≥ 65	31 (35)	20 (22)	
Präoperativer PSA³ (ng/ml)			
< 10	29 (36)	17 (21)	0,650
≥ 10	20 (25)	15 (18)	
Rezidiv			
nein	41 (46)	25 (28)	0,631
ja	13 (15)	10 (11)	
LVI			
nein	47 (53)	34 (38)	0,141
ja	7 (8)	1 (1)	
BVI			
nein	52 (58)	35 (39)	0,517
ja	2 (2)	0 (0)	
PNI			
nein	12 (14)	7 (8)	1,000
ja	41 (47)	28 (32)	
pT			
pT2	37 (41)	17 (19)	0,077
pT3	17 (19)	18 (20)	
pN			
pN0	52 (58)	35 (39)	0,517
pN1	2 (2)	0 (0)	
GS			
< 7	17 (19)	9 (10)	0,638
≥ 7	37 (41)	26 (29)	
Rac⁴			
≤ 1-fach	14 (32)	9 (20)	0,017 *
> 1-fach	5 (11)	16 (36)	
Tiam1⁵			
< 3,5-fach	9 (21)	9 (21)	0,542
≥ 3,5-fach	10 (23)	16 (36)	

* Statistisch signifikant. LVI, Lymphgefäßinvasion; BVI, Blutgefäßinvasion; PNI, Perineuralscheideninvasion; GS, Gleason Score.

¹ Aufgrund von Rundungen ergeben sich nicht immer exakt 100%.

² Zweiseitiger Fisher's Exakt Test

³ Der präoperative PSA-Wert war für 81 der 89 Patienten bekannt.

⁴ Expression im Vgl. zum Normalgewebe. Der Rac-Expressionswert war für 44 der 89 Patienten bekannt.

⁵ Expression im Vgl. zum Normalgewebe. Der Tiam1-Expressionswert war für 44 der 89 Patienten bekannt.

3.2.2 Univariate Analyse

Auch für die Beurteilung der prognostischen Relevanz der Gas6-Expression im Prostatakarzinom wurde eine Dichotomisierung der Kohorte in Tumoren mit Gas6-Überexpression und Tumoren ohne Gas6-Überexpression vorgenommen. Während sich in der univariaten Analyse bei den etablierten Prostatakarzinom-Prognosefaktoren Gleason Score, prätherapeutischer PSA-Wert und pT-Stadium, wie weiter oben bereits dargestellt, eine signifikante Assoziation dieser Faktoren mit einem verkürzten rezidivfreien Überleben der Patienten zeigte, war dies für die Gas6-Überexpression im Tumor, verglichen mit dem Normalgewebe, nicht der Fall ($p = 0,388$; Abb.6). Daher wurde auch auf eine multivariate Analyse verzichtet.

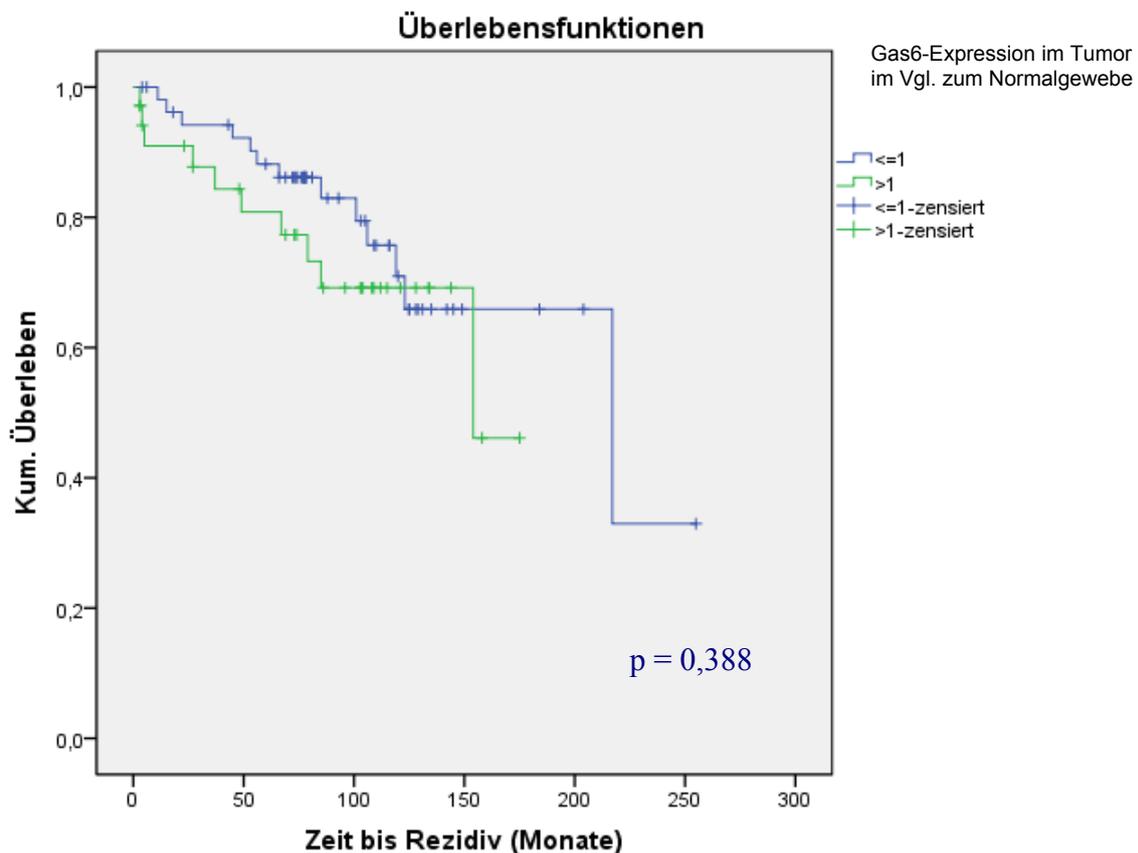


Abb.6: Prognostische Relevanz der Gas6-Überexpression in der Kaplan-Meier-Analyse.

4 Diskussion

Der Gas6/Axl-Signalweg spielt eine wichtige Rolle bei der Tumorentstehung sowie bei der Regulation von Zellproliferation, Migration, Adhäsion und Apoptose [Hafizi 2006]. Da bislang jedoch nur wenig über die Expression und prognostische Relevanz des Tyrosinkinaserzeptors Axl und seines Liganden Gas6 im Prostatakarzinom bekannt ist, wurden diese Aspekte in der vorliegenden Arbeit anhand einer repräsentativen Kohorte von R0-resezierten Prostatakarzinompatienten mittels semiquantitativer Immunhistochemie untersucht. Hierzu wurde zunächst die von Engers et al. [Engers 2006] beschriebene Kohorte von 60 Prostatakarzinompatienten auf 89 Patienten erweitert. Bereits am Vorgängerkollektiv von 60 Patienten konnten Engers et al. mit Tiam1 und Rac zwei neue, unabhängige Prognosefaktoren des Prostatakarzinoms identifizieren [Engers 2006, Engers 2007]. Auch die dieser Arbeit zugrunde liegende erweiterte, aus 89 Patienten bestehende Kohorte ist repräsentativ, da alle bislang etablierten Prognosefaktoren des Prostatakarzinoms (prätherapeutischer PSA-Wert, Gleason Score und pT-Stadium) auch in dieser Kohorte jeweils eine signifikante prognostische Relevanz zeigten. Die Stärke des vorliegenden Kollektivs liegt trotz der relativ begrenzten Fallzahl darin, dass nur R0-resezierte Prostatakarzinomfälle in die Studie eingeschlossen wurden. Demnach ist davon auszugehen, dass Rezidive tatsächlich Ausdruck eines aggressiven Tumorverhaltens sind und nicht nur das Ergebnis eines Tumorwachstums, ausgehend von Residuen eines unvollständig resezierten Primärtumors.

In der vorliegenden Arbeit lag die Axl-Expression im Prostatakarzinom durchschnittlich um den Faktor 2,48 über der Expression im korrespondierenden normalen sekretorischen Epithel, was einer hochsignifikanten ($p < 0,001$) Überexpression entspricht. Der Vergleich der Axl-überexprimierenden Prostatakarzinome (d.h. Axl-Expression im Tumor/Axl-Expression im korrespondierenden normalen sekretorischen Epithel > 1) mit den Prostatakarzinomen ohne Axl-Überexpression zeigte in der univariaten Analyse, dass die Überexpression von Axl mit einer grenzwertig signifikanten ($p = 0,05$) Verkürzung des rezidivfreien Überlebens der Patienten assoziiert ist. Hierzu passt auch, dass die Axl-Überexpression signifikant mit dem Auftreten eines Tumorrezidivs ($p = 0,048$) korrelierte. In der multivariaten Analyse jedoch, in der die Unabhängigkeit der Axl-Überexpression von den etablierten prognostischen Parametern des Prostatakarzinoms (prätherapeutischer PSA-Wert, Gleason Score und pT-Stadium) untersucht wurde, war die prognostische Aussagekraft der Axl-Überexpression nicht mehr nachweisbar ($p = 0,643$). Dies könnte daran liegen, dass die Axl-Überexpression beim Vergleich mit verschiedenen klinischen, pathologischen und molekularen Faktoren u.a. auch

mit einem hohen pT-Stadium ($p = 0,008$) und einem hohen Gleason Score ($p = 0,004$) korrelierte und somit eine Abhängigkeit zwischen der Axl-Überexpression und einem bzw. beiden anderen Parametern bestehen könnte. Für eine abschließende Beurteilung der prognostischen Relevanz einer Axl-Überexpression im Prostatakarzinom erscheint es jedoch sinnvoll, die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit auf ein größeres Kollektiv auszuweiten.

Insgesamt weist die Axl-Überexpression im Prostatakarzinom auf eine Bedeutung des Signalwegs in der Tumorbilogie des Prostatakarzinoms hin. Die genannten Korrelationen mit prognostisch relevanten klinisch-pathologischen Parametern deuten auf eine höhere Aggressivität und Invasionsfähigkeit Axl-überexprimierender Tumoren hin, was bereits im Zusammenhang mit Untersuchungen an Prostatakarzinom-Zelllinien vermutet wurde: So wiesen Jacob et al. 1999 mittels Differential-Display-PCR erstmals eine Axl-mRNA-Überexpression im Prostatakarzinom sowie in den Prostatakarzinom-Zelllinien DU145 und PC-3 nach, wobei in der metastatischen Zelllinie DU145 eine besonders hohe Überexpression im Vergleich zur nicht-metastatischen Zelllinie PC-3 und insbesondere im Vergleich zum Normalgewebe vorlag. Die Autoren folgerten daraus, dass ein Zusammenhang zwischen der Axl-Gen-Überexpression und der Tumorgenese sowie dem metastatischen Potential der Tumorzellen vorliegen könnte [Jacob 1999]. Sainaghi et al. beobachteten eine mitogene Funktion des Gas6/Axl-Signalwegs in DU145 und PC-3-Zelllinien, wobei die Stimulation der Zellproliferation in den stärker Axl-überexprimierenden DU145-Zellen am größten war, und folgerten daraus eine Bedeutung der Axl-Expression für die Aggressivität von Prostataatumoren [Sainaghi 2005].

Ähnlich wie für Axl war auch für Gas6 eine signifikant stärkere Expression im Prostatakarzinom, verglichen mit dem korrespondierenden normalen sekretorischen Epithel ($p = 0,001$), nachweisbar. Dabei betrug die Gas6-Expression im Tumor im Mittel das 1,28-fache der Expression im normalen sekretorischen Epithel. Die Gas6-Überexpression erwies sich in der univariaten Kaplan-Meier-Analyse jedoch nicht als prognostisch relevant ($p = 0,388$). Daher wurde auch auf eine multivariate Analyse verzichtet.

Interessanterweise konnte eine signifikante Überexpression von Axl und Gas6 beim Vergleich mit dem normalen sekretorischen Epithel nicht nur im Prostatakarzinom, sondern auch in der präneoplastischen HG-PIN nachgewiesen werden. So war Axl in 84,1% der Fälle in der HG-PIN signifikant stärker exprimiert als im korrespondierenden Normalgewebe ($p < 0,001$). Für Gas6 lag eine Überexpression in der HG-PIN im Vergleich zum normalen sekretorischen Epithel in 52,5% der Fälle ($p < 0,001$) vor. Sowohl für Axl als auch für Gas6 waren die

semiquantitativ bestimmten Expressionsstärken in der HG-PIN jeweils ähnlich hoch wie im Prostatakarzinom. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine Überexpression von Axl und Gas6 bereits in einem frühen Stadium der Tumorentstehung zu finden ist und dieses Signalsystem daher von Bedeutung für die Entwicklung des Prostatakarzinoms sein könnte. Eine solche maligne Transformation wurde bereits in anderen Axl-überexprimierenden Zelltypen beobachtet. So zeigten O'Bryan et al., dass die Transfektion von NIH3T3-Fibroblasten mit Axl-cDNA zur malignen Entartung dieser Zellen führt [O'Bryan 1991]. McCloskey et al. beobachteten eine maligne Transformation von 32D-Zellen unter Stimulation von Axl [McCloskey 1994].

Die molekularen Mechanismen, die die Transkription von Axl regulieren und somit für die über Axl vermittelte Karzinogenese bzw. Tumorprogression relevant sein könnten, erscheinen sehr vielfältig und komplex und sind bislang in bestimmten Malignomen nur teilweise entschlüsselt. Mudduluru et al. konnten in verschiedenen Studien einige Regulationsmechanismen der Axl-Expression identifizieren: Im Jahr 2008 deckten sie eine Regulation der Axl-Genexpression über die Zinkfingerproteine Sp1 und Sp3 aus der Familie der Sp-Transkriptionsfaktoren und über die Methylierung von CpG (Cytosin-phosphatidyl-Guanin)-Inseln auf [Mudduluru 2008]. Des Weiteren fanden sie heraus, dass MZF1 (myeloid zinc finger 1), ein Zinkfinger-Transkriptionsfaktor aus der SCAN-domain-Familie, an den Axl-Promotor bindet und auf diese Weise dosisabhängig die Axl-mRNA- und Proteinexpression stimuliert, was in dieser Studie zur Invasion und Metastasenbildung bei Kolon- und Zervixkarzinomen führte [Mudduluru 2010]. Eine inverse Korrelation konnte zwischen der Axl-Expression und den spezifischen mikroRNAs (miRNAs) miR-34a und miR-199a/b, die an der 3'UTR (untranslated region) des Axl-Gens ansetzen, nachgewiesen werden [Mudduluru 2011]. Im Blasenkarzinom wird die Transkription von Axl direkt durch Fra-1 (Fos-related antigen 1) aus der Fos-Familie hochreguliert und hat auf diese Weise Einfluss auf die Motilität der Tumorzellen des Blasenkarzinoms [Sayan 2011]. Im Mammakarzinom konnte eine Induktion der Axl-Expression über Vimentin, ein Typ3-Intermediärfilament aus der Gruppe der Desmine, nachgewiesen werden, was für die Zellmigration von Bedeutung zu sein scheint [Vuoriluoto 2011].

Intrazellulär führt die Gas6/Axl-Interaktion zur Aktivierung unterschiedlicher Signalwege. Bekannt ist eine Aktivierung der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K), der Src-Tyrosinkinase, der Extracellular signal-regulated Kinase (ERK), der C-Jun N-terminalen Kinase (JNK) und der p38 mitogen-activated protein Kinase (p38 MAPK) [Goruppi 1997, Goruppi 1999]. Das Onkoprotein Ras, welches im Rahmen des ERK-Signalwegs aktiviert wird, scheint im

Rahmen der Gas6-induzierten Mitogenese eine wichtige Rolle zu spielen, ist jedoch für das Gas6-vermittelte Zellüberleben nicht erforderlich [Goruppi 1999]. Die genannten „downstream targets“ des Axl-Signalwegs sind in die Regulation verschiedener Transkriptionsfaktoren involviert. Es ist daher denkbar, dass Gas6 und/oder Axl im Rahmen der Tumorentstehung die Transkription bestimmter Onkogene induzieren bzw. die Transkription bestimmter Tumorsuppressorgene inhibieren und so schließlich zur malignen Entartung der Zellen beitragen.

In diesem Kontext ist auch interessant, dass in der vorliegenden Arbeit signifikante Korrelationen einerseits zwischen der Expression von Axl und Tiam1 ($p = 0,023$) und andererseits zwischen der Expression von Gas6 und Rac ($p = 0,017$) im Prostatakarzinom nachgewiesen wurden. Rac ist eine Rho-ähnliche GTPase, von der drei Isoformen bekannt sind, die in die Regulation des Aktin-Zytoskeletts und in die onkogene Transformation von Zellen involviert sind. Tiam1 ist ein Guaninnukleotid-Austauschfaktor, der die GTPase Rac spezifisch aktiviert, indem er die GDP-Abspaltung katalysiert, so dass GTP binden kann. Der Tiam1/Rac-Signalweg spielt eine wichtige Rolle bei der Onkogenese sowie bei der Zellmigration, -invasion und Metastasierung [Strumane 2006]. Engers et al. wiesen eine signifikante Überexpression von Tiam1 und Rac sowohl in der HG-PIN als auch im Prostatakarzinom nach und zeigten, dass sowohl eine starke Überexpression von Tiam1 als auch die Überexpression von Rac jeweils mit einem signifikant verkürzten rezidivfreien Überleben der Patienten assoziiert war [Engers 2006, Engers 2007]. Goruppi et al. berichteten bereits im Jahr 1999 über eine Beteiligung von Rac und Rho, einer weiteren GTPase aus der Rho-Familie, bei dem von Gas6 gesteuerten Überleben von NIH3T3-Zellen unter Serumangelbedingungen [Goruppi 1999]. Eine Aktivierung von Rac über Gas6 wird auch in GnRH(Gonadotropin-Releasing-Hormone)-Neuronen sowie in Mikroglia beschrieben [Allen 2002, Grommes 2008]. Über eine mögliche Beziehung zwischen dem Gas6/Axl-Signalweg und dem Tiam1/Rac-Signalweg ist bislang nichts bekannt. Interessanterweise werden jedoch bei der Tiam1/Rac-Interaktion z.T. dieselben Signalwege aktiviert wie bei der Gas6/Axl-Signalkaskade, darunter die „downstream targets“ p38 MAPK, JNK und ERK [Frost 1996]. Außerdem gibt es funktionelle Überschneidungen der beiden Signalwege, da sowohl der Tiam1/Rac-Signalweg als auch der Gas6/Axl-Signalweg eine bedeutende Rolle bei der Tumorentstehung und -metastasierung wie auch bei der Regulation der Zellmigration und -invasion spielen. Auch vor diesem Hintergrund erscheint eine Interaktion beider Signalwege durchaus möglich. Die Korrelationen mit Rac und Tiam1 könnten somit Hinweise auf weitere molekulare Mechanismen und funktionelle Implikationen des Gas6/Axl-Signalwegs liefern,

die für die Tumorentstehung und –progression von Bedeutung sein könnten. Zur weiteren Aufklärung dieser Zusammenhänge sind weiterführende Untersuchungen auf Molekularebene erforderlich. Die Überexpression von Gas6 und Axl sowohl in der HG-PIN als auch im Prostatakarzinom könnte neue therapeutische Möglichkeiten im Sinne einer „targeted therapy“ eröffnen. So wiesen Vajkoczy et al. eine Axl-Überexpression in humanen Gliom-Zelllinien nach und entdeckten, dass eine experimentelle Inhibition von Axl durch Überexpression einer dominant-negativen Axl-Rezeptor-Mutante bei Mäusen das Gliom-Wachstum und die Invasion unterdrückte und das Überleben der Tiere verlängerte [Vajkoczy 2006]. Ähnliches beobachteten Zhang et al. an Brustkrebszellen, deren Motilität und Invasivität nach Blockade des Axl-Signalwegs durch eine dominant-negative Axl-Rezeptor-Mutante bzw. durch short hairpin RNA knockdown deutlich abnahm [Zhang 2008]. Li et al. konnten nachweisen, dass eine Inhibition der Axl-Expression mittels RNA-Interferenz oder Blockade des Axl-Rezeptors mittels monoklonaler Antikörper die pulmonale Metastasierung des Mammakarzinoms verhindert. Des weiteren ergaben sich deutliche Hinweise, dass eine Axl-Blockade nicht nur die Tumorzellen selbst, sondern über die Modulation der Vaskularisierung und Immunzellfunktionen auch die Zellen des umgebenden Stromas beeinflusst [Li 2009, Ye 2010]. So kann auch der therapeutische Effekt von anti-VEGF-Antikörpern, EGFR small-molecule Inhibitoren und Chemotherapeutika durch eine Axl-Blockade verstärkt werden [Ye 2010].

Demzufolge stellt Axl ein vielversprechendes therapeutisches Target zur Behandlung von Krebserkrankungen dar. Eine Inhibition des Axl-Signalwegs könnte auf unterschiedliche Art und Weise erfolgen. Zum einen ist die bereits erwähnte Blockade mittels spezifischer inhibitorischer Antikörper möglich. Bei der Behandlung von GIST-Tumoren (gastrointestinale Stromatumoren) ist die Behandlung mit Imatinib, einem spezifischen Inhibitor der in GIST-Tumoren überexprimierten KIT-Rezeptortyrosinkinase, seit Jahren etabliert und wirkt sich positiv auf die Prognose der Patienten aus [Din 2008]. Auch bei der Behandlung von HER2/neu-positivem Brustkrebs ist die Anwendung von Herceptin (Trastuzumab), einem monoklonalen Antikörper gegen den HER2/neu-Rezeptor, seit Jahren fester Therapiebestandteil. Da die Struktur der Axl-Tyrosinkinase bekannt ist, sollte auch die Herstellung solcher Axl-spezifischer Antikörper möglich sein. Zum anderen ist eine Unterbrechung der Signalkaskade mit Hilfe von kleinmolekularen Tyrosinkinase-Rezeptor-Inhibitoren, die die intrazelluläre RTK-Domäne angreifen, denkbar. Ein Beispiel hierfür sind die von Zhang et al. beschriebenen 3-Quinolinecarbonitril Substanzen, die die Axl-Autophosphorylierung hemmen, was bei invasiven Brustkrebszellen zu einer Abnahme der

Motilität und Invasivität führte [Zhang 2008]. Zu diesen gehören NA80x1 und SKI-606, die allerdings nicht nur Axl, sondern auch die Src/Abl-Kinase und multiple weitere Kinasen hemmen [Zhang 2008]. Auch ein Transfer von Genen, die für eine Rezeptor-Mutante kodieren, könnte eine Option für die Zukunft sein. Da der Axl-Signalweg jedoch komplex ist und eine Aktivierung des Signalwegs z.B. auch indirekt über den Interleukinrezeptor 15 α stattfinden kann, erscheint mitunter eine Kombination dieser unterschiedlichen Methoden sinnvoll, um sämtliche Aktivierungswege auszuschalten [Vajkoczy 2006, Zhang 2008].

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Studie, dass Axl und Gas6 sowohl im Prostatakarzinom als auch in der präneoplastischen HG-PIN signifikant überexprimiert sind. Die Axl-Überexpression im Tumor war in Hinblick auf das rezidivfreie Überleben von Prostatakarzinompatienten in der univariaten Analyse grenzwertig signifikant, was sich in der multivariaten Analyse jedoch nicht bestätigen ließ, so dass hier eine Untersuchung an größeren Fallzahlen sinnvoll wäre. Die Gas6-Überexpression erwies sich als prognostisch nicht relevant. Die Korrelation der Axl-Überexpression mit dem Auftreten eines Krankheitsrezidivs, einem hohen pT-Stadium und einem hohen Gleason Score weist auf eine höhere Aggressivität Axl-überexprimierender Prostatakarzinome hin. Aufgrund ihrer Überexpression im Prostatakarzinom könnten Gas6 und Axl als potentielle Targets für neue therapeutische Ansätze in Betracht kommen. Die Tatsache, dass Gas6 und Axl nicht nur im Prostatakarzinom, sondern auch in der präneoplastischen HG-PIN signifikant überexprimiert sind, könnte auf eine Bedeutung des Signalsystems für die Entstehung des Prostatakarzinoms hinweisen. Vor diesem Hintergrund sind die beobachteten Korrelationen der Überexpression von Axl und Tiam1 sowie Gas6 und Rac interessant, die auf eine Vernetzung des Gas6/Axl-Signalwegs mit dem Tiam1/Rac-Signalweg hindeuten könnten, der ebenfalls eine Rolle bei der Onkogenese sowie der Zellmigration, -invasion und Metastasierung spielt. Dies zu klären muss jedoch weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

5 Zusammenfassung

Der Tyrosinkinaserzeptor Axl und sein Ligand Gas6 spielen eine wichtige Rolle bei der Tumorentstehung sowie bei der Regulation von Zellproliferation, Migration, Adhäsion und Apoptose. Über die Expression und prognostische Relevanz des Gas6/Axl-Signalwegs im Prostatakarzinom ist jedoch bislang nur sehr wenig bekannt. In der vorliegenden Arbeit wurden diese Aspekte daher anhand einer repräsentativen Kohorte von 89 R0-resezierten Prostatakarzinompatienten untersucht. Zunächst wurde die Expression von Gas6 und Axl im Prostatakarzinom, in der präneoplastischen HG-PIN und im korrespondierenden benignen sekretorischen Epithel mittels semiquantitativer Immunhistochemie bestimmt. Dabei ergab sich für Axl und Gas6 eine signifikante Überexpression sowohl in der HG-PIN (jeweils $p < 0,001$) als auch im Prostatakarzinom ($p < 0,001$ für Axl, $p = 0,001$ für Gas6) im Vergleich zum normalen sekretorischen Epithel. Die Überexpression von Axl korrelierte signifikant mit dem Auftreten eines Tumorrezidivs ($p = 0,048$), einem hohen pT-Stadium ($p = 0,008$) und einem hohen Gleason Score ($p = 0,004$). Des Weiteren ergab sich eine signifikante Korrelation der Axl-Überexpression mit Tiam1 ($p = 0,023$), dem spezifischen Aktivator der Rho-ähnlichen GTPase Rac, deren Überexpression selbst wiederum signifikant mit der Überexpression von Gas6 im Prostatakarzinom korrelierte ($p = 0,017$). In der univariaten Analyse war die Axl-Überexpression im Hinblick auf die Krankheitsprognose, gemessen am rezidivfreien Überleben der Patienten, grenzwertig signifikant ($p = 0,050$). In der multivariaten Analyse, in der alle bislang etablierten prognostisch relevanten Parameter eingeschlossen waren, erwies sich die Axl-Überexpression jedoch nicht als unabhängiger prognostischer Parameter für das rezidivfreie Überleben der Patienten, sodass Untersuchungen an größeren Kohorten notwendig sind. Die prognostische Aussagekraft der Überexpression von Gas6 im Prostatakarzinom war statistisch nicht signifikant.

Die vorliegenden Daten zeigen, dass Axl und Gas6 im Prostatakarzinom signifikant überexprimiert sind und diese Überexpression bereits in einem frühen Stadium der Prostatakarzinomentstehung auftritt. Diese Ergebnisse könnten möglicherweise neue Therapieoptionen im Rahmen einer sog. „targeted therapy“ eröffnen. Die Korrelationen mit wichtigen klinisch-pathologischen Parametern weisen auf eine höhere Aggressivität Axl-exprimierender Tumoren hin. Die Korrelationen zwischen der Überexpression von Axl und Tiam1 sowie von Gas6 und Rac könnten neue Einblicke in die molekularen Mechanismen und funktionellen Implikationen des Gas6/Axl-Signalwegs liefern.

6 Literaturverzeichnis

Allen MP, Linseman DA, Udo H, Xu M, Schaack JB, Varnum B, Kandel ER, Heidenreich KA, Wierman ME (2002) Novel mechanism for gonadotropin-releasing hormone neuronal migration involving Gas6/Ark signaling to p38 mitogen-activated protein kinase. *Mol Cell Biol.* 22(2):599-613.

Angelillo-Scherrer A, Burnier L, Flores N, Savi P, DeMol M, Schaeffer P, Herbert JM, Lemke G, Goff SP, Matsushima GK, Earp HS, Vesin C, Hoylaerts MF, Plaisance S, Collen D, Conway EM, Wehrle-Haller B, Carmeliet P (2005) Role of Gas6 receptors in platelet signaling during thrombus stabilization and implications for antithrombotic therapy. *J Clin Invest.* 115(2):237-246.

Ayala AG, Ro JY, Babaian R, Troncoso P, Grignon DJ (1989) The prostatic capsule: does it exist? Its importance in the staging and treatment of prostatic carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 13(1):21-27.

Baquet CR, Horm JW, Gibbs T, Greenwald P (1991) Socioeconomic factors and cancer incidence among blacks and whites. *J Natl Cancer Inst.* 83(8):551-557.

Barmoshe S, Zlotta AR (2006) Pharmacotherapy for prostate cancer, with emphasis on hormonal treatments. *Expert Opin Pharmacother.* 7(13):1685-1699.

Bellosta P, Zhang Q, Goff SP, Basilico C (1997) Signaling through the ARK tyrosine kinase receptor protects from apoptosis in the absence of growth stimulation. *Oncogene.* 15(20):2387-2397.

Benninghoff A, Drenckhahn D (2003) Anatomie. 16. Auflage, Bd. 1: Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie. Urban & Fischer Verlag, München. 824-827.

Bostwick DG, Brawer MK (1987) Prostatic intraepithelial neoplasia and early invasion in prostate cancer. *Cancer.* 59(4):788-794.

Bostwick DG (1992) Prostatic intraepithelial neoplasia (PIN): current concepts. *J Cell Biochem Suppl.* 16H:10-19.

Bostwick DG (1994) Grading prostate cancer. *Am J Clin Pathol.* 102(4 Suppl 1):38-56.

Bostwick DG, Grignon DJ, Hammond ME, Amin MB, Cohen M, Crawford D, Gospodarowicz M, Kaplan RS, Miller DS, Montironi R, Pajak TF, Pollack A, Srigley JR, Yarbrow JW (2000) Prognostic factors in prostate cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med.* 124(7):995-1000.

Böcker W, Denk H, Heitz PU (2001) Pathologie. 2. Auflage. Urban & Fischer Verlag, München. 834-838.

Budagian V, Bulanova E, Orinska Z, Thon L, Mamat U, Bellosta P, Basilico C, Adam D, Paus R, Bulfone-Paus S (2005) A promiscuous liaison between IL-15 receptor and Axl receptor tyrosine kinase in cell death control. *EMBO J.* 24(24):4260-4270.

Burchert A, Attar EC, McCloskey P, Fridell YW, Liu ET (1998) Determinants for transformation induced by the Axl receptor tyrosine kinase. *Oncogene*. 16(24):3177-3187.

Catalona WJ, Richie JP, Ahmann FR, Hudson MA, Scardino PT, Flanigan RC, deKernion JB, Ratliff TL, Kavoussi LR, Dalkin BL, et al. (1994) Comparison of digital rectal examination and serum prostate specific antigen in the early detection of prostate cancer: results of a multicenter clinical trial of 6,630 men. *J Urol*. 151(5):1283-1290.

Chan JM, Gann PH, Giovannucci EL (2005) Role of diet in prostate cancer development and progression. *J Clin Oncol*. 23(32):8152-8160.

Chung BI, Malkowicz SB, Nguyen TB, Libertino JA, McGarvey TW (2003) Expression of the proto-oncogene Axl in renal cell carcinoma. *DNA Cell Biol*. 22(8):533-540.

Cook LS, Goldoft M, Schwartz SM, Weiss NS (1999) Incidence of adenocarcinoma of the prostate in Asian immigrants to the United States and their descendants. *J Urol*. 161(1): 152-155.

Craven RJ, Xu LH, Weiner TM, Fridell YW, Dent GA, Srivastava S, Varnum B, Liu ET, Cance WG (1995) Receptor tyrosine kinases expressed in metastatic colon cancer. *Int J Cancer*. 60(6):791-797.

Dagnelie PC, Schuurman AG, Goldbohm RA, Van den Brandt PA (2004) Diet, anthropometric measures and prostate cancer risk: a review of prospective cohort and intervention studies. *BJU Int*. 93(8):1139-1150.

De Angelis G, Rittenhouse HG, Mikolajczyk SD, Blair Shamel L, Semjonow A (2007) Twenty Years of PSA: From Prostate Antigen to Tumor Marker. *Rev Urol*. 9(3):113-123.

Demarchi F, Verardo R, Varnum B, Brancolini C, Schneider C (2001) Gas6 anti-apoptotic signaling requires NF-kappa B activation. *J Biol Chem*. 276(34):31738-31744.

De Marzo AM, Putzi MJ, Nelson WG (2001) New concepts in the pathology of prostatic epithelial carcinogenesis. *Urology*. 57(4 Suppl 1):103-114.

DGU / Deutsche Gesellschaft für Urologie e.V. (2009) Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms. Version 1.03. Düsseldorf. [Online im Internet] URL: http://www.urologenportal.de/fileadmin/MDB/PDF/S3_LL_PCa_-110331_Version1.03.pdf [Stand: 03.01.2012].

Dhom G (1983) Epidemiologic aspects of latent and clinically manifest carcinoma of the prostate. *J Cancer Res Clin Oncol*. 106(3):210-218.

Din OS, Woll PJ (2008) Treatment of gastrointestinal stromal tumor: focus on imatinib mesylate. *Ther Clin Risk Manag*. 4(1):149-162.

Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA (2004) Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs (WHO Classification of Tumours). IARC press, Lyon. 160.

- Engers R, Mueller M, Walter A, Collard JG, Willers R, Gabbert HE (2006) Prognostic relevance of Tiam1 protein expression in prostate carcinomas. *Br J Cancer*. 95(8):1081-1086.
- Engers R, Ziegler S, Mueller M, Walter A, Willers R, Gabbert HE (2007) Prognostic relevance of increased Rac GTPase expression in prostate carcinomas. *Endocr Relat Cancer*. 14(2):245-256.
- Epstein JI, Allsbrook WC Jr, Amin MB, Egevad LL; ISUP Grading Committee (2005): The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 29(9):1228-1242.
- Epstein JI (2010): An update of the Gleason grading system. *J Urol*. 183(2):433-440.
- Etzioni R, Penson DF, Legler JM, di Tommaso D, Boer R, Gann PH, Feuer EJ (2002) Overdiagnosis due to prostate-specific antigen screening: lessons from U.S. prostate cancer incidence trends. *J Natl Cancer Inst*. 94(13):981-990.
- Flanigan RC, Catalona, WJ, Richie JP, Ahmann FR, Hudson MA, Scardino PT, deKernion JB, Ratliff TL, Kavoussi LR, Dalkin BL, et al. (1994) Accuracy of digital rectal examination and transrectal ultrasonography in localizing prostate cancer. *J Urol*. 152(5 Pt 1):1506-1509.
- Foley R, Hollywood D, Lawler M (2004) Molecular pathology of prostate cancer: the key to identifying new biomarkers of disease. *Endocr Relat Cancer*. 11(3):477-488.
- Fridell YW, Villa J Jr, Attar EC, Liu ET (1998) Gas6 induces Axl-mediated chemotaxis of vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 273(12):7123-7126.
- Frost JA, Xu S, Hutchison MR, Marcus S, Cobb MH (1996) Actions of Rho family small G proteins and p21-activated protein kinases on mitogen-activated protein kinase family members. *Mol Cell Biol*. 16(7):3707-3713.
- Galsky MD, Vogelzang NJ (2010) Docetaxel-based combination therapy for castration-resistant prostate cancer. *Ann Oncol*. 21(11):2135-2144.
- Gann PH, Hennekens CH, Ma J, Longcope C, Stampfer MJ (1996) Prospective study of sex hormone levels and risk of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst*. 88(16):1118-1126.
- Giovannucci E, Rimm EB, Colditz GA, Stampfer MJ, Ascherio A, Chute CC, Willett WC (1993) A prospective study of dietary fat and risk of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst*. 85(19):1571-1579.
- Giovannucci E, Ascherio A, Rimm EB, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC (1995) Intake of carotenoids and retinol in relation to risk of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst*. 87(23):1767-1776.
- Godowski PJ, Mark MR, Chen J, Sadick MD, Raab H, Hammonds RG (1995) Reevaluation of the roles of protein S and Gas6 as ligands for the receptor tyrosine kinase Rse/Tyro3. *Cell*. 82(3):355-358.

Goruppi S, Ruaro E, Schneider C (1996) Gas6, the ligand of Axl tyrosine kinase receptor, has mitogenic and survival activities for serum starved NIH3T3 fibroblasts. *Oncogene*. 12(3):471-480.

Goruppi S, Ruaro E, Varnum B, Schneider C (1997) Requirement of phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway and Src for Gas6-Axl mitogenic and survival activities in NIH3T3 fibroblasts. *Mol Cell Biol*. 17(8):4442-4453.

Goruppi S, Ruaro E, Varnum B, Schneider C (1999) Gas6-mediated survival in NIH3T3 cells activates stress signalling cascade and is independent of Ras. *Oncogene*. 18(29):4224-4236.

Gosselaar C, Roobol MJ, Roemeling S, Schröder FH (2008) The role of the digital rectal examination in subsequent screening visits in the European randomized study of screening for prostate cancer (ERSPC), Rotterdam. *Eur Urol*. 54(3):581-588.

Grommes C, Lee CY, Wilkinson BL, Jiang Q, Koenigsknecht-Talboo JL, Varnum B, Landreth GE (2008) Regulation of microglial phagocytosis and inflammatory gene expression by Gas6 acting on the Axl/Mer family of tyrosine kinases. *J Neuroimmune Pharmacol*. 3(2):130-140.

Hafizi S, Dahlbäck B (2006) Gas6 and protein S. Vitamin K-dependent ligands for the Axl receptor tyrosine kinase subfamily. *FEBS J*. 273(23):5231-5244.

Hautmann R, Huland H (2006) *Urologie*. 3. Auflage. Springer Medizin Verlag, Heidelberg.
a) 17-19
b) 229-241

Heidenreich A, Ohlmann CH, Polyakov S (2007) Anatomical extent of pelvic lymphadenectomy in patients undergoing radical prostatectomy. *Eur Urol*. 52(1):29-37.

Heidenreich A, Aus G, Bolla M, Joniau S, Matveev VB, Schmid HP, Zattoni F (2008) European Association of Urology: EAU guidelines on prostate cancer. *Eur Urol*. 53(1):68-80.

Helpap B, Egevad L (2006) The significance of modified Gleason grading of prostatic carcinoma in biopsy and radical prostatectomy specimens. *Virchows Arch*. 449(6):622-627.

Hofstetter, Alfons (2004) *Prostatkarzinom: Fortschritte in Diagnostik und Therapie. Basiswissen Praxis*. Urban & Vogel Medien und Medizin-Verlagsgesellschaft GmbH & Co. KG, München. 36-41.

Hotte SJ, Saad F (2010) Current management of castrate-resistant prostate cancer. *Curr Oncol*. 17 Suppl 2:72-79.

Humphrey PA (2004) Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate. *Mod Pathol*. 17(3):292-306.

Hutterer M, Knyazev P, Abate A, Reschke M, Maier H, Stefanova N, Knyazeva T, Barbieri V, Reindl M, Muigg A, Kostron H, Stockhammer G, Ullrich A (2008) Axl and growth arrest-specific gene 6 are frequently overexpressed in human gliomas and predict poor prognosis in patients with glioblastoma multiforme. *Clin Cancer Res*. 14(1):130-138.

- Ito T, Ito M, Naito S, Ohtsuru A, Nagayama Y, Kanematsu T, Yamashita S, Sekine I (1999) Expression of the Axl receptor tyrosine kinase in human thyroid carcinoma. *Thyroid*. 9(6):563-567.
- Jacob AN, Kalapurakal J, Davidson WR, Kandpal G, Dunson N, Prashar Y, Kandpal RP (1999) A receptor tyrosine kinase, UFO/Axl, and other genes isolated by a modified differential display PCR are overexpressed in metastatic prostatic carcinoma cell line DU145. *Cancer Detect Prev*. 23(4):325-332.
- Janssen JW, Schulz AS, Steenvoorden AC, Schmidberger M, Strehl S, Ambros PF, Bartram CR (1991) A novel putative tyrosine kinase receptor with oncogenic potential. *Oncogene*. 6(11):2113-2120.
- Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ (2008). Cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 58(2):71-96.
- Jocham D, Miller K (2007) *Praxis der Urologie*. 3. Auflage, Bd.2. Thieme Verlag, Stuttgart. 128-189.
- Johnson DE, Lanieri JP Jr, Ayala AG (1972) Prostatic adenocarcinoma occurring in men under 50 years of age. *J Surg Oncol*. 4(3):207-216.
- Joniau S, Van Poppel H (2008) Localized prostate cancer: can we better define who is at risk of unfavourable outcome? *BJU Int*. 101 Suppl 2:5-10.
- Kehinde EO, Maghrebi MA, Anim JT (2008) The importance of determining the aggressiveness of prostate cancer using serum and tissue molecular markers. *Can J Urol*. 15(2):3967-3974.
- Kerr LA, Zincke H (1994) Radical retropubic prostatectomy for prostate cancer in the elderly and the young: complications and prognosis. *Eur Urol*. 25(4):305-311.
- Klein EA, Silverman R (2008) Inflammation, infection, and prostate cancer. *Curr Opin Urol*. 18(3):315-319.
- Li R, Chen J, Hammonds G, Phillips H, Armanini M, Wood P, Bunge R, Godowski PJ, Sliwkowski MX, Mather JP (1996) Identification of Gas6 as a growth factor for human Schwann cells. *J Neurosci*. 16(6):2012-2019.
- Li Y, Ye X, Tan C, Hongo JA, Zha J, Liu J, Kallop D, Ludlam MJ, Pei L (2009) Axl as a potential therapeutic target in cancer: role of Axl in tumor growth, metastasis and angiogenesis. *Oncogene*. 28(39):3442-3455.
- Linger RM, Keating AK, Earp HS, Graham DK (2008) TAM receptor tyrosine kinases: biologic functions, signaling and potential therapeutic targeting in human cancer. *Adv Cancer Res*. 100:35-83.
- Lotan TL, Epstein JI (2010) Clinical implications of changing definitions within the Gleason grading system. *Nat Rev Urol*. 7(3):136-142.

- Manfioletti G, Brancolini C, Avanzi G, Schneider C (1993) The protein encoded by a growth arrest-specific gene (gas6) is a new member of the vitamin K-dependent proteins related to protein S, a negative coregulator in the blood coagulation cascade. *Mol Cell Biol.* 13(8):4976-4985.
- McCloskey P, Pierce J, Koski RA, Varnum B, Liu ET (1994) Activation of the Axl receptor tyrosine kinase induces mitogenesis and transformation in 32D cells. *Cell Growth Differ.* 5(10):1105-1117.
- McCloskey P, Fridell YW, Attar E, Villa J, Jin Y, Varnum B, Liu ET (1997) Gas6 mediates adhesion of cells expressing the receptor tyrosine kinase Axl. *J Biol Chem.* 272(37):23285-23291.
- McNeal JE (1981) The zonal anatomy of the prostate. *Prostate.* 2(1):35-49.
- Monda JM, Barry MJ, Oesterling JE (1994) Prostate specific antigen cannot distinguish stage T1a (A1) prostate cancer from benign prostatic hyperplasia. *J Urol.*151(5):1291-1295.
- Montironi R, Mazzucchelli R, Algaba F, Lopez-Beltran A (2000) Morphological identification of the patterns of prostatic intraepithelial neoplasia and their importance. *J Clin Pathol.* 53(9):655-665.
- Mostofi FK, Davis CJ Jr, Sesterhenn IA (1992) Pathology of carcinoma of the prostate. *Cancer.* 70(1 Suppl):235-253.
- Mudduluru G, Allgayer H (2008) The human receptor tyrosine kinase Axl gene – promoter characterization and regulation of constitutive expression by Sp1, Sp3 and CpG methylation. *Biosci Rep.* 28(3):161-176.
- Mudduluru G, Vajkoczy P, Allgayer H (2010) Myeloid zinc finger 1 induces migration, invasion and in vivo metastasis through Axl gene expression in solid cancer. *Mol Cancer Res.* 8(2):159-169.
- Mudduluru G, Ceppi P, Kumarswamy R, Scagliotti GV, Papotti M, Allgayer H (2011) Regulation of Axl receptor tyrosine kinase expression by miR-34a and miR-199a/b in solid cancer. *Oncogene.* 30(25):2888-2899.
- Nagata K, Ohashi K, Nakano T, Arita H, Zong C, Hanafusa H, Mizuno K (1996) Identification of the product of growth arrest-specific gene 6 as a common ligand for Axl, Sky and Mer receptor tyrosine kinases. *J Biol Chem.* 271(47):30022-30027.
- Narod S (1999) Genetic epidemiology of prostate cancer. *Biochim Biophys Acta.* 1423(1):1-13.
- O'Bryan JP, Frye RA, Cogswell PC, Neubauer A, Kitch B, Prokop C, Espinosa R 3rd, Le Beau MM, Earp HS, Liu ET (1991) Axl, a transforming gene isolated from primary human myeloid leukemia cells, encodes a novel receptor tyrosine kinase. *Mol Cell Biol.* 11(10):5016-5031.

Oesterling JE, Jacobsen SJ, Chute CG, Guess HA, Girman CJ, Panser LA, Lieber MM (1993) Serum prostate-specific antigen in a community-based population of healthy men. Establishment of age-specific reference ranges. *JAMA*. 270(7):860-864.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P (2005) Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*. 55(2):74-108.

Petrylak DP, Tangen CM, Hussain MH, Lara PN Jr, Jones JA, Taplin ME, Burch PA, Berry D, Moinpour C, Kohli M, Benson MC, Small EJ, Raghavan D, Crawford ED (2004) Docetaxel and estramustine compared with mitoxantrone and prednisone for advanced refractory prostate cancer. *N Engl J Med*. 351(15):1513-1520.

Pienta KJ, Esper PS (1993) Risk factors for prostate cancer. *Ann Intern Med*. 118(10):793-803.

Quong RY, Bickford ST, Ing YL, Terman B, Herlyn M, Lassam NJ (1994) Protein kinases in normal and transformed melanocytes. *Melanoma Res*. 4(5):313-319.

Riede UN, Werner M, Schäfer HE (2004) *Allgemeine und spezielle Pathologie*. 5. Auflage. Thieme Verlag, Stuttgart. 933-935.

Robert Koch-Institut (RKI) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (2008) *Krebs in Deutschland 2003 – 2004, Häufigkeiten und Trends*. 6. Auflage, Berlin. [Online im Internet] URL: <http://www.ekr.med.uni-erlangen.de/GEKID/Doc/kid2008.pdf> [Stand: 05.01.2012].

Rochlitz C, Lohri A, Bacchi M, Schmidt M, Nagel S, Fopp M, Fey MF, Herrmann R, Neubauer A (1999) Axl expression is associated with adverse prognosis and with expression of Bcl-2 and CD34 in de novo acute myeloid leukemia (AML): results from a multicenter trial of the Swiss Group for Clinical Cancer Research (SAKK). *Leukemia*. 13(9):1352-1358.

Ross JS, Jennings TA, Nazeer T, Sheehan CE, Fisher HA, Kauffman RA, Anwar S, Kallakury BV (2003) Prognostic factors in prostate cancer. *Am J Clin Pathol*. 120 Suppl:85-100.

Sainaghi PP, Castello L, Bergamasco L, Galletti M, Bellosta P, Avanzi GC (2005) Gas6 induces proliferation in prostate carcinoma cell lines expressing the Axl receptor. *J Cell Physiol*. 204(1):36-44.

Sasaki T, Knyazev PG, Clout NJ, Cheburkin Y, Göhring W, Ullrich A, Timpl R, Hohenester E (2006) Structural basis for Gas6-Axl signalling. *EMBO J*. 25(1):80-87.

Sawabu T, Seno H, Kawashima T, Fukuda A, Uenoyama Y, Kawada M, Kanda N, Sekikawa A, Fukui H, Yanagita M, Yoshibayashi H, Satoh S, Sakai Y, Nakano T, Chiba T (2007) Growth arrest-specific gene 6 and Axl signaling enhances gastric cancer cell survival via Akt pathway. *Mol Carcinog*. 46(2):155-164.

Sayan AE, Stanford R, Vickery R, Grigorenko E, Diesch J, Kulbicki K, Edwards R, Pal R, Greaves P, Jariel-Encontre I, Piechaczyk M, Kriaievska M, Mellon JK, Dhillon AS, Tulchinsky E (2012) Fra-1 controls motility of bladder cancer cells via transcriptional upregulation of the receptor tyrosine kinase Axl. *Oncogene*. 31(12):1493-1503.

Schröder FH, van der Maas P, Beemsterboer P, Kruger AB, Hoedemaeker R, Rietbergen J, Kranse R (1998) Evaluation of the digital rectal examination as a screening test for prostate cancer. Rotterdam section of the European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer. *J Natl Cancer Inst.* 90(23):1817-1823.

Shieh YS, Lai CY, Kao YR, Shiah SG, Chu YW, Lee HS, Wu CW (2005) Expression of Axl in lung adenocarcinoma and correlation with tumor progression. *Neoplasia.* 7(12):1058-1064.

Shimizu H, Ross RK, Bernstein L, Yatani R, Henderson BE, Mack TM (1991) Cancers of the prostate and breast among Japanese and white immigrants in Los Angeles County. *Br J Cancer.* 63(6):963-966.

Shiozawa Y, Pedersen EA, Patel LR, Ziegler AM, Havens AM, Jung Y, Wang J, Zalucha S, Loberg RD, Pienta KJ, Taichman RS (2010) Gas6/Axl axis regulates prostate cancer invasion, proliferation and survival in the bone marrow niche. *Neoplasia.* 12(2):116-127.

Smith DS, Catalona WJ (1995) Interexaminer variability of digital rectal examination in detecting prostate cancer. *Urology.* 45(1):70-74.

Sökelland J, Schulze H, Rübber H (2004) *Urologie Verstehen-Lernen-Anwenden.* 13. Auflage. Thieme Verlag, Stuttgart.

a) 31

b) 301-314

Sonn GA, Aronson W, Litwin MS (2005) Impact of diet on prostate cancer: a review. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 8(4):304-310.

Steinberg GD, Carter BS, Beaty TH, Childs B, Walsh PC (1990) Family history and the risk of prostate cancer. *Prostate.* 17(4):337-347.

Stitt TN, Conn G, Gore M, Lai C, Bruno J, Radziejewski C, Mattsson K, Fisher J, Gies DR, Jones PF, et al. (1995) The anticoagulation factor protein S and its relative, Gas6, are ligands for the Tyro 3/Axl family of receptor tyrosine kinases. *Cell.* 80(4):661-670.

Strumane K, Rygiel TP, Collard JG (2006) The Rac activator Tiam1 and Ras-induced oncogenesis. *Methods Enzymol.* 407:269-281.

Sun WS, Fujimoto J, Tamaya T (2003) Coexpression of growth arrest-specific gene 6 and receptor tyrosine kinases Axl and Sky in human uterine endometrial cancers. *Ann Oncol.* 14(6):898-906.

Sun W, Fujimoto J, Tamaya T (2004) Coexpression of Gas6/Axl in human ovarian cancers. *Oncology.* 66(6):450-457.

Tannock IF, Osoba D, Stockler MR, Ernst DS, Neville AJ, Moore MJ, Armitage GR, Wilson JJ, Venner PM, Coppin CM, Murphy KC (1996) Chemotherapy with mitoxantrone plus prednisone or prednisone alone for symptomatic hormone-resistant prostate cancer: a Canadian randomized trial with palliative end points. *J Clin Oncol.* 14(6):1756-1764.

Tannock IF, de Wit R, Berry WR, Horti J, Pluzanska A, Chi KN, Oudard S, Théodore C, James ND, Turesson I, Rosenthal MA, Eisenberger MA; TAX 327 Investigators (2004) Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. *N Engl J Med.* 351(15):1502-1512.

Thompson IM, Ankerst DP, Chi C, Goodman PJ, Tangen CM, Lucia MS, Feng Z, Parnes HL, Coltman CA Jr (2006) Assessing prostate cancer risk: results from the Prostate Cancer Prevention Trial. *J Natl Cancer Inst.* 98(8):529-534.

Tominaga S (1985) Cancer incidence in Japanese in Japan, Hawaii, and western United States. *Natl Cancer Inst Monogr.* 69:83-92.

UICC / Wittekind C, Meyer HJ (2010) TNM-Klassifikation maligner Tumoren. 7. Auflage. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. 229-233.

Vajkoczy P, Knyazev P, Kunkel A, Capelle HH, Behrndt S, von Tengg-Kobligk H, Kiessling F, Eichelsbacher U, Essig M, Read TA, Erber R, Ullrich A (2006) Dominant-negative inhibition of the Axl receptor tyrosine kinase suppresses brain tumor cell growth and invasion and prolongs survival. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(15):5799-5804.

Varnum BC, Young C, Elliott G, Garcia A, Bartley TD, Fridell YW, Hunt RW, Trail G, Clogston C, Toso RJ, et al. (1995) Axl receptor tyrosine kinase stimulated by the vitamin K-dependent protein encoded by growth-arrest-specific gene 6. *Nature.* 373(6515):623-626.

Vij U, Kumar A (2004) Phyto-oestrogens and prostatic growth. *Natl Med J India.* 17(1):22-26.

Vuoriluoto K, Haugen H, Kiviluoto S, Mpindi JP, Nevo J, Gjerdrum C, Tiron C, Lorens JB, Ivaska J (2011) Vimentin regulates EMT induction by Slug and oncogenic H-Ras and migration by governing Axl expression in breast cancer. *Oncogene.* 30(12):1436-1448.

Wu CW, Li AF, Chi CW, Lai CH, Huang CL, Lo SS, Lui WY, Lin WC (2002) Clinical significance of AXL kinase family in gastric cancer. *Anticancer Res.* 22(2B):1071-1078.

Wu YM, Robinson DR, Kung HJ (2004) Signal pathways in up-regulation of chemokines by tyrosine kinase MER/NYK in prostate cancer cells. *Cancer Res.* 64(20):7311-7320.

Ye X, Li Y, Stawicki S, Couto S, Eastham-Anderson J, Kallop D, Weimer R, Wu Y, Pei L (2010) An anti-Axl monoclonal antibody attenuates xenograft tumor growth and enhances the effect of multiple anticancer therapies. *Oncogene.* 29(38):5254-5264.

Zhang YX, Knyazev PG, Cheburkin YV, Sharma K, Knyazev YP, Orfi L, Szabadkai I, Daub H, Kéri G, Ullrich A (2008) AXL is a potential target for therapeutic intervention in breast cancer progression. *Cancer Res.* 68(6):1905-1915.

7 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. R. Engers, für die Bereitstellung des Themas, die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten wie auch für die freundliche und konstruktive Begleitung während der Erarbeitung der Dissertation.

Herrn Prof. Dr. med. H.E. Gabbert danke ich für die mir gewährte Arbeitsmöglichkeit an seinem Institut.

Ich bedanke mich weiterhin bei Frau S. Schneeloch und Frau C. Feldhoff für die freundliche Unterstützung bei der Anfertigung und Färbung der Präparateschnitte.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie, die mich immer in jeder Hinsicht motiviert und unterstützt hat.

8 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist

28. Juni 2012, Elena Stenzel