

Aus der  
Universitätsklinik für Urologie Tübingen

**Heterogenität des multifokalen Prostatakarzinoms -  
Differentielle Darstellung von RANK und RANKL in  
Knochenmark, Serum sowie in den unterschiedlichen  
Tumorarealen multifokaler Prostatakarzinome mittels  
der Tissue microarray Technik**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**Kromer, Daniel Martin**

**2023**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. T. Todenhöfer

2. Berichterstatter: Professor Dr. S. Kommoss

Tag der Disputation: 25.10.2022

**Für meine Eltern.**

## Inhaltsverzeichnis

<b>I.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>13</b>
I.1.	Das Prostatakarzinom	13
I.1.1.	Epidemiologie	13
I.1.2.	Ätiologie	13
I.1.3.	Klinik	14
I.1.4.	Rolle von ossären Metastasen beim Prostatakarzinom	14
I.1.5.	Diagnostik	15
I.1.6.	Einteilung des Prostatakarzinoms	16
I.1.7.	Therapie des Prostatakarzinoms	19
I.1.8.	Prognose	22
I.2.	Das RANK/RANKL/OPG-System	23
I.2.1.	Der RANK/RANKL/OPG- <i>Pathway</i> im physiologischen Kontext	23
I.2.2.	RANKL	24
I.2.3.	RANK	24
I.2.4.	OPG	25
I.2.5.	RANK/RANKL/OPG- <i>Pathway</i> beim Prostatakarzinom	25
I.3.	Intertumorale und intratumorale Heterogenität des PCA	26
I.4.	Fragestellung	27
<b>II.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>29</b>
II.1.	Patientenkollektiv	29
II.1.1.	Studiengruppe	29
II.1.2.	Kontrollgruppe	29
II.1.3.	Ein- und Ausschlusskriterien für die Interventionsgruppe	30
II.1.4.	Ein- und Ausschlusskriterien für die Kontrollgruppe	31
II.2.	Rekrutierung und Ethikvotum	31
II.3.	Methoden	32
II.3.1.	Paraffiniertes Gewebe aus Routinebehandlungen	32
II.3.2.	Tissue Micro Array (TMA)-Technik	34
II.3.3.	Immunhistochemie	36

II.3.4. Mikroskopie	41
II.3.5. Scoring und semiquantitative Auswertung	42
II.3.6. Bestimmung von sRANKL und OPG im Serum	45
II.3.7. Bestimmung von sRANKL und OPG im Knochenmark	47
II.3.8. Weitere Serum-Marker	47
II.3.9. Statistische Auswertung	47
II.3.10. Datenschutz	49
II.3.11. Verwendete Software	49
<b>III. Ergebnisse</b>	<b>50</b>
III.1. Eigenschaften des Kollektivs	50
III.1.1. Studiengruppe	50
III.1.2. Kontrollgruppe	52
III.2. Ergebnisse der studienbedingten Untersuchungen	53
III.2.1. Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung	53
III.2.2. Studienbedingte Ergebnisse aus Knochenmark und Serum	60
III.3. Heterogenität der Tumorareale je Patient	65
III.3.1. Ergebnisse der arealweisen Auswertung für RANK	65
III.3.2. Ergebnisse der arealweisen Auswertung für RANKL	70
III.4. Korrelation der RANK- und RANKL-Expression im Tumor mit sRANKL- und OPG-Spiegeln aus Serum und Knochenmark	75
III.4.1. Übersicht über die Ergebnisse der statistischen Auswertung	75
III.4.2. Korrelation der RANKL-Expression im Tumorareal mit dem höchsten Gleason-Score mit Serum- Knochenmarks-OPG und-sRANKL	76
III.5. Korrelation von klinischen Parametern mit studienbedingten Ergebnissen aus dem Tumor	78
III.5.1. Korrelation des Tumorstadiums T mit Ergebnissen aus dem Tumor	78
III.5.2. Korrelation des Gleason-Scores mit studienbedingten Ergebnissen aus dem Tumor	79

<b><u>IV. Diskussion</u></b>	<b>81</b>
IV.1. Intention der vorliegenden Arbeit	81
IV.2. Zentrale Ergebnisse dieser Studie	82
IV.3. Expression von RANK und RANKL im Tumorgewebe – Biologie des Prostatakarzinoms	83
IV.4. Serumwerte von sRANKL und OPG als potenzielle Malignitätsparameter	84
IV.5. Heterogenität verschiedener Tumorareale – der Stellenwert der Indexläsion	85
IV.6. Veränderungen in den Kompartimenten Blut und Knochenmark beim lokalisierten Prostatakarzinom	88
IV.7. Zusammenhang der RANK- und RANKL-Expression im Tumor mit anderen klinischen Parametern	89
IV.8. Im Knochenmark disseminierte Tumorzellen als Malignitätsparameter	91
IV.9. Potentielle medikamentöse Intervention mit Denosumab	92
IV. 10. Limitationen der vorliegenden Arbeit	92
<b><u>V. Zusammenfassung</u></b>	<b>94</b>
<b><u>VI. Literaturverzeichnis</u></b>	<b>96</b>
<b><u>VII. Anhang</u></b>	<b>103</b>
VII.1. Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift	103
VII.2. Danksagung	104

## Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
<i>Aqua dest.</i>	<i>aqua destillata</i>
BMI	Body Mass Index
BPH	Benigne Prostatahyperplasie
Ca	Calcium
CRP	C-reaktives Protein
DAB	Diaminobenzidine
dl	Deziliter
DRU	Digital rektale Untersuchung
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FDCR-1	Follicular dendritic receptor 1
G	größtes Tumorareal
G2	zweitgrößtes Tumorareal
G3	drittgrößtes Tumorareal
g	Gramm
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
Hb	Hämoglobin
HDR	High-Dose-Rate
IRS	<i>immunoreactive score</i>
KM	Knochenmark
l	Liter
LDH	Laktatdehydrogenase
LDR	Low-Dose-Rate
M	Mol
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar

mmol	Millimol
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
OCIF	Osteoclastogenesis inhibitory factor
ODAR	Osteoclast differentiation and activation receptor
ODF	Osteoclast differentiation factor
OPG	Osteoprotegerin ligand
OPG	Osteoprotegerin
OPGL	Osteoprotegerin ligand
PCA	Prostatakarzinom
pg	Pikogramm
ph	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
PSA	Prostata spezifisches Antigen
RANK	receptor activator of nuclear factor kappa-B
RANKL	receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand
s.u.	siehe unten
SOFA	Stromal osteoclast-forming activity
TACE	TNF- $\alpha$ -converting enzyme like protease
TBST	Tris buffered Saline with Tween® 20
TMA	Tissue-Micro-Array
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFRSF-11A	TNF superfamily receptor 11 A
TNFSF-11	TNF superfamily 11
TNFRSF-11B	TNF superfamily receptor 11B
TNM	Tumor, Nodes, Metastasen
TR-1	TNF-receptor-like molecule 1
TRUS	Transrektaler Ultraschall
TUR-P	Transurethrale Resektion der Prostata



U

UICC

vs.

Unit

Union internationale contre le cancer

*versus*

## **Abbildungs- und Tabellenverzeichnis**

### **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Schematische Darstellung der fünf Gleason- Wachstumsmuster

Abbildung 2: Algorithmus für die Primärtherapie des PCA

Abbildung 3: RANK/RANKL/OPG pathway of osteoclastogenesis

Abbildung 4: Knochenmarkpunktion

Abbildung 5: Mapping einer Prostata mit eingezeichneten Tumorherden

Abbildung 6: Manual Tissue Arrayer MTA-1

Abbildung 7: Prinzip der indirekten Immunhistochemie

Abbildung 8: Abbildung Ergebnis: Objektträger mit 64 Gewebelockausschnitten in RANK-Färbung

Abbildung 9: Färbeergebnis der RANK-Färbung (Übersicht eines Gewebelockausschnitts), 25 x Vergrößerung

Abbildung 10: Färbeintensitäten der RANK-Färbung, 400 x Vergrößerung

Abbildung 11: Vergleich der RANK-Expression in der Kontrollgruppe im benigen angrenzenden Gewebe und im Tumor

Abbildung 12: Graphische Darstellung der RANK-Kernfärbungen in der Kontrollgruppe im angrenzenden benignen Gewebe und Tumorgewebe

Abbildung 13: Färbeergebnis der RANKL-Färbung, 25 x Vergrößerung

Abbildung 14: Färbeintensitäten der RANKL-Färbung, 400 x Vergrößerung

Abbildung 15: Vergleich der RANKL-Expression in Tumorarealen, im angrenzendem benignem Gewebe in tumortragenden Prostaten und aus BPH-Gewebe

Abbildung 16: Graphische Darstellung der RANKL-gefärbten Kerne unterteilt nach Tumorarealen, angrenzendem benignem Gewebe in tumortragenden Prostaten und aus BPH-Gewebe der Kontrollgruppe

Abbildung 17: Linearer Zusammenhang der RANK/RANKL Expression im Tumorgewebe

Abbildung 18: Linearer Zusammenhang der sRANKL-Konzentration ng/ml in Serum und Knochenmark von Tumorpatienten

Abbildung 19: Linearer Zusammenhang der OPG-Konzentration pg/ml in Serum und Knochenmark von Tumorpatienten

Abbildung 20: Vergleich der sRANKL-Serumkonzentration bei Patienten mit Prostatakarzinom und ohne Prostatakarzinom

Abbildung 21: Vergleich der OPG-Serumkonzentration bei Patienten mit Prostatakarzinom und ohne Prostatakarzinom

Abbildung 22: Vergleich der Ratio sRANKL/OPG bei Patienten mit Prostatakarzinom und ohne Prostatakarzinom

Abbildung 23: Häufigkeiten der höchsten RANK-Expression. Verteilung der Areale mit der höchsten RANK-Expression

Abbildung 24: Vergleich der Höhe der RANK-Expression je Höhe des Gleason-Score und im angrenzenden benignen Gewebe

Abbildung 25: Vergleich der Höhe der RANK-Expression nach Größe des Tumoreals und im angrenzenden benignen Gewebe

Abbildung 26: Unterschiedlichkeit der RANK-Expression in den verschiedenen Tumorealen, gruppiert nach der Höhe der jeweiligen Expression

Abbildung 27: Häufigkeiten der höchsten RANKL-Expression. Verteilung der Areale mit der höchsten RANKL-Expression

Abbildung 28: Vergleich der Höhe der RANKL-Expression je Höhe des Gleason-Score und im angrenzenden benignen Gewebe

Abbildung 29: Vergleich der Höhe der RANKL-Expression nach Größe des Tumoreals und im angrenzenden benignen Gewebe

Abbildung 30: Unterschiedlichkeit der RANKL-Expression in den verschiedenen Tumorealen, gruppiert nach der Höhe der jeweiligen Expression

Abbildung 31: Zusammenhang der OPG-Konzentration im Serum mit der RANKL-Expression im Tumoreal mit dem höchsten Gleason-Score

Abbildung 32: Zusammenhang der OPG-Konzentration im Knochenmark mit der RANKL-Expression im Tumoreal mit dem höchsten Gleason-Score

Abbildung 33: Vergleich der RANK-Expression im Tumorgewebe je nach initialem Gleason-Score

Abbildung 34: Vergleich der RANKL-Expression im Tumorgewebe je nach initialem Gleason-Score

Abbildung 35: Vergleich der RANK-Expression im größten Tumoreal nach initialem Gleason-Score

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: TNM-Klassifikation des Prostatakarzinoms nach UICC

Tabelle 2: Häufigkeiten der Tumorstadien T nach TNM-Klassifikation in der Studiengruppe

Tabelle 3: Darstellung von N, L, V und R nach TNM-Klassifikation

Tabelle 4: Häufigkeiten des Gleason-Score in der Studiengruppe

Tabelle 5: Klinische Daten und Daten aus dem Serum der Studiengruppe

Tabelle 6: Klinische Daten und Daten aus dem Serum der Kontrollgruppe

Tabelle 7: Darstellung der studienbedingt erhobenen Daten aus dem Serum und Knochenmark der Studiengruppe

Tabelle 8: Darstellung der studienbedingt erhobenen Daten aus dem Serum der Kontrollgruppe

Tabelle 9: Gemittelte Expressionswerte der Mittelwerte der Färbeintensität von RANK in den verschiedenen Subgruppen der Studiengruppe

Tabelle 10: Gemittelte Expressionswerte der Mittelwerte der Färbeintensität von RANKL in den verschiedenen Subgruppen der Studiengruppe

Tabelle 11: Korrelation der RANK- und RANKL-Expression im Tumor mit sRANKL- und OPG-Spiegeln aus Serum und Knochenmark

## **I. Einleitung**

### **I.1. Das Prostatakarzinom**

#### **I.1.1. Epidemiologie**

Das Prostatakarzinom (PCA) steht mit 25,4 % an erster Stelle der in Deutschland diagnostizierten Krebserkrankungen des Mannes. Hierbei liegt das mittlere Erkrankungsalter bei circa 69 Jahren bei 58.000 Neuerkrankungen pro Jahr in der Bundesrepublik Deutschland. Unter den letal verlaufenden Tumorerkrankungen steht das Prostatakarzinom mit 10,1 % an dritter Stelle. Insgesamt versterben jährlich etwa 12.000 Patienten in Deutschland an den Folgen eines Prostatakarzinoms. Durch den zu erwartenden demographischen Wandel mit einer Zunahme der Personen über 60 Jahren am Anteil der Gesamtbevölkerung ist mit einem massiven Anstieg der Inzidenz des Prostatakarzinoms in Zukunft zu rechnen [1]. Es wird mit einer Zunahme von bis zu 39 % bis zum Jahre 2050 gerechnet, was einen Anstieg auf 88.000 Neuerkrankungen pro Jahr entspräche [2]. Bereits seit 1985 ist in den meisten Ländern weltweit ein Anstieg der Todesfälle durch das Prostatakarzinom zu verzeichnen [3]. Auch der volkswirtschaftliche Schaden durch Aufwendungen zur Therapie des Prostatakarzinoms, dessen Komplikationen und durch Arbeitsunfähigkeit sind enorm. So beliefen sich die Kosten 2008 in Deutschland auf über 1,4 Milliarden Euro [4].

#### **I.1.2. Ätiologie**

Zu den Risikofaktoren an einem Prostatakarzinom zu erkranken zählt in erster Linie das Alter. Während das Auftreten eines Karzinoms in jungen Jahren sehr selten ist, zeigt sich eine starke Zunahme der Inzidenz mit steigendem Alter mit einem Gipfel zwischen dem 65. und 69. Lebensjahr [1].

Insgesamt wird von einer multifaktoriellen Genese der Erkrankung ausgegangen. Somit spielen verschiedene Umweltfaktoren eine Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass Personen die aus Ländern mit niedriger Prävalenz, welche in Länder mit höherer Prävalenz emigrieren, eine höhere Inzidenz als nicht emigrierte Personen aufweisen [5].

Als ein wichtiger Umweltfaktor kann die Ernährung genannt werden. Man geht

davon aus, dass ein bestehendes West-Ost-Gefälle (weltweit) sowie ein Nord-Süd-Gefälle (in Europa) der Inzidenz des Prostatakarzinoms mit der unterschiedlichen Ernährung in verschiedenen Regionen der Welt zusammenhängt. Es wird angenommen, dass eine Ernährung welche reich an Körnern, Getreide und Nüssen ist, einen gewissen protektiven Wert hat [6].

Des Weiteren besteht ein erhöhtes Risiko an einem Prostatakarzinom zu erkranken, wenn eine familiäre Belastung besteht. So haben Personen, bei denen Verwandte ersten Grades an einem Prostatakarzinom erkrankt sind, ein etwa 2,5fach erhöhtes Risiko selbst zu erkranken [7].

### **I.1.3. Klinik**

Das Prostatakarzinom ist im Frühstadium meist symptomlos. Erst in späteren Stadien können sich obstruktive Symptome wie bei einer benignen Prostatahyperplasie zeigen.

Bei bereits metastasiertem Krebsleiden können beispielsweise Rückenschmerzen (bei ossärer Metastasierung in die Wirbelsäule) auftreten [8].

### **I.1.4. Rolle von ossären Metastasen beim Prostatakarzinom**

Insbesondere Knochenmetastasen des Prostatakarzinoms haben einen erheblichen Einfluss auf Morbidität und Mortalität. Sie beeinflussen maßgeblich die Überlebensdauer der Patienten. Des Weiteren werden durch ossäre Metastasen Komplikationen verursacht, beispielsweise pathologische Frakturen, welche ebenso die Prognose des Prostatakarzinoms verschlechtern [9]. Knochenmetastasen bei Patienten mit Prostatakarzinom ließen sich in einer großen Autopsie-Studie bei 90 % aller Patienten finden [10].

Das Prostatakarzinom metastasiert am häufigsten in die Wirbelsäule (meist lumbal), gefolgt vom Femur, dem Becken, dem knöchernen Thorax, dem Schädel und dem Humerus [11, 12]. Als Komplikationen durch Knochenmetastasen können Schmerzen, pathologische Frakturen sowie eine Kompression des Spinalkanals auftreten. Diese Komplikationen erfordern therapeutische Interventionen wie Radiatio oder Operationen zur Versorgung von Frakturen [13]. Somit stellt die Therapie von Knochenmetastasen beim Prostatakarzinom eine

interdisziplinäre Herausforderung dar und hat eine große gesundheitsökonomische Bedeutung [14].

## **I.1.5. Diagnostik**

### **I.1.5.1 Digital rektale Untersuchung**

Die digital rektale Untersuchung (DRU) stellt die einfachste Form der Diagnostik des PCA dar. Eine Metanalyse ergab eine insgesamt geringe Sensitivität von 59 % (51-67%) bei hoher Spezifität von 94 % (91-96%). Der positive prädiktive Wert lag bei 28% (20-36%) und der negative prädiktive Wert bei 99 % (98-99%) [15]. Die DRU eignet sich somit nicht zur alleinigen Sekundärprävention und sollte in Kombination mit der Bestimmung des PSA erfolgen [16].

### **I.1.5.2. Prostata spezifisches Antigen**

Das Prostata spezifische Antigen (PSA) ist ein Glykoprotein, welches in der Prostata produziert wird. Eine Erhöhung des PSA kann verschiedene Ursachen haben.

So kann nach mechanischer Manipulation der Prostata, bei entzündlichen Prozessen, bei einer benignen Prostatahyperplasie oder einem malignen Prozess der Prostata ein erhöhter PSA-Spiegel im Serum gemessen werden. Das PSA wird sowohl zur Primärdiagnostik als auch zur Prognoseabschätzung und zum Therapieverlauf bestimmt [8].

### **I.1.5.3 Transrektaler Ultraschall**

Der transrektale Ultraschall (TRUS) der Prostata ist ein bildgebendes Verfahren, bei welchem eine Ultraschallsonde transrektal eingebracht wird und die Prostata sonographisch dargestellt werden kann. Hierbei können hypodense und somit malignitätsverdächtige Areale dargestellt werden und gegebenenfalls sonographisch gesteuert biopsiert werden (s.u.).

Der alleinige diagnostische Wert dieser Untersuchung ist nicht sehr hoch und deshalb sollte die Untersuchung mit anderen Methoden kombiniert werden [17]. Eine Biopsie sollte transrektal ultraschallgesteuert durchgeführt werden [18].

#### **I.1.5.4. Stanzbiopsie der Prostata**

Die Stanzbiopsie dient der histologischen Diagnosesicherung des PCA.

Die Indikation zu einer Stanzbiopsie ist gegeben bei Verdacht auf ein PCA durch erhöhte PSA-Werte, positiver DRU und bestehender therapeutischer Konsequenz.

Hierbei sollten 10 bis 12 Gewebszylinder aus der Prostata entnommen werden [19].

#### **I.1.5.5 Endorektale Magnetresonanztomographie**

Die endorektale Magnetresonanztomographie kann bei negativer Biopsie ergänzend durchgeführt werden und hat einen hohen negativ prädiktiven Wert und kann somit eine Re-Biopsie zum Ausschluss eines PCA ersetzen [20].

#### **I.1.6. Einteilung**

Die Einteilung des Prostatakarzinoms erfolgt zum einen anhand der TNM-Klassifikation (Staging) und zum anderen anhand des Gradings (Gleason-Score). Beide Systeme haben maßgeblichen Einfluss auf die weitere Behandlung und Prognose der Erkrankung.

##### **I.1.6.1. TNM-Klassifikation**

In dieser Klassifikation werden die lokale Tumorausbreitung (T), befallene Lymphknoten (N) sowie Metastasen (M) beurteilt. (Siehe Tabelle 1)

Die Stadien T1-T2 N0 M0 werden als lokalisiertes Karzinom der Prostata bezeichnet.

Die Stadien T3-T4 N0 M0 werden als lokal fortgeschrittenes Prostatakarzinom bezeichnet.

Ab den Stadien N1-N3 und/oder M1 handelt sich um ein fortgeschrittenes bzw. metastasiertes Karzinom der Prostata.



<b>T – Primärtumor</b>	
<b>TX</b>	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
<b>T0</b>	Kein Anhalt für Primärtumor
<b>T1</b>	Klinisch nicht erkennbarer Tumor, der weder tastbar noch in den bildgebenden Verfahren sichtbar ist
<b>T1a</b>	Tumor zufälliger histologischer Befund (»incidental carcinoma«) in 5% oder weniger des resezierten Gewebes
<b>T1b</b>	Tumor zufälliger histologischer Befund (»incidental carcinoma«) in mehr als 5 % des resezierten Gewebes
<b>T1c</b>	Tumor durch Nadelbiopsie diagnostiziert (z.B. wegen erhöhtem PSA)
<b>T2</b>	Tumor auf die Prostata begrenzt
<b>T2a</b>	Tumor infiltriert die Hälfte eines Lappens oder weniger
<b>T2b</b>	Tumor infiltriert mehr als die Hälfte eines Lappens
<b>T2c</b>	Tumor infiltriert beide Lappen
<b>T3</b>	Tumor durchbricht die Prostatakapsel
<b>T3a</b>	Extrakapsuläre Ausbreitung (ein- oder beidseitig)
<b>T3b</b>	Tumor infiltriert Samenblase(n)
<b>T4</b>	Tumor infiltriert benachbarte Strukturen (Blasenhals, Sphincter externus, Rektum, Levator-Muskulatur, Beckenwand)
<b>N – Regionäre Lymphknoten</b>	
<b>N0</b>	Kein Anhalt für regionäre Lymphknotenmetastasen
<b>N1</b>	Regionäre Lymphknotenmetastasen
<b>M – Fernmetastasen</b>	
<b>M0</b>	Kein Anhalt für Fernmetastasen
<b>M1</b>	Fernmetastasen
<b>M1a</b>	Nicht regionärer Lymphknotenbefall
<b>M1b</b>	Knochenmetastasen
<b>M1c</b>	andere Manifestation

**Tabelle 1:** TNM-Klassifikation des Prostatakarzinoms nach UICC [21]

### I.1.6.2. Gleason-Score

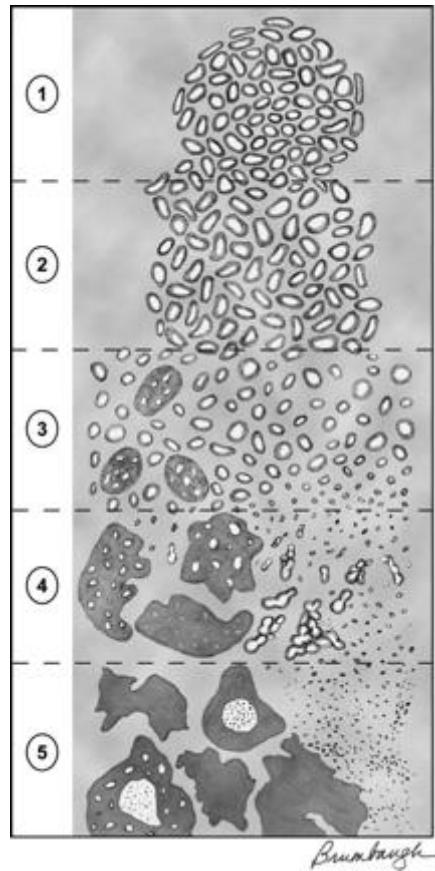
Beim Gleason-Score handelt es sich um ein histologisches Grading des PCA, wobei je nach Differenzierungsgrad des malignen Gewebes Werte von 1-5 angegeben werden.

Ein Wert von 1 entspricht hoch differenzierten Zellen mit niedriger Malignität, ein Wert von 5 hingegen hochgradig entdifferenzierten Zellen mit hoher Malignität.

Der Score wird ermittelt durch den am häufigsten vorkommenden Differenzierungsgrad, welcher mit dem am zweihäufigsten vorkommenden addiert wird.

Hieraus können sich Werte von  $1+1=2$  bis  $5+5=10$  ergeben, wobei ein niedrigerer Gleason-Score die vergleichsweise beste Prognose hat und höhere Werte mit einer dementsprechend schlechteren Prognose einhergehen [22]

[23].



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung der fünf Gleason- Wachstumsmuster. Modifizierte Version von 2005[23]

### I.1.6.3 Risikostratifikation nach D'Amico

Eine weitere Einteilung Anhand des Risikoprofils erfolgt nach D'Amico. Die so in 3 Gruppen eingeteilten Patienten können entsprechend ihrem Risikoprofil der passenden Therapie zugeführt werden. Ebenfalls kann anhand dieser Einteilung die Notwendigkeit weiterer Diagnostik abgeschätzt werden.

niedriges Risiko:

PSA-Wert < 10 ng/ml und Gleason-Score 6 und cT-Kategorie ≤ 2a.

intermediäres Risiko:

PSA-Wert > 10-20 ng/ml oder Gleason-Score 7 oder cT-Kategorie 2b.

hohes Risiko:

PSA-Wert > 20 ng/ml oder Gleason-Score > 8 oder cT-Kategorie 2c[24].

### I.1.7. Therapie des Prostatakarzinoms

Die Primärtherapie des Prostatakarzinoms ist von vielen Faktoren abhängig und für jeden Patienten individuell (siehe folgendes Schaubild).

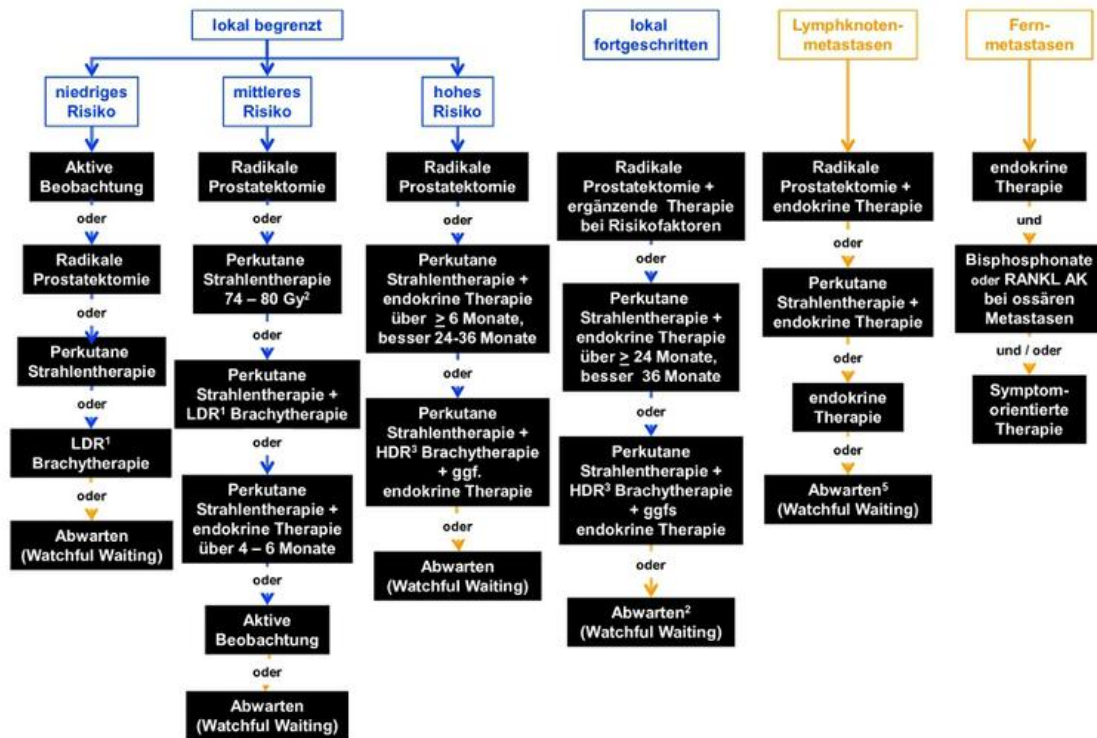


Abbildung 2: Algorithmus für die Primärtherapie des PCA (onkopedia.de)

#### I.1.7.1. Therapie im lokalisierten Stadium

Nur im lokalisierten Stadium (T1-2, N0, M0) und im lokal fortgeschrittenen Stadium (T1-4, N0, M0) kann eine Therapie des Prostatakarzinoms in kurativer Absicht erfolgen [25].

Hierbei stehen verschiedene Therapiemöglichkeiten zur Verfügung.

##### I.1.7.1.1. Radikale Prostatektomie

Die Radikale Prostatektomie gilt als Goldstandard bei klinisch lokalisierten Karzinomen bei einer Lebenserwartung von mehr als 15 Jahren[26].

Es konnte nachgewiesen werden, dass durch die Radikale Prostatektomie sowohl die Mortalität, das Risiko von Metastasen und der lokale Progress positiv

beeinflusst werden können [27].

#### **I.1.7.1.2 Active Surveillance**

Als *Active Surveillance* bezeichnet man eine Therapiestrategie, bei welcher nach Diagnose eines Prostatakarzinoms eine engmaschige Kontrolle stattfindet, ob ein Tumorprogress zu beobachten ist. Sollte dies der Fall sein, so wird eine Therapie eingeleitet.

Dieses Vorgehen kommt in erster Linie für Patienten mit niedrigem Risiko in Frage [28].

Diese Therapieoption ist der Tatsache geschuldet, dass Arten von Prostatakarzinomen existieren, welche kaum Progress zeigen und somit eine frühe aggressive Behandlung eine potentielle Übertherapie darstellen würde [29].

#### **I.1.7.1.3 Watchful Waiting**

Unter *Watchful Waiting* versteht man einen rein palliativen Therapieansatz, bei welchem nach Diagnose eines Prostatakarzinoms zunächst keine weitere Diagnostik oder Therapie eingeleitet wird. Erst bei Auftreten von Beschwerden durch das Karzinom werden diese symptomorientiert therapiert.

Das *Watchful Waiting* kommt in erster Linie für Patientin mit einer Lebenserwartung von weniger als 10 Jahren in Betracht [30].

#### **I.1.7.1.4 Perkutane Strahlentherapie**

Eine perkutane Bestrahlung kommt als Alternative zur operativen Therapie in Frage. Bisher konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen einer operativen Therapie und einer Strahlentherapie (sowohl extern als auch intern, s.u.) gefunden werden [31].

#### **I.1.7.1.5 Brachytherapie**

Eine weitere Form der Strahlentherapie stellt die sogenannte Brachytherapie dar. Hierbei unterscheidet man die LDR (*low dose rate*) - von der HDR (*high dose rate*) -Brachytherapie.

Hierbei werden radioaktive Seeds direkt in die Prostata eingebracht. Die LDR-

Brachytherapie eignet sich bei lokalisierten Karzinomen mit niedrigem Risiko [32]. Die HDR-Brachytherapie stellt hingegen eine Therapieoption bei Tumoren mit intermediärem oder hohem Risiko dar [33].

### **I.1.7.2. Therapie im fortgeschrittenen und metastasierten Stadium**

#### **I.1.7.2.1 Hormontherapie (Androgendeprivation)**

Beim bereits metastasiertem Prostatakarzinom kommt eine Hormontherapie in Frage [34]. Es handelt sich hierbei um eine Androgendeprivation. Dabei kann medikamentös oder operativ [35] ein Absenken der Testosteron-Konzentration erreicht werden, wodurch den Tumorzellen das Testosteron als Wachstumsfaktor entzogen wird [36].

#### **I.1.7.2.2 Chemotherapie**

Eine Chemotherapie kommt bei Patienten mit kastrationsresistentem Prostatakarzinom in Frage. Es handelt sich hierbei um einen palliativen Ansatz. Hier wären in erster Linie Zytostatika aus der Gruppe der Taxane wie Docetaxel als Chemotherapeutikum zu erwähnen, bei welchem ein längeres Überleben gegenüber einer Therapie mit Mitoxantron nachgewiesen werden konnte [37].

#### **I.1.7.2.3 Therapie bei Knochenmetastasen**

Die Therapie beim ossär metastasierten Prostatakarzinom erfolgt interdisziplinär. Es konnte gezeigt werden, dass die Gabe von Radionukleiden sowohl zu einer Schmerzreduktion als auch zu einem verlängerten Gesamtüberleben führt [38, 39]. Eine Strahlentherapie von Knochenmetastasen kann eine Schmerzsymptomatik lindern und die Häufigkeit ossärer Komplikationen senken [40].

Medikamentös kommen bislang Bisphosphonate (Zoledronsäure) und der monoklonale Antikörper Denosumab als Therapieoption in Frage. Die Gabe von Zoledronsäure oder Denosumab kann die Komplikationsrate bei Knochenmetastasen im kastrationsresistenten Stadium senken [41].

In einer Studie konnte gezeigt werden, dass Denosumab im Vergleich zu Bisphosphonaten mindestens gleichwertig zu sehen ist, was das Auftreten von

ossären Komplikationen angeht.

Bei Denosumab handelt es sich um einen humanen monoklonalen Antikörper, der an den RANK Liganden bindet, dadurch die Aktivierung von RANK verhindert und die Osteoklastenaktivierung inhibiert. Hauptnebenwirkungen sind Hypokalzämie und Kiefernekrosen. Die Gabe von Denosumab ist auch bei eingeschränkter Nierenfunktion möglich [42].

### **I.1.7.3 Prävention von Knochenmetastasen**

Die präventive Gabe von Bisphosphonaten hat bislang in Studien keine Vorteile bezüglich des Auftretens von Knochenmetastasen oder das Gesamtüberleben erbracht [43]. Jedoch ist diese Thematik noch Inhalt aktueller Studien.

In einer Studie konnte bezüglich des monoklonalen Antikörpers Denosumab eine signifikante Verlängerung der metastasenfremen Überlebenszeit nachgewiesen werden. Ein Einfluss auf das Gesamtüberleben war jedoch nicht nachweisbar [44]. Denosumab hat bislang keine Zulassung zur Prävention von Knochenmetastasen.

### **I.1.8. Prognose**

Die Prognose des Prostatakarzinoms ist maßgeblich vom Stadium der Erkrankung abhängig.

In lokalisierten Stadien, das heißt bei früh diagnostizierten Prostatakarzinomen, kann eine Therapie in kurativer Absicht mit einer sehr guten Aussicht auf Heilung erfolgen.

Sobald jedoch Lymphknoten befallen sind (N1) oder eine Fernmetastasierung (M1) vorliegt, verschlechtert sich die Prognose rapide und so sind nach 5 Jahren nur noch 28 % der Patienten am Leben [45].

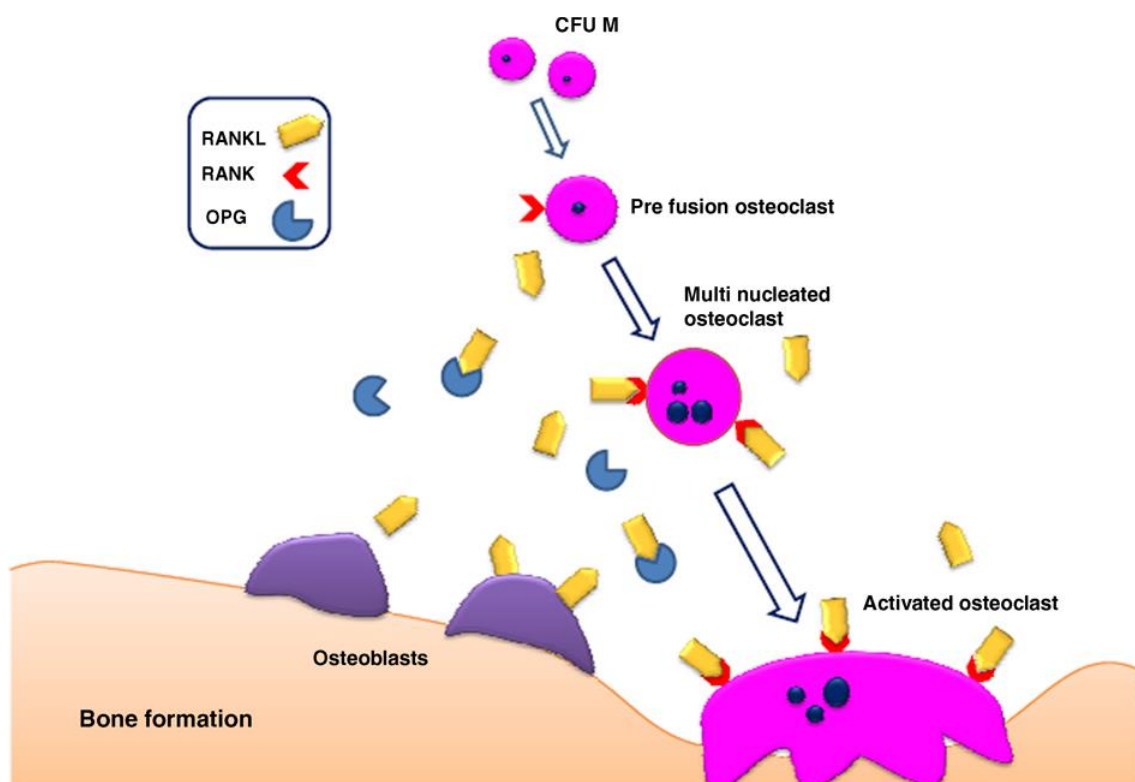
## I.2. Das RANK/RANKL/OPG-System

### I.2.1. Rolle des RANK/RANKL/OPG-Pathways im physiologischen Kontext

Das RANK/RANKL/OPG-System wurde erstmals 1997 beginnend mit der Entdeckung von OPG von Boyle et. al. beschrieben [46].

Der RANK/RANKL/OPG-Pathway hat im physiologischen Sinne die Funktion den Knochenmetabolismus zu kontrollieren, also die Formation und Aktivierung von Osteoklasten zu regulieren [47]. Des Weiteren werden über dieses System die T-Zellen des Immunsystems aktiviert [48] und mamilläre Drüsenzellen zu einer Hyperplasie angeregt im Rahmen der Laktation [49].

Das Verhältnis von RANK zu OPG ist maßgeblich für das Gleichgewicht zwischen Knochenaufbau und Knochenabbau verantwortlich. Bei Krankheiten, bei welchen es zu einem verstärkten Abbau der Knochenmasse kommt, kann ein erhöhter RANKL/OPG-Quotient beobachtet werden [50]



**Abbildung 3:** RANK/RANKL/OPG (receptor activator of nuclear factor kappa-B)/receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand/osteoprotegerin) Pathway der Osteoklastogenese. (Aus: Bonekey Re, *Giant-cell tumor of bone, anti-RANKL therapy*, Armelle Dufresne) [51]

### **I.2.2. RANKL**

Der „*receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*“ (RANKL), auch bekannt als ODF (*Osteoclast differentiation factor*), OPGL (*Osteoprotegerin ligand*), TRANCE (*TNF-related activation-induced cytokine*), SOFA (*Stromal osteoclast-forming activity*) oder TNFSF-11 (*TNF superfamily 11*) spielt eine zentrale Rolle im Knochenmetabolismus [52]. Es handelt sich um einen überwiegend von Osteoblasten und Knochenmarkstromazellen exprimierten Botenstoff. Er bindet an Vorläuferzellen von Osteoklasten, welche sich anschließend zu reifen Osteoklasten differenzieren und somit für den Knochenabbau verantwortlich sind [53].

Des Weiteren spielt RANKL eine immunologische Rolle. Durch RANKL wird das T-Zell-Wachstum gefördert und die Funktion dendritischer Zellen beeinflusst [54]. RANKL gehört der Familie der Tumor-Nekrose-Faktoren-Liganden (*TNF-ligands*) an und kommt in einer membrangebundenen als auch in einer löslichen Form vor. Diese lösliche Form entsteht durch eine post-translationale Modifikation durch TACE (*TNF- $\alpha$ -converting enzyme like protease*) [55].

RANKL bindet an den RANK-Rezeptor als auch an OPG (*Osteoprotegerin*).

Durch eine Bindung an RANK wird die oben genannte Osteoklastendifferenzierung eingeleitet. OPG fungiert als *decoy-receptor*, welcher irreversibel an RANKL bindet und somit eine Bindung an RANK verhindert [56].

### **I.2.3. RANK**

Der „*receptor activator of nuclear factor kappa-B*“ ist der Rezeptor, an welchen RANKL bindet. RANK wird auch ODAR (*Osteoclast differentiation and activation receptor*) oder TNFRSF-11A (*TNF superfamily receptor 11 A*) genannt [52].

Es handelt sich hierbei um ein Membranprotein aus 616 Aminosäuren, gehört der Gruppe der TNF-Rezeptoren an und wird von Osteoklasten, Lymphozyten und dendritischen Zellen exprimiert [54, 57].



#### **I.2.4. OPG**

Osteoprotegerin (OPG) ist auch als OCIF (*Osteoclastogenesis inhibitory factor*), TR-1 (*TNF-receptor-like molecule 1*), FDCR-1 (*Follicular dendritic receptor 1*) oder TNFSRSF-11B (*TNF superfamily receptor 11B*) bekannt [52].

Bei Osteoprotegerin handelt es sich um einen sogenannten Abfangrezeptor (*decoy-receptor*), welcher irreversibel an RANKL bindet und somit eine Bindung von RANKL an RANK verhindert [56].

OPG wird wie von Knochenmarkstromazellen und Osteoblasten exprimiert, sowie in einer Vielzahl anderer Organe wie Herz, Niere, Leber und Milz [58].

#### **I.2.5. Rolle des RANK/RANKL/OPG-Pathways beim Prostatakarzinom**

Bei verschiedenen Tumoren konnte gezeigt werden, dass Veränderungen im RANK/RANKL/OPG-*Pathway* bei ossären Metastasen nachweisbar sind [59].

Dies trifft auch auf das Prostatakarzinom zu. So konnte bei Patienten mit nachgewiesenem ossär metastasiertem Prostatakarzinom eine erhöhte Osteoklastendichte nachgewiesen werden, obwohl Karzinome der Prostata üblicherweise osteoblastische Metastasen aufweisen [60].

In Studien konnte gezeigt werden, dass bei nachgewiesenen Tumorzellen im Knochenmark eine erhöhte RANKL-Aktivität in Stromazellen besteht [61].

Die Tumorzellen des Prostatakarzinoms sind jedoch auch selbst in der Lage RANK, RANKL und OPG zu exprimieren [62]. Es konnte nachgewiesen werden, dass diese Expression in einem Zusammenhang mit dem Gleason-Score, dem TNM-Stadium sowie dem PSA-Level besteht [63]. Es konnte auch gezeigt werden, dass der RANKL-Status als prognostischer Marker hinsichtlich eines biochemischen Rezidivs verwendet werden kann [64].

Somit kann aufgrund der aktuellen Studienlage angenommen werden, dass beim Prostatakarzinom Veränderungen im RANK/RANKL/OPG-*Pathway* vorliegen und diese wahrscheinlich auch einen Einfluss auf das Risiko einer ossären Metastasierung haben [65].

### **I.3. Intertumorale und intratumorale Heterogenität des Prostatakarzinoms**

Das multifokale Auftreten von Tumorherden innerhalb einer Prostata ist bereits als Herausforderung der Diagnose und Therapieplanung des Prostatakarzinoms beschrieben, so dass Proben aus einzelnen Tumorherden als nicht zwingend repräsentativ für die Tumorerkrankung zu werten sind. [66, 67]

Das Prostatakarzinom zeigt sich sowohl klinisch, morphologisch, als auch auf molekularer Basis als heterogene Erkrankung, das heißt es liegt eine intertumorale Heterogenität vor. [68] Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass über 80% der Prostata mit Tumorbefall, mehr als 2 sowohl topographisch unterschiedliche als auch sich in der Morphologie unterscheidende Tumorherde aufweisen. [66] [69] Ebenso konnte bislang nachgewiesen werden, dass diese einzelnen Tumorherde teils eine unterschiedliche Wachstumsgeschwindigkeit als auch eine unterschiedliche Aggressivität aufweisen, was durch eine unterschiedliche Tumorbilogie der einzelnen Herde bedingt ist [70]. Auf molekularer Ebene konnten genetische Unterschiede zwischen unterschiedlichen Tumorherden festgestellt werden. [71]

Gemeinhin wird als Indexläsion, also die führende tumoröse Läsion innerhalb einer Prostata, der größte und meist entartete (höchster Gleason-Score) Tumorherd bezeichnet. [72] Jedoch sind die Belege bezüglich der prognostischen Wertigkeit der Indexläsion beschränkt. [73] Dem gegenüber liegen Hinweise vor, dass auch kleine und gut differenzierte Tumorherde für eine Metastasierung verantwortlich sein können. [74] [75]

Abgesehen von dieser ausgeprägten intertumoralen Heterogenität des Prostatakarzinoms ist eine intratumorale Heterogenität beschrieben. Das heißt eine Heterogenität innerhalb eines Tumorfokus. So können innerhalb eines Tumorherdes verschiedene Tumorklone mit jeweils unterschiedlichen genetischen Veränderungen vorkommen. [70] Hieraus können sich intratumoral unterschiedliche immunhistochemische Ergebnisse zeigen. Dies konnte beispielsweise für ERG gezeigt werden. [76]

#### **I.4. Fragestellung**

Biomarkeruntersuchungen gewinnen aktuell im Rahmen von individualisierten Therapien stetig an Bedeutung. Beim Einsatz von Biomarkern muss allerdings gewährleistet sein, dass diese repräsentativ für die tumorassoziierten Veränderungen des individuellen Patienten sind.

Speziell beim bekannt heterogenen und multifokalen Prostatakarzinom gilt es die Repräsentativität von Biomarkern zu überprüfen. Am RANK/RANKL/OPG-Signalwegs soll dies in der vorliegenden Arbeit exemplarisch evaluiert werden. In Studien konnte bereits gezeigt werden, dass dieses System eine Rolle bei der Pathogenese des Prostatakarzinoms spielt [65] und dass es zu spezifischen Veränderungen sowohl im Tumorgewebe als auch im Serum von Tumorpatienten kommt. [77]. Ebenso ist bereits bekannt, dass der RANK/RANKL/OPG-Signalweg auch bei anderen Tumorerkrankungen, wie dem Mammakarzinom, relevant ist [59].

Nicht bekannt ist bislang, ob eine Heterogenität der Expression von RANK und RANKL in verschiedenen Tumorarealen vorliegt.

Nicht bekannt ist auch, ob im Falle einer bestehenden Heterogenität bezüglich der RANK- und RANKL-Expression in den unterschiedlichen Tumorherden, diese in Zusammenhang mit dem Gleason-Score oder der Tumorherdgröße (also der Indexläsion) steht.

Unklar ist bislang auch, ob ein Zusammenhang zwischen der Expression von RANK und RANKL im Tumor mit deren Konzentration Serum und Knochenmark besteht.

Damit sollen in der vorliegende Untersuchung folgende Fragen beantwortet werden:

A) Bestehen Veränderungen der Expressionen von RANK und RANKL im Prostatakarzinomgewebe im Vergleich zum Gewebe von Patienten ohne nachgewiesenes Prostatakarzinom?

Bestehen Unterschiede der Konzentrationen von OPG und sRANKL im Serum zwischen Patienten mit und ohne Prostatakarzinom?

B) Besteht eine Heterogenität bezüglich der RANK- und RANKL-Expression in den verschiedenen Tumorarealen eines Patienten?

Besteht im Falle einer nachweisbaren Heterogenität ein Zusammenhang mit der Größe oder dem Gleason-Score der Tumorareale?

C) Bestehen bei Patienten mit einem lokalisiertem Prostatakarzinom bereits nachweisbare Veränderungen im RANK/RANKL/OPG-Signalweg im Serum oder im Knochenmark und besteht ein Zusammenhang mit dem Risikoprofil des Patienten (PSA, TNM-Stadium, Gleason-Score)?

Besteht ein Zusammenhang zwischen der immunhistochemischen Expression von RANK und RANKL im Tumor mit den Konzentrationen von sRANKL und OPG im Serum und im Knochenmark?

D) Besteht ein Zusammenhang zwischen im Knochenmark vorhandenen disseminierten Tumorzellen (DTCs) und Veränderungen im RANK/RANKL/OPG-Signalweg in den Kompartimenten Gewebe, Serum und Knochenmark?

## **II. Material und Methoden**

### **II.1. Patientenkollektiv**

#### **II.1.1. Studiengruppe**

Für die Studie wurden 60 konsekutive Patienten mit einem stanzbioptisch gesichertem Prostatakarzinom nach radikaler Prostatektomie im Zeitraum vom 30.08.2010 bis zum 15.02.2011 an der Urologischen Universitätsklinik in Tübingen ausgewählt. Bei diesen Patienten handelt es sich um Patienten mit einem präoperativ klinisch lokalisierten Karzinom der Prostata ohne Nachweis von Metastasen im Stadium cM0 zum Operationszeitpunkt bei stanzbioptisch präoperativ gesicherter Malignität.

An Untersuchungsmaterialien liegen von diesen Patienten jeweils Serum, Knochenmark sowie Paraffinblöcke und gefärbte Schnitte der Prostata vor. Das Serum wurde im Rahmen der präoperativen Blutentnahme ohne zusätzliche Venenpunktion entnommen.

10 bis 20 ml Knochenmark wurde im Rahmen der der Prostatektomie mittels einer Punktion aus der anterioren *Crista iliaca* gewonnen.

Bei den Gewebelöcken handelt es sich um die standardmäßig angefertigten pathologischen, in Paraffin gegossenen Präparate.

Alle Patienten wurden im Vorfeld über die Studienteilnahme aufgeklärt und es liegt von jedem Patienten eine schriftliche Einverständniserklärung vor.

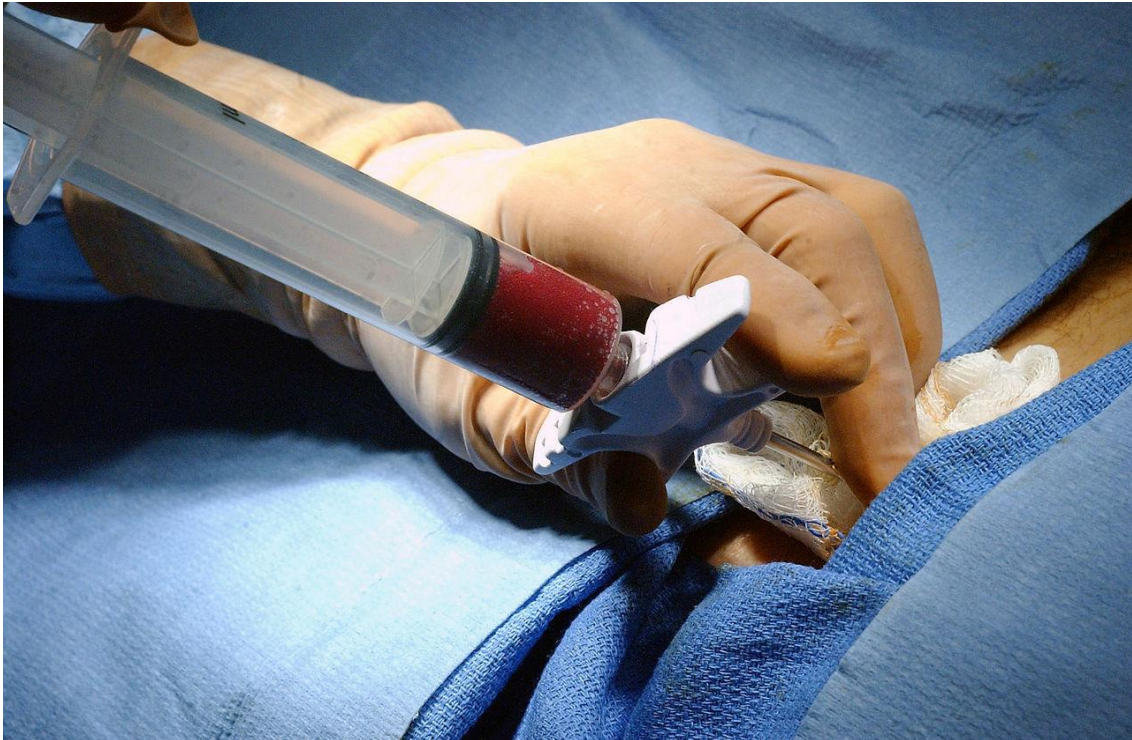
#### **II.1.2. Kontrollgruppe**

Als Kontrollgruppe wurden weitere 20 konsekutive Patienten mit einer benignen Prostatahyperplasie ohne pathologisch nachgewiesene Malignität ausgewählt. Hier liegen an Untersuchungsmaterialien Serum sowie Paraffinblöcke der Prostata vor. Die Gewebelöcke wurden hierbei durch eine transurethrale Resektion der Prostata (TUR-P) oder durch eine offene transvesikale Enukektion der Prostata nach Harris-Hryntschak im Zeitraum vom 20.10.2010 bis zum 26.04.2011 gewonnen.

Das untersuchte Serum wurde auch hier im Rahmen der präoperativen Blutentnahme ohne zusätzliche Venenpunktion gewonnen.

Auch hier handelt es sich bei den Gewebeproben um die standardmäßig angefertigten pathologischen, in Paraffin gegossenen Präparate.

Auch in der Kontrollgruppe wurden alle Patienten im Vorfeld über die Studienteilnahme aufgeklärt und es liegt von jedem Patienten eine schriftliche Einverständniserklärung vor.



**Abbildung 4:** Knochenmarkpunktion - Chad McNeeley, Navy News Service, 021204-N-0696M-180

### **II.1.3. Ein- und Ausschlusskriterien für die Interventionsgruppe**

Eingeschlossen in die Studie wurden Patienten mit Prostatakarzinom, im Alter zwischen 18 und 99 Jahren, sowie eine vorliegende unterschriebene Einverständniserklärung. Ausschlusskriterien bestanden bei nicht nachweisbarem Tumor in der endgültigen Histologie. Ausgeschlossen wurden auch Patienten mit bekannter Osteoporose und Patienten, die zum Zeitpunkt der Studie Glucocorticoide einnahmen. Weitere Krankheiten, die zum Ausschluss führten, sind: Morbus Paget, Multiples Myelom und andere hämatologische Neoplasien sowie andere bekannte Tumorerkrankungen.

Ausgeschlossen wurden auch Patienten, bei denen nach Sicherstellung der für

die Knochenmarks-Zytologie benötigte Menge an Knochenmarks-Aspirat die für die weitere Analyse benötigte Menge nicht erreicht wurde. Auch Patienten, bei welchen sich durch die Entnahme von Schnitten am Paraffinpräparat nicht mehr ausreichend Gewebe für die routinemäßige Asservation verbleiben würde, wurden von der Studie ausgeschlossen.

#### **II.1.1.4. Ein- und Ausschlusskriterien für die Kontrollgruppe**

Die Kontrollgruppe besteht aus Patienten im Alter zwischen 18 und 99 Jahren, die aufgrund einer benignen Prostatahyperplasie einer transurethralen Resektion der Prostata oder einer offenen, transvesikalen Adenomenukleation unterzogen wurden.

Der Nachweis von Malignität in der endgültigen Histologie war ein Ausschlusskriterium.

Ausgeschlossen wurden auch Patienten mit bekannter Osteoporose und Patienten, die zum Zeitpunkt der Studie Glucocorticoide einnahmen. Weitere Vordiagnosen, die zum Ausschluss führten, sind: Morbus Paget, Multiples Myelom und andere hämatologische Neoplasien sowie andere bekannte Tumorerkrankungen.

Ausgeschlossen wurden auch Patienten, bei denen nach Sicherstellung der für die Knochenmarks-Zytologie benötigte Menge an Knochenmarks-Aspirat die für die weitere Analyse benötigte Menge nicht erreicht wurde. Auch Patienten, bei welchen sich durch die Entnahme von Schnitten am Paraffinpräparat nicht mehr ausreichend Gewebe für die routinemäßige Asservation verbleiben würde, wurden von der Studie ausgeschlossen.

## **II.2. Rekrutierung und Ethikvotum**

Die Patienten wurden durch den behandelnden Arzt rekrutiert und für die Teilnahme an der Studie mündlich als auch schriftlich aufgeklärt. Eine unterschriebene Einwilligung liegt von allen Studienteilnehmern vor. Die Aufklärung erfolgte präoperativ und unabhängig von der Operationsindikation. Diese Studie mit der Verwendung von Gewebeproben aus Operationspräparaten, Serum sowie Knochenmark wurde von der Ethikkommission des

Universitätsklinikums Tübingen bewilligt. Der Ethikantrag hat die Nummer 194/2013BO2.

Die Studie fand im Rahmen des Verbundprojektes zu Untersuchungen zur Rolle des RANK-Liganden bei Veränderungen des Microenvironment des Knochenmarks bei Patienten mit Prostata- bzw. Mammakarzinom statt.

## **II.3. Methoden**

### **II.3.1. Paraffiniertes Gewebe aus Routinebehandlungen**

Das im Rahmen der radikalen Prostatektomie bzw. im Rahmen einer TUR-P oder offenen Adenomenukleation gewonnene Gewebe wurde vom pathologischen Institut Tübingen routinemäßige aufgearbeitet und archiviert.

Nach Auswahl des Patientenkollektivs nach den oben genannten Kriterien wurden mit Hilfe des jeweiligen pathologischen Befundberichtes die Hämatoxylin-Eosin gefärbten Schnitte der Prostata aus dem Archiv des pathologischen Instituts Tübingen entnommen.

Um ein dreidimensionales Bild des Präparats zu erhalten, wurden die jeweiligen Schnitte entsprechend ihrer Lage auf einer Platte angeordnet. Dabei wurden zunächst die rechte und die linke Prostatahälfte aufgelegt, diese dann von basal bis apikal angeordnet und der jeweilige ventrale und dorsale Schnitt einander zugeordnet.

Dann wurden die Schnitte von einem erfahrenen Pathologen mikroskopiert und mit Filzstift alle Tumorherde auf den Objektträgern eingezeichnet. Dies geschah zum einen, um später diese Tumorherde für den Tissue-Microarray exakt lokalisieren zu können und zum anderen, um einzelne Tumorherde voneinander differenzieren zu können und deren Größe abzuschätzen.

Je Patient wurden dann vom Pathologen bis zu 3 unterschiedliche Tumorherde ausgewählt.

Die Kriterien für die Auswahl dieser Tumorherde waren zum einen eine ausreichende Größe, um eine Stanze für den TMA zu entnehmen, des Weiteren sollte es sich um möglichst voneinander deutlich getrennte Herde handeln und es sollte möglichst ein Herd auf jeder Seite der Prostata ausgewählt werden.





**Abbildung 5:** Mapping einer Prostata mit eingezeichneten Tumorherden

Zusätzlich wurde vom Pathologen auf einem der ausgewählten Schnitte ein möglichst repräsentativer Bereich mit benignem Gewebe eingezeichnet.

Als nächstes wurden die den bis zu 3 Schnitten zugehörigen Paraffinblöcke aus dem Archiv des pathologischen Instituts Tübingen entnommen. Die Paraffinblöcke der Vergleichsgruppe mit einer benignen Prostatahyperplasie wurden jeweils komplett aus dem Archiv entnommen.

## **II.3.2 Tissue Micro Array (TMA)-Technik**

### **II.3.2.1. Allgemeines**

Bei der *Tissue microarray* Technik (TMA) handelt es sich um ein Hochdurchsatzverfahren um viele Gewebeproben in kurzer Zeit mit verschiedenen Biomarkern anzufärben und zu untersuchen. Die Technik wurde erstmals 1998 beschrieben [78] und hat sich in der onkologischen Forschung als kosten- und zeiteffizientes Verfahren erwiesen [79].

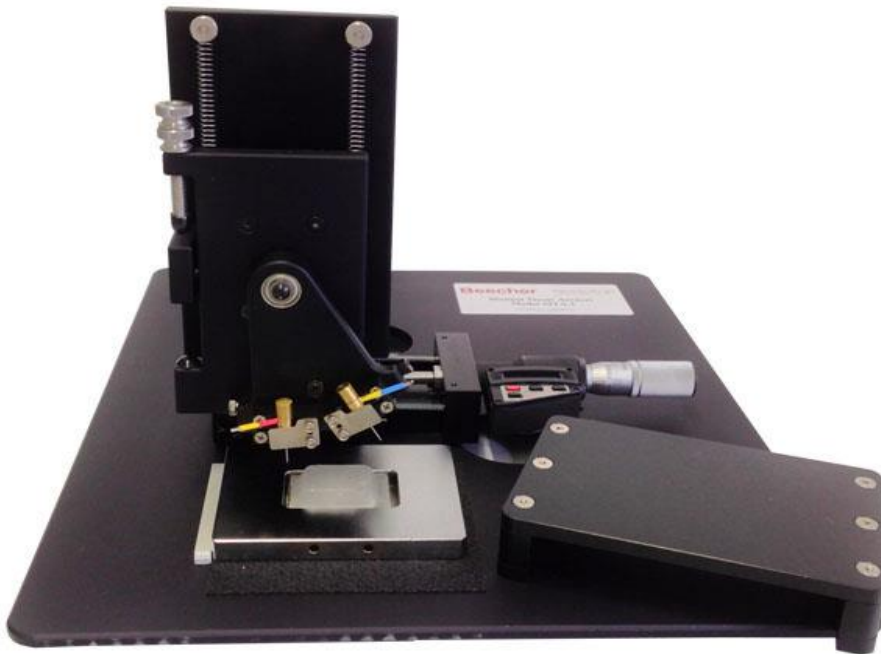
Dabei werden mittels eines Tissue-Microarrayers Stanzen mit einem Durchmesser von 0,6 mm aus Tumorgewebe entnommen und zur weiteren Aufarbeitung in einen Empfänger-Paraffinblock gesetzt, aus welchem sich dann histologische Schnitte erstellen lassen. Somit ergeben sich auf einem Objektträger multiple Gewebelockausschnitte, welche sich je nach Fragestellung mit verschiedenen immunhistochemischen Färbungen versehen lassen und mikroskopiert werden können.

### **II.3.2.2. Herstellung des TMA**

Bevor es zu einer Weiterverarbeitung und Herstellung des Arrays kam, wurden die bereits mikroskopierten Objektträger mit eingezeichneten Tumorherden erneut anhand ihrer anatomischen Lage auf einer Platte ausgebreitet. Dies geschah für jeden Patienten separat. Das sich hieraus ergebende multifokale Wachstumsmuster im dreidimensionalen Raum wurde genutzt, um die 3 nach obigen Kriterien ausgewählten Tumorherde anhand ihrer Makroskopie der geschätzten Größe im Raum zu ordnen. Der raummäßig geschätzte größte Tumorherd wurde als G1 bezeichnet, der zweitgrößte mit G2 und der kleinste mit G3.

Bei der Durchführung des TMA wurden die entsprechenden Objektträger über den jeweiligen zugehörigen Paraffinblock gelegt, um den Block im Tumorbereich Stanzen zu können.

Pro Tumorherd wurden 2 Stanzen entnommen. Hierzu wurde der Tissue Microarrayer MTA I (Beecher Instruments Inc., Sun Prairie, USA) verwendet. (siehe Abbildung 6).



**Abbildung 6:** Manual Tissue Arrayer MTA-1, Quelle: [www.alphamatrix.de](http://www.alphamatrix.de)

Aus den Spenderblöcken (*Donor-Blöcke*) wurden Stanzen mit einem Durchmesser von 0,6 mm ausgestanzt. Handelte es sich um dünne Gewebsblöcke, so wurden mehrere Stanzen innerhalb des eingezeichneten Areals direkt nebeneinander entnommen und im Zielblock (*Recipient-Block*) übereinandergestapelt. Dies wurde entsprechend auf dem Auswertungsbogen vermerkt.

Auch aus dem eingezeichneten Bereich für Normalgewebe wurden nach dem gleichen Prinzip zwei Stanzen entnommen.

Aus dem Gewebe der Kontrollgruppe wurden jeweils nach demselben Vorgehen 2 Stanzen entnommen. Im Zielblock (leerer Paraffinblock) wurden als Landmarken einzelne Stanzen aus paraffinierter Schweineleber eingefügt, um später eine sichere Identifikation einzelner Blöcke sowie die Lage aller Gewebeproben zueinander zu gewährleisten. Der Abstand der einzelnen Gewebelockausschnitte (*Dots*) betrug 1,8 mm zueinander. Ein Paraffinblock enthält  $8 \times 8 = 64$  Gewebelockausschnitte. Insgesamt wurden 9 dieser Blöcke erstellt.

### **II.3.3. Immunhistochemie**

#### **II.3.3.1. Allgemeines zur Immunhistochemie**

Die Immunhistochemie ist ein Verfahren, bei welchem Proteine mit Hilfe von markierten Antikörpern sichtbar gemacht (angefärbt) werden können und somit Rückschlüsse auf deren Expression gezogen werden können [80].

Man unterscheidet hierbei die direkte und die indirekte Methode der Immunhistochemie.

Bei der direkten Methode bindet ein Antikörper, welcher beispielsweise Fluoreszin-markiert ist direkt an das entsprechende Antigen und macht dieses nach Zugabe eines Substrates sichtbar.

Bei der indirekten Methode (welche hier angewendet wurde) bindet zunächst der sogenannte Primärantikörper an das gesuchte Antigen. In einem zweiten Schritt wird der Sekundärantikörper hinzugefügt, welcher farbmarkiert ist und spezifisch an den Primärantikörper bindet. Auch hier wird nach Bindung ein Substrat umgesetzt, um eine Anfärbung zu erreichen.

Zur Verstärkung des Signals (Amplifikation) kann bei dieser Methode noch ein weiterer markierter Antikörper hinzugefügt werden. Dies eignet sich bei geringer Menge des Antigens, jedoch wird eine Hintergrundreaktion hervorgerufen, (beispielsweise durch endogene Peroxidase, was das Färbegergebnis insgesamt unspezifischer macht [81, 82].

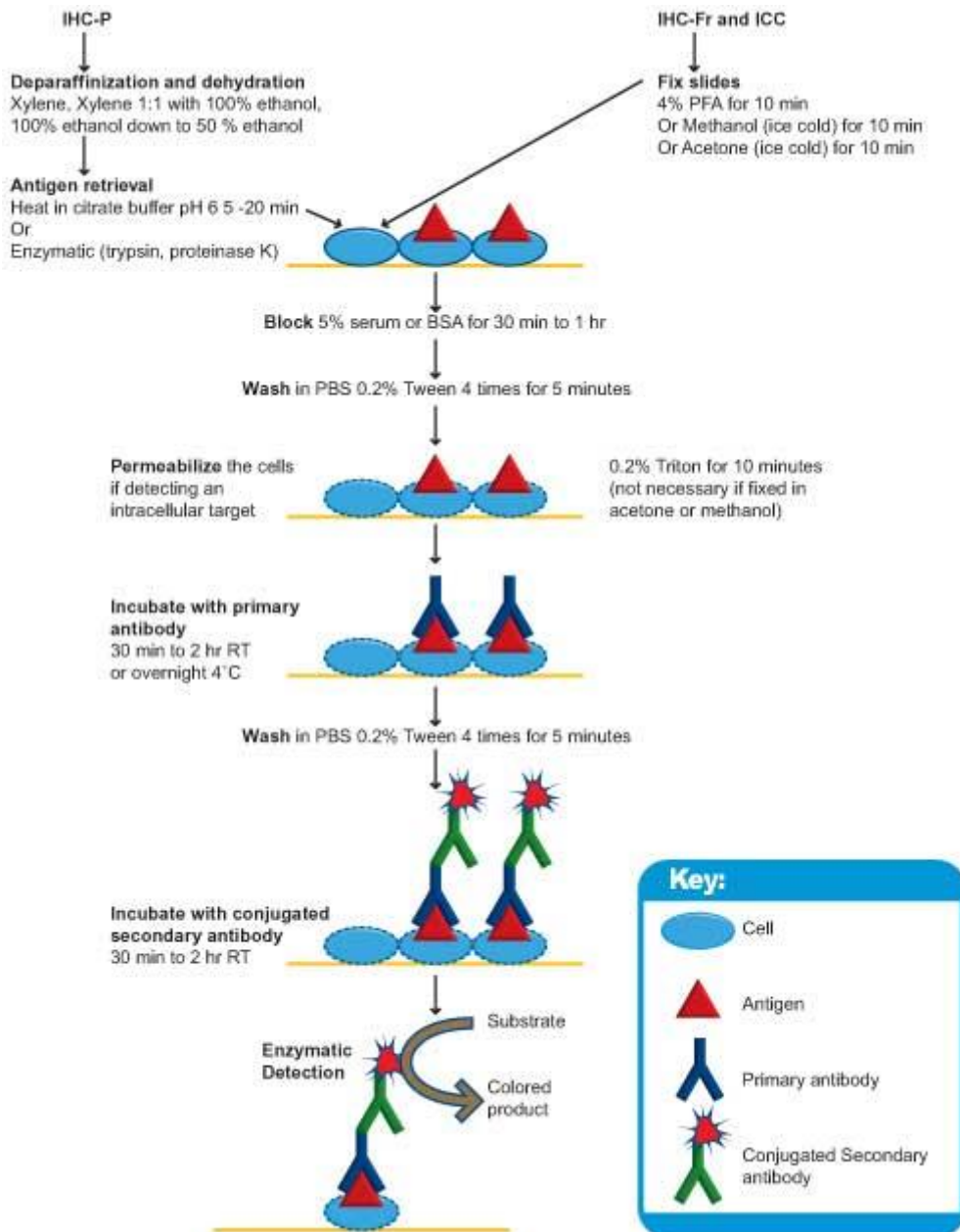


Abbildung 7: Prinzip der indirekten Immunhistochemie, ABCAM.com

### II.3.3.2. Durchführung der immunhistochemischen Färbungen

Aus den oben beschriebenen 9 Paraffinblöcken wurden im Anschluss Schnitte auf Objektträgern angefertigt und immunhistochemisch angefärbt.

Zunächst wurde, um die Gewebestanden und das umliegende Paraffinmaterial anzugleichen, ein Erwärmen auf 37°C im Wärmeschrank (ED 35, WTB Binder, Tuttingen, Deutschland) durchgeführt.

Mit Hilfe eines Mikrotoms (RM 2125RT, Leica, Nußloch) wurden Schnitte von 4-6 µm Dicke angefertigt und auf Objektträger aufgezogen.

Pro Block wurden 3 Färbungen durchgeführt: Eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung und je eine mit RANK- und RANKL-Antikörpern. Die so gefärbten Objektträger wurden im Kühlschrank gelagert, um die Färbung bestmöglich bis zur Mikroskopie zu konservieren. Somit resultierten 27 Objektträger mit jeweils 64 Gewebelockausschnitten.

### **II.3.3.3. RANK-Färbung**

Zunächst wurden die Gewebelockausschnitte entparaffiniert mit Xylol (3 mal 10 Minuten) und im nächsten Schritt mit Ethanol rehydriert (2 mal 7 Minuten 100% Alkohol, 2 mal 7 Minuten 96% Alkohol, 1 mal 7 Minuten 70% Alkohol). Dies diente der Wiederherstellung der Antigenpräsentation, welche durch die Fixierung in Paraffin abgeschwächt wurde.

Ein Peroxidaseblock wurde in 3%igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 20 Minuten durchgeführt. Dies diente der Hemmung der endogenen Peroxidase, um das Färbeergebnis spezifischer zu machen.

Im Anschluss daran wurde das Material einmalig 5 Minuten mit *Aqua dest.* für 5 Minuten gewaschen.

Der nächste Schritt war die Demaskierung zur Intensivierung der immunhistochemischen Färbung. Hierzu wurden die Präparate in einem Citratpuffer, bei einem pH-Wert von 6,0 für 45 Minuten in der Mikrowelle (Moulinex Mikro-Chef MO 500, Moulinex, Alençon, Frankreich) bei 600 Watt (Stufe 2) gekocht und anschließend 30 Minuten bei Raumtemperatur abgekühlt.

In einem weiteren Schritt wurden die Präparate zweimal für 5 Minuten mit TBST (0,05M Triss, pH7,6; 0,15M NaCl; 0,1% Tween 20) gewaschen.

Der Primärantikörper RANK (human RANK/TNFRSF11A Antibody, Monoclonale Mouse IgG2a Clone # 80707, R&D SYSTEMS, Minneapolis, USA) wurde in einer Verdünnung von 1:600 (Verdünnungsmedium Dako Diluent S0809, Dako, Glostrup, Dänemark) aufgetragen und über Nacht bei 4°C im Kühlschrank inkubiert.

Dann wurden die Objektträger erneut dreimal für 5 Minuten mit TBST gewaschen.

Dann wurde als Link der ADVANCE HRP Link (anti rabbit SAK, ABCAM, Cambridge, USA) für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin erfolgte eine erneute Waschung mit TBST wieder für dreimal 5 Minuten.

Als Enzym wurde dann das ADVANCE HRP Enzyme (Code K4067, ABCAM, Cambridge, USA) für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte wieder eine Waschung mit TBST für 3 mal 5 Minuten.

Als Farbsubstrat wurde Liquide DAB + Substrate Chromogene System (Code K3467, Merck, Darmstadt, Deutschland) für 5 Minuten inkubiert.

Anschließend erfolgte die Gegenfärbung für 30 sec mit Hämatoxylin nach Mayer und 7 Minuten bläuen in Leitungswasser.

Die Dehydration erfolgte mit 96%igem Ethanol für 2x3 min, dann mit 100%igem Alkohol für 2x5 Minuten und dann 3x5 Minuten mit Xylol. Abschließend erfolgte das Eindecken mit VectaMount (VectaMount Mounting Medium (H-5000), Vector Laboratories, Burlingame, USA).

So konnte eine zytoplasmatische Färbung im Prostatagewebe erreicht werden.

#### **II.3.3.4. RANKL-Färbung**

Zunächst wurden die Gewebelockausschnitte mit Xylol entparaffiniert (3 mal 10 Minuten) und im nächsten Schritt mit Ethanol rehydriert (2 mal 7 Minuten mit 100% Alkohol, 2 mal 7 Minuten mit 96% Alkohol, 1 mal 7 Minuten mit 70% Alkohol). Ein Peroxidaseblock wurde in 3%igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 20 Minuten durchgeführt. Auch hier diente dies zur Verbesserung des Färbeergebnisses durch Blockade der endogenen Peroxidase.

Dann wurde das Material einmalig 5 Minuten mit TBST (0,1 M Triss, pH7,6; 0,15M NaCl) gewaschen.

Der nächste Schritt war die Demaskierung. Hierzu wurden die Präparate in 10 mM Citratpuffer, bei einem pH-Wert von 6,0 für 20 Minuten in der Mikrowelle (Moulinex Mikro-Chef MO 500, Moulinex, Alençon, Frankreich) bei 600 Watt (Stufe 2) gekocht und anschließend 30 Minuten bei Raumtemperatur im Puffer abgekühlt.

Als Avidin/Biotin-Blocking Kit wurde das Vector Blocking-Kit SP-2001 (Vector Laboratories, Burlingame, USA) verwendet.

Zunächst wurde die Avidin-Solution für 15 Minuten inkubiert, dann zweimal mit TBST für 5 Minuten gewaschen, dann die Biotin-Solution für ebenfalls 15 Minuten inkubiert und dann wieder zweimal für 5 Minuten mit TBST gewaschen.

Der Primärantikörper Anti-RANKL (Anti-RANKL Antibody ab9957 ABCAM, Cambridge, USA) wurde in einer Verdünnung von 1:300 (Verdünnung Dako Real Antibody Diluent, (Dako, Glostrup, Dänemark) für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und erneut dreimal 5 Minuten im TBST gewaschen.

Der Sekundärantikörper (Fertigreagenz aus Kit, Testkit EnVision, Code K5355, Dako, Glostrup, Dänemark) wurde im Folgenden für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert mit folgender TBST-Waschung (3x5 Minuten).

Als Streptavidin-Biotin-Komplex wurde das Fertigreagenz aus dem Kit (Code K5007, Dako REA EnVisio Detection System, Peroxidase/DAB+, Dako, Glostrup, Dänemark) 30 Minuten inkubiert mit anschließender TBST-Waschung (dreimal 5 Minuten).

Als Farbsubstrat wurde dann DAB aus dem Kit (1000 µl Substratpuffer + 20 µl DAB) für 2 Minuten inkubiert und zweimal für 5 Minuten mit *A. dest* gewaschen. Anschließend erfolgte die Gegenfärbung für 30 sec mit Hämatoxylin nach Meyer und 7 Minuten bläuen in Leitungswasser.

Die Dehydration erfolgte mit 96%igem Ethanol für 2x3 Minuten, dann mit 100%igem Alkohol für 2x5 Minuten und dann 3x5 Minuten mit Xylol. Abschließend erfolgte das Eindecken mit VectaMount (VectaMount Mounting Medium (H-5000), Vector Laboratories, Burlingame, USA).

So konnte ein braunes Farbpigment mit überwiegend membranständigem und zytoplasmatischem und vereinzelt nukleärem Färbemuster erzielt werden.





**Abbildung 8:** Ergebnis: Objektträger mit 64 Gewebelockausschnitten mit RANK-Färbung

#### **II.3.4. Mikroskopie**

Zunächst wurden die einzelnen Gewebelockausschnitte hinsichtlich ihrer Malignität mikroskopiert, um sicher zu gehen, dass bei der Stanze Tumorgewebe getroffen wurde. Es wurde jeder Gewebelockausschnitt in verschiedenen Vergrößerungen mikroskopiert. Hierzu wurde ein Zeiss Universal-Lichtmikroskop (Zeiss Universal, Carl Zeiss, Jena, Deutschland) verwendet.

Zur Übersicht wurde die 100fache Vergrößerung genutzt. Für die Abschätzung der Färbeintensität hauptsächlich die 200fache Vergrößerung. Zur genaueren Differenzierung welche Anteile der Zelle gefärbt sind (Kern, Cytoplasma, Membran) wurde die 400fache Vergrößerung genutzt. Das Drüsenepithel wurde hinsichtlich folgender Malignitätskriterien beurteilt:

- Architekturstörung
- Kernatypien
- Ausschluss einer benignen Läsion [83, 84]

Konnten diese Kriterien nicht erfüllt werden, ging der jeweilige Gewebelockausschnitt nicht in die Auswertung mit ein.

Bei manchen Gewebelockausschnitten wurden bei der Stanze lediglich bindegewebige Anteile getroffen oder es handelte sich um benignes

Prostatagewebe. Bestand der Gewebelockausschnitt nur aus Stromagewebe, wurde sie nicht ausgewertet. Waren in einem Gewebelockausschnitt sowohl malignes als auch benignes Gewebe ausgestanzt worden, so wurde nur das maligne Gewebe innerhalb der Probe beurteilt. Bei den benignen Vergleichs-Gewebelockausschnitten kam es nicht vor, dass auch malignes Gewebe ausgestanzt war.

### **II.3.5. Scoring und semiquantitative Auswertung**

Ein Score wurde erarbeitet, um alle jeweiligen Färbereigenschaften eines jeden einzelnen Gewebelockausschnittes in ein numerisches Punktesystem zu überführen. Dieses Scoringsystem wurde sowohl für die RANK- als auch für die RANKL-Färbung verwendet.

Dieses System bewertet zum einen die Intensität der Färbung, zum anderen die Lokalisation der Färbung.

Als Grundlage dieses Scores diente der von Remmele und Stegner 1987 etablierte *immunoreactive score* (IRS) [85], welcher jedoch, um die Färbelokalisation abbilden zu können, modifiziert wurde.

Bei der Anwendung dieses Scores wurde ausschließlich das Drüsenepithel beurteilt. Umgebendes Stromagewebe wurde nicht beurteilt.

Man entschied sich hier zu einer manuellen Beurteilung ohne Mithilfe einer Software, da es sich zum Teil um sehr heterogenes Gewebe handelte mit unterschiedlichen Färbeintensitäten und etwaigen entzündlichen Infiltraten sowie Anteilen von Stromagewebe, welche nicht in den Score mit eingehen sollten. Entzündliche Lymphozyteninfiltrate zeigten beispielsweise eine sehr starke Anfärbbarkeit und durften nicht in den Score miteingehen.

Obwohl Studien bewiesen haben, dass eine computergestützte Auswertung durchaus mit einer visuellen Auswertung konkurrieren kann, [86] entschieden wir uns, bei teilweise inhomogenem Gewebe und wie oben genannter starker Anfärbbarkeit von nicht malignem Gewebe, zu einer rein visuellen Auswertung.

Mikroskopiert wurde mit unterschiedlichen Vergrößerungen. Mit 100-facher

Vergrößerung, um die prozentuale Größe der unterschiedlich gefärbten Areale zu beurteilen, mit 200facher Vergrößerung, um die genau Lokalisation der Färbung zu erkennen. Hierbei wurde dann unterschieden in zytoplasmatische Färbung, membranständiger Färbung und Färbung des Kerns.

Zunächst wurde die Färbeintensität eines jeden Gewebeblockausschnittes beurteilt. Die Intensität konnte zwischen 0 (=keine Anfärbung) und IV (=maximale Anfärbung) unterschieden werden. Der Grad IV wurde als Referenz anhand von den am stärksten angefärbten Zellen im gesamten Kollektiv gewählt.

Es wurden pro Gewebeblockausschnitt dann bis zu 4 Färbeintensitäten beurteilt. Hierbei wurden die 4 am häufigsten pro Gewebeblockausschnitt vorkommenden Intensitäten gewählt.

Dann wurden die flächenmäßig prozentualen Anteile einer jeden Intensität abgeschätzt.

Zur Ermittlung eines numerischen Scores wurde für jeden Gewebeblockausschnitt der prozentuale Anteil einer Intensität mit deren Wertigkeit multipliziert.

Intensität 0: Multiplikator:0

Intensität I: Multiplikator:1

Intensität II: Multiplikator:2

Intensität III: Multiplikator:3

Intensität IV: Multiplikator:4

So konnte für jeden Gewebeblockausschnitt theoretisch ein Wert zwischen 0 und 400 zur Messung der Gesamtintensität der Färbung ermittelt werden. Das heißt, wenn die Gesamtheit der zu beurteilenden Zellen nicht angefärbt sind, würde sich ein Wert von 0 ergeben. Sind alle zu beurteilenden Zellen maximal angefärbt betrüge der Wert 400. Währen beispielsweise 40 % eines Gewebeblockausschnittes mit der Intensität II und 60 % mit der Intensität III bewertet, so ergäbe sich ein Gesamtwert von  $40 \times 2$  (Intensität II: Multiplikator:2) +  $60 \times 3$  (Intensität III: Multiplikator:3) =  $80 + 180 = 260$ .

Da pro Tumorareal, beziehungsweise pro benigner Kontrolle zwei Gewebelockausschnitte vorlagen, wurden die Werte aus beiden Areal gemittelt und gingen so in die Auswertung ein.

Bezüglich der Lokalisation wurde die Anfärbung im Kern, im Cytoplasma und der Membran beurteilt. Bei komplett fehlender Färbung der jeweiligen Struktur wurde eine 0 notiert. Bei bis zu 10 % Anteil der jeweiligen Struktur ein +.

10-70 % entsprach ++ und bei >70 % angefärbter Struktur wurde +++ auf dem Auswertungsbogen notiert.

Auf Auswertebögen, die in ihrem Aufbau der Gewebelockausschnitt -Anordnung des Objektträgers entsprachen, wurde der jeweilige Score sowie die Färbelokalisation vermerkt. So wurde auf dem Auswertungsbogen für jeden Gewebelockausschnitt also eine Färbeintensität (Zwischen 0 und IV) und ein jeweiliger prozentualer Anteil notiert. In die studienbedingte Datenbank wurden dann pro Gewebelockausschnitt der mittlere Score, welcher aus den zwei auf dem Array befindlichen errechnet wurde, eingetragen. Hierzu wurde der Mittelwert beider für den jeweiligen Gewebelockausschnitt ermittelten Scoring-Werte gebildet.

Alle Gewebelockausschnitte und alle Färbungen wurden in zwei separaten Durchgängen ohne Kenntnis der Ergebnisse des vorherigen Mikroskopierdurchganges mikroskopiert. Anschließend wurden die Ergebnisse verglichen und bei Abweichungen erneut mikroskopiert.

Um eine Korrelation der ermittelten Werte mit dem entsprechende Gleason-Score darzustellen können, wurden die Objektträger erneut von einem erfahrenen Pathologen mikroskopiert, um für jeden einzelnen Gewebelockausschnitt einen Gleason-Score zu ermitteln.

Auch diese Daten wurden aus den Auswertebögen in die Datenbank mit den klinisch-pathologischen Parametern der Patienten übertragen. Es erfolgte eine tabellarische Eintragung der Tumorherde sowie eine Aufteilung in größter, zweitgrößter und drittgrößter bzw. kleinster Tumorherd und eine Aufteilung nach Höhe des Gleason-Scores. Zur weiteren Vorbereitung der Auswertung wurden weitere

Gruppen gebildet. Es wurde die Expression von RANK und RANKL in den Arealen entsprechend der Größe und entsprechend der Höhe des Gleason eingetragen. Eine weitere Codierung wurde vorgenommen. So entsprach die Codierung 0 der höchsten Expression von RANK bzw. RANKL weder im größten Areal noch im Areal mit dem höchsten Gleason-Score.

Die Codierung I entsprach der höchsten Expression im größten Areal ohne Korrelation zum Gleason-Score. Die Codierung II entsprach der höchsten Expression im größten Areal mit zugleich dem höchsten Gleason-Score. Die Codierung III entsprach der höchsten Expression im Areal mit dem größten Gleason ohne Korrelation zur Größe des Tumorherdes. Ergab sich die Situation, dass der Gleason-Wert in verschiedenen Tumorarealen gleich groß war, erfolgte die weitere Einteilung nach der Größe des Tumorherdes.

### **II.3.6. Bestimmung von sRANKL und OPG im Serum**

10 ml peripher-venöses Blut wurden im Rahmen der präoperativen Blutentnahme ohne zusätzliche Punktion einen Tag vor der radikalen Prostatektomie beziehungsweise der TUR-P /Prostataenukleation entnommen. Das Blut wurde anschließend zentrifugiert und bei -80° C eingefroren.

Aus diesen Proben wurden dann mittels ELISA (*enzyme linked immuno sorbent assay*) die Serumkonzentrationen von sRANKL und OPG bestimmt. Hierzu wurden ELISA-Kits der Firma Immundiagnostik AG (Bensheim, Deutschland, Nr. K1016 und Nr. 1011) entsprechend den Herstellerangaben verwendet.

Der Test zur sRANKL-Bestimmung basiert auf der Sandwich-ELISA-Technik. Es werden zwei ausgewählte Antikörper, die humanes sRANKL und OPG erkennen, verwendet.

Teststandards, Kontrollen, verdünnte Patientenproben, die sRANKL enthalten, und die OPG-Lösung wurden in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert, welche mit einem hochaffinen polyklonalen anti-human-OPG-Antikörper beschichtet waren. In diesem ersten Inkubationsschritt wurde das sRANKL aus der Probe an das OPG gebunden und von dem gekoppelten Fängerantikörper an die

Mikrotiterplatte gebunden. Dann wurde der Detektionsantikörper (ein biotinmarkierter monoklonaler anti-sRANKL-Antikörper) zugegeben und es bildete sich folgender Komplex an der Wand der Mikrotiterplatte:

Fängerantikörper –humanes OPG – sRANKL – Detektionsantikörper.

Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe eines Streptavidin-Peroxidase-Konjugats, das spezifisch an Biotin bindet. Als Peroxidasesubstrat wurde Tetramethylbenzidin (TMB) eingesetzt.

Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von Säure abgestoppt. Dadurch erfolgte ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die entstandene chromogene Verbindung wurde photometrisch bei 450nm gemessen. Die Intensität der Farbe war dem total sRANKL-Gehalt direkt proportional. Anhand einer mitgeführten Standardkurve – optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration – ließ sich die Konzentration der Probe ermitteln [87]. Die Konzentrationen wurden mittels eines Anthos 2010 Readers (Anthos Mikrosysteme GmbH, Krefeld, Deutschland) bei 450 nm gemessen.

Der Test zur OPG-Bestimmung basiert ebenfalls auf der Sandwich-ELISA Technik. Es wurden spezifische Antikörper, die gegen OPG gerichtet sind, verwendet. Standards, Kontrollen und verdünnte Patientenproben, die auf OPG zu untersuchen sind, wurden in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert, welche mit einem polyklonalen Ziege-anti-OPG-Antikörper beschichtet waren. In diesem ersten Inkubationsschritt wird OPG aus der Probe von dem Primärantikörper an die Mikrotiterplatte gebunden. Dann wurde ein monoklonaler mit Biotin markierter Maus-anti-OPG-Antikörper zugegeben. Der nächste Schritt war die Zugabe des Streptavidin-Peroxidase-Konjugats und es bildete sich folgender Komplex an der Wand der Mikrotiterplatte:

1. Antikörper – OPG–biotinylierter Antikörper – Streptavidin-Peroxidase-Konjugat.

Als Peroxidasesubstrat wurde Tetramethylbenzidin eingesetzt. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von Säure abgestoppt. Dadurch erfolgte ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die entstandene chromogene Verbindung wurde photometrisch bei 450 nm gemessen. Die Intensität der Farbe war dem OPG-Gehalt

direkt proportional. Aus den Konzentrationen der mitgeführten Standards wurde eine Standardkurve auf Millimeterpapier erstellt, anhand der die Konzentrationen der Proben ermittelt wurden [88].

Die Konzentrationen wurden mittels eines Anthos 2010 Readers (Anthos Mikrosysteme GmbH, Krefeld, Deutschland) bei 450 nm gemessen.

### **II.3.7. Bestimmung von RANKL und OPG im Knochenmark**

2 ml des im Rahmen der Prostatektomie aus der anterioren *Crista iliaca* gewonnenen Knochenmarks (Siehe Abb. 4) wurden zentrifugiert und der entstandene Überstand abpipettiert.

In diesem Überstand wurden das lösliche RANKL (sRANKL) sowie OPG bestimmt.

Das hierbei gewonnene Knochenmarkserum wurde mittels ELISA auf die Konzentrationen von löslichem OPG und RANKL untersucht.

Dies erfolgte analog der Bestimmung der sRANKL- und OPG-Konzentration im Blutserum (siehe oben).

### **II.3.8. Weitere Serum-Marker**

Von den präoperativ routinemäßig bestimmten Laborparametern wurde besonderes Augenmerk auf das PSA (siehe I.1.5.2.) als direkter Tumormarker für das Prostatakarzinom sowie auf das Serum-Calcium und die LDH als Parameter des Knochenumbaus beziehungsweise als allgemeiner Tumormarker gelegt. Es ist bekannt, dass bei ossärer Metastasierung durch einen vermehrten Calcium-Einbau in den Knochen erniedrigte Serum-Calcium-Konzentrationen gemessen werden können [89]. Die Laktatdehydrogenase als bereits etablierter allgemeiner Tumormarker besitzt auch einen prognostischen Wert beim Prostatakarzinom. [90]

### **II.3.9. Statistische Auswertung**

Die aus den oben genannten Verfahren gewonnenen Daten wurden in eine Microsoft Excel 2011<sup>®</sup> (Microsoft Germany, Unterschleißheim, Deutschland)

Tabelle eingetragen.

Hier erhielt jeder Fall (also jeder Patient) eine Zeile der Tabelle.

Neben Stammdaten wie Alter, Größe, BMI sowie Laborwerten (Hb, Ca, PSA) wurden dann die im Rahmen der Studie gewonnenen Daten eingetragen. Also die Serum-Konzentrationen von sRANKL und OPG sowie die entsprechenden Werte aus der Analyse des Knochenmarks. Schließlich erfolgte die Eintragung der studienbedingt erhobenen Werte aus der immunhistochemischen Untersuchung des Prostata-Tissue-Microarrays.

Bei der weiteren statistischen Auswertung wurden die Häufigkeitsverteilungen für die Studien- und die Kontrollgruppe bezüglich präoperativer Laborparameter, Patientenstammdaten (Alter, Gewicht, BMI) sowie Gleason-Score und TNM-Stadien mit Mittel-, Maximal- und Minimalwert sowie der Medianwert ermittelt. Gleiches geschah für die ermittelten Expressionswerte der Immunhistochemie sowie der studienbedingten Spiegel im Serum und Knochenmark.

Zur statistischen Auswertung der Heterogenität, also der Unterschiedlichkeit der verschiedenen Tumorareale bezüglich der absoluten RANK- und RANKL-Expression, erfolgten nichtparametrische Vergleiche der jeweiligen Gruppen mittels des Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Tests und anschließend für jedes Paar mittels des Wilcoxon-Tests als nachgeschaltetem ‚post hoc‘ Test.

Dann wurden die Expressionen von RANK und RANKL in den unterschiedlichen Tumorarealen und im benignen Gewebe je nach Tumorgöße und Gleason-Score ebenfalls mittels Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Test mit nachgeschaltetem Wilcoxon-Test verglichen. Selbiges erfolgte bezüglich der Expressionen im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Ordinale Variablen (gefärbte Kerne) wurden mittels Kontingenzanalysen verglichen und mittels der Likelihood-Methode und des Pearson-Tests getestet. Hier wurde zusätzlich der Cochran-Armitage-Trendtest zum Vergleich der Gewebegruppen bezüglich des ordinal skalierten Merkmals (der gefärbten Kerne) angewendet.



Dann wurden lineare Regressionsanalysen zwischen den Werten der Serumparameter und Ergebnissen der Immunhistochemie durchgeführt.

Die Datensätze wurde mittels JMP 10.0® (SAS Inc., Cary, NC, USA) statistisch ausgewertet.

### **II.3.10. Datenschutz**

Alle persönlichen Patientendaten wurden unter strengen Datenschutzauflagen sowie unter Beachtung des Datenschutzgesetzes erfasst und in anonymisierter Form verarbeitet. Die Erhebung der patientenbezogenen, klinischen und persönlichen Daten vor deren Anonymisierung erfolgte ausschließlich durch an der Studie mitwirkenden und zugleich der Schweigepflicht unterliegenden Personen. Alle Daten wurden anonymisiert vor der Weiterverarbeitung, so dass aus der studienbedingt angelegten Tabelle keine Rückschlüsse auf die Identität der Patienten mehr gezogen werden konnte. Die Tabellen wurden zusätzlich stets durch Passwörter geschützt, um unbefugten Zugriff zu unterbinden.

### **II.3.11. Verwendete Software**

Datenbankerstellung: Microsoft Excel 2011® (Microsoft Germany, Unterschleißheim, Deutschland)

Statistische Auswertung: JMP 10.0® (SAS Inc., Cary, NC, USA)

Verfassung der Dissertation: Microsoft Word 2016® (Microsoft Germany, Unterschleißheim, Deutschland)

Literaturverwaltung: Endnote X7® (Thomson Reuters, NY, USA)

### III. Ergebnisse

#### III.1. Eigenschaften des Kollektivs

##### III.1.1. Studiengruppe

##### III.1.1.1. TNM-Klassifikation im Kollektiv

Die im Patientenkollektiv vertretenen Tumorstadien sind in nachfolgender Tabelle 2 dargestellt.

Tumorstadium	Anzahl (n)
Tumorstadium T2a	8
Tumorstadium T2b	1
Tumorstadium T2c	37
Tumorstadium T3a	11
Tumorstadium T3b	3

**Tabelle 2:** Häufigkeiten (n) der Tumorstadien T nach TNM-Klassifikation in der Studiengruppe

Die weiteren Charakteristika des Patientenkollektivs nach der TNM-Klassifikation sind in Tabelle 3 dargestellt.

Lymphknotenstatus N	N0: 58 Patienten	N1: 2 Patienten
Invasion in Lymphgefäße L	L0: 59 Patienten	L1: 1 Patient
Invasion in Venen V	V0: 58 Patienten	V1: 2 Patienten
Residualtumor R	R0: 44 Patienten	R1: 16 Patienten

**Tabelle 3:** Darstellung von N, L, V und R nach TNM-Klassifikation

##### III.1.1.2. Gleason-Score im Kollektiv

Der Gleason-Score im Kollektiv lag im Mittel bei 7,47. Das Minimum lag bei einem Gleason-Score von 5, das Maximum bei 9. (siehe Tabelle 4)

Gleason-Score	Anzahl (n)
Gleason 5	2
Gleason 6	6
Gleason 7a	26
Gleason 7b	18
Gleason 8	5

**Tabelle 4:** Häufigkeiten (n) des Gleason-Score in der Studiengruppe**III.1.1.3. Allgemeine Patientendaten und präoperative Laborwerte**

Die Studiengruppe mit nachgewiesenem Prostatakarzinom, bestehend aus 60 Patienten (Rekrutierung etc. siehe oben), wies ein mittleres Alter von 65,7 Jahren auf. Die ermittelten klinischen Daten sowie Daten aus der Serologie sind in Tabelle 5 dargestellt.

	<b>Patienten mit Prostatakarzinom</b>
<b>Anzahl</b>	60
<b>Mittleres Prostatavolumen</b>	52,5 g
	(Median 46; Spanne 20 - 352)
<b>Mittleres PSA</b>	8,3 ng/ml
	(Median: 6,9; Spanne: 1,5-28,9)
<b>Mittleres Gewicht</b>	82,3 kg
	(Median: 81; Spanne: 61-117,5)
<b>Mittlerer BMI</b>	26,6
	(Median: 26,5; Spanne: 21,7-37,9)
<b>Mittleres Hämoglobin</b>	14,8 g/dl
	(Median 15,1; Spanne: 11,4 - 17,1)
<b>Mittleres CRP</b>	0,1 mg/l
	(Median 0,06; Spanne 0,01 - 1,15)
<b>Mittleres Calcium</b>	2,3 mmol/l
	(Median 2,3; Spanne 1,9 - 2,5)
<b>Mittlere LDH</b>	170,2 U/l
	(Median 170; Spanne 81 - 261)
<b>Mittlere Leukozyten</b>	7309/ $\mu$ l
	(Median 7005; Spanne 3630 - 14810)
<b>Mittlere Thrombozyten</b>	269 Tausend/ $\mu$ l
	(Median 252000; Spanne 147000 - 562000)

**Tabelle 5:** Klinische Daten und Daten aus dem Serum der Studiengruppe

### III.1.2. Kontrollgruppe

#### III.1.2.1. Allgemeine Patientendaten und präoperative Laborwerte

Die Kontrollgruppe, bestehend aus 20 Patienten (Rekrutierung etc. siehe oben) mit benigner Prostatahyperplasie, ohne Nachweis von Malignität, wies ein mittleres Alter von 72,3 Jahren und ein mittleres Prostatavolumen (sonographisch bestimmt) von 64,9 ml auf. Die hier dargestellten Daten aus Serum wurden präoperativ bei der standardmäßigen venösen Blutentnahme gewonnen. Die klinischen Daten wurden aus dem Krankenhaus-Informationssystem entnommen. Die so ermittelten klinischen Daten sowie Daten aus der Serologie sind in Tabelle 6 dargestellt.

	<b>Patienten ohne Prostatakarzinom</b>
<b>Anzahl</b>	20
<b>Mittleres Prostatavolumen</b>	64,9 ml
	(Median 61; Spanne 10-130)
<b>Mittleres PSA</b>	6,9 ng/ml
	(Median 4; Spanne 1,2 - 34)
<b>Mittleres Gewicht</b>	86,5 kg
	(Median 86; Spanne 63,7 - 118,5)
<b>Mittlerer BMI</b>	28,9
	(Median 27; Spanne 22,8 - 38,3)
<b>Mittleres Alter</b>	72,3 Jahre
	(Median 72; Spanne 57 - 86)
<b>Mittleres Hämoglobin</b>	14,2 g/dl
	(Median 14; Spanne 11 - 16,3)
<b>Mittleres CRP</b>	0,5 mg/dl
	(Median 0,2; Spanne 0,0 - 6,4)
<b>Mittleres Calcium</b>	2,3 mmol/l
	(Median 2; Spanne 2 - 2,5)
<b>Mittlere LDH</b>	167,1 U/l
	(Median 164, Spanne 110 -239)
<b>Mittlere Leukozyten</b>	7732/ $\mu$ l
	(Median 7375; Spanne 5380 - 11380)
<b>Mittlere Thrombozyten</b>	260 Tausend/ $\mu$ l

	(Median 253500; Spanne 186000 - 337000)
--	---

**Tabelle 6:** Klinische Daten und Daten aus dem Serum der Kontrollgruppe

## **III.2. Deskriptive Ergebnisse der studienbedingten Untersuchungen**

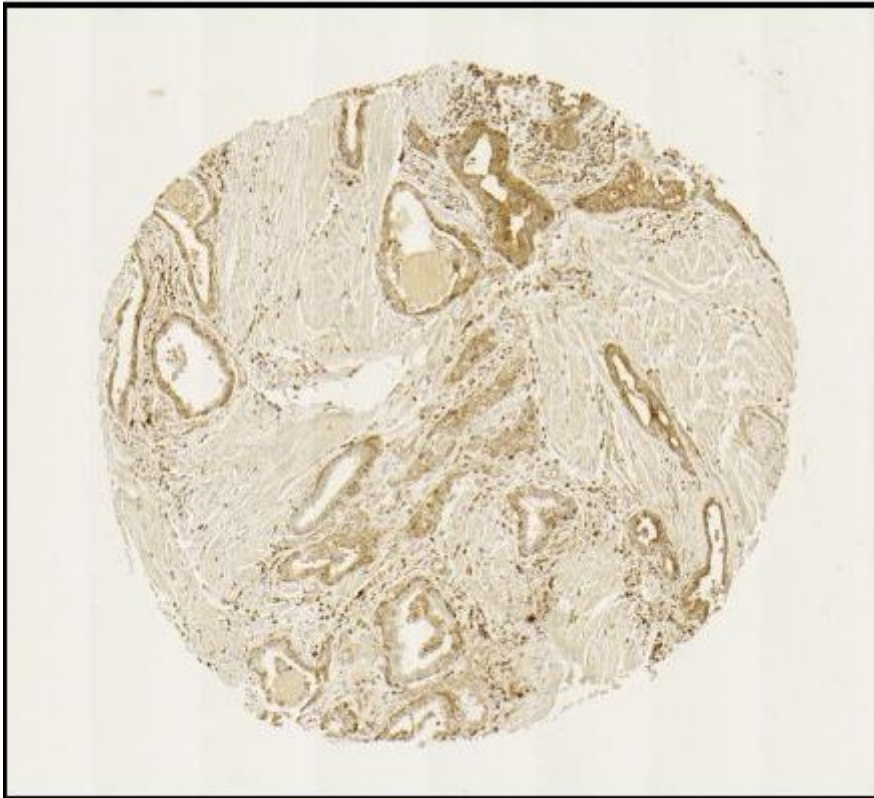
### **III.2.1. Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung**

Von den insgesamt 447 Gewebelockausschnitten (bereits abzüglich der Landmarken aus Schweineleber) gingen 440 Gewebelockausschnitte in die Auswertung ein. Bei 4 dieser nicht ausgewerteten Gewebelockausschnitten handelte es sich um reines Bindegewebe und bei 3 Gewebelockausschnitten handelte es sich um gutartiges Prostatagewebe in Stanzen, in welchen malignes Material erwartet wurde.

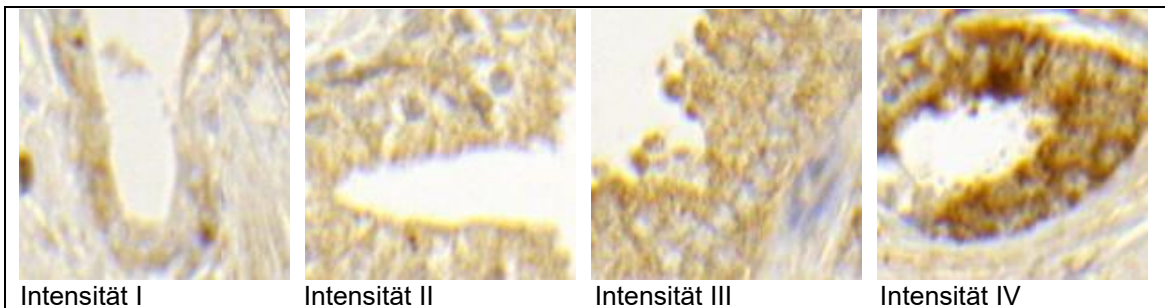
#### **III.2.1.1. Ergebnisse der RANK-Färbung**

Die immunhistochemische Färbung mit dem RANK/TNFRSF11A-Antibody ergab eine überwiegend zytoplasmatische braune Färbung des Gewebes (Siehe Abbildung 9 und 10). Es konnten jedoch auch gefärbte Zellkerne nachgewiesen werden.

Auffällig war eine starke Anfärbbarkeit von entzündlichen lymphozytären Infiltraten. Abgesehen davon fand sich eine verstärkte Färbung der basalen Zellschicht des Drüsenepithels. Diese floss nicht in die Auswertung mit ein.



**Abbildung 9:** Färbeergebnis der RANK-Färbung (Übersicht eines Gewebekblockausschnitts), 25 x Vergrößerung



Intensität I

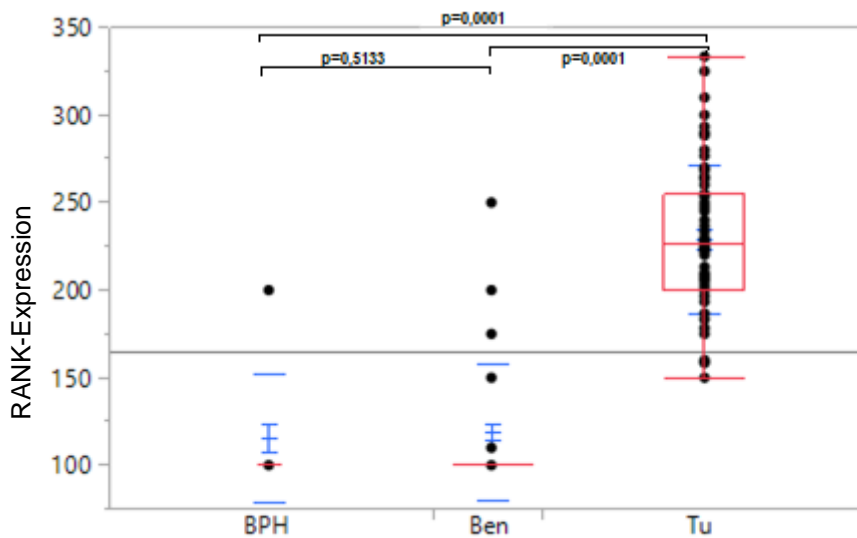
Intensität II

Intensität III

Intensität IV

**Abbildung 10:** Färbintensitäten der RANK-Färbung, 400 x Vergrößerung

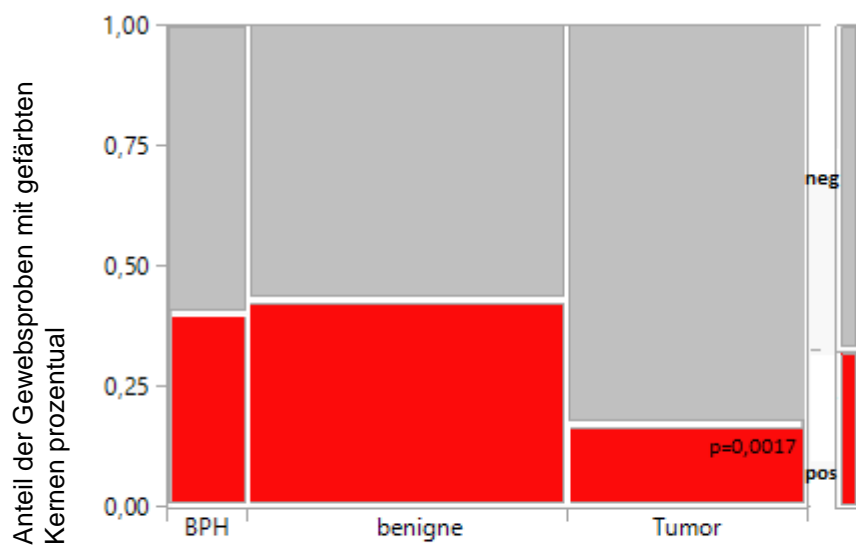
Wie in Abbildung 11 dargestellt, fand sich bezüglich der RANK-Expression in der Immunhistochemie ein Mittelwert von 115 in der Kontrollgruppe (BPH), 118,7 in den benignen angrenzenden Vergleichsproben (Ben) und 228,4 im Tumorgewebe (Tu). Somit zeigte sich ein signifikant höherer Wert im Tumorgewebe im Vergleich zu den nichtmalignen Proben ( $p < 0,0001$ ).



**Abbildung 11:** Vergleich der RANK-Expression in der Kontrollgruppe (BPH), im benignen angrenzenden Gewebe (Ben) und im Tumor (Tu)

### III.2.1.2 Analyse der RANK-positiven Zellkerne

Es fanden sich deutlich weniger RANK positive Kerne in den malignen Proben als in den benignen Proben. Im gutartigen angrenzenden Gewebe fanden sich in 43,3 % der Proben positive Kerne, während sich im malignen Gewebe in einem kleineren Teil RANK positive Zellkerne nachweisen ließen (16,7 %). In der Kontrollgruppe waren ähnlich zur benignen Gruppe 40 % positive Kerne. Bei  $p=0,0017$  für den Cochran-Armitage-Trendtest zeigten sich im malignen Gewebe signifikant weniger gefärbte Zellkerne. Siehe und Abbildung 12.

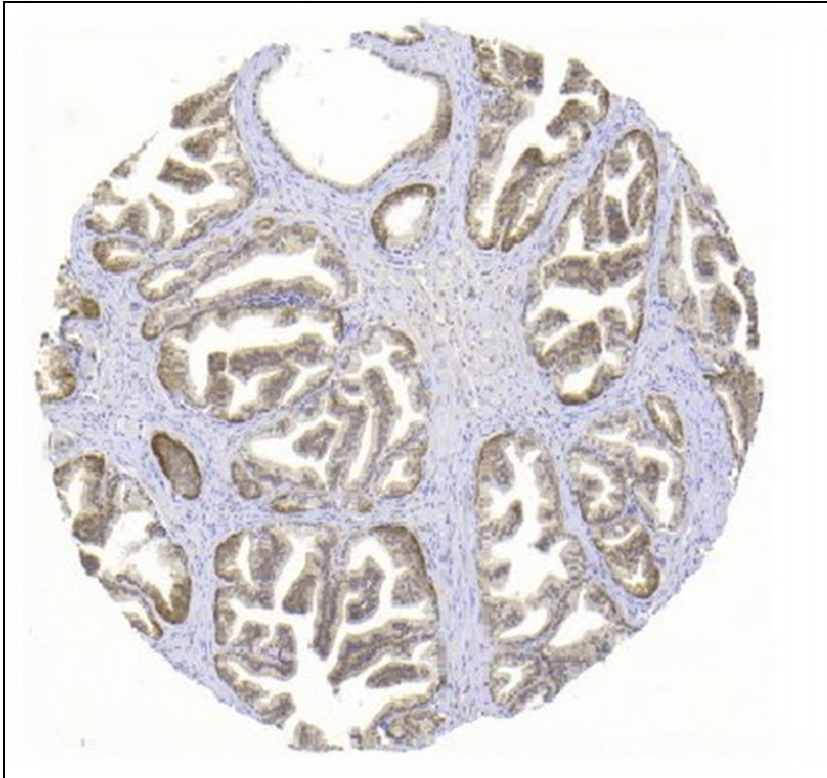


**Abbildung 12:** Graphische Darstellung der Tumorproben mit Nachweis von RANK-gefärbten Kernen (rote Farbe) unterteilt nach Tumorarealen (Tumor), angrenzendem benignem Gewebe in tumortragenden Prostata (benigne) und aus BPH-Gewebe der Kontrollgruppe (BPH).

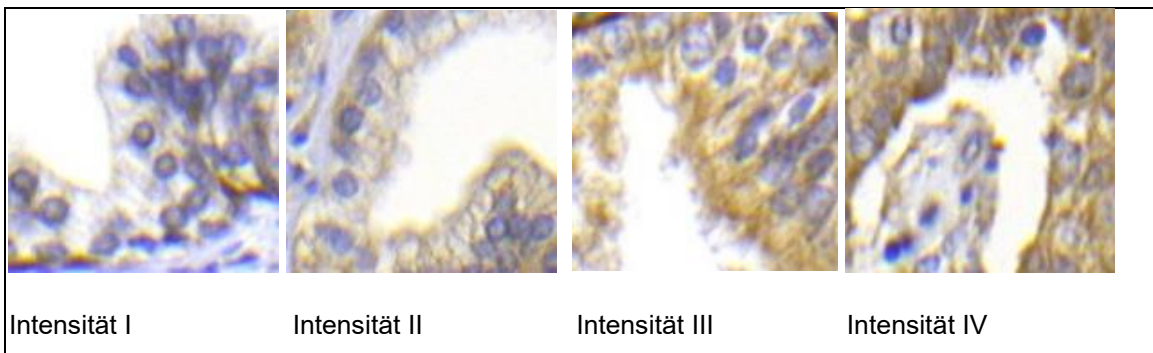
### III.2.1.3. Ergebnisse der RANKL-Färbung

Die immunhistochemische Färbung mit dem Anti-RANKL-Antibody zeigte sich mikroskopisch als braunes Farbpigment, welches überwiegend membranständig und zytoplasmatisch zu beobachten war, jedoch auch mit teilweise nukleärem Färbemuster. Insgesamt zeigte sich eine homogene Färbung des Gewebes (Siehe Abbildung 13 und 14).



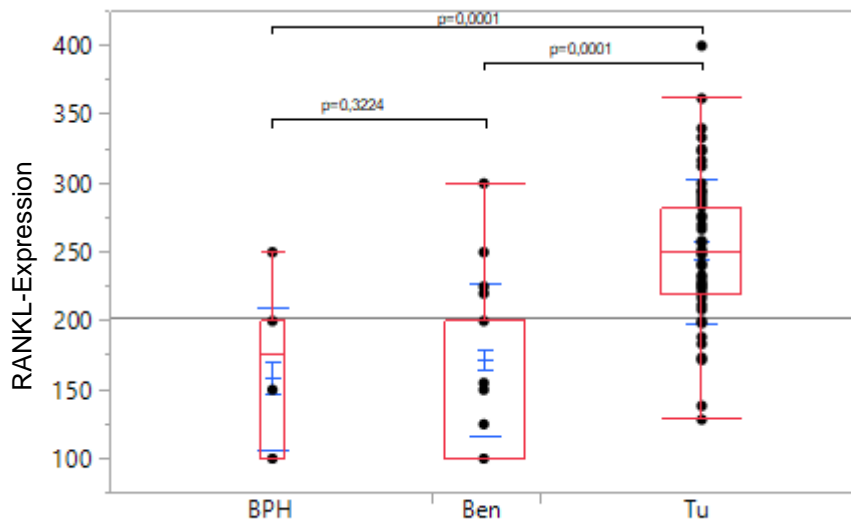


**Abbildung 13:** Färbeargebnis der RANKL-Färbung (Übersicht eines Gewebeblockausschnitts) 25 x Vergrößerung



**Abbildung 14:** Färbearbeitungen der RANKL-Färbung, 400 x Vergrößerung

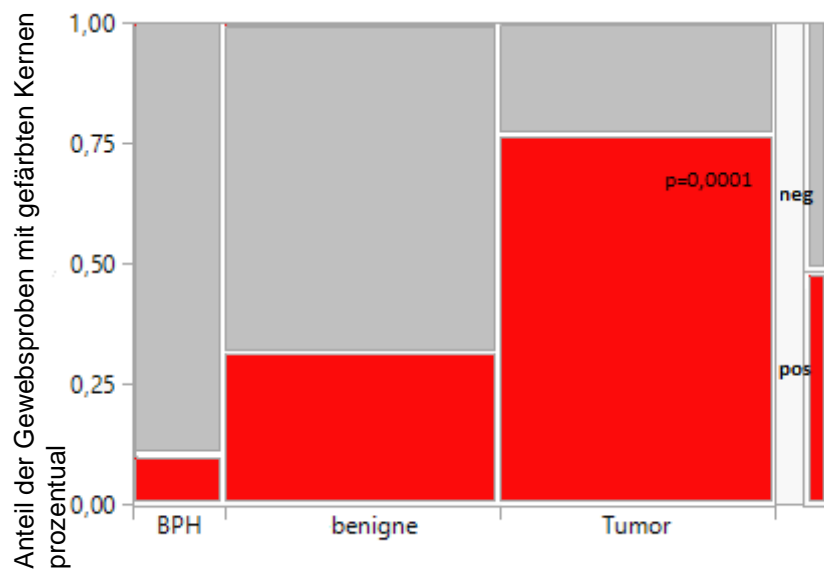
Wie in Abbildung 15 dargestellt, fand sich bezüglich der RANKL-Expression in der Immunhistochemie ein Mittelwert von 157,5 in der Kontrollgruppe (BPH), 171,3 in den benignen angrenzenden Vergleichsproben (Ben) und 250,4 im Tumorgewebe (Tu). Somit zeigte sich ein signifikant höherer Wert im Tumorgewebe im Vergleich zu den nichtmalignen Proben ( $p < 0,0001$ ).



**Abbildung 15:** Vergleich der RANKL-Expression in Tumorarealen (Tu), im angrenzendem benignem Gewebe in tumortragenden Prostata (Ben) und aus BPH-Gewebe der Kontrollgruppe (BPH).

### III.2.1.5. Analyse der RANKL-positiven Zellkerne

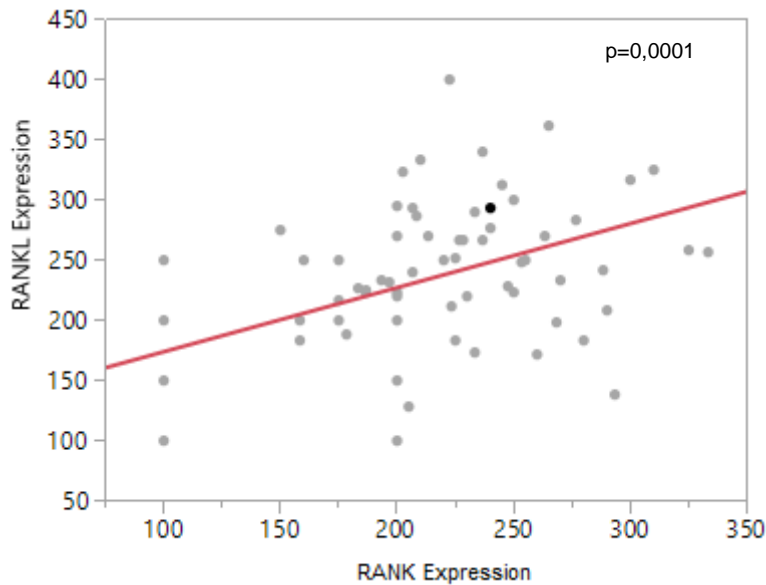
Es fanden sich deutlich mehr RANKL positive Kerne in den malignen Proben als in den benignen angrenzenden Proben. Im malignen Gewebe fanden sich in 80,7 % der Proben positive Kerne während sich im angrenzenden benignen Gewebe in einem kleineren Teil positive RANK positive Zellkerne nachweisen ließen (31,7 %). In den Proben der Kontrollgruppe mit benignen Prostatahyperplasie konnten in 90 % der Fälle keine positiven Kerne beobachtet werden. Es besteht eine Signifikanz bei  $p < 0,0001$  für den Cochran-Armitage-Trendtest. Siehe Abbildung 16.



**Abbildung 16:** Graphische Darstellung der Tumorproben mit Nachweis von RANKL-gefärbten Kernen (rote Farbe) unterteilt nach Tumorealen (Tumor), angrenzendem benignem Gewebe in tumortragenden Prostaten (benigne) und aus BPH-Gewebe der Kontrollgruppe (BPH).

### III.2.1.6. Linearer Zusammenhang der RANK/RANKL Expression im Tumorgewebe

Bei Betrachtung des linearen Zusammenhangs von immunhistochemisch ermittelter Expression von RANK und RANKL im Tumorgewebe zeigte sich eine signifikante positive Relation ( $p=0,0001$ ). Siehe Abbildung 17.



**Abbildung 17:** Linearer Zusammenhang der RANK- und der RANKL-Expression im Tumorgewebe von Prostata in mikroskopisch ermittelten Score-Punkten

### III.2.2. Studienbedingte Ergebnisse aus Knochenmark und Serum

Tabelle 7 zeigt die studienbedingt erhobenen Werte von sRANKL und OPG im Serum und Knochenmark sowie die im Knochenmark nachweisbaren disseminierten Tumorzellen bezogen auf die Studiengruppe.

<b>Mittleres OPG im Serum</b>	64,3 pg/m
	(Median 67,8; Spanne 30 - 109,6)
<b>Mittleres sRANKL im Serum</b>	239,5 ng/ml
	(Median 17,7; Spanne 15,6 - 2871,8)
<b>Mittlere Ratio sRANKL/OPG im Serum</b>	4209,4
	(Median 235,6; Spanne 0,17 - 52775,2)
<b>Mittleres OPG im Knochenmark</b>	55,3 pg/ml
	(Median 51,6; Spanne 22,4 - 137)
<b>Mittleres sRANKL im Knochenmark</b>	166,8 ng/ml
	(Median 11,1; Spanne 15,6 - 2043,8)
<b>Mittlere Ratio sRANKL/OPG im Knochenmark</b>	4538,4
	(Median 213,2; Spanne 0,17 - 85913,2)
<b>Disseminierte Tumorzellen im KM</b>	bei 18 von 60 nachweisbar
	bei 30 % der Patienten

**Tabelle 7:** Darstellung der studienbedingt erhobenen Daten aus dem Serum und aus dem Knochenmark der Studiengruppe

Bei den nachfolgend in Tabelle 8 dargestellten Werten handelt es sich um die

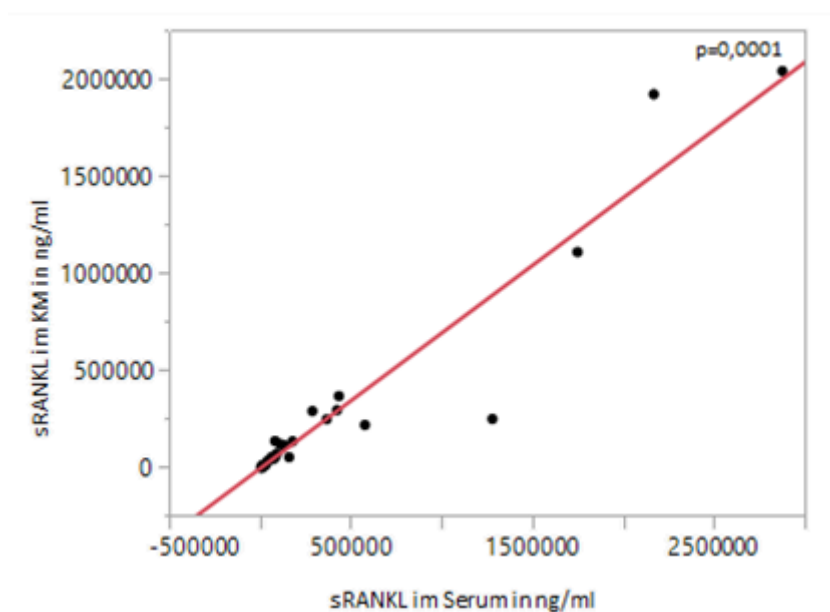
Serum-Werte von sRANKL und OPG der Kontrollgruppe. Werte aus dem Knochenmark wurden bei dieser Gruppe nicht erhoben.

<b>Mittleres OPG im Serum</b>	76,8 pg/ml
	(Median 77,7; Spanne 31 - 157)
<b>Mittleres sRANKL im Serum</b>	418,1 ng/ml
	(Median 10,3; Spanne 15,6 - 4553,1)
<b>Mittlere Ratio sRANKL/OPG im Serum</b>	6847,5
	(Median 184,2; Spanne 0,13 - 100,3)

**Tabelle 8:** Darstellung der studienbedingt erhobenen Daten aus dem Serum der Kontrollgruppe

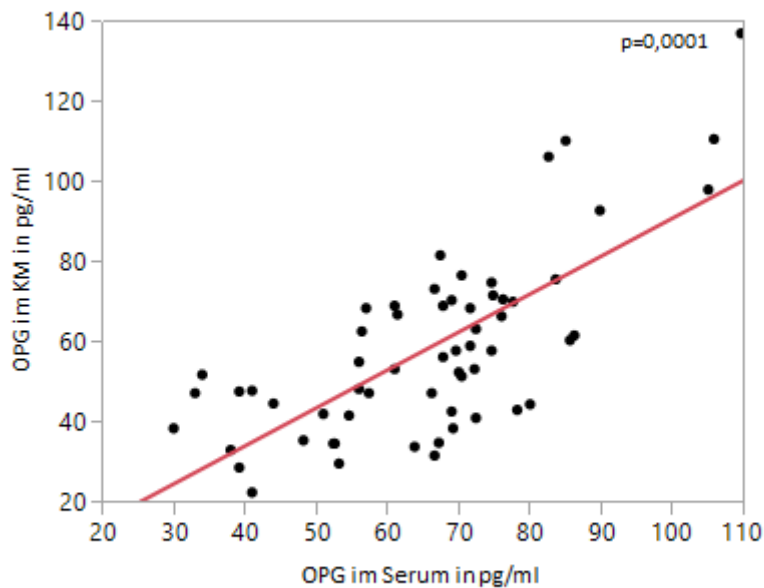
### III.2.2.1. Vergleich der Konzentration von sRANKL und OPG im Knochenmark und Serum von Patienten mit Prostatakarzinom

Im Vergleich der Konzentrationen von sRANKL im Serum und im Knochenmark von Patienten mit Prostatakarzinom ergab sich für sRANKL ein signifikanter linearer Zusammenhang ( $p=0,0001$ ,  $r^2= 0,924$ ). Siehe Abbildung 18.



**Abbildung 18:** Linearer Zusammenhang der sRANKL-Konzentration ng/ml in Serum und Knochenmark von Tumorpatienten

Im Vergleich der Konzentrationen von OPG im Serum und im Knochenmark von Patienten mit Prostatakarzinom ergab sich für OPG ein signifikanter linearer Zusammenhang ( $p=0,0001$ ,  $r^2=0,524$ ). Siehe Abbildung 19.

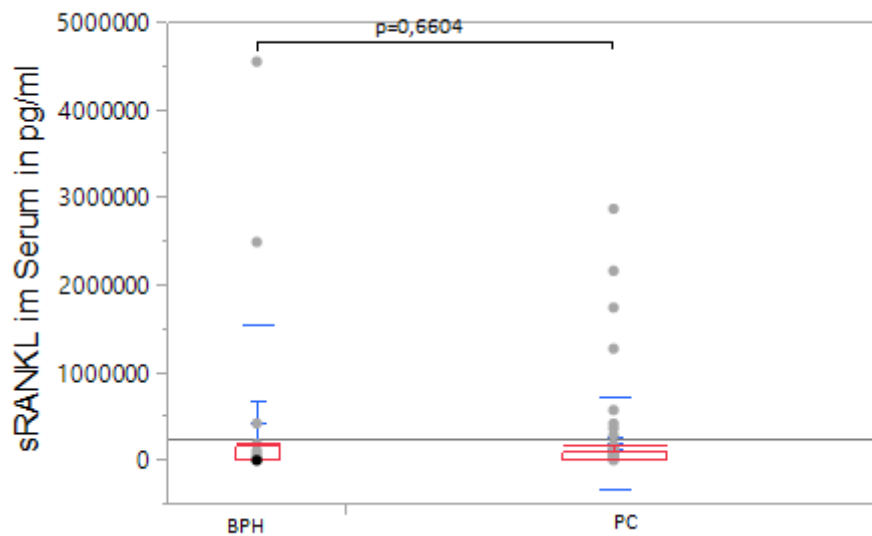


**Abbildung 19:** Linearer Zusammenhang der OPG-Konzentration pg/ml in Serum und Knochenmark von Tumorpatienten

Zwischen den Konzentrationen von OPG und sRANKL im Knochenmark mit den jeweiligen Konzentrationen im Serum, ergaben sich keine weiteren signifikanten Zusammenhänge.

### III.2.2.2. sRANKL im Serum, Vergleich der Patienten mit Prostatakarzinom mit Patienten ohne Prostatakarzinom

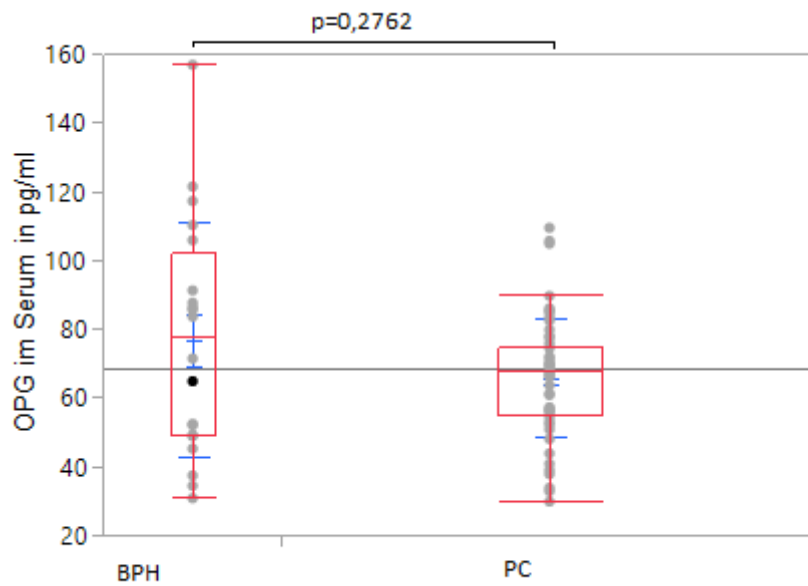
Im Vergleich der Patienten mit Prostatakarzinom mit Patienten ohne Prostatakarzinom ergab sich für die Studiengruppe bezüglich sRANKL ein Mittelwert von 0,1933 mg/ml (Maximum 0,3296, Minimum 0,0000155, Median 0,01159) und für die Kontrollgruppe 0,419 mg/dl (Maximum 4,55, Minimum 0,0000156, Median 0,01033). Somit ergab sich hier bei einem  $p=0,6604$  kein signifikanter Unterschied. Siehe Abbildung 20.



**Abbildung 20:** Vergleich der sRANKL-Serumkonzentration bei Patienten mit Prostatakarzinom (PC) und ohne Prostatakarzinom (BPH)

### III.2.2.3. OPG im Serum, Vergleich der Patienten mit Prostatakarzinom mit Patienten ohne Prostatakarzinom

Im Vergleich der Patienten mit Prostatakarzinom mit Patienten ohne Prostatakarzinom ergab sich für die Studiengruppe bezüglich OPG ein Mittelwert von 65,7 pg/ml (Maximum 109,6, Minimum 30, Median 67,8) und für die Kontrollgruppe 76,8 pg/ml (Maximum 157, Minimum 34,9, Median 77,7). Bei einem  $p=0,2762$  ergab sich auch hier kein signifikanter Unterschied. Siehe Abbildung 21.

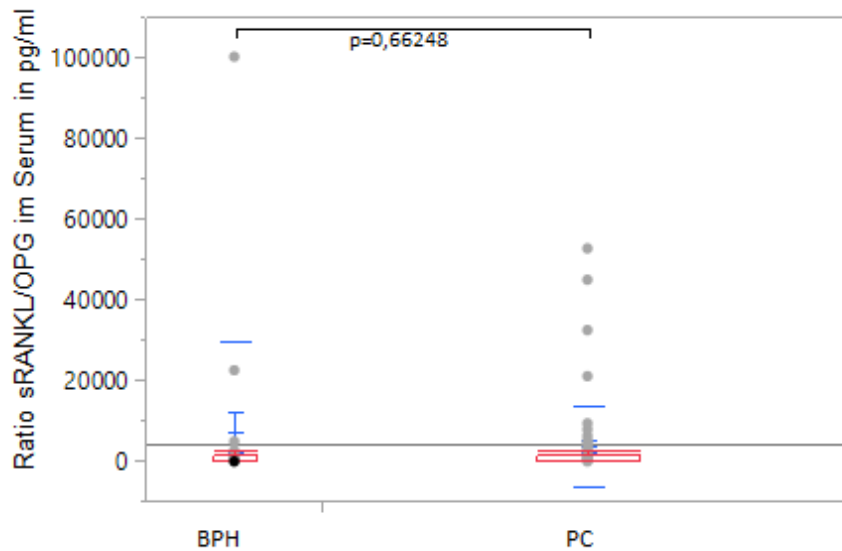


**Abbildung 21:** Vergleich der OPG-Serumkonzentration bei Patienten mit Prostatakarzinom (PC) und ohne Prostatakarzinom (BPH)

#### III.2.2.4. Ratio sRANKL/OPG im Serum, Vergleich der Patienten mit Prostatakarzinom mit Patienten ohne Prostatakarzinom

Im Vergleich der Patienten mit Prostatakarzinom mit Patienten ohne Prostatakarzinom ergab sich für die Studiengruppe bezüglich der Ratio sRANKL/OPG ein Mittelwert von 3502 (Maximum 52775, Minimum 0,17, Median 170) und für die Kontrollgruppe 6847 (Maximum 100287, Minimum 0,13, Median 184). Bei  $p=0,6648$  bestand kein signifikanter Unterschied. Siehe Abbildung 22.





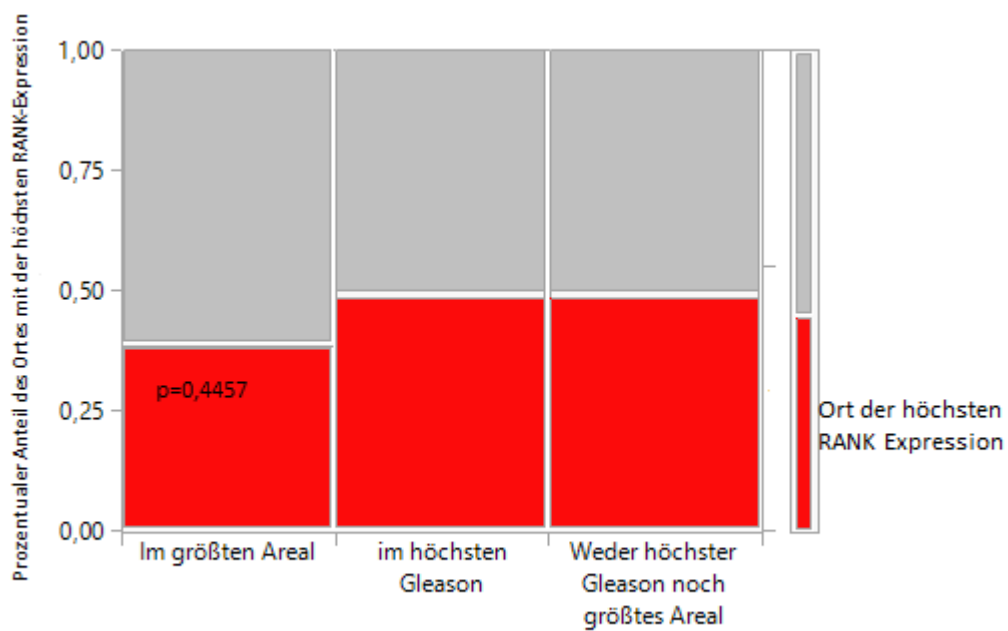
**Abbildung 22:** Vergleich der Ratio sRANKL/OPG bei Patienten mit Prostatakarzinom (PC) und ohne Prostatakarzinom (BPH)

### III.3. Heterogenität der Tumorareale je Patient

#### III.3.1. Ergebnisse der arealweisen Auswertung für RANK

##### III.3.1.1. Areale mit der höchsten RANK-Expression

In der Auswertung der einzelnen Tumorareale wurde zum Vergleich der einzelnen Herde innerhalb einer Prostata betrachtet, in welcher Abhängigkeit die größte Expression steht. Bezüglich der RANK-Färbung ergab sich in den etwa der Hälfte der Fälle (n=29) kein Zusammenhang zur Größe und Areal mit dem höchsten Gleason-Score. In lediglich 2 Fällen bestand die höchste Expression im Areal mit dem höchsten Gleason-Score ohne Korrelation zur Größe des Areals. In 8 Fällen ist die größte Expression auch im gleichzeitig größten Areal und in 21 Fällen war die Expression im größten Areal mit dem gleichzeitig höchsten Gleason-Score am größten. Somit ergibt sich hier kein signifikanter statistischer Zusammenhang (Dargestellt in Abbildung 23).



**Abbildung 23:** Häufigkeiten der höchsten RANK-Expression. Verteilung der Areale mit der höchsten RANK-Expression

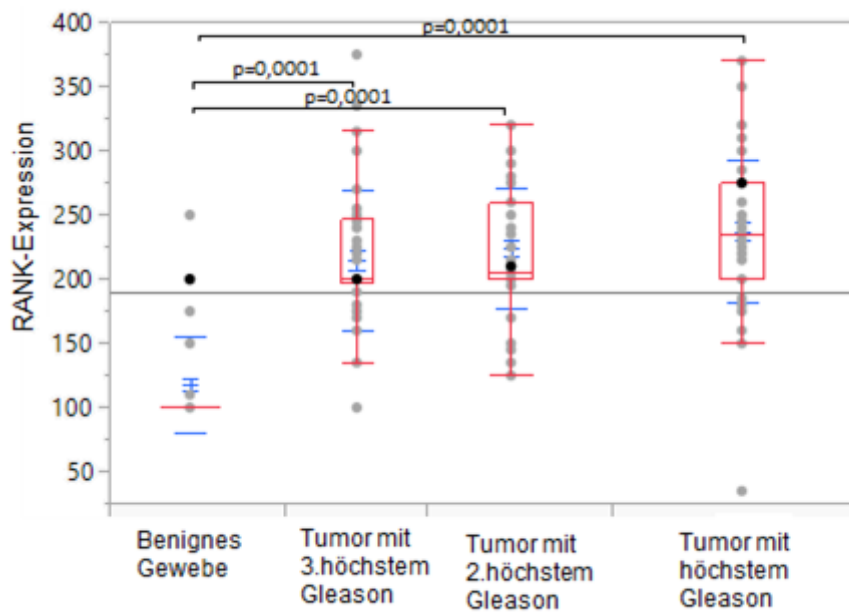
### III.3.1.2. Ergebnisse der RANK-Färbung in Bezug zu größtem Tumorareal und Areal mit dem höchsten Gleason-Score

Die weiteren Ergebnisse der Immunhistochemischen RANK-Färbungen je nach Gleason-Score des einzelnen Tumorareals bzw. der Größe sind in der nachfolgenden Tabelle 9 und in Abbildung 24 dargestellt.

Expressionsverhalten	Expression Mittelwert	Expression Median	Expression Minimum	Expression Maximum
Größtes Tumora-real	234,1	222,5	150	365
Zweitgrößtes Tumora-real	228,5	215	125	335
Drittgrößtes Tumora-real	222,4	200	100	375
Areal mit dem höchsten Gleason-Score	237,1	235	35	370
Areal mit dem zweithöchsten Gleason-Score	223,8	205	125	320
Areal mit dem dritthöchsten Gleason-Score	215	200	100	375

**Tabelle 9:** Gemittelte Expressionswerte der Mittelwerte der Färbeintensität von RANK in den verschiedenen Subgruppen der Studiengruppe

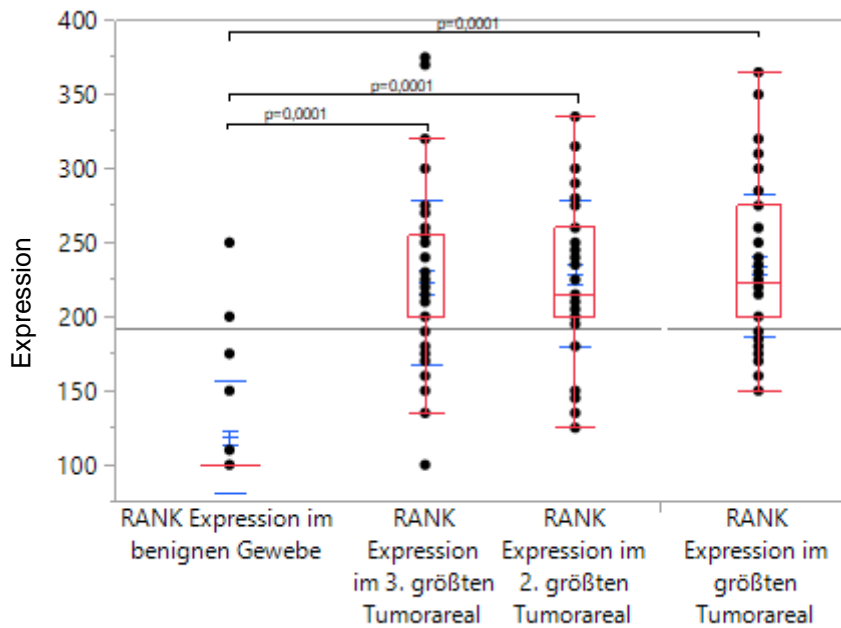
Im Vergleich der Expression von RANK in den unterschiedlichen Tumora-realen nach Gleason-Score ergab sich im Areal mit dem dritthöchsten Gleason-Score eine mittlere RANK-Expression von 215 (Maximum 375, Minimum 100, Median 200). Im Areal mit dem zweitgrößten Gleason-Score lag der Mittelwert bei 223,7 (Maximum 320, Minimum 125, Median 205). Im Areal mit dem höchsten Gleason-Score war der Mittelwert bei 237,1 (Maximum 370, Minimum 35, Median 235). Somit ergaben sich keine signifikanten Unterschiede der verschiedenen Tumora-reale untereinander. Im Vergleich zu den nichtmalignen Proben zeigte sich ein signifikant höherer Wert im Tumorgewebe ( $p < 0,0001$ ). Siehe Abbildung 24.



**Abbildung 24:** Vergleich der Höhe der RANK-Expression je Höhe des Gleason-Score und im angrenzenden benignen Gewebe.

Im Vergleich der Expression von RANK in den unterschiedlichen Tumorarealen nach Größe der Tumorareale ergab sich im drittgrößten Tumorareal eine mittlere RANK-Expression pro Patient ein Wert von 222,4 (Maximum 375, Minimum 100, Median 200). Im zweitgrößten Areal lag der Mittelwert bei 228,5 (Maximum 335, Minimum 125, Median 215). Im größten Areal war der Mittelwert bei 234,1 (Maximum 365, Minimum 150, Median 222,5). Die Expression in den Tumorarealen untereinander zeigte somit keine signifikanten Unterschiede.

Die mittlere RANK-Expression in den angrenzenden benignen Proben lag bei 117,8 (Maximum 250, Minimum 100, Median 100). Es zeigten sich somit signifikant höhere Werte in allen 3 Tumorarealen im Vergleich zum angrenzenden benignen Gewebe ( $p=0,0001$  jeweils). Siehe Abbildung 25.

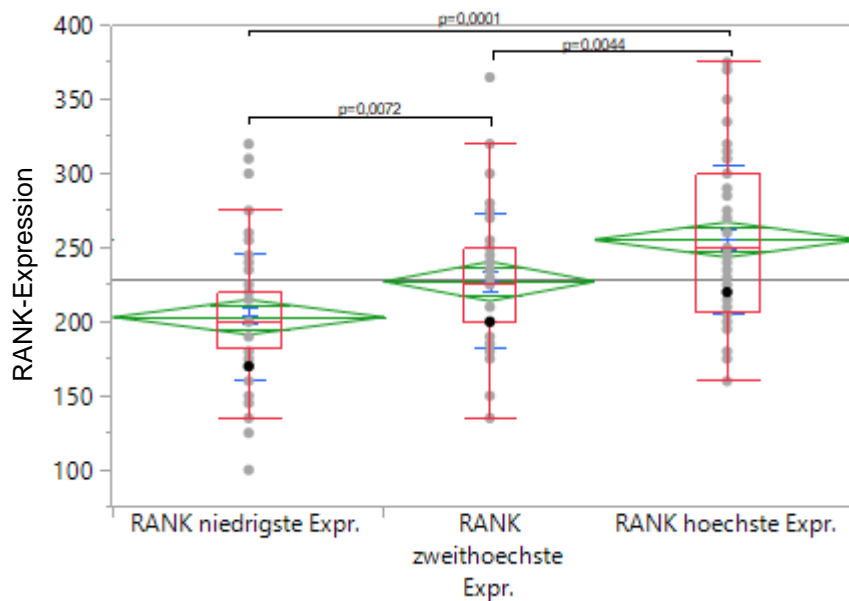


**Abbildung 25:** Vergleich der Höhe der RANK-Expression nach Größe des Tumorareals und im angrenzenden benignen Gewebe.

### III.3.1.3. Heterogenität der RANK-Expression in den verschiedenen Tumorarealen nach Höhe der Expression

Beim Vergleich der Expressionen von RANK in den unterschiedlichen Tumorarealen ergab sich im Areal mit der niedrigsten RANK-Expression pro Patient ein mittlerer Wert von 203,8 (Maximum 320, Minimum 100, Median 200). Im Areal mit der zweithöchsten Expression lag der Mittelwert bei 222,2 (Maximum 365, Minimum 135, Median 225). Im Areal mit der höchsten Expression war der Mittelwert bei 255,3 (Maximum 375, Minimum 160, Median 250).

Es fanden sich hier signifikante Unterschiede: Signifikant war der Unterschied zwischen niedrigster und höchster Expression ( $p=0,0001$ ); auch zwischen niedrigster und zweithöchster Expression ( $p=0,0072$ ) und zwischen zweithöchster und höchster Expression ( $p=0,0044$ ) bestand ein signifikanter Unterschied (Abbildung 26).

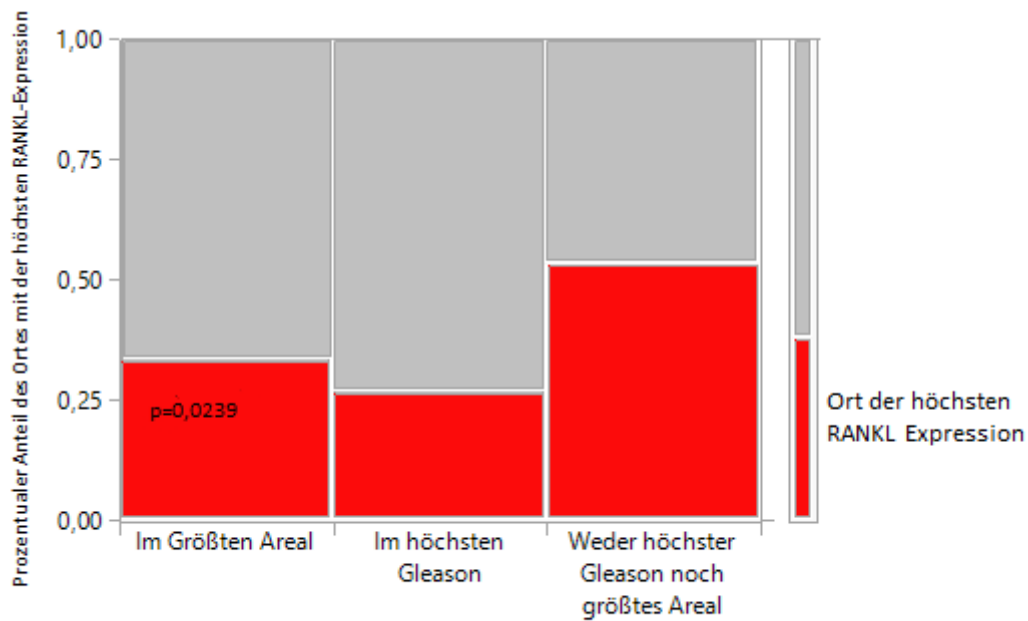


**Abbildung 26:** Unterschiedlichkeit der RANK-Expression in den verschiedenen Tumorarealen, gruppiert nach der Höhe der jeweiligen Expression.

### III.3.2. Ergebnisse der arealweisen Auswertung für RANKL

#### III.3.2.1. Areale mit der höchsten RANKL-Expression

In der Auswertung der einzelnen Tumorareale wurde zum Vergleich der einzelnen Herde innerhalb einer Prostata betrachtet, in welcher Abhängigkeit die größte Expression steht. Bezüglich der RANKL-Färbung ergab sich in den meisten Fällen (n=32) kein Zusammenhang zur Größe und zum Areal mit dem höchsten Gleason-Score. In 12 Fällen bestand die höchste Expression im Areal mit dem höchsten Gleason-Score ohne Korrelation zur Größe des Areals. In 8 Fällen ist die größte Expression auch im gleichzeitig größten Areal und in ebenfalls 8 Fällen ist die Expression im größten Areal mit dem gleichzeitig höchsten Gleason-Score am größten. Bei  $p=0,0239$  für den Cochran-Armitage-Trendtest fand sich der Ort der höchsten Expression signifikant häufiger unabhängig von Tumorgröße und Gleason-Score. (Dargestellt in Abbildung 27)



**Abbildung 27:** Häufigkeiten der höchsten RANKL-Expression. Verteilung der Areale mit der höchsten RANKL-Expression

### III.3.2.2. Ergebnisse der RANKL-Färbung in Bezug zu größtem Tumorareal und Areal mit dem höchsten Gleason-Score

Die weiteren Ergebnisse der immunhistochemischen RANKL-Färbungen je nach Gleason-Score des einzelnen Tumorareals bzw. der Größe sind in der nachfolgenden Tabelle 10 und in Abbildung 28 dargestellt.

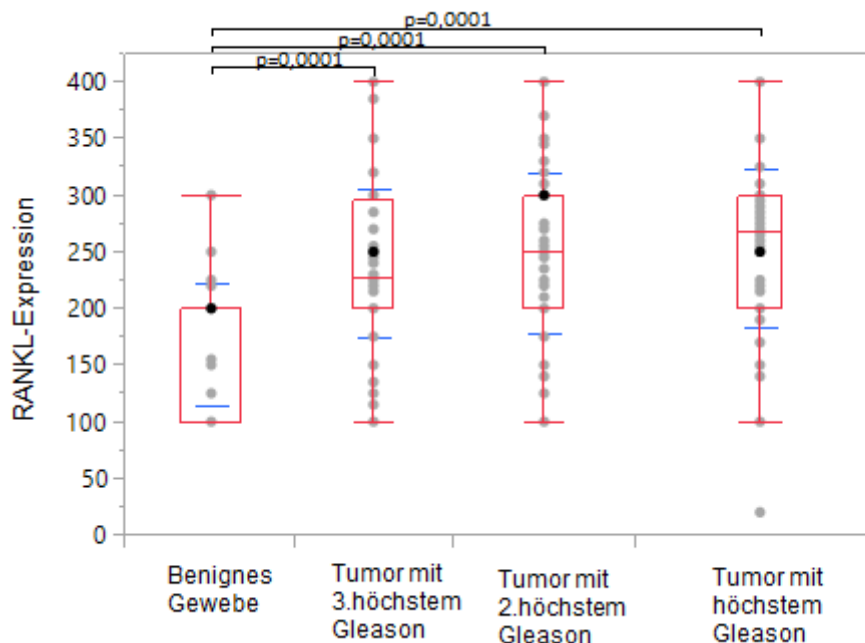
Expressionsverhalten	Expres- sion Mittelwert	Expres- sion Median	Expres- sion Minimum	Expres- sion Maximum
Größtes Tumorareal	249,4	255	100	400
Zweitgrößtes Tumorareal	256,1	250	100	400
Drittgrößtes Tumorareal	240	230	100	400
Areal mit dem höchsten Gleason-Score	253	267,5	20	400
Areal mit dem zweithöchsten Gleason-Score	249,5	250	100	400
Areal mit dem drittgrößten Gleason-Score	239,9	227,5	100	400

**Tabelle 10:** Gemittelte Expressionswerte der Mittelwerte der Färbeintensität von RANKL in den verschiedenen Subgruppen der Studiengruppe

Beim Vergleich der Expressionen von RANKL in den unterschiedlichen Tumorarealen nach dem Gleason-Score ergab sich im Areal mit dem niedrigsten Gleason-Score eine mittlere RANKL-Expression von 239,9 (Maximum 400, Minimum 100, Median 227,5).

Im Areal mit dem zweitgrößten Gleason-Score lag der Mittelwert bei 249,5 (Maximum 400, Minimum 100, Median 250). Im Areal mit dem höchsten Gleason-Score war der Mittelwert bei 253 (Maximum 400, Minimum 20, Median 267,5). Die Expression in den Tumorarealen untereinander zeigte somit keine signifikanten Unterschiede. Es zeigten sich signifikant höhere Werte in allen 3 Tumorarealen im Vergleich zum angrenzenden benignen Gewebe ( $p=0,0001$  jeweils). Siehe Abbildung 28.

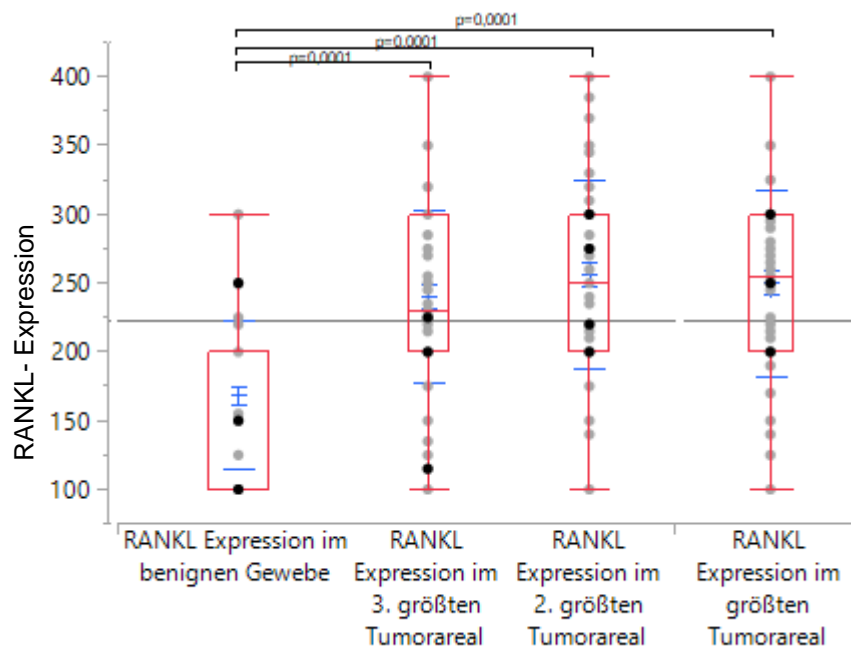




**Abbildung 28:** Vergleich der Höhe der RANKL-Expression je Höhe des Gleason-Score und im angrenzenden benignen Gewebe.

Im Vergleich der Expression von RANKL in den unterschiedlichen Tumorarealen nach Größe der Tumorareale ergab sich im drittgrößten Tumorareal eine mittlere RANKL-Expression pro Patient ein mittlerer Wert von 240 (Maximum 400, Minimum 100, Median 230). Im zweitgrößten Areal lag der Mittelwert bei 256,1 (Maximum 400, Minimum 100, Median 250). Im größten Areal war der Mittelwert bei 249,4 (Maximum 400, Minimum 100, Median 255).

Die mittlere RANKL-Expression in den angrenzenden benignen Proben lag bei 167,8 (Maximum 300, Minimum 100, Median 200). Somit ergab sich lediglich ein signifikanter Unterschied zwischen dem angrenzenden benignen Gewebe und den malignen Arealen (jeweils  $p=0,0001$ ). Zwischen den malignen Arealen untereinander ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (alle  $p>0,2$ ). Siehe Abbildung 29.

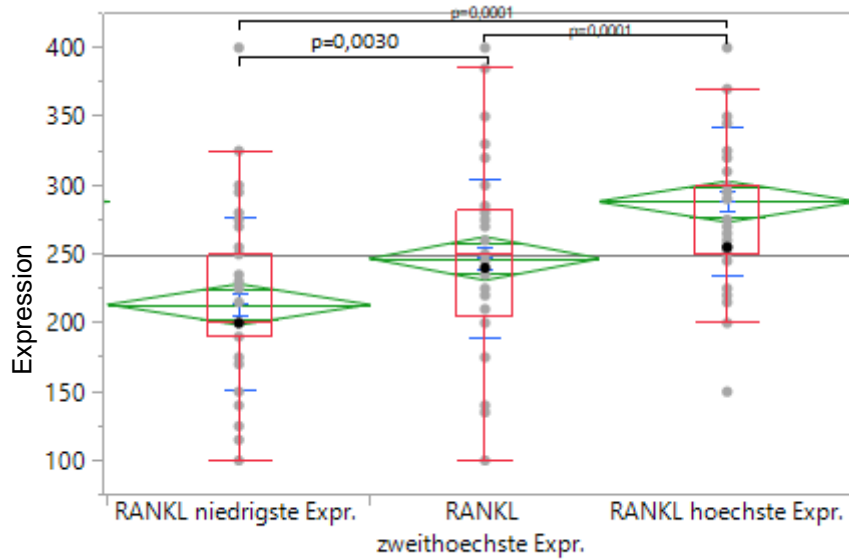


**Abbildung 29:** Vergleich der Höhe der RANKL-Expression nach Größe des Tumorareals und im angrenzenden benignen Gewebe.

### III.3.2.3. Heterogenität der RANKL-Expression in den verschiedenen Tumorarealen nach Höhe der Expression

Im Vergleich der Expression von RANKL in den unterschiedlichen Tumorarealen ergab sich im Areal mit der niedrigsten RANKL-Expression pro Patient ein mittlerer Wert von 213,3 (Maximum 400, Minimum 100, Median 200). Im Areal mit der zweithöchsten Expression lag der Mittelwert bei 246,79 (Maximum 400, Minimum 100, Median 250). Im Areal mit der höchsten Expression war der Mittelwert bei 288,08 (Maximum 400, Minimum 150, Median 300).

Es bestand zwischen allen Arealen signifikante Unterschiede ( $p=0,0001$  zwischen dem Areal mit der niedrigsten Expression und dem Areal mit der zweithöchsten Expression sowie ebenfalls  $p=0,0001$  im Areal mit der niedrigsten vs. der höchsten Expression, eine etwas schwächere Signifikanz bei  $p=0,0030$  besteht zwischen dem Areal mit der niedrigsten vs. dem Areal mit der zweithöchsten Expression. Siehe Abbildung 30.



**Abbildung 30:** Unterschiedlichkeit der RANKL-Expression in den verschiedenen Tumorarealen, gruppiert nach der Höhe der jeweiligen Expression.

### III.4. Korrelation der RANK- und RANKL-Expression im Tumor mit sRANKL- und OPG-Spiegeln aus Serum und Knochenmark

#### III.4.1. Übersicht über die Ergebnisse der statistischen Auswertung

In der nachfolgenden Tabelle 11 werden die Ergebnisse der statistischen Auswertungen für den linearen Zusammenhang für RANK- und RANKL-Expressionen im Tumor mit sRANKL- und OPG-Spiegeln aus den Kompartimenten Serum und Knochenmark dargestellt.

Sowohl für die Expressionen von RANK und RANKL im Tumor, deren maximaler Expression und deren Expressionen im größten Tumorareal ergaben sich keine signifikanten Zusammenhänge mit den Spiegeln von OPG- und sRANKL in Serum und Knochenmark.

Auch bezüglich der RANK-Expression im Tumorareal mit dem höchsten Gleason-Score ergab sich kein signifikanter Zusammenhang. Dies traf auch für die RANKL-Expression im Areal mit dem höchsten Gleason-Score für sRANKL in Serum und Knochenmark zu.

Für OPG fanden sich hingegen signifikante Zusammenhänge. Dies wird unten separat dargestellt.

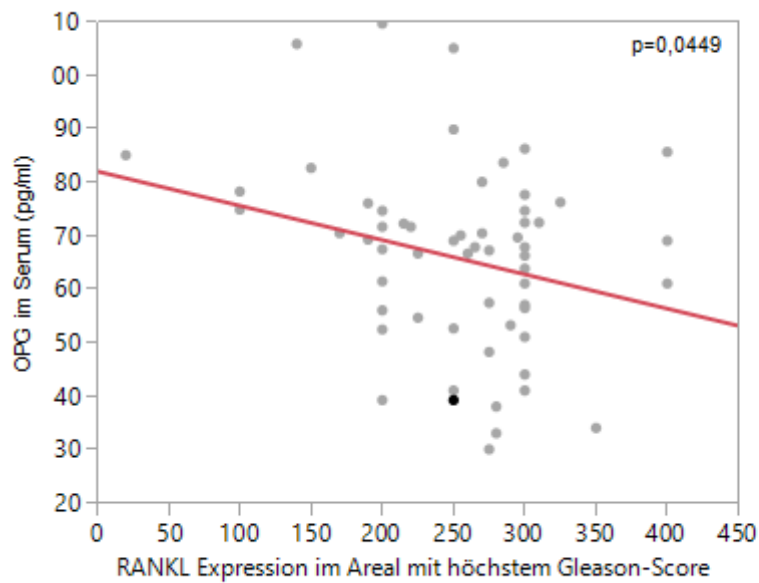
	Serum OPG	KM-OPG	Serum RANKL	KM RANKL
RANK-Expression im größten Tumoreal	p=0,6588 r <sup>2</sup> =0,01	p=0,0779 r <sup>2</sup> =0,05	p=0,5867 r <sup>2</sup> =0,01	p=0,6018 r <sup>2</sup> =0,01
RANK-Expression im Tumoreal mit dem höchsten Gleason-Score	p=0,1699 r <sup>2</sup> =0,03	p=0,4354 r <sup>2</sup> =0,01	p=0,4628 r <sup>2</sup> =0,01	p=0,5465 r <sup>2</sup> =0,01
RANK-Expression im Tumoreal mit der max. RANK-Expression	p=0,8170 r <sup>2</sup> =0,02	p=0,3540 r <sup>2</sup> =0,01	p=0,7601 r <sup>2</sup> =0,02	p=0,7882 r <sup>2</sup> =0,01
RANKL-Expression im größten Tumoreal	p=0,1406 r <sup>2</sup> =0,04	p=0,1479 r <sup>2</sup> =0,04	p=0,9721 r <sup>2</sup> =0,00	p=0,9436 r <sup>2</sup> =0,02
RANKL-Expression im Tumoreal mit dem höchsten Gleason-Score	<b>p=0,0449</b> <b>r=0,07</b>	<b>p=0,0039</b> <b>r<sup>2</sup>=0,13</b>	p=0,9113 r <sup>2</sup> =0,00	p=0,9445 r <sup>2</sup> =0,02
RANKL-Expression im Tumoreal mit der max. RANKL-Expression	p=0,8378 r <sup>2</sup> =0,00	p=0,9016 r <sup>2</sup> =0,02	p=0,6965 r <sup>2</sup> =0,00	p=0,7175 r <sup>2</sup> =0,01

**Tabelle 11:** Korrelation der RANK- und RANKL-Expression im Tumor mit sRANKL- und OPG-Spiegeln aus dem Serum und aus dem Knochenmark, signifikante Werte fett hervorgehoben.

#### **III.4.2. Korrelation der RANKL-Expression im Tumoreal mit dem höchsten Gleason-Score mit Serum- Knochenmarks-OPG und-sRANKL**

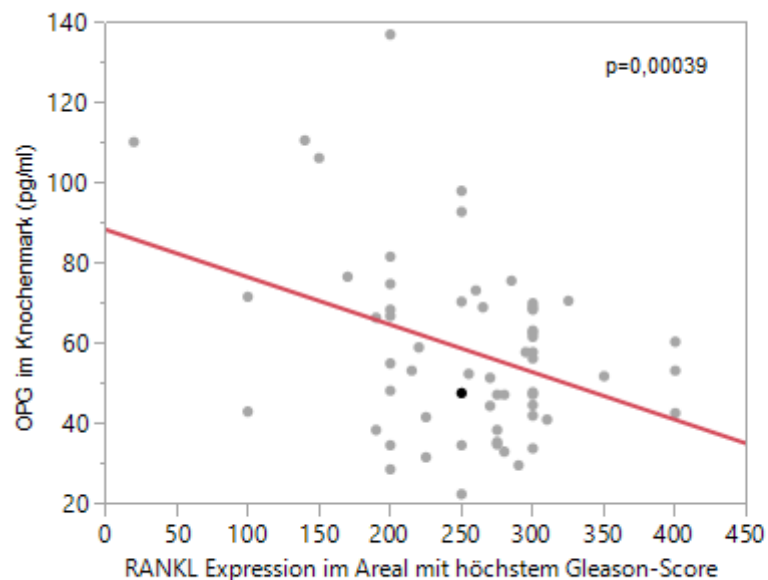
Die RANKL-Expression im Tumoreal mit dem höchsten Gleason-Score in Bezug zur sRANKL-Konzentration im Serum gesetzt ergibt bei p=0,9113 keinen signifikanten Zusammenhang. Auch zwischen der sRANKL-Konzentration im Knochenmark und der RANKL-Expression im Tumoreal mit dem höchsten Gleason-Score ergibt sich kein Zusammenhang (p=0,9445).

Die RANKL-Expression im Tumoreal mit dem höchsten Gleason-Score in Bezug zur OPG-Konzentration im Serum gesetzt ergibt bei p=0,0449 einen signifikanten Zusammenhang (siehe Abbildung 31).



**Abbildung 31:** Zusammenhang der OPG-Konzentration im Serum (in pg/ml) mit der RANKL-Expression im Tumorareal mit dem höchsten Gleason-Score

Auch zwischen der OPG-Konzentration im Knochenmark und der RANKL-Expression im Tumorareal mit dem höchsten Gleason-Score ergibt sich ein signifikanter Zusammenhang ( $p= 0,0039$ ), (siehe Abbildung 32).



**Abbildung 32:** Zusammenhang der OPG-Konzentration im Knochenmark (in pg/ml) mit der RANKL-Expression im Tumorareal mit dem höchsten Gleason-Score

### **III.5. Korrelation von klinischen Parametern mit studienbedingten Ergebnissen aus dem Tumor**

#### **III.5.1. Korrelation des Tumorstadiums T mit Ergebnissen aus dem Tumor**

##### **III.5.1.1. RANK-Expression im Tumor in Bezug auf das Tumorstadium T**

Die mittlere RANK-Expression im Tumorgewebe in Bezug zum initialen Tumorstadium T gesetzt ergab eine signifikant höhere RANK-Expression im Stadium T3a zu T2c ( $p=0,008$ ). Die Mittelwerte befanden sich im Rahmen von 175 bis 255. Zwischen den anderen Tumorstadien fanden sich keine signifikanten Unterschiede.

##### **III.5.1.2. RANK-Expression im Tumorareal mit dem höchsten Gleason-Score in Bezug auf das Tumorstadium T**

Die RANK-Expression im jeweiligen Tumorareal, mit dem höchsten Gleason-Score in Bezug zum initialen Tumorstadium T gesetzt, ergab lediglich im Vergleich von T3a zu T2c signifikante Unterschiede ( $p=0,005$ ). Die Mittelwerte lagen in einem Bereich von 150 bis 271 Score-Punkten.

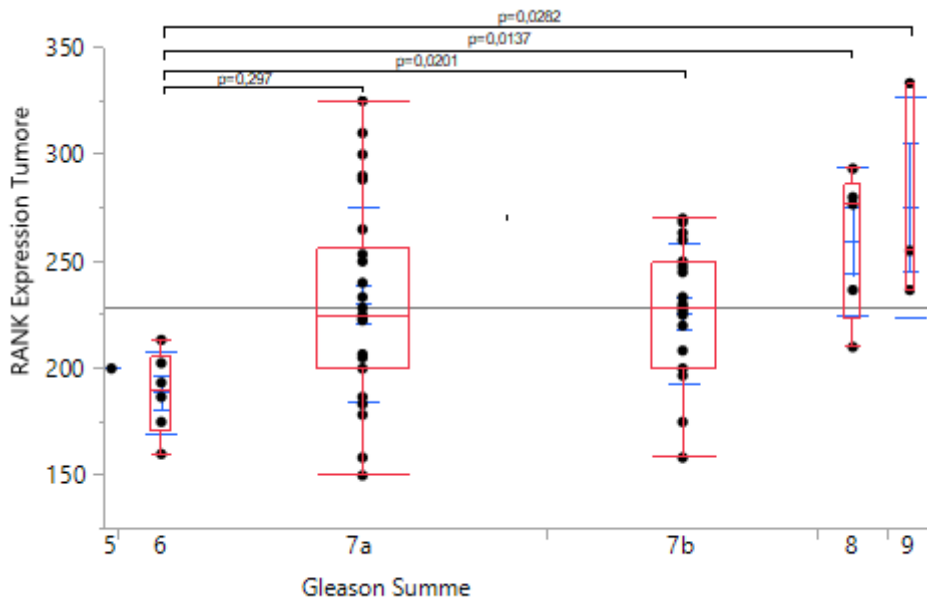
#### **III.5.2. Korrelation des Gleason-Scores mit studienbedingten Ergebnissen aus dem Tumor**

##### **III.5.2.1. RANK-Expression im Tumor in Bezug auf den Gleason-Score**

Die RANK-Expression im Tumorgewebe in Bezug zum initialen Gleason-Score ergab signifikant höhere Expressionswerte bei höheren Gleason-Werten.

So waren im Vergleich zu Gewebe mit einem Gleason-Score von 6 die RANK-Expressionen bei einem Gleason-Score von 7a und 7b ( $p=0,029$  und  $p=0,020$ ) signifikant höher.

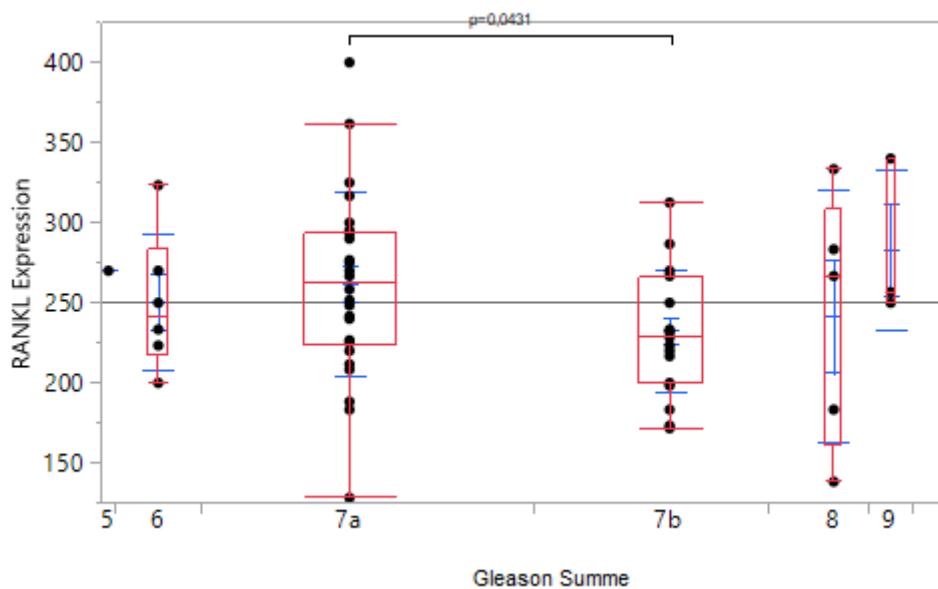
Ebenso ergaben sich signifikante Unterschiede, verglich man die Expression von RANK bei einem Gleason-Score von 6 mit einem Gleason Score von 8 ( $p = 0,014$ ). Ebenso signifikante Unterschiede ergab der Vergleich von einem Gleason-Score von 6 mit einem Gleason Score von 9 ( $p=0,028$ ). Siehe Abbildung 33.



**Abbildung 33:** Vergleich der RANK-Expression im Tumorgewebe je nach initialem Gleason-Score

### III.5.2.2 RANKL-Expression im Tumor in Bezug auf den Gleason-Score

Die RANKL-Expression im Tumorgewebe in Bezug zum initialen Gleason-Score ergab lediglich im Vergleich von Gleason 7a zu Gleason 7b eine schwache Signifikanz ( $p=0,0431$ ). Siehe Abbildung 34.

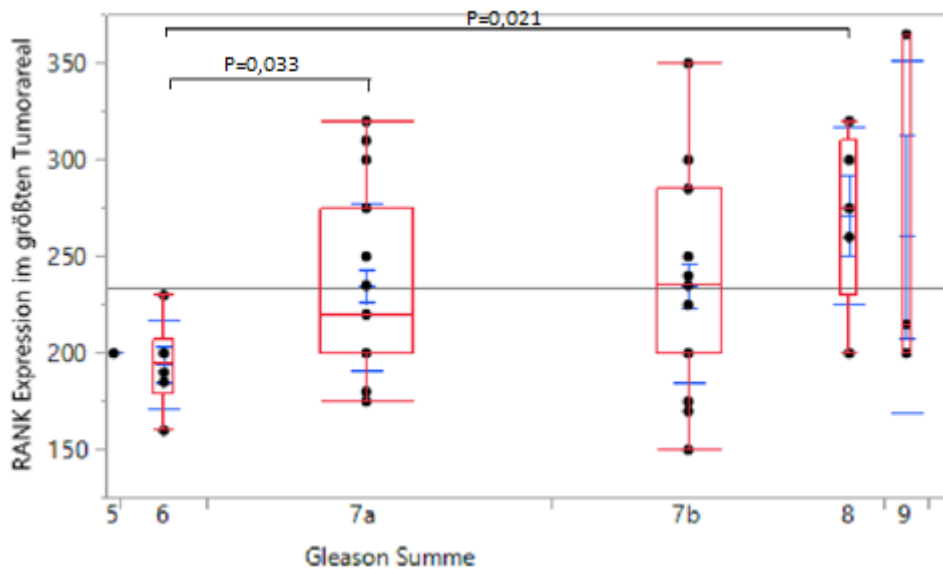


**Abbildung 34:** Vergleich der RANKL-Expression im Tumorgewebe je nach initialem Gleason-Score

### III.5.2.3. RANK-Expression im größten Tumorareal in Bezug auf den Gleason-Score

Die RANK-Expression im größten Tumorareal in Bezug zum initialen Gleason-Score ergab positive signifikante Unterschiede zwischen Gleason 6 und 7a ( $p=0,033$ ) und Gleason 6 und Gleason 8 ( $p=0,021$ ).

Die Mittelwerte der Expression von RANK waren in einer Spanne von 194 bis 271 Score-Punkten. Siehe Abbildung 35.



**Abbildung 35:** Vergleich der RANK-Expression im größten Tumorareal nach initialem Gleason-Score



## **V. Diskussion**

### **IV.1. Intention der vorliegenden Arbeit**

Der RANK/RANKL/OPG-Signalweg spielt eine wesentliche Rolle für die ossäre Metastasierung des Prostatakarzinoms. Vorausgehende Studien konnten zeigen, dass Veränderungen dieses Signalweges bereits bei Patienten mit lokalisiertem Prostatakarzinom detektiert werden können [59].

Beim Prostatakarzinom ist ein multifokales Auftreten und eine Heterogenität bekannt, so dass Proben aus einzelnen Tumorherden als nicht zwingend als repräsentativ für die Tumorerkrankung zu werten sein müssen [66, 67].

Es konnte bislang nachgewiesen werden, dass diese einzelnen Tumorherde teils eine unterschiedliche Wachstumsgeschwindigkeit als auch eine unterschiedliche Aggressivität aufweisen, was durch eine unterschiedliche Tumorbiologie der einzelnen Herde bedingt ist [70].

Diese intra- und intertumorale Heterogenität stellt eine wesentliche Herausforderung für Biomarkeranalysen beim Prostatakarzinom dar. Es stellt sich die Frage, inwiefern diese Heterogenität auf den RANK/RANKL/OPG-Signalweg zutrifft und ob es Tumorherde mit einer erhöhten Expression dieser Marker gegenüber anderen Herden gibt.

In der vorliegenden Arbeit soll des Weiteren der Zusammenhang zwischen der Expression von RANK und RANKL im Tumor mit deren Konzentration im Serum und im Knochenmark geklärt werden.

Die hier exemplarisch angewandten Vergleichsmethoden können auch auf jedweden anderen neuen Biomarker zumindest des lokal begrenzten Prostatakarzinoms übertragen werden.

## IV.2. Zentrale Ergebnisse dieser Studie

Es lassen sich einige zentrale Ergebnispunkte darstellen:

A) Bezüglich der RANK- als auch der RANKL-Expression fanden sich erhöhte Expressionen im Tumor im Vergleich zu benignem Gewebe, wobei ein positiver linearer Zusammenhang zwischen der RANK- und der RANKL-Expression im Tumor besteht.

B) Es besteht eine Heterogenität bezüglich der Expression von RANK und RANKL im Tumorgewebe in unterschiedlichen Tumorarealen. Das heißt, für die Expressionen beider Marker fanden sich in den verschiedenen Tumorarealen signifikant unterschiedliche Ergebnisse.

Für die Höhe der RANK als auch für RANKL-Expression konnten keine Zusammenhänge mit dem Ort des höchsten Gleason-Scores als auch mit dem größten Tumorareal beobachtet werden.

Die Indexläsion (größter Herd bzw. die Läsion mit dem höchsten Gleason-Score) ist also nicht mit dem Areal höchster Expression identisch und stellt sich damit nicht zwingend als repräsentatives Areal für Biomarkeranalysen dar.

C) Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede von sRANKL und OPG im Serum zwischen Patienten mit und ohne Karzinom und zwischen Gewebe- und Serumwerten bestand kein Zusammenhang.

Die Konzentrationen von sRANKL sowie OPG in Serum und Knochenmark von Tumorpatienten korrelierten jeweils miteinander.

Aggressivere Tumorareale (Areale mit dem höchsten Gleason-Score) korrelieren invers mit den OPG-Spiegeln im Serum und im Knochenmark. Dies könnte darauf hindeuten, dass OPG-Werte im Blut und Knochenmark durch RANKL im Tumor beeinflusst werden.

D) Es fand sich kein Zusammenhang zwischen im Knochenmark zirkulierenden Tumorzellen (DTCs) und anderen Parametern aus Serum, Knochenmark und Tumor.

### **IV.3. Expression von RANK und RANKL im Tumorgewebe – Biologie des Prostatakarzinoms**

In der vorliegenden Studie fanden sich signifikant erhöhte Expressionen von RANK ( $p=0,0001$ ) als auch von RANKL ( $p=0,0001$ ) im Tumorgewebe im Vergleich zu nicht tumorös verändertem Gewebe des erkrankten Patienten als auch im Vergleich zur Kontrollgruppe mit einer benignen Prostatahyperplasie.

In bereits veröffentlichten Studien zur Thematik konnte bezüglich RANKL in Zelllinien eine verstärkte Expression im Tumorgewebe nachgewiesen werden konnte [63,64].

Auch in bereits veröffentlichten immunhistochemischen Studien fanden sich erhöhte Expressionen von RANK und RANKL Tumorgewebe verglichen mit Normalgewebe [91]. Ohtaka et. al konnten eine Überexpression von RANK als auch RANKL in Tumorgewebe auch auf der DNA-Ebene bestätigen [92], Christoph et. al. auf mRNA-Ebene [93].

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie bestätigt somit die Veränderungen im RANK/RANKL-Pathway bereits beim lokalisierten Prostatakarzinom, welche sich durch eine erhöhte Expression im Tumorgewebe nachweisen lassen.

Immunhistochemisch fand sich in der vorliegenden Studie in der RANKL-Färbung eine signifikant vermehrte Anfärbbarkeit der Zellkerne im Tumor als im Nicht-Tumorgewebe ( $p=0,0001$ ).

Bezüglich der RANK-Färbung fand sich ein gegensinniges Ergebnis. Hier waren in den Nicht-Tumorgeweben die Zellkerne signifikant häufiger gefärbt als in den Tumorgeweben ( $p=0,0048$ ).

Diese Veränderungen im Vergleich zu Gewebe aus benigner Prostatahyperplasie und tumornahem, benignen Gewebe spricht für ebenfalls tumorbedingte Veränderungen im Bereich des RANK/RANKL-Pathways.

Somit kann bezüglich RANKL, bei erhöhtem immunhistochemischem nukleärem Nachweis, ein erhöhter Proliferationsstatus bezüglich dieses Markers angenommen werden.

Hingegen ist die verminderte RANK-Anfärbbarkeit von Kernen von malignen Zellen hiermit nicht zu erklären. Möglich wäre ein Kompartiment-Wechsel von

nukleärer nach zytoplasmatischer Färbung im Rahmen des Tumorprogresses. Ein solcher Kompartiment-Wechsel konnte bereits für andere Biomarker wie XPA-210 und PTOV1 von zytoplasmatischer Anfärbung, zu vermehrter Kernfärbung im Rahmen der Progression zu Tumorgewebe beobachtet werden [94, 95].

Heumann et. al. konnten beispielsweise für das Protein YB-1 (*Y-box binding protein 1*) bei nukleärer Expression eine schlechtere Prognose der betroffenen Patienten mit Prostatakarzinom ableiten [96].

Inwiefern eine zytoplasmatische oder einer nukleären Expression von RANK und RANKL eine prognostische Wertigkeit besitzt, müsste in einer Follow-up Studie evaluiert werden.

Des Weiteren fand sich eine hochsignifikante positive Korrelation von RANK- und RANKL-Expression im Kollektiv ( $p=0,0001$ ).

Diese Beobachtung deckt sich mit Ergebnissen aus dem Verbundprojekt [97].

#### **IV.4. Serumwerte von sRANKL und OPG als potenzielle Malignitätsparameter**

Die Werte von sRANKL und OPG im Serum ergaben in der vorliegenden Studie keine signifikanten Unterschiede im Vergleich der Studien- und Kontrollgruppe. Bezüglich der sRANKL-Konzentration im Serum ist dies bereits vorbeschrieben [65].

In mehreren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass bei Patienten mit Prostatakarzinom, beziehungsweise bei bereits metastasiertem Tumorleiden, Veränderungen der Serumkonzentrationen von Proteinen, welche in den RANK/RANKL/OPG-Pathway involviert sind, vorliegen [98] [99] [100].

Ob die Expression von RANK beziehungsweise RANKL durch Tumorzellen die RANK- oder RANKL- Konzentration im Knochenmark und im Serum beeinflusst, ist unklar.

Bezüglich der OPG-Konzentration im Serum wurde durch Li et al. eine signifikant höhere OPG-Konzentration im Serum von Tumorpatienten - verglichen mit Patienten, die ein BPH vorwiesen- beschrieben. Dies bestätigte sich in der

vorliegenden Arbeit nicht. Möglicherweise ursächlich hierfür kann sein, dass in unserer Studie nur Patienten mit lokalisiertem Prostatakarzinom eingeschlossen waren, in der Studie von Li et al. jedoch ein großer Teil der eingeschlossenen Patienten einen lokal fortgeschrittenen oder bereits metastasierten Befund aufwies. Eine erhöhte OPG-Konzentration im Serum bei Patienten mit fortgeschrittenem Tumor im Vergleich zu Patienten im lokalisierten Stadium konnten Eaton et. al zeigen [101].

In einer Studie von Todenhöfer et. al. konnte gezeigt werden, dass Patienten mit Prostatakarzinom signifikant niedrigere OPG-Spiegel im Serum hatten als Patienten, die an einer gutartigen Prostatavergrößerung litten [102].

Zumindest tendenziell (Mittelwert 65,73 vs. 76,8 pg/ml), jedoch nicht signifikant, zeigten sich auch in der vorliegenden Studie niedrigere OPG-Spiegel bei der Prostatakarzinomgruppe.

Bekannt ist, dass Veränderungen der Serumwerte von OPG und RANKL ein höheres Risiko eines biochemischen Rezidivs mit sich bringen. [77] Todenhöfer et al. konnten zeigen, dass höhere Spiegel von sRANKL, niedrige Spiegel von OPG und eine erhöhte Ratio sRANKL/OPG signifikant mit einem biochemischen Rezidiv zusammenhängen.

Da in der vorliegenden Studie im Vergleich weder signifikant veränderte Werte OPG im Serum nachzuweisen waren, ist davon auszugehen, dass die Veränderungen im RANK/RANKL/OPG-Pathway nur bei einer Subgruppe der Patienten, beziehungsweise erst später im Krankheitsverlauf auftreten.

#### **IV.5. Heterogenität verschiedener Tumorareale – der Stellenwert der Indexläsion**

Ziel dieser Studie war es festzustellen, ob es bei verschiedenen Tumorherden innerhalb einer Prostata signifikante Unterschiede bezüglich der Expression von RANK und RANKL bestehen. Somit soll geklärt werden, ob eine Probe aus einem Areal einen repräsentativen Ausschnitt der Veränderungen im RANK/RANKL/OPG-Signalweg darstellt. Desweiteren stellt sich die Frage ob die Veränderungen im RANK/RANKL-Signalweg mit dem Gleason-Score oder der Größe der Tumorareale in Zusammenhang stehen.

Bisherige Studien beschreiben einen Zusammenhang von Gleason-Score und Veränderungen im RANK/RANKL/OPG-Systems. [91] Chen et.al. konnten zeigen, dass eine RANK, RANKL und OPG-Expression im Tumor mit etablierten klinischen Parametern wie PSA, dem Androgenstatus, dem Gleason-Score und dem Tumorstadium korreliert. Ahmed et. al. konnten zeigen, dass Metastasen des Prostatakarzinoms von vermutlich von einem Zellklon aus der erkrankten Prostata stammen [103]. Dies bestätigt Studien von Liu et. al., die zum gleichen Ergebnis kamen [104]. Jedoch konnten Kneppers et. al. zeigen, dass in Lymphknotenmetastasen bei etwa einem Viertel der Patienten die Zellen nicht in klonalem Zusammenhang mit der Indexläsion standen[75].

Beim Prostatakarzinom liegt eine ausgeprägte intertumorale Heterogenität vor was bezüglich anderer immunhistochemischer Marker [76] sowie auf genetischer Ebene bereits gezeigt werden konnte. [71]

#### **IV.5.1. Zusammenhang der RANK- und RANKL-Expression mit der Tumorgröße und mit dem Gleason-Score**

In der vorliegenden Studie konnte kein Zusammenhang zwischen der immunhistochemischen Expression von RANK und RANKL mit der Größe des Tumorherdes oder der Höhe des Gleason-Scores festgestellt werden.

In nahezu der Hälfte der Patienten (29 von 60) konnte die höchste RANK-Expression im Areal mit dem gleichzeitig höchsten Gleason-Score beobachtet werden, bei 21 Patienten im größten Tumorareal. Somit war jedoch die höchste Expression ebenfalls der Hälfte des Kollektives ohne Zusammenhang mit der Größe des Areals beziehungsweise mit dem Areal mit höchsten Gleason Score. Bezüglich der RANKL-Expression fand sich bei 16 von 60 Patienten die maximale Expression im Areal mit dem höchsten Gleason-Score. In 32 von 60 Fällen ergab sich kein Zusammenhang mit der Größe des Areals beziehungsweise mit dem Areal mit höchsten Gleason Score. Somit besteht auch hier kein signifikanter Zusammenhang.

Somit bestätigt die vorliegende Studie eine intertumorale Heterogenität, welche

zumindest beim lokalisierten Prostatakarzinom unabhängig von etablierten Risikoparametern zu sein scheint. Es wird auch die Studie von Chen et. al. bestätigt, welche im lokalisierten Tumorstadium keinen Zusammenhang fanden. [91]

#### **IV.5.2. Heterogenität verschiedener Tumorareale und mögliche diagnostische Wertigkeit**

In der vorliegenden Studie konnten signifikante Unterschiede der Expression in den 3 verschiedenen Arealen untereinander sowohl für RANK als auch für RANKL nachgewiesen werden.

Somit scheint es nicht sinnvoll zu sein, aus lediglich einem Tumorherd eine diagnostische Probe zu entnehmen, da diese möglicherweise nicht die relevanten Veränderungen im Signalweg abbildet. Dies bestätigt bereits veröffentlichte Studien zum Thema. [105]

Jedoch muss hierbei in Betracht gezogen werden, dass lediglich ein Tumorherd möglicherweise die Prognose bestimmt und bei einer Überexpression einer therapeutische Intervention zugänglich wäre. Dies kann auch der kleinste und verhältnismäßig am wenigsten entdifferenzierte Tumorherd sein. [74] [75]

Bisher wurde gemeinhin zur Interpretation von Expressionen als Indexläsion entweder das Tumorareal mit der größten Ausdehnung oder das Areal mit dem höchsten Gleason-Score herangezogen. [72] Es scheint jedoch unklar zu sein, inwiefern diese Areale die jeweilige tatsächliche onkologische Situation des Patienten bezüglich Prognose und etwaiger Therapiesensibilität widerspiegelt. Tourinho-Barbosa et. al. konnten zeigen, dass die größten Tumorareale und die Areale mit dem höchsten Gleason repräsentativ für Patienten mit *low-risk* Tumoren sind, jedoch andere Tumorfoci bei Patienten mit high-risk Tumoren an Bedeutung gewinnen[106].

Da sich in der vorliegenden Studie in keine Korrelation mit dem höchsten Gleason-Score und dem größten Tumorareal ergibt, scheint es zumindest bezüglich der Veränderungen im RANK/RANKL-Pathway nicht sinnvoll zu sein, aus dem bisherigen Konzept der Indexläsion eine eindeutige prognostische

Situation des einzelnen Patienten abzuleiten. Zur genaueren Einschätzung müsste jedoch mittels einer Follow-up Studie geklärt werden, welche Relevanz diese Erkenntnis für einzelne Subgruppen der Studie bedeutet.

In der vorliegenden Studie wurden die unterschiedlichen Tumorherde auch hinsichtlich ihrer Größe und nach Höhe des Gleason-Score unterschieden. Somit soll geklärt werden, ob möglicherweise im größten Areal bzw. im Areal mit dem höchsten Gleason-Score auch die maximale Expression von RANK oder RANKL vorliegt, so dass eine Untersuchung des jeweils größten Areales/ des Areals mit dem höchsten Gleason-Score sinnvoll wäre. Hier ergaben sich keine signifikanten Unterschiede sowohl der RANK-, als auch der RANKL-Expression, so dass eine Untersuchung nicht von der Größe der Areale und nicht von der Höhe des Gleason-Score abhängig gemacht werden kann.

Somit scheint das Areal mit der größten Ausdehnung als auch das Areal mit dem höchsten Gleason-Score bezüglich Veränderungen im RANK/RANKL-Pathway in der vorliegenden Studie nicht aussagekräftig für Veränderungen im Signalweg zu sein. Perez-Martinez et. al. konnten im Gegensatz dazu erhöhte Expressionen in Arealen mit höherem Gleason-Score nachweisen [63]. Hier wurden die Patienten jedoch einer *low-grade* (<4) und *high-grade* (>7a) Gruppe zugewiesen, so dass die Studien nicht deckungsgleich sind.

Jedoch könnten auch hier möglicherweise in einem Follow-up mögliche Subgruppen identifiziert werden, für welche sich aus den gewonnenen Informationen eine möglich prognostische Relevanz ergibt.

#### **IV.6. Veränderungen in den Kompartimenten Blut und Knochenmark beim lokalisierten Prostatakarzinom**

Ziel der Studie war es herauszufinden, ob bestehende Veränderungen im RANK/RANKL-OPG-Pathway, welche im Tumorgewebe nachzuweisen sind, [62] sich auch in den Kompartimenten Serum und Knochenmark widerspiegeln und inwiefern ein Zusammenhang zur Indexläsion zu sehen ist.

Inwieweit die Expression von RANK/RANKL und OPG im Tumor, Serum und Knochenmark zusammenhängt, ist bislang unbekannt.



In der vorliegenden Studie fand sich lediglich ein Zusammenhang zwischen der RANKL-Expression im Areal mit dem höchsten Gleason-Score mit der OPG-Konzentration im Serum als auch im Knochenmark. Kein Zusammenhang ergab sich hier bezüglich der sRANKL-Konzentration im Serum und Knochenmark.

Sowohl im Knochenmark ( $p=0,00039$ ) als auch im Serum ( $p=0,0449$ ) fanden sich signifikant niedrigere OPG-Werte bei höherer RANKL-Expression im Tumorareal mit dem höchsten Gleason-Score.

Diese Ergebnisse implizieren, dass das Tumorareal mit dem höchsten Gleason-Score die OPG-Werte in Serum und Knochenmark bedingt. Dass diesbezüglich ein Zusammenhang besteht, fanden bereits Todenhöfer et. al., die bei niedrigeren OPG-Werten im Serum ein erhöhtes Risiko für ein biochemisches Rezidiv feststellen konnten [77].

Bezüglich der Tumorarealgröße und dem Areal mit der höchsten Expression von RANK oder RANKL ergab sich in der vorliegenden Studie kein Hinweis auf einen Zusammenhang mit den Parametern aus dem Serum und dem Knochenmark.

Die Konzentrationen von sRANKL sowie OPG in Serum und Knochenmark korrelierten jeweils signifikant miteinander. Dies bestätigte vorhergehende Studien. [102]

Insgesamt scheinen Konzentrationen von sRANKL und OPG im Knochenmark weitgehend unabhängig von der Expression der Parameter im Gewebe zu sein. Es könnte angenommen werden, dass im hier vorliegenden lokalisierten Stadiums des Prostatakarzinoms noch keine wesentlichen Veränderungen bezüglich sRANKL und OPG in Knochenmark und Serum nachzuweisen sind. Die im Serum und Knochenmark messbaren Konzentrationen von sRANKL und OPG könnten also als physiologisch angesehen werden und von Osteoblasten und Knochenmarkstromazellen exprimiert worden sein.

#### **IV.7. Zusammenhang der RANK- und RANKL-Expression im Tumor mit anderen klinischen Parametern**

Wie bereits bekannt, korreliert die sowohl die RANK- als auch die RANKL-

Expression in Tumorgewebe von Prostatakarzinomen mit klinischen Parametern wie Tumorstadium, Androgenrezeptorstatus, Gleason-Score und PSA [91]. Chen et al. fanden bei RANK/RANKL/OPG-Nachweis im Tumor eine Korrelation mit höhergradigen Gleason-Scores sowie vermehrter Tumormetastasierung.

Christoph et al. konnten ebenfalls eine Korrelation der RANK/RANKL/OPG-Expression (auf mRNA-Ebene) mit dem Gleason-Score, der Serum-PSA und fortgeschrittenem Tumorstadium belegen [93].

In der vorliegenden Studie waren bezüglich des Tumorstadiums signifikant höhere mittlere RANK-Expressionen im Stadium T3a im Vergleich zu Stadium T2c zu beobachten. Ebenso fanden sich signifikante Unterschiede zwischen Stadium T3a im Vergleich zu Stadium T2c im Vergleich der Areale mit dem höchsten Gleason-Score.

Diese Beobachtung legt nahe, dass bei fortgeschrittenen Tumoren die RANK-Expression erhöht ist, was durch die oben genannten Studien bekräftigt wird.

In Bezug zum initialen Gleason-Score (Gesamt-Gleason-Score) fanden sich in der vorliegenden Studie höhere RANK-Expressionen in Gewebe mit höherem Gleason-Score. Auch dies bekräftigt die bisherigen Erkenntnisse. Der Gesamt-Gleason-Score eines Patienten scheint somit positiv mit der RANK-Expression zu korrelieren. Wenn man aber die verschiedenen Tumoreale der Patienten nach Höhe des jeweiligen Gleason-Score einzeln betrachtet und nach der Höhe des jeweiligen Gleason-Scores anordnet, zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Reihenfolge der Gleason-Scores und der RANK Expression.

Während in den oben genannten Studien von Christoph et al. als auch Chen et al. die Patienten gruppiert wurden (Gleason  $< 7$ / $> 7$ , Tumorstadium lokalisiert/ lokal fortgeschritten/metastasiert), wurden in unserer Studie die Daten für jedes Tumorstadium T und jeden Gleason-Score einzeln ausgewertet. Somit können die Studien nicht exakt miteinander verglichen werden. Insgesamt decken sich die Ergebnisse jedoch.

#### **IV.8. Im Knochenmark disseminierte Tumorzellen als Malignitätsparameter**

Im Rahmen der Studie sollte der Zusammenhang zwischen im Knochenmark zirkulierenden Tumorzellen (DTCs) mit der RANK und RANKL-Expression im Tumor, Knochenmark und Serum geklärt werden.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass der Nachweis von im Knochenmark zirkulierenden Tumorzellen als unabhängiger Marker für eine schlechte Prognose zu sehen ist [107]. Im Knochenmark vorhandene disseminierte Tumorzellen können häufig bei Patienten nach radikaler Prostatektomie nachgewiesen werden [108]. In einer Metaanalyse fanden sich zwischen 10-90 % nachweisbare disseminierte Tumorzellen [109]. Kollermann et.al. konnten bei beispielsweise 86 von 193 Patienten (44,6%) mit lokalisiertem Prostatakarzinom DTCs nachweisen [110].

Bekannt ist, dass die Aktivität von RANKL in Stromazellen des Knochenmarks durch die Anwesenheit von Tumorzellen erhöht ist und die Produktion von OPG vermindert ist. Dies wurde sowohl in vitro als auch in vivo nachgewiesen [61, 111, 112].

Die Expression von RANKL durch Zellen im Knochenmark und Knochen scheint auch für die Absiedlung von Tumorzellen in den Knochen eine entscheidende Rolle zu spielen. Es wird davon ausgegangen, dass RANKL an den von Tumorzellen exprimierten RANK-Rezeptor bindet und somit die Migrations- und Invasionseigenschaften von Tumorzellen verändert [98, 113].

In der vorliegenden Studie ergab sich kein signifikanter Zusammenhang von im Knochenmark zirkulierenden Tumorzellen mit den innerhalb der Studie erhobenen Daten aus dem Tumor, dem Serum und dem Knochenmark.

Somit scheint es keinen Zusammenhang im lokalisierten Stadium des Prostatakarzinoms zwischen den Expressionen von RANK/RANKL und OPG in Tumor, Knochenmark und Serum zu geben.

Welchen Einfluss im Knochenmark zirkulierenden Tumorzellen auf die ossäre Metastasierung bei Patienten mit Prostatakarzinom haben, ist somit weiterhin unklar.

## **IV.9. Potentielle medikamentöse Intervention mit Denosumab**

Der monoklonale RANKL-Antikörper Denosumab steht als therapeutische Option zur Beeinflussung des RANK/RANKL/OPG-Signalweges zur Verfügung.

Aktuell besteht eine EU-Zulassung für folgenden Diagnosen: Verhinderung von sekundären skelettbezogenen Ereignissen aufgrund eines Multiplen Myeloms oder Knochenmetastasen solider Tumoren [114], nicht operabler Riesenzelltumor des Knochens [115], Tumor-Hyperkalzämie [116], postmenopausale Osteoporose mit hohem Frakturrisiko [117], Glukokortikoid-induzierte Osteoporose mit hohem Frakturrisiko [118] sowie bei Aromatasehemmer-induzierten Osteoporose [119].

In einer klinischen Studie konnten Smith et al. ein verzögertes Auftreten von ossären Metastasen bei kastrationsresistenten Prostatakarzinomen zeigen. Das Gesamtüberleben war jedoch nicht beeinflusst [44].

Es stellt sich die Frage, ob eine Gruppe von Patienten mit lokalisiertem Prostatakarzinom von einer Denosumab-Gabe profitieren könnte. Dies könnte in zukünftigen Studien evaluiert werden. Hier könnte geprüft werden, ob sich im Knochenmark zirkulierende Tumorzellen oder RANK/RANKL/OPG-Konzentrationen im Serum oder Knochenmark beziehungsweise die Expressionen im Tumor selbst eine ossäre Metastasierung begünstigen.

## **IV. 10. Limitationen der vorliegenden Arbeit**

### **IV.10.1. Patientenkollektiv**

Die Größe des Patientenkollektivs von 60 Patienten in der Studiengruppe und 20 Patienten in der Kontrollgruppe lässt es nicht zu, endgültige Schlüsse über eventuelle pathophysiologische Zusammenhänge zu ziehen.

In der vorliegenden Studie wurde kein Bezug zu Ethnie, Ernährung oder sonstigen Umweltfaktoren hergestellt, so dass hierzu keine Aussage möglich ist. Das Kollektiv setzt sich des Weiteren aus einem vorselektierten Patientenkollektiv zusammen, welches bei einem nachgewiesenen Prostatakarzinom bzw. einer benignen Prostatahyperplasie in die Klinik für Urologie des Universitätsklinikums Tübingen zur operativen Therapie vorstellig

wurde. Somit beinhaltet das Kollektiv keine Patienten mit Prostatakarzinom bei welchen eine nichtoperative Therapie angewendet wird.

#### **IV.10.2. Tissue-Microarray-Technik**

Limitationen im Bereich der Tissue-Microarray-Technik ergeben sich durch die nicht sichere Repräsentativität der ausgestanzten Tumorproben. So kann eine Stanze aus einem Tumorherd nicht sicher repräsentativ für den gesamten Tumorherd sein. Obwohl einer Studie von Nocito et al. für Ki67 eine gute Repräsentativität belegt werden konnte, [120] dennoch bleibt eine gewisse Restunsicherheit. So konnten Merseburger et al. zeigen, dass ein einzelner Gewebekblockausschnitt nicht unbedingt repräsentativ für das gesamte Gewebe ist, sofern es sich um heterogenes Gewebe handelt.[121].

Es wurden pro Patient aus jeweils 3 Tumorherden Proben entnommen, um ein möglichst repräsentatives Ergebnis zu erreichen. Bei Vorliegen von mehr als 3 Tumorherden kann jedoch keine Aussage über die Eigenschaften der nicht beachteten Herde getätigt werden.

#### **IV.10.3. Untersucherabhängigkeit**

Die Auswertung erfolgte rein visuell ohne technische Hilfsmittel. Hierdurch lässt sich eine Abweichung durch unterschiedliche Untersucher und Untersuchungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nicht sicher ausschließen. Zur Sicherheit wurden Proben, bei denen es im zweiten Mikroskopierdurchganges zu Abweichungen kam, ein drittes Mal mikroskopiert.

## **V. Zusammenfassung**

Der RANK/RANKL/OPG-Signalweg spielt eine wesentliche Rolle für die ossäre Metastasierung des Prostatakarzinoms. Vorausgehende Studien konnten zeigen, dass Veränderungen dieses Signalweges bereits bei Patienten mit lokalisierten Prostatakarzinomen detektiert werden können. Eine wesentliche Herausforderung für Biomarkeranalysen beim Prostatakarzinom stellt die intra- und intertumorale Heterogenität dar. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Bedeutung der intertumorale Heterogenität für Biomarker, die mit dem RANK/RANKL/OPG-Signalweg assoziiert sind, beim Prostatakarzinom zu untersuchen. Hierzu wurden multiple Tumorareale von Patienten mit Prostatakarzinom auf die Expression von RANK, RANKL und OPG untersucht. Als Vergleichskollektiv diente eine Kohorte von Patienten mit benigner Prostatahyperplasie. Weiterhin wurden korrespondierende Serum- und Knochenmarkspalten der Patienten untersucht, um eine potenzielle Korrelation der Biomarkerlevel in Gewebe, Serum und Knochenmark zu detektieren.

Die Studie bestätigt eine erhöhte Expression von RANK und RANKL in Tumorgewebe im Vergleich zu benignem Gewebe. Der Vergleich der verschiedenen Tumorareale zeigte eine Heterogenität der Gewebeexpression. Die Expression der verschiedenen Tumorherde war dabei unabhängig von der Größe des Tumorareals und dem jeweiligen Gleason-Score.

Die Konzentrationen von sRANKL und OPG zeigten eine signifikante Korrelation im Serum und im Knochenmark. Die Konzentrationen von sRANKL und OPG im Knochenmark waren weitgehend unabhängig von der Expression der Parameter im Gewebe.

Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Konzentrationen von RANK/RANKL/OPG-Signalweg assoziierten Biomarkern im Serum und Knochenmark unabhängig von der Expression im Tumorgewebe sind. Weiterhin unterstreichen die vorliegenden Ergebnisse die Bedeutung der intertumorale Heterogenität beim Prostatakarzinom. Die hier angewandte Methodik könnte für Biomarkeranalysen, bei denen die Levels bestimmter Parameter in verschiedenen Körperkompartimenten analysiert werden, zur Anwendung kommen, da nicht nur Unterschiede zwischen den Kompartimenten, sondern

auch der Einfluss der intertumoralen Heterogenität berücksichtigt wird.

## VI. Literaturverzeichnis

1. Robert-Koch-Institut, *Krebs in Deutschland 2003-2004. Häufigkeiten und Trends. 6th ed.* . 2008: Berlin.
2. Peters, E., et al., [*Demographic change and disease rates: a projection until 2050*]. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz, 2010. **53**(5): p. 417-26.
3. Quinn, M. and P. Babb, *Patterns and trends in prostate cancer incidence, survival, prevalence and mortality. Part II: individual countries.* BJU Int, 2002. **90**(2): p. 174-84.
4. Bundesamt, S., *Krankheitskosten - Fachserie 12 Reihe 7.2.* . 2002, 2004, 2006, 2008.
5. Gronberg, H., *Prostate cancer epidemiology.* Lancet, 2003. **361**(9360): p. 859-64.
6. Graham, S., et al., *Diet in the epidemiology of carcinoma of the prostate gland.* J Natl Cancer Inst, 1983. **70**(4): p. 687-92.
7. Johns, L.E. and R.S. Houlston, *A systematic review and meta-analysis of familial prostate cancer risk.* BJU Int, 2003. **91**(9): p. 789-94.
8. Hautmann R. & Gschwend, J.E., *Urologie. 5., aktualisierte Auflage.* 2014: Springer-Lehrbuch. Berlin,.
9. Norgaard, M., et al., *Skeletal related events, bone metastasis and survival of prostate cancer: a population based cohort study in Denmark (1999 to 2007).* J Urol, 2010. **184**(1): p. 162-7.
10. Bubendorf, L., et al., *Metastatic patterns of prostate cancer: an autopsy study of 1,589 patients.* Hum Pathol, 2000. **31**(5): p. 578-83.
11. Roudier, M.P., et al., *Phenotypic heterogeneity of end-stage prostate carcinoma metastatic to bone.* Hum Pathol, 2003. **34**(7): p. 646-53.
12. Imbriaco, M., et al., *A new parameter for measuring metastatic bone involvement by prostate cancer: the Bone Scan Index.* Clin Cancer Res, 1998. **4**(7): p. 1765-72.
13. Saad, F., et al., *Long-term efficacy of zoledronic acid for the prevention of skeletal complications in patients with metastatic hormone-refractory prostate cancer.* J Natl Cancer Inst, 2004. **96**(11): p. 879-82.
14. Roghmann, F., et al., *The burden of skeletal-related events in patients with prostate cancer and bone metastasis.* Urol Oncol, 2015. **33**(1): p. 17 e9-18.
15. Hoogendam, A., F. Buntinx, and H.C. de Vet, *The diagnostic value of digital rectal examination in primary care screening for prostate cancer: a meta-analysis.* Fam Pract, 1999. **16**(6): p. 621-6.
16. Mistry, K. and G. Cable, *Meta-analysis of prostate-specific antigen and digital rectal examination as screening tests for prostate carcinoma.* J Am Board Fam Pract, 2003. **16**(2): p. 95-101.
17. Renfer, L.G., et al., *Is ultrasound guidance necessary for transrectal prostate biopsy?* J Urol, 1995. **154**(4): p. 1390-1.
18. Turkeri, L., et al., *Transrectal ultrasonography versus digitally guided prostate biopsies in patients with palpable lesions on digital rectal examination.* Br J Urol, 1995. **76**(2): p. 184-6.
19. Eichler, K., et al., *Diagnostic value of systematic biopsy methods in the*



- investigation of prostate cancer: a systematic review.* J Urol, 2006. **175**(5): p. 1605-12.
20. Prando, A., et al., *Prostatic biopsy directed with endorectal MR spectroscopic imaging findings in patients with elevated prostate specific antigen levels and prior negative biopsy findings: early experience.* Radiology, 2005. **236**(3): p. 903-10.
  21. Wittekind, C. and B. Oberschmid, *[TNM classification of malignant tumors 2010: General aspects and amendments in the general section]*. Pathologe, 2010. **31**(5): p. 333-4, 336-8.
  22. Epstein, J.I., et al., *The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma.* Am J Surg Pathol, 2005. **29**(9): p. 1228-42.
  23. Gleason, D.F., *Histologic grading of prostate cancer: a perspective.* Hum Pathol, 1992. **23**(3): p. 273-9.
  24. D'Amico, A.V., et al., *Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer.* JAMA, 1998. **280**(11): p. 969-74.
  25. Heidenreich, A., et al., *EAU guidelines on prostate cancer. part 1: screening, diagnosis, and local treatment with curative intent-update 2013.* Eur Urol, 2014. **65**(1): p. 124-37.
  26. Thompson, I., et al., *Guideline for the management of clinically localized prostate cancer: 2007 update.* J Urol, 2007. **177**(6): p. 2106-31.
  27. Bill-Axelson, A., et al., *Radical prostatectomy versus watchful waiting in early prostate cancer.* N Engl J Med, 2011. **364**(18): p. 1708-17.
  28. Klotz, L., et al., *Clinical results of long-term follow-up of a large, active surveillance cohort with localized prostate cancer.* J Clin Oncol, 2010. **28**(1): p. 126-31.
  29. Graefen, M., et al., *[Active surveillance for prostate cancer]*. Urologe A, 2008. **47**(3): p. 261-9.
  30. Parker, C., *The Scandinavian Prostate Cancer Group Study: the case for conservative management.* BJU Int, 2005. **96**(7): p. 952-3.
  31. Kupelian, P.A., et al., *Radical prostatectomy, external beam radiotherapy <72 Gy, external beam radiotherapy > or =72 Gy, permanent seed implantation, or combined seeds/external beam radiotherapy for stage T1-T2 prostate cancer.* Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2004. **58**(1): p. 25-33.
  32. Koukourakis, G., et al., *Brachytherapy for prostate cancer: a systematic review.* Adv Urol, 2009: p. 327945.
  33. Morton, G.C., *The emerging role of high-dose-rate brachytherapy for prostate cancer.* Clin Oncol (R Coll Radiol), 2005. **17**(4): p. 219-27.
  34. Loblaw, D.A., et al., *Initial hormonal management of androgen-sensitive metastatic, recurrent, or progressive prostate cancer: 2006 update of an American Society of Clinical Oncology practice guideline.* J Clin Oncol, 2007. **25**(12): p. 1596-605.
  35. Seidenfeld, J., et al., *Single-therapy androgen suppression in men with advanced prostate cancer: a systematic review and meta-analysis.* Ann Intern Med, 2000. **132**(7): p. 566-77.
  36. Barbieri, C.E., F. Demichelis, and M.A. Rubin, *The lethal clone in prostate cancer: redefining the index.* Eur Urol, 2014. **66**(3): p. 395-7.

37. Berthold, D.R., et al., *Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer: updated survival in the TAX 327 study*. J Clin Oncol, 2008. **26**(2): p. 242-5.
38. Bauman, G., et al., *Radiopharmaceuticals for the palliation of painful bone metastasis-a systemic review*. Radiother Oncol, 2005. **75**(3): p. 258-70.
39. Parker, C., et al., *Alpha emitter radium-223 and survival in metastatic prostate cancer*. N Engl J Med, 2013. **369**(3): p. 213-23.
40. Falkmer, U., et al., *A systematic overview of radiation therapy effects in skeletal metastases*. Acta Oncol, 2003. **42**(5-6): p. 620-33.
41. Yuen, K.K., et al., *Bisphosphonates for advanced prostate cancer*. Cochrane Database Syst Rev, 2006(4): p. CD006250.
42. Fizazi, K., et al., *Denosumab versus zoledronic acid for treatment of bone metastases in men with castration-resistant prostate cancer: a randomised, double-blind study*. Lancet, 2011. **377**(9768): p. 813-22.
43. Mason, M.D., et al., *Oral sodium clodronate for nonmetastatic prostate cancer--results of a randomized double-blind placebo-controlled trial: Medical Research Council PR04 (ISRCTN61384873)*. J Natl Cancer Inst, 2007. **99**(10): p. 765-76.
44. Smith, M.R., et al., *Denosumab and bone-metastasis-free survival in men with castration-resistant prostate cancer: results of a phase 3, randomised, placebo-controlled trial*. Lancet, 2012. **379**(9810): p. 39-46.
45. Miller, K.D., et al., *Cancer treatment and survivorship statistics, 2016*. CA Cancer J Clin, 2016. **66**(4): p. 271-89.
46. Simonet, W.S., et al., *Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density*. Cell, 1997. **89**(2): p. 309-19.
47. Karsenty, G. and E.F. Wagner, *Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development*. Dev Cell, 2002. **2**(4): p. 389-406.
48. Wong, B.R., et al., *TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates c-Jun N-terminal kinase in T cells*. J Biol Chem, 1997. **272**(40): p. 25190-4.
49. Fata, J.E., et al., *The osteoclast differentiation factor osteoprotegerin-ligand is essential for mammary gland development*. Cell, 2000. **103**(1): p. 41-50.
50. Menaa, C., et al., *Enhanced RANK ligand expression and responsivity of bone marrow cells in Paget's disease of bone*. J Clin Invest, 2000. **105**(12): p. 1833-8.
51. Dufresne, A., et al., *Giant-cell tumor of bone, anti-RANKL therapy*. Bonekey Rep, 2012. **1**: p. 149.
52. American Society for, B. and N. Mineral Research President's Committee on, *Proposed standard nomenclature for new tumor necrosis factor family members involved in the regulation of bone resorption. The American Society for Bone and Mineral Research President's Committee on Nomenclature*. J Bone Miner Res, 2000. **15**(12): p. 2293-6.
53. Dougall, W.C., et al., *RANK is essential for osteoclast and lymph node development*. Genes Dev, 1999. **13**(18): p. 2412-24.
54. Anderson, D.M., et al., *A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function*. Nature, 1997. **390**(6656): p. 175-9.
55. Lum, L., et al., *Evidence for a role of a tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha)-converting enzyme-like protease in shedding of TRANCE, a TNF family member involved in osteoclastogenesis and dendritic cell survival*. J Biol Chem, 1999. **274**(19): p. 13613-8.

56. Lacey, D.L., et al., *Osteoprotegerin ligand modulates murine osteoclast survival in vitro and in vivo*. Am J Pathol, 2000. **157**(2): p. 435-48.
57. Hsu, H., et al., *Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(7): p. 3540-5.
58. Wada, T., et al., *RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease*. Trends Mol Med, 2006. **12**(1): p. 17-25.
59. Roodman, G.D., *Mechanisms of bone metastasis*. N Engl J Med, 2004. **350**(16): p. 1655-64.
60. Roudier, M.P., et al., *Bone histology at autopsy and matched bone scintigraphy findings in patients with hormone refractory prostate cancer: the effect of bisphosphonate therapy on bone scintigraphy results*. Clin Exp Metastasis, 2003. **20**(2): p. 171-80.
61. Fizazi, K., et al., *Prostate cancer cells-osteoblast interaction shifts expression of growth/survival-related genes in prostate cancer and reduces expression of osteoprotegerin in osteoblasts*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(7): p. 2587-97.
62. Brown, J.M., et al., *Osteoprotegerin and rank ligand expression in prostate cancer*. Urology, 2001. **57**(4): p. 611-6.
63. Perez-Martinez, F.C., et al., *Immunohistochemical analysis of low-grade and high-grade prostate carcinoma: relative changes of parathyroid hormone-related protein and its parathyroid hormone 1 receptor; osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor-kB ligand*. J Clin Pathol, 2007. **60**(3): p. 290-4.
64. Perez-Martinez, F.C., et al., *Receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL) as a novel prognostic marker in prostate carcinoma*. Histol Histopathol, 2008. **23**(6): p. 709-15.
65. Li, X., et al., *Potential role of the OPG/RANK/RANKL axis in prostate cancer invasion and bone metastasis*. Oncol Rep, 2014. **32**(6): p. 2605-11.
66. Andreoiu, M. and L. Cheng, *Multifocal prostate cancer: biologic, prognostic, and therapeutic implications*. Hum Pathol, 2010. **41**(6): p. 781-93.
67. Ruijter, E.T., et al., *Histological grade heterogeneity in multifocal prostate cancer. Biological and clinical implications*. J Pathol, 1996. **180**(3): p. 295-9.
68. Haffner, M.C., et al., *Genomic and phenotypic heterogeneity in prostate cancer*. Nat Rev Urol, 2021. **18**(2): p. 79-92.
69. Karavitakis, M., et al., *Tumor focality in prostate cancer: implications for focal therapy*. Nat Rev Clin Oncol, 2011. **8**(1): p. 48-55.
70. Gerlinger, M., et al., *Intratumour heterogeneity in urologic cancers: from molecular evidence to clinical implications*. Eur Urol, 2015. **67**(4): p. 729-37.
71. Lovf, M., et al., *Multifocal Primary Prostate Cancer Exhibits High Degree of Genomic Heterogeneity*. Eur Urol, 2019. **75**(3): p. 498-505.
72. Gundem, G., et al., *The evolutionary history of lethal metastatic prostate cancer*. Nature, 2015. **520**(7547): p. 353-357.
73. Wise, A.M., et al., *Morphologic and clinical significance of multifocal prostate cancers in radical prostatectomy specimens*. Urology, 2002. **60**(2): p. 264-9.
74. Haffner, M.C., et al., *Tracking the clonal origin of lethal prostate cancer*. J Clin Invest, 2013. **123**(11): p. 4918-22.
75. Kneppers, J., et al., *Frequent clonal relations between metastases and non-index prostate cancer lesions*. JCI Insight, 2019. **4**(2).

76. Tsourlakis, M.C., et al., *Heterogeneity of ERG expression in prostate cancer: a large section mapping study of entire prostatectomy specimens from 125 patients*. BMC Cancer, 2016. **16**: p. 641.
77. Todenhofer, T., et al., *Serum receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) levels predict biochemical recurrence in patients undergoing radical prostatectomy*. BJU Int, 2014. **113**(1): p. 152-9.
78. Kononen, J., et al., *Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens*. Nat Med, 1998. **4**(7): p. 844-7.
79. Milanes-Yearsley, M., et al., *Tissue micro-array: a cost and time-effective method for correlative studies by regional and national cancer study groups*. Mod Pathol, 2002. **15**(12): p. 1366-73.
80. Coons, A.H., *The development of immunohistochemistry*. Ann N Y Acad Sci, 1971. **177**: p. 5-9.
81. Grube, D., *Constants and variables in immunohistochemistry*. Arch Histol Cytol, 2004. **67**(2): p. 115-34.
82. Böcker, W., Denk, H., Heitz, Ph. U., *Pathologie Pathologie*, ed. A. 3. Auflage. 2004, München: Elsevier, München 20-22.
83. Epstein, J.I. and M. Herawi, *Prostate needle biopsies containing prostatic intraepithelial neoplasia or atypical foci suspicious for carcinoma: implications for patient care*. J Urol, 2006. **175**(3 Pt 1): p. 820-34.
84. J. Köllermann, G.S., *Histologische Diagnostik an der Prostatastanzbiopsie*. Urologe, 2009. **48**: p. 306-313.
85. Remmele, W. and H.E. Stegner, *[Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]*. Pathologe, 1987. **8**(3): p. 138-40.
86. Rizzardi, A.E., et al., *Quantitative comparison of immunohistochemical staining measured by digital image analysis versus pathologist visual scoring*. Diagn Pathol, 2012. **7**: p. 42.
87. *Arbeitsanleitung total sRANKL (human) ELISA Kit 2015*, Immundiagnostik Bensheim AG. p. 7.
88. *Osteoprotegerin ELISA Kit ,Zur in-vitro-Bestimmung des OPG in Serum und Plasma*. 2014, Immundiagnostik AG: Bensheim.
89. Schwartz, G.G., *Prostate cancer, serum parathyroid hormone, and the progression of skeletal metastases*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2008. **17**(3): p. 478-83.
90. Mori, K., et al., *Prognostic Value of Lactate Dehydrogenase in Metastatic Prostate Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis*. Clin Genitourin Cancer, 2019. **17**(6): p. 409-418.
91. Chen, G., et al., *Expression of RANKL/RANK/OPG in primary and metastatic human prostate cancer as markers of disease stage and functional regulation*. Cancer, 2006. **107**(2): p. 289-98.
92. Ohtaka, M., et al., *RANK/RANKL expression in prostate cancer*. Int J Surg Case Rep, 2017. **30**: p. 106-107.
93. Christoph, F., et al., *RANKL/RANK/OPG cytokine receptor system: mRNA expression pattern in BPH, primary and metastatic prostate cancer disease*. World J Urol, 2018. **36**(2): p. 187-192.
94. Aufderklamm, S., et al., *XPA-210: a new proliferation marker determines locally advanced prostate cancer and is a predictor of biochemical recurrence*. World J

- Urol, 2012. **30**(4): p. 547-52.
95. Santamaria, A., et al., *PTOV-1, a novel protein overexpressed in prostate cancer, shuttles between the cytoplasm and the nucleus and promotes entry into the S phase of the cell division cycle*. Am J Pathol, 2003. **162**(3): p. 897-905.
  96. Heumann, A., et al., *Up regulation and nuclear translocation of Y-box binding protein 1 (YB-1) is linked to poor prognosis in ERG-negative prostate cancer*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 2056.
  97. Pach, Y., *Immunohistochemische Untersuchungen zur Expression von Konchenstoffwechselfparametern RANK und RANKL entlang der Progression des Prostatakarzinoms mittels der Tissue-Mikroarray Technik*. 2021.
  98. Armstrong, A.P., et al., *RANKL acts directly on RANK-expressing prostate tumor cells and mediates migration and expression of tumor metastasis genes*. Prostate, 2008. **68**(1): p. 92-104.
  99. Jung, K., et al., *Comparison of 10 serum bone turnover markers in prostate carcinoma patients with bone metastatic spread: diagnostic and prognostic implications*. Int J Cancer, 2004. **111**(5): p. 783-91.
  100. Jung, K., et al., *Serum osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand as indicators of disturbed osteoclastogenesis in patients with prostate cancer*. J Urol, 2003. **170**(6 Pt 1): p. 2302-5.
  101. Eaton, C.L., et al., *Serum osteoprotegerin (OPG) levels are associated with disease progression and response to androgen ablation in patients with prostate cancer*. Prostate, 2004. **59**(3): p. 304-10.
  102. Todenhofer, T., et al., *Alterations of the RANKL pathway in blood and bone marrow samples of prostate cancer patients without bone metastases*. Prostate, 2013. **73**(2): p. 162-8.
  103. Ahmed, H.U., *The index lesion and the origin of prostate cancer*. N Engl J Med, 2009. **361**(17): p. 1704-6.
  104. Liu, W., et al., *Copy number analysis indicates monoclonal origin of lethal metastatic prostate cancer*. Nat Med, 2009. **15**(5): p. 559-65.
  105. Merseburger, A.S., et al., *Tissue microarrays: applications in urological cancer research*. World J Urol, 2006. **24**(5): p. 579-84.
  106. Tourinho-Barbosa, R.R., J. de la Rosette, and R. Sanchez-Salas, *Prostate cancer multifocality, the index lesion, and the microenvironment*. Curr Opin Urol, 2018. **28**(6): p. 499-505.
  107. Pantel, K. and C. Alix-Panabieres, *Bone marrow as a reservoir for disseminated tumor cells: a special source for liquid biopsy in cancer patients*. Bonekey Rep, 2014. **3**: p. 584.
  108. Morgan, T.M., et al., *Disseminated tumor cells in prostate cancer patients after radical prostatectomy and without evidence of disease predicts biochemical recurrence*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(2): p. 677-83.
  109. Riethdorf, S., H. Wikman, and K. Pantel, *Review: Biological relevance of disseminated tumor cells in cancer patients*. Int J Cancer, 2008. **123**(9): p. 1991-2006.
  110. Kollermann, J., et al., *Prognostic significance of disseminated tumor cells in the bone marrow of prostate cancer patients treated with neoadjuvant hormone treatment*. J Clin Oncol, 2008. **26**(30): p. 4928-33.
  111. Pearse, R.N., et al., *Multiple myeloma disrupts the TRANCE/ osteoprotegerin cytokine axis to trigger bone destruction and promote tumor progression*. Proc

- Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(20): p. 11581-6.
112. Giuliani, N., et al., *Myeloma cells induce imbalance in the osteoprotegerin/osteoprotegerin ligand system in the human bone marrow environment*. Blood, 2001. **98**(13): p. 3527-33.
  113. Jones, D.H., et al., *Regulation of cancer cell migration and bone metastasis by RANKL*. Nature, 2006. **440**(7084): p. 692-6.
  114. Ahern, E., et al., *Roles of the RANKL-RANK axis in antitumour immunity - implications for therapy*. Nat Rev Clin Oncol, 2018. **15**(11): p. 676-693.
  115. Jamshidi, K., et al., *Denosumab in Patients with Giant Cell Tumor and Its Recurrence: A Systematic Review*. Arch Bone Jt Surg, 2018. **6**(4): p. 260-268.
  116. Hildebrand, G.K. and A. Kasi, *Denosumab*, in *StatPearls*. 2021: Treasure Island (FL).
  117. Tsourdi, E., et al., *Denosumab effects on bone density and turnover in postmenopausal women with low bone mass with or without previous treatment*. Bone, 2019. **120**: p. 44-49.
  118. Iwamoto, N., et al., *Denosumab is effective toward glucocorticoid-induced osteoporosis patients complicated with rheumatic diseases regardless of prior anti-osteoporotic drugs*. J Bone Miner Metab, 2019. **37**(3): p. 554-562.
  119. Briot, K., et al., *French recommendations for osteoporosis prevention and treatment in patients with prostate cancer treated by androgen deprivation*. Joint Bone Spine, 2019. **86**(1): p. 21-28.
  120. Nocito, A., et al., *Microarrays of bladder cancer tissue are highly representative of proliferation index and histological grade*. J Pathol, 2001. **194**(3): p. 349-57.
  121. Merseburger, A.S., et al., *Tissue microarrays: applications in urological cancer research*. World Journal of Urology, 2006. **24**(5): p. 579-584.

## **VII. Anhang**

### **VII.6. Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift**

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben. Alle wörtlich und inhaltlich übernommenen Stellen aus anderen Arbeiten habe ich als solche gekennzeichnet.

Die Arbeit wurde in der Universitätsklinik für Urologie Tübingen unter der Leitung von Prof. Dr. med. Dr. h.c. Arnulf Stenzl, dem Ärztlichen Direktor der Klinik für Urologie des Universitätsklinikums Tübingen durchgeführt. Die Betreuung erfolgte zunächst durch Prof. Dr. med. Christian Schwentner und wurde im Verlauf von Prof. Dr. med. Tilman Todenhöfer übernommen.

Die Arbeit fand im Rahmen des Verbundprojektes zu Untersuchungen zur Rolle des RANK-Liganden bei Veränderungen des Microenvironments im Knochenmark bei Patienten mit Prostata- bzw. Mammakarzinom statt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. med. Christian Schwentner, Prof. Dr. med. Tilman Todenhöfer und Dipl.-Biol. Jörg Hennenlotter, dem Leiter des Labors der Klinik für Urologie des Universitätsklinikums Tübingen.

Bei der Anfertigung der immunhistochemischen Färbung und der Aufarbeitung der Gewebeproben war Frau Ursula Kühs als medizinisch-technische Assistentin im Uro-Onkologischen Labor der Klinik für Urologie des Universitätsklinikums Tübingen beteiligt.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung durch Prof. Dr. med. Tilman Todenhöfer in Zusammenarbeit mit Dipl.-Biol. Jörg Hennenlotter und Tim Neumann, wissenschaftlicher Mitarbeiter des Labors der Klinik für Urologie des Universitätsklinikums Tübingen.

Die studienassoziierte histopathologische Befundung der Präparate erfolgte durch OA Dr. med. Marcus Scharpf (Institut für Pathologie, Universität Tübingen).

Tübingen, den

### **VI.3. Danksagung**

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. Arnulf Stenzl, dem Ärztlichem Direktor der Klinik für Urologie des Universitätsklinikums Tübingen, für das Überlassen des Themas und die Bereitstellung aller für diese Arbeit benötigten Materialien und Hilfsmittel bedanken.

Herrn Prof. Dr. med. Tilman Todenhöfer gebührt ein großer Dank für die Betreuung, als wissenschaftlicher Mitarbeiter bei Beginn der Arbeit und als betreuender Doktorvater. Er war stets für alle Fragen Ansprechpartner sowohl bei praktischen Anliegen bezüglich der Studie als auch bei wissenschaftlichen oder statistischen Fragen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dipl.-Biol. Jörg Hennenlotter, ohne den diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Herr Hennenlotter war allzeit Ansprechpartner zu allen Aspekten der Arbeit.

Herrn Oberarzt Dr. Marcus Scharpf vom Pathologischen Institut des Universitätsklinikums Tübingen danke ich für die histopathologische Begutachtung der Gewebelockausschnitte und die dreidimensionale Darstellung der unterschiedlichen Tumorherde.

Dank gilt ebenso gesamten Teams des urologischen Labors. Alle hatten stets ein offenes Ohr für meine Anliegen während der wissenschaftlichen Arbeit im Labor.

Herrn Tim Neumann danke ich für die geduldige Hilfe bei der Erstellung der Statistik.

Zu guter Letzt gilt mein allergrößter Dank meiner Familie, meinen Freunden und insbesondere meiner Ehefrau. Die motivierenden Worte und ihr Verständnis waren mir stets eine antreibende Kraft.



