

**Aus der Universitätsklinik für  
Urologie Tübingen**

**Prognostische Bedeutung apoptotischer und nicht-  
apoptotischer disseminierter Tumorzellen  
im Knochenmark von Patienten mit  
nicht-metastasiertem Prostatakarzinom**

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

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

**vorgelegt von  
Faber, Frank**

**2018**

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth  
1. Berichterstatter: Professor Dr. C. Schwentner  
2. Berichterstatterin: Privatdozentin Dr. A. Staebler  
Tag der Disputation: 06.02.2018

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>VII</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>VIII</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Das Prostatakarzinom .....	1
1.1.1 Anatomie und Funktion der Prostata.....	1
1.1.2 Epidemiologie und Ätiologie des Prostatakarzinoms.....	2
1.1.3 Pathologie und Ausbreitung.....	3
1.1.4 Klinik.....	4
1.1.5 Einteilung.....	4
1.1.5.1 TNM-Klassifikation.....	4
1.1.5.2 Gleason Score.....	5
1.1.6 Diagnostik.....	7
1.1.6.1 Früherkennung .....	7
1.1.6.2 Das prostataspezifische Antigen.....	7
1.1.6.3 Digital-rektale Untersuchung.....	8
1.1.6.4 Transrektale Ultraschalluntersuchung.....	8
1.1.6.5 Prostatabiopsie .....	8
1.1.6.6 Ausbreitungsdiagnostik.....	9
1.1.6.7 Staging .....	9
1.1.7 Therapie .....	10
1.1.7.1 Active Surveillance und Watchful Waiting .....	10
1.1.7.2 Radikale Prostatektomie .....	11
1.1.7.3 Strahlentherapie .....	11
1.1.7.4 Hormonablative Therapie.....	11
1.1.8 Nachsorge nach radikaler Prostatektomie.....	12
1.1.9 Rezidivrisiko nach radikaler Prostatektomie.....	12
1.2 Disseminierte Tumorzellen .....	13
1.2.1 Minimal residual disease.....	13
1.2.2 Pathophysiologie ossärer Tumorzell dissemination.....	14
1.2.2.1 Tumoraussaat.....	14

1.2.2.2	Konzept der Nische.....	15
1.2.2.3	Homing .....	16
1.2.2.4	Dormancy .....	16
1.2.2.5	Metastatisches Potenzial disseminierter Tumorzellen .....	17
1.2.3	Molekulare Nachweismethoden von DTC im Knochenmark.....	17
1.2.4	Klinische Bedeutung disseminierter Tumorzellen.....	19
1.3	Fragestellung der Arbeit .....	20
<b>2</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>21</b>
2.1	Studienpopulation.....	21
2.2	Studienverlauf .....	22
2.3	Nachweis apoptotischer und nicht-apoptotischer DTC.....	24
2.4	Statistik.....	25
2.5	Datenschutz .....	26
2.6	Ethikvotum.....	27
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>28</b>
3.1	Charakteristika der Studienkohorte.....	28
3.1.1	Altersverteilung.....	28
3.1.2	Präoperativer PSA-Wert .....	29
3.1.3	Gleason-Score.....	29
3.1.4	Tumorstadien.....	30
3.1.4.1	T-Stadium .....	30
3.1.4.2	N-Stadium.....	31
3.1.4.3	M-Stadium .....	31
3.1.5	Resektionsstatus .....	31
3.2	Nachweis disseminierter Tumorzellen .....	32
3.2.1	Zytokeratinfärbung.....	32
3.2.2	M30-Färbung .....	33
3.3	Korrelation von DTC mit klinischen Patientendaten .....	34
3.3.1	DTC gemäß Panzytokeratinfärbung.....	34
3.3.2	Apoptotische DTC.....	35
3.4	Postoperative Therapiemaßnahmen.....	36
3.4.1	Adjuvante Therapie.....	36
3.4.2	Salvage Therapie.....	36
3.5	Postoperativer Verlauf .....	37

3.5.1	PSA-Persistenz .....	37
3.5.2	Biochemisches Rezidiv .....	37
3.5.2.1	Auftreten biochemischer Rezidive in Abhängigkeit vom Knochenmarksstatus .....	38
3.5.2.2	Vergleich der biochemisch rezidivfreien Lebenszeit in Relation zum Zytokeratinstatus .....	39
3.5.2.3	Biochemisch rezidivfreie Lebenszeit in Relation zu apoptotischen und vitalen DTC .....	40
3.5.3	Metastasierung .....	41
3.5.3.1	Auftreten von Metastasen in Abhängigkeit vom Knochenmarksstatus .....	41
3.5.3.2	Metastasenfreie Überlebenszeit in Relation zum Zytokeratinstatus ..	42
3.5.3.3	Metastasenfreie Überlebenszeit in Relation zu apoptotischen und vitalen DTC .....	43
3.5.4	Überleben .....	44
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>45</b>
4.1	Variation von DTC-Detektionsraten .....	45
4.2	Korrelation von DTC mit klinischen Risikofaktoren .....	47
4.3	Korrelation von DTC mit onkologischem Outcome .....	48
4.4	Notwendigkeit der weiteren Differenzierung von DTC .....	50
4.5	Prognostische Wertigkeit apoptotischer Zellen .....	52
4.6	Limitationen der Studienkonzeption .....	53
4.7	Schlussfolgerung .....	54
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>56</b>
<b>6</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>58</b>
<b>7</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>69</b>
<b>8</b>	<b>Erklärung zum Eigenanteil .....</b>	<b>71</b>
<b>9</b>	<b>Veröffentlichung .....</b>	<b>72</b>
<b>10</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>73</b>
<b>11</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>74</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
AJCC	American Joint Committee on Cancer
al.	Altera
APAAP	Alkaline Phosphatase - Anti-Alkaline Phosphatase
BR	Biochemisches Rezidiv
Bspw.	Beispielsweise
Ca.	Circa
CAPRA	Cancer of the Prostate Risk Assessment
CD	Cluster of differentiation
CK	Zytokeratin
CSC	Krebsstammzelle
CT	Computertomographie
CTC	Zirkulierende Tumorzellen
CXCL	C-X-C-Motiv Ligand
CXCR	C-X-C-Motiv Chemokinrezeptor
DGU	Deutsche Gesellschaft für Urologie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DRU	Digitale rektale Untersuchung
DTC	Disseminierte Tumorzelle
ECM	Extrazelluläre Matrix
EpCAM	Epitheliales Zelladhäsionsmolekül

## Abkürzungsverzeichnis

---

EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
ERG	ETS (erythroblast transformation- specific)-related gene
fPSA	Freies PSA
GnRH	Gonadotropin releasing hormone
HAT	Hormonablative Therapie
HSC	Hämatopoetische Stammzelle
ID	Identifikationsnummer
IL6R	Interleukin 6 Rezeptor
ISHAGE	International Society of Hematotherapy and Graft Engineering
MNC	Mononukleäre Zelle
MRD	Minimal residual disease
MRT	Magnetresonanztomographie
Neg.	Negativ
Nr.	Nummer
OP	Operation
PCA3	Prostate Cancer Gene 3
PCR	Polymerasekettenreaktion
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
Pos.	Positiv
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
PSMA	Prostata-spezifisches Membranantigen
RNA	Ribonukleinsäure

## Abkürzungsverzeichnis

---

RT	Reverse Transkriptase
s.	Siehe
s.a.	Siehe auch
SDF	Stromal derived factor
TGF	Transforming growth factor
TMPRSS2	Transmembrane protease, serine 2
tPSA	Totales PSA
TRUS	Transrektale Ultraschalluntersuchung
TUNEL	terminal desoxynucleotidyl transferase -mediated dUTP-biotin nick end labelling
v.a.	Vor allem
z.B.	Zum Beispiel

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: TNM Klassifikation des Prostatakarzinoms [13].....	5
Tabelle 2: Verteilung des Gleason-Scores innerhalb des Gesamtkollektivs.....	30
Tabelle 3: Verteilung des T-Stadiums innerhalb des Gesamtkollektivs .....	30
Tabelle 4: Korrelation der DTC-Anzahl mit apoptotischen DTC. ....	33
Tabelle 5: Korrelation zwischen Zytokeratin-Status und klinischen Daten .....	34
Tabelle 6: Korrelation zwischen apoptotischen DTC und klinischen Daten .....	35
Tabelle 7: Adjuvante Therapie gruppiert nach Knochenmarksstatus .....	36
Tabelle 8: Salvage Therapie gruppiert nach Knochenmarksstatus .....	36
Tabelle 9: PSA-Persistenz gruppiert nach Knochenmarksstatus .....	37
Tabelle 10: Biochemische Rezidive und Nachbeobachtungszeiträume gruppiert nach Knochenmarksstatus .....	38
Tabelle 11: Aufgetretene Metastasen und Nachbeobachtungszeiträume gruppiert nach Knochenmarksstatus .....	41

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Pathologische Beurteilung nach Gleason [16].....	6
Abbildung 2: Altersverteilung innerhalb des Gesamtkollektivs .....	28
Abbildung 3: Verteilung der präoperativ gemessenen PSA-Werte .....	29
Abbildung 4: Zytokeratinpositive Zellen in verschiedenen Vergrößerungen. a: CK-pos. Zelle in 16-facher Vergrößerung. b+c: Beispiele CK-pos. Zellen in 40-facher Vergrößerung. d: Positivkontrolle in 16-facher Vergrößerung. ....	32
Abbildung 5: M30 positive Zelle in 16-facher (a) und 40-facher (b) Vergrößerung. ....	33
Abbildung 6: Kaplan-Meier-Analyse des Einflusses von positivem DTC- Nachweis auf die biochemische Rezidivfreiheit. ....	39
Abbildung 7: Kaplan-Meier-Analyse des Einflusses von M30-positiven und M30-negativen DTCs auf die biochemische Rezidivfreiheit.....	40
Abbildung 8: Kaplan-Meier-Analyse des Einflusses von positivem DTC- Nachweis auf die metastasenfrie Überlebenszeit .....	42
Abbildung 9: Kaplan-Meier-Analyse des Einflusses von M30-positiven und M30-negativen DTCs auf die metastasenfrie Überlebenszeit.....	43
Abbildung 10: Kaplan-Meier-Analyse des Einflusses von positivem DTC- Nachweis auf das Gesamtüberleben.....	44

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Prostatakarzinom

### 1.1.1 Anatomie und Funktion der Prostata

Die Prostata liegt extraperitoneal an der Basis der Blase um die Urethra, hat in etwa die Größe einer Esskastanie und ist von einer kräftigen fibrösen Kapsel umgeben. Sie verjüngt sich nach kaudal zum *Apex* der Prostata, wobei sie teilweise durch den *Hiatus urogenitalis* ragt und dort dem *Musculus transversus profundus* aufliegt. Nach dorsal grenzt sie an das Rektum, ventral ist sie durch das *Ligamentum puboprostaticum* mit der Symphyse bindegewebig verwachsen. Makroskopisch kann die Prostata in die Seitenlappen (*Lobus dexter* und *sinister*) unterteilt werden, welche bezüglich der Urethra nach ventral durch den *Isthmus prostatae* und nach dorsal durch den *Lobus medius* verbunden sind. Histologisch handelt es sich um einen Verbund von ca. 30-50 tubuloalveolären Drüsen. Unter topographischen und pathologischen Gesichtspunkten kann die Prostata in drei Zonen differenziert werden: Die periurethrale Zone umgibt die *Pars prostatica urethrae*. Nach außen hin folgt zunächst eine schmale Übergangszone, woran sich die zentrale Zone anschließt, welche ca. 25% des Prostatavolumens ausmacht und die beiden *Ductus ejaculatorii* einschließt. Die periphere Zone liegt wiederum dorsal und lateral der zentralen Zone und stellt mit ca. 70% den größten Anteil der Prostata dar. Das Sekret der Prostata ist schwach sauer (pH 6,4) und enthält neben zahlreichen Proteasen vor allem saure Phosphatase. Es bildet mit ca. 30% nach dem Sekret der *Glandulae vesiculares* den zweitgrößten Anteil des Ejakulatvolumens und drainiert über 15-20 kleine Ausführungsgänge in die Urethra seitlich des *Colliculus seminalis*. Arteriell wird die Prostata über *Rami prostatici* aus der *A. vesicalis inferior* und der *A. rectalis media* versorgt, venös fließt das Blut über die *Plexus venosi vesicalis* und *prostaticus* in die *Venae vesicales* ab. Die Lymphe fließt entweder indirekt über pararektale vorgeschaltete Lymphknoten oder direkt über die *Nodi lymphatici iliaci interni* ab [1].

### **1.1.2 Epidemiologie und Ätiologie des Prostatakarzinoms**

Das Prostatakarzinom stellt unter Vernachlässigung der nicht-melanotischen Hautkrebsformen den häufigsten malignen Tumor des Mannes in Deutschland dar. So kam es 2010 zu 65.830 Neuerkrankungen, was einem Anteil von 26,1% aller diagnostizierten Krebserkrankungen entspricht. Während die Anzahl der Erkrankungen pro Jahr stetig ansteigt, ist die altersstandardisierte Erkrankungsrate nach einem Anstieg bis um die Jahrtausendwende seit 2003 weitgehend konstant und beträgt derzeit in Deutschland 111,4/100.000 [2]. Global betrachtet steigt die Zahl der erfassten Neuerkrankungen aufgrund der vorangetriebenen Verwendung PSA-basierter Früherkennungsmethoden weiter an [3]. Die Inzidenz variiert international sehr stark und weist in Europa ein Nord-Süd-Gefälle zugunsten südeuropäischer Länder auf. Die global höchste beschriebene Inzidenz findet sich in den USA [4]. Dabei bestehen in den vereinigten Staaten bedeutende Unterschiede zwischen den ethnischen Subgruppen: Während die asiatisch-stämmigen und indigenen Bevölkerungsmitglieder der USA eine geringe altersstandardisierte Inzidenz von aktuell unter 80/100.000 aufweisen, ist besonders die afroamerikanische Bevölkerung betroffen (223,9/100.000) [5].

Bezüglich der Mortalität steht das Prostatakarzinom nach Lungenkrebs und Darmkrebs in Deutschland mit einem Anteil von 10,8% an allen tödlich verlaufenden Tumorerkrankungen des Mannes an dritter Stelle. Das mittlere Erkrankungsalter beträgt derzeit 70 Jahre. Eine Erkrankung vor dem fünfzigsten Lebensjahr ist dabei selten. So liegt die Wahrscheinlichkeit für einen 35 Jährigen in den nächsten 10 Jahren an einem Prostatakarzinom zu erkranken bei unter 10%, womit das Alter den größten Risikofaktor für das Auftreten der Erkrankung darstellt [2]. Dies ist besonders vor dem Hintergrund der demographischen Entwicklung zu bewerten: Voraussichtlich wird der Anteil der über 60 Jährigen in der Bevölkerung bis 2050 auf ca. 28 Millionen Männer anwachsen, was etwa dem doppelten des heutigen Anteils entspräche. Entsprechend wird ein drastischer Anstieg der Neuerkrankungen an Prostatakrebs erwartet, was neue Herausforderungen im Bereich der Diagnostik und Therapie mit sich bringen wird [6].

Die Entstehung des Prostatakarzinoms ist bis heute weitestgehend ungeklärt. Neben dem Alter gilt vor allem die Assoziation zu positiver Familienanamnese als gesicherter Risikofaktor für das Auftreten der Erkrankung [7]. Ferner wurden vermehrt Zusammenhänge zu Ernährungsgewohnheiten beschrieben, die als Erklärung für die globale Variation der Erkrankungsraten diskutiert werden. So scheint beispielsweise eine fettreiche Ernährung das Risiko auf ein Prostatakarzinom zu erhöhen [8], wohingegen eine phytoöstrogenreiche Kost (z.B. in Sojaprodukten) offenbar mit einer Risikoreduktion einhergeht [9]. Des Weiteren ist in der Literatur ein Zusammenhang zwischen abgelaufener Prostatitis mit der Krebsentität beschrieben [10].

### **1.1.3 Pathologie und Ausbreitung**

Beim Prostatakarzinom handelt es sich fast immer um ein langsam wachsendes azinäres Adenokarzinom des Drüsenepithels, welches zumeist multifokal, seltener auch unifokal, auftritt. Es existiert jedoch eine breite Palette weiterer histomorphologischer Entitäten. So finden sich beispielsweise deutlich seltener auch stromale Tumore, Plattenepithelkarzinome oder Übergangszellkarzinome. [11].

Der Ursprung des Karzinoms liegt in ca. 90% der Fälle in der peripheren Zone. Die meisten anderen Vorkommen finden sich in der Übergangszone, während Tumore der zentralen Zone Raritäten sind. Die lokale Ausbreitung erfolgt bevorzugt in Richtung Apex. Im weiteren Fortschreiten kann auch die Kapsel penetriert werden, wobei benachbarte Gewebe, insbesondere die Samenbläschen, infiltriert werden können. Oft erfolgt die Ausbreitung dabei entlang der Perineuralscheiden [12].

Die Metastasierung erfolgt zunächst meist lymphogen in die Lymphknoten der *Fossa obturatoria*. Nachfolgend kann die Ausbreitung in die prä-sacralen und inguinalen sowie darauffolgend in die iliacalen und paraaortalen Lymphknoten erfolgen. Bei ausgedehnten Befunden können auch mediastinale Lymphknoten befallen sein. Die hämatogene Metastasierung erfolgt bevorzugt ossär, wobei in erster Linie Wirbelkörper, proximaler Femur, Becken, Rippen, Humerus und die

Schädelkalotte betroffen sind. Selten erfolgt auch eine viszerale Metastasierung wie z.B. in die Lunge, die Leber oder die Nebenniere [12].

### **1.1.4 Klinik**

Aufgrund der meist peripheren Lokalisation des Prostatakarzinoms ist die Tumorentität in Frühstadien oft symptomfrei. Erst bei fortschreitender lokaler Ausbreitung kann es analog zur benignen Prostatahyperplasie zu obstruktiven Miktionsbeschwerden und ggfs. auch zu Hämaturie kommen. Bei Infiltration der Ductus ejaculatorii oder der Samenbläschen ist eine Hämatospermie oder eine Verminderung des Ejakulationsvolumens möglich. Ferner kann eine Impotenz im Rahmen der Infiltration der neurovaskulären Bündel auftreten.

Bei lymphogener Metastasierung kann es je nach Lokalisation zu ausgedehnten Lymphödemen, z.B. in den Hodensack, kommen. Selten tritt im Rahmen der lymphatischen Ausbreitung auch eine retroperitoneale Fibrosierung mit konsekutiver Harnleiterobstruktion auf. Eine ösäre Metastasierung kann zu ausgeprägten Knochenschmerzen, Anämie, pathologischen Frakturen und nachfolgend auch zu komplexen neurologischen Ausfällen führen. Bei Metastasierung in andere Organe kann die Klinik entsprechend vielseitig sein. In seltenen Fällen können auch paraneoplastische Syndrome, wie beispielsweise eine disseminierte intravasale Gerinnung oder eine ektope Hormonbildung auftreten [12].

### **1.1.5 Einteilung**

#### **1.1.5.1 TNM-Klassifikation**

Das Prostatakarzinom wird nach der aktuellen TNM-Klassifikation eingeteilt. Dabei bezeichnet T die lokale Tumorausdehnung, N den regionären Lymphknotenstatus und M das Vorliegen von Fernmetastasen. Eine ausführliche Darstellung der aktuellen Einteilung ist in Tabelle 1 dargestellt [13].

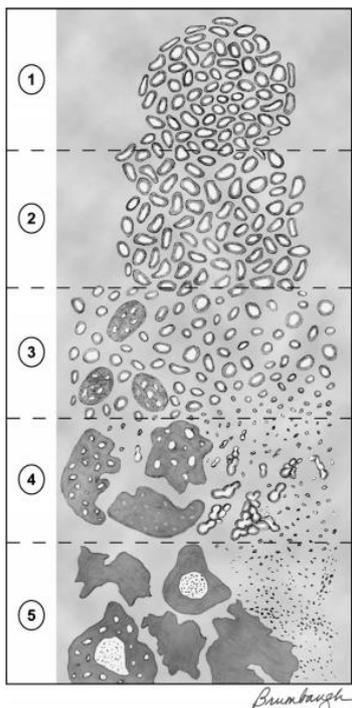
**Tabelle 1: TNM Klassifikation des Prostatakarzinoms [13]**

T - Primärtumor	
Tx	Primärtumor nicht beurteilbar
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Klinisch nicht erkennbarer Tumor, weder palpabel noch in bildgebenden Verfahren sichtbar
T1a	Tumor zufälliger histologischer Befund ("Incidental carcinoma") in 5% oder weniger des resezierten Gewebes
T1b	Tumor zufälliger histologischer Befund ("Incidental carcinoma") in mehr als 5% des resezierten Gewebes
T1c	Tumor durch Nadelbiopsie diagnostiziert (z.B. wegen erhöhtem PSA)
T2	Tumor begrenzt auf Prostata
T2a	Tumor infiltrierte 50% eines Lappens oder weniger
T2b	Tumor infiltrierte mehr als 50% eines Lappens
T2c	Tumor infiltrierte beide Lappen
T3	Tumor durchbricht die Prostatakapsel
T3a	Extrakapsuläre Ausbreitung (einseitig oder beidseitig) ohne Befall der Samenblase(n)
T3b	Extrakapsuläre Ausbreitung mit Befall der Samenblase (n)
T4	Tumor infiltrierte andere benachbarte Strukturen als Samenblase (Blasenhals, Sphincter externus, Rektum, Beckenwand) oder ist fixiert
N - Regionäre Lymphknoten	
Nx	Regionäre Lymphknoten nicht beurteilbar
N0	Kein Anhalt für regionäre Lymphknotenmetastasen
N1	Regionäre Lymphknotenmetastasen
M - Fernmetastasen	
Mx	Fernmetastasen nicht beurteilbar
M0	Kein Anhalt für Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen
M1a	Nichtregionärer Lymphknotenbefall
M1b	Knochenmetastasen
M1c	Metastasen in anderen Organen und/oder Strukturen

### 1.1.5.2 Gleason Score

Zum histopathologischen Grading empfiehlt die aktuelle S3-Leitlinie der DGU die Einteilung gemäß dem Gleason Score. [14]. Bei dem von dem Pathologen Donald F. Gleason vorgeschlagenen System wird dabei zunächst der Grad der

histologischen Entdifferenzierung verschiedener Abschnitte einer Gewebeprobe mit ganzen Zahlenwerten zwischen 1 (gut differenzierte Drüsen) und 5 (schlecht differenzierte Drüsen) belegt. Anschließend werden die so erhaltenen Zahlen der in der Probe am häufigsten und am zweithäufigsten auftretenden Wachstumsmuster addiert, womit Werte zwischen  $1+1=2$  und  $5+5=10$  erreicht werden können. [15]. Entsprechend seiner prognostischen Relevanz wird ein Gleason-Score von 7 noch in 7a (=3+4) und 7b(=4+3) unterteilt. Zur Angleichung der so ermittelten Scores zwischen bioptischem Material und Resektionspräparaten wurde in einer Konsensuskonferenz die genaue Definition der Zahlenwerte und der Scoreberechnung überarbeitet. Außerdem wird der Wert  $1+1=2$  heute nichtmehr als Adenokarzinom sondern als atypische adenomatöse Hyperplasie bezeichnet [16]. Abbildung 1 zeigt schematisch die Zuordnung der verschiedenen Wachstumsmuster zu den Zahlenwerten nach aktueller Definition.



**Abbildung 1: Pathologische Beurteilung nach Gleason [16]**

## **1.1.6 Diagnostik**

### **1.1.6.1 Früherkennung**

Die Effektivität PSA-basierter Screenings wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Eine Metaanalyse der aktuellen Datenlage konnte nachweisen, dass trotz höherer Inzidenz der Entität innerhalb der Screeninggruppen weder bezüglich Gesamtmortalität noch bezüglich der prostataspezifischen Mortalität signifikante Unterschiede bestehen, während die Gefahr zur Überbehandlung klinisch irrelevanter Tumore innerhalb der Screeninggruppen deutlich erhöht ist [17]. Die aktuelle S3-Leitlinie der DGU empfiehlt, dass über 45 jährige Patienten, die eine mutmaßliche Lebenserwartung von über 10 Jahren haben, über die Möglichkeit einer Früherkennungsuntersuchung informiert werden sollen. Gleichzeitig soll dabei über Vor- und Nachteile der Untersuchung aufgeklärt werden [14].

### **1.1.6.2 Das prostataspezifische Antigen**

Beim prostataspezifischen Antigen handelt es sich um eine Serinprotease, welche physiologisch der Verflüssigung des Ejakulats dient. Es wird fast ausschließlich von den Epithelzellen der Azini und Ducti der Prostata Drüsen gebildet und gilt folglich als äußerst sensitiver Marker für Prozesse innerhalb der Prostata. Die Spezifität für maligne Prozesse ist dabei jedoch gering, da das PSA auch bspw. im Rahmen einer benignen Prostat hyperplasie oder einer Prostatitis erhöht sein kann [12]. Auch konnte kein Wert identifiziert werden oberhalb dessen die Inzidenz des Prostatakarzinoms sprunghaft ansteigen würde, sodass ein Schwellenwert zur Biopsieindikation zur weiteren Abklärung nur schwer zu definieren ist [18]. Aktuell wird die diagnostische Eskalation bei kontrolliertem PSA-Wert über 4 ng/ml empfohlen, wobei die Indikation zur Biopsie individuell auch früher gestellt werden kann [14]. Zur Erhöhung der Spezifität der PSA-Messung in der Krebsdiagnostik kann eine Bestimmung der molekularen Fraktionen im Serum erfolgen, da der Quotient aus freiem PSA (fPSA) zum Gesamt-PSA (tPSA) bei Karzinomen erniedrigt, bei benigner Prostat hyperplasie jedoch erhöht ist. [19]. Eine weitere Verbesserung bietet die wiederholte Messung des PSA-Werts zur Bestimmung der Anstiegsgeschwindigkeit, wobei auch hier kein Konsens zu einem sinnvollen Grenzwert besteht. Häufig wird ein

Anstieg von  $>0,75$  ng/ml pro Jahr unabhängig vom Ausgangswert als Hinweis auf ein Prostatakarzinom interpretiert [20]. Bei histologisch gesichertem Karzinom ist das PSA ein wertvoller Marker zur Stadieneinteilung und Therapiekontrolle.

### **1.1.6.3 Digital-rektale Untersuchung**

Die digital-rektale Untersuchung (DRU) ist ein kostensparendes grundlegendes Verfahren zur Erkennung von Prostatakarzinomen und stellt das entscheidende Verfahren zur Einschätzung der lokalen Tumorausdehnung dar [14]. Hierbei kann insbesondere die periphere Zone der Prostata durch transrektales Tasten der Prostata gut beurteilt werden. Laut einer Metaanalyse der vorliegenden Daten weist die DRU eine relativ hohe Spezifität (94%) sowie einen sehr hohen negativen prädiktiven Wert (99%) bei gleichzeitig niedriger Sensitivität (59%) und niedrigem positiven prädiktiven Wert (28%) auf [21]. Aufgrund der niedrigen Sensitivität ist die DRU nicht zur alleinigen Früherkennungsuntersuchung geeignet, kann jedoch die Karzinomfindung PSA-basierter Screenings noch erhöhen [22]. Insbesondere bei PSA-Werten  $<4$  ng/ml können mithilfe der DRU einige Karzinome identifiziert werden, die ansonsten übersehen werden würden [23].

### **1.1.6.4 Transrektale Ultraschalluntersuchung**

In der transrektalen Ultraschalluntersuchung (TRUS) grenzt sich ein Karzinom klassischerweise als hypoechogener Bereich von der Prostata ab, wobei jedoch keineswegs jedes Karzinom derart gestaltet sein muss. [24]. Insgesamt zeigte sich, dass die TRUS bei normalem PSA und normaler DRU nur eine geringe zusätzliche Information bieten kann, weswegen sie in der Früherkennung eine untergeordnete Rolle spielt [25]. Das Verfahren kommt derzeit vor allem in der Volumetrie sowie der ultraschallunterstützten Biopsie bei Malignitätsverdacht zum Einsatz [12].

### **1.1.6.5 Prostatabiopsie**

Die Gewebeentnahme ist zur Diagnosesicherung und für das histopathologische Grading obligat. Der derzeitige Standard stellt die systematische transrektale ultraschallkontrollierte Entnahme von 10 bis 12 Gewebezylindern mittels

Stanzbiopsie aus verschiedenen anatomischen Regionen der Prostata dar. Palpatorisch auffällige Areale können zusätzlich gezielt biopsiert werden. Indikationen stellen ein kontrollierter PSA-Wert  $>4$  ng/ml, ein suspekter Tastbefund der DRU und eine erhöhte PSA-Anstiegsgeschwindigkeit dar [14].

### **1.1.6.6 Ausbreitungsdiagnostik**

Eine weiterführende Diagnostik wird aufgrund eingeschränkter Testgüteparameter derzeit nur risikoadaptiert empfohlen: Bei Patienten mit Knochenschmerzen oder einem von Gleason-Score  $>7$  oder einem PSA-Wert  $>10$  sollte eine Knochenszintigraphie zur Auffindung von Knochenmetastasen durchgeführt werden [26, 14]. Patienten mit einem Gleason-Score von  $\geq 8$  oder dem Stadium T3/T4 können unter Berücksichtigung der individuellen klinischen Fragestellung von einer Magnetresonanztomographie (mit Endorektalspule) profitieren [14]. Eine Computertomographie (CT) kann dem Nachweis von Lymphknotenmetastasen dienen, weist jedoch nur begrenzte Spezifität und Sensitivität auf [12]. Auch die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) ist trotz hoher diagnostischer Aussagekraft bezüglich ihres diagnostischen Nutzens umstritten, wobei die Untersuchungsmethode gleichzeitig sehr teuer ist [27].

Im Zuge der stetigen Weiterentwicklung bildgebender Verfahren werden derzeit innerhalb von Studien einige neue Methoden erprobt, welche noch keinen Eingang in aktuelle Leitlinien erhalten haben. So konnten beispielsweise Harisinghani et al. mittels intravenöser Applikation superparamagnetischer Nanopartikel selbst kleine Lymphknotenmetastasen per MRT mit hoher Sensitivität detektieren [28]. Auch Neurungen der PET-MRT scheinen vielversprechende neue Möglichkeiten zu bieten. Es konnte bspw. gezeigt werden, dass sich der Tracer  $^{68}\text{Ga}$ -PSMA zur Auffindung selbst kleiner Tumorreste bei Rezidiven eignet [29].

### **1.1.6.7 Staging**

Zur adäquaten Therapieplanung hat sich neben der TNM-Einteilung die Zuteilung der Patienten zu Gruppen nach D'Amico bewährt, welche sich nach dem Rezidivrisiko nach der angestrebten Therapie bemessen. Dies erfolgt dabei durch Zusammenschau des T-Stadiums nach DRU, des PSA-Werts und des Gleason-Scores der Biopsie [30]. Basierend auf denselben Parametern kann

eine noch präzisere Einschätzung des Rezidivrisikos durch Nutzung validierter Nomogramme erfolgen, die jedoch aufgrund ihrer Vielschichtigkeit eine Schwierigkeit in der klinischen Handhabung darstellen [31]. Eine vergleichbare Präzision verspricht der einfach zu errechnende CAPRA-Score, welcher zur Berechnung zusätzlich das Patientenalter und die Anzahl positiver Stanzbiopsien benötigt [32]. Analog kann mithilfe der genannten Risikofaktoren auch eine Abschätzung der lokalen Infiltration und des Lymphknotenbefalls anhand empirisch erstellter Tabellen vorgenommen werden, wobei die zuletzt 2007 aktualisierten Partin-Tabellen am weitesten verbreitet sind [33].

### **1.1.7 Therapie**

Art und Umfang der empfohlenen Therapie richten sich neben dem Staging vor allem nach dem Allgemeinzustand und dem Alter des Patienten. Entscheidend bei der Wahl der Therapie ist dabei der Patientenwunsch.

#### **1.1.7.1 Active Surveillance und Watchful Waiting**

Die vermehrte Verwendung PSA-basierter Früherkennungsuntersuchungen führt zur Diagnose klinisch irrelevanter Tumoren, die mit und ohne Behandlung die gleiche Prognose aufweisen [34]. Zur Vermeidung der Übertherapie solcher vermeintlich niedrigmaligner und kleinvoluminöser Tumoren, sollten Patienten mit niedrigem Risikoprofil neben den kurativen Optionen auch über die Active-Surveillance-Strategie informiert werden, bei welcher unter engmaschiger Kontrolle zunächst eine abwartende Haltung eingenommen wird. Aktuell werden hierfür folgende Kriterien gefordert: Gleason  $\leq 6$ , PSA  $\leq 10$ , T1/2a, Tumor in  $\leq 2$  Stanzen, Tumoranteil pro Stanze  $\leq 50\%$  [14]. Sollte ein Progress der Erkrankung auftreten, kann eine verzögerte kurative Therapie erfolgen. Langzeitdaten stehen momentan noch aus.

Watchful Waiting bezeichnet demgegenüber ein definitiv konservatives, nicht-kuratives Therapiekonzept, das sich aufgrund eingeschränkter Prognose vor allem bei älteren oder multimorbiden Patienten mit Lebenserwartung  $< 10$  Jahren anbietet [35]. Dabei kommen palliative Verfahren erst beim Auftreten von subjektiv störenden Symptomen zum Einsatz. Hierzu gehören z.B. eine

transurethrale Resektion der Prostata bei obstruktiver Symptomatik oder palliative Radio- bzw. Hormontherapie zur Behandlung ossärer Metastasen.

### **1.1.7.2 Radikale Prostatektomie**

Die radikale chirurgische Entfernung der Prostata ist eine primäre Therapieoption des nicht-metastasierten Prostatakarzinoms. Eine prospektiv randomisierte Studie konnte belegen, dass die radikale Prostatektomie bei Patienten mit lokal begrenztem Befund und einer Lebenszeiterwartung von >10 Jahren zu einer signifikanten Senkung lokaler Tumorprogression, Auftreten von Metastasen und tumorspezifischer Mortalität gegenüber einer Watchful-Waiting-Strategie führt [36]. Der chirurgische Zugang kann offen (retropubisch oder perineal), laparoskopisch oder roboterassistiert (DaVinci) erfolgen. Die verschiedenen Methoden zeigen dabei bei begrenzt beurteilbarer Datenlage bezüglich der peri- und postoperativen Komplikationen vergleichbare Ergebnisse [37]. Die Hauptnebenwirkungen des Verfahrens bestehen vor allem im postoperativen Auftreten von erektiler Dysfunktion, Harninkontinenz und Urethrastrikturen, wobei das Outcome erheblich von der Erfahrung des Operateurs abhängig ist [38].

### **1.1.7.3 Strahlentherapie**

Eine Bestrahlung des Tumorgewebes kann perkutan mittels eines Linearbeschleunigers oder als High- bzw. Low-Dose-Rate (HDR/ LDR) Brachytherapie mittels radioaktiver Seeds erfolgen. Auch eine Kombination der Möglichkeiten ist möglich. Die Bestrahlungsverfahren stellen kurative primäre Therapiealternativen zur radikalen Prostatektomie des nicht-metastasierten Prostatakarzinoms dar, wobei aktuell keine ausreichend validen Daten zum Vergleich der einzelnen Methoden vorliegen [14]. Neben der primären Bestrahlung ist die perkutane Radiatio auch als adjuvantes Verfahren nach radikaler Prostatektomie bei lokal fortgeschrittenen Karzinomen, insbesondere mit positiven Schnitträndern (R1), indiziert [14].

### **1.1.7.4 Hormonablative Therapie**

Da das Wachstum vieler Prostatakarzinome testosteronabhängig ist, lässt sich mithilfe einer hormonablativen Therapie (HAT, auch Androgendeprivation) eine Verlangsamung des Tumorwachstums erzielen. Hierfür stehen die bilaterale

Orchiektomie, GnRH-Agonisten und Antagonisten oder steroidale und nicht-steroidale Antiandrogene zur Verfügung [12]. Das Verfahren ist palliativer Natur und kann bspw. adjuvant bei positivem Lymphknotenstatus oder bei metastasiertem Karzinom angewandt werden [14].

### **1.1.8 Nachsorge nach radikaler Prostatektomie**

Zur rechtzeitigen Erkennung von Rezidiven nach radikaler Prostatektomie werden regelmäßige biochemische Nachsorgeuntersuchungen empfohlen. Die erste Untersuchung asymptomatischer Patienten sollte dabei nach 12 Wochen erfolgen, wobei der PSA-Wert unter die Nachweisgrenze abgefallen sein sollte. Weitere Untersuchungen sollten innerhalb der ersten 2 Jahre vierteljährlich, im 3. und 4. Jahr halbjährlich und danach jährlich erfolgen [14]. In der Regel werden 2 aufeinanderfolgende PSA-Werte  $>0,2$  ng/ml als biochemisches Rezidiv (BR) gewertet, wobei diese Definition kontrovers diskutiert wird [39, 14]. Sollte der PSA-Wert nach der Operation nicht in den definierten Nullbereich abgefallen sein, spricht man von einer PSA-Persistenz, was als Hinweis auf lokal verbliebenes Tumorgewebe oder auf unerkannte Fernmetastasen gilt [40]. Sowohl im Falle einer PSA-Persistenz, als auch im Falle eines biochemischen Rezidivs, kann eine Radiatio als second-line-Therapie in kurativer Absicht erfolgen. In fortgeschrittenen Stadien kann in palliativer Absicht hormonablative Therapie angestrebt werden [14].

### **1.1.9 Rezidivrisiko nach radikaler Prostatektomie**

Kohortenstudien zur Untersuchung des postoperativen Krankheitsverlaufs nach radikaler Prostatektomie wurden an diversen Zentren mit teils schwankenden Ergebnissen durchgeführt, wobei die Raten für biochemisch-progressionsfreies Überleben, metastasenfreies Überleben und tumorspezifisches Überleben nach 10 Jahren jeweils ungefähr 68-75%, 84-90% und 97% betragen [41–44]. Das Rezidivrisiko korreliert dabei vor allem mit dem präoperativen PSA-Wert, der lokalen Tumorausdehnung, dem Gleason-Score und mit positiven Resektionsrändern [42]. Die hieraus hervorgegangen Nomogramme und Risikoeinschätzungen (s.a. Abschnitt 1.1.6.7) konnten zwar bereits große Fortschritte im Management des Prostatakarzinoms erreichen, sind jedoch aufgrund der Unsi-

cherheit der einzelnen eingehenden Variablen in ihrer Genauigkeit limitiert [45]. Im Rahmen der Suche nach verlässlichen Prädiktoren konnte die Forschung der letzten Jahrzehnte dank moderner technischer Möglichkeiten eine Welle neuer Biomarker und Testverfahren hervorbringen, die nachweislich mit dem Rezidivrisiko nach primär operativem Vorgehen korrelieren. Hierzu gehören bspw. das Prostatakrebs-Antigen 3 (PCA3), das TMPRSS2-ERG Fusionsgen oder auch zirkulierende Tumorzellen (CTC) [46]. Den klinischen Mehrwert solcher biologischer Marker konnten Kattan et al. bereits 2003 demonstrieren, indem durch die Erweiterung ihres Nomogramms um IL6R und TGF- $\beta$ 1 dessen prognostische Genauigkeit von 75% auf 83% gesteigert werden konnte [47].

Trotz dieser Fortschritte stellt die Einschätzung des individuellen Risikos der Patienten auch heute noch eine große Herausforderung in der Urologie dar. Um zukünftig eine weitere Individualisierung der Therapie zu ermöglichen und gleichzeitig Überbehandlung zu vermeiden, bedarf es daher weiterer intensiver Forschungsbemühungen auf diesem Gebiet.

## **1.2 Disseminierte Tumorzellen**

### **1.2.1 Minimal residual disease**

Obwohl die meisten PSA-Rezidive in den ersten Monaten nach der Operation auftreten, können Progresse auch noch über 10 Jahre nach radikaler Prostatektomie beobachtet werden [41, 42]. Dieser Umstand der jahrelangen Verzögerung der Wiedererkrankung nach primärer Therapie kann auch bei vielen weiteren Tumorentitäten beobachtet werden und signalisiert den Verbleib maligner Zellen im Körper des Patienten. Der erstmalige Nachweis einzelner disseminierter Tumorzellen (DTC) im Knochenmark von Brustkrebspatientinnen in den 80er Jahren erlaubte in diesem Zusammenhang die Übertragung des Begriffs der „minimal residual disease“ (MRD) von Leukämien und Lymphomen auf solide Tumore [48]. Dabei handelt es sich bei DTC offensichtlich um Zellen, die bereits essenzielle Schritte zur Bildung von Metastasen durchlaufen haben: Sie konnten den Primärtumorkomplex verlassen, außerhalb des zellulären Verbundes überleben, den programmierten Zelltod vermeiden (sog. Apoptose), dem Stress

innerhalb des Gefäßsystems standhalten und letzteres auch wieder verlassen. DTC stellen daher einen essenziellen Zwischenschritt vor der Ausbildung von Tochtergeschwülsten in entfernten Organen dar [49]. Da Metastasen die Hauptursache von Morbidität und Mortalität solider Tumoren darstellen und DTC eine Schlüsselrolle in diesem Prozess einnehmen, müssen Herkunft und Charakteristika der DTC verstanden werden.

## **1.2.2 Pathophysiologie ossärer Tumorzeldissemination**

### **1.2.2.1 Tumorausfaat**

Epithelzellen verfügen naturgemäß über eine starke Einbindung in den zellulären Verbund und die extrazelluläre Matrix (ECM), welche bei epithelialen Tumoren für eine systemische Aussaat im Sinne einer Metastasierung notwendig durchbrochen werden muss. Bei einigen Entitäten, mitunter auch beim Prostatakarzinom, deutet die Datenlage darauf hin, dass die Tumorzellen hierfür mittels der sog. „epithelial-mesenchymalen Transition“ (EMT) eine phänotypische Änderung hin zu mesenchymalen Zellen vornehmen, was den Zellen eine gesteigerte Motilität verleiht und es ihnen ermöglicht den Primärtumor zu verlassen [50–53]. Außerdem können die Zellen dadurch die physiologische Apoptose beim Lösen der Zell-ECM-Kontakte (sog. *Anoikis*) vermeiden [54]. Bei der EMT handelt sich dabei um einen konservierten Mechanismus, welcher physiologisch besonders in der embryonalen Entwicklung für die Wanderung epithelialer Zellen, z.B. bei der Entwicklung der Neuralleiste, eine Schlüsselrolle einnimmt [55]. Sie bewirkt im Wesentlichen eine Downregulation epithelialer Strukturproteine wie E-Cadherin bei gleichzeitig gesteigerter Expression von Matrix-Metalloproteinasen, welche eine Degradation der ECM erlauben. Dieser Vorgang wird durch die Aktivierung einer Reihe von Transkriptionsfaktoren, vor allem von Twist und SNAIL aus der Zinkfinger-Familie, vermittelt und über eine Vielzahl verschiedener Signalwege induziert, wobei die TGF $\beta$ -Familie hierin eine dominante Rolle einnimmt [56]. Neben dem Aspekt der Mobilisierung aus dem zellulären Verbund, scheint der Mechanismus auch eine wichtige Rolle in der Bildung von sog. Krebsstammzellen (CSC) einzunehmen, wobei die damit

verbundenen Fähigkeiten zur Selbsterneuerung und Proliferation maßgebliche Größen in der späteren Ausbildung von Metastasen sind [57, 58].

Vom Primärtumor schließlich losgelöste Zellen können im Zuge der systemischen Erkrankung entweder direkt oder sekundär nach zunächst lymphogener Metastasierung in die Blutbahn eindringen [49, 59]. Innerhalb des Gefäßsystems sind die Zellen dabei enormen biomechanischen Belastungen und dem Immunsystem ausgeliefert, wodurch die meisten Tumorzellen zugrunde gehen. Es wird angenommen, dass einzelne Tumorzellen überleben, indem sie sich der Beanspruchung durch Bildung eines Gerinnsels aus Fibrin und Thrombozyten entziehen [60].

### **1.2.2.2 Konzept der Nische**

Bereits 1889 erkannte Stephen Paget bei Brustkrebspatientinnen, dass nicht jedes Organ in gleichem Umfang empfänglich für die Bildung von Metastasen ist. In seiner bekannten „seed-and-soil“-Theorie postulierte er, dass ein Zielorgan bestimmte Bedingungen („soil“, engl. Boden) aufbieten muss, damit sich Tumorzellen („seed“, engl. Saat) dort einnisten können [61]. Die seitdem in der Krebsforschung gewonnen Erkenntnisse unterstützen diese These bis heute, wobei man davon ausgeht, dass für ein erfolgreiches sekundäres Tumorstadium, neben den genetischen Veränderungen der Tumorzellen, vor allem die Interaktion der Zellen mit dem Mikromilieu des Zielorgans von entscheidender Bedeutung ist. Hierbei beschreibt das „Mikromilieu“ in diesem Zusammenhang eine Kombination physikalischer, chemischer und biologischer Komponenten, welche von vielen Faktoren beeinflusst wird. Insbesondere spielen hierbei z.B. durch Botenstoffe vermittelte Zell-Zell-Interaktionen und die Gefäßversorgung eine ausgezeichnete Rolle [62]. Es konnte gezeigt werden, dass eben dieses Gefüge von Primärtumoren auf endokrine Weise, noch vor der eigentlichen Metastasierung, sogar aus der Ferne beeinflusst werden kann, wodurch eine sogenannte „prämetastatische Nische“ geschaffen wird. So fanden sich in Mäusen bereits 14 Tage nach Implantation von Tumorgewebe Cluster VEGFR1-positiver hämatopoetischer Stammzellen (HSC) an genau jenen Orten, an denen sich später Tumorzellen ansiedelten und Metastasen ausbildeten [63]. Der

Begriff der „Nische“ wurde dabei bereits in den 70er Jahren von Schofield zur Beschreibung des Lebensraums der HSC im Knochenmark geprägt, welcher bei der Regulation des Lebenszyklus und der Erhaltung der Stammzellen bedeutende Rolle spielt [64]. Wie Forschungen der letzten Jahre erkannten, fungiert eben jene Nische auch im Rahmen ossärer Metastasierung als Nährboden für disseminierte Tumorzellen [65]. Experimentell konnte sogar gezeigt werden, dass DTC eines Prostatakarzinoms im Knochenmark von Mäusen in parasitärer Weise um den Platz der HSC an den Osteoblasten konkurrieren, indem sie diese verdrängen [66, 67].

### **1.2.2.3 Homing**

Wie die Tumorzellen den Weg in die Knochenmarksnischen finden und in diese einwandern (sog. Homing) ist Gegenstand intensiver Forschung. Das bei diesem Vorgang am besten untersuchte und bedeutendste Chemokin ist SDF-1 („stromal derived factor“; auch als CXCL12 bekannt). Es wird neben anderen Zellen hauptsächlich durch Osteoblasten gebildet und vermittelt durch Bindung an den CXCR4-Chemokinrezeptor 4 (CXCR4) physiologisch u.a. das Einwandern der HSC in ihre Nische [68]. Dass der Signalweg auch für das Homing von Tumorzellen von herausragender Bedeutung ist, ließ sich bspw. bei Prostatakarzinomzellen zeigen, deren gesteigerte CXCR4-Expression mit starker Chemoattraktion zum Knochenmark einherging [69]. Ferner triggert SDF-1 durch gesteigerte Aktivierung von  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin und CD164 die Adhäsion disseminierter Tumorzellen an Endothelzellen des Knochenmarks und an Osteoblasten [70, 71]. Neben den Chemokin-vermittelten Homingmechanismen scheinen Karzinomzellen auch diverse Adhäsionsmoleküle zu binden, die physiologisch für die Verankerung der HSC an den Osteoblasten zuständig sind. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass sowohl HSC als auch Prostatakarzinomzellen Rezeptoren für Annexin-II (ANXA2) exprimieren, deren Blockade bei beiden Zelltypen zu gestörter Adhäsion im Knochenmark führt [72, 73].

### **1.2.2.4 Dormancy**

Eine wichtige Aufgabe der endostealen Nische ist die Regulation des Zellzyklus der HSC. Um die Selbsterneuerungsfähigkeit der Stammzellen zu erhalten,

werden diese durch die Mikroumgebung an den Osteoblasten im Ruhestadium G0 gehalten, was auch als Quieszenz bezeichnet wird [74]. Der Zustand unterliegt einer komplexen Regulation, wobei dem Thyrosinkinase-Rezeptor Tie2 und seinem Liganden Angiopoetin-1, sowie den hypoxischen Bedingungen am Endost besondere Bedeutung beigemessen wird [75, 76]. Für DTC konnte ein ähnlicher Übergang in einen Ruhezustand beobachtet werden (sog. „cellular dormancy“), welcher ein langfristiges Überleben unter Umgehung des Immunsystems ermöglicht und die Zellen für heutige Therapieformen oft unerreichbar macht [77]. Obgleich die verantwortlichen Vorgänge nicht zur Gänze geklärt sind, scheinen DTC auch hierfür ähnliche molekulare Mechanismen zu nutzen, die physiologisch der Regulation der HSC-Quieszenz in der Knochenmarksni-sche dienen [78].

### **1.2.2.5 Metastatisches Potenzial disseminierter Tumorzellen**

Bei DTC handelt es sich um eine überaus heterogene Zellgruppe. Da sich die Zellen einerseits zu verschiedenen Zeitpunkten vom Primärtumor lösen können und sie andererseits individuelle Anpassungen in ihrem Lebenszyklus vorgenommen haben, alterieren sie sowohl genetisch, epigenetisch als auch phänotypisch beträchtlich [79]. Dem geschuldet variiert auch die Neigung zur Proliferation und damit einhergehend die Neigung zur Metastasenbildung. So scheinen spät ausgesandte DTC ein höheres Risiko zu bergen tatsächlich Metastasen zu bilden als früh ausgesandte DTC, die jedoch wiederum eine erhöhte Tendenz zur Dormancy aufweisen [79]. Die genauen Umstände, wann eine Tumorzelle in die Dormancy übergeht, ob sie aus diesem Zustand wieder reaktiviert werden kann und welche Bedingungen entweder die Apoptose oder das Wachstum von Metastasen triggern, sind bis heute nur in ihren Ansätzen verstanden und würden in ihrer Ausführlichkeit den Rahmen der vorliegenden Arbeit übersteigen.

### **1.2.3 Molekulare Nachweismethoden von DTC im Knochenmark**

Da disseminierte Tumorzellen nur in sehr geringer Anzahl im Knochenmark vorliegen, werden vor der eigentlichen Detektion derselben zumeist Anreicherungsverfahren durchgeführt. Häufig wird hierfür die Dichte-Gradient-

Zentrifugation angewendet, bei welcher physikalische Größen der Zellfraktionen genutzt werden, um unter Verwendung eines speziellen Mediums (z.B. Ficoll-Hypaque) mononukleäre Zellen (MNC) von Erythrozyten und polynukleären Zellen zu trennen. Eine Alternative zu diesem Verfahren bietet die immunomagnetische Separation. Hierbei können die gewünschten Zellen mittels Antikörper gegen epitheliale Oberflächen (z.B. anti-EpCAM [„epithelial cell adhesion molecule“]) direkt ausselektiert werden oder es können unerwünschte Zellen, bspw. durch Nutzung eines Antikörpers gegen das Leukozytenantigen CD45, eliminiert werden. Des Weiteren können auch spezielle Filter zur Anreicherung der DTC verwendet werden, was jedoch derzeit ein nur wenig angewandtes Verfahren darstellt [80, 81].

Zum eigentlichen Nachweis disseminierter Tumorzellen werden in der Regel immunzytochemische Methoden mit Primärantikörpern gegen epitheliale oder tumorassoziierte Antigene eingesetzt. Zur Detektion epithelstammiger Zellen in mesenchymalen Geweben (wie dem Knochenmark) haben sich hierfür besonders Zytokeratin-Antikörper bewährt, da es sich bei Zytokeratinen um Proteine des Zytoskeletts von Epithelzellen handelt, die von hämatopoetischen Stammzellen nicht exprimiert werden. Um die Sensitivität der Methode zu steigern können Antikörper verwendet werden, die gegen mehrere Zytokeratine gleichzeitig gerichtet sind (sog. Panzytokeratin-Antikörper). Daneben eignet sich auch der, bereits im Rahmen der Selektion diskutierte, anti-EpCAM Antikörper zur breiten Detektion epithelialer Zellen. Die Färbung des so entstandenen Antigen-Antikörper-Komplexes erfolgt dann zumeist über die APAAP-Methode (Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase). Hierfür ermöglicht ein Brückenantikörper die Bindung des Komplexes an den APAAP-Komplex. Letzterer stellt dabei wiederum einen Antikörper gegen alkalische Phosphatase dar, welcher bereits präformiert an alkalische Phosphatase gebunden ist. Die eigentliche Färbung erfolgt dann unter Zugabe chromogener Substrate der alkalischen Phosphatase wie bspw. Neufuchsin oder Fast-Red [82]. Die Nutzung unterschiedlicher Antikörper und unterschiedlicher Färbetechniken geht mit deutlich schwankenden Detektionsraten einher, weshalb die Nutzung standardisierter Schemata zur Detektion disseminierter Tumorzellen empfohlen wird [83, 84].

Ein weiterer Ansatz zur Detektion von DTC bietet der Nachweis spezifischer Transkripte von Tumorzellen (z.B. PSA-mRNA). Hierfür werden die mRNA-Stücke zunächst via reverser Transkription (RT) in DNA-Abschnitte überführt und dieselben anschließend mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Auch der direkte Nachweis von DNA-Mutationen mittels PCR ist möglich, was jedoch wegen fehlender spezifischer Marker aufgrund genetischer Heterogenität zum Nachweis von DTC kaum Anwendung findet [80].

### **1.2.4 Klinische Bedeutung disseminierter Tumorzellen**

Untersuchungen zur prognostischen Relevanz präinterventionell nachgewiesener disseminierter Tumorzellen wurden zu diversen soliden Tumoren mit unterschiedlichen Ergebnissen durchgeführt. Bis heute ist das Mammakarzinom die diesbezüglich am besten untersuchte Krebsentität, wobei der größte Datensatz in einer gepoolten Analyse erfasst ist, welche 4703 europäische und US-amerikanische Brustkrebspatientinnen einschließt. Zur Zeit der Diagnosestellung konnten hierin bei ca. 30% der Patientinnen disseminierte Tumorzellen im Knochenmark nachgewiesen werden, ohne dass sonstige Anzeichen auf Fernmetastasierung vorlagen. Der Nachweis von DTC war innerhalb des 10-jährigen Follow-ups mit signifikant schlechterem Outcome, insbesondere hinsichtlich Gesamtüberleben und tumorspezifischem Überleben, vergesellschaftet. Die weitere Analyse zeigte außerdem, dass das Vorliegen von DTC einen unabhängigen Risikofaktor darstellt, dessen prognostische Relevanz für alle Subgruppen belegt werden konnte [85]. Basierend auf der eindeutigen Datenlage wurde das Vorliegen disseminierter Tumorzellen beim Mammakarzinom inzwischen in den aktuellen Auflagen der TNM-Klassifikation und des Cancer Staging Manual des American Joint Committee on Cancer (AJCC) berücksichtigt [13, 86].

Einzelne monozentrische Studien konnten auch bei vielen anderen Tumorarten eine Verbindung zwischen dem Nachweis von DTC und einer schlechten Prognose herstellen. Hierzu zählen unter anderem gastrointestinale Karzinome (Magen, Darm, Pankreas), Lungenkrebs, Ovarialkarzinom sowie das Melanom. [87–91] Eine definitive Aussage bezüglich der prognostischen Relevanz konnte

jedoch aufgrund der schwachen Datenlage neben dem Mammakarzinom bei bisher noch keiner weiteren Entität getroffen werden.

Im Speziellen ist auch beim Prostatakarzinom die klinische Relevanz der DTC nicht abschließend geklärt, wobei vorliegende Studien auf diesem Gebiet teils widersprüchliche Ergebnisse hervorbrachten [92]. Aufgrund erheblicher methodischer Unterschiede zwischen den einzelnen Studien und bisweilen sehr unterschiedlicher Kollektive der vorliegenden Arbeiten ist ein Gesamtbild der Situation dabei nur schwer zu zeichnen (s. Diskussion).

### **1.3 Fragestellung der Arbeit**

Obwohl disseminierte Tumorzellen unzweifelhaft eine essenzielle Rolle in der systemischen Ausbreitung solider Tumoren einnehmen, konnte deren Einfluss auf die Prognose von Prostatakarzinompatienten bislang nicht sicher belegt werden. Da die beschriebenen Diskrepanzen in der Literatur vermeintlich auf methodische Unterschiede zwischen den einzelnen Studien zurückzuführen sind, muss eine zukünftige Sicherung der Datenlage auf der Basis standardisierter Verfahren erfolgen. In diesem Sinne war das Ziel der vorliegenden Studie präoperativ nachgewiesene disseminierte Tumorzellen im Knochenmark von Prostatakarzinompatienten auf ihre prognostische Relevanz hin zu prüfen, wobei die Bestimmung der DTC basierend auf einem immunhistochemischen Verfahren gemäß den Empfehlungen zur Standardisierung der DTC-Detektion erfolgt ist. Des Weiteren sollte erstmalig beim Prostatakarzinom untersucht werden, ob bei nachweisbarer Tumorzell dissemination im Knochenmark eine Unterscheidung zwischen apoptotischen DTC und vitalen DTC eine weitere prognostische Information beinhaltet.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Studienpopulation

Das Ausgangskollektiv der vorliegenden Arbeit sind Patienten mit nicht-metastasiertem Prostatakarzinom, die zwischen Dezember 2007 und Februar 2011 an der Universitätsklinik für Urologie in Tübingen primär radikal prostatektomiert worden sind und einer routinemäßigen intraoperativen Entnahme von Knochenmarksmaterial aus dem Beckenkamm zu wissenschaftlichen Zwecken zugestimmt haben. Ferner muss das Biopsat gemäß der in Abschnitt 2.3 aufgeführten Methoden auf disseminierte Tumorzellen untersucht worden sein. Diese primären Anforderungen ergaben ein Kollektiv von 467 Patienten.

Von den infrage kommenden Patienten wurden nun vorab Patientencharakteristika (Name, Alter, Geburtsdatum), pathologischer TNM-Status, OP-Datum, Resektionsstatus, Gleason-Score, präoperativer Serum-PSA Wert sowie die Ergebnisse der Zytokeratinfärbung aus den klinikeigenen Unterlagen erfasst. Bei positivem Zytokeratinnachweis wurde des Weiteren das Ergebnis der M30-Färbung eingeholt.

Zur Einschränkung des Kollektivs wurden vor der Erhebung des Follow-ups weitere Einschlusskriterien mithilfe etablierter Risikofaktoren definiert. Dabei wurde die Erfüllung mindestens einer der folgenden drei Punkte gefordert:

- Serum PSA  $\geq 10$  ng/ml zum Zeitpunkt der Prostatektomie
- T  $\geq 3$  in der abschließenden Histologie
- Gleason-Summenscore  $>7$

Ausgeschlossen wurden Patienten mit bekannten zusätzlichen malignen Erkrankungen, neoadjuvanter hormonablativer Therapie und nicht ausreichendem Knochenmarksmaterial. Insgesamt wurde durch Definition der Kriterien eine Reduktion des Kollektivs auf 213 Patienten erreicht.

## 2.2 Studienverlauf

Nach Eingrenzung des Kollektivs gemäß o.g. Kriterien erfolgte die retrospektive Erhebung des Follow-ups. Von Interesse waren hierbei Informationen darüber, ob und wann es zu biochemischen Rezidiven (oder ggfs. zu einer PSA-Persistenz), zu Lokalrezidiven oder zu Fernmetastasen gekommen war. Außerdem sollten die nach der Prostatektomie durchgeführten Therapieformen in Art und Zeitpunkt detailliert erfasst werden. Hierfür wurden für die vorliegende Arbeit folgende Definitionen festgesetzt:

- Das Nichterreichen eines postoperativen PSA-Nadirs  $<0,1$  ng/ml gilt als PSA-Persistenz
- Zwei aufeinanderfolgende PSA-Werte  $>0,2$  ng/ml nach adäquatem postoperativem Abfall wurden als biochemisches Rezidiv bezeichnet. Als Zeitpunkt eines Rezidivs wurde das Datum der ersten Messung mit  $>0,2$  ng/ml festgesetzt.
- Eine Radiotherapie (oder HAT), die aufgrund eines Rezidivs nach zunächst adäquatem postoperativem PSA-Abfall durchgeführt wurde, wurde als „salvage“ bezeichnet
- Eine Radiotherapie (oder HAT) innerhalb von 6 Monaten nach radikaler Prostatektomie wurde als „adjuvant“ bezeichnet, sofern sie nicht aus vorgenannter Indikation erfolgte.
- Als Lokalrezidiv oder Fernmetastase wurde jeder beweisende Befund aus radiologischer Bildgebung oder klinischer Untersuchung (Sonographie, Knochenszintigraphie, PET-CT, DRU etc.) gewertet.

In einer ersten Phase wurden nun zunächst alle elektronischen Patientenakten des Klinikums Tübingen und die externen Arztbriefe gesichtet. Ferner wurden Datenbanken mit überschneidenden klinischen Endpunkten anderer Forschungsprojekte der Klinik für Urologie in Tübingen analysiert, um im weiteren Verlauf Mehrfachbefragungen von Patienten zu vermeiden. Insbesondere gingen im Zuge dessen auch Informationen aus den regelmäßig versandten Nachbeobachtungsbögen des Comprehensive Cancer Center (CCC) Tübingen in die Datenbank ein. Um ein möglichst aktuelles Follow-up zu gewährleisten, wurden

Daten nur dann als vollständig erachtet, wenn der letzte Kontakt zu dem jeweiligen Patienten am 01.03.2014 nicht länger als 6 Monate zurücklag, wobei das genannte Datum den Beginn der geplanten telefonischen Befragung darstellte.

In der zweiten Phase der Erhebung wurden die Patienten, deren Follow-up bis dahin unvollständig oder veraltet war, telefonisch befragt, nachdem das Gespräch vorab postalisch angekündigt wurde (exemplarisches Anschreiben siehe Anhang 1). Das Telefonat umfasste nach Aufklärung über die Vertraulichkeit und Freiwilligkeit des Gesprächs die algorithmische Erfassung aller studienrelevanten Parameter. Zuerst wurde dabei der postoperative PSA-Verlauf erfragt, um zu eruieren, ob eine PSA-Persistenz aufgetreten war oder ob es nach einem adäquaten PSA-Abfall im weiteren Verlauf zu einem biochemischen Rezidiv gekommen war. War kein Ereignis aufgetreten, wurde der letzte gemessene PSA-Wert erfragt und notiert. Bei Patienten mit PSA-Persistenz oder biochemischem Rezidiv wurde das exakte Datum der Diagnosestellung, sowie die weitere Therapie (Bestrahlungszeiträume, HAT-Therapie etc.) detailliert eruiert. Im Anschluss wurde nach dem Auftreten eines Lokalrezidivs oder einer Fernmetastase gefragt. Bei unauffälligen klinischen Untersuchungen, einschließlich eventuell durchgeführter Bildgebung (z.B. TRUS, Knochenszintigraphie etc.), wurde das letzte Datum einer urologischen Untersuchung notiert, unabhängig davon, welche Untersuchung zu diesem Zeitpunkt durchgeführt wurde. War es hingegen zu einem gesicherten Lokalrezidiv oder zu Metastasen gekommen, wurde, analog zu dem oben dargestellten Verfahren beim biochemischen Rezidiv, Datum der Diagnose und therapeutisches Vorgehen im Detail besprochen.

Falls die Patienten relevante Informationen innerhalb des Gespräches nicht ausreichend genau schildern konnten, wurde das Einverständnis der Patienten zur Kontaktaufnahme der zuständigen Fachärzte eingeholt. Diese wurden dann in einer dritten Studienphase per Fax und zum Teil auch telefonisch kontaktiert (exemplarisches Fax siehe Anhang 2).

Data-Closeup der Erhebung war der 01.07.2014. Patienten, die die Teilnahme an der Studie ablehnten oder deren Follow-up-Informationen unvollständig wa-

ren, wurden aus der Studie ausgeschlossen. Letzteres betraf dabei v.a. Patienten, die bis zum Cut-Off-Datum nicht kontaktiert werden konnten.

Nach Abschluss der Erhebung umfasste das auszuwertende Kollektiv 202 Patienten.

### **2.3 Nachweis apoptotischer und nicht-apoptotischer DTC**

Vor der Durchführung der radikalen Prostatektomie wurden intraoperativ 5-20ml Knochenmark aus dem Beckenkamm aspiriert und zur weiteren Verarbeitung in heparinierter Form an die Abteilung für Immunzytologie des Labors der Universitäts-Frauenklinik Tübingen übergeben.

Dort erfolgte zunächst eine Dichte-Zentrifugation (Dichte 1,077 g/ml, Ficoll; Biochrom, Berlin, Deutschland), sodass die mononukleäre Zellfraktion abgetrennt werden konnte. Diese wurde nach Zellzählung unter dem Lichtmikroskop derart mittels einer phosphatgepufferten Salzlösung resuspendiert, dass eine Lösung der Konzentration  $1 \times 10^6$  Zellen/ml entstand. Zur Erstellung der Cytospins wurden mehrere Objektträger unter Nutzung spezieller Aufsätze mit jeweils 1ml dieser Lösung beschickt und anschließend in eine spezielle Zentrifuge der Bauart *Rotina 380* (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland) eingebracht. Nach der Zentrifugation konnte der Überstand mithilfe einer Pipette abgenommen werden, woraufhin nach erneuter Zentrifugation eine Lufttrocknung der Objektträger über 24h bei Raumtemperatur erfolgte. Zurück blieben also auf jedem Objektträger  $1 \times 10^6$  MNC.

Die immunhistochemische Färbung erfolgte automatisiert durch den *DAKO Autostainer* (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark). Dabei wurden die Zellen zunächst gemäß gängiger Schemata 10 Minuten lang in 5% Formalin fixiert und mit phosphatgepufferter Salzlösung gespült. Als Primärantikörper wurde der murine Panzytokeratinantikörper *mAb A45-B/B3* (Micromet, München, Deutschland) verwendet, welcher an ein gemeinsames Epitop der Zytokeratine 8,18 und 19 bindet [93]. Die Visualisierung des Antikörperkomplexes erfolgte im Anschluss an die 15-minütige Inkubation der Zellen mit dem Primärantikörper unter Beachtung der Herstellerangaben durch das *DAKO-APAAP detection kit*

(DakoCytomation). Als Substrat der alkalischen Phosphatase diente Neufuchsin (DakoCytomation). Zuletzt erfolgte die Gegenfärbung der mononukleären Zellen durch Hämatoxilin (DakoCytomation).

Von jedem Patienten wurden  $2 \times 10^6$  Zellen (2 Cytospins) untersucht. Die gefärbten Zellen wurden durch das ACIS™ imaging system (ChromaVision, Medical Systems Inc., San Juan, Capistrano, CA, USA) zunächst automatisch erkannt und anschließend gemäß den Empfehlungen für standardisierte Detektion disseminierter Tumorzellen der europäischen Arbeitsgruppe ISHAGE evaluiert [83, 94].

Zum Nachweis apoptotischer disseminierter Tumorzellen wurden zusätzliche Cytospins angefertigt und mithilfe des Antikörpers M30 (Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland) sowie dem DAKO-APAAP-kit nach o.g. Methode visualisiert. Dabei bindet M30 spezifisch an ein Neoepitop von Zytokeratin 18, welches nur bei dessen Zerlegung durch Caspaseaktivität während der frühen Phase der Apoptose entsteht [95]. Da M30 nicht an intaktes Zytokeratin 18 in lebenden oder nekrotischen Zellen bindet, handelt es sich um einen spezifischen Marker für apoptotische Zellen [96]. Vorteil gegenüber anderen weit verbreiteten Nachweisverfahren apoptotischer Zellen, wie z.B. der Caspase-3-Färbung oder des sog. „TdT-mediated dUTP-biotin nick end labelling“ (TUNEL), war im Rahmen dieser Studie die Spezifität für epitheliale Zellen, da Zytokeratin 18 von nicht-epithelialen Zellen des Knochenmarks nicht exprimiert wird [97, 98]. Die Identifikation apoptotischer Zellen erfolgte daraufhin mikroskopisch unter den Gesichtspunkten der positiven M30-Färbung und zytomorphologischer Kriterien [99]. Als Positivkontrolle der Färbung wurden Salzsäure-behandelte MCF-7 Zellen verwendet, während unbehandelte MCF-7 Zellen und Leukozyten freiwilliger Spender als Negativkontrolle fungierten [100].

## 2.4 Statistik

Die Datenbank wurde mit Excel (Microsoft Office 2007, Microsoft Corporation, Redmond, USA) erstellt und gepflegt. Nach der Erhebung und der Anonymisierung erfolgte zunächst eine Überarbeitung der Spalten entsprechend eines Kodierplans. Im Anschluss wurde die Datenbank zur statistischen Auswertung in

das Statistikprogramm JMP® (Version 11.0, SAS Institute, Cary, USA) importiert, wo jeder Spalte gemäß ihres Wertebereichs das entsprechende Skalenniveau (stetig, nominal, ordinal) zugeordnet wurde. Nicht benötigte Spalten wurden gelöscht.

Stetige Parameter wurden neben Median und Wertebereich durch Mittelwert, Standardabweichung und Histogramme charakterisiert. Bei diskreten Parametern wurden Häufigkeitsverteilungen berechnet. Für den Vergleich zweier Kohorten (z.B. DTC positiv vs. negativ) bezüglich stetiger Variablen (z.B. PSA-Wert, Alter) wurde der nichtparametrische Wilcoxon/Kruskal-Wallis Test verwendet. Bei einem entsprechenden Vergleich zweier Kohorten bezüglich binärer Variablen (z.B. N-Status, R-Status, dichotomisierte Variablen) wurden  $\chi^2$ -Tests verwendet. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit  $<5\%$  ( $p < 0,05$ ) wurde jeweils als signifikant gewertet. Für die Schätzung der Überlebenszeiten ohne biochemisches Rezidiv, Lokalrezidiv, Metastasen und Tod bezüglich verschiedener Variablen wurden Kaplan-Meier-Kurven und der Log-Rang-Test verwendet.

### **2.5 Datenschutz**

Die Durchführung der Studie erfolgte unter besonderem Augenmerk auf Einhaltung der Datenschutzrichtlinien und der ärztlichen Schweigepflicht. Sämtliche patientenbezogenen Daten wurden in einer Datenbank erfasst, welche ausschließlich auf klinikinternen Rechnern gespeichert wurde und nur autorisierten Mitarbeiter/-innen der Klinik für Urologie in Tübingen zur Ansicht und Bearbeitung zugänglich war. Alle Telefonate wurden von klinikeigenen Anschlüssen aus getätigt. Dabei wurde jeder Patient vor Beginn des Gespräches noch einmal ausdrücklich darüber informiert, dass das Gespräch der ärztlichen Schweigepflicht unterliegt. Nach Erfassung aller klinischen Parameter wurde die Datenbank terminal anonymisiert, wofür den Patienten in fortlaufender Nummerierung eine ID zugeordnet wurde und anschließend Vornamen, Nachnamen, Geburtsdaten, Anschriften sowie Telefonnummern aus der Datenbank entfernt wurden. Der so erhaltene Datensatz lässt keine Rückschlüsse auf die Identität einzelner Personen mehr zu. Die weitere Bearbeitung sowie die statistische Auswertung erfolgten erst im Anschluss an diese Anonymisierung.

## **2.6 Ethikvotum**

Vor Durchführung der Studie erfolgte die Erstellung eines Prüfplanes zur Vorlage bei der Tübinger Ethikkommission. Der Prüfplan umfasste neben Titel der Arbeit, Name der Beteiligten und Finanzierung vor allem Details zum Inhalt und zur Durchführung des Projekts. Dabei wurden wissenschaftliche Hintergründe erörtert, Studienziele aufgezeigt, Ein- und Ausschlusskriterien definiert und letztlich der Studienablauf und die Untersuchungsmethoden ausführlich beschrieben. Insbesondere wurde darauf eingegangen, dass eine telefonische Kontaktaufnahme zunächst postalisch angekündigt werden würde und die Patienten zu Beginn jedes Gespräches darüber informiert würden, dass die Teilnahme an der Befragung freiwillig sei und keine Nachteile durch die Nichtteilnahme entstünden. Ein weiterer Punkt des Prüfplanes war die ausführliche Diskussion der oben aufgeführten Aspekte des Datenschutzes.

Nach Vorlage des Prüfplans befürwortete die Ethikkommission die Durchführung der Studie in ihrem Ethikvotum Nr. 204/2014BO2.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Charakteristika der Studienkohorte

Der untersuchten Erkrankung geschuldet bestand das Patientenkollektiv ausschließlich aus Männern. Nach Abschluss der Erhebung umfasste das Kollektiv 202 Patienten, die zur statistischen Auswertung zur Verfügung standen.

#### 3.1.1 Altersverteilung

Das Alter der Patienten betrug zum Zeitpunkt der Operation im Mittel  $64,44 \pm 6,32$  Jahre (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung). Der jüngste Patient war dabei 45 Jahre, der älteste Patient 77 Jahre alt, der Median betrug 65 Jahre. Die Altersverteilung des Gesamtkollektivs ist in Abbildung 2 dargestellt.

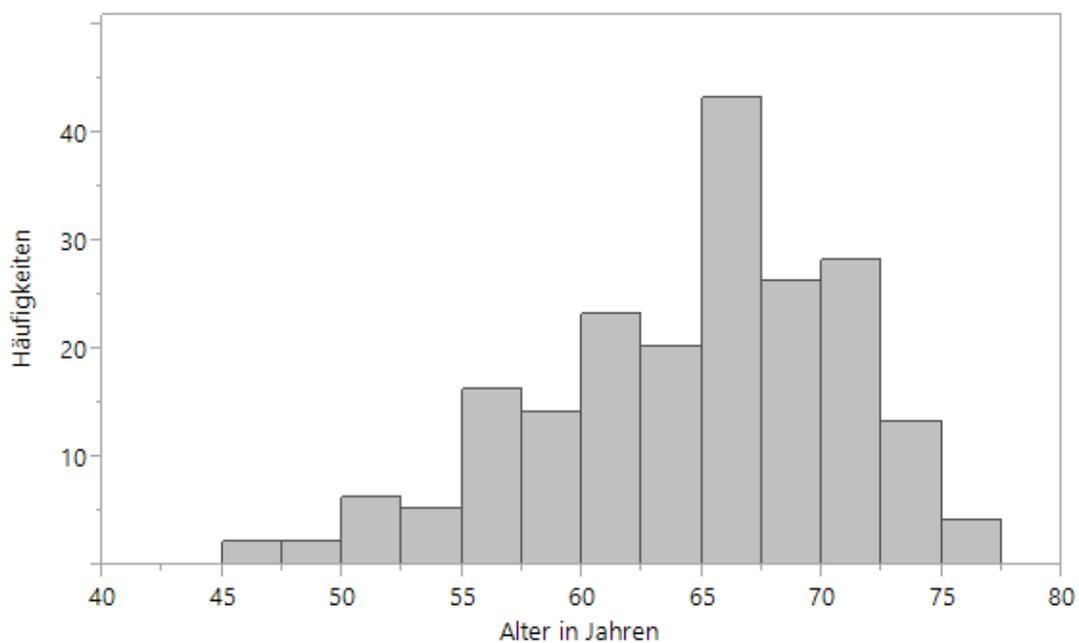
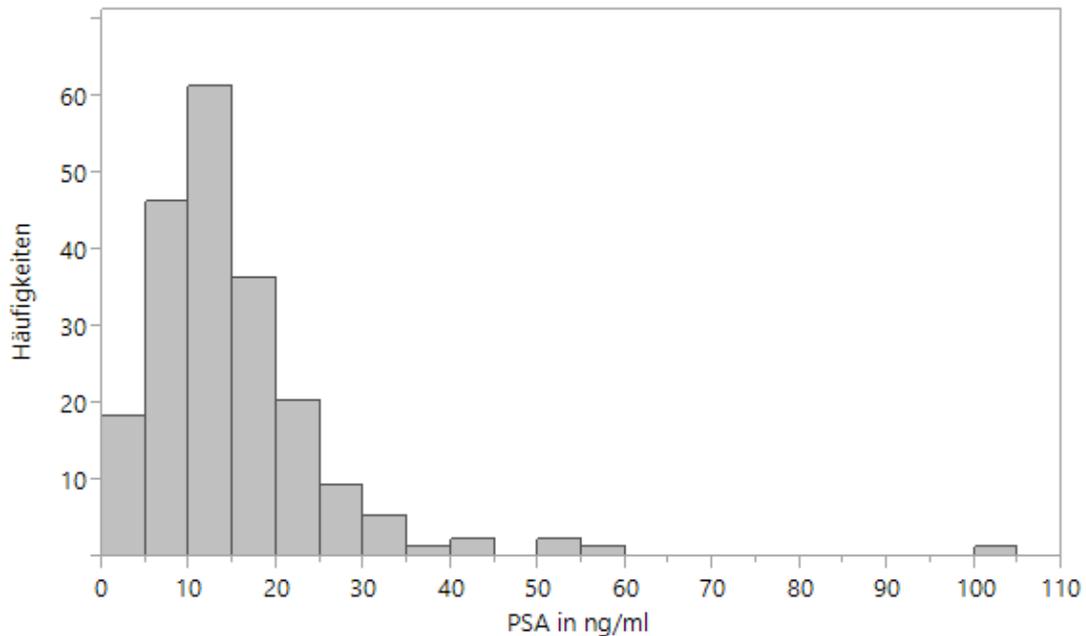


Abbildung 2: Altersverteilung innerhalb des Gesamtkollektivs

### 3.1.2 Präoperativer PSA-Wert

Der präoperativ bestimmte PSA-Wert der Patienten lag im Mittel bei  $14,84 \pm 11,16$  ng/ml. Der kleinste gemessene Wert betrug 0,10 ng/ml, der größte 104 ng/ml. Der Median lag bei 11,95 ng/ml. Die Verteilung der PSA-Werte ist in Abbildung 3 dargestellt.



**Abbildung 3: Verteilung der präoperativ gemessenen PSA-Werte**

### 3.1.3 Gleason-Score

Das Kollektiv umfasste Patienten mit einem Gleason-Score zwischen 5 und 10. Dabei wiesen 137 Patienten (68,3%) einen Gleason-Score  $\leq 7$  auf, 64 Patienten (31,7%) hatten entsprechend einen Gleason-Score  $> 7$ . Die genaue Verteilung ist Tabelle 2 zu entnehmen.

**Tabelle 2: Verteilung des Gleason-Scores innerhalb des Gesamtkollektivs**

<b>Gleason-Summenscore</b>	<b>Anzahl</b>	<b>Prozent</b>
5	3	1,5%
6	15	7,4%
7	120	59,4%
8	30	14,9%
9	31	15,3%
10	3	1,5%
Summe	202	100,0%

### 3.1.4 Tumorstadien

#### 3.1.4.1 T-Stadium

Anhand des Operationspräparates konnten 98 (48,5%) Patienten ein pathologisches T-Stadium  $<3$  zugerechnet werden. Entsprechend litten 104 (51,5%) der Patienten an einem Karzinom mit kapselüberschreitendem Tumorwachstum ( $T \geq 3a$ ). Die Häufigkeitsverteilung der einzelnen T-Stadien ist Tabelle 3 zu entnehmen.

**Tabelle 3: Verteilung des T-Stadiums innerhalb des Gesamtkollektivs**

<b>T- Stadium</b>	<b>Anzahl</b>	<b>Prozent</b>
1c	1	0,5%
2a	9	4,5%
2b	2	1,0%
2c	86	42,6%
3a	72	35,6%
3b	29	14,4%
3c	1	0,5%
4	2	1,0%
Gesamt	236	100,0%

#### **3.1.4.2 N-Stadium**

Bei einem Patient lag eine abschließende Beurteilung der operativ mitentnommenen regionalen Lymphbahnen nicht vor. Bei 20 Patienten (9,9%) konnten lokale Lymphknotenmetastasen (N1) gefunden werden.

#### **3.1.4.3 M-Stadium**

Gemäß der Definition der Studienpopulation war bei keinem Patient zum Zeitpunkt der Operation eine Fernmetastasierung (M1) bekannt. Dabei lagen bei 36 Patienten (17,8%) zum Operationszeitpunkt vollständige Staginguntersuchungen zum Ausschluss von Fernmetastasen vor.

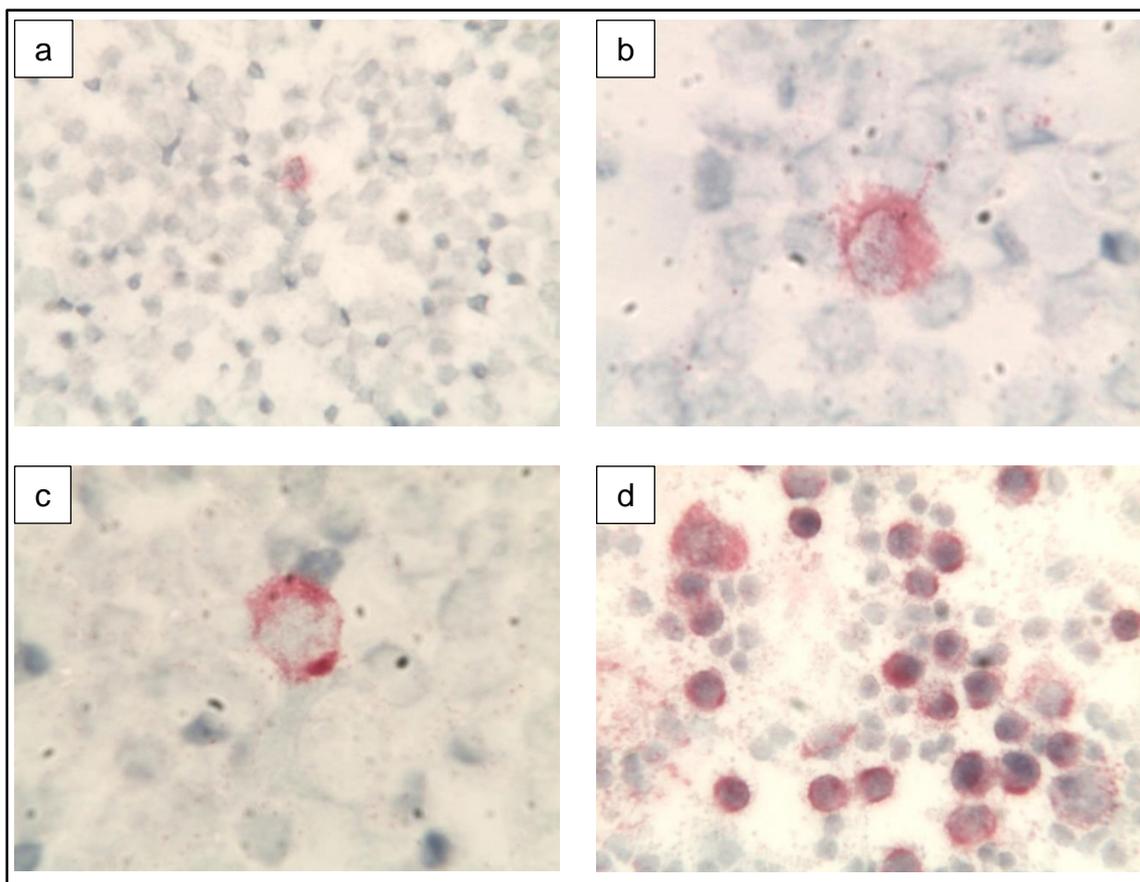
#### **3.1.5 Resektionsstatus**

Bei 4 Patienten lag keine abschließende Beurteilung der operativen Resektionsränder vor. Unter den verbliebenen 198 Patienten waren bei 69 Patienten (34,8%) die Schnittränder befallen, bei 129 Patienten (65,2%) waren die Schnittränder frei.

## 3.2 Nachweis disseminierter Tumorzellen

### 3.2.1 Zytokeratinfärbung

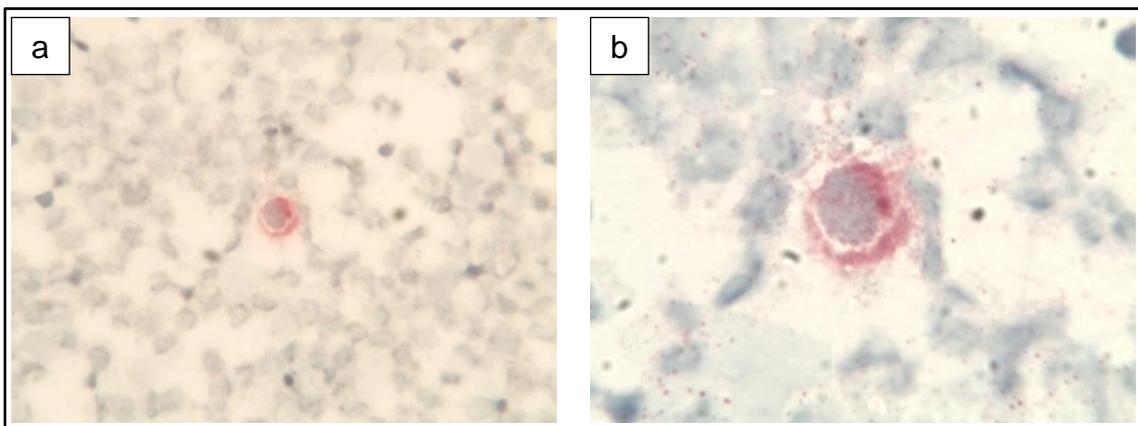
Die Zytokeratinfärbung erbrachte bei 37 der 202 Patienten (18,3%) den Nachweis disseminierter Tumorzellen im Knochenmark. Die mediane Anzahl nachgewiesener DTC betrug 1 DTC pro  $2 \times 10^6$  mononukleären Zellen, die Spanne lag dabei zwischen 1 und 3 DTC pro  $2 \times 10^6$  MNC. Bei 12 Patienten war mehr als nur eine Zelle in den Präparaten aufzufinden. Abbildung 4 zeigt lichtmikroskopische Beispiele der Zytokeratinfärbungen. Neben der roten Färbung sind die für Tumorzellen typischen großen Kerne mit hoher Kern-Plasma Relation zu erkennen. Die Kerne sind dabei teilweise von der ansonsten zytoplasmatisch geprägten Zytokeratinfärbung überdeckt.



**Abbildung 4: Zytokeratinpositive Zellen in verschiedenen Vergrößerungen.** a: CK-pos. Zelle in 16-facher Vergrößerung. b+c: Beispiele CK-pos. Zellen in 40-facher Vergrößerung. d: Positivkontrolle in 16-facher Vergrößerung.

### 3.2.2 M30-Färbung

Bei Patienten mit positivem Nachweis disseminierter Tumorzellen durch die Panzytokeratinfärbung wurde eine zusätzliche Subdifferenzierung durch Einholung des M30-Status vorgenommen. Dabei konnten lichtmikroskopisch unter den Gesichtspunkten positiver M30-Färbung und zytomorphologischer Kriterien bei 14 der 37 Patienten (37,8%) apoptotische DTC identifiziert werden. Abbildung 5 zeigt beispielhaft eine apoptotische disseminierte Tumorzelle in verschiedenen Vergrößerungen.



**Abbildung 5: M30 positive Zelle in 16-facher (a) und 40-facher (b) Vergrößerung.**

Zwischen dem Nachweis von  $>1$  DTC pro  $2 \times 10^6$  Zellen in der Zytokeratinfärbung und dem M30-Status ließ sich per  $\chi^2$ -Test kein signifikanter Zusammenhang feststellen ( $p=0,74$ ). Die Verhältnisse sind als Vierfeldertafel in Tabelle 4 dargestellt.

**Tabelle 4: Korrelation der DTC-Anzahl mit apoptotischen DTC.**

	DTC-Anzahl pro $2 \times 10^6$ Zellen	
	1 DTC	$\geq 2$ DTC
M30-Status		
Positiv	9	5
Negativ	16	7

### 3.3 Korrelation von DTC mit klinischen Patientendaten

#### 3.3.1 DTC gemäß Panzytokeratinfärbung

Der Nachweis disseminierter Tumorzellen (CK positiv) im Knochenmark der Patienten korrelierte weder mit dem Alter zum Zeitpunkt der Operation noch mit dem präoperativ gemessenen PSA-Wert. Auch das Vorliegen von kapselüberschreitendem Wachstum ( $pT \geq 3$ ), befallenen Lymphknoten (N1) oder positiven Resektionsrändern (R1) unterschied sich in den beiden Gruppen nicht signifikant. Eine Zusammenfassung der Genüberstellung zwischen CK-Status und klinischen Parametern ist in Tabelle 5 dargestellt.

**Tabelle 5: Korrelation zwischen Zytokeratin-Status und klinischen Daten**

<b>Zytokeratin-Status</b>	<b>positiv</b>	<b>negativ</b>	<b>p-Wert</b>
<b>Anzahl</b>	37	165	-
<b>Alter in Jahre</b>			0,76
Median (Spanne)	66 (48-77)	65 (45-75)	
<b>Tumorausdehnung</b>			0,70
pT < 3	19 (51,4%)	79 (47,9%)	
pT ≥ 3	18 (48,6%)	86 (52,1%)	
<b>Gleason Summenscore</b>			0,15
< 8	29 (78,4%)	109 (66,1%)	
≥ 8	8 (21,6%)	56 (33,9%)	
<b>PSA in ng/ml</b>			0,43
Median (Spanne)	11,80 (4,8-52,4)	12,00 (0,1-104,0)	
<b>Lymphknotenstatus*</b>			0,31
N0	35 (94,6%)	146 (88,5%)	
N1	2 (5,4%)	18 (10,9%)	
<b>Resektionsstatus*</b>			0,33
R0	26 (70,3%)	103 (62,4%)	
R1	10 (27,0%)	59 (35,8%)	

\* Reduzierte Patientenzahlen aufgrund nicht vorliegender abschließender Berichte

Prozentuale Angaben sind auf die genannte Anzahl n der Patienten der jeweiligen Spalte bezogen

### 3.3.2 Apoptotische DTC

Tabelle 6 stellt vergleichend klinische Parameter von Patienten mit apoptotischen DTC und von Patienten mit nicht-apoptotischen DTC gegenüber. Dabei fanden sich innerhalb der Gruppe apoptotischer DTC signifikant mehr positive Schnittränder ( $p=0,02$ ). Bezüglich Alter, präoperativem PSA-Wert, dem Auftreten von kapselüberschreitendem Wachstum ( $pT \geq 3$ ) und befallenen Lymphknoten (N1) fanden sich keine Unterschiede zwischen den beiden DTC-Fraktionen.

**Tabelle 6: Korrelation zwischen apoptotischen DTC und klinischen Daten**

	M30 pos. DTC	M30 neg. DTC	p-Wert
<b>N</b>	14	23	-
<b>Alter in Jahre,</b> Median (Spanne)	66,5 (52-72)	66 (48-77)	0,95
<b>Tumorausdehnung</b>			0,14
pT < 3	5 (35,7%)	14 (60,9%)	
pT ≥ 3	3 (21,4%)	9 (39,1%)	
<b>Gleason Summenscore</b>			0,98
< 8	11 (78,6%)	18 (78,3%)	
≥ 8	3 (21,4%)	5 (21,7%)	
<b>PSA in ng/ml</b> Median (Spanne)	11,75 (4,8-52,4)	11,8 (6,3-29,6)	1,00
<b>Lymphknotenstatus</b>			0,06
N0	12 (85,7%)	23 (100,0%)	
N1	2 (14,3%)	0 (0,0%)	
<b>Resektionsstatus*</b>			0,02
R0	7 (50,0%)	19 (82,6%)	
R1	7 (50,0%)	3 (13,0%)	

\*Reduziertes Kollektiv aufgrund nicht vorliegender Berichte

Prozentuale Angaben sind auf die genannte Anzahl n der Patienten der jeweiligen Spalte bezogen

### 3.4 Postoperative Therapiemaßnahmen

#### 3.4.1 Adjuvante Therapie

Insgesamt wurden 43 der 202 Patienten (21,3%) einer adjuvanten Therapie zugeführt. Tabelle 7 bietet einen Überblick über die verwendeten Therapieschemata innerhalb der einzelnen Subgruppen.

**Tabelle 7: Adjuvante Therapie gruppiert nach Knochenmarksstatus**

Knochenmarksstatus	n	Adjuvante Radiatio*	Adjuvante HAT*	Kombiniertes Schema
<b>DTC pos. (CK pos.)</b>	37	2 (5,4%)	3 (8,1%)	2 (5,4%)
CK pos. / M30 pos.	14	2 (14,3%)	3 (21,4%)	2 (14,3%)
CK pos. / M30 neg.	23	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
<b>Keine DTC (CK neg.)</b>	165	29 (17,6%)	19 (11,5%)	8 (4,8%)
<b>Gesamt</b>	202	31 (15,3%)	22 (10,9%)	10 (5,0%)

\* Angaben dieser Spalten enthalten auch die Patienten, die ein kombiniertes Schema erhielten

Prozentuale Angaben sind auf die genannte Anzahl n der Patienten der jeweiligen Zeile bezogen

#### 3.4.2 Salvage Therapie

54 der 202 Patienten (26,7%) erhielten im Rahmen eines biochemischen oder klinischen Rezidivs eine salvage Therapie. Ein Überblick über die Salvage-Therapieschemata innerhalb der untersuchten Gruppen ist in Tabelle 8 dargestellt.

**Tabelle 8: Salvage Therapie gruppiert nach Knochenmarksstatus**

Knochenmarksstatus	n	Salvage Radiatio*	Salvage HAT*	Kombiniertes Schema
<b>DTC pos. (CK pos.)</b>	37	8 (21,6%)	3 (8,1%)	1 (2,7%)
CK pos. / M30 pos.	14	2 (14,3%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
CK pos. / M30 neg.	23	6 (26,1%)	3 (13,0%)	1 (4,3%)
<b>Keine DTC (CK neg.)</b>	165	34 (20,6%)	15 (9,1%)	5 (3,3%)
<b>Gesamt</b>	202	42 (20,8%)	18 (8,9%)	6 (3,0%)

\* Angaben dieser Spalten enthalten auch die Patienten, die ein kombiniertes Schema erhielten

Prozentuale Angaben sind auf die genannte Anzahl n der Patienten der jeweiligen Zeile bezogen

Die Zeit von der Operation bis zum Einleiten einer salvage Therapie im Falle eines Rezidivs betrug im Median für die Bestrahlung 25 Monate (Spanne: 5 bis 70 Monate) und für die HAT 24 Monate (Spanne: 3 bis 54 Monate).

### 3.5 Postoperativer Verlauf

#### 3.5.1 PSA-Persistenz

Bei insgesamt 15 der 202 Patienten (7,4%) kam es postoperativ zu keinem adäquaten PSA-Abfall. Hierunter wurden 13 Patienten (86,7%) einer adjuvanten Therapie zugeführt. Tabelle 9 gibt einen Überblick über das Auftreten postoperativ erhöhter PSA-Werte innerhalb der untersuchten Subgruppen.

**Tabelle 9: PSA-Persistenz gruppiert nach Knochenmarksstatus**

<b>Knochenmarksstatus</b>	<b>n</b>	<b>PSA-Persistenz</b>
<b>DTC pos. (CK pos.)</b>	37	3 (8,1%)
CK pos. / M30 pos.	14	2 (14,3%)
CK pos. / M30 neg.	23	1 (4,3%)
<b>Keine DTC (CK neg.)</b>	165	12 (7,3%)
<b>Gesamt</b>	202	15 (7,4%)

Zwischen CK-Status und dem Auftreten erhöhter postoperativer PSA-Werte konnte durch den  $\chi^2$ -Test kein signifikanter Zusammenhang gefunden werden ( $p=0,86$ ). Das vermehrte Auftreten von PSA-Persistenz in der Gruppe apoptotischer DTC erwies sich gegenüber der Gesamtheit aller Patienten ohne apoptotische DTC ebenfalls als nicht signifikant ( $p=0,31$ ). Auch war der Unterschied zu den Patienten mit ausschließlich nicht-apoptotischen DTC statistisch nicht relevant ( $p=0,28$ ).

#### 3.5.2 Biochemisches Rezidiv

Patienten mit postoperativer PSA-Persistenz und Patienten, die eine adjuvante Therapie (HAT oder Radiatio) erhielten, wurden bei den folgenden Auswertungen bezüglich biochemischer Rezidive ausgeschlossen. Dies führte zu einem um 45 Patienten reduzierten Kollektiv von  $n=157$  Patienten, was auch zu einer Reduktion der untersuchten Subkollektive führte (s. Tabelle 10).

Insgesamt kam es innerhalb dieses Kollektivs bei 49 Patienten (31,2%) zu einem biochemischen Rezidiv. Die mediane Nachbeobachtungszeit für ein biochemisches Rezidiv (Zeit von der OP bis zum biochemischen Rezidiv oder bis zur letzten PSA-Messung) lag bei 49 Monaten (Spanne: 4 bis 75 Monate). Der Mittelwert lag bei 44±19 Monaten.

### 3.5.2.1 Auftreten biochemischer Rezidive in Abhängigkeit vom Knochenmarksstatus

Die Anzahl biochemischer Rezidive und Nachbeobachtungszeiträume der untersuchten Subgruppen sind in Tabelle 10 dargestellt.

**Tabelle 10: Biochemische Rezidive und Nachbeobachtungszeiträume gruppiert nach Knochenmarksstatus**

Knochenmarksstatus	n*	Biochemische Nachbeobachtungszeit,	
		Rezidive	Median (Spanne)
<b>DTC pos. (CK pos.)</b>	33	10 (30,3%)	47 (4-73)
CK pos. / M30 pos.	11	3 (27,3%)	47 (15-67)
CK pos. / M30 neg.	22	7 (31,8%)	44,5 (4-73)
<b>Keine DTC (CK neg.)</b>	124	39 (31,5%)	49 (4-75)
<b>Gesamt</b>	157	49 (31,2%)	49 (4-75)

\* Reduzierte Teilkollektive aufgrund der im Text beschriebenen Einschränkung des Kollektivs

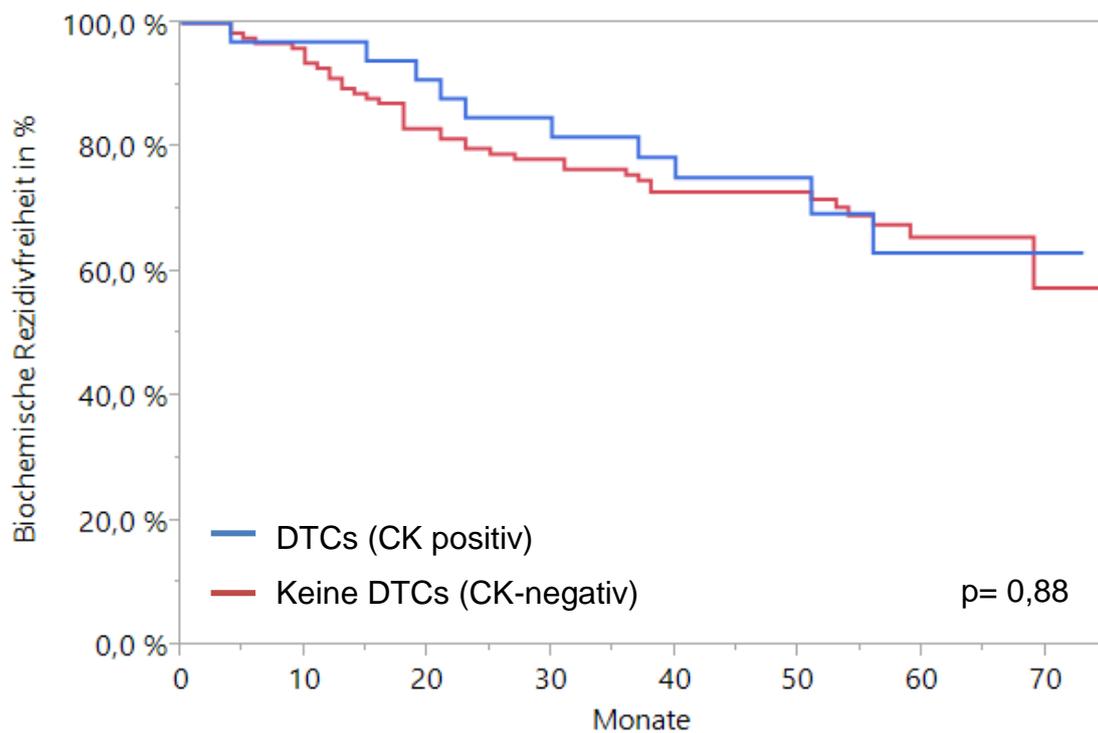
Prozentuale Angaben sind auf die genannte Anzahl n der Patienten der jeweiligen Zeile bezogen

Das relative Risiko von Patienten mit positivem Zytokeratinnachweis auf ein biochemisches Rezidiv errechnet sich damit zu 0,96 (95% KI: 0,54-1,72), das Odds Ratio beträgt dabei 0,94 (0,41-2,18).

Das relative Risiko auf ein biochemisches Rezidiv ist für Patienten mit apoptotischen DTC (M30 pos.) gegenüber Patienten mit vitalen DTC (M30 neg.) durch 0,86 (0,27-2,69) gegeben, das Odds Ratio beträgt 0,80 (0,16-3,99).

### 3.5.2.2 Vergleich der biochemisch rezidivfreien Lebenszeit in Relation zum Zytokeratinstatus

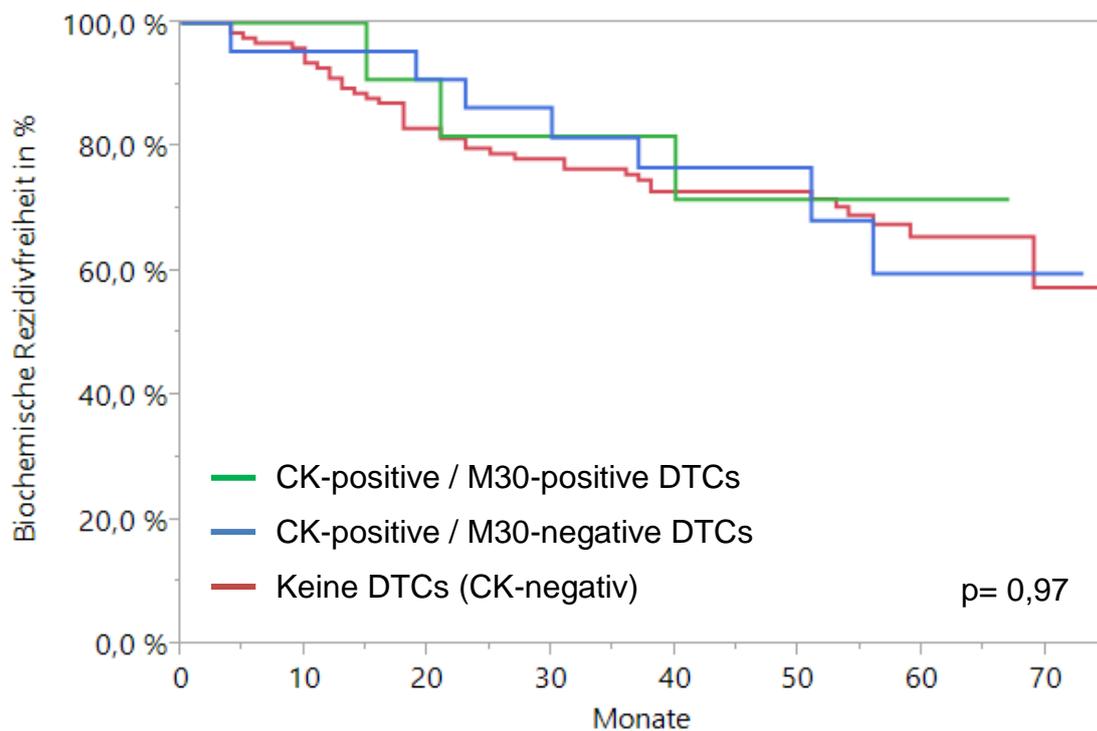
Zwischen dem Nachweis disseminierter Tumorzellen und der biochemisch rezidivfreien Lebenszeit bestand kein signifikanter Zusammenhang ( $p=0,88$ ). Die zugehörige Kaplan-Meier-Kurve ist in Abbildung 6 dargestellt.



**Abbildung 6: Kaplan-Meier-Analyse des Einflusses von positivem DTC-Nachweis auf die biochemische Rezidivfreiheit.**

### 3.5.2.3 Biochemisch rezidivfreie Lebenszeit in Relation zu apoptotischen und vitalen DTC

Patienten mit apoptotischen (CK pos. /M30 pos.) DTCs, Patienten mit vitalen (CK pos. /M30 neg.) DTCs und Patienten ohne DTC-Nachweis unterschieden sich bezüglich der Lebenszeit ohne biochemisches Rezidiv nicht voneinander ( $p=0,97$ ). Die zugehörige Kaplan-Meier-Kurve ist in Abbildung 7 dargestellt.



**Abbildung 7: Kaplan-Meier-Analyse des Einflusses von M30-positiven und M30-negativen DTCs auf die biochemische Rezidivfreiheit.**

### 3.5.3 Metastasierung

Die Analysen bezüglich klinischer Progression erfolgten für das gesamte Kollektiv (n=202). Hierunter entwickelten 16 Patienten (7,9%) im Verlauf der Erkrankung Metastasen. Bei 2 dieser Patienten konnte außerdem ein Lokalrezidiv gefunden werden. Eine lokale Progression ohne Metastasierung im weiteren Verlauf trat innerhalb des untersuchten Kollektivs nicht auf.

Die mediane Nachbeobachtungszeit für das Auftreten von Metastasen (Zeit von OP bis zur letzten klinischen Untersuchung oder Diagnose einer Metastasierung) lag bei 54,5 Monaten (Spanne: 1 bis 75 Monate). Der Mittelwert betrug  $52 \pm 15$  Monate.

#### 3.5.3.1 Auftreten von Metastasen in Abhängigkeit vom Knochenmarksstatus

Anzahl aufgetretener Metastasen und die Nachbeobachtungszeiträume der untersuchten Subgruppen sind in Tabelle 11 dargestellt.

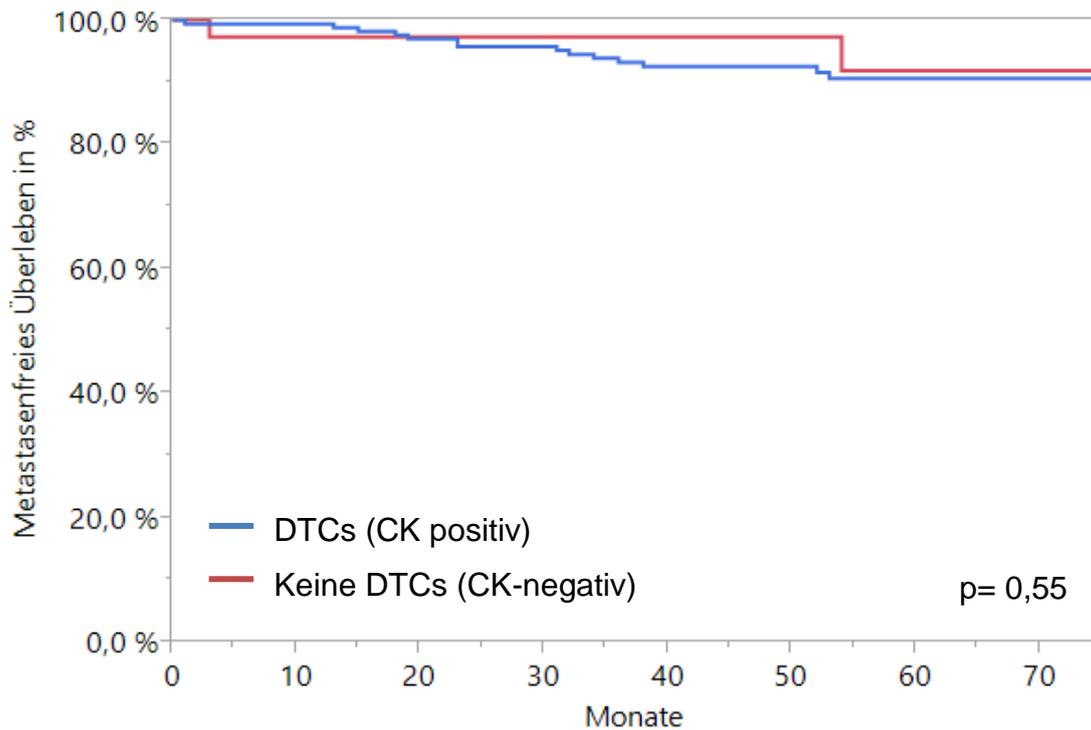
**Tabelle 11: Aufgetretene Metastasen und Nachbeobachtungszeiträume gruppiert nach Knochenmarksstatus**

Knochenmarksstatus	n	Metastasen	Nachbeobachtungszeit, Median (Spanne)
<b>DTC pos. (CK pos.)</b>	37	2 (5,4%)	52 (3-75)
CK pos. / M30 pos.	14	0 (0,0%)	51 (36-75)
CK pos. / M30 neg.	23	2 (8,7%)	54 (3-74)
<b>Keine DTC</b>	165	14 (8,5%)	55 (1-75)
<b>Gesamt</b>	202	16 (7,9%)	54,5 (1-75)

Prozentuale Angaben sind auf die genannte Anzahl n der Patienten der jeweiligen Subgruppe bezogen

### 3.5.3.2 Metastasenfreie Überlebenszeit in Relation zum Zytokeratinstatus

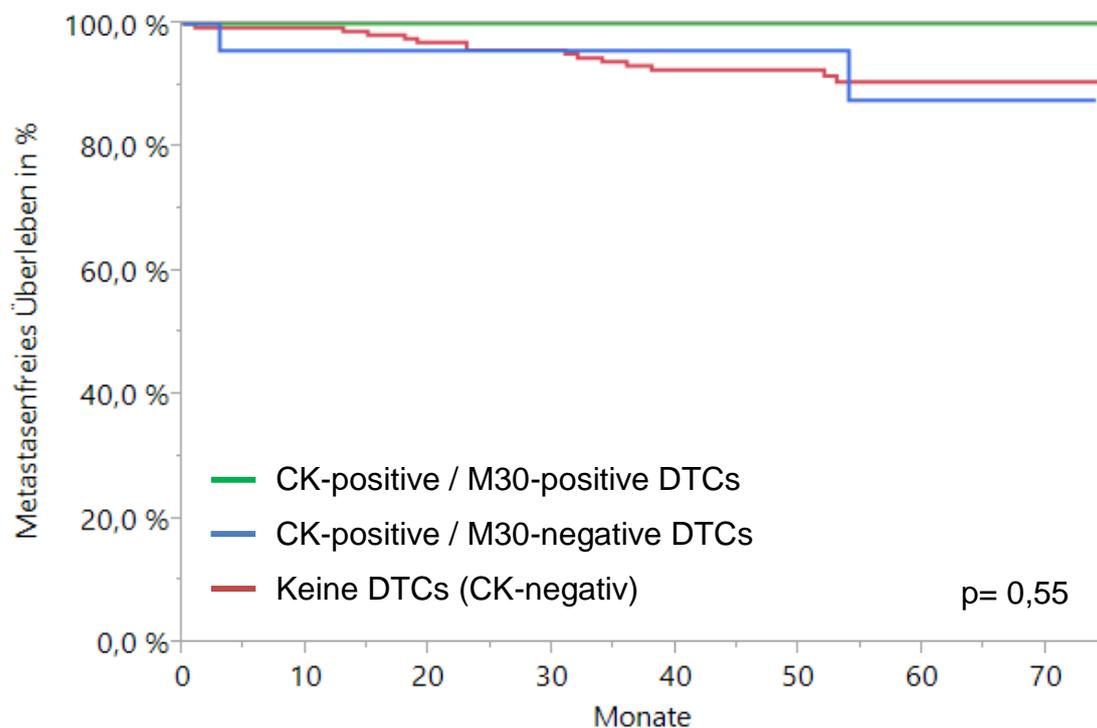
Zwischen dem Nachweis disseminierter Tumorzellen und der metastasenfreien Lebenszeit bestand kein signifikanter Zusammenhang ( $p=0,55$ ). Die zugehörige Kaplan-Meier-Kurve ist in Abbildung 8 dargestellt.



**Abbildung 8: Kaplan-Meier-Analyse des Einflusses von positivem DTC-Nachweis auf die metastasenfreie Überlebenszeit**

### 3.5.3.3 Metastasenfreie Überlebenszeit in Relation zu apoptotischen und vitalen DTC

Patienten mit CK-positiven/M30-positiven DTCs unterschieden sich bezüglich der Überlebenszeit ohne Auftreten von Metastasen nicht von Patienten mit CK-positiven/M30-negativen DTCs bzw. von Patienten ohne DTC-Nachweis ( $p=0,55$ ). Die zugehörige Kaplan-Meier-Kurve ist in Abbildung 9 dargestellt.



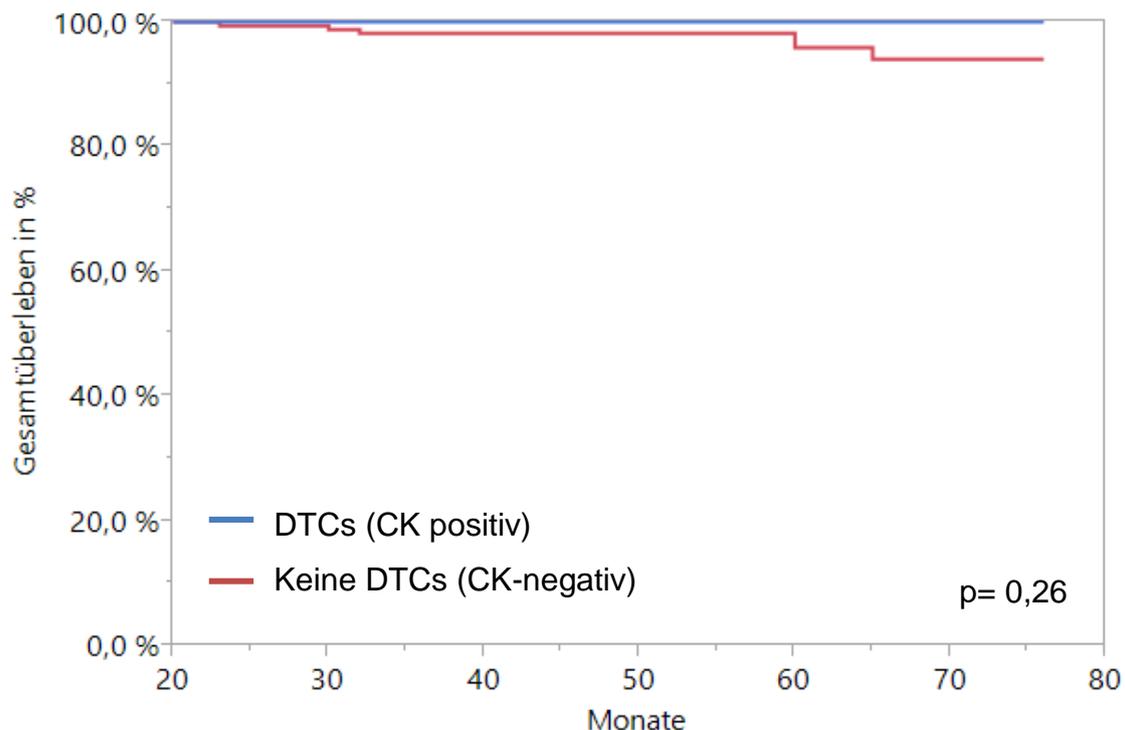
**Abbildung 9: Kaplan-Meier-Analyse des Einflusses von M30-positiven und M30-negativen DTCs auf die metastasenfreie Überlebenszeit**

### 3.5.4 Überleben

Von den eingeschlossenen 202 Patienten waren 6 (3,0%) zum Zeitpunkt des Follow-Ups verstorben, davon 2 an den Folgen des Prostatakarzinoms. Andere Todesursachen waren kardialer Genese, Lungenembolie sowie die Folgen eines Schlaganfalls und eines später aufgetretenen Bronchialkarzinoms.

Die mediane postoperative Nachbeobachtungszeit (Zeit von der OP bis zum Todestag oder bis zum letzten Lebenszeichen des Patienten) betrug 59 Monate (Spanne: 23 bis 76 Monate). Der Mittelwert lag bei  $57 \pm 12$  Monaten.

Bei keinem der 6 verstorbenen Patienten waren perioperativ zytokeratinpositive Zellen im Knochenmark nachweisbar. Eine entsprechende Unterscheidung zwischen apoptotischen und nicht-apoptotischen DTC erübrigt sich daher. Die vergleichende Kaplan-Meier-Kurve des Gesamtüberlebens zwischen Patienten mit und ohne DTC-Nachweis ist in Abbildung 10 dargestellt.



**Abbildung 10: Kaplan-Meier-Analyse des Einflusses von positivem DTC-Nachweis auf das Gesamtüberleben**

## 4 Diskussion

Patienten mit primär nicht-metastasiertem Prostatakarzinom können nach radikaler Prostatektomie im Rahmen äußerst heterogener Verläufe auch noch nach mehrjähriger Latenzphase einen Progress der Erkrankung erleiden [41]. Trotz intensiver Bemühungen eine adäquate Risikoabschätzung mithilfe etablierter Faktoren wie Gleason-Score, Tumorausdehnung, präoperativer PSA-Wert und Resektionsränder zu erreichen, stellt die individuelle Vorhersage des postoperativen Verlaufs auch heute noch eine große Herausforderung dar, wodurch im Zuge weiterführender Stratifizierungsbemühungen eine bedeutende Nachfrage nach zusätzlichen Prädiktoren entstanden ist [45–47]. In diesem Zusammenhang wird auch eine nachweisbare Tumorzell dissemination im Knochenmark als möglicher Biomarker diskutiert. Trotz der Bedeutung disseminierter Tumorzellen in der Entwicklung von Knochenmetastasen [49], ist die prognostische Bedeutung präinterventionell nachweisbarer DTC beim Prostatakarzinom bislang nicht abschließend geklärt [101]. Die vorliegende Studie sollte in diesem Rahmen prüfen ob perioperativ nachweisbare DTC bei Patienten mit nicht-metastasiertem Prostatakarzinom und erhöhtem Rezidivrisikoprofil einen unabhängigen Risikofaktor für ein schlechtes onkologisches Outcome darstellen, wobei der immunhistochemische Nachweis der Zellen gemäß den aktuellen Empfehlungen zur Standardisierung der DTC-Detektion erfolgt ist. Ferner sollte erstmals beim Prostatakarzinom zusätzlich die prognostische Bedeutung der apoptotischen Subfraktion der DTC untersucht werden, welche mithilfe des M30 Antikörpers identifiziert wurde.

Eine Korrelation zwischen DTC bzw. apoptotischen DTC zu Alter, PSA-Wert und histopathologischen Risikofaktoren konnte im Rahmen der vorliegenden Ergebnisse nicht festgestellt werden. Auch konnten keinerlei Zusammenhänge zwischen dem Auftreten von DTC (apoptotisch oder nicht-apoptotisch) und dem onkologischen Outcome der Patienten gefunden werden.

### 4.1 Variation von DTC-Detektionsraten

In der vorliegenden Arbeit konnten bei 18,3% der Patienten zytokeratinpositive Zellen nachgewiesen werden (siehe Abschnitt 3.2.1). Die Einordnung dieses

Ergebnisses muss äußerst differenziert betrachtet werden, da Studien auf diesem Gebiet beträchtlich unterschiedlichen Methoden folgen, wobei in der Literatur hauptsächlich RT-PCR basierte Methoden (PSA-mRNA-Nachweis) und immunhistochemische Ansätze (mittels anti-EpCam oder diverser Zytokeratinantikörper) beschrieben sind [92]. Jedoch kann selbst unter Einschränkung der Problematik auf aktuelle Studien mit zytokeratinbasiertem Ansatz eine deutliche Variation der Nachweisraten zwischen 13,1% und 44,6% beobachtet werden [102–106]. Dabei konnten Weckermann et al. in ihrer Studie von 2001 eindrücklich aufzeigen, dass der Wahl des verwendeten Antikörpers eine besondere Rolle zukommt, indem für jede Patientenprobe bei ansonsten identischem Färbeprotokoll 2 unterschiedliche Primärantikörper verwendet wurden. Hierbei konnte eine erheblich höhere Nachweisrate bei Verwendung des Panzytokeratinantikörpers A45 B/B3 (40,3%) vorgefunden werden als bei Nutzung des CK2 Antikörpers, welcher solitär an Zytokeratin 18 bindet (24,4%) [103]. Daraus wird deutlich, dass die Expression einzelner Zytokeratine in DTC offenbar sehr variabel ist (s.a. Abschnitt 4.4 ), sodass eine hohe Sensitivität nur bei Nutzung von Antikörpern gegen mehrere Zytokeratine erreicht werden kann. Bei einer späteren Untersuchung derselben Arbeitsgruppe konnte trotz gleichem Vorgehen (insb. wurde derselbe Panzytokeratinantikörper verwendet) nur bei 13,1% der Patienten DTC gefunden werden [105]. So scheint das Auftreten zytokeratinpositiver Zellen auch bei ansonsten gleichen Umständen einer statistischen Streuung unterworfen zu sein, die eventuell Einfluss auf Studienergebnisse haben kann. Auch variiert die Anzahl positiver Zellen bei positivem Befund unter den Studien sehr stark, wobei die in der vorliegenden Studie beschriebene Spanne zwischen 1 und 3 DTC pro  $2 \times 10^6$  MNC als relativ gering eingeschätzt werden muss [92, 105]. In diesem Kontext muss hinterfragt werden, inwieweit Abweichungen zwischen den einzelnen Studienprotokollen, wie bspw. abweichende Dichtegradienten zur Zellselektion oder abweichende Inkubationszeiten mit den einzelnen Färbesubstanzen, mit dem Nachweis von DTC korrelieren. Derart umfangreiche Beschreibungen sind dabei in den Veröffentlichungen zu diesem Thema zumeist nicht gegeben.

Ein noch weiteres Feld ergibt sich, wenn man zusätzlich Studien anderer Nachweismethodik miteinbezieht. So konnten unter Nutzung von Antikörpern gegen EpCam erheblich höhere Detektionsraten von 40% bis zu 90% beobachtet werden [107, 108]. Auch RT-PCR basierte Studien auf diesem Gebiet zeigen stark variable Nachweisraten zwischen 19% und 45% [108–113].

Eine Aussage zur Vergleichbarkeit der Methoden untereinander kann aufgrund der nur spärlichen Anzahl direkt vergleichender Arbeiten kaum valide getroffen werden. Insgesamt muss im Rahmen der Heterogenität disseminierter Tumorzellen heute davon ausgegangen werden, dass die verschiedenen Nachweismethoden unterschiedliche Fraktionen innerhalb der DTC erfassen [114, 101], was im Weiteren auch beim Vergleich der Studienergebnisse bezüglich Korrelation zu klinischen Parametern und onkologischem Outcome bedacht werden muss (s.a. Abschnitt 4.4).

### **4.2 Korrelation von DTC mit klinischen Risikofaktoren**

In der vorliegenden Arbeit konnten keine signifikanten Zusammenhänge zwischen DTC bzw. apoptotischen DTC und klassischen klinisch-pathologischen Risikofaktoren gefunden werden. Ein positiver Zytokeratinnachweis ging sogar mit einer geringeren Rate positiver Lymphknotenbeteiligung, hohem Gleason-Score  $\geq 8$  und lokal fortgeschrittener Tumorausdehnung ( $pT \geq 3$ ) einher, wobei der Unterschied nur dezent zu verzeichnen war und keine statistische Signifikanz aufwies (s. Tabelle 5).

Die Unabhängigkeit von Zytokeratinnachweis von klinischen Parametern zum Zeitpunkt einer radikalen Prostatektomie finden sich im Einklang mit einigen früheren Studien ähnlichen Designs und könnten darauf hindeuten, dass es sich bei der Tumorzell dissemination um einen von bekannten Risikofaktoren unabhängigen Prozess handelt [105, 106]. Jedoch konnten bspw. Wood et al. und Mitsiades et al. in PCR-basierten Studien signifikante Zusammenhänge zwischen DTC-Nachweis und PSA-Wert und T-Stadium bzw. Gleason-Score feststellen [111, 112]. Ferner ergaben sich auch in einigen auf Immunhistochemie basierenden Studien Hinweise auf eine Korrelation zwischen DTC-Nachweis und Gleason-Score [104, 109, 110].

### **4.3 Korrelation von DTC mit onkologischem Outcome**

Die vorliegende Arbeit konnte zwischen DTC-Nachweis und dem onkologischen Outcome nach radikaler Prostatektomie keinen signifikanten Unterschied feststellen. Wider Erwarten entwickelten DTC-negative Patienten sogar häufiger biochemische Rezidive und Metastasen als DTC-positive Patienten, wobei diese Unterschiede keine statistische Signifikanz aufwiesen. Dabei kann dieser Umstand wahrscheinlich durch die insignifikant höhere relative Anzahl lokal ausgedehnter Tumorbefunde, positiver Resektionsränder und lokalem Lymphknotenbefall innerhalb der DTC-positiven Patientengruppe hinreichend erklärt werden.

Die dargestellten Ergebnisse stehen in direktem Widerspruch zu einigen vorliegenden Studien auf diesem Gebiet. Während Differenzen zu Studien mit PCR-basierten Ansätzen oder abweichenden immunhistochemischen Färbungen (z.B. mittels anti-EpCAM) im Rahmen unterschiedlicher Nachweismethoden ggfs. auf methodische Unterschiede zurückzuführen sind, ergaben sich selbst in Studien mit nahezu identischen Färbeprotokollen deutliche Hinweise auf eine prognostische Relevanz von präoperativ nachgewiesenen DTC [103, 105, 106]. Um methodische Differenzen zunächst auszuklammern, können vor allem die Ergebnisse der Studien von Köllermann et al. und Weckermann et al. mit der vorliegenden Arbeit verglichen werden, da beide Studien ebenfalls Kollektive nach radikaler Prostatektomie nachbeobachteten und ein nahezu identisches Nachweisprotokoll für DTC verwendeten. Beide Autoren konnten dabei im Kontrast zu den hier beschriebenen Ergebnissen jeweils eine signifikante Korrelation von panzytokeratinpositiven Zellen zum Auftreten biochemischer Rezidive nachweisen [105, 106]. Ein direkter Vergleich mit der vorliegenden Arbeit ist jedoch aufgrund anderweitiger methodischer Differenzen nur bedingt möglich. So wurde die Studienkohorte von Köllermann ausschließlich aus neoadjuvant hormonablativ behandelten Patienten rekrutiert, während solche Patienten in der vorliegenden Studie explizit ausgeschlossen wurden [106]. Ferner lagen die Operationszeitpunkte jener Kohorte zwischen 1992 und 2000 und damit deutlich vor den Operationsterminen des vorliegenden Kollektivs [106]. Gleiches gilt auch für die zwischen 1994 und 2002 operierte Studienkohorte von Wecker-

mann et al. [105]. Dies ist insofern von Interesse, als dass seit Einführung der neuen Klassifikationskriterien des Gleason-Scores 2005 eine kontinuierliche Migration des histopathologischen Gratings zu höheren Werten beobachtet werden kann [115]. Dies bietet einen möglichen Erklärungsansatz der Tatsache, dass das Auftreten biochemischer Rezidive in den beiden Studienkohorten von Köllermann und Weckermann deutlich häufiger war als in dem hier beschriebenen Kollektiv, obwohl diese Studienkollektive einen deutlich geringeren Anteil von Patienten mit Gleason-Score  $>7$  aufwiesen. Insgesamt erscheint das Outcome der beiden Studienkollektive bezüglich biochemischer Rezidivfreiheit in Relation zu aktuellen Nachbeobachtungskohorten nach radikaler Prostatektomie vergleichsweise schlecht, was eine Einordnung zusätzlich erschwert [116]. Ein wesentlicher methodischer Unterschied besteht auch in der Definition des biochemischen Rezidivs, welches bei Weckermann et al. als zwei aufeinanderfolgende Werte  $>0,4$  ng /ml definiert wurde [105]. Dabei deuten einige Daten darauf hin, dass diese Definition geeigneter sein könnte um eine eventuelle Metastasierung abzuschätzen, welche, vom pathophysiologischen Standpunkt aus betrachtet, den eigentlich interessanten klinischen Endpunkt ossärer Tumorzellen darstellt [117]. So ist es nicht verwunderlich, dass das Kollektiv von Weckermann et al. analog zu der hohen BR-Rate auch eine hohe Metastasierungsrate aufwies, die ebenfalls signifikant mit dem Auftreten von DTC korrelierte, während ein solcher Zusammenhang in der vorliegenden Studie nicht beobachtet werden konnte. Dabei beschreiben die Autoren bereits nach 3 Jahren eine signifikante Korrelation zwischen metastasenfreiem Überleben und DTC-Status, sodass die in der vorliegenden Arbeit relativ kurze mediane Nachbeobachtungszeit von 54,5 Monaten zumindest nicht vollständig für das konträre Ergebnis verantwortlich gemacht werden kann [105]. Demgegenüber konnten auch Berg et al. und Lilleby et al. eine Korrelation panzytokerativpositiver DTC zu metastasenfreier Überlebenszeit feststellen, wobei beide Autoren erst nach ca. 6 Jahren Follow-up relevante Unterschiede der Metastasierungsrate DTC-positiver und –negativer Patienten nachweisen konnten [104, 118]. Obgleich diese beiden Studien beträchtlich unterschiedlichen primären Therapieschemata folgten als in der vorliegenden Arbeit (primäre Strahlentherapie mit

oder ohne HAT), unterstreicht deren Ergebnis dennoch die Notwendigkeit einer längeren Nachbeobachtungszeit um eine eventuelle prognostische Relevanz zytokeratinpositiver Zellen bezüglich Metastasierung mit Sicherheit ausschließen zu können. Es muss konstatiert werden, dass die hier vorliegende Anzahl aufgetretener Metastasen zu gering ist um eine valide Unterscheidung zwischen einzelnen Gruppen treffen zu können.

Trotz der vorliegenden methodischen Differenzen zu anderen Studien und der bestehenden Limitationen (s.a. Abschnitt 4.6) gibt die vorliegende Arbeit Grund zu der Annahme, dass der Nachweis von DTC mittels eines Panzytokeratinantikörpers nicht notwendig mit schlechterem onkologischen Outcome einhergehen muss. Entsprechend dieser Erkenntnis für den zytokeratinbasierten Ansatz lassen sich auch in Studien anderer Vorgehensweise auf diesem Gebiet analoge Widersprüche finden: So konnten bspw. Mitsiades et al. via RT-PCR (mPSA) nachgewiesene DTC als unabhängigen Risikofaktor für frühe biochemische Rezidive identifizieren, während Pfitzenmaier et al. keine derartige Korrelation bei ähnlichem Vorgehen finden konnten [111, 113]. Es muss daher festgestellt werden, dass ein Konsens inzwischen in weiter Ferne scheint.

#### **4.4 Notwendigkeit der weiteren Differenzierung von DTC**

Auch wenn gezeigt werden konnte, dass die Mehrheit zytokeratinpositiver Zellen im Knochenmark von Krebspatienten genetische Aberrationen aufweisen [119], muss die Nutzung von Antikörpern gegen Zytokeratine zur Detektion disseminierter Tumorzellen kritisch hinterfragt werden. Diverse Studien ergaben Hinweise darauf, dass auch in Knochenmarksproben gesunder Patienten panzytokeratinpositive Zellen nachgewiesen werden können, wobei einzelne Ergebnisse sogar darauf hindeuten, dass auch nicht-epitheliale Zellen (wie etwa Plasmazellen) Zytokeratine exprimieren können [120–122]. Andererseits konnten Gužvić et al. in einer unabhängigen Einzelzell-Gen-Expressions-Studie unter genetisch aberranten Zellen mit prostataspezifischen epithelialen Markern eine Subpopulation identifizieren, welche zwar EpCAM-positiv, jedoch CK 8/18-negativ waren. Es kann deshalb davon ausgegangen werden, dass im Rahmen der ausgeprägten Heterogenität disseminierter Tumorzellen auch ein gänzlicher

Verlust der Zytokeratinexpression möglich ist [123]. Dies ist auch ein Erklärungsansatz für den Umstand, dass Panzytokeratinantikörper eine höhere Sensitivität aufweisen als Antikörper gegen einzelne Zytokeratine (s. Abschnitt 4.1).

Obwohl die Nutzung von Antikörpern gegen EpCAM zwar augenscheinlich auch zytokeratinnegative Zellen zu markieren vermag, scheint der Antikörper als alleinige Methode zum Nachweis von DTC sogar noch problematischer als die zytokeratinbasierten Ansätze zu sein, da hierdurch eine hohe Rate falsch positiver Befunde erreicht wird. So konnten bspw. Pfitzenmaier et al. innerhalb ihrer Kontrollgruppe bei 11% der Patienten trotz gänzlich fehlendem Hinweis auf ein Krebsgeschehen EpCAM positive Zellen im Knochenmark finden [113]. Außerdem konnten einige Einzelzell-Transkriptom-Analysen nachweisen, dass auch andere Knochenmarkszellen (insbesondere Progenitorzellen der Erythropoese) EpCAM exprimieren können [124–126]. Die dadurch entstandene Unschärfe könnte auch die in Abschnitt 4.1 aufgezeigten hohen Nachweisraten bei Nutzung von anti-EpCAM zur Detektion von DTC erklären. Um die Situation noch weiter zu komplizieren, konnte in Studien gezeigt werden, dass trotz der hohen Detektionsraten anti-EpCAM basierter Nachweismethoden einzelne DTC-Subgruppen, wie z.B. Zellen mit neuroendokrinem oder stammzellartigem Phänotyp, kein EpCAM exprimieren [127, 128]. Analog sind RT-PCR basierte Ansätze an die Expression der untersuchten Marker mRNA-Stränge gebunden, die nicht von allen DTC exprimiert werden [114].

Schlussendlich wird deutlich, dass für zukünftige Forschung auf diesem Gebiet eine weitere Spezifizierung disseminierter Tumorzellen erforderlich ist. Ein möglicher Ansatzpunkt bietet hierfür die zusätzliche Beurteilung der biologischen Aktivität CK-positiver Zellen, was beim Prostatakarzinom derzeit nur in sehr geringem Umfang erfolgt ist [129]. Bianco et al. differenzierten in diesem Zusammenhang proliferierende und nicht-proliferierende DTC mittels Doppelfärbung mit einem Panzytokeratinantikörper und dem Proliferationsmarker MIB-1. Dabei deutete sich in der univariaten Analyse ein Zusammenhang zwischen proliferierender DTC-Fraktion und dem Auftreten von biochemischen Rezidiven an, welcher sich jedoch in der multivariaten Analyse nur als grenzwertig signifikant er-

wies ( $p=0,05$ ) [110]. Daten bezüglich der prognostischen Relevanz apoptotischer DTC im Knochenmark von Prostatakarzinompatienten liegen bislang in der Literatur nicht vor.

#### **4.5 Prognostische Wertigkeit apoptotischer Zellen**

Die Apoptose ist ein fein regulierter, konservierter, kontrollierter Vorgang, der den programmierten Tod einer einzelnen Zelle vermittelt und im Organismus eine Gegenspielerrolle zur Zellteilung einnimmt [130]. Entsprechend führt eine verminderte Apoptoserate durch Mutation regulatorischer Gene zu unkontrollierter Teilung von Zellen und damit zu Tumorwachstum, weshalb der Vorgang schon seit Jahrzehnten Gegenstand intensiver Forschung in der Onkologie darstellt [130–132].

Paradoxerweise konnte bei einigen soliden Tumorentitäten wie dem Mammakarzinom, dem Blasenkarzinom und dem Prostatakarzinom gezeigt werden, dass ein hoher Anteil apoptotischer Zellen innerhalb des Primärtumors mit einer schlechteren Prognose einhergeht [133–136]. Dies wird unter anderem dadurch erklärt, dass in wachsenden Tumoren eine hohe Apoptoserate mit verstärkter Proliferationsrate und vermehrten malignen Mutationen verbunden ist. Noch überraschender ist jedoch, dass bspw. Krawczyk et al. beim Mammakarzinom auch für präoperativ nachgewiesene apoptotische DTC eine Korrelation mit schlechtem onkologischen Outcome feststellen konnten [100]. Dies erscheint zunächst widersprüchlich, da die Apoptose als Hauptursache der metastatischen Ineffizienz gesehen wird, da angenommen wird, dass die meisten Tumorzellen außerhalb des Primärtumors durch Einleitung der Apoptose zugrunde gehen [137]. Die Autoren verfolgen darum den Erklärungsansatz, dass das Umgehen der Apoptose für Tumorzellen eventuell einen geringeren klinischen Stellenwert in der Entstehung von Metastasen einnehmen könnte als bisher angenommen. Vielmehr könnten nachweisbare apoptotische DTC, analog zu den Überlegungen beim Primärtumor, eine Korrelation zu stark malignen Zellklonen und gesteigerter Proliferation aufweisen und somit für ein höheres metastatisches Potenzial sprechen [100].

Die vorliegende Arbeit konnte im Kontrast zu den Erkenntnissen beim Mammakarzinom keine schlechtere Prognose von Patienten mit apoptotischen DTC feststellen (s. Abbildung 7 und Abbildung 9). Insgesamt gingen apoptotische DTC sogar mit weniger biochemischen Rezidiven und Metastasen einher als Patienten mit vitalen DTC (s. Tabelle 10 bzw. Tabelle 11), was wahrscheinlich auf die geringe Anzahl höherer Gleason-Scores und ausgedehnter Tumorbefunde ( $T \geq 3$ ) zurückzuführen ist (s. Tabelle 6). Im Rahmen des kleinen untersuchten Kollektivs DTC-positiver Patienten, muss die Wertigkeit der Subdifferenzierung der DTC-Fraktion grundsätzlich kritisch betrachtet werden.

### **4.6 Limitationen der Studienkonzeption**

Eine wesentliche Einschränkung der vorliegenden Arbeit ist durch den retrospektiven Studiencharakter gegeben, welcher gegenüber prospektiven Kohortenstudien einige zusätzliche Verzerrungsfaktoren aufweist. So kann beispielsweise aufgrund des sog. Recall-Bias das Studienergebnis verzerrt werden, indem sich Patienten bei der Befragung nicht differenziert an ihren Krankheitsverlauf erinnern können. Die so erhaltene Störung sollte bei der vorliegenden Arbeit durch den Kontakt der Fachärzte bei unklarem Verlauf aufgefangen werden. Dennoch kann der Effekt nicht zur Gänze vernachlässigt werden, da nicht bei jedem Patienten die behandelnden Ärzte befragt wurden. Eine weitere potenzielle Störgröße von retrospektiven Befragungen stellt auch der Non-Response-Bias dar, wobei Patienten, welche die Befragung ablehnen, ein potenziell abweichendes durchschnittliches Outcome aufweisen wie die befragte Population. Durch die hohe Teilnahmebereitschaft der Patienten dürfte sich der so erhaltene Fehler jedoch in Grenzen halten. Analog sind auch Gruppenunterschiede zu anderweitig ausgefallenen Patienten denkbar. Insbesondere muss auch die vorgenommene Einschränkung des Kollektivs durch Definition der Ein- und Ausschlusskriterien kritisch hinterfragt werden, wodurch im Sinne eines Selection-Bias eine weitere Verzerrung entstanden sein kann.

Eine bedeutende Fehlerquelle bilden auch ungleiche Nachsorgeintervalle, z.B. auf der Basis eingeschränkter Patientencompliance, was gleich mehrere Probleme aufwirft. So kann bspw. nicht sicher beurteilt werden ob Patienten, deren

letzte PSA-Untersuchung zum Zeitpunkt der Erhebung lange zurück lag, nicht doch bereits ein biochemisches Rezidiv entwickelt haben, welches aufgrund der fehlenden Messungen lediglich nicht diagnostiziert wurde. Um eine solche Verzerrung zu vermeiden wurden für das biochemische Follow-Up die Zeitpunkte der letzten PSA-Messung beurteilt, was zu einer weiteren Reduktion der Nachbeobachtungszeit bezüglich biochemischer Rezidive führte, welche im Rahmen des vergleichsweise aktuellen Patientenkollektivs als ohnehin schon gering erachtet werden muss. Außerdem entsteht auf diesem Weg eine schwer einschätzbare Unschärfe der tatsächlichen Zeitpunkte des Auftretens eventueller Rezidive. So wäre es denkbar, dass bei lange verpassten Terminen ein nun deutlich erhöhter PSA-Wert schon in vorhergehenden Messungen als biochemisches Rezidiv gewertet worden wäre.

Insgesamt traten in der vorliegenden Arbeit nur bei sehr wenigen Patienten Metastasen auf, sodass eine aussagekräftige Unterscheidung nach einzelnen Subgruppen kaum möglich ist. Insbesondere waren die Gruppenstärken bei der Unterscheidung zwischen Patienten mit Nachweis apoptotischer DTC und Patienten mit Nachweis nicht-apoptotischer DTC durch die vorgenommene Dichotomisierung noch zusätzlich reduziert, sodass entsprechend auch die Anzahl der Ereignisse (z.B. biochemische Rezidive bei apoptotischen DTC) innerhalb der Subgruppen sehr gering war. Eine Aussage zu einer zusätzlichen prognostischen Bedeutung apoptotischer DTC kann deshalb nicht verlässlich getroffen werden. Insgesamt kann auch die Gesamtzahl des Patientenkollektivs für eine zuverlässige multifaktorielle Analyse als zu gering erachtet werden.

### **4.7 Schlussfolgerung**

Aufgrund der beschriebenen Einschränkungen der vorliegenden Arbeit kann ein möglicher Einfluss panzytokeratinpositiver Zellen auf die Prognose von Patienten nach radikaler Prostatektomie nicht mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden. Jedoch kann in Zusammenschau der hier aufgezeigten Daten mit den widersprüchlichen Ergebnissen anderer Studien auf diesem Gebiet derzeit nicht davon ausgegangen werden, dass DTC, die mithilfe heute routinemäßig angewandter Nachweismethoden bestimmt wurden, zusätzliche prognostische

Informationen hinsichtlich des kurzfristigen Krankheitsverlaufs gewonnen werden können. Auch eine Unterscheidung zwischen apoptotischen und vitalen DTC kann auf Basis der dargelegten Ergebnisse in der klinischen Praxis nicht empfohlen werden, obgleich auch an dieser Stelle die in Abschnitt 4.6 beschriebenen Limitationen betont werden müssen.

Da etablierte Marker einerseits einige DTC nicht erfassen können, jedoch andererseits einige nicht-maligne Zellen markieren, wird deutlich, dass heute verwendete Verfahren beim Prostatakarzinom nicht diejenigen Zellen sicher zu detektieren vermögen, die später tatsächlich zu Metastasen führen. Insofern müssen zukünftig zuverlässigere Marker identifiziert werden, welche hochspezifisch für DTC mit hoher Tendenz zur Metastasenbildung sind und hierdurch eine klinisch relevante Verbesserung der Ausbreitungsdiagnostik ermöglichen.

## 5 Zusammenfassung

Disseminierte Tumorzellen gelten nach heutigem Kenntnisstand als zelluläre Vorläufer ossärer Metastasen und können bei diversen soliden Tumorentitäten bei klinisch nicht-metastasierten Stadien nachgewiesen werden. Während beim Mammakarzinom inzwischen zweifelsfrei gezeigt werden konnte, dass DTCs einen unabhängigen Prädiktor für ein ungünstiges onkologisches Outcome darstellen, ist der Nachweis einer Tumorzell dissemination beim Prostatakarzinom bezüglich seiner prognostischen Relevanz umstritten.

In der vorliegenden Arbeit wurde in diesem Zusammenhang das Vorhandensein disseminierter Tumorzellen im Knochenmark von Patienten mit nicht-metastasiertem Prostatakarzinom mit klinisch-pathologischen Patientendaten und onkologischem Outcome korreliert. Zusätzlich sollte erstmals überprüft werden, ob sich Patienten mit apoptotischen DTC hinsichtlich dieser klinischen Endpunkte von Patienten mit dem Nachweis nicht-apoptotischer DTC unterscheiden. Hierfür wurde retrospektiv das Follow-Up einer Patientenkohorte erhoben, welche in der Klinik für Urologie in Tübingen radikal prostatektomiert wurde und deren intraoperativ entnommenes Knochenmarksaspirat auf apoptotische und nicht-apoptotische DTC untersucht worden war. Dabei wurde ein immunhistochemischer Zytokeratinnachweis zur Detektion von DTC verwendet und als Apoptosemarker ein Antikörper gegen Caspase-gespaltene Zytokeratin 18 eingesetzt (M30).

Von den eingeschlossenen 202 Patienten konnten bei 37 Patienten (18,3%) DTC nachgewiesen werden. Bei 14 dieser 37 Patienten (37,8%) waren zusätzlich apoptotische DTC nachweisbar. Dabei korrelierte das Vorhandensein von DTC nicht mit PSA-Wert, Gleason-Score, positivem regionärem Lymphknotenbefall oder ausgedehnter lokaler Tumorausbreitung. Ebenso konnte kein Einfluss von Knochenmarksstatus auf die biochemisch rezidivfreie Lebenszeit, metastasenfreie Lebenszeit oder auf Gesamtüberleben bzw. tumorspezifisches Überleben festgestellt werden. Patienten mit apoptotischen DTCs unterschieden sich von Patienten mit nicht-apoptotischen DTCs weder bezüglich der klinischen Risikofaktoren noch bezüglich des onkologischen Outcomes signifikant.

In Zusammenschau dieser Ergebnisse mit der unklaren Datenlage auf diesem Gebiet, kann eine präoperative Knochenmarksbiopsie zur Bestimmung disseminierter Tumorzellen in der klinischen Routine beim nicht-metastasiertem Prostatakarzinom derzeit nicht empfohlen werden. Vielmehr deutet sich an, dass die heute eingesetzten Nachweismethoden aufgrund der Heterogenität von DTC in ihrer Signifikanz beschränkt sind, was eine noch differenziertere Forschung auf diesem Gebiet zwingend notwendig macht.

## 6 Literatur

- 1 *Aumüller G.* Anatomie. 208 Tabellen. Stuttgart: Thieme; 2007
- 2 *Robert Koch-Institut.* Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes - Krebs in Deutschland 2009/2010. 9. Aufl. Berlin: Robert Koch-Institut; 2013
- 3 *Schroder FH.* Screening for prostate cancer: current status of ERSPC and screening-related issues. Recent results in cancer research. Fortschritte der Krebsforschung. Progres dans les recherches sur le cancer 2014; 202: 47–51
- 4 *Haas GP, Delongchamps N, Brawley OW et al.* The worldwide epidemiology of prostate cancer: perspectives from autopsy studies. The Canadian journal of urology 2008; 15: 3866–3871
- 5 *Howlader N (eds), Noone AM, Krapcho M, Garshell J, Miller D, Altekruse SF, Kosary CL, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA.* SEER Cancer Statistics Review, 1975-2011. Bethesda, MD, USA; 2014
- 6 *Beske F, Becker E, Krauss C, Katalinic A, Pritzkuleit R.* Gesundheitsversorgung 2050. Prognose für Deutschland und Schleswig-Holstein. Kiel: Schmidt & Klaunig; 2007
- 7 *Zeegers, Maurice P A, Jellema A, Ostrer H.* Empiric risk of prostate carcinoma for relatives of patients with prostate carcinoma: a meta-analysis. Cancer 2003; 97: 1894–1903
- 8 *Giovannucci E, Rimm EB, Colditz GA et al.* A prospective study of dietary fat and risk of prostate cancer. Journal of the National Cancer Institute 1993; 85: 1571–1579
- 9 *Ozasa K, Nakao M, Watanabe Y et al.* Serum phytoestrogens and prostate cancer risk in a nested case-control study among Japanese men. Cancer science 2004; 95: 65–71
- 10 *Dennis LK, Lynch CF, Torner JC.* Epidemiologic association between prostatitis and prostate cancer. Urology 2002; 60: 78–83
- 11 *Humphrey PA.* Histological variants of prostatic carcinoma and their significance. Histopathology 2012; 60: 59–74
- 12 *Schmelz H, Sparwasser C, Weidner W.* Facharztwissen Urologie. Differenzierte Diagnostik und Therapie. 3. Aufl.; 2014
- 13 *Wittekind C.* TNM. Klassifikation maligner Tumoren. 7. Aufl. Somerset: Wiley-Blackwell; 2010
- 14 *Leitlinienprogramm Onkologie.* Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms. Im Internet:

<http://leitlinienprogrammonkologie.de/Leitlinien.7.0.html>;  
11.12.2015

Stand:

- 15 *Gleason DF*. Classification of prostatic carcinomas. *Cancer chemotherapy reports*. Part 1 1966; 50: 125–128
- 16 *Epstein JI, Allsbrook WC, Amin MB et al*. The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. *The American journal of surgical pathology* 2005; 29: 1228–1242
- 17 *Ilic D, Neuberger MM, Djulbegovic M et al*. Screening for prostate cancer. *The Cochrane database of systematic reviews* 2013; 1: CD004720
- 18 *Thompson IM, Ankerst DP, Chi C et al*. Assessing prostate cancer risk: results from the Prostate Cancer Prevention Trial. *Journal of the National Cancer Institute* 2006; 98: 529–534
- 19 *Catalona WJ, Partin AW, Slawin KM et al*. Use of the percentage of free prostate-specific antigen to enhance differentiation of prostate cancer from benign prostatic disease: a prospective multicenter clinical trial. *JAMA* 1998; 279: 1542–1547
- 20 *Carter HB, Pearson JD, Metter EJ et al*. Longitudinal evaluation of prostate-specific antigen levels in men with and without prostate disease. *JAMA* 1992; 267: 2215–2220
- 21 *Hoogendam A, Buntinx F, de Vet, H C*. The diagnostic value of digital rectal examination in primary care screening for prostate cancer: a meta-analysis. *Family practice* 1999; 16: 621–626
- 22 *Catalona WJ, Richie JP, Ahmann FR et al*. Comparison of digital rectal examination and serum prostate specific antigen in the early detection of prostate cancer: results of a multicenter clinical trial of 6,630 men. *The Journal of urology* 1994; 151: 1283–1290
- 23 *Carvalho GF, Smith DS, Mager DE et al*. Digital rectal examination for detecting prostate cancer at prostate specific antigen levels of 4 ng/ml. or less. *The Journal of urology* 1999; 161: 835–839
- 24 *Lee F, Torp-Pedersen ST, Siders DB*. The role of transrectal ultrasound in the early detection of prostate cancer. *CA: a cancer journal for clinicians* 1989; 39: 337–360
- 25 *Mettlin C, Murphy GP, Babaian RJ et al*. The results of a five-year early prostate cancer detection intervention. Investigators of the American Cancer Society National Prostate Cancer Detection Project. *Cancer* 1996; 77: 150–159
- 26 *Abuzallouf S, Dayes I, Lukka H*. Baseline staging of newly diagnosed prostate cancer: a summary of the literature. *The Journal of urology* 2004; 171: 2122–2127
- 27 *Farsad M, Schiavina R, Castellucci P et al*. Detection and localization of prostate cancer: correlation of (11)C-choline PET/CT with histopathologic

- step-section analysis. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 2005; 46: 1642–1649
- 28 *Harisinghani MG, Barentsz J, Hahn PF et al.* Noninvasive Detection of Clinically Occult Lymph-Node Metastases in Prostate Cancer. *N Engl J Med* 2003; 348: 2491–2499
- 29 *Afshar-Oromieh A, Haberkorn U, Schlemmer HP et al.* Comparison of PET/CT and PET/MRI hybrid systems using a 68Ga-labelled PSMA ligand for the diagnosis of recurrent prostate cancer: initial experience. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 2014; 41: 887–897
- 30 *D'Amico AV, Whittington R, Malkowicz SB et al.* Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer. *JAMA* 1998; 280: 969–974
- 31 *Shariat SF, Karakiewicz PI, Roehrborn CG et al.* An updated catalog of prostate cancer predictive tools. *Cancer* 2008; 113: 3075–3099
- 32 *Punnen S, Freedland SJ, Presti, Joseph C Jr et al.* Multi-institutional validation of the CAPRA-S score to predict disease recurrence and mortality after radical prostatectomy. *European urology* 2014; 65: 1171–1177
- 33 *Makarov DV, Trock BJ, Humphreys EB et al.* Updated nomogram to predict pathologic stage of prostate cancer given prostate-specific antigen level, clinical stage, and biopsy Gleason score (Partin tables) based on cases from 2000 to 2005. *Urology* 2007; 69: 1095–1101
- 34 *Lu-Yao GL, Yao SL.* Population-based study of long-term survival in patients with clinically localised prostate cancer. *Lancet (London, England)* 1997; 349: 906–910
- 35 *Adolfsson J, Steineck G, Hedlund PO.* Deferred treatment of locally advanced nonmetastatic prostate cancer: a long-term followup. *The Journal of urology* 1999; 161: 505–508
- 36 *Bill-Axelsson A, Holmberg L, Ruutu M et al.* Radical prostatectomy versus watchful waiting in early prostate cancer. *The New England journal of medicine* 2011; 364: 1708–1717
- 37 *Tooher R, Swindle P, Woo H et al.* Laparoscopic radical prostatectomy for localized prostate cancer: a systematic review of comparative studies. *The Journal of urology* 2006; 175: 2011–2017
- 38 *Vickers A, Savage C, Bianco F et al.* Cancer control and functional outcomes after radical prostatectomy as markers of surgical quality: analysis of heterogeneity between surgeons at a single cancer center. *European urology* 2011; 59: 317–322
- 39 *Boccon-Gibod L, Djavan WB, Hammerer P et al.* Management of prostate-specific antigen relapse in prostate cancer: a European Consensus. *International journal of clinical practice* 2004; 58: 382–390

- 40 *Partin AW, Pearson JD, Landis PK et al.* Evaluation of serum prostate-specific antigen velocity after radical prostatectomy to distinguish local recurrence from distant metastases. *Urology* 1994; 43: 649–659
- 41 *Pound CR, Partin AW, Eisenberger MA et al.* Natural history of progression after PSA elevation following radical prostatectomy. *JAMA* 1999; 281: 1591–1597
- 42 *Roehl KA, Han M, Ramos CG et al.* Cancer progression and survival rates following anatomical radical retropubic prostatectomy in 3,478 consecutive patients: long-term results. *The Journal of urology* 2004; 172: 910–914
- 43 *Han M, Partin AW, Pound CR et al.* Long-term biochemical disease-free and cancer-specific survival following anatomic radical retropubic prostatectomy. The 15-year Johns Hopkins experience. *The Urologic clinics of North America* 2001; 28: 555–565
- 44 *Hull GW, Rabbani F, Abbas F et al.* Cancer control with radical prostatectomy alone in 1,000 consecutive patients. *The Journal of urology* 2002; 167: 528–534
- 45 *Rübben H.* Uroonkologie. [eBook inside]. 6. Aufl. Berlin [u.a.]: Springer; 2014
- 46 *Crawford ED, Ventii K, Shore ND.* New biomarkers in prostate cancer. *Oncology (Williston Park, N.Y.)* 2014; 28: 135–142
- 47 *Kattan MW, Shariat SF, Andrews B et al.* The addition of interleukin-6 soluble receptor and transforming growth factor beta1 improves a preoperative nomogram for predicting biochemical progression in patients with clinically localized prostate cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2003; 21: 3573–3579
- 48 *Dearnaley DP, Sloane JP, Ormerod MG et al.* Increased detection of mammary carcinoma cells in marrow smears using antisera to epithelial membrane antigen. *British Journal of Cancer* 1981; 44: 85–90
- 49 *Pantel K, Brakenhoff RH.* Dissecting the metastatic cascade. *Nature reviews. Cancer* 2004; 4: 448–456
- 50 *Heerboth S, Housman G, Leary M et al.* EMT and tumor metastasis. *Clinical and Translational Medicine* 2015; 4
- 51 Nieto, M. Angela, *Cano A.* The epithelial-mesenchymal transition under control: global programs to regulate epithelial plasticity. *Seminars in cancer biology* 2012; 22: 361–368
- 52 *Khan MI, Hamid A, Adhami VM et al.* Role of Epithelial Mesenchymal Transition in Prostate Tumorigenesis. *Current pharmaceutical design* 2015; 21: 1240–1248
- 53 *Nauseef JT, Henry MD.* Epithelial-to-mesenchymal transition in prostate cancer: paradigm or puzzle? *Nature reviews. Urology* 2011; 8: 428–439
- 54 *Yang J, Mani SA, Weinberg RA.* Exploring a new twist on tumor metastasis. *Cancer research* 2006; 66: 4549–4552

- 55 *Thiery JP, Acloque H, Huang, Ruby Y J et al.* Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 2009; 139: 871–890
- 56 *Lamouille S, Xu J, Derynck R.* Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nature reviews. Molecular cell biology* 2014; 15: 178–196
- 57 *Mani SA, Guo W, Liao M et al.* The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 2008; 133: 704–715
- 58 *Singh A, Settleman J.* EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene* 2010; 29: 4741–4751
- 59 *Pienta KJ, Loberg R.* The "emigration, migration, and immigration" of prostate cancer. *Clinical prostate cancer* 2005; 4: 24–30
- 60 *Walz DA, Fenton JW.* The role of thrombin in tumor cell metastasis. *Invasion & metastasis* 1994-1995; 14: 303–308
- 61 *Paget S.* The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *The Lancet* 1889; 133: 571–573
- 62 *Stenzl A, Fehm T, Hofbauer LC, Jakob F.* Knochenmetastasen. Pathophysiologie, Diagnostik und Therapie: Springer; 2014
- 63 *Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S et al.* VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* 2005; 438: 820–827
- 64 *Schofield R.* The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood cells* 1978; 4: 7–25
- 65 *Shiozawa Y, Havens AM, Pienta KJ et al.* The bone marrow niche: habitat to hematopoietic and mesenchymal stem cells, and unwitting host to molecular parasites. *Leukemia* 2008; 22: 941–950
- 66 *Shiozawa Y, Pedersen EA, Havens AM et al.* Human prostate cancer metastases target the hematopoietic stem cell niche to establish footholds in mouse bone marrow. *The Journal of clinical investigation* 2011; 121: 1298–1312
- 67 *Yu C, Shiozawa Y, Taichman RS et al.* Prostate Cancer and Parasitism of the Bone Hematopoietic Stem Cell Niche. *Critical reviews in eukaryotic gene expression* 2012; 22: 131–148
- 68 *Taichman RS.* Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche. *Blood* 2005; 105: 2631–2639
- 69 *Sun Y, Schneider A, Jung Y et al.* Skeletal localization and neutralization of the SDF-1(CXCL12)/CXCR4 axis blocks prostate cancer metastasis and growth in osseous sites in vivo. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 2005; 20: 318–329

- 70 Sun Y, Fang M, Wang J *et al.* Expression and activation of alpha v beta 3 integrins by SDF-1/CXC12 increases the aggressiveness of prostate cancer cells. *The Prostate* 2007; 67: 61–73
- 71 Havens AM, Jung Y, Sun YX *et al.* The role of sialomucin CD164 (MGC-24v or endolyn) in prostate cancer metastasis. *BMC cancer* 2006; 6: 195
- 72 Jung Y, Wang J, Song J *et al.* Annexin II expressed by osteoblasts and endothelial cells regulates stem cell adhesion, homing, and engraftment following transplantation. *Blood* 2007; 110: 82–90
- 73 Shiozawa Y, Havens AM, Jung Y *et al.* Annexin II/annexin II receptor axis regulates adhesion, migration, homing, and growth of prostate cancer. *Journal of cellular biochemistry* 2008; 105: 370–380
- 74 Yin T, Li L. The stem cell niches in bone. *Journal of Clinical Investigation* 2006; 116: 1195–1201
- 75 Arai F, Hirao A, Ohmura M *et al.* Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell* 2004; 118: 149–161
- 76 Takubo K, Goda N, Yamada W *et al.* Regulation of the HIF-1alpha level is essential for hematopoietic stem cells. *Cell stem cell* 2010; 7: 391–402
- 77 Aguirre-Ghiso JA. Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nature reviews. Cancer* 2007; 7: 834–846
- 78 Pedersen EA, Shiozawa Y, Mishra A *et al.* Structure and function of the solid tumor niche. *Frontiers in bioscience (Scholar edition)* 2012; 4: 1–15
- 79 Sosa MS, Bragado P, Aguirre-Ghiso JA. Mechanisms of disseminated cancer cell dormancy: an awakening field. *Nature reviews. Cancer* 2014; 14: 611–622
- 80 Pantel K, Alix-Panabieres C, Riethdorf S. Cancer micrometastases. *Nat Rev Clin Oncol* 2009; 6: 339–351
- 81 Paterlini-Brechot P, Benali NL. Circulating tumor cells (CTC) detection: clinical impact and future directions. *Cancer letters* 2007; 253: 180–204
- 82 Cordell JL, Falini B, Erber WN *et al.* Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 1984; 32: 219–229
- 83 Fehm T, Braun S, Muller V *et al.* A concept for the standardized detection of disseminated tumor cells in bone marrow from patients with primary breast cancer and its clinical implementation. *Cancer* 2006; 107: 885–892
- 84 Borgen E, Pantel K, Schlimok G *et al.* A European interlaboratory testing of three well-known procedures for immunocytochemical detection of epithelial cells in bone marrow. Results from analysis of normal bone marrow. *Cytometry. Part B, Clinical cytometry* 2006; 70: 400–409

- 85 *Braun S, Vogl FD, Naume B et al.* A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *The New England journal of medicine* 2005; 353: 793–802
- 86 *Edge SB.* AJCC cancer staging manual. 7. Aufl. New York: Springer; 2010
- 87 *Calaluce R, Miedema BW, Yesus YW.* Micrometastasis in colorectal carcinoma: a review. *Journal of surgical oncology* 1998; 67: 194–202
- 88 *Coello MC, Luketich JD, Litle VR et al.* Prognostic significance of micrometastasis in non-small-cell lung cancer. *Clinical lung cancer* 2004; 5: 214–225
- 89 *Ghossein RA, Carusone L, Bhattacharya S.* Molecular detection of micrometastases and circulating tumor cells in melanoma prostatic and breast carcinomas. *In vivo (Athens, Greece)* 2000; 14: 237–250
- 90 *Wimberger P, Heubner M, Otterbach F et al.* Influence of platinum-based chemotherapy on disseminated tumor cells in blood and bone marrow of patients with ovarian cancer. *Gynecologic oncology* 2007; 107: 331–338
- 91 *Wolfrum F, Vogel I, Fandrich F et al.* Detection and clinical implications of minimal residual disease in gastro-intestinal cancer. *Langenbeck's archives of surgery / Deutsche Gesellschaft fur Chirurgie* 2005; 390: 430–441
- 92 *Riethdorf S, Wikman H, Pantel K.* Review: Biological relevance of disseminated tumor cells in cancer patients. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 2008; 123: 1991–2006
- 93 *Hartkopf AD, Taran F, Wallwiener M et al.* The presence and prognostic impact of apoptotic and nonapoptotic disseminated tumor cells in the bone marrow of primary breast cancer patients after neoadjuvant chemotherapy. *Breast cancer research : BCR* 2013; 15: R94
- 94 *Borgen E, Naume B, Nesland JM et al.* Standardization of the immunocytochemical detection of cancer cells in BM and blood: I. establishment of objective criteria for the evaluation of immunostained cells. *Cytotherapy* 1999; 1: 377–388
- 95 *Caulin C, Salvesen GS, Oshima RG.* Caspase cleavage of keratin 18 and reorganization of intermediate filaments during epithelial cell apoptosis. *The Journal of cell biology* 1997; 138: 1379–1394
- 96 *Leers MP, Kolgen W, Bjorklund V et al.* Immunocytochemical detection and mapping of a cytokeratin 18 neo-epitope exposed during early apoptosis. *The Journal of pathology* 1999; 187: 567–572
- 97 *Fehm T, Becker S, Becker-Pergola G et al.* Presence of apoptotic and nonapoptotic disseminated tumor cells reflects the response to neoadjuvant systemic therapy in breast cancer. *Breast cancer research : BCR* 2006; 8: R60
- 98 *Wimberger P, Roth C, Pantel K et al.* Impact of platinum-based chemotherapy on circulating nucleic acid levels, protease activities in blood and disseminated tumor cells in bone marrow of ovarian cancer patients. *Inter-*

- national journal of cancer. Journal international du cancer 2011; 128: 2572–2580
- 99 *Fehm T, Solomayer EF, Meng S et al.* Methods for isolating circulating epithelial cells and criteria for their classification as carcinoma cells. *Cytotherapy* 2005; 7: 171–185
- 100 *Krawczyk N, Hartkopf A, Banys M et al.* Prognostic relevance of induced and spontaneous apoptosis of disseminated tumor cells in primary breast cancer patients. *BMC cancer* 2014; 14: 394
- 101 *Schilling D, Todenhofer T, Hennenlotter J et al.* Isolated, disseminated and circulating tumour cells in prostate cancer. *Nature reviews. Urology* 2012; 9: 448–463
- 102 *Weckermann D, Muller P, Wawroschek F et al.* Micrometastases of bone marrow in localized prostate cancer: correlation with established risk factors. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 1999; 17: 3438–3443
- 103 *Weckermann D, Muller P, Wawroschek F et al.* Disseminated cytokeratin positive tumor cells in the bone marrow of patients with prostate cancer: detection and prognostic value. *The Journal of urology* 2001; 166: 699–703
- 104 *Berg A, Berner A, Lilleby W et al.* Impact of disseminated tumor cells in bone marrow at diagnosis in patients with nonmetastatic prostate cancer treated by definitive radiotherapy. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 2007; 120: 1603–1609
- 105 *Weckermann D, Polzer B, Ragg T et al.* Perioperative activation of disseminated tumor cells in bone marrow of patients with prostate cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2009; 27: 1549–1556
- 106 *Kollermann J, Weikert S, Schostak M et al.* Prognostic significance of disseminated tumor cells in the bone marrow of prostate cancer patients treated with neoadjuvant hormone treatment. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2008; 26: 4928–4933
- 107 *Morgan TM, Lange PH, Porter MP et al.* Disseminated tumor cells in prostate cancer patients after radical prostatectomy and without evidence of disease predicts biochemical recurrence. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2009; 15: 677–683
- 108 *Ellis WJ, Pfitzenmaier J, Colli J et al.* Detection and isolation of prostate cancer cells from peripheral blood and bone marrow. *Urology* 2003; 61: 277–281
- 109 *Cher ML, de Oliveira, J G, Beaman AA et al.* Cellular proliferation and prevalence of micrometastatic cells in the bone marrow of patients with clinically localized prostate cancer. *Clinical cancer research : an official*

- journal of the American Association for Cancer Research 1999; 5: 2421–2425
- 110 Bianco, F J Jr, Wood, D P Jr, Gomes de Oliveira, J *et al.* Proliferation of prostate cancer cells in the bone marrow predicts recurrence in patients with localized prostate cancer. *The Prostate* 2001; 49: 235–242
- 111 Mitsiades CS, Lymbessis P, Sourla A *et al.* Molecular staging by RT-pCR analysis for PSA and PSMA in peripheral blood and bone marrow samples is an independent predictor of time to biochemical failure following radical prostatectomy for clinically localized prostate cancer. *Clinical & experimental metastasis* 2004; 21: 495–505
- 112 Wood, D P Jr, Banerjee M. Presence of circulating prostate cells in the bone marrow of patients undergoing radical prostatectomy is predictive of disease-free survival. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 1997; 15: 3451–3457
- 113 Pfitzenmaier J, Ellis WJ, Hawley S *et al.* The detection and isolation of viable prostate-specific antigen positive epithelial cells by enrichment: a comparison to standard prostate-specific antigen reverse transcriptase polymerase chain reaction and its clinical relevance in prostate cancer. *Urologic oncology* 2007; 25: 214–220
- 114 Morrissey C, Vessella RL, Lange PH *et al.* The biology and clinical implications of prostate cancer dormancy and metastasis. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 2015
- 115 Danneman D, Drevin L, Robinson D *et al.* Gleason inflation 1998-2011: a registry study of 97,168 men. *BJU international* 2015; 115: 248–255
- 116 Louis AS, Kalnin R, Maganti M *et al.* Oncologic outcomes following radical prostatectomy in the active surveillance era. *Canadian Urological Association journal = Journal de l'Association des urologues du Canada* 2013; 7: E475-80
- 117 Stephenson AJ, Kattan MW, Eastham JA *et al.* Defining biochemical recurrence of prostate cancer after radical prostatectomy: a proposal for a standardized definition. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2006; 24: 3973–3978
- 118 Lilleby W, Stensvold A, Mills IG *et al.* Disseminated tumor cells and their prognostic significance in nonmetastatic prostate cancer patients. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 2013; 133: 149–155
- 119 Mueller P, Carroll P, Bowers E *et al.* Low frequency epithelial cells in bone marrow aspirates from prostate carcinoma patients are cytogenetically aberrant. *Cancer* 1998; 83: 538–546
- 120 Klein CA, Blankenstein, Thomas J F, Schmidt-Kittler O *et al.* Genetic heterogeneity of single disseminated tumour cells in minimal residual cancer. *Lancet (London, England)* 2002; 360: 683–689

- 121 *Molloy TJ, Bosma AJ, Baumbusch LO et al.* The prognostic significance of tumour cell detection in the peripheral blood versus the bone marrow in 733 early-stage breast cancer patients. *Breast cancer research : BCR* 2011; 13: R61
- 122 *Shetye JD, Liljefors ML, Emdin SO et al.* Spectrum of cytokeratin-positive cells in the bone marrows of colorectal carcinoma patients. *Anticancer research* 2004; 24: 2375–2383
- 123 *Guzvic M, Braun B, Ganzer R et al.* Combined genome and transcriptome analysis of single disseminated cancer cells from bone marrow of prostate cancer patients reveals unexpected transcriptomes. *Cancer research* 2014; 74: 7383–7394
- 124 *Chery L, Lam H, Coleman I et al.* Characterization of single disseminated prostate cancer cells reveals tumor cell heterogeneity and identifies dormancy associated pathways. *Oncotarget* 2014; 5: 9939–9951
- 125 *Lammers R, Giesert C, Grunebach F et al.* Monoclonal antibody 9C4 recognizes epithelial cellular adhesion molecule, a cell surface antigen expressed in early steps of erythropoiesis. *Experimental hematology* 2002; 30: 537–545
- 126 *Eisenwort G, Jurkin J, Yasmin N et al.* Identification of TROP2 (TACSTD2), an EpCAM-like molecule, as a specific marker for TGF-beta1-dependent human epidermal Langerhans cells. *The Journal of investigative dermatology* 2011; 131: 2049–2057
- 127 *Brownback KR, Renzulli J, DeLellis R et al.* Small-cell prostate carcinoma: A retrospective analysis of five newly reported cases. *Indian Journal of Urology : IJU : Journal of the Urological Society of India* 2009; 25: 259–263
- 128 *Collins AT, Berry PA, Hyde C et al.* Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer research* 2005; 65: 10946–10951
- 129 *Gerges N, Jabado N.* Biomarkers in cancer micrometastasis: where are we at? *Bioanalysis* 2010; 2: 881–899
- 130 *Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR.* Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* 1972; 26: 239–257
- 131 *Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV.* Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 1994; 73: 2013–2026
- 132 *Wong RSY.* Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR* 2011; 30: 87
- 133 *Lipponen P, Aaltomaa S, Kosma VM et al.* Apoptosis in breast cancer as related to histopathological characteristics and prognosis. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 1994; 30A: 2068–2073
- 134 *Lipponen PK, Aaltomaa S.* Apoptosis in bladder cancer as related to standard prognostic factors and prognosis. *The Journal of pathology* 1994; 173: 333–339

- 135 *Aihara M, Scardino PT, Truong LD et al.* The frequency of apoptosis correlates with the prognosis of Gleason Grade 3 adenocarcinoma of the prostate. *Cancer* 1995; 75: 522–529
- 136 *Dachille G, Cai T, Ludovico GM et al.* Prognostic role of cell apoptotic rate in prostate cancer: outcome of a long-time follow-up study. *Oncology reports* 2008; 19: 541–545
- 137 *Weiss L.* Metastatic inefficiency. *Advances in cancer research* 1990; 54: 159–211

## 7 Anhang



Klinik für Urologie · Hoppe-Seyler-Str. 3 · D-72076 Tübingen

### Universitätsklinikum Tübingen Klinik für Urologie

Ärztlicher Direktor:  
Prof. Dr. med. A. Stenzl

Hoppe-Seyler-Str. 3  
D-72076 Tübingen

24h-Info-Telefon: ☎ 07071 / 29 – 86000  
Sekretariat: ☎ 07071 / 29 – 86613  
Terminvergabe ☎ 07071 / 29 – 86565  
OP-Terminvergabe: ☎ 07071 / 29 – 84097  
Telefax: 07071 / 29 – 5092  
E-Mail: urologie@med.uni-tuebingen.de  
Internet: http://www.uro-tuebingen.de



27.01.2016

#### Ankündigung einer telefonischen Befragung zu Ihrem Krankheitsverlauf

Sehr geehrter Herr [REDACTED],

am [REDACTED] wurden Sie an unserer Klinik wegen eines Prostatakarzinoms operiert und das Knochenmark im Rahmen der routinemäßigen Diagnostik untersucht. Als Universitätsklinik sind wir auch wissenschaftlich tätig um die Behandlungsmöglichkeiten für das Prostatakarzinom weiter zu verbessern. In einer aktuellen Studie untersuchen wir die bekannte prognostische Wertigkeit bestimmter Veränderungen im Knochenmark. Hierbei sind wir an Informationen zum weiteren Krankheitsverlauf nach Ihrer Operation interessiert.

Unser Herr Faber wird Sie daher in den nächsten Tagen telefonisch kontaktieren. Das Einverständnis für diese kurze Befragung ist selbstverständlich freiwillig. Aus einer Nicht-Teilnahme werden Ihnen keinerlei Nachteile entstehen. Sie werden über den Inhalt und den Zweck des Telefonats aufgeklärt und es werden Ihnen einige kurze Fragen zum Verlauf Ihrer Erkrankung seit der Operation gestellt. Die Fragen betreffen dabei ein eventuelles Wiederauftreten der Tumorerkrankung und den weiteren Behandlungsverlauf nach der Operation.

Der Mitarbeiter unserer Klinik unterliegt der ärztlichen Schweigepflicht und alle von Ihm erhobene Daten werden streng nach den Richtlinien des Datenschutzes bearbeitet

Wir bedanken uns im Voraus ganz herzlich für Ihre Mithilfe und würden uns freuen, wenn Sie unsere Studie durch Ihre Teilnahme unterstützen würden.

Für eventuelle Rückfragen können Sie sich beim Ansprechpartner der Studie, Herrn Hennenlotter, telefonisch informieren: 07071-29-80324.

Mit freundlichen Grüßen

Prof. Dr. med. C. Schwentner  
Ltd. Oberarzt d. Klinik

Dr. Tilman Todenhöfer  
Wissensch. Mitarbeiter

Frank Faber  
Studienkoordination

Universitätsklinikum Tübingen  
Anstalt des öffentlichen Rechts  
Sitz Tübingen  
Geissweg 3 • 72076 Tübingen  
Tel. 07071/29-0  
www.medizin.uni-tuebingen.de  
Steuer-Nr. 86156/09402  
UST-ID: DE 146 889 674

Aufsichtsrat  
Hartmut Schrade (Vorsitzender)  
Vorstand  
Prof. Dr. Michael Bamberg (Vorsitzender)  
Gabriele Sonntag (Stellv. Vorsitzende)  
Prof. Dr. Karl Ulrich Bartz-Schmidt  
Prof. Dr. Ingo B. Autenrieth  
Jana Luntz

Baden-Württembergische Bank Stuttgart  
BLZ 600 501 01 Konto-Nr. 7477 5037 93  
IBAN: DE 41 6005 0101 7477 5037 93  
BIC (SWIFT-Code): SOLADEST600  
Kreissparkasse Tübingen  
BLZ 641 500 20 Konto-Nr. 14 144  
IBAN: DE 79 6415 0020 0000 0141 44  
BIC (SWIFT-Code): SOLADES1TUB

**Stellvertreter:**  
Prof. Dr. Karl-Dietrich Sievert  
**Leitender Oberarzt:**  
Prof. Dr. Christian Schwentner  
**Oberärzte:**  
Dr. Bastian Amend  
Prof. Dr. Jens Bedke  
Dr. Georgios Gakis  
Dr. med. S. Kruck  
**OP-Terminvergabe:**  
Barbara Schäffer  
Tobias Adam  
☎ 07071 / 29-84097  
**Patientenmanagement:**  
Werner Gest-Gronover  
☎ 07071 / 29-80320  
**Bereich klinische Studien:**  
Dr. Susan Feyrerabend  
☎ 07071 / 29-87235



### Anhang 1: Exemplarisches Anschreiben



Klinik für Urologie · Hoppe-Seyler-Str. 3 · D-72076 Tübingen

An Herrn Dr. med. [redacted]

Fax-Nr.: [redacted]

**Universitätsklinikum Tübingen  
Klinik für Urologie**

Ärztlicher Direktor:  
Prof. Dr. med. A. Stenzl

Hoppe-Seyler-Str. 3  
D-72076 Tübingen

24h-Info-Telefon: ☎ 07071 / 29 – 86000  
Sekretariat: ☎ 07071 / 29 – 86613  
Terminvergabe ☎ 07071 / 29 – 86565  
OP-Terminvergabe: ☎ 07071 / 29 – 84097  
Telefax: 07071 / 29 – 5092  
E-Mail: urologie@med.uni-tuebingen.de  
Internet: http://www.uro-tuebingen.de



27.01.2016

Sehr geehrter Herr Kollege [redacted],

aus unseren Unterlagen geht hervor, dass bei Ihrem Patienten Herrn [redacted], geb. [redacted], am [redacted] in unserem Hause eine radikale Prostatektomie durchgeführt wurde. Die Urologische Klinik der Universität Tübingen führt momentan ein Forschungsprojekt zum Krankheitsverlauf des Prostatakarzinoms durch. Für eine vollständige Auswertung unserer Ergebnisse fehlen uns noch einige wichtige klinische Daten des Patienten. Dabei handelt es sich um Daten des weiteren Krankheitsverlaufs. Wir wären Ihnen sehr dankbar, wenn Sie uns durch Beantworten der Fragen beim Abschluss dieses Projektes helfen würden.

Vielen Dank für Ihre Kooperation und mit freundlichen Grüßen

Prof. Dr. med. C. Schwentner  
Ltd. Oberarzt d. Klinik

Dr. Tilman Todenhöfer  
Wissensch. Mitarbeiter

Frank Faber  
Studienkoordination

1. PSA-Wiederanstieg? Nein  Ja  Datum: \_\_\_\_\_ Wert: \_\_\_\_\_ ng/ml

Wenn „Nein“, dann Datum letzte PSA-Untersuchung: \_\_\_\_\_ Wert: \_\_\_\_\_ ng/ml

2. Wenn Ja, eingeleitete Therapie (Radioatio / Hormonabl. / etc.)

3. Metastasen entwickelt? Nein  Ja  Datum \_\_\_\_\_ Lokalisation \_\_\_\_\_

4. Ist der Patient verstorben? Nein  Ja  Datum \_\_\_\_\_

4a) an den Folgen des Prostatakarzinoms Ja  Nein

5. Ihre Kommentare \_\_\_\_\_  
(z.B. Patient verzogen, weitere Krebserkrankungen/ -therapien)

Stellvertreter:  
Prof. Dr. Karl-Dietrich Sievert  
Leitender Oberarzt:  
Prof. Dr. Christian Schwentner  
Oberärzte:  
Dr. Bastian Amend  
Prof. Dr. Jens Bedke  
Dr. Georgios Gakis  
Dr. med. S. Kruck  
OP-Terminvergabe:  
Barbara Schäffler  
Tobias Adam  
☎ 07071 / 29-84097  
Patientenmanagement:  
Werner Gest-Gronover  
☎ 07071 / 29-80320  
Bereich klinische Studien:  
Dr. Susan Feyerabend  
☎ 07071 / 29-87235



VIELEN DANK FÜR DAS RÜCKFAX AN 07071-29-5092

Universitätsklinikum Tübingen  
Anstalt des öffentlichen Rechts  
Sitz Tübingen  
Geissweg 3 • 72076 Tübingen  
Tel. 07071/29-0  
www.medizin.uni-tuebingen.de  
Steuer-Nr. 86156/09402  
USt.-ID: DE 146 889 674

Aufsichtsrat  
Hartmut Schrade (Vorsitzender)  
Vorstand  
Prof. Dr. Michael Bamberg (Vorsitzender)  
Gabriele Sonntag (Stellv. Vorsitzende)  
Prof. Dr. Karl Ulrich Bartz-Schmidt  
Prof. Dr. Ingo B. Autenrieth  
Jana Luntz

Baden-Württembergische Bank Stuttgart  
BLZ 600 501 01 Konto-Nr. 7477 5037 93  
IBAN: DE 41 6005 0101 7477 5037 93  
BIC (SWIFT-Code): SOLADEST600  
Kreissparkasse Tübingen  
BLZ 641 500 20 Konto-Nr. 14 144  
IBAN: DE 79 6415 0020 0000 0141 44  
BIC (SWIFT-Code): SOLADES1TUB

**Anhang 2: Exemplarisches Fax an einen Facharzt**

## 8 Erklärung zum Eigenanteil

Die vorliegende Arbeit wurde in der Klinik für Urologie des Universitätsklinikums Tübingen unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Christian Schwentner durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Tilman Todenhöfer und Herrn Jörg Hennenlotter.

Der Nachweis apoptotischer und nicht apoptotischer DTC mittels immunhistochemischer Färbungen erfolgte durch Mitarbeiter/innen der Abteilung für Immunzytologie des Labors der Universitäts-Frauenklinik Tübingen.

Die Erhebung des Follow-Ups, respektive des Patienten- und Arztkontakts, sowie die Digitalisierung der Daten und die Organisation der Datenbank wurden von mir eigenständig durchgeführt.

Bei der statistischen Auswertung wurde ich von Herrn Dr. T. Todenhöfer und Herrn J. Hennenlotter unterstützt. Sämtliche in der vorliegenden Arbeit dargestellten statistischen Ergebnisse wurden von mir selbst errechnet und die dargestellten Tabellen und Graphen eigenständig erstellt.

Ich versichere, das vorliegende Manuskript selbständig verfasst zu haben, nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen als solche gekennzeichnet zu haben. Ich erkläre ferner alle aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken und Abbildungen als solche kenntlich gemacht zu haben. Ich versichere an Eides statt, dass diese Angaben wahr sind und dass ich nichts verschwiegen habe.

Mir ist bekannt, dass die falsche Abgabe einer Versicherung an Eides statt mit Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe bestraft wird.

Frank Faber

## 9 Veröffentlichung

Der in dieser Arbeit verwendete Datensatz stellt das größte Teilkollektiv der folgenden, unter meiner Mitarbeit entstandenen, Veröffentlichung dar:

*Todenhöfer, T., Hennenlotter, J., Faber, F., Wallwiener, D., Schilling, D., Kühs, U., Aufderklamm, S., Bier, S., Mischinger, J., Gakis, G., Fehm, T., Stenzl, A. and Schwentner, C. (2015), Significance of apoptotic and non-apoptotic disseminated tumor cells in the bone marrow of patients with clinically localized prostate cancer. Prostate, 75: 637–645. doi: 10.1002/pros.22947*

## 10 Danksagung

Für die Überlassung des interessanten Themas und die Bereitstellung der Ressourcen der Klinik für Urologie des Universitätsklinikums Tübingen möchte ich zunächst Herrn Prof. Dr. A. Stenzl einen besonderen Dank aussprechen.

Außerordentlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. C. Schwenter für die Betreuung und das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Ganz besonders danken möchte ich Herrn Dr. T. Todenhöfer, der mich neben der Planung des Projekts besonders in fachlichen Fragen stets kompetent unterstützte und mein Projekt auch während seines Auslandsaufenthalts weiter konstruktiv begleitete. Insbesondere möchte ich ihm auch für das Korrekturlesen meines ersten Manuskripts danken.

Hervorheben möchte ich auch Herrn J. Hennenlotter, der mir trotz seines stressigen Alltags zu jeder Zeit hilfsbereit zur Seite stand. Ohne seine zahlreichen Hinweise zu praktischem Vorgehen, konstruktiven Überlegungen bei Schwierigkeiten und Motivation wäre das Vorankommen des Projekts erheblich erschwert gewesen. Außerdem möchte ich ihm noch besonders für die Hilfe bei organisatorischen Aspekten der Dissertation danken.

Mein Dank gilt auch den Mitarbeiter/-innen der Abteilung für Immunzytologie des Labors der Universitäts-Frauenklinik Tübingen, welche mittels der Durchführung immunhistochemischer Färbungen und Auswertungen zum Nachweis von DTC die Basis der vorliegenden Arbeit bildeten. Besonderer Dank gilt insbesondere Frau Amann, die mich persönlich in das Verfahren einarbeitete.

Zu guter Letzt gilt mein persönlicher Dank meiner Familie, insbesondere meinen Eltern Doris Faber und Bernd Faber, ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Im Speziellen möchte ich mich auch bei meiner Schwester Lena Faber für das Korrekturlesen meines Manuskripts besonders bedanken.

## 11 Lebenslauf

**Name:** Frank Faber  
**Geboren:** 19.10.1988 in Sindelfingen  
**Familienstand:** ledig, keine Kinder

### Studium:

17.11.2015 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 2)  
2011-2015 Parallelstudium der Physik (bis einschl. Zwischenprüfung)  
09.10.2014 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 2)  
30.03.2011 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 1,5)  
SS 2009 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

### Forschung:

10/ 2013 Aufnahme als Doktorand der Universitätsklinik für Urologie in Tübingen. Beginn der Forschungsarbeit am Thema *„Prognostische Bedeutung apoptotischer und nicht-apoptotischer disseminierter Tumorzellen im Knochenmark von Patienten mit nicht-metastasiertem Prostatakarzinom“*

### Praktische Erfahrungen:

Seit 06/2016 Assistenzarzt der Inneren Medizin in der Klinik Sindelfingen  
11/ 2014-11/ 2015 Praktisches Jahr im Klinikum Friedrichshafen mit Wahlfach Anästhesie  
09-10/ 2013 Famulatur in der pädiatrischen Facharztpraxis Dr.Kirchner / Dr. Backhaus in Weil der Stadt  
08-09/ 2013 Famulatur in der medizinischen Klinik für Innere Medizin in Sindelfingen  
08-09/ 2012 Famulatur in der Anästhesie in Sindelfingen  
03-04/ 2012 Famulatur in der Klinik für Viszeralchirurgie in Böblingen

### Schulbildung:

04/ 2008 Abitur  
1999-2008 Gymnasium Rutesheim, Rutesheim  
1995-1999 Ludwig-Uhland-Schule Heimsheim

### Sprachkenntnisse:

Deutsch (Muttersprache), Englisch (sicher in Wort und Schrift), Französisch (Grundkenntnisse)