

Aus dem Institut für Pathologie  
Medizinische Fakultät der Universität Rostock  
Direktor: Prof. Dr. med. Andreas Erbersdobler

# **CD57: Expression in inzidenten, operativ behandelten und metastasierten Prostatakarzinomen**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock  
vorgelegt von

Holger Wangerin, Dipl. mus., M. A. phil.

Rostock 2013

Erster Gutachter: Erbersdobler, Andreas, Prof. Dr. med.; Direktor des Institutes für Pathologie der Universität Rostock

Zweiter Gutachter: Hakenberg, Oliver, Prof. Dr. med.; Direktor der Urologischen Klinik und Poliklinik der Universität Rostock

Dritter Gutachter: Schlomm, Thorsten, Prof. Dr. med.; Leitender Arzt und wissenschaftlicher Direktor der Martini-Klinik am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Datum der Einreichung: 7.5.2013

Datum der Verteidigung: 27.11.2013

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	5
1.1. Vorbemerkungen.....	5
1.2. CD57 als molekularer Gewebemarker der Prostata – Forschungsstand.....	7
1.2.1. Begriffsbestimmung .....	7
1.2.2. CD57 – Erstbeschreibung und molekulare Struktur .....	8
1.2.3. CD57 – Vorkommen im humanen Gewebe .....	9
1.3. Herleitung der Hypothese .....	11
2. Material und Methoden .....	14
2.1. Gewebe und Patientendaten .....	14
2.1.1. TMA „inzidente Ca“ .....	14
2.1.2. TMA „Berlin klein“ .....	15
2.1.3. TMA „Berlin groß“ .....	15
2.1.4. TMA „Hamburg“ .....	16
2.1.5. TMA „Lymphknoten“ .....	17
2.1.6. „Großflächenschnitte“ .....	18
2.2. Mikroskopie.....	18
2.3. Prinzip der TMA-Herstellung.....	20
2.4. Immunhistochemie.....	21
2.5. Statistik .....	22
3. Ergebnisse .....	23
3.1. Vergleich CD57 in Tumor versus Normalgewebe.....	24
3.2. Absolute Häufigkeiten der einzelnen Färbegrade .....	26
3.3. Korrelation mit <i>stage</i> und <i>grade</i> .....	28
3.3.1. CD57 versus <i>stage</i> .....	28
3.3.2. CD57 versus <i>grade</i> .....	30
3.4. CD57 versus Tumorrezidiv .....	31
3.5. CD57 versus Tumorrezidiv mit Zeitverlauf .....	32
3.6. Vergleich CD57- versus PSA-Expression .....	33
3.7. Heterogenität von CD57 in Großflächenschnitten.....	36

4. Diskussion.....	38
4.1. CD57 in der Prostata – Vorkommen und Funktion .....	38
4.2. Methodendiskussion .....	41
4.3. Ergebnisdiskussion .....	45
4.3.1. Vorkommen von CD57 im Prostatakarzinom und Vergleich zur PSA- Expression .....	46
4.3.2. Vergleich CD57 in Tumor versus Normalgewebe .....	46
4.3.3. CD57 als Progressionsmarker: Korrelation mit <i>stage</i> .....	47
4.3.4. CD57 als Aggressivitätsmarker: Korrelation mit <i>grade</i> .....	48
4.3.5. CD57 als Prognosemarker: Korrelation mit PSA-Rezidiv.....	50
4.4. Mögliche Nutzbarkeit von CD57 im Prostatakarzinom.....	51
5. Zusammenfassung .....	52
6. Literatur.....	54
7. Abkürzungsverzeichnis.....	61
8. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen .....	62
9. Danksagung .....	64
10. Selbständigkeitserklärung.....	65

## 1. Einleitung

### 1.1. Vorbemerkungen

Nach den aktuellen Zahlen des Robert-Koch-Institutes lag deutschlandweit die Inzidenz des Prostatakarzinoms 2008 bei 63440 Fällen (altersstandardisiert 110,9 pro 100000 EW) mit 12134 krebsbedingten Todesfällen (20,6 pro 100000 EW). Die Inzidenz nahm seit 1999 um 50% (altersstandardisiert um 25%) zu. Damit ist das Prostatakarzinom der häufigste Tumor des Mannes. Es stellt trotz seiner mit 92% guten relativen 5-Jahres-Überlebensrate die dritthäufigste Krebstodesursache dar. Neben der Verbesserung der Früherkennung dürfte auch die Überalterung der Gesellschaft zu einer Zunahme der Inzidenz geführt haben.

95% aller Tumoren der Prostata sind Adenokarzinome. Prostatagewebe wächst androgenabhängig, so dass sich allgemein ohne Androgene auch kein Karzinom entwickelt. Alter, familiäre Vorbelastung und ethnische Zugehörigkeit sind die einzigen gesicherten unbeeinflussbaren Risikofaktoren (Köllermann, Erbersdobler, Sauter 2007). Im zwei- bis mehrreihigen Drüsengewebe der Prostata gibt es mit den Basalzellen, den luminalen Drüsenzellen und wenigen enterochromaffinen Zellen drei Zelltypen. Aus den Basalzellen bzw. Stammzellen gehen die Luminalzellen hervor. Ein morphogenetisches Modell besagt, dass sich ein Karzinom aus Basalzellen durch zunehmende Entdifferenzierung und Verlust von Basalzelleigenschaften entwickelt. Der Verlust der Basalzellschicht ist daher, neben Kernatypien und veränderter Drüsenstruktur, ein wichtiges diagnostisches Kriterium (Totten *et al.* 1953).

Es stehen mit dem Prostataspezifischen Antigen (PSA), der digitalrektalen Untersuchung und verschiedenen bildgebenden Verfahren einige diagnostisch hilfreiche Werkzeuge zur Verfügung. Ein erhöhter PSA-Wert im Serum ist ein Hinweis auf ein mögliches Tumorgeschehen. Die sichere Diagnose des Prostatakarzinoms erfolgt jedoch alleinig durch die pathologische Untersuchung einer Stanzbiopsie oder auch von TURP-Gewebe (transurethrale Resektion der Prostata). Meist kann sie eindeutig gestellt werden.

Dennoch hat sich, insbesondere seit der Einführung der PSA-Reihenuntersuchung zur Früherkennung in den 1980er Jahren, ein doppeltes Dilemma hinsichtlich der Diagnostik und Therapie des Prostatakarzinoms ergeben. Zuvor wurden Prostatakarzinome in der Regel beim älteren Patienten festgestellt und waren zum Diagnosezeitpunkt häufig schon in der digitalrektalen Untersuchung tastbar, mit Symptomen durch die Einengung der prostatistischen Harnröhre verbunden oder gar metastasiert. Durch die bessere Früherkennung wurden wesentlich mehr Fälle und zunehmend auch klinisch inapparente Karzinome bei jüngeren Männern zwischen 50 und 69 Jahren entdeckt.

Es wird mithin eine Vielzahl von „harmlosen“ Karzinomen diagnostiziert, die unter Umständen nie symptomatisch geworden wären – und vorerst häufig auch keiner intensiven Therapie bedürften. Dieses diagnostische Dilemma führt also zu einem therapeutischen. Die Entscheidung für eine Therapieoption wie die radikale Prostatektomie, eine Hormontherapie, Bestrahlung oder eine vorläufige engmaschige Überwachung (*active surveillance*) muss vor allem mit Hilfe von Prognosefaktoren, die in Nomogramme eingehen, getroffen werden (Nam *et al.* 2011). Als solche sind zurzeit Serum-PSA, Gleason-*score* und das Tumorstadium etabliert. Sie haben statistisch in größeren Gruppen eine deutliche, für das Individuum jedoch eine oft begrenzte Aussagekraft (Liu A. *et al.* 2004; Mostofi *et al.* 1992b). Dennoch wird heute wahrscheinlich oft „übertherapiert“, da Instrumente zur differenzierten Prognose fehlen (Albertsen *et al.* 2005).

Die Suche nach weiteren diagnostisch und prognostisch verwertbaren Eigenschaften des Prostatakarzinoms erschien in diesem Licht sinnvoll. Zahlreiche molekulare Gewebemarker und Genmuster sind dahingehend charakterisiert worden und zeigten mitunter viel versprechende Ergebnisse (Kristiansen 2012). Keiner jedoch konnte sich in der Routinediagnostik durchsetzen, was oft auch an einer mangelnden Validierung durch zu kleine untersuchte Fallzahlen lag (Schlomm *et al.* 2007). Für einige der diskutierten molekularen Marker wie p53, Gewebe-PSA oder CD44 ist eine Validierung anhand größerer und gut charakterisierter Kollektive bereits erfolgt (Schlomm *et al.* 2008; Gunia *et al.* 2009; Erbersdobler *et al.* 2009).

In der vorliegenden Arbeit sollte mit CD57 ein weiterer, schon seit langem bekannter Gewebemarker auf seine Expressionscharakteristika im

Prostatakarzinom geprüft werden. CD57 ist ein Zelloberflächenmolekül, das 1981 in einer T-Zell-Kultur durch den monoklonalen Antikörper HNK-1 erstmals detektiert wurde (Abo & Balch 1981). CD57 ist immunhistochemisch anfärbbar. Das Epitop wurde in den daran anknüpfenden Studien auch auf weiteren Geweben gefunden und biochemisch analysiert. Eine prognostische Relevanz für das Prostatakarzinom wurde durch diverse Publikationen nahe gelegt. Der Stand der Forschung soll im Folgenden anhand der für die vorliegende Arbeit relevanten Studien skizziert werden.

## 1.2. CD57 als molekularer Gewebemarker der Prostata – Forschungsstand

### 1.2.1. Begriffsbestimmung

Da die Nomenklatur der Zelloberflächenmoleküle nicht einheitlich ist, existieren parallel folgende Bezeichnungen für das hier untersuchte Antigen, wobei die Unterscheidung zwischen Antigen und Antikörper in der Literatur oft unzureichend erscheint:

**HNK-1** bzw. **NK-1** (*[human] natural killer cells*) nach der Erstbeschreibung (Abo & Balch 1981). Im engeren Sinne ist HNK-1 der eigentliche Antikörper (IgM).

**CD57** (*cluster of differentiation*) nach der Nomenklatur der *Human-Leukocyte-Differentiation-Antigens-Konferenz* (neunte Konferenz von 2010). CD57 ist das HNK-1-Epitop.

**Leu-7** ist der Name des ersten kommerziellen CD57-Antikörpers der Firma Becton Dickinson, Sunnyvale, California.

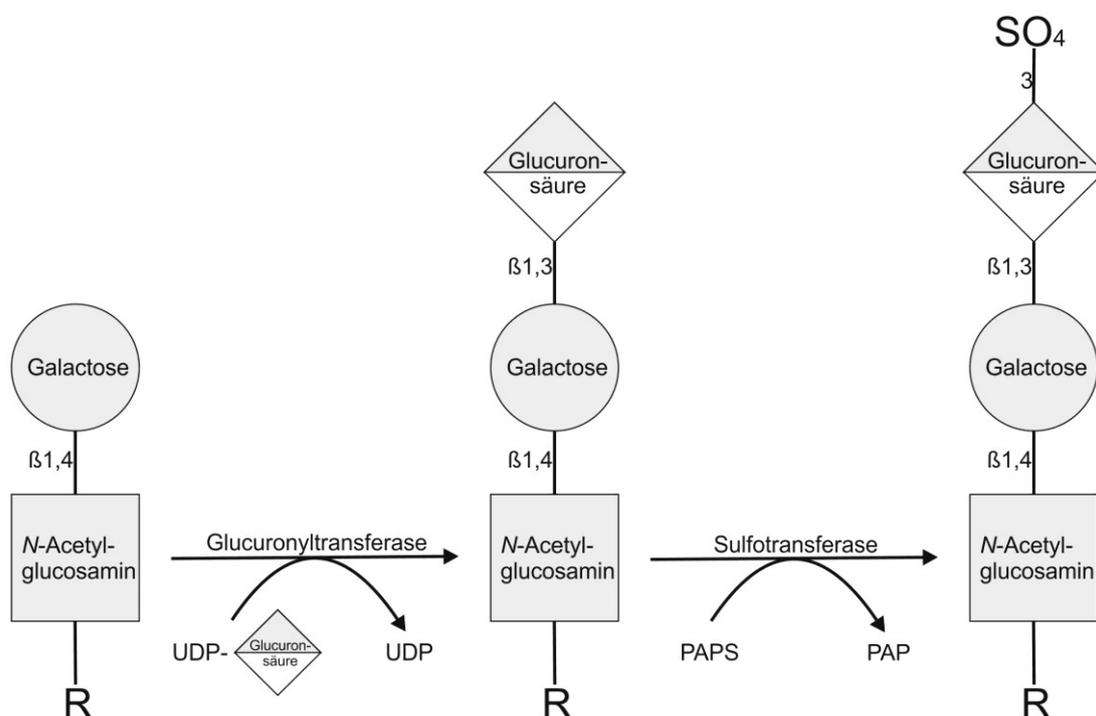
**L-2** ist ein monoklonaler IgG-Antikörper aus Ratten gegen CD57 im Gehirn von Mäusen (Kruse *et al.* 1984).

Im Folgenden werden die Bezeichnungen „CD57“ für das Antigen und, da heute mehrere kommerziell hergestellte Antikörper verfügbar sind, „Anti-CD57“ für den

Antikörper verwendet werden. CD57-positive Zellen sind gemäß der Erstbeschreibung durch ihre Reaktion mit dem HNK-1-Antikörper, einem monoklonalen IgM-Antikörper, definiert.

### 1.2.2. CD57 – Erstbeschreibung und molekulare Struktur

Abo & Balch (1981) stellten einen monoklonalen IgM-Antikörper (HNK-1) gegen ein membranständiges Antigen auf Zellen aus T-Zellkulturen her. Etwa 15% der Lymphozyten aus peripherem Blut waren ebenfalls positiv. Die positive Zellfraktion konnte als NK-Zellen in hoher Reinheit bestimmt werden. B-Zellen, Monozyten, Thrombozyten, Granulozyten und Erythrozyten waren negativ. HNK-1 war der erste Antikörper, der auf NK-Zellen reagierte. Die Zellfunktionen wurden durch seine Bindung nicht eingeschränkt.



**Abb. 1:** Biosynthese von CD57, modifiziert nach Vogel *et al.* (1991) und Focosi *et al.* (2010). UDP: Uridindiphosphat, PAPS: 3'-Phosphoadenosin-5'-Phosphosulfat.

Die Struktur des Epitops ist später beschrieben worden (Ariga *et al.* 1987; Voshol *et al.* 1996). Es handelt sich um eine sulfatierte Kohlenhydratseitenkette. Da bei verschiedenen CD57 unterschiedlicher Herkunft nur die endständige sulfatierte Glucuronsäure übereinstimmt, wird angenommen, dass diese auch hauptverantwortlich für die universale Bindung des Antikörpers HNK-1 ist.

Mindestens zwei verschiedene Glucuronyltransferasen (GlcAT-P bzw. GlcAT-S) und eine Sulfotransferase generieren CD57 intrazellulär (Pedraza *et al.* 1995; Terayama *et al.* 1997; Bakker *et al.* 1997; Seiki *et al.* 1999). Die Beta-1,3-Glycuronyltransferase nimmt in der Synthese eine Schlüsselstellung ein (Kakuda *et al.* 2004) (vgl. Abb. 1). Sie ist am Genort 11q25 codiert (HUGO Gene Nomenclature Committee, <http://www.genenames.org>).

### 1.2.3. CD57 – Vorkommen im humanen Gewebe

CD57 kommt auf einer Vielzahl von Zelltypen und Oberflächenproteinen vor (vgl. Tab. 1). So findet es sich an Glycoproteinen, Proteoglycanen und Glycolipiden. Seine exakte Funktion ist gleichwohl unklar und scheint vielfältig. Cebo *et al.* (2002) konnten zeigen, dass CD57 als Bestandteil des Glycoproteins gp130, einem Teil des IL-6-Rezeptors, zur Bindung und Signaltransduktion von IL-6 beiträgt. Häufig ist CD57 aber auch Bestandteil und Bindungspartner bei für Zellkontakte verantwortlichen Proteinen (Keilhauer *et al.* 1985) wie Contactin, MAG (*myelin associated glycoprotein*), ICAM5 (*intercellular adhesion molecule*, Oka 1998) oder P0 (Bestandteil des Myelins, Burger *et al.* 1990; van den Berg *et al.* 1990). Demnach dürfte CD57 vermutlich in der Zellproliferation und -differenzierung sowie im Wachstum von Axonen eine Rolle spielen (Riopelle *et al.* 1986; Vogel *et al.* 1991; Focosi *et al.* 2010). Beispielsweise ist CD57 im embryonalen Nagerhirn maximal exprimiert und nimmt dort nach der Geburt kontinuierlich ab (Prasadarao *et al.* 1990; Yagi *et al.* 2010). Auch für die Nieren konnte eine entwicklungsabhängige Expression von CD57 nachgewiesen werden (Caillaud *et al.* 1984).

**Tab. 1:** Vorkommen von CD57 in Gewebe außer Prostata, modifiziert nach <sup>1</sup>Wahab & Wright (1985). Weitere, tlw. gegensätzliche Angaben aus: <sup>2</sup>Ghali *et al.* (1992); <sup>3</sup>Lipinski *et al.* (1983); <sup>4</sup>May & Perentes (1987); <sup>5</sup>Caillaud *et al.* (1984); <sup>6</sup>Ioachim *et al.* (1994); <sup>7</sup>Bunn *et al.* (1985). (LGL: *large granular lymphocytes*, entsprechen NK; SCLC: *small cell lung cancer*, APUD: *amine precursor uptake decarboxylase system*).

CD57 positiv		CD57 negativ	
Tumor	Normalgewebe	Tumor	Normalgewebe
Neuroblastom <sup>1</sup>	Myelin <sup>1</sup>	Blasenkarzinom <sup>1,4</sup>	Blase <sup>1</sup>
Lunge (SCLC) <sup>1,7</sup>	Niere (Henleschleife) <sup>1</sup>	Nierenzellkarzinom <sup>1</sup>	Colon <sup>1</sup>
Prostata (Adenokarzinom) <sup>1</sup>	Prostata <sup>1</sup>	Colonkarzinom <sup>1</sup>	Lunge <sup>1</sup>
Schilddrüsenkarzinom (follikulär und papillär) <sup>2,4</sup>	Pankreas (Inselzellen) <sup>1</sup>	Brust (Adenokarzinom) <sup>1</sup>	Haut <sup>1</sup>
Ewingsarkom <sup>3</sup>	Lymphknoten (LGL) <sup>1</sup>	Kaposisarkom <sup>1</sup>	Bindegewebe <sup>1</sup>
Medulloblastom <sup>3</sup>	Milz (LGL) <sup>1</sup>	Fibrosarkom <sup>3</sup>	Quergestreifte Muskulatur <sup>1</sup>
Retinoblastom <sup>3</sup>	Nebennierenmark <sup>1</sup>	Liposarkom <sup>3</sup>	Muskulatur <sup>1</sup>
Chorionkarzinom <sup>3</sup>	Magen (Hauptzellen) <sup>1</sup>	Cervix (Adenokarzinom) <sup>3,4</sup>	Blutgefäße <sup>1</sup>
Astrozytom <sup>5</sup>	Schilddrüse <sup>1</sup>	Rektumkarzinom <sup>3</sup>	Leber <sup>1</sup>
Glioblastom <sup>5</sup>	Enterochromaffine Zellen <sup>3</sup>	Pankreaskarzinom <sup>4</sup>	Brust <sup>1</sup>
Oligodendrogliom <sup>5</sup>		Lymphom <sup>5</sup>	Gehirn <sup>1</sup>
Ependymom <sup>5</sup>		Leukämie <sup>5</sup>	respir. Epithel <sup>3</sup>
Meningeom <sup>5</sup>		Adenom <sup>5</sup>	Hoden <sup>3</sup>
Neuroendokrinom (APUD) <sup>5</sup>		Magenkarzinom <sup>5</sup>	
Nephroblastom <sup>5</sup>		Ovarialkarzinom <sup>5</sup>	
		Endometriumkarzinom <sup>5</sup>	
		Lunge (NSCLC) <sup>6,7</sup>	
<i>Färbung schwach/ in wenigen Fällen/ auf Zellmembran beschränkt:</i>			
Melanom <sup>3,4</sup>			
Brust (Adenokarzinom) <sup>4</sup>			
Endometriumkarzinom <sup>4</sup>			
Ovarialkarzinom <sup>4</sup>			
Leber <sup>4</sup>			

Dem Vorkommen im MAG und seiner Rolle in der embryonalen Entwicklung insbesondere des Nervensystems entsprechend ergab sich ein „neurologisches“ Hauptforschungsgebiet zu CD57. Die klinische Bedeutung wird unter anderem in der Regeneration von Nervengewebe, aber auch im Pathomechanismus neurodegenerativer Erkrankungen gesehen. Für nähere Ausführungen zu diesem Forschungsgebiet sei hier jedoch auf die Übersichtsarbeiten von Schachner *et al.* (1995) bzw. Uusitalo & Kivela (2001) verwiesen.

Ein zweites, „immunologisches“ Forschungsgebiet zu CD57 ergab sich aus der Erstbeschreibung als Marker für HNK-Zellen bzw. Lymphozyten. Auch daraus sollen hier nur einige neuere Erkenntnisse skizziert werden. Im Übrigen sei als Überblick auf die Arbeit von Focosi *et al.* (2010) verwiesen.

Neben HNK-Zellen ist CD57 unter anderem auch auf T-Zellen (CD8<sup>+</sup>, auch CD4<sup>+</sup> und CD3<sup>+</sup>) zu finden. Es scheint mit dem Alter sowie bei chronischen Erkrankungen vermehrt CD57-positive Zytotoxische T-Zellen zu geben, die allerdings nicht mehr proliferieren und funktionell eher einem immunologischen Gedächtnis zugeordnet werden. Viele dieser Zellen sind anfälliger für Apoptose als Zellen ohne CD57. Es kann daher als Marker für eine „klonale Erschöpfung und proliferative Instabilität“ bei Virusinfektionen wie HIV oder hämatologischen Tumorerkrankungen verwendet werden (Brenchley *et al.* 2003; Wood *et al.* 2009; Focosi *et al.* 2010). Die exakte Funktion von CD57 bleibt aber auch hier vorerst ungeklärt.

Nach der Erstbeschreibung an NK-Zellen 1981 wurde der CD57-Antikörper an vielen weiteren Geweben getestet. Wie erwähnt, fand sich CD57 in Geweben des Nervensystems (Lipinski *et al.* 1983; McGarry *et al.* 1983; Schuller-Petrovic *et al.* 1983). Auch weitere Gewebe und Tumoren neuroektodermalen Ursprunges wie neuroendokrine Zellen des Gastrointestinaltraktes, die Nebenniere, Schwannzelltumoren oder das kleinzellige Bronchialkarzinom ließen sich für CD57 anfärben (Lipinski *et al.* 1983; Caillaud *et al.* 1984; Shioda *et al.* 1984; Bunn *et al.* 1985; Cooper *et al.* 1990) (vgl. Tab. 1).

Das Vorkommen von CD57 in prostatischem Gewebe fällt etwas aus dieser Reihe, weil die Prostata mesenchymalen und nicht neuroektodermalen oder hämatopoietischen Ursprungs ist. Es wurde von Wahab & Wright (1985) bzw. Rusthoven *et al.* (1985) erstmalig beschrieben. Zu dieser Zeit war Serum-PSA in der Krebsdiagnostik noch nicht so etabliert wie heute. Eher wurde die Prostataspezifische Saure Phosphatase (PAP), die heute eine untergeordnete Rolle spielt, als diagnostischer Marker benutzt.

### 1.3. Herleitung der Hypothese

CD57 wird in der Diagnostik heute allenfalls ergänzend zur Markierung neuroendokriner Tumoren oder zur Differenzierung seltener T-Zell-Lymphome verwendet (Dabbs 2006). Aus der bisherigen Forschung zu CD57 in prostatischem

Gewebe ergab sich kein einheitliches Bild. Zusammenfassend könnte CD57 als Marker für diagnostische Zwecke oder auch die Detektion von Metastasen beschrieben werden. Zur Korrelation von Färbeintensität und Differenzierungsgrad bzw. Prognose eines Karzinoms gab es unterschiedliche und zum Teil widersprüchliche Forschungsergebnisse. Auf diese ist in der Diskussion näher eingegangen worden. Zudem waren die bisher analysierten Fallzahlen zu klein, um statistisch signifikante Aussagen treffen zu können (vgl. Tab. 2).

Die Arbeit von Liu X. *et al.* (1995) konnte als bisher einzige die Tauglichkeit von CD57 für die Prognose eines Prostatakarzinoms andeuten (siehe Diskussion). Mit einer zu dieser Studie vergleichbaren Anzahl von Gewebeproben (70) wurde für die vorliegende Arbeit ein kleines Kollektiv, quasi als Pilotstudie, zur Hypothesengenerierung untersucht (siehe Material und Methoden bzw. Ergebnisse). Auch hier konnte wie bei Liu X. *et al.* (1995) das Signifikanzniveau nicht erreicht werden. Daher erschien es als sinnvoll, CD57 in einem deutlich größeren und mit ausführlichen Folgedaten versehenen Kollektiv zu prüfen.

**Tab. 2:** Bisher auf CD57 untersuchte prostatistische Gewebetypen mit Fallzahlen. Auf diese Studien wird in der Ergebnisdiskussion näher eingegangen.

PCa: Prostatakarzinom, BPH: Benigne prostatistische Hyperplasie, PIN: prostatistische intrapitheliale Neoplasie, Met.: Metastase.

Studie	Fallzahl und Gewebetyp
Rusthoven <i>et al.</i> (1985)	1 Fallstudie am PCa und 3 BPH
Wahab & Wright (1985)	60, davon 34 PCa und 5 Met. prostat. Ursprungs
May & Perentes (1987)	21 PCa, davon 2 Met. prostat. Ursprungs
Rubenstein <i>et al.</i> (1989)	28 PCa und 8 BPH
McNeal <i>et al.</i> (1988)	15 PIN
Liu X. <i>et al.</i> (1995)	52 PCa
<b>insgesamt</b>	<b>188</b>

## Hypothese

CD57 ist ein Zelloberflächenmolekül, welches sowohl in gesundem als auch tumorösem Prostatadrüsengewebe gefunden wird. Die Funktion von CD57 im prostatistischen Gewebe ist gleichwohl nicht geklärt. In der vorliegenden Arbeit wurde die Häufigkeit einer CD57-Expression im benignen und malignen Gewebe der Prostata erneut in einem allerdings großen Kollektiv untersucht. Als zu überprüfende Hypothese wurde angenommen, dass mit zunehmender Aggressivität und Entdifferenzierung eines Prostatakarzinoms CD57 weniger stark exprimiert und angefärbt wird. CD57 könnte dadurch als zusätzlicher Marker und Prognosefaktor für das Prostatakarzinom dienen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Gewebe und Patientendaten

Die untersuchten Gewebeschnitte waren unterschiedlicher Provenienz. Insgesamt sechs verschiedene Kollektive wurden untersucht. Die jeweils zugehörigen Patientendaten wie *stage* (Krebsprogression als pT-Stadium), *grade* (Aggressivität als Gleason-score) oder *follow up* (Krebsprognose aus Folgedaten wie Rezidiv) waren in unterschiedlichem Umfang bereits vorhanden und konnten für die Auswertung genutzt werden. Die verwendeten Färbungen waren Hämatoxylin-Eosin (HE) und immunhistochemische Färbemethoden gegen PSA und CD57. Naturgemäß bis auf die Großflächenschnitte lagen alle Gewebeproben in Form von *tissue microarrays* (TMA) vor. Alle Daten waren anonymisiert, jedoch über Eingangsnummern bzw. ihre Position im Koordinatensystem der TMAs eindeutig einem Fall zuordenbar.

Im Folgenden seien die sechs verwendeten Kollektive unter ihrem jeweiligen Arbeitstitel sowie die jeweils vorliegenden Patientendaten näher beschrieben. Die Herstellung des TMA sowie die Färbemethoden sind weiter unten erläutert.

#### 2.1.1. TMA „inzidente Ca“

Dieser TMA enthielt in einem Block 59 Gewebestanzungen zufällig ausgewählter Proben. Das Gewebe stammte aus transurethralen Resektionen der Prostata (TURP), die in den Jahren 1995 bis 2008 in Berlin, Brandenburg und Sachsen durchgeführt worden waren. In der pathologischen Untersuchung des TUR-Materials wurde jeweils ein inzidenten Karzinom diagnostiziert. Bei allen Fällen wurde anschließend eine radikale Prostatektomie durchgeführt, bei der das Karzinom bestätigt und weiter charakterisiert wurde. Als inzident wird ein Karzinom bezeichnet, das als Zufallsbefund bei einer Operation oder Biopsie aus anderem Grund – wie z. B. bei einer benignen Prostatahyperplasie – gefunden

wurde (Mostofi *et al.* 1992a). Es ist in der Regel nicht tastbar, durch Bildgebung nicht nachweisbar beziehungsweise klinisch inapparent.

Der Stanzdurchmesser im TMA betrug 2 mm. Es lagen HE- und CD57-Färbungen vor.

Bekannte Patientendaten dieses TMA:

- Alter des Patienten bei TUR
- Präoperativer PSA-Wert
- *stage*
- *grade*
- Befunde der anschließenden radikalen Prostatektomie

### 2.1.2. TMA „Berlin klein“

Es befanden sich auf diesem TMA in einem Block 70 Gewebestanden von zufällig ausgewählten radikalen Prostatektomien. Diese wurden 2001 bis 2009 an der Berliner Charité durchgeführt. Dieser TMA nimmt insofern eine Sonderstellung ein, als er zum Erlernen der Technik und zur Hypothesengenerierung verwendet wurde. Der Stanzdurchmesser betrug 1,5 mm. Die Gewebeproben lagen in der HE- und der CD57-Färbung vor.

Bekannte Patientendaten dieses TMA:

- Präoperativer PSA
- *stage*
- *grade*
- *follow up*: PSA-Rezidiv (ja/nein, nach wie vielen Monaten)

### 2.1.3. TMA „Berlin groß“

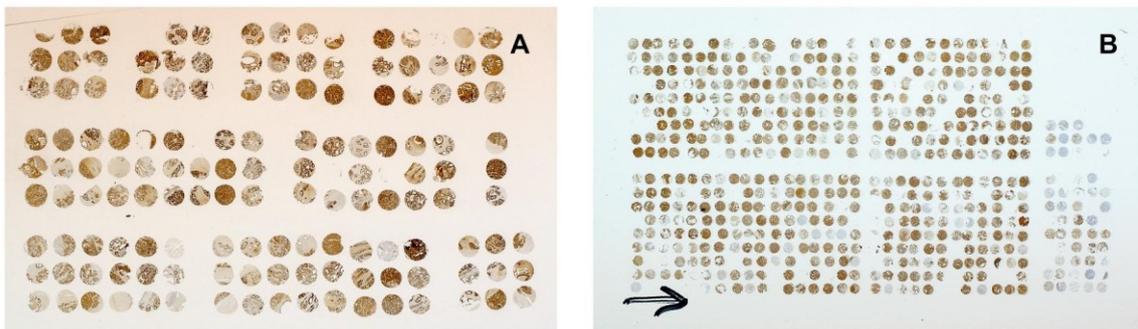
Es stand ein TMA in 20 Blöcken mit insgesamt 970 x 3 Stanzpunkten – pro Prostata 3 Stenzen – zur Verfügung (vgl. Abb. 2). Die Paraffinblöcke wurden am

Pathologischen Institut der Charité Berlin mit Prostatae aus radikalen Prostatektomien der Jahre 1999 bis 2007 angefertigt. Die Proben sind konsekutiv gesammelt worden.

Der Stanzdurchmesser betrug 1,2 mm. Es lagen HE- und CD57-Färbungen vor. An diesem Kollektiv konnten die Färbungen sowohl normalen als auch tumorösen Gewebes bewertet werden, da eine der jeweils drei Stanzen pro Fall aus tumorfreiem Gewebe entnommen worden war.

Bekannte Patientendaten dieses TMA (nicht immer vollständig):

- Jahr der radikalen Prostatektomie
- Präoperativer PSA-Wert
- *stage*
- *grade*
- Rezidiv (ja/nein)



**Abb. 2:** **A:** Ein Objektträger aus dem TMA „Berlin groß“. Pro Prostata sind drei Stanzen zu sehen – hier jeweils übereinander und in insgesamt drei „Reihen“ angeordnet. Die frei gelassenen Spalten dienten der Identifizierung des jeweiligen Objektträgers. **B:** Ein Objektträger aus dem TMA „Hamburg“ (Pfeil diente als Orientierung bei der Auswertung.). Pro Prostata ist ein Stanzpunkt zu sehen. Die Stanzpunkte sind in vier Feldern arrangiert, getrennt durch größere Zwischenräume. Rechts im Bild sind Kontrollproben zu sehen.

Das Größenverhältnis der Stanzpunktdurchmesser (A: 1,2 mm; B: 0,6 mm) ist hier auch in der Vergrößerung wiedergegeben. (Färbung immunhistochemisch mit Anti-CD57.)

#### 2.1.4. TMA „Hamburg“

Es stand ein TMA in 7 Blöcken mit insgesamt 3261 Stanzpunkten und jeweils umfangreichen Patientendaten zur Verfügung. Die Gewebe wurden von Prostatae aus radikalen Prostatektomien, die zwischen 1992 und 2004 an der Urologischen

Abteilung der Universitätsklinik Hamburg Eppendorf stattfanden, konsekutiv gesammelt. Die Herstellung speziell dieses TMA ist beschrieben (Erbersdobler *et al.* 2009).

Der Stanzdurchmesser betrug 0,6 mm. Für jede Prostata gab es nur einen Stanzpunkt. Am Ende eines jeden TMAs befanden sich Kontrollproben anderer Tumorentitäten und von Normalgewebe (vgl. Abb. 2). Es lagen HE-, PSA- und CD57-Färbungen vor.

Bekannte Patientendaten dieses TMA (nicht immer vollständig):

- Patientenalter
- Präoperativer PSA-Wert
- Erfolgte Hormontherapie (ja/nein)
- *stage*
- Lymphknotenstatus
- *grade*
- Tumolvolumen (cm<sup>3</sup>)
- Randstatus (positiv/negativ)
- *follow up*: PSA-Rezidiv (ja/nein, nach wie vielen Monaten)
- Tumor im HE-Schnitt (ja/nein)

#### 2.1.5. TMA „Lymphknoten“

Der TMA bestand aus zwei Blöcken mit insgesamt 94 Stanzen, von denen 87 ausgewertet werden konnten. Weitere Patientendaten lagen nicht vor. In diesem Kollektiv waren Tumorgewebe aus Lymphknoten von Hochrisikopatienten mit zum Diagnosezeitpunkt primär metastasierten Karzinomen zusammengefasst. Die Sammlung dieser Fälle erfolgte in den Jahren 1998-2010, die Anfertigung des TMA erfolgte 2010 an der Charité Berlin. Lymphknotenmetastasen führen in nahezu 100% der Fälle innerhalb von 10 Jahren zu einem Rezidiv oder einer Progression (Epstein *et al.* 1996).

Der Stanzdurchmesser betrug 1,5 mm, angeordnet im Abstand von 2,5 mm. HE- und CD57-Färbungen lagen vor.

### 2.1.6. „Großflächenschnitte“

Durch das Institut für Pathologie der Universität Rostock wurden 12 Flächenschnitte von zufällig ausgewählten Prostatae aus radikalen Prostatektomien zur Verfügung gestellt. Die Prostatektomien erfolgten in den Jahren 2011 und 2012 am Universitätsklinikum Rostock.

Eine Schnittfläche auf je einem Objektträger repräsentiert dabei etwa ein Viertel eines gesamten Querschnitts durch eine Prostata.

Bekannte Patientendaten:

- *stage*
- *grade*

### 2.2. Mikroskopie

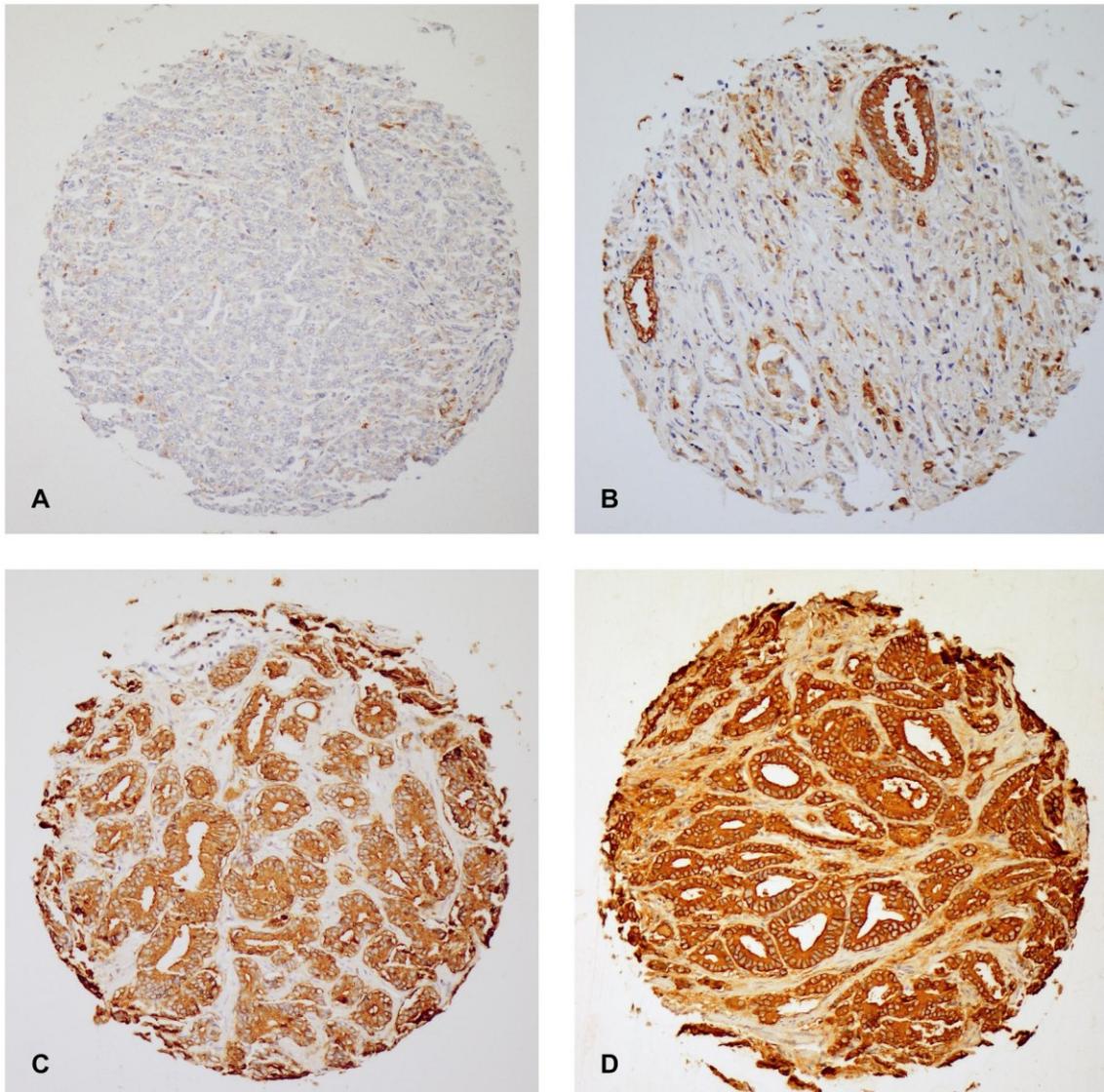
Sämtliche Schnitte wurden an einem Zeiss „Axiostar plus“ untersucht. Die Einweisung und Einarbeitung in die Mikroskopie und Pathologie des Prostatakarzinoms erfolgte durch Herrn Prof. Dr. A. Erbersdobler. Die abgebildeten Fotografien der Gewebeschnitte wurden an einem Olympus BX 51 Mikroskop mit Kameraadapter und einer digitalen Spiegelreflexkamera der Marke Sony Alpha 330 angefertigt.

Die Bewertung der immunhistochemisch gefärbten Gewebe erfolgte semiquantitativ, wobei eine membranös-zytoplasmatische Färbung der Epithelzellen gewertet wurde. Die Maßstäbe zur einheitlichen Erfassung des Färbegrades in allen Kollektiven (CD57 und PSA) sind in Tab. 3 und Abb. 3 wiedergegeben.

Für einige Auswertungen und Grafiken wurden die Färbegrade dichotomisiert. Dabei wurden die Färbegrade 0/1 als „*low*“ und die Färbegrade 2/3 als „*high*“ kategorisiert.

**Tab. 3:** Übersicht Bewertungsschema der immunhistochemischen Färbung (vgl. Abb. 3).

Färbung	Bewertung
Negativ	0
Schwach, oder heterogen mit < 50% positiven Zellen	1
Mittel, oder heterogen mit > 50% positiven Zellen	2
Stark	3



**Abb. 3:** Beispiele aus dem TMA „Hamburg“ zur Bewertung der Färbegrade (vgl. Tab. 3). Färbegrade **A:** 0, **B:** 1, **C:** 2, **D:** 3. Stanzdurchmesser original 0,6 mm. (Färbung immunhistochemisch mit Anti-CD57.)

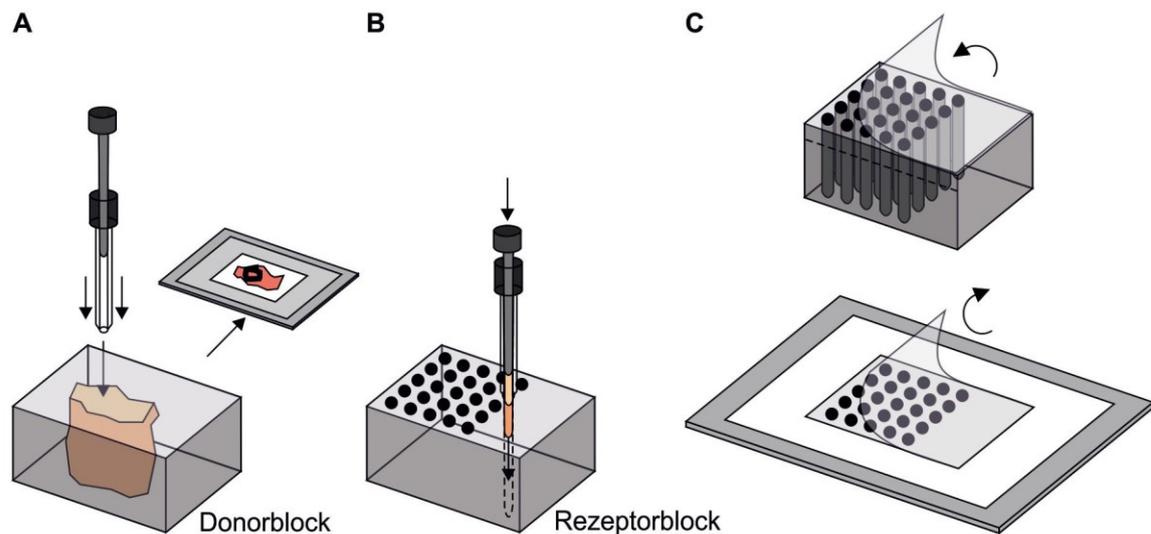
Das Vorhandensein von Tumorzellen respektive deren Abgrenzung von ebenfalls angeschnittenem gesundem Gewebe wurde teils separat an Schnitten der HE-Färbung, teils sukzessive in der immunhistochemischen Färbung erfasst. So konnten die Färbegrade normalen bzw. tumorösen Gewebes unabhängig voneinander bewertet werden. Die Identifizierung von Tumorgewebe wurde in der Vorbereitung bei Prof. Dr. Erbersdobler erlernt. Die Diagnosekriterien des Prostatakarzinoms wie Kernatypien, atypische Drüsenstruktur und Basalzellverlust sind bei Totten *et al.* (1953) bzw. Mostofi *et al.* (1992a) beschrieben.

Eine Sonderstellung nahm die Bewertung der Großflächenschnitte ein. Hier wurde hinsichtlich der Tumorheterogenität und damit der Zuverlässigkeit der TMA-Technik die Fragestellung untersucht, ob und für wie viele Färbegrade es möglich war, mit einer bestimmten Vergrößerung ein Gesichtsfeld mit nur einem Färbegrad einzustellen. Es wurde hierzu die 20er Vergrößerung benutzt, die einem Gesichtsfeld mit 1 mm Durchmesser bzw. 0,79 mm<sup>2</sup> Fläche entsprach.

### 2.3. Prinzip der TMA-Herstellung

Ein TMA vereint in einem oder wenigen Gewebeblöcken das Material von bis zu mehreren tausend Patienten. Durch dieses Prinzip werden die Kosten und der Zeitaufwand für die Färbungen im Vergleich zu Normalschnitten auf einen Bruchteil reduziert. Es können hohe Fallzahlen effizient untersucht und verglichen werden. Grundlage jedes TMA ist die Gewebesammlung des zu untersuchenden Materials in Form von Paraffinblöckchen („Donorblöcke“). Aus diesen werden mit Hilfe einer speziellen Apparatur eine oder mehrere Gewebestanzungen entnommen und in einen „Rezeptorblock“ nach einer zuvor definierten Reihenfolge transferiert (vgl. Abb. 4). Der Rezeptorblock kann eine Vielzahl konsekutiver Schnitte liefern, so dass *in situ* parallel diverse Gewebeeigenschaften untersucht werden können. Die Dicke der hier vorliegenden Schnitte betrug 2-3 µm. Da das Prostatakarzinom sehr heterogen sein kann, wurden bei den hier vorliegenden TMAs vor der Gewebeentnahme per HE-Schnitt identifizierte Indextumorregionen auf dem

Donorblock markiert. Einzelheiten sind in der Literatur beschrieben (Kononen *et al.* 1998; Bubendorf *et al.* 2001; Rubin *et al.* 2002).



**Abb. 4:** Grafik zur TMA-Herstellung (modifiziert nach Kononen *et al.* 1998). Von einem Donorblock wird ein Schnitt zur Identifizierung des Indextumors angefertigt, der infolge gezielt gestanzt wird (A). Die Stanze wird neben vielen anderen in einen leeren Rezeptorblock transferiert (B). Von diesem werden Schnitte angefertigt und mit Hilfe einer Folie auf Objektträger aufgebracht (C).

## 2.4. Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ist heute weit verbreitet, standardisiert und automatisiert. Das Prinzip der Färbung sei hier der Vollständigkeit halber dennoch kurz beschrieben:

Die immunhistochemische Färbung wurde nach der Methode „Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex“ (ABC) durchgeführt (Hsu *et al.* 1981). Bei dieser indirekten Methode wird dem Gewebe zunächst ein erster Antikörper gegen das darzustellende Epitop zugeführt. Wenn der erste Antikörper gebunden hat, wird ein weiterer, mit Biotin markierter Sekundärantikörper gegen dessen Fc-Fragment zugeführt. In einem dritten Schritt wird ein Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex hinzugefügt. Da Avidin, ein Hühnereiweiß, mehrere Biotinmoleküle binden kann, bindet es an das Biotin des Sekundärantikörpers. Die Peroxidase ist ein Enzym, das ein in einem letzten Schritt zugeführtes Chromogen sichtbar macht.

Über Brückenantikörper ist eine Signalverstärkung möglich, so dass auch kleinste Epitopvorkommen spezifisch und sicher nachgewiesen werden können.

Die immunhistochemischen Färbungen erfolgten auf einem Färbeautomaten vom Typ „Autostainer Link 48“ der Firma DAKO.

Es kamen folgende Primärantikörper zur Anwendung:

Anti-CD57: Klon NK-1 (Firma Menarini), Verdünnung 1:10, Vorbehandlung: Proteinase K für 10 min.

Anti-PSA: Klon ErPr8 (Firma DAKO), Verdünnung 1:25, Vorbehandlung: Kochen im Zitratpuffer pH 7,8.

Die Markierung des gebundenen Primärantikörpers erfolgte mit dem „DAKO Envision-Kit“ mit Diaminobenzidin als Chromogen.

## 2.5. Statistik

Statistisch wurden einfache Häufigkeiten berechnet sowie verschiedene Tests durchgeführt:

Mit dem „ $\chi^2$ -Test“ und dem „Exakten Fisher-Test“ wurden Korrelationen verschiedener Variablen der Datensätze bzw. p-Werte berechnet. Das abhängige Patientenüberleben wurde durch Kaplan-Meier-Kurven dargestellt. Verschiedene Überlebenskurven wurden mittels des Logranktests verglichen.

Zur Berechnung wurden die Programme PRISM (Version 2.01, GraphPad, San Diego, CA) und „Statistical Package for Social Sciences“ (SPSS, Version 20.0.0, IBM Corp., Armonk, NY) verwendet. Ein p-Wert  $< 0,05$  wurde als signifikant, ein p-Wert  $< 0,0001$  als hochsignifikant eingestuft.

### 3. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 6394 TMA-*spots* und 12 Großflächenschnitte von insgesamt 4462 Prostatakarzinomen untersucht. Die Expression des CD57-Antigens war in den *spots* von insgesamt 3016 Prostatakarzinomen auswertbar. Aufgrund der unterschiedlichen Qualitäten und Datenlage der sechs Gewebekollektive konnten verschiedene Fragestellungen bearbeitet werden (vgl. Tab. 4).

**Tab. 4:** Übersicht der Fragestellungen zu den einzelnen TMAs.

Fragestellung:	TMA:	inzidente Ca	Berlin klein	Berlin groß	Hamburg	Lymphknoten
1. Vergleich CD57 Tumor vs. Normalgewebe				X		
2. absolute Häufigkeiten Färbegrad 3/2/1/0 im Tumor		X	X	X	X	X
3. Korrelation CD57 mit <i>stage</i> und <i>grade</i>		X	X	X	X	
4. <i>follow up</i> Rezidiv ja/nein und CD57			X	X		
5. <i>follow up</i> Rezidiv ja/nein mit Zeitverlauf					X	
6. Vergleich CD57 mit PSA-Expression					X	

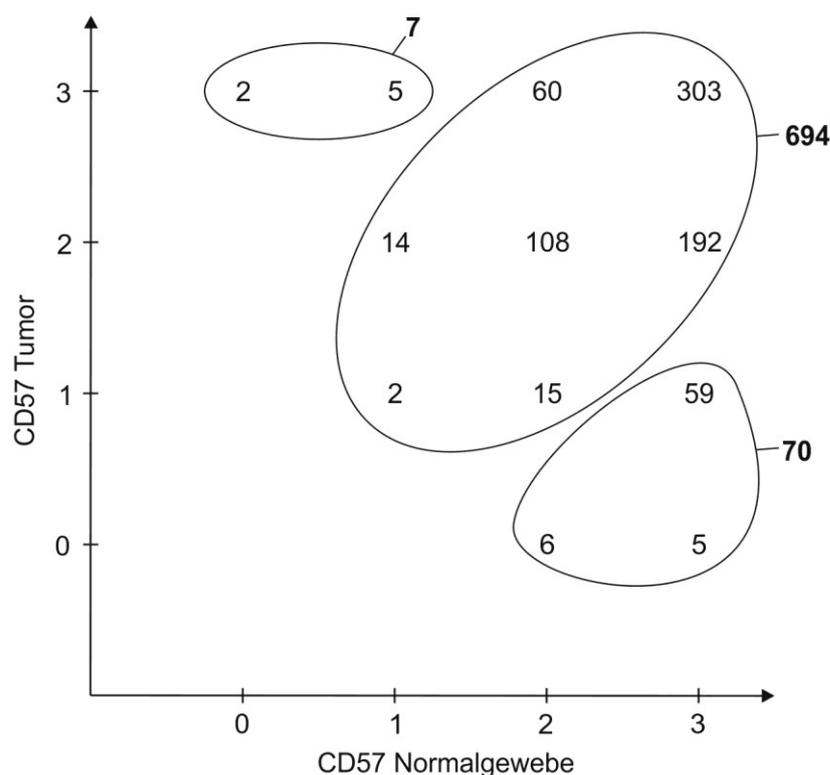
Der Vergleich der Färbung in Tumor und Normalgewebe (Fragestellung 1.) sowie die absoluten Häufigkeiten der unterschiedlichen Färbegrade (2.) konnten das Vorkommen von CD57 im Prostatagewebe charakterisieren. Durch die Korrelationen mit gesicherten Prognosefaktoren wie *stage* und *grade* (3.) und der PSA-Expression (6.) sowie mit dem klinischen Endpunkt „Rezidiv“ (4. & 5.) sollte die Aussagekraft der CD57-Färbung als Marker für das Prostatakarzinom näher bestimmt werden. Als siebte Fragestellung wurden die Großflächenschnitte auf Heterogenität in der CD57-Färbung untersucht.

Das Färbeverhalten von CD57 zeigte sich wie in der Literatur beschrieben (May & Perentes 1987; McNeal *et al.* 1988). Basalzellen und Stroma waren sämtlich CD57-negativ. CD57-positiv zeigten sich ausschließlich die luminalen Epithelzellen.

Enterochromaffine Zellen werden regelmäßig durch Anti-CD57 gefärbt, spielten jedoch durch ihre geringe Anzahl für diese Arbeit keine Rolle. Die Kontrollproben anderer Tumorentitäten im TMA „Hamburg“ waren bis auf vereinzelte Zellen sämtlich CD57-negativ.

### 3.1. Vergleich CD57 in Tumor versus Normalgewebe

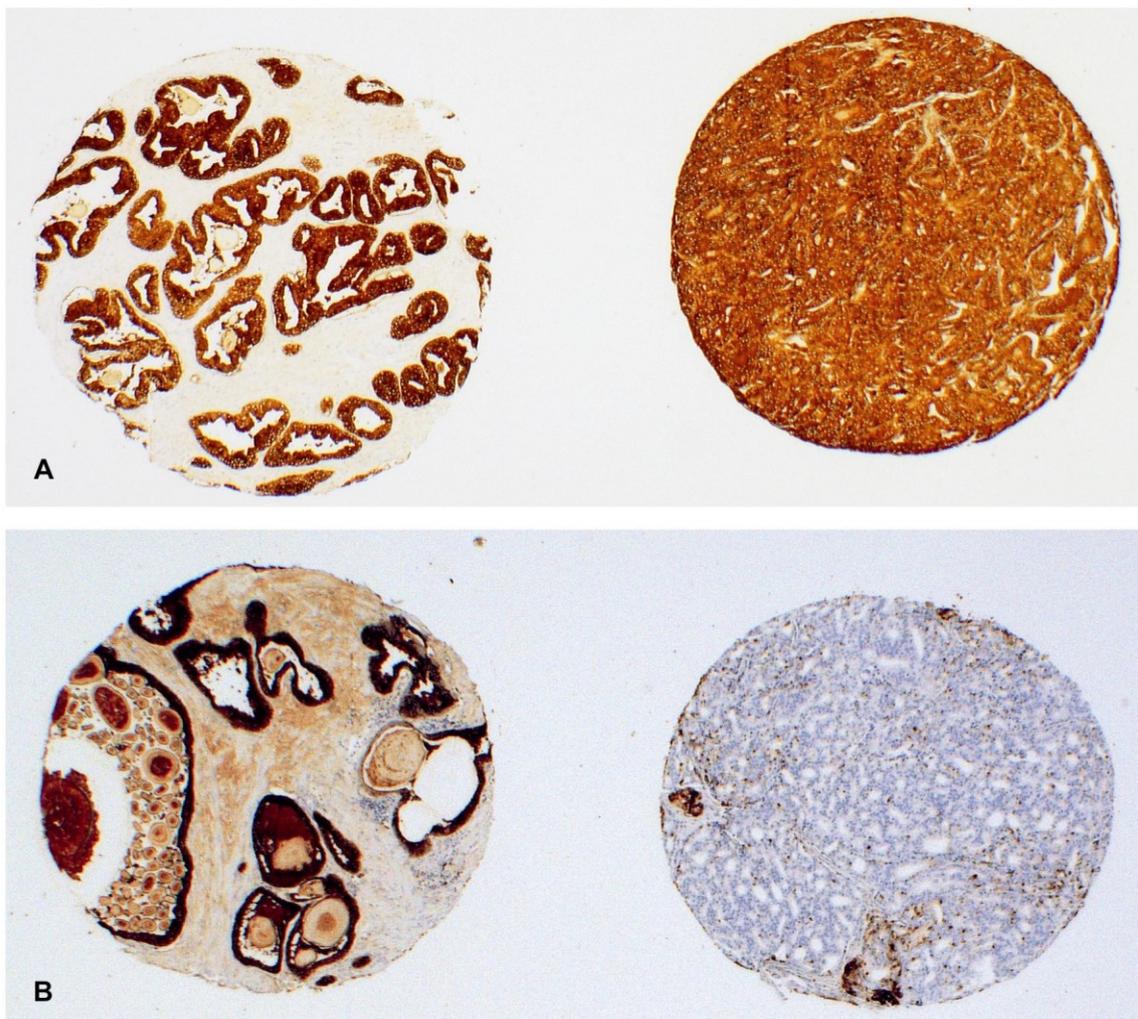
Die grundlegende Fragestellung, ob sich die CD57-Färbung von Tumor und Normalgewebe überhaupt unterscheidet, wurde am TMA „Berlin groß“ untersucht. Würden sich Tumor und Normalgewebe in ein und derselben Prostata hierin nicht deutlich unterscheiden, wäre CD57 als Diagnosemarker nur bedingt dienlich.



**Abb. 5:** TMA „Berlin groß“, Blasendiagramm für absolute Häufigkeiten (Anzahl der Proben) der Färbegrade 0 bis 3 von CD57 in Tumor und Normalgewebe. Die Blasen fassen drei Gruppen zusammen, deren Summe jeweils fett außerhalb der Blase steht: Bei 694 Proben unterschied sich die Färbung um nicht mehr als einen Grad oder war gleich. Bei 70 bzw. 7 Proben war der Unterschied größer als ein Färbegrad (siehe Text).

Es konnten nur Proben ausgewertet werden, die in den jeweils drei Stenzen aus einer Prostata beide Gewebequalitäten zeigten. Aus 970 möglichen Prostatae traf dies für 771 zu. Eine Differenz von mehr als einem Färbegrad – also z. B. Normalgewebe 1 und Tumorgewebe 3 – wurde als deutlicher Unterschied bewertet. Das Blasendiagramm in Abb. 5 veranschaulicht das Gefundene.

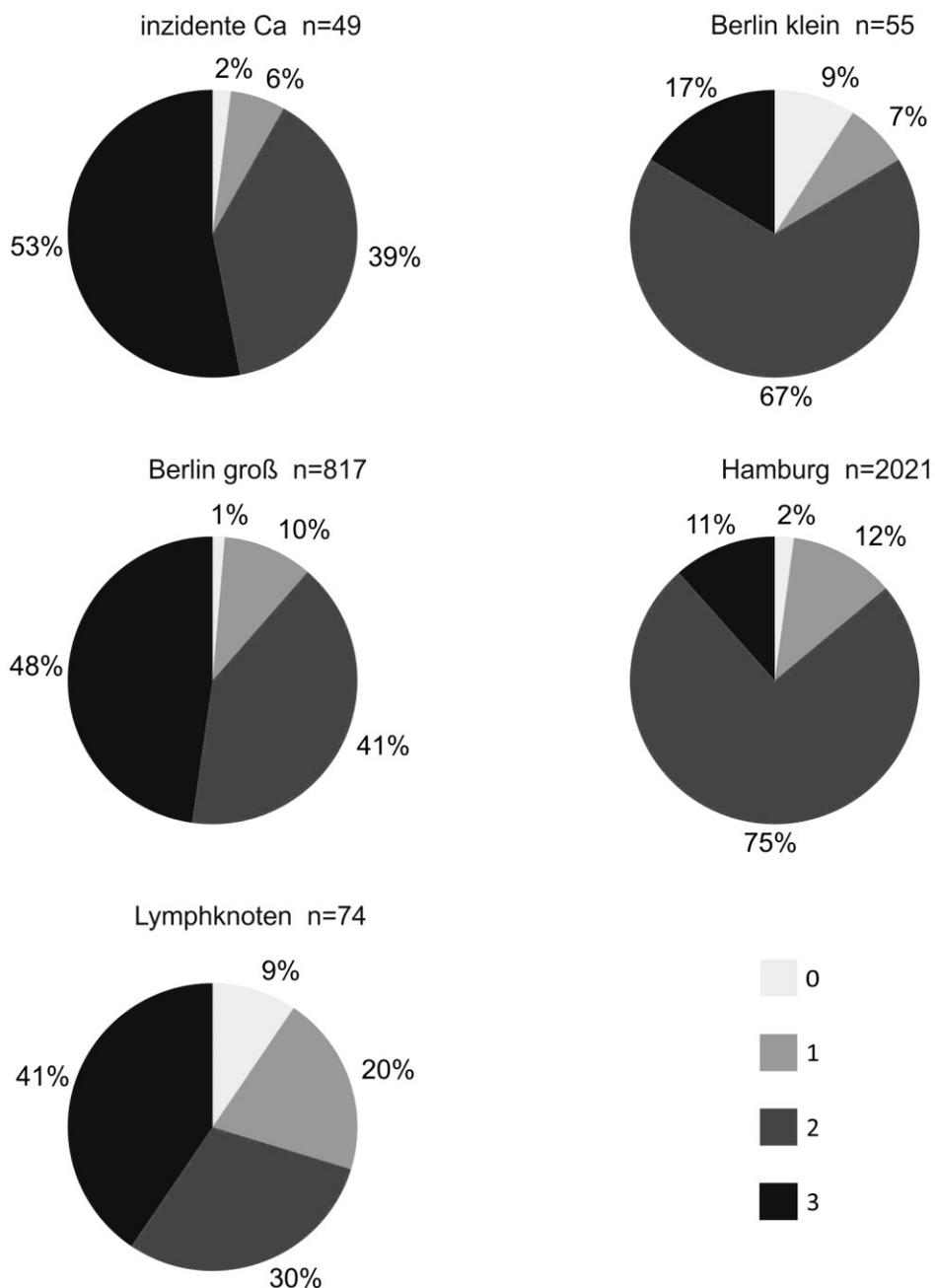
Für 70 Proben war das Normalgewebe mit Färbegrad 2 oder 3 deutlich kräftiger gefärbt als das Tumorgewebe mit 0 oder 1. Für 7 Proben galt das Umgekehrte. Im überwiegenden Anteil von 694 Proben unterschieden sich Tumor und Normalgewebe um nicht mehr als einen Färbegrad (vgl. Abb. 6). Darunter wurden 413 Fälle sogar identisch bewertet. Von diesen waren aber nur 2 für Tumor und Normalgewebe im dichotomisierten Bereich *low* (jeweils Färbegrad 1).



**Abb. 6:** Zu sehen sind zwei Ausschnitte aus dem TMA „Berlin groß“ mit jeweils zwei benachbarten *spots* aus einem Prostataektomiepräparat. **A:** Normalgewebe (links) und Tumorgewebe (rechts), beide CD57-*high*. **B:** Normalgewebe (links) CD57-*high* und Tumorgewebe (rechts) CD57-*low*. Stanzdurchmesser original 1,2 mm. (Färbung immunhistochemisch mit Anti-CD57.)

### 3.2. Absolute Häufigkeiten der einzelnen Färbegrade

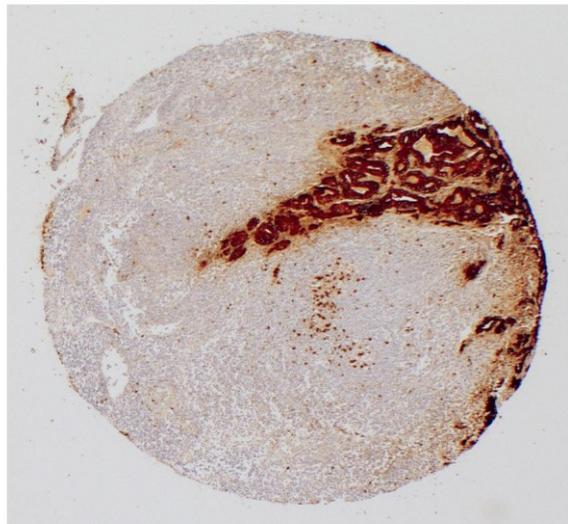
In allen 5 TMAs wurden die absoluten Häufigkeiten der einzelnen Färbegrade im Tumorgewebe ausgezählt. Mit den Kreisdiagrammen in Abb. 7 wurden die prozentualen Häufigkeiten zu jedem TMA dargestellt. In Tab. 5 finden sich dazu die absoluten Werte.



**Abb. 7:** Häufigkeiten der CD57-Färbegrade im Prostatakarzinom. Jedes Kreisdiagramm entspricht einem TMA. Die prozentualen Häufigkeiten nach Tab. 5 sind den einzelnen Sektoren zugeordnet. Die Färbegrade sind von hell- nach dunkelgrau ansteigend 0 bis 3.

**Tab. 5:** Absolute Häufigkeiten der Färbegrade im Tumor. Graphische Darstellung in Abb. 7.  
(n = 3016)

CD57-Färbegrad Tumor:	TMA:	inzidente Ca	Berlin klein	Berlin groß	Hamburg	Lymphknoten
0		1	5	11	43	7
1		3	4	82	238	15
2		19	37	334	1507	22
3		26	9	390	233	30



**Abb. 8:** Beispielbild aus dem TMA „Lymphknoten“. Das Tumorgewebe ist deutlich positiv für CD57. Einzelne Lymphozyten im Normalgewebe des Lymphknotens sind ebenfalls positiv (wahrscheinlich NK-Zellen). Stanzdurchmesser original 1,5 mm. (Färbung immunhistochemisch mit Anti-CD57.)

### 3.3. Korrelation mit *stage* und *grade*

Außer zu den Lymphknotenmetastasen waren zu allen anderen TMAs Daten zu *stage* und *grade* vorhanden. Die Bewertung der CD57-Färbung wurde für diese Korrelation in *low* und *high* dichotomisiert (siehe Material und Methoden). Die Prognose des Prostatakarzinoms wird entscheidend durch die Penetration der Organgrenzen, also den Schritt von einem pT2- zu einem pT3-Tumor, verschlechtert (Wheeler *et al.* 1998). Daher wurde die Färbung in zwei Gruppen – pT2- bzw. pT3/4-Tumoren – getrennt ausgewertet. Analog dazu wurde auch die Bewertung des *grade* mit dem Gleason-*score* in zwei Gruppen geteilt. Als *low grade* galten Werte kleiner oder gleich 3+3, als *high grade* Werte größer 3+3 (Köllermann, Erbersdobler, Sauter 2007; Epstein *et al.* 2005).

Die Ergebnisse sind in den einzelnen Kreuztabellen (Tab. 6-9) und den grafischen Darstellungen aufgeführt (Abb. 9 und 10). Eingeschlossen waren jeweils alle qualitativ auswertbaren Stanzpunkte, die Tumorgewebe enthielten.

#### 3.3.1. CD57 versus *stage*

Als statistisch hochsignifikant zeigte sich nur die Korrelation von CD57 mit *stage* im TMA „Hamburg“. Der Anteil CD57-*low* war in pT3/4-Tumoren mit 23,2% signifikant höher als mit 8,5% in Tumoren, welche die Organgrenzen noch nicht überschritten hatten. Diese Tendenz zeigte sich gleichwohl auch in allen anderen TMAs. Der größte, allerdings statistisch nicht signifikante Unterschied fand sich bei den inzidenten Karzinomen. Hier waren in den pT3/4-Tumoren 33,4% CD57-*low* – im Vergleich zu 4,7% in den pT2-Tumoren.

**Tab. 6:** Kreuztabellen CD57 (*high/low*) vs. *stage* (pT). Siehe Text und grafische Darstellung in Abb. 9. Das jeweils verwendete statistische Testverfahren und die p-Werte sind angegeben.

<b>Berlin klein</b> p = 0,279 (exact Fisher)	2+3 <i>high</i>	0+1 <i>low</i>	
pT2	36	4	34
pT3/4	16	5	21
	46	9	<b>55</b>

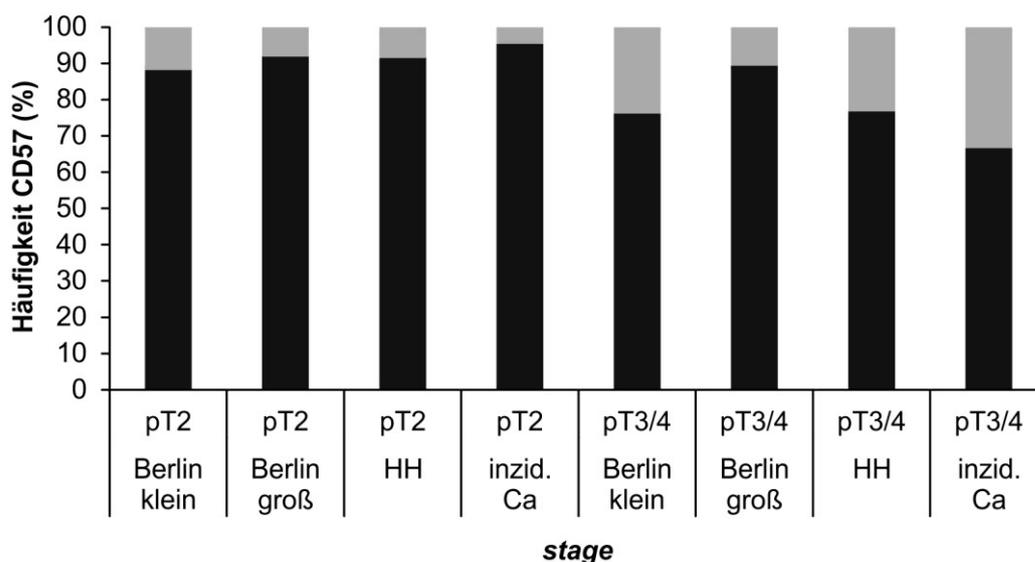
<b>Berlin groß</b> p = 0,307 (X <sup>2</sup> )	2+3 <i>high</i>	0+1 <i>low</i>	
pT2	373	33	406
pT3/4	176	21	197
	549	54	<b>603</b>

<b>Hamburg</b> p < 0,0001 (X <sup>2</sup> )	2+3 <i>high</i>	0+1 <i>low</i>	
pT2	1091	102	1193
pT3/4	555	168	723
	1646	279	<b>1916</b>

<b>inzidente Ca</b> p = 0,068 (exact Fisher)	2+3 <i>high</i>	0+1 <i>low</i>	
pT2	41	2	43
pT3/4	4	2	6
	45	4	<b>49</b>

**Tab. 7:** Datentabelle CD57 vs. *stage* (Prozentwerte zu Abb. 9).

		<b>CD57</b>		
		Anzahl <i>high</i> in %	Anzahl <i>low</i> in %	
<i>stage</i>	pT2	Berlin klein	88,2	11,8
		Berlin groß	92,0	8,0
		Hamburg	91,5	8,5
		inzidente Ca	95,3	4,7
pT3/4	Berlin klein	76,2	23,8	
	Berlin groß	89,3	10,7	
	Hamburg	76,8	23,2	
	inzidente Ca	66,6	33,4	



**Abb. 9:** Korrelation CD57 mit *stage* (Prozentwerte); grau: CD57-*low*, schwarz: CD57-*high*. *Stage* wurde dichotomisiert in pT2 (Organgrenzen respektierend) und pT3/4 (Organgrenzen überschreitend).

3.3.2. CD57 versus *grade*

Die Korrelation von CD57 mit *grade* (Gleason-score) war im TMA „Berlin groß“ und im TMA „Hamburg“ signifikant bzw. hochsignifikant. Der Anteil von CD57-*low* bei *low-grade*-Tumoren zu dem bei *high-grade*-Tumoren betrug 3,8% versus 11,2% („Berlin groß“) bzw. 5,8% versus 19,8% („Hamburg“). Dieser Trend bestätigte sich, allerdings statistisch nicht aussagekräftig, bei den inzidenten Karzinomen, während er sich im TMA „Berlin klein“ umkehrte.

**Tab. 8:** Kreuztabellen CD57 (*high/low*) vs. *grade* ( $\leq/\gt 3+3$ ). Siehe Text und grafische Darstellung in Abb. 10. Das jeweils verwendete statistische Testverfahren und die p-Werte sind angegeben.

<b>Berlin klein</b> p = 0,709 ( <i>exact Fisher</i> )	2+3 <i>high</i>	0+1 <i>low</i>	
$\leq 3+3$	16	4	20
$> 3+3$	30	5	35
	46	9	<b>55</b>

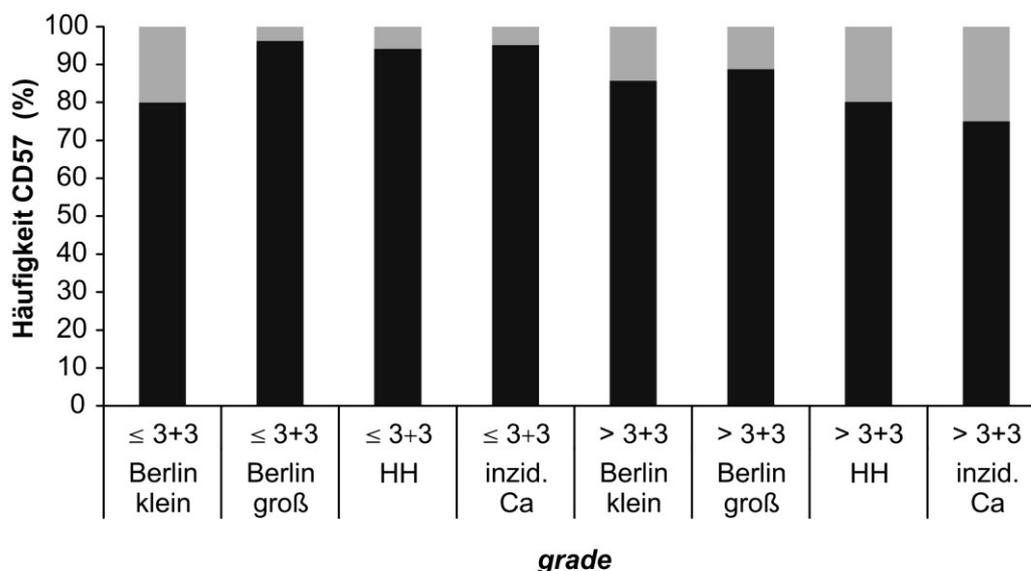
<b>Berlin groß</b> p = 0,0032 ( $\chi^2$ )	2+3 <i>high</i>	0+1 <i>low</i>	
$\leq 3+3$	178	7	185
$> 3+3$	372	47	419
	550	54	<b>604</b>

<b>Hamburg</b> p < 0,0001 ( $\chi^2$ )	2+3 <i>high</i>	0+1 <i>low</i>	
$\leq 3+3$	742	46	788
$> 3+3$	905	224	1129
	1647	270	<b>1917</b>

<b>inzidente Ca</b> p = 0,1195 ( <i>exact Fisher</i> )	2+3 <i>high</i>	0+1 <i>low</i>	
$\leq 3+3$	39	2	41
$> 3+3$	6	2	8
	45	4	<b>49</b>

**Tab. 9:** Datentabelle CD57 vs. *grade* (Prozentwerte zu Abb. 10).

		<b>CD57</b>		
		Anzahl <i>high</i> in %	Anzahl <i>low</i> in %	
<i>grade</i>	$\leq 3+3$	Berlin klein	80,0	20,0
		Berlin groß	96,2	3,8
		Hamburg	94,2	5,8
		inzidente Ca	95,1	4,9
$> 3+3$	Berlin klein	85,7	14,3	
	Berlin groß	88,8	11,2	
	Hamburg	80,2	19,8	
	inzidente Ca	75,0	25,0	



**Abb. 10:** Korrelation CD57 mit *grade* (Prozentwerte); grau: CD57-low, schwarz: CD57-high. *Grade* wurde dichotomisiert in  $\leq 3+3$  und  $> 3+3$ .

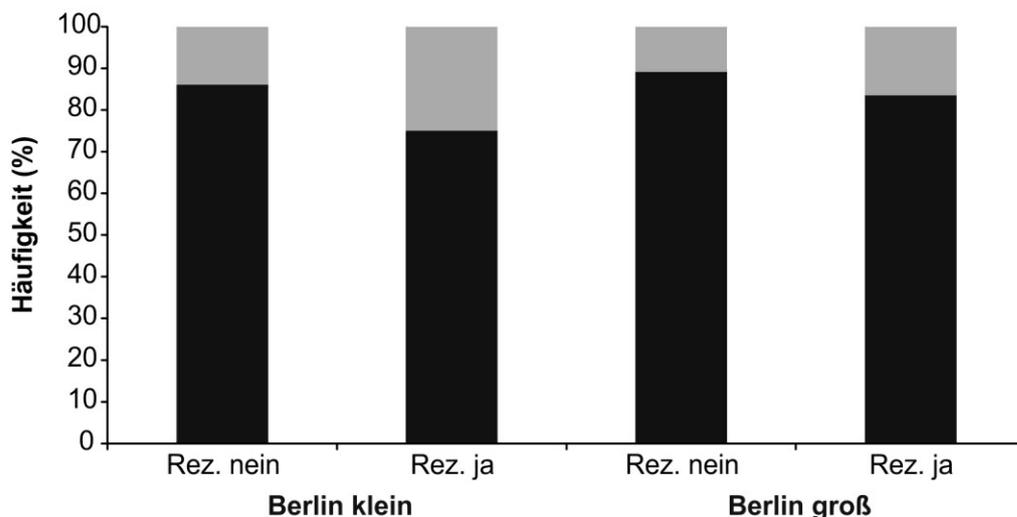
### 3.4. CD57 versus Tumorrezidiv

Es stand die Frage zu beantworten, ob eine Änderung der CD57-Färbeintensität mit einem späteren Tumorrezidiv korrelierte. Jeweils konnten nur Stanzproben ausgewertet werden, die Tumorgewebe enthielten und für die das klinische *follow up* bekannt war. Sowohl im TMA „Berlin groß“ als auch im TMA „Berlin klein“ zeigte sich bei Rezidiven im *follow up* eine Tendenz zu einer geringeren Färbeintensität im Primärtumor (vgl. Tab. 10 und Abb. 11). Diese Ergebnisse waren jedoch statistisch nicht signifikant.

**Tab. 10:** Kreuztabellen CD57 (*high/low*) vs. Rezidiv, grafische Darstellung in Abb. 11. P-Wert und statistisches Testverfahren sind angegeben.

<b>Berlin klein</b> p = 0,3918 (exact Fisher)	2+3 <i>high</i>	0+1 <i>low</i>	
Rez. nein	37	6	43
Rez. ja	9	3	12
	46	9	<b>55</b>

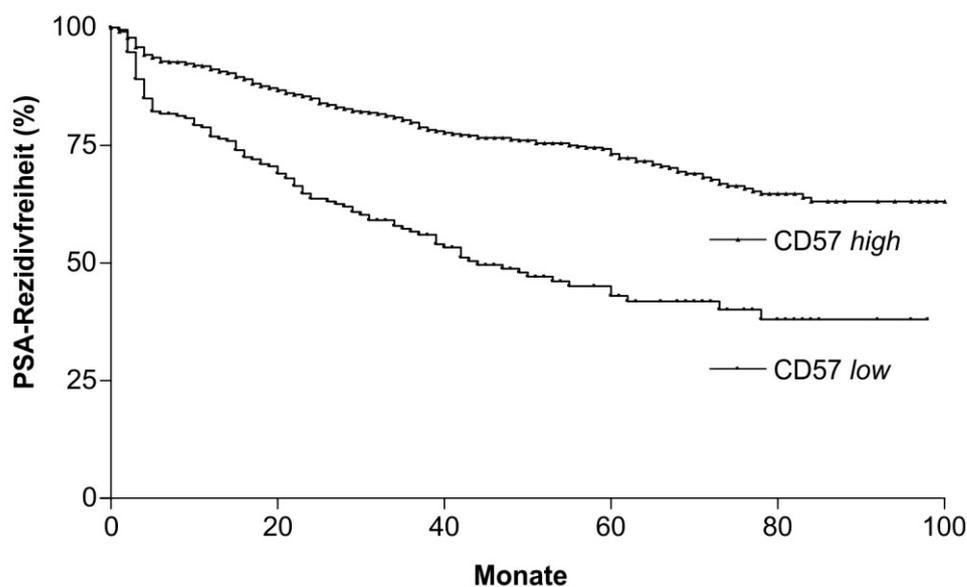
<b>Berlin groß</b> p = 0,1023 ( $\chi^2$ )	2+3 <i>high</i>	0+1 <i>low</i>	
Rez. nein	625	76	701
Rez. ja	81	16	97
	706	92	<b>798</b>



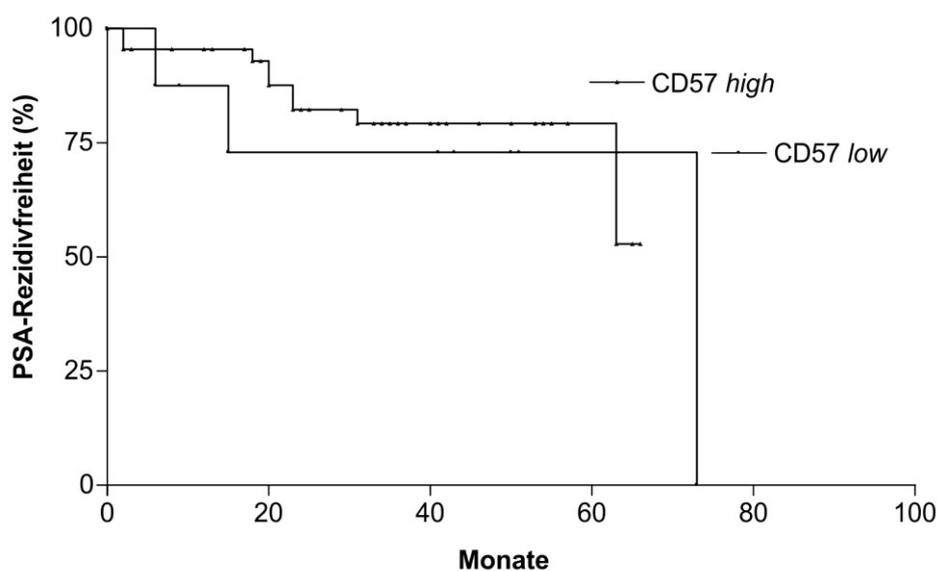
**Abb. 11:** Korrelation CD57 vs. Rezidiv ohne Zeitverlauf; grau: CD57-low, schwarz: CD57-high.

### 3.5. CD57 versus Tumorrezidiv mit Zeitverlauf

Aufgrund der guten Datenlage des TMA „Hamburg“ konnte die Rezidivrate im Zeitverlauf mit der CD57-Färbeintensität im Rahmen einer Kaplan-Meier-Analyse korreliert werden (vgl. Abb. 12). Auch für den TMA „Berlin klein“ lagen Daten im Zeitverlauf vor (vgl. Abb. 13). Ein Tumorrezidiv war dabei als PSA-Rezidiv, das heißt als ein erneuter Anstieg des Serum-PSA nach Prostatektomie, definiert. Die Ergebnisse des TMA „Hamburg“ zeigten hochsignifikant, dass CD57-low mit einer früheren und höheren Rezidivrate verknüpft war. Im TMA „Berlin klein“ zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.



**Abb. 12:** CD57 vs. Rezidiv mit Zeitverlauf, TMA „Hamburg“, n = 1916, Logrank-Test:  $p < 0,0001$ .



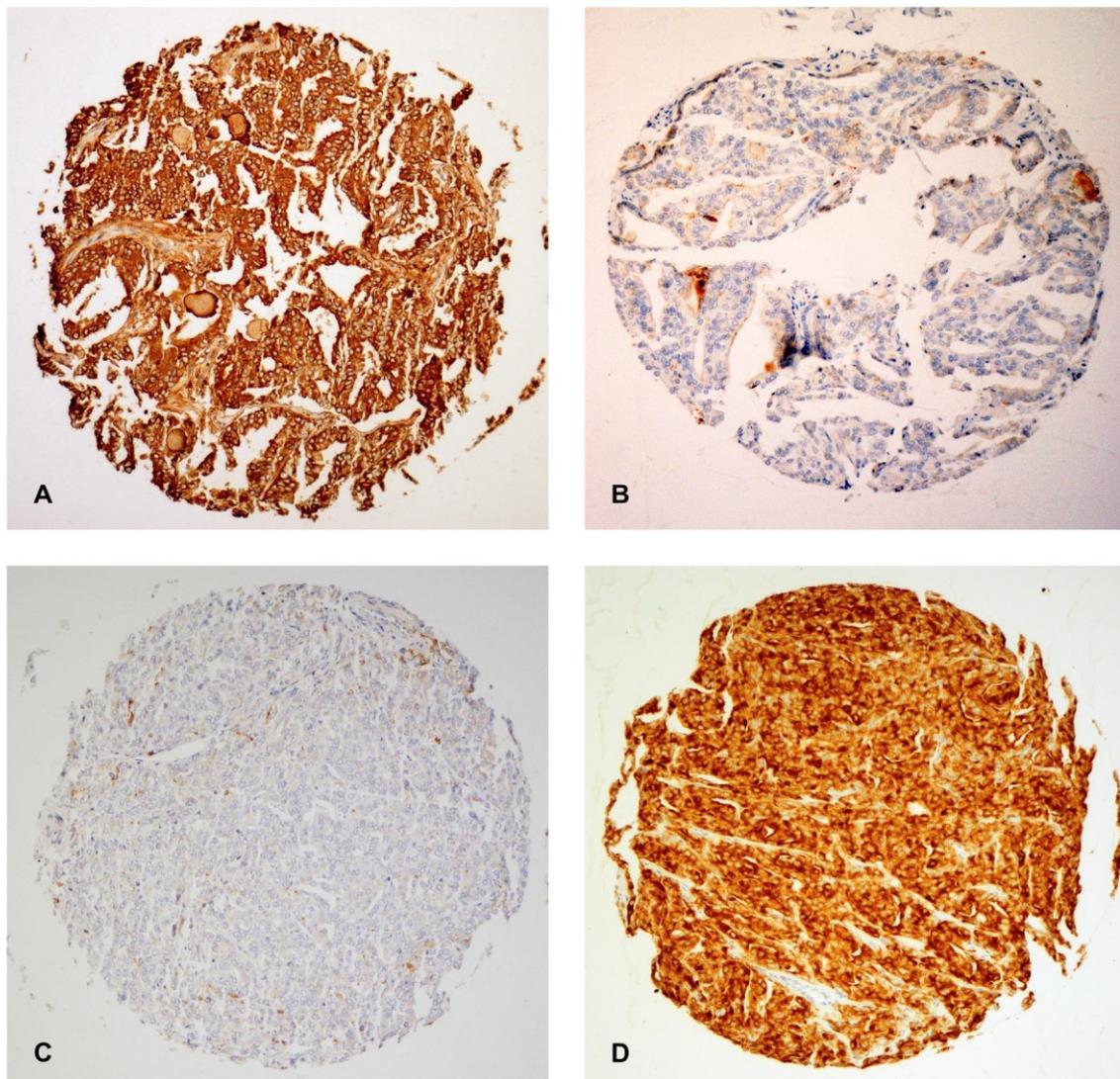
**Abb. 13:** CD57 vs. Rezidiv mit Zeitverlauf, TMA „Berlin klein“, n = 55, Logrank-Test:  $p = 0,09163$ .

### 3.6. Vergleich CD57- versus PSA-Expression

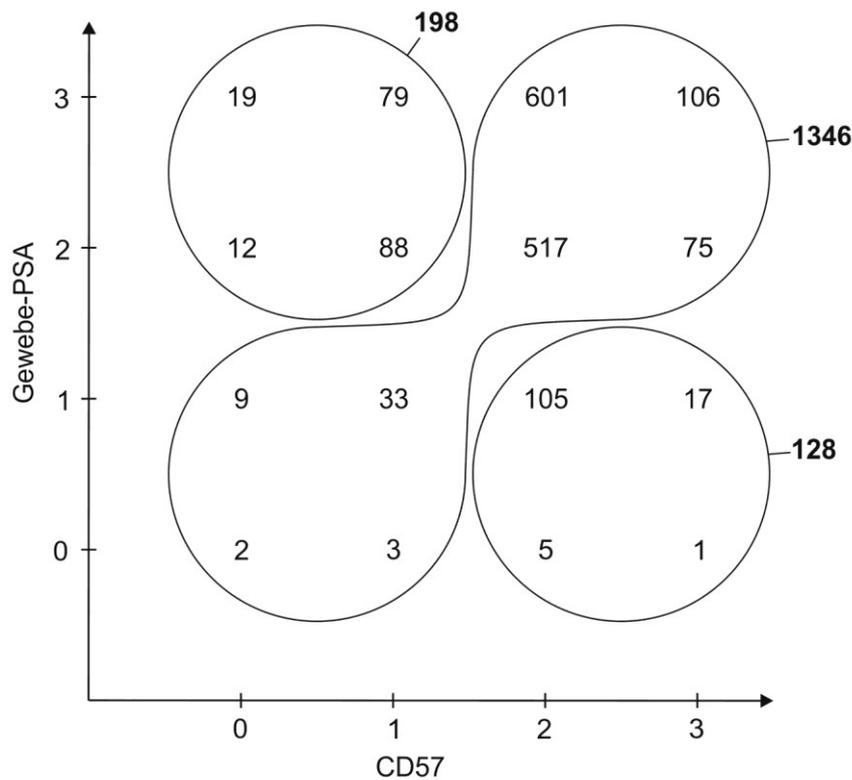
Für die PSA-Expression im prostatistischen Tumorgewebe ist am TMA „Hamburg“ bereits eine prognostische Relevanz nachgewiesen worden (Erbersdobler *et al.* 2009). Daher wurde für den TMA „Hamburg“ die

PSA-Expression erneut bewertet, um eine eventuelle Koexpression mit CD57 zu untersuchen.

In den Vergleich konnten nur die 1672 Datenreihen eingehen, die erstens Tumorgewebe enthielten und zweitens für beide Marker auswertbar waren (vgl. Abb. 14 und 15). Die CD57- und die PSA-Bewertung waren in 1346 Fällen gleich oder fielen dichotomisiert in die gleiche Gruppe. 198 Fälle waren CD57-*low* in Kombination mit PSA-*high*. In dieser Gruppe kam es in 38,9% der Fälle zu einem Rezidiv. 128 Fälle waren CD57-*high* in Kombination mit PSA-*low*. In dieser Gruppe gab es in 27,1% der Fälle ein Rezidiv.

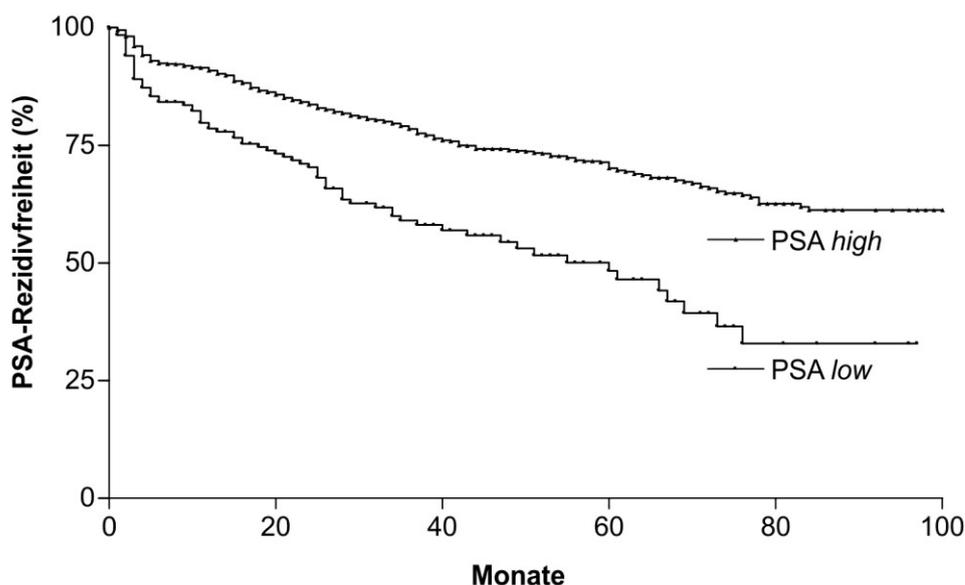


**Abb. 14:** Zu sehen sind zwei korrespondierende *spot*-Paare (A/B bzw. C/D) des TMA „Hamburg“ aus jeweils denselben Prostataktomiepräparaten. Prostata 1: **A:** CD57-*high*; **B:** PSA-*low*. Prostata 2: **C:** CD57-*low*; **D:** PSA-*high*. Stanzdurchmesser original 0,6 mm. (Färbung immunohistochemisch mit Anti-CD57 und Anti-PSA.)



**Abb. 15:** TMA „Hamburg“, Blasendiagramm für absolute Häufigkeiten der PSA- und CD57-Expression nach Färbegraden 0 bis 3 im Tumorgewebe. Die Summen der Blasen sind fett gedruckt. Nach Dichotomisierung in *low* und *high* fielen 1346 Proben in die gleiche Kategorie, 128 waren CD57-*high* und PSA-*low*, 198 waren CD57-*low* und PSA-*high*.

Darüber hinaus konnte ähnlich der Fragestellung 5 für den TMA „Hamburg“ die Korrelation von im Gewebe exprimiertem PSA und PSA-Rezidiv nach Prostatektomie überprüft werden. Eingeschlossen waren alle Stanzpunkte, die Tumorgewebe enthielten und für die die entsprechenden *follow-up*-Daten vorlagen. Dieses Experiment wurde bereits am gleichen TMA durchgeführt (Erbersdobler *et al.* 2009). Die vorliegende Arbeit konnte die damaligen Ergebnisse bestätigen. Im Vergleich zu CD57 zeigte sich ein ähnliches Bild: PSA-*low* war hochsignifikant häufiger und mit einem zeitigeren Rezidiv korreliert als PSA-*high* (vgl. Abb. 16).



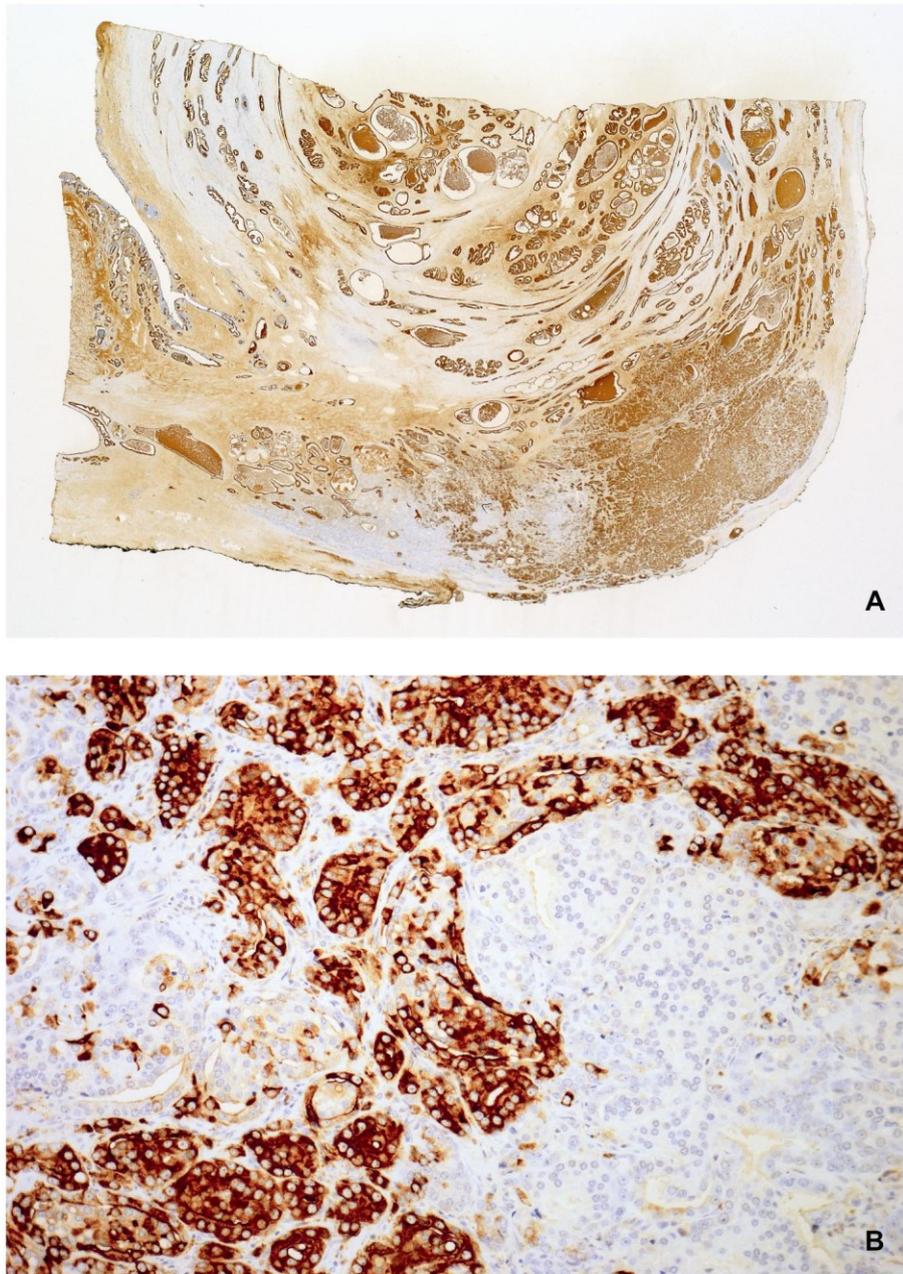
**Abb. 16:** Gewebe-PSA vs. Rezidiv mit Zeitverlauf, TMA „Hamburg“, n = 2562, Logrank-Test:  $p < 0,0001$ .

### 3.7. Heterogenität von CD57 in Großflächenschnitten

Es wurde bestimmt, ob und für welche Färbegrade sich im Mikroskop ein Gesichtsfeld von 1 mm Durchmesser mit einer homogenen Färbung von Tumorgewebe einstellen lässt (vgl. Abb. 17). Dieser Wert lag zwischen den Durchmessern eines *spots* aus dem TMA „Hamburg“ (0,6 mm) und dem TMA „Berlin groß“ (1,2 mm). Die Ergebnisse, ergänzt um *stage* und *grade*, sind in Tab. 11 zusammengefasst.

**Tab. 11:** CD57-Heterogenität in 12 Großflächenschnitten anhand der Einstellbarkeit („X“) eines Gesichtsfeldes mit nur einem Färbegrad.

Objektnr.	CD57-Färbegrade				stage pT	grade
	0	1	2	3		
11282/11			X	X	3a	3+4
11580/11		X	X	X	3b	4+3
527/12	X	X	X		3a	3+4
2773/12				X	2c	3+4
3352/12			X	X	2c	3+3
3541/12		X	X		3b	4+5
4470/12		X	X	X	2c	3+4
4787/12			X	X	3a	4+3
4872/12		X	X	X	3a	3+4
4935/12			X	X	3a	3+4
4970/12	X	X	X		3b	4+3
5040/12		X	X	X	3a	3+4



**Abb. 17:** **A:** Großflächenschnitt in toto (Länge x Höhe original ca. 2 x 1,5 cm), Tumor im der unteren Randzone. **B:** Detail aus A. Die Heterogenität der CD57-Expression ist darin deutlich erkennbar. (Färbung immunhistochemisch mit Anti-CD57.)

## 4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte nicht nur das Vorkommen des Zelloberflächenmarkers CD57 in Normal- und Tumorgewebe der Prostata charakterisiert, sondern auch eine Korrelation von CD57 mit etablierten Parametern wie *stage* und *grade* sowie eine prognostische Relevanz bezüglich eines Tumorrezidivs nachgewiesen werden.

Bislang existierten nur wenige Publikationen, die CD57 in der Prostata untersucht haben. Die Aussagen der dazu vorhandenen Literatur beschränkten sich in der Regel auf Vorkommen und Ausprägung von CD57 in Normal- und Tumorgewebe. Die klinische oder prognostische Relevanz des Markers ist überhaupt erst in einer Studie an vergleichsweise wenigen Fällen untersucht worden (Liu X. *et al.* 1995). Das Besondere der vorliegenden Arbeit ergab sich zum einen aus der großen Anzahl der Proben. Durch die Verwendung von TMAs konnte eine vielfach höhere Probenanzahl (4462 Proben) untersucht werden, als es in allen früheren Studien zusammen (insgesamt 188 Proben) zu CD57 in der Prostata möglich war (Rusthoven *et al.* 1985; Wahab & Wright 1985; May & Perentes 1987; McNeal *et al.* 1988; Rubenstein *et al.* 1989; Liu X. *et al.* 1995; vgl. Tab. 2). Eine zweite Besonderheit stellte die breite Streuung der unterschiedlichen Gewebekollektive dar. Es wurden Tumoren aus Sammlungen zweier großer Prostatakarzinomzentren verwendet. Das Spektrum reichte von Normalgewebe über inzidente Karzinome, klinisch manifeste Karzinome aus radikalen Prostatektomien bis hin zu lymphogen metastasierten Karzinomen. Die Expression von CD57 konnte so für verschiedene Tumorstadien bestimmt werden. In dieser Form und Vollständigkeit ist bisher zu CD57 in der Prostata nicht geforscht worden.

### 4.1. CD57 in der Prostata – Vorkommen und Funktion

CD57 ist ein Zelloberflächenmolekül, das in verschiedenen Geweben des menschlichen Körpers vorkommt. Dabei wird CD57 teilweise nur in bestimmten

Entwicklungsstadien einer Zelle exprimiert (siehe Einleitung). Nach der Erstbeschreibung (Abo & Balch 1981) wurde es 1985 erstmalig auch in der Prostata gefunden (Wahab & Wright 1985; Rusthoven *et al.* 1985).

Rusthoven *et al.* (1985) untersuchten in einer Fallstudie aus Toronto einen differentialdiagnostischen Zufallsfund durch Anti-CD57-Färbung von Knochenmark. Die positiven Zellnester stellten sich als ossäre Metastasen eines Prostatakarzinoms heraus. Infolgedessen überprüfte TURP-Resektate aus benignen Hyperplasien waren ebenfalls CD57-positiv.

Wahab & Wright (1985) legten eine grundlegende Studie zur Färbung mit Anti-CD57 – auch im Vergleich zur PSA-Färbung – in Normal-, BPH- und Tumorgewebe der Prostata vor. Die BPH-Gewebeproben und gut bis moderat differenzierte Karzinome färbten sich am stärksten, während Normalgewebe sehr heterogen mit oft nur vereinzelt angefärbten Zellen reagierte. Bis auf zwei schlecht differenzierte Karzinome, die für CD57 negativ waren, konnte von Wahab & Wright (1985) in allen Proben CD57 nachgewiesen werden.

Für die Prostata galt CD57 der Literatur zufolge also als nicht spezifisch, aber als sehr sensitiv. Deshalb erschien CD57 als Marker für die Herkunftsbestimmung unklarer Metastasen bedingt geeignet (Wahab & Wright 1985; May & Perentes 1987). Die Variabilität der CD57-Färbung bei unterschiedlichen Malignitätsgraden ließ darüber hinaus auch an eine prognostische Relevanz des Markers denken. So wiesen McNeal *et al.* (1988) in prostaticher intraepithelialer Neoplasie (PIN), einer putativen Vorstufe des invasiven Karzinoms, ein unterschiedliches CD57-Färbeverhalten zwischen drei Dysplasiestufen nach. Niedriggradige Dysplasien erschienen im Vergleich zum fleckig gefärbten Normalgewebe homogen. Dysplasien dritten Grades zeigten hingegen eine Abschwächung der Färbung von der Zellmembran ins Innere der Zelle, über eine ausschließlich lineare Färbung der luminalen Seite der Zellen bis hin zum Verlust jeglicher Färbung. McNeal *et al.* (1988) schlussfolgerten, dass ein die Expression von CD57 unterdrückender Mechanismus früh, unter Umständen schon in der dem Karzinom vorangehenden PIN, ausfällt.

Das gegenwärtige Therapiekonzept der „aktiven Überwachung“ (*active surveillance*) eines mutmaßlich niedrig malignen Prostatakarzinoms beruht ebenfalls auf den Annahmen, dass Tumore früh im Grad ihrer Aggressivität

festgelegt sind und heute in frühen Stadien diagnostiziert werden. *Low-grade* Karzinome würden demnach eher gut differenziert bleiben und langsam wachsen, während *high-grade* Karzinome schon initial schlecht differenziert sind. Die alternative Theorie würde bedeuten, dass Prostatakarzinome generell als gut differenzierte Tumore beginnen und erst mit fortschreitender Erkrankung entdifferenzieren.

Dies wirft die Frage nach der Funktion von CD57 in der Prostata und im Prostatakarzinom auf. Diese ist bislang nicht eindeutig geklärt. Erkenntnisse aus Studien an anderen Gewebetypen (siehe auch Einleitung) lassen sich aber möglicherweise übertragen: Erstens wurde CD57 in vielen Fällen als Bestandteil von Proteinen gefunden, die für Zellkontakte verantwortlich sind (Keilhauer *et al.* 1985; Oka 1998; Burger *et al.* 1990; van den Berg *et al.* 1990). Zweitens kann CD57 abhängig vom Entwicklungsstadium in der fetalen Niere (Caillaud *et al.* 1984) und in Nervengewebe (Yagi *et al.* 2010) verstärkt exprimiert werden. Dies dürfte in Phasen der Zellproliferation einen koordinierenden Zusammenhalt des Zellverbandes bewirken. Eine verstärkte CD57-Expression in der Genese bzw. Progression des Prostatakarzinoms könnte also die Regression auf ein früheres Entwicklungsstadium mit erhöhter Zellproliferation bedeuten.

An dieser Stelle sollte auch auf einen möglicherweise durch das Vorhandensein von CD57 begünstigten Expansionsweg hingewiesen werden. So wurde CD57 als Bestandteil von N-CAM (*neural cell adhesion molecule*) in neuronalem Gewebe nachgewiesen (Kruse *et al.* 1984). Auch in der Prostata wurde N-CAM mit Anti-CD57 detektiert. Damit könnte das bevorzugte Wachstum des Prostatakarzinoms entlang von Nervenfaserbündeln und die Penetration der Organgrenzen auf diesem Weg möglicherweise auch auf das gemeinsame Vorkommen von N-CAM in beiden Gewebearten zurückzuführen sein (Lipford & Wright 1991, Kakies *et al.* 2011).

Der Verlust von CD57 und damit der Verlust seiner möglichen Funktion in Zellkontakten andererseits könnte eine lymphogene oder hämatogene Streuung der Tumorzellen begünstigen. Ein Tumorrezidiv nach erfolgreicher Operation würde so durch eine frühe, von einem CD57-Verlust begünstigte, mikroskopische Metastasierung erklärbar.

## 4.2. Methodendiskussion

Mit der vorliegenden Arbeit wurde die Technik des TMA für CD57 in der Prostata erstmals verwendet. Die Technik erlaubt es, ungleich größere Mengen an Gewebeproben wesentlich materialschonender sowie kosten- und zeitsparender zu untersuchen, als dies mit konventionellen Einzelschnitten möglich ist. Aus einem Einzeltumor können mit Hilfe eines TMA bis 1000fach mehr Schnitte produziert werden als mit konventioneller Technik (Camp *et al.* 2008). Darüber hinaus werden in einem TMA hunderte Gewebeproben völlig identisch und zeitgleich geschnitten, gefärbt und ausgewertet. Etwaige Besonderheiten der Färbung betreffen damit alle Proben in gleichem Maße, so dass Differenzen zwischen zwei Tumoren nicht auf unterschiedliche Färbetechniken oder tagesabhängige Schwankungen zurückgeführt werden können. Die Gleichheit der Proben in Form und Größe reduziert subjektive Fehlerquellen bei der Auswertung der Färbungen, die bei konventionellen Schnittpräparaten nie ganz vermieden werden können. Die Methode unterstützt zudem die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse.

Nach der Erstbeschreibung (Wan *et al.* 1987) und vor allem nach Entwicklung einer technisch praktikablen TMA-Erstellung (Kononen *et al.* 1998, Bubendorf *et al.* 2001) etablierte sich der TMA schnell als Werkzeug für Rasteruntersuchungen großer Tumorzahlen auf diverse Marker. Für die Prostata sind mehr als 160 verschiedene Marker bereits mit dieser Technik erforscht worden (Datta *et al.* 2007). Daher erschien die TMA-Technik auch für die hier untersuchte Fragestellung als überaus geeignet.

Da das Prostatakarzinom histopathologisch ein verhältnismäßig heterogener Tumor ist, stellte sich zwangsläufig die Frage, ob eine einzelne Stanze von 0,6 mm Durchmesser pro Tumor für den Tumor als Ganzes aussagekräftig sein kann. Dies war der Durchmesser der meisten Stanzpunkte in dieser Arbeit. Mit dem Grad der Heterogenität steigt auch die Wahrscheinlichkeit, mit einer Stanze nur gesundes Gewebe zu treffen. Zur Abschätzung der Heterogenität des Karzinoms und der CD57-Färbung wurden daher in dieser Arbeit konventionelle Schnittpräparate (Großflächenschnitte) von 12 Prostatakarzinomen angefertigt und gegen CD57 gefärbt. Es wurde überprüft, für welche Färbegrade sich ein homogenes

Gesichtsfeld von 1 mm Durchmesser mikroskopisch einstellen ließ (vgl. Tab. 11). Die Färbegrade „0“ und „3“ konnten nie parallel in einem Gewebeschnitt eingestellt werden. Bei der Dichotomisierung der vier Färbegrade in *low* und *high* waren 5 von 12 Großflächenschnitten in der Kategorie *high* potenziell eindeutig. Dort könnte also ein singulärer Stanzzyylinder für einen Tumor nicht zufällig die falsche Kategorie anzeigen. In der Kategorie *low* war keine potenzielle Eindeutigkeit zu finden. Dort waren Gesichtsfelder aus den Bereichen *low* und *high* zugleich in einem konventionellen Gewebeschnitt nachweisbar. Damit wäre ein „Irrtum“ in der Bewertung anhand nur einer Stanze in einem TMA theoretisch möglich gewesen.

Verschiedene Möglichkeiten, diese Fehlerquelle zu umgehen, sind in der Literatur diskutiert worden. Dazu zählen die Vergrößerung der Stanzfläche, eine höhere Stanzzahl pro Tumor, eine hohe Gesamtzahl an Gewebeproben und die Vorauswahl des zu stanzenden Indextumors. Eine größere Stanzfläche brächte kaum Vorteile, zumal ein Durchmesser von 0,6 mm eine hohe Stanzzahl pro *array* bei geringem Schaden am Donorblock und dennoch ausreichend erhaltener histologischer Information erlaubt (Kononen *et al.* 1998). Es erschien eher vorteilhaft, mehrere Stenzen pro Tumor als *spots* in den TMA einzubetten, um die Genauigkeit zu erhöhen.

Rubin *et al.* (2002) schlugen in einer Studie mit 88 Prostatatumoren zum Vergleich der prognostischen Wertigkeit von Ki67 (Proliferationsmarker) in Standardschnitten und TMA eine optimale Anzahl von 3 bis 4 *spots* pro Tumor vor. Weniger TMA-*spots* vergrößerten die Abweichung vom Standardschnitt, während eine größere Anzahl die Genauigkeit nicht deutlich erhöhte. Im vergleichbar zum Prostatakarzinom ebenfalls heterogenen Mammakarzinom spiegelten zwei Stenzen von 0,6 mm Durchmesser das Ergebnis von konventionellen Schnitten hinreichend wider (Camp *et al.* 2000). Nach Analyse einer entsprechend großen Anzahl von Gewebeproben stimmte das Ergebnis von sogar nur einer Stanze pro Brusttumor in bis zu 95% mit dem von Standardschnitten überein (Torhorst *et al.* 2001).

Offenbar ergibt sich im TMA bei Beachtung einiger Regeln also kein größerer Nachteil aus der Heterogenität eines Tumors. Insbesondere die Vorauswahl des zu stanzenden Indextumors am Standardschnitt durch einen erfahrenen Pathologen und eine hohe Fallzahl wirken ausgleichend (Bubendorf *et al.* 2001).

Beides traf auch für die vorliegende Arbeit zu. Immerhin erklärt sich daraus, warum die Ergebnisse des TMA „Berlin klein“ nicht deutlich und statistisch nicht signifikant waren. Erst höhere Fallzahlen erlaubten statistisch signifikante Aussagen. Die TMA-Methode ist ein Instrument nicht zur Untersuchung und Diagnostik individueller Patienten, sondern großer Gewebekollektive.

Durch die Vorauswahl der Gewebe zeigte sich ein weiterer Vorteil des TMA: Die Möglichkeit der Auswertung durch einen Nichtpathologen. Ein vorab durchlaufenes Training erlaubte eine Bewertung ausschließlich der Tumordrüsen. Zur Überprüfung dienten eine *intra*- und eine *inter-observer*-Validierung. So unterschied sich das Ergebnis des TMA „Berlin klein“ in einer zweiten Bewertung nicht wesentlich von einer in der Trainingsphase durchgeführten ersten Bewertung (*intra-observer*). Die Auswertung der PSA-Expression stellte ebenfalls eine zweite Bewertung dar (*inter-observer*), da derselbe TMA mit derselben Fragestellung bereits in einer anderen Arbeitsgruppe ausgewertet worden war (Erbersdobler *et al.* 2009). Die dort festgestellte prognostische Relevanz von Gewebe-PSA für das Prostatakarzinom fand sich als Validierung der Methode mit vergleichbarem Ergebnis auch in der vorliegenden Arbeit (vgl. Abb. 16).

Allerdings brachte die manuelle Auswertung der TMAs durch nur einen Untersucher verschiedene mögliche Fehlerquellen mit sich. Grundsätzlich wurden alle Stanzpunkte in Unkenntnis der dazu vorhandenen Daten wie *grade* oder *stage* bewertet. Dennoch ermöglichte selbst ein Stanzpunkt mit geringer Fläche die grobe Abschätzung der räumlichen Anordnung der Drüsen und damit auch des *grade*. Das könnte in manchen Fällen zu dem Fehler erster Art geführt haben, dass der Untersucher bei einem anscheinend hohen Gleason-*score* oder einer höheren Aggressivität bei z. B. Metastasen zur Bewertung mit niedrigeren Färbegraden tendierte. Klassische subjektive Bewertungsfehler wie der Haloэффект oder der Kontrasteffect konnten in der Abfolge der vielen Stanzpunkte ebenfalls nicht ausgeschlossen werden. Für all diese Fehlerquellen galt jedoch, dass sie durch eine entsprechend hohe Fallzahl wie in der vorliegenden Arbeit marginalisiert wurden bzw. an der Grundaussage nichts geändert haben dürften. Subjektive Bewertungsfehler hätten durch eine automatisierte Bewertung ausgeschlossen werden können. Ein Automat hätte auch das Farbkontinuum als

solches in einer kontinuierlichen Bewertungsskala abbilden können. Verschiedene automatisierte Bewertungsmethoden mit z. B. Fluoreszenzmarkierung sind entwickelt worden (Giltnane & Rimm 2004; Rubin *et al.* 2004; Descazeaud *et al.* 2006; Camp *et al.* 2008). Allein in der CD57- und der PSA-Färbung hätte aber mit einem Automaten nicht zwischen Normalgewebe und Tumordrüsen unterschieden werden können. Dies war trotz der Vorauswahl der Gewebe in der Regel nötig. Zudem sollte auch eine mögliche praxisnahe Anwendung der CD57-Färbung im Prostatakarzinom überprüft werden.

Die Unterteilung des eigentlich vorgefundenen Farbkontinuums in 4 Färbegrade ging unweigerlich mit einem gewissen Informationsverlust einher. Der gewählte Bewertungsmaßstab der Färbung auf einer Nominalskala von 0 bis 3 entsprach aber den Forschungsstandards (Liu X. *et al.* 1995; Erbersdobler *et al.* 2009). Liu X. *et al.* (1995) beurteilten in der CD57-Färbung sowohl die Anzahl der positiven Zellen (in 4 Stufen) als auch die Färbeintensität (in 3 Stufen). Zwischen beidem ergab sich eine signifikante Korrelation, so dass es legitim erschien, in der vorliegenden Arbeit Intensität und Zellzahl in einem Bewertungsschema zu kombinieren. Das Vorgehen ist weit akzeptiert, da es einfach anzuwenden und hinreichend genau ist (Camp *et al.* 2008). Die Grenze zwischen Färbegrad „2“ und „3“ war oft nicht deutlich. Klar und für eine mögliche praktische Verwendung hilfreich hingegen zeigte sich in der Regel die Grenze zwischen *low* (0+1) und *high* (2+3). Die in der Auswertung der Ergebnisse angewendete Dichotomisierung in diese beiden Kategorien erschien daher sinnvoll. So konnte zwar das kontinuierliche Datenspektrum nicht abgebildet, einer denkbaren klinisch-praktischen Anwendung des Markers aber möglichst nahe gekommen werden.

Eine weitere mögliche Fehlerquelle ergab sich aus der unterschiedlichen Datenqualität der TMAs. Das Prostatakarzinom hat einen langen natürlichen Krankheitsverlauf. Ein optimaler TMA sollte deshalb neben einer hohen Fallzahl insbesondere für eine Aussage zur prognostischen Relevanz eines Markers auch über einen längeren Zeitraum erhobene Folgedaten enthalten (Datta *et al.* 2007). Von den hier untersuchten Kollektiven erwies sich die Datenlage zum TMA „Hamburg“ als am belastbarsten. Die Folgedaten wurden im Vergleich zu den

übrigen TMAs bei mehr Patienten und über einen längeren Zeitraum (1-144 Monate, im Schnitt 34 Monate) erhoben. Darin dürfte der Hauptgrund dafür liegen, dass die Ergebnisse des TMA „Hamburg“ im Vergleich zum TMA „Berlin groß“ deutlicher ausfielen. Alternativ müsste von einem von vornherein unterschiedlichen Patientengut in den beiden Großstädten bzw. von einer leicht unterschiedlichen Behandlungsstrategie ausgegangen werden.

Als letzte Fehlerquelle ist anzuführen, dass die Donorblöcke, die teilweise aus pathologischen Archiven stammten, über die Zeit der Lagerung und Fixierung ihre Antigenität zu einem gewissen Grad eingebüßt haben könnten. Allerdings wurde am Beispiel des Mammakarzinoms nachgewiesen, dass auch 60 Jahre alte Proben ihre Antigenität weitestgehend behielten (Camp *et al.* 2000).

Insgesamt wurde den Forschungsstandards entsprechend verfahren. Die Technik des TMA ist durch zahlreiche Studien erprobt und validiert. Ihre Vor- und Nachteile sowie zu beachtende Grundsätze bei der Anwendung sind hier diskutiert worden. Fehlerquellen wurden weitgehend minimiert, so dass die Ergebnisse belastbar sein dürften.

#### 4.3. Ergebnisdiskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 4462 Prostatakarzinome in der immunhistochemischen Färbung gegen CD57 bzw. PSA untersucht. Es konnte eine statistisch signifikante Korrelation von CD57 mit *stage, grade* und dem PSA-Rezidiv nachgewiesen werden. CD57 kann nach den vorliegenden und im Folgenden eingehender zu diskutierenden Ergebnissen als relevanter Marker für die Identifizierung, Progression und Prognose des Prostatakarzinoms bezeichnet werden.

#### 4.3.1. Vorkommen von CD57 im Prostatakarzinom und Vergleich zur PSA-Expression

CD57 konnte als Marker für die Histogenese des Prostatakarzinoms dargestellt werden. Grundsätzlich konnten jeweils alle 4 Färbegrade in allen TMAs nachgewiesen werden. Insgesamt zeigten von den auswertbaren 3016 Tumoren 22,8% eine starke Färbung (3), 63,6% eine mittelgradige Färbung (2) und 11,4% eine schwache Färbung (1). Nur 2,2% waren komplett negativ (0). Fast alle Karzinome zeigten somit zumindest eine schwache Expression von CD57. Dies steht im Gegensatz zur in aller Regel negativen CD57-Färbung der meisten Adenokarzinome anderer Organe wie Lunge oder Gastrointestinaltrakt (vgl. Tab. 1). Diese Eigenschaft lässt die CD57-Expression als zusätzlichen Marker für die Identifizierung eines Adenokarzinoms als Prostatakarzinom erscheinen, auch wenn CD57 im Gegensatz zum PSA nicht spezifisch für diese Drüse ist.

Bisher verglichen zwei Arbeiten wie auch die vorliegende Arbeit zusätzlich die CD57- mit der PSA-Expression (Wahab & Wright 1985; May & Perentes 1987). Eine obligate Koexpression von CD57 und PSA war schon in diesen Arbeiten ausgeschlossen worden. Eine Kreuzreaktion von Anti-CD57 mit dem PSA-Antigen wurde ebenfalls ausgeschlossen (Wahab & Wright 1985). Die CD57-Färbung und die PSA-Färbung verhielten sich in der vorliegenden Arbeit nicht direkt kongruent zueinander, so dass Fälle mit gleicher PSA-Färbung, Fälle mit stärkerer sowie Fälle mit schwächerer PSA-Färbung im Vergleich zur CD57-Färbung vorkamen.

Diese Unterschiede der CD57-Expression zur PSA-Expression konnten hier mit einer größeren Probenzahl bestätigt werden (vgl. Abb. 15). Bei fehlendem PSA könnte so fallweise die Färbung von CD57 helfen, die Herkunft einer Metastase zu bestimmen.

#### 4.3.2. Vergleich CD57 in Tumor versus Normalgewebe

Der TMA „Berlin groß“ erlaubte den direkten, fallbezogenen Vergleich von Tumor- und Normalgewebe in der CD57-Färbung. Zum größten Teil waren die Färbegrade

in beiden Entitäten so ähnlich, dass sie dichotomisiert in die gleiche Gruppe fielen – in der Regel beide Gewebe mit *CD57-high*. Damit ist CD57 kein sicherer Krebsmarker. Dennoch gab es in 77 von 771 Fällen Unterschiede, die zeigten, dass CD57 durch die Karzinogenese beeinflusst wurde: Die 7 Fälle, in denen der Tumor stärker als das Normalgewebe gefärbt wurde, entsprachen wohl den Beobachtungen in der Literatur, dass CD57 verglichen mit dem heterogen gefärbten Normalgewebe im Tumor zunächst homogener auftritt (McNeal *et al.* 1988; Wahab & Wright 1985). Auch könnten in diesen Fällen die normalen Drüsen atrophisch und deshalb schwächer gefärbt gewesen sein. Dass in 70 Fällen umgekehrt der Tumor mit *low* und das Normalgewebe mit *high* beurteilt wurden, könnte durch eine Entdifferenzierung in der Tumorprogression oder einen initialen Verlust von CD57 erklärt werden.

#### 4.3.3. CD57 als Progressionsmarker: Korrelation mit *stage*

Eine statistisch nicht signifikante Tendenz der Korrelation von CD57 und *stage* war an 52 Gewebeproben bereits nachgewiesen worden (Liu X. *et al.* 1995). Mit den vorliegenden Ergebnissen einer vielfach höheren Fallzahl konnte CD57 als Progressionsmarker für das Prostatakarzinom erstmals statistisch gesichert werden. Ein Fehlen von CD57 war signifikant mit einem höheren Tumorstadium korreliert. Im TMA „Hamburg“ war die Beziehung von *stage* und CD57 hochsignifikant. Parallel zum Tumorstadium nahm ausgehend von den inzidenten Karzinomen über die klinisch manifesten Karzinome der Prostatektomiepräparate bis hin zu den Karzinomen mit Lymphknotenmetastasen die Bewertung 0 oder 1 (*low*) von 8% auf 29% zu. In Kohorten mit fortgeschrittenen Karzinomen waren demnach mehr Zellen zu finden, die CD57 nicht mehr exprimierten.

Das Überschreiten der Organgrenzen durch das Prostatakarzinom, also der Unterschied von pT2 zu pT3/4, stellt den entscheidenden Schritt bei der lokalen Tumorprogression dar und ist mit einer deutlich schlechteren Prognose assoziiert (Wheeler *et al.* 1998). Aus diesem Grund wurden die Tumorstadien in der Auswertung der Tumorkollektive aus den Prostatektomiepräparaten dichotomisiert.

Bisher hatten zwei Arbeiten die CD57-Färbung in Prostatakarzinomen mit unterschiedlichen Malignitätsgraden und Metastasen geprüft (Wahab & Wright 1985; May & Perentes 1987). Dort konnte eine Abschwächung der Färbung in den Metastasen nur vereinzelt, jedoch nicht als Trend gefunden werden. Allerdings wurden dort mit insgesamt 7 Metastasen im Vergleich zur vorliegenden Arbeit nur wenige Gewebe untersucht.

#### 4.3.4. CD57 als Aggressivitätsmarker: Korrelation mit *grade*

CD57 konnte in dieser Arbeit als Marker für die Aggressivität des Prostatakarzinoms charakterisiert werden. Ein Fehlen von CD57 war signifikant mit einem höheren Gleason-*score* des Tumors verbunden. Der Malignitätsgrad, gemessen mit dem Gleason-*score* gilt als der sicherste Prognosefaktor des Prostatakarzinomes (Köllermann, Erbersdobler, Sauter 2007; Epstein *et al.* 2005).

Das Ergebnis dieser Arbeit widerspricht teilweise einer Studie, die eine *stärkere* Färbung gegen CD57 als Korrelat einer höheren Tumoraggressivität interpretierte (Rubenstein *et al.* 1989). Durch die dort im Vergleich zur vorliegenden Arbeit mit 23 Karzinomen deutlich geringere Anzahl an Proben ist das widersprüchliche Ergebnis erklärbar. Zudem wurde die CD57-Färbung auch in der vorliegenden Studie in Karzinomen gegenüber dem heterogenen Normalgewebe zunächst homogener, um mit weiter steigender Aggressivität jedoch wieder abzunehmen.

Mit einer anderen Methode wurden bereits Ergebnisse gefunden, die ebenfalls eine prognostische Relevanz vermuten ließen: Mittels Durchflusszytometrie und mit einer wesentlich geringeren Anzahl an Gewebeproben wurden diverse CD-Moleküle in Prostatagewebe bestimmt (Liu A. *et al.* 1997 und 1999). Die meisten Tumoren hatten in diesen Studien den Basalzellmarker CD44 verloren und zeigten sich CD57-positiv. Innerhalb der prostatistischen Zelllinie schlossen die Autoren auf eine Progression von den Basalzellen (CD57-negativ), die den Stammzellpool für die Luminalzellen (CD57-positiv) beinhalten sollen, hin zu den gut (CD57-positiv) und schließlich den schlecht differenzierten (CD57-negativ) Tumoren. Daraus

wurde eine mögliche prognostische Relevanz von CD57 abgeleitet. Drei Zellkulturlinien von Metastasen waren CD57-negativ (Liu A. 2000).

Mit einem ähnlichen Ansatz wie in der vorliegenden Arbeit untersuchten, wie oben erwähnt, auch Liu X. *et al.* (1995) an einem Kollektiv von 52 Patienten die Korrelation der Intensität der immunhistochemischen CD57-Färbung mit dem histologischen Differenzierungsgrad (*grade*), dem Tumorstadium (*stage*) und dem 5-Jahres-Überleben. Je geringer die Färbeintensität und die Zahl der gefärbten Zellen war, desto signifikant schlechter waren die Karzinome differenziert ( $p < 0,05$ ). Die prognostische Relevanz von CD57 wurde damit durch Liu X. *et al.* (1995) erstmals in Ansätzen, allerdings nur teilweise statistisch signifikant nachgewiesen und blieb in ihrer abschließenden Einschätzung offen.

Aus heutiger Sicht ist zu bedenken, dass 32 der 52 von Liu X. *et al.* (1995) untersuchten Patienten Tumoren in einem metastasierten Stadium hatten und mit einer Orchiektomie in Kombination mit Hormontherapie anstelle einer Prostatektomie therapiert worden waren. Auch waren, verglichen mit den hier vorgelegten Daten, überproportional viele Karzinome *high-grade* (38%) mit dann im gesamten Kollektiv möglicherweise überproportional gering exprimiertem CD57. Das untersuchte Kollektiv war mithin nicht nur klein, sondern auch gewissermaßen zu schlechter differenzierten Karzinomen hin verschoben und somit nicht repräsentativ für die Situation der Prostatakarzinome in Zeiten des PSA-*Screenings*. Heutzutage stellt sich die Frage nach der Tauglichkeit von CD57 zur Prognose vor allem hinsichtlich der Therapieentscheidung bei Tumoren in frühen Stadien. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Gewebekollektive bildeten die aktuelle Lage in der Prostatadiagnostik adäquat ab.

Wir konnten die Ergebnisse aus der Literatur bestätigen und ergänzen: Die Korrelation von CD57 und *grade* war hochsignifikant ( $p < 0,0001$ , TMA „Hamburg“). Lediglich der Pilot-TMA „Berlin klein“ zeigte eine umgekehrte Tendenz in der Korrelation zum *grade*. Auch die Kaplan-Meier-Analyse zum Rezidiv war für diesen TMA nicht aussagekräftig. Dies dürfte an der geringen Fallzahl und der im Verhältnis schlechteren Datenlage dieses Pilot-TMA gelegen haben. Die Bedeutung einer hinreichend hohen Fallzahl für belastbare wissenschaftliche Schlussfolgerungen wird dadurch eindrucksvoll illustriert.

#### 4.3.5. CD57 als Prognosemarker: Korrelation mit PSA-Rezidiv

Wir konnten ohne Zeitverlauf tendenziell und mit Zeitverlauf statistisch signifikant nachweisen, dass ein CD57-Verlust mit einem späteren PSA-Rezidiv nach erfolgter operativer Therapie korreliert. Somit empfiehlt sich CD57 prinzipiell auch als Prognosemarker des Prostatakarzinoms. Einschränkend wären hier die Heterogenität der Färbung und die Tatsache zu berücksichtigen, dass nur wenige Tumoren einen kompletten Verlust der CD57-Expression zeigten. Das PSA-Rezidiv stellte in unserer Untersuchung den vorläufigen klinischen Endpunkt dar. Für die Beurteilung eines Prognosefaktors wäre sicherlich das tumorspezifische Ableben noch besser geeignet. Jedoch war die Erhebung dieses Parameters aufgrund der Größe der hier verwendeten Datenbanken nicht möglich gewesen.

Das 5-Jahres-Überleben wurde bereits in der oben diskutierten Arbeit von Liu X. *et al.* (1995) untersucht: Bei Karzinomen mit mehr als 2/3 gefärbten Zellen war es signifikant besser als bei weniger als 2/3 gefärbten Zellen ( $p < 0,05$ ). Das galt sowohl in der gesamten Studienpopulation als auch speziell in der Gruppe (nicht operierter) metastasierter Tumorstadien.

Etwa 20 - 40% der Patienten bekommen nach der Prostatektomie ein PSA-Rezidiv (Ward & Moul 2005). Der weitere Verlauf kann dennoch langsam sein. Die Prognose ist hier zusätzlich mit Faktoren wie der PSA-Verdopplungszeit oder dem *grade* korreliert (Wirth & Fröhner 2007 bzw. Freedland *et al.* 2005). Nach unseren Ergebnissen war CD57 nicht nur mit einem PSA-Rezidiv, sondern auch statistisch signifikant mit dem *stage* und dem *grade* korreliert. Es darf deshalb angenommen werden, dass CD57 analog zum Gewebe-PSA (Erbersdobler *et al.* 2009) im Vergleich zu den etablierten Parametern kein unabhängiger Prognosefaktor ist. Auf eine multivariate statistische Analyse wurde daher verzichtet.

#### 4.4. Mögliche Nutzbarkeit von CD57 im Prostatakarzinom

Den vorliegenden Ergebnissen zufolge ist CD57 ein Marker für die Histogenese des Prostatakarzinoms, der im Vergleich zum Gewebe-PSA zusätzliche Informationen liefern kann. In Einzelfällen kann dieser Marker hilfreich sein, um die Prostata als Ursprungsort eines metastasierten Adenokarzinoms mit unklarem Primarius (sogenanntes CUP-Syndrom) zu identifizieren. Dies wurde im Institut für Pathologie der Universität Rostock bereits mehrfach praktiziert, ist jedoch als Allgemeinwissen unter Pathologen bislang noch nicht verbreitet (persönliche Mitteilung Prof. Dr. A. Erbersdobler).

Auch wenn CD57 kein ausgewiesener Tumormarker ist, gibt es doch deutliche Veränderungen gegenüber der Färbung im Normalgewebe, die zu Spekulationen hinsichtlich der Bedeutung dieses Moleküls in der Karzinogenese Anlass geben. Daraus könnten sich möglicherweise zukünftig neue Therapieansätze ergeben.

CD57 muss nach unseren Ergebnissen auch als relevanter Marker des Prostatakarzinoms angesehen werden. Seine Expression korreliert mit der Tumorprogression (*stage*), der Tumoraggressivität (*grade*) und der Prognose (Tumorrezidiv nach erfolgter Operation).

Allerdings würde sich CD57 weniger für die Routinediagnostik als für den Einzelfall eignen. Seine Abwesenheit kann zwar ein Hinweis auf ein aggressives Tumorgeschehen sein. Eine starke Färbung schließt dies aber auch nicht aus. Insbesondere in Zusammenschau mit anderen Faktoren wie *stage* und *grade* kann der Verdacht einer ungünstigen Prognose bei Fehlen von CD57 jedoch spezifiziert und untermauert werden. Die schnell verfügbare und kostengünstige Färbung gegen CD57 könnte so von Fall zu Fall z. B. helfen, aus Stanzbiopsien die geeignete Therapie oder nach erfolgter Prostatektomie das Rezidivrisiko abzuleiten.

## 5. Zusammenfassung

Das Adenokarzinom der Prostata ist der häufigste maligne Tumor des Mannes. Durch Vorsorgeuntersuchungen, die auch Frühstadien erfassen, ist die Inzidenz des Karzinoms sprunghaft angestiegen. Nicht jedes Karzinom muss jedoch durch eine radikale Prostatektomie mit all ihren Risiken entfernt werden. Die Wahl zwischen verschiedenen Therapieoptionen kann dabei nur anhand gesicherter Prognosefaktoren erfolgen. Werkzeuge wie *stage*, *grade* oder Serum-PSA wurden hierzu etabliert. Es sind zahlreiche weitere Zellmerkmale erforscht worden, welche die Aussagekraft einer Prognose erhöhen und individualisieren könnten.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, inwieweit das Zelloberflächenmolekül CD57 als relevanter Marker für das Prostatakarzinom geeignet ist. Hierzu wurden 4462 Gewebeproben von verschiedenen Tumorstadien inklusive Lymphknotenmetastasen und von Normalgewebe in *tissue microarrays* und Standardschnitten immunhistochemisch gegen CD57 und als Vergleich gegen Gewebe-PSA gefärbt und lichtmikroskopisch ausgewertet.

CD57 spielt eine Rolle bei Zellkontakten. Es kommt unter anderem auf NK-Zellen, Zellen neuronalen Ursprungs und auch auf Drüsenzellen der Prostata vor. Aufgrund der wenigen bisherigen Forschungsergebnisse konnte vermutet werden, dass CD57 in Prostatakarzinomen unterschiedlicher Aggressivität verschieden stark exprimiert wird. Die mögliche Bedeutung von CD57 in der Karzinogenese eröffnet weitere Forschungsansätze.

Nach den hier vorliegenden Ergebnissen wurde CD57 in prostatistischem Gewebe häufig, heterogen und nicht kongruent zum Gewebe-PSA exprimiert. Im Vergleich zum Gewebe-PSA kann CD57 daher zusätzliche Informationen liefern. Die Zuordnung einer Metastase mit unbekanntem Primärherd (*CUP*) zu einem Prostatakarzinom ist im Falle einer positiven CD57-Färbung wahrscheinlich. CD57 zeigte sich allerdings nicht als sicherer Krebsmarker, da sich die Expression in Tumor- und Normalgewebe eines Individuums in nur 77 von 771 Fällen deutlich unterschied.

Die Expression von CD57 nahm mit höherem Tumorstadium und höherem Gleason-*score* signifikant ab. Sie korrelierte negativ mit einem PSA-Rezidiv

nach Prostatektomie. 13,8% aller Tumore wiesen einen teilweisen oder vollständigen CD57-Verlust auf. Damit zeigte sich CD57 erstmals als ein – wenngleich von den bereits etablierten Parametern wahrscheinlich nicht unabhängiger – Marker für Progression, Aggressivität und Prognose des Prostatakarzinomes.

Schlussfolgernd kann die Abwesenheit von CD57 ein Hinweis auf einen aggressiven Tumor sein, eine starke Färbung schließt dies aber auch nicht aus. Neben der Metastasendiagnostik ist die Färbung gegen CD57 also geeignet, bei fehlender Expression fallweise den Verdacht einer ungünstigen Prognose zu erhärten.

## 6. Literatur

Abo T, Balch CM. A differentiation antigen of human NK and K cells identified by a monoclonal antibody (HNK-1). *Journal of immunology (Baltimore, Md.)* 1981; 127, H. 3: 1024–1029.

Albertsen PC, Hanley JA, Fine J. 20-year outcomes following conservative management of clinically localized prostate cancer. *JAMA : The Journal of the American Medical Association* 2005; 293, H. 17: 2095–2101.

Ariga T, Kohriyama T, Freddo L, Latov N, Saito M, Kon K, Ando S, Suzuki M, Hemling ME, Rinehart KLJ. Characterization of sulfated glucuronic acid containing glycolipids reacting with IgM M-proteins in patients with neuropathy. *The Journal of Biological Chemistry* 1987; 262, H. 2: 848–853.

Bakker H, Friedmann I, Oka S, Kawasaki T, Nifant'ev N, Schachner M, Mantei N. Expression cloning of a cDNA encoding a sulfotransferase involved in the biosynthesis of the HNK-1 carbohydrate epitope. *The Journal of Biological Chemistry* 1997; 272, H. 47: 29942–29946.

Brenchley JM, Karandikar NJ, Betts MR, Ambrozak DR, Hill BJ, Crotty LE, Casazza JP, Kuruppu J, Migueles SA, Connors M, Roederer M, Douek DC, Koup RA. Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8+ T cells. *Blood* 2003; 101, H. 7: 2711–2720.

Bubendorf L, Nocito A, Moch H, Sauter G. Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughput in situ studies. *The Journal of Pathology* 2001; 195, H. 1: 72–79.

Bunn PAJ, Linnoila I, Minna JD, Carney D, Gazdar AF. Small cell lung cancer, endocrine cells of the fetal bronchus, and other neuroendocrine cells express the Leu-7 antigenic determinant present on natural killer cells. *Blood* 1985; 65, H. 3: 764–768.

Burger D, Simon M, Perruisseau G, Steck AJ. The epitope(s) recognized by HNK-1 antibody and IgM paraprotein in neuropathy is present on several N-linked oligosaccharide structures on human P0 and myelin-associated glycoprotein. *Journal of Neurochemistry* 1990; 54, H. 5: 1569–1575.

Caillaud JM, Benjelloun S, Bosq J, Braham K, Lipinski M. HNK-1-defined antigen detected in paraffin-embedded neuroectoderm tumors and those derived from cells of the amine precursor uptake and decarboxylation system. *Cancer Research* 1984; 44, H. 10: 4432–4439.

Camp RL, Charette LA, Rimm DL. Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma. *Laboratory Investigation* 2000; 80, H. 12: 1943–1949.

- Camp RL, Neumeister V, Rimm DL. A decade of tissue microarrays: progress in the discovery and validation of cancer biomarkers. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 2008; 26, H. 34: 5630–5637.
- Cebo C, Durier V, Lagant P, Maes E, Florea D, Lefebvre T, Strecker G, Vergoten G, Zanetta J. Function and molecular modeling of the interaction between human interleukin 6 and its HNK-1 oligosaccharide ligands. *The Journal of Biological Chemistry* 2002; 277, H. 14: 12246–12252.
- Cooper MJ, Hutchins GM, Israel MA. Histogenesis of the human adrenal medulla. An evaluation of the ontogeny of chromaffin and nonchromaffin lineages. *The American Journal of Pathology* 1990; 137, H. 3: 605–615.
- Dabbs D: *Diagnostic Immunohistochemistry*, 2. Aufl.; Churchill Livingstone Elsevier, 2006.
- Datta MW, True LD, Nelson PS, Amin MB. The role of tissue microarrays in prostate cancer biomarker discovery. *Advances in Anatomic Pathology* 2007; 14, H. 6: 408–418.
- Descazeaud A, de la Taille A, Allory Y, Faucon H, Salomon L, Bismar T, Kim R, Hofer MD, Chopin D, Abbou CC, Rubin MA. Characterization of ZAG protein expression in prostate cancer using a semi-automated microscope system. *The Prostate* 2006; 66, H. 10: 1037–1043.
- Epstein JI, Allsbrook WCJ, Amin MB, Egevad LL. The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. *The American Journal of Surgical Pathology* 2005; 29, H. 9: 1228–1242.
- Epstein JI, Partin AW, Sauvageot J, Walsh PC. Prediction of progression following radical prostatectomy. A multivariate analysis of 721 men with long-term follow-up. *The American Journal of Surgical Pathology* 1996; 20, H. 3: 286–292.
- Erbersdobler A, Isbarn H, Steiner I, Schlomm T, Chun F, Mirlacher M, Sauter G. Predictive value of prostate-specific antigen expression in prostate cancer: a tissue microarray study. *Urology* 2009; 74, H. 5: 1169–1173.
- Focosi D, Bestagno M, Burrone O, Petrini M. CD57+ T lymphocytes and functional immune deficiency. *Journal of Leukocyte Biology* 2010; 87, H. 1: 107–116.
- Freedland SJ, Humphreys EB, Mangold LA, Eisenberger M, Dorey FJ, Walsh PC, Partin AW. Risk of prostate cancer-specific mortality following biochemical recurrence after radical prostatectomy. *JAMA : The Journal of the American Medical Association* 2005; 294, H. 4: 433–439.
- Ghali VS, Jimenez EJ, Garcia RL. Distribution of Leu-7 antigen (HNK-1) in thyroid tumors: its usefulness as a diagnostic marker for follicular and papillary carcinomas. *Human Pathology* 1992; 23, H. 1: 21–25.

Giltneane JM, Rimm DL. Technology insight: Identification of biomarkers with tissue microarray technology. *Nature Clinical Practice Oncology* 2004; 1, H. 2: 104–111.

Gunia S, May M, Koch S, Dietel M, Erbersdobler A. Expression of CD44s in incidental prostate cancer is more strongly associated with Gleason scores on subsequent radical prostatectomies than conventional prognostic parameters. *Pathobiology : Journal of Immunopathology, Molecular and Cellular Biology* 2009; 76, H. 6: 286–292.

Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry : Official Journal of the Histochemistry Society* 1981; 29, H. 4: 577–580.

HUGO Gene Nomenclature Committee, <http://www.genenames.org>.

Ioachim HL, Pambuccian S, Giancotti F, Dorsett B. Reactivity of lung tumors with lung-derived and non-lung-derived monoclonal antibodies. *International Journal of Cancer* 1994; 8: 132–133.

Kakies C, Hakenberg OW, Gunia S, Erbersdobler A. Prostate cancer with Paneth cell-like neuroendocrine differentiation and extensive perineural invasion: coincidence or causal relationship? *Pathology, research and practice* 2011; 207, H. 11: 715–717.

Kakuda S, Shiba T, Ishiguro M, Tagawa H, Oka S, Kajihara Y, Kawasaki T, Wakatsuki S, Kato R. Structural basis for acceptor substrate recognition of a human glucuronyltransferase, GlcAT-P, an enzyme critical in the biosynthesis of the carbohydrate epitope HNK-1. *The Journal of Biological Chemistry* 2004; 279, H. 21: 22693–22703.

Keilhauer G, Faissner A, Schachner M. Differential inhibition of neurone-neurone, neurone-astrocyte and astrocyte-astrocyte adhesion by L1, L2 and N-CAM antibodies. *Nature* 1985; 316, H. 6030: 728–730.

Köllermann J, Erbersdobler A, Sauter G: „Pathologie des Prostatakarzinoms“, in: Praxis der Urologie (Bd. II), D. Jocham (Hrsg.), Stuttgart 2007, S. 148ff.

Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nature Medicine* 1998; 4, H. 7: 844–847.

Kristiansen G. Diagnostic and prognostic molecular biomarkers for prostate cancer. *Histopathology* 2012; 60, H. 1: 125–141.

Kruse J, Mailhammer R, Wernecke H, Faissner A, Sommer I, Goridis C, Schachner M. Neural cell adhesion molecules and myelin-associated glycoprotein share a common carbohydrate moiety recognized by monoclonal antibodies L2 and HNK-1. *Nature* 1984; 311, H. 5982: 153–155.

- Lipford GB, Wright GLJ. Comparative study of monoclonal antibodies TURP-27 and HNK-1: their relationship to neural cell adhesion molecules and prostate tumor-associated antigens. *Cancer Research* 1991; 51, H. 9: 2296–2301.
- Lipinski M, Braham K, Caillaud JM, Carlu C, Tursz T. HNK-1 antibody detects an antigen expressed on neuroectodermal cells. *The Journal of Experimental Medicine* 1983; 158, H. 5: 1775–1780.
- Liu AY. Differential expression of cell surface molecules in prostate cancer cells. *Cancer Research* 2000; 60, H. 13: 3429–3434.
- Liu AY, Roudier MP, True LD. Heterogeneity in primary and metastatic prostate cancer as defined by cell surface CD profile. *The American Journal of Pathology* 2004; 165, H. 5: 1543–1556.
- Liu AY, True LD, LaTray L, Ellis WJ, Vessella RL, Lange PH, Higano CS, Hood L, van den Engh G. Analysis and sorting of prostate cancer cell types by flow cytometry. *The Prostate* 1999; 40, H. 3: 192–199.
- Liu AY, True LD, LaTray L, Nelson PS, Ellis WJ, Vessella RL, Lange PH, Hood L, van den Engh G. Cell-cell interaction in prostate gene regulation and cytodifferentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997; 94, H. 20: 10705–10710.
- Liu XH, Zhan B, Tomoyoshi T, Masanori T. Immunohistochemical study of HNK-1 (Leu-7) antigen in prostate cancer and its clinical significance. *Chinese Medical Journal* 1995; 108, H. 7: 516–521.
- May EE, Perentes E. Anti-Leu 7 immunoreactivity with human tumours: its value in the diagnosis of prostatic adenocarcinoma. *Histopathology* 1987; 11, H. 3: 295–304.
- McGarry RC, Helfand SL, Quarles RH, Roder JC. Recognition of myelin-associated glycoprotein by the monoclonal antibody HNK-1. *Nature* 1983; 306, H. 5941: 376–378.
- McNeal JE, Alroy J, Leav I, Redwine EA, Freiha FS, Stamey TA. Immunohistochemical evidence for impaired cell differentiation in the premalignant phase of prostate carcinogenesis. *American Journal of Clinical Pathology* 1988; 90, H. 1: 23–32.
- Mostofi FK, Davis CJJ, Sesterhenn IA. Pathology of carcinoma of the prostate. *Cancer* 1992a; 70, H. 1 Suppl.: 235–253.
- Mostofi FK, Sesterhenn IA, Davis CJJ. Prostatic carcinoma: problems in the interpretation of prostatic biopsies. *Human Pathology* 1992b; 23, H. 3: 223–241.
- Nam RK, Kattan MW, Chin JL, Trachtenberg J, Singal R, Rendon R, Klotz LH, Sugar L, Sherman C, Izawa J, Bell D, Stanimirovic A, Venkateswaran V, Diamandis EP, Yu C, Loblaw DA, Narod SA. Prospective multi-institutional study evaluating the performance of prostate cancer risk calculators. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2011; 29, H. 22: 2959–2964.

- Oka S. Molecular biological approach to functions of telencephalin, a cell adhesion molecule and HNK-1 carbohydrate epitope, which is commonly expressed on cell adhesion molecules in the nervous system. *Yakugaku Zasshi : Journal of the Pharmaceutical Society of Japan* 1998; 118, H. 10: 431–446.
- Pedraza L, Spagnol G, Latov N, Salzer JL. Biosynthesis and regulation of expression of the HNK-1 epitope on myelin-associated glycoprotein in a transfected cell model system. *Journal of Neuroscience Research* 1995; 40, H. 6: 716–727.
- Prasadarao N, Tobet SA, Jungalwala FB. Effect of different fixatives on immunocytochemical localization of HNK-1-reactive antigens in cerebellum: a method for differentiating the localization of the same carbohydrate epitope on proteins vs lipids. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry : Official Journal of the Histochemistry Society* 1990; 38, H. 8: 1193–1200.
- Riopelle RJ, McGarry RC, Roder JC. Adhesion properties of a neuronal epitope recognized by the monoclonal antibody HNK-1. *Brain Research* 1986; 367, H. 1-2: 20–25.
- Rubenstein M, Shaw MW, Ray V, Dubin A, McKiel CF, Guinan P. Application of immunohistologic staining to develop a malignant index to aid in distinguishing benign from malignant prostatic tissue. *The Prostate* 1989; 14, H. 4: 383–388.
- Rubin MA, Dunn R, Strawderman M, Pienta KJ. Tissue microarray sampling strategy for prostate cancer biomarker analysis. *The American Journal of Surgical Pathology* 2002; 26, H. 3: 312–319.
- Rubin MA, Zerkowski MP, Camp RL, Kuefer R, Hofer MD, Chinnaiyan AM, Rimm DL. Quantitative determination of expression of the prostate cancer protein alpha-methylacyl-CoA racemase using automated quantitative analysis (AQUA): a novel paradigm for automated and continuous biomarker measurements. *The American Journal of Pathology* 2004; 164, H. 3: 831–840.
- Rusthoven JJ, Robinson JB, Kolin A, Pinkerton PH. The natural-killer-cell-associated HNK-1 (Leu-7) antibody reacts with hypertrophic and malignant prostatic epithelium. *Cancer* 1985; 56, H. 2: 289–293.
- Schachner M, Martini R, Hall H, Orberger G. Functions of the L2/HNK-1 carbohydrate in the nervous system. *Progress in Brain Research* 1995; 105: 183–188.
- Schlomm T, Erbersdobler A, Mirlacher M, Sauter G. Molecular staging of prostate cancer in the year 2007. *World Journal of Urology* 2007; 25, H. 1: 19–30.
- Schlomm T, Iwers L, Kirstein P, Jessen B, Kollermann J, Minner S, Passow-Drolet A, Mirlacher M, Milde-Langosch K, Graefen M, Haese A, Steuber T, Simon R, Huland H, Sauter G, Erbersdobler A. Clinical significance of p53 alterations in surgically treated prostate cancers. *Modern Pathology* 2008; 21, H. 11: 1371–1378.

- Schuller-Petrovic S, Gebhart W, Lassmann H, Rumpold H, Kraft D. A shared antigenic determinant between natural killer cells and nervous tissue. *Nature* 1983; 306, H. 5939: 179–181.
- Seiki T, Oka S, Terayama K, Imiya K, Kawasaki T. Molecular cloning and expression of a second glucuronyltransferase involved in the biosynthesis of the HNK-1 carbohydrate epitope. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1999; 255, H. 1: 182–187.
- Shioda Y, Nagura H, Tsutsumi Y, Shimamura K, Tamaoki N. Distribution of Leu 7 (HNK-1) antigen in human digestive organs: an immunohistochemical study with monoclonal antibody. *The Histochemical Journal* 1984; 16, H. 8: 843–854.
- Terayama K, Oka S, Seiki T, Miki Y, Nakamura A, Kozutsumi Y, Takio K, Kawasaki T. Cloning and functional expression of a novel glucuronyltransferase involved in the biosynthesis of the carbohydrate epitope HNK-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997; 94, H. 12: 6093–6098.
- Torhorst J, Bucher C, Kononen J, Haas P, Zuber M, Kochli OR, Mross F, Dieterich H, Moch H, Mihatsch M, Kallioniemi OP, Sauter G. Tissue microarrays for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints. *The American Journal of Pathology* 2001; 159, H. 6: 2249–2256.
- Totten RS, Heinemann MW, Hudson PB, Sproul EE, Stout AP. Microscopic differential diagnosis of latent carcinoma of prostate. *A.M.A. archives of pathology* 1953; 55, H. 2: 131–141.
- Uusitalo M, Kivela T. The HNK-1 carbohydrate epitope in the eye: basic science and functional implications. *Progress in Retinal and Eye Research* 2001; 20, H. 1: 1–28.
- van den Berg LH, Sadiq SA, Thomas FP, Latov N. Characterization of HNK-1 bearing glycoproteins in human peripheral nerve myelin. *Journal of Neuroscience Research* 1990; 25, H. 3: 295–299.
- Vogel M, Kowalewski HJ, Zimmermann H, Janetzko A, Margolis RU, Wollny HE. Association of the HNK-1 epitope with 5'-nucleotidase from *Torpedo marmorata* (electric ray) electric organ. *The Biochemical Journal* 1991; 278: 199–202.
- Voshol H, van Zuylen CW, Orberger G, Vliegenthart JF, Schachner M. Structure of the HNK-1 carbohydrate epitope on bovine peripheral myelin glycoprotein P0. *The Journal of Biological Chemistry* 1996; 271, H. 38: 22957–22960.
- Wahab ZA, Wright GLJ. Monoclonal antibody (anti-Leu 7) directed against natural killer cells reacts with normal, benign and malignant prostate tissues. *International Journal of Cancer* 1985; 36, H. 6: 677–683.
- Wan WH, Fortuna MB, Furmanski P. A rapid and efficient method for testing immunohistochemical reactivity of monoclonal antibodies against multiple tissue samples simultaneously. *Journal of Immunological Methods* 1987; 103, H. 1: 121–129.

Ward JF, Moul JW. Rising prostate-specific antigen after primary prostate cancer therapy. *Nature Clinical Practice Urology* 2005; 2, H. 4: 174–182.

Wheeler TM, Dillioglulil O, Kattan MW, Arakawa A, Soh S, Suyama K, Ohori M, Scardino PT. Clinical and pathological significance of the level and extent of capsular invasion in clinical stage T1-2 prostate cancer. *Human Pathology* 1998; 29, H. 8: 856–862.

Wirth M, Fröhner M: „Therapie des lokal begrenzten und lokal fortgeschrittenen Prostatakarzinoms“, in: Praxis der Urologie (Bd. II), D. Jocham (Hrsg.), Stuttgart 2007, S. 155ff.

Wood KL, Twigg HL 3rd, Doseff AI. Dysregulation of CD8+ lymphocyte apoptosis, chronic disease, and immune regulation. *Frontiers in Bioscience : a Journal and Virtual Library* 2009; 14: 3771–3781.

Yagi H, Yanagisawa M, Suzuki Y, Nakatani Y, Ariga T, Kato K, Yu RK. HNK-1 epitope-carrying tenascin-C spliced variant regulates the proliferation of mouse embryonic neural stem cells. *The Journal of Biological Chemistry* 2010; 285, H. 48: 37293–37301.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

APUD	<i>amine precursor uptake decarboxylase system</i>
BPH	Benigne Prostatahyperplasie
Ca	Karzinom
CD	<i>cluster of differentiation</i>
COPD	<i>chronic obstructive pulmonary disease</i>
CUP	<i>cancer of unknown primary site (syndrome)</i>
EW	Einwohner
GlcAT-P/S	Glucuronyltransferase P/S
Gp	Glycoprotein
HE	Hämatoxylin-Eosin
HER2	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
HH	Hamburg
(H)NK	<i>(human) natural killer cells</i>
ICAM	<i>intracellular adhesion molecule</i>
IgG/M	Immunglobulin G/M
IL	Interleukin
Ki-67	„Kiel“-67, ein Proliferationsmarker
LGL	<i>large granular lymphocytes</i>
MAG	<i>myelin associated glycoprotein</i>
N-CAM	<i>neural cell adhesion molecule</i>
(N)SCLC	<i>(non) small cell lung cancer</i>
PAPS	3´-Phosphoadenosin-5´-Phosphosulfat
PIN	Prostatische Intraepitheliale Neoplasie
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
pT	pathologisches Tumor <i>staging</i>
Rez.	Rezidiv
TMA	<i>tissue microarray</i>
TURP	Transurethrale Resektion der Prostata
UPD	Uridindiphosphat

## 8. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

<b>Abb. 1:</b> Biosynthese von CD57 (modifiziert nach Vogel <i>et al.</i> 1991 und Focosi <i>et al.</i> 2010) .....	8
<b>Abb. 2:</b> Beispiele Objektträger TMA „Berlin groß“ und TMA „Hamburg“ .....	16
<b>Abb. 3:</b> Beispiele aus dem TMA Hamburg zur Bewertung der Färbegrade .....	19
<b>Abb. 4:</b> Grafik zur TMA-Herstellung (modifiziert nach Kononen <i>et al.</i> 1998).....	21
<b>Abb. 5:</b> Blasendiagramm für absolute Häufigkeiten der Färbegrade 0 bis 3 von CD57 in Tumor und Normalgewebe, TMA „Berlin groß“ .....	24
<b>Abb. 6:</b> Beispiele aus TMA „Berlin groß“, Tumor- und Normalgewebe mit CD57 <i>low/high</i> .....	25
<b>Abb. 7:</b> Kreisdiagramme zu Häufigkeiten der CD57-Färbegrade im PCa.....	26
<b>Abb. 8:</b> Beispielbild aus dem TMA „Lymphknoten“ .....	27
<b>Abb. 9:</b> Säulendiagramm Korrelation CD57 mit <i>stage</i> .....	29
<b>Abb. 10:</b> Säulendiagramm Korrelation CD57 mit <i>grade</i> .....	31
<b>Abb. 11:</b> Säulendiagramm Korrelation Rezidiv vs. CD57 ohne Zeitverlauf.....	32
<b>Abb. 12:</b> Kaplan-Meier-Kurve Rezidiv vs. CD57, TMA „Hamburg“.....	33
<b>Abb. 13:</b> Kaplan-Meier-Kurve Rezidiv vs. CD57, TMA „Berlin klein“ .....	33
<b>Abb. 14:</b> Beispielbilder TMA „Hamburg“, Vgl. CD57 und Gewebe-PSA.....	34
<b>Abb. 15:</b> Blasendiagramm absolute Häufigkeiten der PSA- und CD57-Expression nach Färbegraden 0 bis 3, TMA „Hamburg“ .....	35
<b>Abb. 16:</b> Kaplan-Meier-Kurve Rezidiv vs. Gewebe-PSA, TMA „Hamburg“ .....	36
<b>Abb. 17:</b> Großflächenschnitt in toto und Detailvergrößerung .....	37

<b>Tab. 1:</b> Vorkommen von CD57 in Gewebe außer Prostata (modifiziert nach Wahab & Wright 1985) .....	10
<b>Tab. 2:</b> Bisher auf CD57 untersuchte prostatiche Gewebetypen mit Fallzahlen .	12
<b>Tab. 3:</b> Übersicht Bewertungsschema der immunhistochemischen Färbung.....	19
<b>Tab. 4:</b> Übersicht der Fragestellungen zu den einzelnen TMAs.....	23
<b>Tab. 5:</b> Absolute Häufigkeiten der Färbegrade im Tumor, zu Abb. 7 .....	27
<b>Tab. 6:</b> Kreuztabellen CD57 vs. <i>stage</i> , zu Abb. 9 .....	29
<b>Tab. 7:</b> Datentabelle CD57 vs. <i>stage</i> (Prozentwerte zu Abb. 9).....	29
<b>Tab. 8:</b> Kreuztabellen CD57 vs. <i>grade</i> , zu Abb. 10 .....	30
<b>Tab. 9:</b> Datentabelle CD57 vs. <i>grade</i> (Prozentwerte zu Abb. 10).....	30
<b>Tab. 10:</b> Kreuztabellen CD57 vs. Rezidiv, zu Abb. 11 .....	31
<b>Tab. 11:</b> CD57-Heterogenität in 12 Großflächenschnitten.....	36

## 9. Danksagung

Gedankt sei an erster Stelle Herrn Prof. Dr. med. Andreas Erbersdobler für die Überlassung des Themas, der Gewebe- und Datensammlungen und die Bereitstellung des Mikroskops sowie eine exzellente Betreuung in allen Phasen der Dissertation. Seine Geduld und stets profunde Expertise waren mir wertvolle Begleiter auf diesem Weg.

Ohne die Zusammenarbeit vieler wäre eine solch umfangreiche Datensammlung wie die hier untersuchte nicht entstanden. Daher ist Herrn Prof. Dr. med. G. Sauter (Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) für die Erstellung des TMA „Hamburg“ und Herrn Prof. Dr. med. Th. Schlomm (Martiniklinik Hamburg) für die Erhebung der klinischen Daten zu diesem TMA herzlich zu danken. Für die Erstellung des TMA „Berlin“ danke ich Herrn Prof. Dr. med. W. Weichert (Institut für Pathologie, Universität Heidelberg) und für die Datenerhebung zu diesem TMA Herrn PD Dr. med. C. Stephan (Klinik und Poliklinik für Urologie, Charité Berlin). Dr. med. S. Gunia (Praxis für Pathologie, Stendal) erhob die Daten des TMA „inzidente Ca“. Nötige Schnitte und Färbungen wurden von den Medizinisch-technischen Assistenten des Institutes für Pathologie der Universität Rostock angefertigt. Ihnen allen sei herzlich gedankt.

Nicht zuletzt ist in diesem Sinne auch und besonders all jenen Patienten zu danken, die durch ihr Einverständnis und ihre Mitarbeit die Gewebe- und Datenbanken erst ermöglichten.

## **10. Selbständigkeitserklärung**

Hiermit versichert der Unterzeichnete nach §4 und §6 der Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock, die vorliegende Dissertation „CD57: Expression in inzidenten, operativ behandelten und metastasierten Prostatakarzinomen“ selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben. Die Stellen der Arbeit, die im Wortlaut oder dem Sinne nach anderen Werken entnommen sind, wurden unter Angabe der Hilfsmittel durch Verweise kenntlich gemacht.

Holger Wangerin.