

Der prädiktive Wert präoperativer Receptor-activator-of-nuclear-factor-kappa-B-Ligand- und Osteoprotegerin-Serumkonzentrationen für das Wiederauftreten eines Prostatakarzinoms nach radikaler Prostatektomie

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

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

**vorgelegt von
Wald, Alexander Alfons Wilhelm**

2016

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. C. Schwentner

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. B. Krämer

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis	6
1 Einleitung	9
1.1 Die Prostata.....	9
1.1.1 Anatomie der Prostata.....	9
1.1.2 Funktion der Prostata	10
1.1.3 Das Prostatakarzinom	10
1.1.3.1 Epidemiologie	10
1.1.3.2 Risikofaktoren.....	11
1.1.3.3 Klinik und Komplikationen	11
1.1.3.4 Pathologie und Ausbreitungsverhalten.....	12
1.1.3.5 Klassifikation.....	12
1.1.3.6 Diagnostik und Vorsorge des Prostatakarzinoms.....	13
Das prostataspezifische Antigen.....	13
Digitorektale Untersuchung.....	14
Transrektaler Ultraschall	15
Stanzbiopsie.....	15
Skelettszintigraphie	15
1.1.3.7 Behandlung des Prostatakarzinoms.....	15
Watchful Waiting und Active Surveillance.....	16
Die radikale Prostatektomie	16
Nachsorge nach radikaler Prostatektomie	17
1.1.3.8 Prognose des Prostatakarzinoms in Relation zum pathologischen Stadium	17
1.2 Das Rezeptor-Activator-of-Nuclear-Factor-kb (RANK) – RANK-Ligand (RANKL) - Osteoprotegerin (OPG) - System	17
1.2.1 RANKL.....	17
1.2.2 RANK und nuclear factor kappa B (NFkB)	19
1.2.3 OPG.....	20
1.2.4 Denosumab	21
1.2.5 Physiologische Funktionen des RANKL-RANK-OPG-Signalwegs	21
1.2.6 RANKL, RANK, OPG und das Prostatakarzinom.....	22
1.3 Fragestellung dieser Arbeit	23
2 Material und Methoden	24
2.1 Patientenkollektiv und Probenakquise.....	24
2.1.1 Analyse der Zeit bis zum Auftreten des biochemischen Rezidivs	25

2.2 Bestimmung von sRANKL und OPG	26
2.3 Statistische Analyse.....	27
2.3.1 Ereigniszeitanalyse.....	27
2.3.1.1 Wilcoxon-Mann-Whitney-Test	27
2.3.2 Student-T-Test.....	28
2.4 Datenschutz	29
2.5 Ethik.....	29
3 Ergebnisse	30
3.1 Beschreibung der Studienkohorte.....	30
3.1.1 Altersverteilung	30
3.1.2 Tumorstadien.....	31
3.1.3 Gleason-Summe.....	31
3.1.4 PSA-Werte.....	32
3.1.5 sRANKL Serum-Konzentrationen.....	33
3.1.6 OPG Serum-Konzentrationen.....	34
3.2 Korrelation etablierter Risikofaktoren mit rezidivfreier Überlebenszeit.....	35
3.2.1 Metastasenbildung und tumorabhängiges Versterben	36
3.2.2 Alter	36
3.2.3 Tumorstadien.....	37
3.2.4 Gleason-Summe.....	38
3.2.5 PSA-Werte.....	39
3.3 Korrelation von sRANKL-Konzentration und sRANKL-OPG-Quotienten mit etablierten Risikofaktoren	40
3.3.1 Vergleich der klinischen Daten mit präoperativ gemessenen sRANKL- und OPG-Serumkonzentrationen	41
3.4 Korrelation von sRANKL und OPG mit rezidivfreier Überlebenszeit	42
3.4.1 sRANKL und OPG dichotomisiert vs. biochemisches Rezidiv	42
3.4.2 Korrelation der präoperativen sRANKL-Serumkonzentration mit der Zeit bis zum Auftreten eines biochemischen Rezidivs.....	44
3.4.3 Korrelation der präoperativen OPG-Serumkonzentration mit der Zeit bis zum Auftreten eines biochemischen Rezidivs.....	45
3.4.4 Korrelation des sRANKL-OPG-Quotienten mit dem progressionsfreien Überleben	46
4 Diskussion	47
4.1 Etablierte Risikofaktoren korrelieren mit Zeit bis zum biochemischen Rezidiv, nicht jedoch mit sRANKL-Konzentration oder sRANKL-OPG-Quotient	47

4.2 Erhöhtes OPG bei Patienten über 63 Jahren	48
4.3 Potentieller Einfluss von Veränderungen des RANKL-RANK-Signalweges auf die Biologie des Prostata-Karzinoms	48
4.4 Ursprung der beobachteten Serum-sRANKL und -OPG Veränderungen beim lokal begrenzten Prostatakarzinom	49
4.5 Mögliche Bedeutung knochenassoziierter Veränderungen im lokalisierten Tumorstadium.....	50
4.6 Denosumab	50
4.7 Potentielle klinische Anwendung von Denosumab bei lokal begrenztem Tumorstadium.....	51
4.8 Die sRANKL Konzentration und der sRANKL-OPG-Quotient als Prädiktoren für das biochemische Rezidiv	52
4.9 Konsequenz eines erhöhten sRANKL-OPG-Quotienten für die Therapie des lokal begrenzten Prostatakarzinoms	54
4.10 Limitationen der vorliegenden Arbeit.....	55
5 Zusammenfassung.....	57
6 Abbildungsverzeichnis	58
7 Tabellenverzeichnis	59
8 Literaturverzeichnis	60
9 Anhang	71
10 Erklärung zum Eigenanteil	73
11 Veröffentlichung.....	74
12 Danksagung.....	75
13 Lebenslauf	76

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
BMP	Bone morphogenic proteins
Ca.	Circa
CD	Cluster of differentiation
CI	Konfidenzintervall
COX	Cyclooxygenase
CT	Computer-Tomographie
DC	Dendritische Zelle
DGU	Deutsche Gesellschaft für Urologie e. V.
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DRU	Digital-rektale Untersuchung
EAU	European Association of Urology
ELISA	Enzyme linked immuno sorbent essay
fPSA	Freies PSA
Ggf.	Gegebenenfalls
IGF	Insulin like growth factor
IKK	I κ B kinase Komplex
IL	Interleukin
iNOS	Induzierbare Stickoxyd-Synthase
iPTH	Intaktes Parathormon
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MRT	Magnet-Resonanz-Tomographie

Abkürzungsverzeichnis

mTED	Medulläre Thymusepithelzellen
NFATc	Nuclear factor of activated T-cells
OCIF	Osteoclastogenesis inhibitory factor
ODAR	Osteoclast-differentiation and activation receptor
ODF	Ostoclast differentiation factor
OP	Operation
OPG	Osteoprotegerin
OPGL	Osteoprotegerin-ligand
PET	Positronen-Emmissions-Tomographie
PSA	Prostataspezifisches Antigen
RANK	Receptor activator of nuclear factor kappa-B
RANKL	Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand
RHD	Rel homology domain
RNA	Ribonukleinsäure
sRANKL	Soluble RANKL
SRE	Skeletal related event
Tab.	Tabelle
TACE	TNF- α converting enzyme-linked protease
TGF	Transforming growth factor
Tnfsf11	Tumornekrosefaktor Superfamilie 11
tPSA	Totales PSA
TRAF	TNF receptor associated factor.
TRANCE	TNF-related activation-induced cytokine

Abkürzungsverzeichnis

TRANCE-R TNF-related activation-induced cytokine receptor

TRUS Transrektaler Ultraschall

u.a. Unter Anderem

UICC Union for international cancer control / Union internationale contre le cancer

Vgl. Vergleich

1 Einleitung

1.1 Die Prostata

1.1.1 Anatomie der Prostata

Die Prostata ist eine akzessorische Genitaldrüse des Mannes, sie ist etwa kastaniengroß und liegt im Spatium extraperitoneale pelvis am Ausgang der Blase, wo sie die Urethra umfasst. Dorsalwärts grenzt sie an die ventrale Wand des Rektums. Anatomisch unterteilen lässt sie sich in zwei Seitenlappen, Lobus dexter und sinister, welche ventral durch den Isthmus prostatae und dorsal durch den Lobus medius miteinander verbunden sind. Klinisch-histologisch wird sie vorzugsweise in Zonen eingeteilt, nämlich die periphere Zone, die zentrale Zone und die periurethrale Mantelzone. Dies ist von Bedeutung, da benigne Prostatahyperplasien meist in der periurethralen Zone auftreten, wohingegen das maligne Prostatakarzinom meist aus der peripheren Zone entspringt.

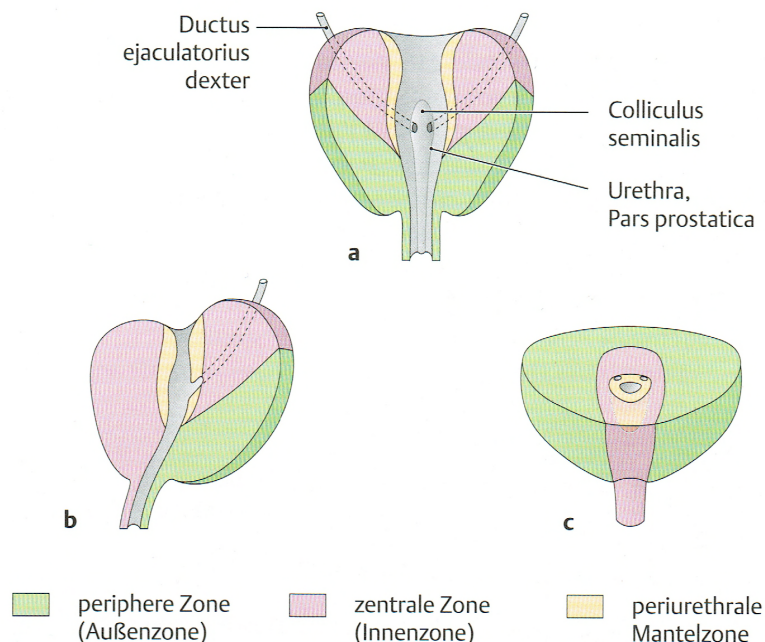


Abbildung 1: Anatomie der Prostata: a) Frontalschnitt, Ansicht von ventral. b) Sagittalschnitt, Ansicht von links. c) Horizontalschnitt, Ansicht von ventral und kranial. Aus Prometheus, Hals- und Innere Organe, Georg-Thieme-Verlag.

Die Drüse ist komplett von einer bindegewebigen Kapsel umschlossen, der Capsula prostatica. Embryologisch ist die Prostata ein Derivat des Urethraepithels, welches sich zunächst nach dorsal ausstülpt, um später dann die Urethra komplett zu umwachsen. Ihr Sagittaldurchmesser beträgt ca. 2-3 cm, ihr Transversaldurchmesser ca. 4 cm, ihr kraniokaudaler Durchmesser ca. 1-2 cm und ihre Masse ca. 20 g, diese Richtwerte variieren allerdings erheblich von Mann zu Mann. Histologisch besteht sie aus ca. 30-50 tubuloalveolären Drüsen, welche über ca. 20 Ausführungsgänge in die Pars prostatica urethrae münden [1].

1.1.2 Funktion der Prostata

Die Prostata produziert ca. 30% des Ejakulatvolumens des Mannes. Ihr dünnflüssiges, enzymreiches und mit einem pH-Wert von 6,4 leicht saures Sekret enthält Stoffe, welche für die aktive Beweglichkeit der Spermien im weiblichen Genitaltrakt von großer Bedeutung sind, so die Enzyme Spermin, Spermidin, Prostaglandine und verschiedene Proteasen, darunter das prostataspezifische Antigen (PSA). Des Weiteren enthält es Zink, Zitronensäure, Immunglobuline und Phosphatasen [2].

1.1.3 Das Prostatakarzinom

1.1.3.1 Epidemiologie

Das Prostatakarzinom (ICD10: C61) ist der häufigste Tumor des älteren Mannes. Es macht ca. 20% aller Krebserkrankungen unter Männern aus. In Deutschland erkranken jährlich rund 49.000 Männer daran. Altersstandardisiert nach Europastandard sind das ca. 100 pro 100.000 Einwohner [3]. Es verursacht drei von 100 Todesfällen unter Männern. In Deutschland verstarben 2013 insgesamt 13.408 Männer daran [4]. Innerhalb der Gruppe der an Krebs verstorbenen Männer ist es für etwa zehn Prozent der Todesfälle verantwortlich und stellt damit die dritthäufigste tödliche Krebserkrankung nach Lungen- (15%) und Darmkrebs (16%) dar [3].

Weltweit betrachtet treten fast drei Viertel der Neuerkrankungen in den Industrienationen auf, die Rate der Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner ändert sich hierbei um fast das 25-fache zwischen Australien und Neuseeland mit 104/100.000 Einwohner und süd-zentral-Asien mit 4,1 pro 100.000 Einwohnern [5].

Mit zunehmendem Alter nimmt die Erkrankungswahrscheinlichkeit stetig zu. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei ca. 69 Jahren [6], etwa 90% der Erkrankten sind älter

als 60 Jahre. Bei über 75-Jährigen steigt die Erkrankungsrate auf über 800/100.000 an [3]. Es bekommen statistisch gesehen 40% aller Männer in westlichen Industrienationen in ihrem Leben ein Prostatakarzinom, jedoch werden nur 10% von ihnen symptomatisch und nur 3% versterben daran [7].

Seit das prostataspezifische Antigen als Bluttest etabliert wurde, existiert ein kontinuierlicher Trend hin zu einer altersstandardisiert höheren Erkrankungsrate bei gleichzeitig sinkender Sterberate. Dies ist auf die hohe Sensitivität des PSA-Tests zurückzuführen, die dazu führt, dass die Erkrankung schon in früheren Stadien erkannt wird und so auch Patienten erfasst werden, die sonst vielleicht asymptomatisch geblieben wären und vor der Manifestation von Symptomen an einem anderen Leiden verstorben wären [8].

1.1.3.2 Risikofaktoren

Das Prostatakarzinom tritt gehäuft in Industrienationen auf. Es wird vermutet, dass die in westlichen Industrienationen vorherrschende ballaststoffarme und kohlenhydratreiche Diät mit einem höheren Risiko, an einem hochgradigen Prostatakarzinom zu erkranken, einhergeht [9]. Darüber hinaus sind Stoffe bekannt, z.B. die Isoflavonoide, Flavonoide und Lignane, die eine protektive Wirkung auf die Prostata zu haben scheinen [10, 11]. Eine Studie konnte auch zeigen, dass eine radikale Änderung des Lebensstils die Progression des Prostatakarzinoms aufhalten oder gar umkehren kann [12].

Es lässt sich außerdem eine familiäre Häufung feststellen. Das Risiko für einen erstgradig Verwandten eines an Prostatakarzinom erkrankten Patienten, ebenfalls an einem Prostatakarzinom zu erkranken ist um den Faktor 2,5 erhöht. Dies nimmt mit jüngerem Erkrankungsalter des erkrankten Verwandten und steigender Anzahl erkrankter Familienmitgliedern weiter zu [13].

1.1.3.3 Klinik und Komplikationen

In den allermeisten Fällen ist ein Prostatakarzinom im Anfangsstadium völlig symptomlos. Ein mögliches Frühsymptom ist die Kompression der Urethra, was zu Anomalien bei der Miktion führen kann, wie z.B. Nykturie, Pollakisurie oder dysurische Beschwerden. Allerdings können diese Symptome auch andere Ursachen haben, wie z.B. die benigne Prostatahyperplasie. Häufigster Ort für eine Metastasierung sind

die Lymphknoten des Beckens. Daher wird auch im Falle einer radikalen Prostatektomie eine beidseitige Lymphadenektomie durchgeführt [14].

Der zweithäufigste Ort, an welchen das Prostatakarzinom metastasiert, ist der Knochen. Zwischen 80 und 90% der Patienten mit metastasiertem Prostatakarzinom leiden an einer Beteiligung des axialen Skeletts. Diese stellt für die meisten Patienten die vorherrschende Manifestation der Erkrankung dar und ist auch die hauptsächliche Ursache für die Morbidität und Mortalität des Prostatakarzinoms [15]. Sie führt zu einem erhöhten Risiko für Knochenbrüche und zu einer verminderten Überlebensprognose [16]. Weitere Lokalisationen für Metastasen sind in absteigender Reihenfolge: Lunge, Harnblase, Leber, Nebenniere, Hoden [2].

1.1.3.4 Pathologie und Ausbreitungsverhalten

Prostatakarzinome entstehen zumeist aus dem prostatistischen Drüsenepithel (Adenokarzinom), selten auch aus dem prostatistischen Bindegewebe (Sarkom). Sie breiten sich in der Regel entlang der Lymphspalten im Gewebe aus. Schreitet ein Tumor in seinem Wachstum fort, so durchbricht er irgendwann die Prostatakapsel und infiltriert das umliegende Gewebe. Am häufigsten wächst er in die Samenblasen ein, aber auch die Wahrscheinlichkeit für lokale Lymphknotenmetastasen steigt. Durchbricht der Tumor schließlich die Wand eines Blutgefäßes, so streuen Tumorzellen bevorzugt in den Knochen. Häufig liegt zum Zeitpunkt der Prostatakarzinomentstehung ebenfalls eine benigne Prostatahyperplasie vor (BPH). Das Vorliegen einer BPH ist jedoch unabhängig von der Entstehung des Prostatakarzinomes und stellt hierfür keinen Risikofaktor dar [17].

1.1.3.5 Klassifikation

Nach den aktuellen S3-Leitlinien wird zur pathologischen Klassifikation des Prostatakarzinoms die Gleason-Summe verwendet [18]. Bei diesem histologischen Grading wird pro Gewebeprobe ein Wert von 1 bis 5 vergeben, wobei 1 für höchst differenzierte Tumorzellen mit niedrigem Malignitätsgrad steht und 5 für höchst undifferenzierte Tumorzellen mit hohem Malignitätsgrad. Um diesen Zahlenwert zu bestimmen wird die Wachstumsarchitektur und das Ausbreitungsmuster der Tumorzellen im Prostatagewebe analysiert [19]. Aufgrund des multifokalen Wachstums und der von Fokus zu Fokus variierenden zellulären Differenzierungsgrade werden, um zur Gleason-Summe zu gelangen, der Zahlenwert der am häufigsten vorkommenden

Tumorart und der Zahlenwert der am meisten entdifferenzierten Tumorart addiert. Dies bedeutet, dass Gleason-Summen zwischen 2 und 10 vorkommen können, wobei 2 die bestmögliche Prognose hat, und 10 die Schlechtmöglichste [19, 20].

Vergleichsweise benigne Tumore mit einem Gleason Score von <5 sind in der Regel Zufallsbefunde, während hochaggressive Tumore mit einem Gleason Score von ≥ 8 häufig durch von Ihnen verursachte Symptome auffällig werden. Ein hoher Gleason-Score geht mit höherer Tumorgroße, einer vermehrten Lymphgefäßinfiltration, positiven Resektionsrändern und einem signifikant höheren Risiko einher, im Verlauf der Erkrankung an Knochenmetastasen zu erkranken [19].

Die UICC hat ebenfalls ein Grading-System für das Prostatakarzinom entwickelt. Hierin wird zusätzlich zur Wachstumsarchitektur und zum Ausbreitungsmuster noch mit einbezogen, wie häufig es zu Drüsenformationen kommt und in wie fern Zellkernanomalien vorliegen. Es findet allerdings hauptsächlich in wissenschaftlichen Analysen Anwendung. In der klinischen Praxis herrscht der Gleason-Score vor [19].

Des Weiteren wird das Prostatakarzinom anhand von Größe, Lymphknoteninfiltration und dem Vorliegen von Fernmetastasen gemäß der TNM-Klassifikation der UICC klassifiziert. Hierbei steht das T für Tumorausdehnung, das N für den Lymphknotenstatus und das M für den Metastasenstatus [6].

1.1.3.6 Diagnostik und Vorsorge des Prostatakarzinoms

Die DGU empfiehlt, Männern, die eine Prostatakarzinom-Vorsorgeuntersuchung wünschen, eine PSA-Bestimmung in Kombination mit einer digital-rektalen Untersuchung nahezulegen. Das allgemeine Screening soll mit Erreichen des 45. Lebensjahres beginnen.

Bislang konnte nicht eindeutig belegt werden, ob durch die Durchführung eines PSA-gestützten Screenings mit allen seinen damit verbundene diagnostischen und therapeutischen Konsequenzen eine Lebenszeitverlängerung erreicht wird [21], allerdings wurde ein krebspezifischer Überlebensvorteil festgestellt [22].

Das prostataspezifische Antigen

Das PSA ist eine Serinprotease, welche ausschließlich von Prostatazellen und in geringem Maße von periurethralen Drüsen produziert wird. Dies macht sie zu einem äußerst spezifischen Serummarker für die Schädigung oder Entartung von Prostata-

gewebe. Die physiologische Funktion des PSAs ist die Verflüssigung des Spermas nach stattgehabter Ejakulation. Seine Konzentration im Blut ist bei Vorliegen eines Prostatakarzinoms in vielen Fällen erhöht, da die Tumorzellen als entartete Drüsenzellen zu einer großen Menge an PSA produzieren [23] und zum anderen durch ihr invasives Wachstumsverhalten umliegendes Prostatagewebe zerstören. Allerdings ist bei mehr als der Hälfte der Patienten, die aufgrund eines PSA-Anstiegs in Kombination mit einem auffälligen digital-rektalen (DRU) oder transrektalen Ultraschall-Befund (TRUS) prostatabiopsiert werden, kein Prostatakarzinom nachweisbar [24]. Dies liegt daran, dass die Spezifität einer PSA-Konzentrationserhöhung für das Vorliegen eines Prostatakarzinoms durch verschiedene Faktoren gemindert wird. Hierzu gehört unter anderem die Erhöhung der PSA-Serumkonzentration aufgrund einer benignen Prostatahyperplasie, einer Prostatitis, einer Manipulation der Prostata, beispielsweise durch eine DRU, und Prostatazelluntergang durch z.B. einen Prostatainfarkt [6, 25]. Es besteht darüber hinaus auch das Risiko, dass ein bestehendes Prostatakarzinom von den Biopsienadeln verfehlt wird und es so zu einem falsch-negativen Ergebnis kommt.

Mit der PSA-Bestimmung wird laut DGU-Leitlinien ab dem 45. Lebensjahr begonnen. Sie hat zurzeit die höchste Sensitivität zur Erkennung des Prostatakarzinoms. Falls der PSA-Wert bei dem Patienten nicht zum ersten Mal bestimmt worden ist, kann zusätzlich die PSA-Velocity (die Änderung im Vergleich zum vorherigen Wert), und im Falle einer Verdopplung, die PSA Verdopplungszeit betrachtet werden. Außerdem kann das komplexierte PSA bestimmt werden und, falls das Volumen der Prostata bekannt ist, auch die PSA-Dichte [2].

Digitorektale Untersuchung

Bei der digitorektalen Untersuchung wird die Prostata des Patienten mit dem Finger durch den Anus getastet. Die Sensitivität und Spezifität dieser Untersuchung alleine ist recht gering. Eine Kanadische Studie kam zu dem Schluss, dass 90% der Prostatakarzinome durch alleinige PSA-Messung entdeckt werden können, wohingegen rechnerisch 344 Männer mit normalem PSA-Wert digital-rektal untersucht werden müssen, um ein weiteres Prostatakarzinom zu entdecken [26].

Transrektaler Ultraschall

Mithilfe des transrektalen Ultraschalls (TRUS) lassen sich Informationen über die Morphologie und die Größe bzw. das Volumen der Prostata gewinnen. Außerdem besteht die Chance, ein Prostatakarzinom anhand beispielsweise einer echoarmen Läsion in der peripheren Zone zu erkennen. Die Sensitivität dieser Untersuchungsmethode ist hierbei doppelt so groß wie die der DRU [27]. Jedoch hat der transrektale Ultraschall bei unauffälliger digital-rektaler Untersuchung und normalen PSA-Werten nur einen geringen zusätzlichen diagnostischen Nutzen, seine Spezifität ist sogar niedriger als bei der DRU. Sein positiver prädiktiver Wert liegt bei 41% [27].

Stanzbiopsie

Die ultraschallgesteuerte transrektale Stanzbiopsie der Prostata ist als Standard für die diagnostische Gewinnung von Prostatagewebe zu betrachten [28]. Hierbei werden mehrere Gewebeproben transrektal aus der Prostata entnommen [18]. Eine Abschätzung der Tumorausdehnung wird anschließend durch eine Zusammenschau der PSA-Werte, dem durch die Prostatabiopsien bestimmten pathologischen Gleason-Score und dem radiologisch bestimmten T- und N-Stadium ermöglicht [18].

Skelettszintigraphie

Die Skelettszintigraphie dient dazu, die Knochendichte zu messen und anhand von Knochendichteanomalien Knochenmetastasen zu entdecken. Laut DGU sollten Patienten mit einem histologisch gesicherten Prostatakarzinom und einer oder mehrerer der folgenden Gegebenheiten eine Knochenszintigraphie erhalten: PSA-Wert >10 ng/ml, Gleason-Score >7, cT3/4 und Knochenschmerzen [6].

1.1.3.7 Behandlung des Prostatakarzinoms

Zur Therapieentscheidung tragen das Stadium und der Differenzierungsgrad des Tumors, sowie das Alter und der Allgemeinzustand des Patienten bei.

Man teilt in drei Schweregrade ein: Erstens das lokal begrenzte Prostatakarzinom mit T1-2 N0 M0. Hier ist der Tumor auf die Prostataloge begrenzt. Zweitens das lokal fortgeschrittene Prostatakarzinom mit T3-4 N0-1 M0. Bei diesem Tumorstadium hat sich der Tumor bereits über die Prostatakapsel hinweg in benachbartes Gewebe oder lokale Lymphknoten ausgebreitet. Und drittens, das metastasierte Prostatakarzi-

nom Tx Nx M1 [2]. Bis zum lokal fortgeschrittenen Stadium ist ein kurativer Therapieansatz noch möglich. Ab dem metastasierten Stadium ist der Tumor nicht mehr durch Prostatektomie und Lymphadenektomie heilbar. Es muss palliativ therapiert werden. Dazu gehört die Chemotherapie, Bestrahlung, Androgenentzugstherapie zur Progressionsverlangsamung, außerdem wenn notwendig Schmerzbehandlungen, Symptomlinderung z.B. durch Gabe von Bisphosphonaten, Bluttransfusionen, etc. [2, 6]. Im noch nicht metastasierten Stadium wird entschieden, ob eine kurative Therapie durchgeführt oder zugewartet werden soll. Hierfür kann unter Umständen noch weitere Diagnostik durchgeführt werden [6].

Watchful Waiting und Active Surveillance

Watchful Waiting beschreibt eine Therapieform, bei der, bis zum Auftreten von lokalen oder systemischen, subjektiv als störend empfundenen Symptomen keine Therapie durchgeführt wird. Wenn diese Symptome auftreten, werden sie palliativ therapiert, beispielsweise mittels transurethraler Resektion der Prostata (TURP) bei Obstruktion der ableitenden Harnwege, oder Radio- und Hormontherapie bei Beschwerden durch metastatische Läsionen. Bei dieser Therapieform wird kein standardisiertes Follow-Up durchgeführt. Sie eignet sich besonders bei älteren oder multimorbiden Patienten, deren Lebenserwartung geringer ist als die vermutete Zeit bis zum Auftreten von schweren, vom Prostatakarzinom verursachten Komplikationen [14].

Dem gegenüber steht die Active Surveillance, welche bei Patienten mit organbegrenztem Prostatakarzinom mit sehr niedrigem Risiko Anwendung findet. Ihr Ziel ist es, Übertherapie zu vermeiden, indem so lange mit der kurativen Therapie abgewartet wird, bis das Prostatakarzinom droht, die Kapsel zu überschreiten. Dann erst wird kurativ therapiert [14].

Die radikale Prostatektomie

Die radikale retropubische Prostatektomie (Syn.: radikale Prostatovesikuloektomie) ist eine primäre Therapieoption für das klinisch lokal begrenzte Prostatakarzinom. Hierbei wird die Prostata im Ganzen chirurgisch entfernt. Bei Patienten ab einer Lebenserwartung von 10 Jahren ist sie kurativer Goldstandard [29]. Sie ist der einzige kurative Ansatz, bei dem in einer prospektiven randomisierten Studie (klinisch lokal begrenzter Tumor (T1b-T2 N0 M0), PSA-Wert < 50ng/ml, Lebenserwartung mind. 10

Jahre) eine Lebensverlängerung gegenüber Watchful Waiting gezeigt werden konnte [30].

Nachsorge nach radikaler Prostatektomie

Laut der S3-Leitlinie der deutschen Gesellschaft für Urologie sollen asymptomatische Patienten nach lokaler, kurativ intendierter Therapie innerhalb von 12 Wochen nach Ende der Therapie eine Nachsorgeuntersuchung erhalten. Danach sollten die Untersuchungen innerhalb der ersten zwei Jahre vierteljährlich, im dritten und vierten Jahr halbjährlich und vom fünften Jahr an in jährlichen Intervallen wiederholt werden. Hierbei wird immer der Serum-PSA-Wert gemessen. Bei Patienten ohne PSA-Wiederaufstieg (Syn.: biochemisches Rezidiv) ist die DRU nicht routinemäßig indiziert. Ferner sollen bildgebende Verfahren nur eingesetzt werden, wenn entweder Symptome bestehen oder therapeutische Maßnahmen möglich sind [31].

1.1.3.8 Prognose des Prostatakarzinoms in Relation zum pathologischen Stadium

Etablierte Prognosefaktoren eines Prostatakarzinoms sind heutzutage das TNM-Stadium, der Gleason-Score und die mikroskopische Beurteilung seiner Resektionsränder (R0 oder R1) [2]. Die postoperative Nachsorgestudie von Epstein et al. zeigte in einer multifaktoriellen Analyse, dass der Resektionsstatus und die Gleason Summe eine starke Korrelation mit der Progressionswahrscheinlichkeit nach radikaler Prostatektomie haben, im Gegensatz zu kapselüberschreitendem Wachstum allein [32]. Da die etablierten Marker jedoch nicht immer Prognosen mit ausreichender Sicherheit erlauben, müssen weitere Marker gefunden werden, welche die Rezidivwahrscheinlichkeit eines Prostatakarzinomes nach radikaler Prostatektomie genauer spezifizieren.

1.2 Das Rezeptor-Activator-of-Nuclear-Factor-kb (RANK) – RANK-Ligand (RANKL) - Osteoprotegerin (OPG) - System

1.2.1 RANKL

RANKL steht für „receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand“, in manchen Quellen wird er auch OPGL = „osteoprotegerin-ligand“, TRANCE = „TNF-related activation-induced cytokine“ oder ODF = „ostoclast differentiation factor“ genannt. Er

wurde 1997 entdeckt [33] und anschließend als Botenstoff charakterisiert, der dendritische Zellen und Osteoklasten stimulieren kann und eine wichtige Rolle in der Funktion des Immunsystems zu spielen scheint [34].

Das Zytokin wird durch das *Tnfsf11*-Gen kodiert, welches beim Menschen auf dem Genlocus 13q14 liegt. Das Gen ist höchst konserviert, es ist beim Rhesusaffen zu beinahe 100% und bei der Maus und dem Hund zu ca. 70% identisch mit der menschlichen Version [35]. RANKL-Expression wurde in vielen Zellen und Geweben nachgewiesen, darunter T-Lymphozyten, Osteoblasten [35], Gehirn, und Haut, in niedrigen Konzentrationen sogar in Herzmuskel, Skelettmuskel, Lunge und Schilddrüse [36, 37].

Er kommt in einer membranständigen, einer primär löslichen (= freien), und in einer sekundär löslichen, durch TACE (TNF- α converting enzyme-linked protease) generierten Form vor [38, 39]. Zellmembrangebundener RANKL wirkt effizienter als löslicher RANKL auf die Osteoklastogenese [40]. RANKL bindet sowohl an RANK, welcher eine intrazelluläre Signalkaskade und sukzessive Transkriptionsänderung einleitet (siehe Abschnitt RANK), als auch an OPG, welches als sog. „Abfangrezeptor (engl. decoy-receptor) wirkt (Siehe Abschnitt OPG). Das bedeutet, dass OPG durch seine irreversible Bindung an RANKL dessen Bindung an RANK verhindert [41] (siehe auch Abb. 2 und 3).

Die Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-11, IL-17 und TNF-alpha führen zu einer RANKL-Expression und einer OPG-Herunterregulation. Im Gegensatz dazu führen die Zytokine IL-13, INF-gamma und TGF- β 1 zu einer Herunterregulation von RANKL und einer Hochregulation von OPG [40]. Ferner wurde gezeigt, dass Glukokortikoide, 1,25(OH)₂-Vit-D₃-Hormon, Parathormon und Prostaglandine die Expression von RANKL steigern und Glukokortikoide und 1,25(OH)₂-Vit-D₃-Hormon auch die Expression von OPG inhibieren [42]. Membrangebundenes RANKL führt zu einer Apoptoseverzögerung reifer Osteoklasten [43] und wird hauptsächlich von Osteoblasten und Stromazellen des Knochenmarks exprimiert, freies RANKL hingegen hauptsächlich von T-Lymphozyten [37].

1.2.2 RANK und nuclear factor kappa B (NFκB)

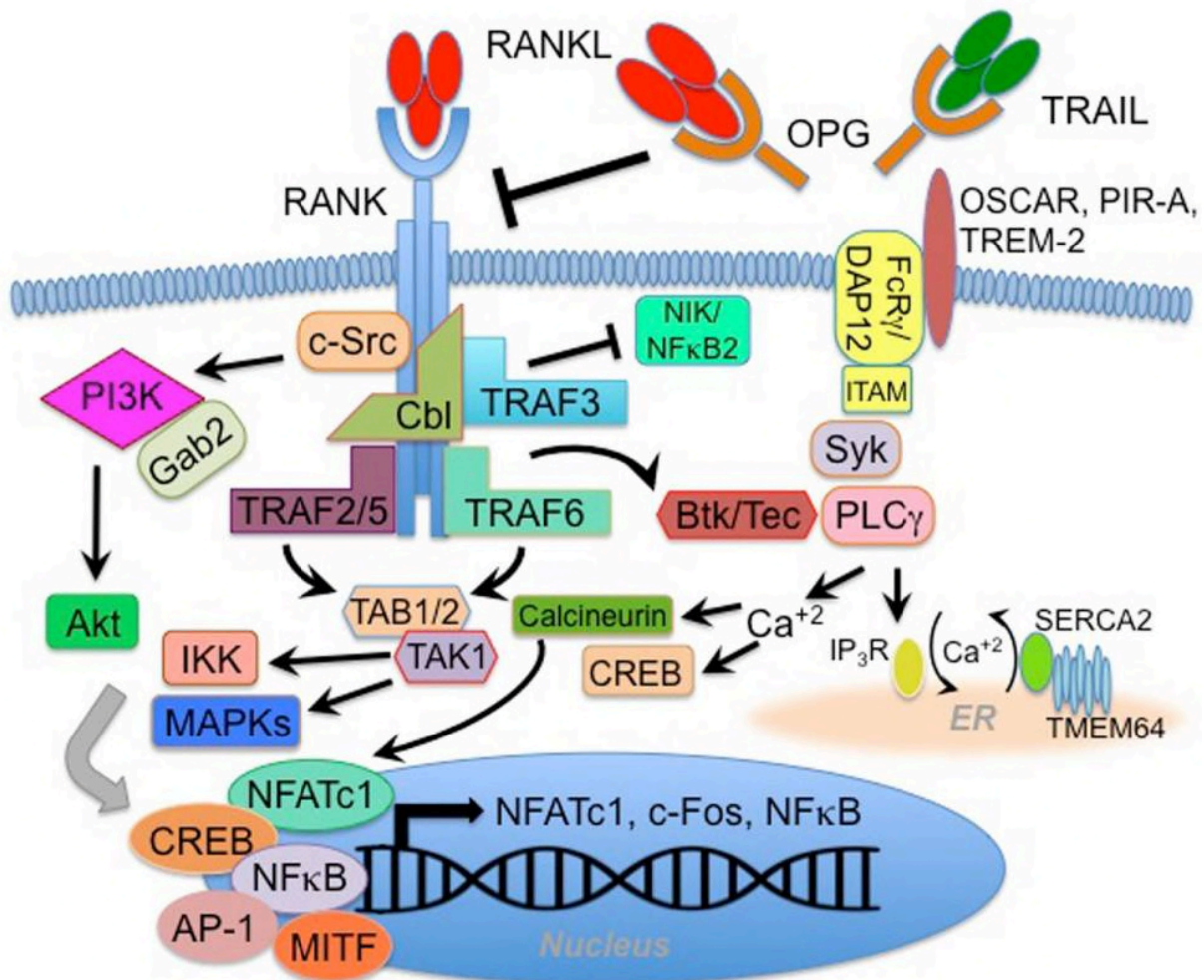


Abbildung 2: Schematische Darstellung der RANK-vermittelten intrazellulären Signalkaskade. Aus Walsh et al., Front Immunol, 2014, Biology of the RANKL-RANK-OPG-System in Immunity, Bone, and Beyond.

RANK steht für „receptor activator of nuclear factor kappa-B“, in manchen Quellen wird er auch TRANCE-R („TNF-related activation-induced cytokine receptor“) [44] und ODAR („Osteoclast-differentiation and activation receptor“) genannt [45]. Das Gen für RANK heißt *Tnfrsf11a* und liegt auf dem Genlocus 18q22.1 [33]. RANK kann in vielen Zellen und Organen nachgewiesen werden, darunter Thymus, Leber, Kolon, Brustdrüsen, Prostata, Pankreas, Knochenmark, Skelettmuskel und Niere [33, 46]. Wenn RANK von RANKL gebunden wird, trimerisiert RANK [47]. So aktiviert, bindet er intrazellulär an TRAF1, -2, -3, -5 und -6. TRAF6 aktiviert dann sukzessive über die Signalmoleküle TAB2 und TAK1 die mitogen-activated protein kinases (MAPKs) p38 und JNK, sowie den IκB kinase (IKK) Komplex, welche gemeinsam den kanonischen NFκB-Signalweg aktivieren. Die anschließende Translokation der Transkriptionsfak-

toren in den Nucleolus führt dann zur Transkription von NFATc1-, c-Fos- und NFκB-abhängigen Genen. Diese Gene sind z.B. für Osteoklasten-Vorläuferzellen notwendig, um in reife Osteoklasten zu differenzieren [44, 48-52]. Ferner beeinflusst die RANKL-RANK-Interaktion über TRAF6 und sukzessive Btk/Tec auch den intrazellulären Kalziumspiegel, dessen Erhöhung ebenfalls die Aktivität des NFATc1-Transkriptionsfaktors steigert [53].

Die NFκB-Signalmolekül-Familie besteht aus fünf Untereinheiten, p50, p52, p65, cRel und RelB. An ihrem N-terminalen Ende haben diese Proteine alle eine circa 300 Aminosäuren lange Rel homology domain (RHD). Mittels dieser RHD können sich jeweils zwei Mitglieder der NFκB Familie zu Homo- oder Heterodimeren verbinden, was es ihnen erlaubt in den Zellkern zu diffundieren und dort die Transkription von Genen zu aktivieren oder zu hemmen [54]. NFκB spielt im Immunsystem eine wichtige Rolle, z.B. in T- & B-Zellen, wo es durch Bindung des T- bzw. B-Zellrezeptors, sowie der Toll-Like-Rezeptoren aktiviert wird und so eine Schlüsselrolle in der adaptiven und angeborenen Immunantwort spielt [55]. Es wurde auch gezeigt, dass der NFκB-Signalweg für die Entwicklung des zentralen Nervensystems wichtig ist [56] und dass es für die Expression verschiedener Cytokine, der induzierbaren Stickoxyd-Synthase (iNOS) [57], der Zyklooxygenase 2 (COX2) [58], sowie verschiedener Wachstums- und Apoptose-Faktoren verantwortlich ist.

1.2.3 OPG

Beim OPG handelt sich um einen „Abfangrezeptor“ (engl. decoy-receptor) für RANKL, welcher irreversibel an RANKL-Moleküle bindet und sowohl die membranständige, als auch die frei gelöste Form in ihrer Wirkung neutralisiert (Siehe Abb. 3). Das Verhältnis zwischen RANKL und OPG entscheidet über den Grad des Knochenabbaus [59]. OPG ist ebenfalls ein Mitglied der TNF-Rezeptor-Superfamilie und trägt den Namen Tnfrsf11b. Synonyme sind osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) [60], TR1 [61], und follicular DC-derived receptor-1 [62]. Es wurde in Ratte, Maus und Mensch beschrieben. Die mRNA von Maus und Mensch sind zu ca. 85% homolog, die von Maus und Ratte zu ca. 94% [63]. OPG wird primär von Knochenmark-Stromazellen und von Osteoblasten produziert, und kann bei B-Lymphozyten, DCs und folliculären DCs durch Stimulation mit CD40L induziert werden [62]. Die

Expression von OPG wird u.a. durch TGF- β , IL-1, Östrogen und die Wnt-Liganden hochreguliert, und durch PGE2, PTH und Glukokortikoide herunterreguliert [64, 65].

1.2.4 Denosumab

Bei Denosumab handelt es sich um einen vollhumanen, monoklonalen Antikörper gegen RANKL. Sein Wirkmechanismus ist prinzipiell mit dem des OPG zu vergleichen. Er ist

„Zur Prävention von skelettbezogenen Komplikationen (SRE) (pathologische Fraktur, Bestrahlung des Knochens, Rückenmarkskompression oder operative Eingriffe am Knochen) bei Erwachsenen mit Knochenmetastasen aufgrund solider Tumoren.“

zugelassen. (Wortlaut der Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft [66]).

Bislang nicht zugelassen ist Denosumab zum präventiven Einsatz gegen das Entstehen von Knochenmetastasen. Hier konnte bisher keine Lebenszeitverlängerung nachgewiesen werden [67].

1.2.5 Physiologische Funktionen des RANKL-RANK-OPG-Signalwegs

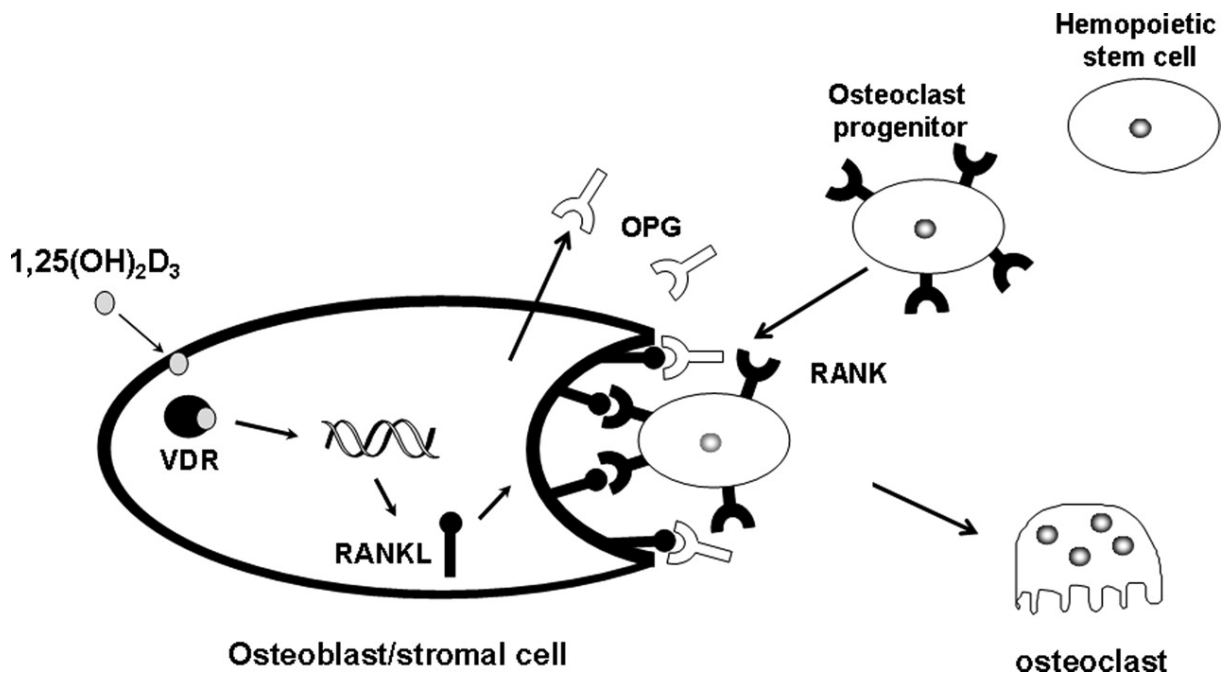


Abbildung 3: Vereinfachte Darstellung der RANKL-RANK-OPG-Funktion im Knochen. Aus Dusso, Brown, Slatopolski, Vitamin D [68].

Der RANKL-RANK-OPG Signalweg spielt eine wichtige Rolle in der embryonalen Organentwicklung. Mäuse, denen RANK fehlte, zeigten abnorme Entwicklungen von sekundärem Lymphgewebe, wie beispielsweise Lymphknoten, Peyer'sche Plaques, Kryptopatches und der Milz. Hier fehlen bei RANK-Defizienz die B-Zellen. Ferner zeigten diese Mäuse starke Osteopetrose und Zahnentwicklungsstörungen, da die Bildung reifer Osteoklasten ohne die nötigen durch RANK induzierten Transkriptionsänderung nicht möglich war [69-72].

Des Weiteren spielt der RANKL-RANK-OPG Signalweg auch eine große Rolle in der Brustdrüsenentwicklung [73]. RANK-Knockout-Mäuse waren nicht in der Lage, normale Mammae zu entwickeln [73, 74].

Die medullären Thymusepithelzellen (mTEC), welche physiologischerweise für die Negativselektion der sich entwickelnden T-Zellen zuständig sind, konnten sich in *in-vivo* Studien ohne RANK- und CD40 Aktivität nicht entwickeln [75]. Demnach scheint der RANK-Signalweg auch bei der Ausbildung der Selbsttoleranz relevant zu sein und mögliche RANK-Dysregulationen könnten für die Entstehung von Autoimmunerkrankungen verantwortlich sein [76].

Darüber hinaus ist der RANKL-RANK-OPG Signalweg der wichtigste bisher bekannte Regulator des Knochenstoffwechsels. Durch das Gleichgewicht zwischen RANKL und OPG Molekülen wird der Knochen-Auf- und Abbau im Verhältnis zueinander gehalten. Überwiegt RANKL, so kommt es zu einer übermäßigen Stimulation der Osteoklasten und sukzessive einem vermehrten Knochenabbau mit Osteoporose-symptomatik. Überwiegt OPG, so findet zu wenig Knochenabbau im Vergleich zum Knochenaufbau statt, und es kommt zu Osteopetrose [41].

1.2.6 RANKL, RANK, OPG und das Prostatakarzinom

Es gibt zahlreiche Hinweise darauf, dass das RANKL-RANK-OPG-System eine Rolle in der Pathogenese verschiedener Tumorarten, wie z.B. dem malignen Melanom [77], dem Mammakarzinom [78, 79], dem Nierenkarzinom [80], und auch dem Prostatakarzinom [81-86] spielt. So wurde beispielsweise bei Patienten mit lokal begrenztem Prostatakarzinom eine erhöhte Konzentration von RANKL, RANK und OPG im Tumorgewebe festgestellt. Dies zeigte sich auch *in vitro*, wo Prostatakarzinom-Zelllinien im Vergleich zu gesunden Prostatazellen vermehrt RANKL, RANK und OPG produzierten. In dieser Studie konnte weiterhin eine Korrelation des Grades der

Expression dieser Marker mit den klinisch-pathologischen Risikofaktoren Gleason-Score, TNM-Stadium, Serum-PSA-Konzentration und Androgenrezeptor-Status festgestellt werden [86]. Klinisch wurde außerdem beobachtet, dass die Wahrscheinlichkeit für einen PSA-Wiederaanstieg nach radikaler Prostatektomie bei erhöhter RANKL- und OPG-Expression im primären Tumorgewebe gesteigert ist [83].

Evidenz für einen Einfluss des RANKL-RANK-OPG-Signalweges auf die zielgerichtete Zellmigration von Prostatakarzinom-Zellen, Mammakarzinom-Zellen und Zellen des malignen Melanoms *in vitro* liegt ebenfalls vor [77].

In Tierversuchen konnte außerdem gezeigt werden, dass die Gabe von OPG zu einer Verlangsamung des Wachstums von Prostatakarzinomen führen kann [87].

In Zusammenschau obiger Ergebnisse ist es nun durchaus plausibel, dass die Konzentrationen dieser Signalmoleküle auch im Serum von Prostatakarzinompatienten im lokal begrenzten Stadium eine prognostische Relevanz haben könnten.

1.3 Fragestellung dieser Arbeit

Der RANKL-RANK-OPG-Signalweg spielt eine Rolle in der Pathogenese des Prostatakarzinoms (siehe Abschnitt 1.2.6) und frühere Studien zeigten bereits eine Veränderung der RANKL- und OPG-Konzentrationen im Serum, im Knochenmark und auch im primären sowie metastatischen Tumorgewebe von Patienten mit fortgeschrittenen Stadien des Prostatakarzinoms auf [82, 86].

Es stellt sich die Frage, ob die Konzentration dieser zwei Proteine im Serum von Patienten mit lokal begrenztem Prostatakarzinom möglicherweise eine Aussagekraft über die Auftrittswahrscheinlichkeit eines Karzinomrezidivs nach radikaler Prostatektomie besitzt. Weiterhin ist zu eruieren, ob eine etwaige Korrelation von bisherigen Risikofaktoren unabhängig ist und somit möglicherweise einen diagnostischen Mehrwert darstellen könnte.

Im Zuge dieser Arbeit wurden die Konzentrationen von RANKL und OPG in gefrorenen Serumproben von Patienten, deren radikale Prostatektomie zum Zeitpunkt der Datenerhebung zwischen 5 und 7 Jahren zurücklag, ermittelt und mit den präoperativen Krankheitsstadien sowie dem postoperativen Krankheitsverlauf dieser Patienten verglichen. Besonderes Augenmerk wurde auf die Zeit bis zum Auftreten eines biochemischen Rezidivs gelegt.

2 Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv und Probenakquise

In der Universitätsklinik für Urologie in Tübingen wird, sofern alle rechtlichen Voraussetzungen erfüllt sind, vor einem onkologischen Eingriff eine Serumprobe bei -80 Grad Celsius asserviert. Das Patientenkollektiv dieser Studie wurde aus dieser Serumsammlung rekrutiert.

Das Ausgangskollektiv der vorliegenden Arbeit setzt sich aus allen Patienten zusammen, welche in den Jahren 2004 bis 2006 in o.g. Abteilung radikal prostatektomiert worden waren und der Asservation einer Serumprobe für wissenschaftliche Zwecke zugestimmt hatten. Patienten, die vor Juni 2004 operiert worden waren, mussten aus dem Kollektiv ausgeschlossen werden, da deren Seren nicht mehr vorlagen. Ebenfalls aus dem Kollektiv ausgeschlossen wurden alle Patienten, deren OP weniger als fünf Jahre vor dem 24.03.2011 zurücklag, um eine Studiendauer von fünf Jahren nicht zu unterschreiten. Übrig blieben 312 Patienten.

Anschließend wurden alle digitalen Patientenakten analysiert, die vorhandenen Arztbriefe zusammengetragen und alle für diese Studie relevanten Informationen (zum Beispiel Auftreten eines biochemischen Rezidivs, ein im Verlauf durchgeführtes Skelettszintigramm, PET-CT o.Ä.) in einer Datenbank zusammengeführt.

Nach Inventur der bei -80 Grad Celsius gelagerten Serum-Proben wurden alle Patienten, von denen kein Serum vorhanden war ebenfalls aus dem Kollektiv ausgeschlossen. Nun bestand das Kollektiv aus 182 Patienten.

Von diesen Patienten lagen nun folgende Informationen vor: eine ausnahmslos am Tag vor der Prostatektomie abgenommene Serumprobe, teilweise das TRUS-Volumen der Prostata, teilweise das im MRT bestimmte Volumen der Prostata, das pTNM-Stadium des Prostatakarzinoms, der Gleason-Score des Prostatakarzinoms, das in der Pathologie erhobene Prostata-Gewicht, sowie jeweils der präoperativ bestimmte tPSA- und fPSA-Wert.

Dann wurden diese 182 Patienten nach vorheriger postalischer Ankündigung telefonisch über den weiteren Verlauf ihrer Erkrankung befragt. Dieses Vorgehen wurde vom Ethikrat der Universitätsklinik Tübingen genehmigt (Siehe Abschnitt 2.4 und

2.5). Da alle Patienten gemäß aktueller EAU-Richtlinien eine Reihe von Nachsorgeuntersuchungen durchführen lassen sollten [18], wurde besonderes Augenmerk auf die in diesem Rahmen erfassten Informationen gelegt: Es wurde erfragt, ob es in dem Zeitraum nach der Operation bis zum Tag des Anrufs zu einem biochemischen Rezidiv gekommen war oder nicht. Wenn nicht, wurde weiter nachgefragt, wann der PSA-Wert zum letzten Mal bestimmt worden war. Falls es postoperativ nicht zu einer kompletten PSA-Remission, oder nach einer primären Remission zu einem biochemischen Rezidiv gekommen war, wurde der Patient gefragt, ob er deswegen nachbestrahlt worden war. Außerdem wurde bei jedem Patienten, bei dem ein biochemisches Rezidiv auftrat, evaluiert, wann genau dieses diagnostiziert wurde, welche Therapie eingeleitet wurde, und ob im Verlauf ein Knochenszintigramm oder ein PET-CT durchgeführt worden war. Zusätzlich wurde nach etwaig aufgetretenen skelettassoziierten Ereignissen gefragt. Um die Genauigkeit der Daten zu erhöhen, wurde, sofern möglich, Rücksprache mit den mit der Nachsorge der Patienten betrauten niedergelassenen Fachärzten gehalten, um die komplette Krankengeschichte und etwaige Nebendiagnosen, die mit dem Prostatakarzinom in Zusammenhang stehen könnten, aus erster Hand zu erfahren. Dazu wurden die Urologen bzw. Hausärzte zum Teil per Fax und zum Teil persönlich zur Krankengeschichte der betreffenden Patienten befragt (exemplarisches Follow-Up-Fax siehe Anhang 1).

Patienten wurden aus dem Kollektiv ausgeschlossen, falls bei ihnen im Follow-up nicht ausreichend Daten erhoben werden konnten, oder falls kein Kontakt mit ihnen aufgenommen werden konnte. Schlussendlich blieben 157 Patienten zur Analyse übrig.

Im Zuge der Datenauswertung für die vorliegende Studie wurden zwei aufeinander folgend gemessene postoperative PSA-Werte, die beide höher als 0,2 ng/ml [18] lagen, als biochemisches Rezidiv betrachtet.

2.1.1 Analyse der Zeit bis zum Auftreten des biochemischen Rezidivs

Aufgrund des Aufbaus der Studie lag nicht für jeden Patienten ein zeitgleich gemessener, abschließender PSA-Wert vor. Daher konnte nicht ausgeschlossen werden, dass es bei einigen Patienten nach dem zuletzt erhobenen Follow-up-Datenpunkt,

welcher bei fast allen Patienten vor dem absoluten Ende der Studienperiode lag, zu einem PSA-Wiederanstieg gekommen war.

Um diesem Problem gerecht zu werden, wurde anstatt mit dem Anteil an Patienten pro Gruppe, die nach fünf Jahren kein biochemisches Rezidiv erlitten hatten, mit der ereignisfreien Zeit bis zum Auftreten eines Rezidivs gerechnet. Hierbei werden die Zeitperioden bis zum Eintreten eines PSA-Wiederanstieges verglichen, ohne dafür eine abschließende Messung zu benötigen.

2.2 Bestimmung von sRANKL und OPG

Die Gesamtkonzentrationen von sRANKL und OPG in den Serumproben wurde durch kommerziell erhältliche ELISA (enzyme linked immuno sorbent essay) Kits nach Herstelleranleitung (Immundiagnostik AG, Bensheim, Nr. K 1016 und Nr. KB 1011 jeweils für sRANKL und OPG) bestimmt. Es folgt ein Auszug zum Funktionsprinzip dieser Tests aus der Literatur des Kits zur Bestimmung von sRANKL.

„Der Test basiert auf der Sandwich-ELISA-Technik. Es werden zwei ausgewählte Antikörper, die humanes sRANKL und OPG erkennen, verwendet. Teststandards, Kontrollen, verdünnte Patientenproben, die sRANKL enthalten, und die OPG-Lösung werden in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert, welche mit einem hochaffinen polyklonalen anti-human-OPG-Antikörper beschichtet wurden. In diesem ersten Inkubationsschritt wird das sRANKL aus der Probe an das OPG gebunden und von dem gekoppelten Fängerantikörper an die Mikrotiterplatte gebunden. Dann wird der Detektionsantikörper (ein biotinmarkierter monoklonaler anti-sRANKL-Antikörper) zugegeben und es bildet sich folgender Komplex an der Wand der Mikrotiterplatte: Fängerantikörper – humanes OPG – sRANKL – Detektionsantikörper. Die Quantifizierung erfolgt mit Hilfe eines Streptavidin-Peroxidase-Konjugats, das spezifisch an Biotin bindet. Als Peroxidasesubstrat wird Tetramethylbenzidin (TMB) eingesetzt. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von Säure abgestoppt. Dadurch erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die entstandene chromogene Verbindung wird photometrisch bei 450nm gemessen. Die Intensität der Farbe ist dem total sRANKL-Gehalt direkt proportional. Anhand einer mitgeführten Standardkurve – Optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration – lässt sich die Konzentration der Probe ermitteln.“ (Zitat aus

Arbeitsanleitung total sRANKL (human) ELISA Kit, 25.3.2015, Seite 7; Immunodiagnostik Bensheim AG.)

Die Bestimmung von OPG erfolgte analog zur Bestimmung von sRANKL. Es wird hierbei jedoch an Stelle eines Detektionsantikörpers gegen sRANKL direkt ein biotinylierter Detektionsantikörper gegen OPG verwendet. Nach Pipettierung auf die Mikrotiterplatte bildet sich nun ein „Sandwich“ aus OPG-Bindeantikörper, OPG-Molekül und biotinyliertem Anti-OPG-Antikörper. Nach Abwaschen aller ungebundenen Moleküle wird der biotinylierte Anti-OPG-Detektionsantikörper mittels eines Streptavidin-Peroxidase/TMB-Systems sichtbar gemacht, seine Konzentration mittels Photometer gemessen und gegen eine mitgeführte Standardkurve quantifiziert.

Die Konzentrationen wurden mit Hilfe eines Anthos 2010 Readers (Anthos Mikrosysteme GmbH, Krefeld) gemessen.

2.3 Statistische Analyse

Zur Pflege der Datenbank wurde Microsoft Excel 2011 verwendet. Zur Analyse von Verteilungen, zum Erstellen von Kaplan-Meyer-Diagrammen, zur Signifikanzanalyse mittels Student-T-Test und Wilcoxon-Mann-Whitney-Test sowie zum Berechnen des relativen Risikos und der Odds-Ratio wurde das Statistikprogramm JMP 11 für Mac (SAS-Institute Inc., Cary, North Carolina, USA) verwendet. Hierbei wurde ein p-Wert von $<0,05$ als statistisch signifikant erachtet.

2.3.1 Ereigniszeitanalyse

Bei der Ereigniszeitanalyse wird die Zeit bis zum Eintritt eines bestimmten Ereignisses zwischen Gruppen verglichen. Ein Beispiel zur grafischen Darstellung ist das Kaplan-Meyer-Diagramm. Hierbei wird das Eintreten von Ereignissen gegen die Studiendauer aufgetragen.

Mittels solcher Kaplan-Meyer-Analysen wurden Abbildung 6, Abbildung 7, Abbildung 8, Abbildung 9, Abbildung 10, Abbildung 11 und Abbildung 12 erstellt.

2.3.1.1 Wilcoxon-Mann-Whitney-Test

Mittels Wilcoxon-Mann-Whitney Test wurden die Ereigniszeiten zweier Kohorten statistisch verglichen. Die Nullhypothese in diesem Test ist, dass beide Kohorten aus zufällig zugeordneten Individuen derselben Population bestehen. Ist die Wahrschein-

lichkeit hierfür $<5\%$, so gilt die Nullhypothese als wahrscheinlich widerlegt und die Hypothese als statistisch signifikant. Das Testprinzip beruht darauf, alle Datenpunkte anhand ihres Ranges zu ordnen. In der vorliegenden Studie geschah dies anhand der Zeit bis zum Auftreten eines biochemischen Rezidivs in Monaten. Anschließend wird analysiert, ob die Ränge gleichmäßig über beide Gruppen verteilt sind oder nicht [88].

Diese Signifikanzanalyse fand zur Erstellung der p-Werte für folgende Analysen Anwendung: Einfluss des Alters auf die biochemische Rezidivfreiheit (3.2.2, Abb. 6), Einfluss der Tumorstadien auf die biochemische Rezidivfreiheit (3.2.3, Abb. 7), Einfluss des Gleason-Scores auf die biochemische Rezidivfreiheit (3.2.4, Abb. 8), Einfluss des präoperativen PSA-Werts auf die biochemische Rezidivfreiheit (3.2.5, Abb. 9), Einfluss der präoperativen sRANKL-Konzentration auf die biochemische Rezidivfreiheit (3.4.3, Abb. 10), Einfluss der präoperativen OPG-Konzentration auf die biochemische Rezidivfreiheit (3.4.4, Abb. 11), sowie für den Einfluss des sRANKL-OPG-Quotienten auf die biochemische Rezidivfreiheit (3.4.5, Abb. 12).

2.3.2 Student-T-Test

Der Student T Test vergleicht die Mittelwerte zweier unabhängiger Stichproben. Unabhängig bedeutet im Zusammenhang dieser Studie beispielsweise, dass die Wahrscheinlichkeit für einen Patienten, ein biochemisches Rezidiv zu erleiden nicht dadurch beeinflusst wird, ob andere Patienten bereits ein biochemisches Rezidiv erlitten, oder nicht. Darüber hinaus muss eine Normalverteilung vorliegen. Die Nullhypothese in diesem Test ist, dass beide Kohorten aus derselben Grundpopulation stammen, und ihre Mittelwerte ggf. nur durch Zufall nicht übereinstimmen. Ist die statistische Wahrscheinlichkeit, dass beide Kohorten aus der gleichen Grundpopulation stammen $<5\%$, so gilt die Nullhypothese als wahrscheinlich wiederlegt. Vgl. z.B. [89].

Diese Analyse wurde zur Erstellung der p-Werte in folgenden Analysen verwendet: Korrelation zwischen biochemischem Rezidiv und klassischen Risikofaktoren (3.1, Tab. 1), Korrelation von sRANKL-Konzentration und sRANKL-OPG-Quotienten mit etablierten Risikofaktoren (3.3, Tab. 7), sowie dem Vergleich klinischer Daten mit präoperativ gemessenen sRANKL- und OPG-Konzentration (3.3.1, Tab. 8).

2.4 Datenschutz

Auf die Einhaltung der Auflagen des Datenschutzes und die Wahrung der ärztlichen Schweigepflicht wurde bei der Datenerhebung und Datenauswertung größten Wert gelegt. Jede telefonische Befragung wurde zuvor postalisch angekündigt (siehe Abschnitt 2.5). Alle Anrufe wurden von klinikeigenen Telefonanschlüssen getätigt und die erhobenen Informationen wurden ausschließlich auf Papier festgehalten. Die Telefongespräche unterlagen der ärztlichen Schweigepflicht, hierüber wurden die Patienten zu Beginn des Telefonats nochmals ausdrücklich informiert. Erst nach Abschluss der Befragung wurden die Daten an einem klinikeigenen Computer digitalisiert. Die resultierende Datenbank wurde im Anschluss anonymisiert. Einzelne Patienten hatten nur noch eine „Patienten-ID“. Namen, Geburtsdaten, Wohnorte, und Telefonnummern wurden entfernt. Es war kein Rückschluss auf die Identität einzelner Patienten mehr möglich. Erst nach Anonymisierung wurden statistische Analysen an der Datenbank durchgeführt.

2.5 Ethik

Die Serum-Proben waren gemäß dem Votum der Ethik-Kommission Nr. 379/2010BO2 einen Tag vor Prostatektomie mit Einverständnis des Patienten asserviert worden. Die retrospektive Untersuchung dieser Serum-Proben auf Proteine des RANK-Signalweges wurde durch die Vota der Ethik-Kommission Nr. 034/2011BO2 und 113/2012BO2 genehmigt.

Das Versenden eines Informationsbriefes (Siehe Anhang 2) an für die Studie qualifizierte Patienten vor telefonischer Kontaktaufnahme wurde durch die Ethikkommission der Universität Tübingen genehmigt und ausdrücklich empfohlen (Votum 187/2011BO2).

Das Anschreiben enthielt Erläuterungen zu Zweck sowie Inhalt des angekündigten Telefongespräches. Weiterhin wurde mitgeteilt wer der Anrufer sein würde, dass er der ärztlichen Schweigepflicht unterliegt, dass die Teilnahme absolut freiwillig sei und durch Nichtteilnahme keinerlei Nachteile entstehe. Außerdem wurde explizit darauf hingewiesen, dass alle vom Patienten erhobenen Daten streng nach den Richtlinien des Datenschutzes verarbeitet werden (Siehe Abschnitt 2.4).

3 Ergebnisse

3.1 Beschreibung der Studienkohorte

Folgende Angaben beziehen sich auf das endgültig analysierte Kollektiv. Patienten, die aus zuvor genannten Gründen ausgeschlossen worden waren, wurden nicht mit einbezogen.

	Gesamtes Kollektiv (95% CI) n=157	Gruppe mit biochemischem Rezidiv (95% CI) n=34	Gruppe ohne biochemisches Rezidiv (95% CI) n=123	P
Mittelwert Alter (Jahre)	62,20	62,02	62,28	0,85
% T≥3	23,56%	55,56%	11,67%	
Mittelwert Gleason Summe	6,48 (6,31; 6,64)	7,17 (6,86; 7,49)	6,28 (6,10; 6,47)	<0,0001*
Mittelwert [PSA] (ng/ml)	8,61 (7,49; 9,74)	11,08 (7,95; 14,21)	7,93 (6,78; 9,08)	0,03*
Mittelwert [sRANKL] (ng/ml)	170,99 (70,84; 271,13)	146,87 (0; 294,6)	177,6 (55,60; 299,60)	0,74
Mittelwert [OPG] (pg/ml)	75,48 (72,72; 78,75)	68,41 (60,20; 76,54)	77,43 (73,93; 80,93)	<0,05*

Tabelle 1: Korrelation zwischen biochemischem Rezidiv und klassischen Risikofaktoren: Vergleich der Patientengruppe mit vs. der Patientengruppe ohne biochemisches Rezidiv auf die Faktoren Alter, Tumor-Stadium (nach TNM-Klassifikation), Gleason-Summe, präoperativ gemessener PSA-, sRANKL- und OPG-Serumkonzentration.

3.1.1 Altersverteilung

Der Median des Kollektivs lag bei 62,2 Jahren, die Hälfte der Patienten war zwischen 57 und 67 Jahre alt, der jüngste Patient war 43 und der Ältteste 76.

3.1.2 Tumorstadien

Zum Zeitpunkt der Operation hatten 120 Patienten (76%) eine organbegrenzte Tumorausdehnung (T-Stadium niedriger als T3). 36 Patienten (24%) litten zum Zeitpunkt der Operation an einem die Prostatakapsel überschreitenden Prostatakarzinom (T3a oder darüber). Die genaue Stadienverteilung ist in Tabelle 2 dargestellt.

T-Stadium	Anzahl	Prozent
T1c	2	1,2%
T2	1	0,6%
T2a	26	16,6%
T2b	3	1,9%
T2c	88	56,4%
T3a	21	13,4%
T3b	9	5,7%
T4	6	3,8%
Gesamt	156	100,0%

Tabelle 2: Verteilung der Tumorstadien: 76% der Patienten hatten ein T-Stadium niedriger als T3. 6 Patienten (4%) hatten einen N1-Status und keiner der Patienten hatte einen M1-Status.

3.1.3 Gleason-Summe

Die Verteilung der präoperativen Gleason-Summen sind in Tabelle 3 dargestellt. 70 Patienten (44,8%) hatten eine Gleason-Summe zwischen 3 und 6, 67 Patienten (42,9%) einen Gleason Score von 7, und 19 Patienten (12,1%) einen Gleason Score von 8 oder 9.

Gleason-Summe	Anzahl	Prozent
3	1	0,6%
4	1	0,6%
5	30	19,2%
6	38	24,4%
7	67	42,9%
8	14	8,9%
9	5	3,2%
Gesamt	156	100,0%

Tabelle 3: Verteilung der Gleason-Summe: Bei 67,1% aller Patienten fand sich ein Gleason-Score von 6 oder 7. Der Median lag bei 7.

3.1.4 PSA-Werte

Der Median der PSA-Wert Verteilung lag bei 7,1 ng/ml. Die Verteilung der präoperativen PSA Werte ist in Tabelle 4 dargestellt.

Quantilen	Beschreibung	[PSA] in ng/ml
100%	Maximum	55,80
75%	Obere Quartile	9,98
50%	Median	7,10
25%	Untere Quartile	4,87
0%	Minimum	0,36

Tabelle 4: Präoperativ gemessene PSA-Verteilung.

3.1.5 sRANKL Serum-Konzentrationen

Bei den präoperativ gemessenen sRANKL-Serum-Konzentrationen ergab sich eine sehr große Amplitude. Das Minimum lag bei 15,6 pg/ml, das Maximum bei 5,49 µg/ml. Eine grafische und tabellarische Darstellung finden sich in Abb. 4 und Tab. 5.

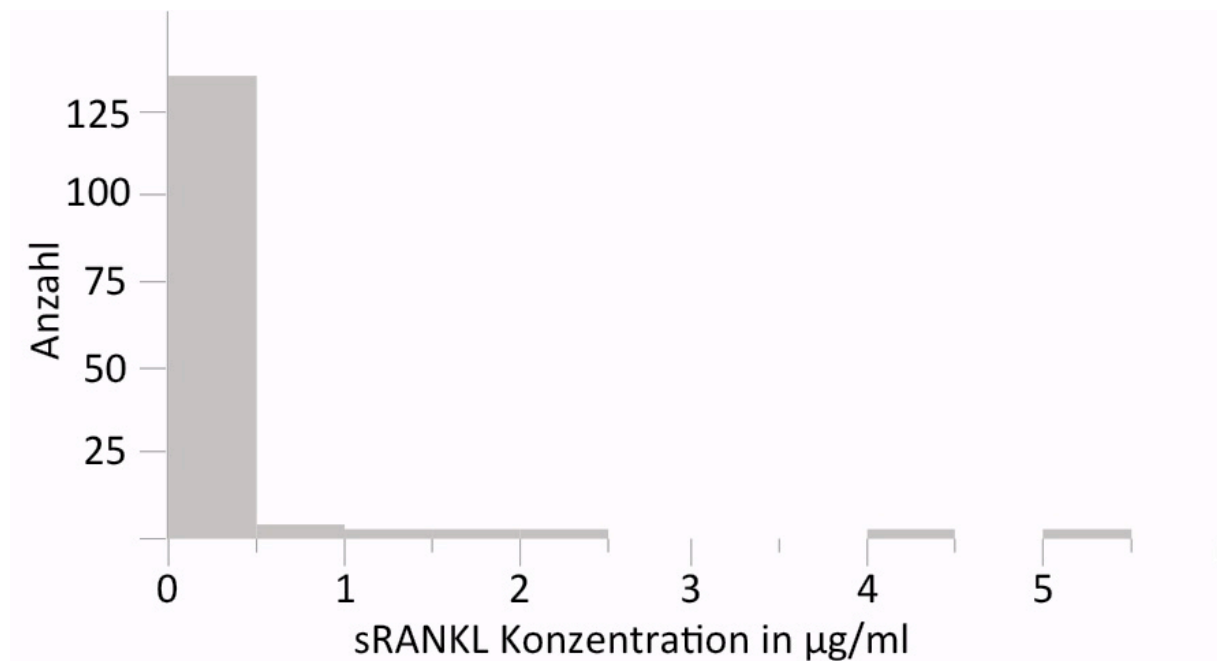


Abbildung 4: Grafische Darstellung der Verteilung der präoperativen sRANKL-Serumkonzentrationen.

Quantilen	Beschreibung	[sRANKL] in pg/ml
100%	Maximum	5,5 µg/ml
75%	Obere Quartile	49,7 ng/ml
50%	Median	11,2 ng/ml
25%	Untere Quartile	15,6 pg/ml
0%	Minimum	15,6 pg/ml

Tabelle 5: Tabellarische Darstellung der Verteilung der präoperativen sRANKL-Serumkonzentrationen.

3.1.6 OPG Serum-Konzentrationen

Die grafische und tabellarische Darstellung der präoperativen Serum-OPG-Konzentrationen findet sich in Abb. 5 und Tab. 6. Der Median lag bei 74,4 pg/ml, das Maximum bei 211,2 pg/ml und das Minimum bei 20,2 pg/ml.

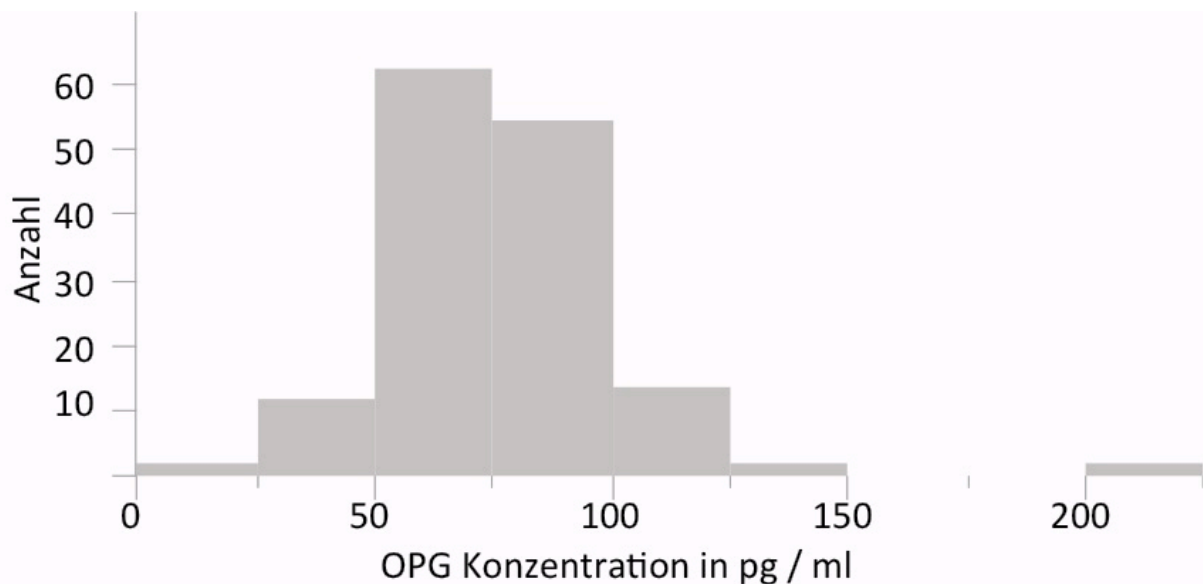


Abbildung 5: Grafische Darstellung der Verteilung der präoperativen OPG-Serumkonzentrationen.

Quantilen	Beschreibung	[OPG] in pg/ml
100%	Maximum	211,2
75%	Obere Quartile	85,1
50%	Median	74,4
25%	Untere Quartile	66,8
0%	Minimum	20,2

Tabelle 6: Tabellarische Darstellung der Verteilung der präoperativen OPG-Serumkonzentrationen.

3.2 Korrelation etablierter Risikofaktoren mit rezidivfreier Überlebenszeit

Da es sich bei dem vorliegenden Kollektiv um eine Stichprobe (N=157) handelt, muss davon ausgegangen werden, dass die hier erfassten Ergebnisse von der Wirklichkeit abweichen. Eine Möglichkeit, die prädiktive Aussagekraft der vorliegenden rezidivfreien Überlebenszeiten einzuschätzen ist zu überprüfen, ob die klinisch etablierten und zu diesem Kollektiv vorliegenden Risikofaktoren T-Stadium, Gleason-Score, und präoperative Konzentration des PSA-Wertes im Stande sind, diese rezidivfreien Überlebenszeiten vorherzusagen. In einer die Realität repräsentierenden Stichprobe wäre zu erwarten, dass ein Vorliegen dieser Risikofaktoren statistisch mit einer geringeren rezidivfreien Überlebenszeit einhergeht.

3.2.1 Metastasenbildung und tumorabhängiges Versterben

Im Laufe der Studiendauer kam es bei sieben Patienten zur Ausbildung von Metastasen und drei Patienten verstarben an den Folgen ihres Prostatakarzinoms.

3.2.2 Alter

Die Kaplan Meier Analyse des Einflusses des Alters bei Operation auf die biochemische Rezidivfreiheit in Monaten ist in Abb. 6 dargestellt. Es werden Patienten mit einem Alter über 63 Jahren mit Patienten mit einem Alter von 63 Jahren oder darunter verglichen ($p=0,56$).

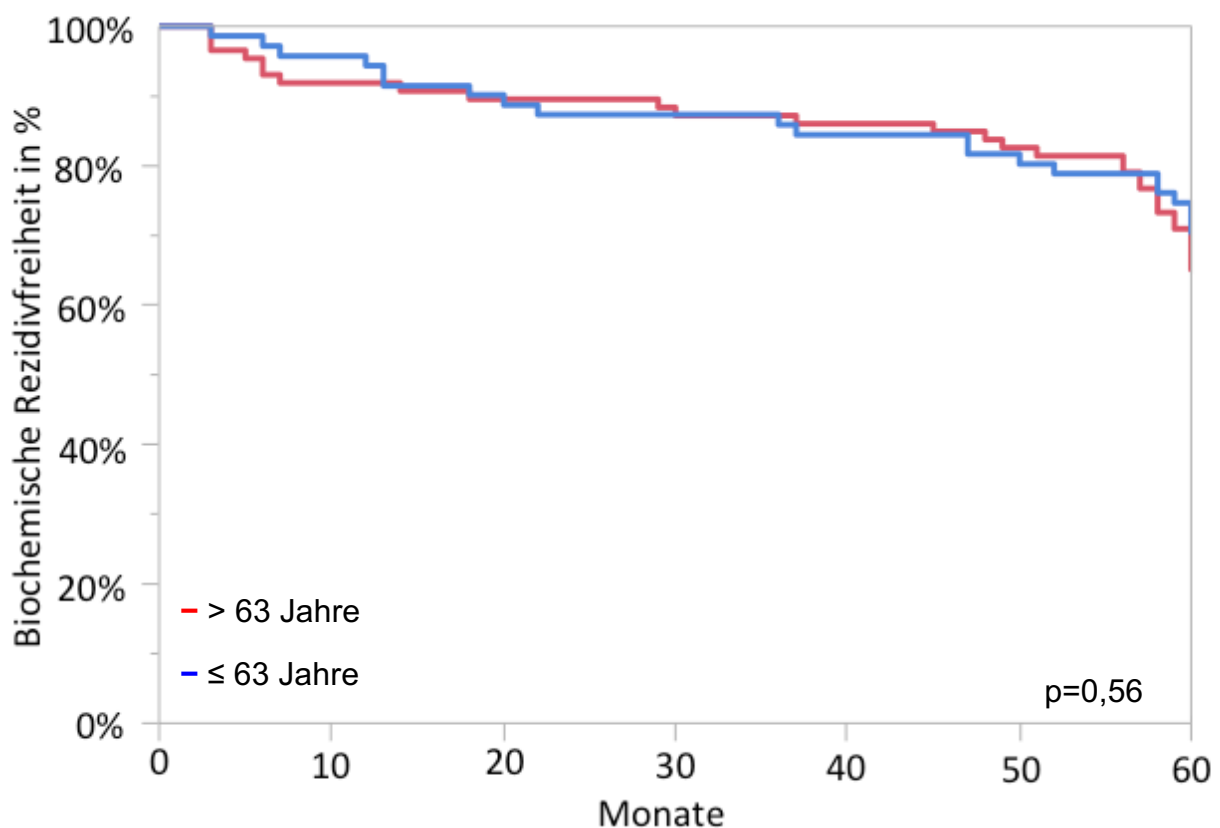


Abbildung 6: Kaplan-Meier-Analyse des Einflusses des Alters zum Zeitpunkt der radikalen Prostatektomie auf die biochemische Rezidivfreiheit in Monaten. Der Median der Studienpopulation lag bei 63 Jahren. Das rezidivfreie Fünf-Jahres-Überleben der Patienten, deren Alter zum Zeitpunkt der Operation über dem Median lag ist in Rot dargestellt. Dasjenige der Patienten, deren Alter auf oder unter dem Median lag ist in blau dargestellt. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

3.2.3 Tumorstadien

Die Kaplan Meier Analyse des Einflusses des pathologischen T-Stadiums bei Operation auf die biochemische Rezidivfreiheit in Monaten ist in Abb. 7 dargestellt. Es werden Patienten mit einem T-Stadium $< pT3$ mit Patienten mit einem pathologischen T-Stadium $\geq pT3$ verglichen ($p < 0,001$).

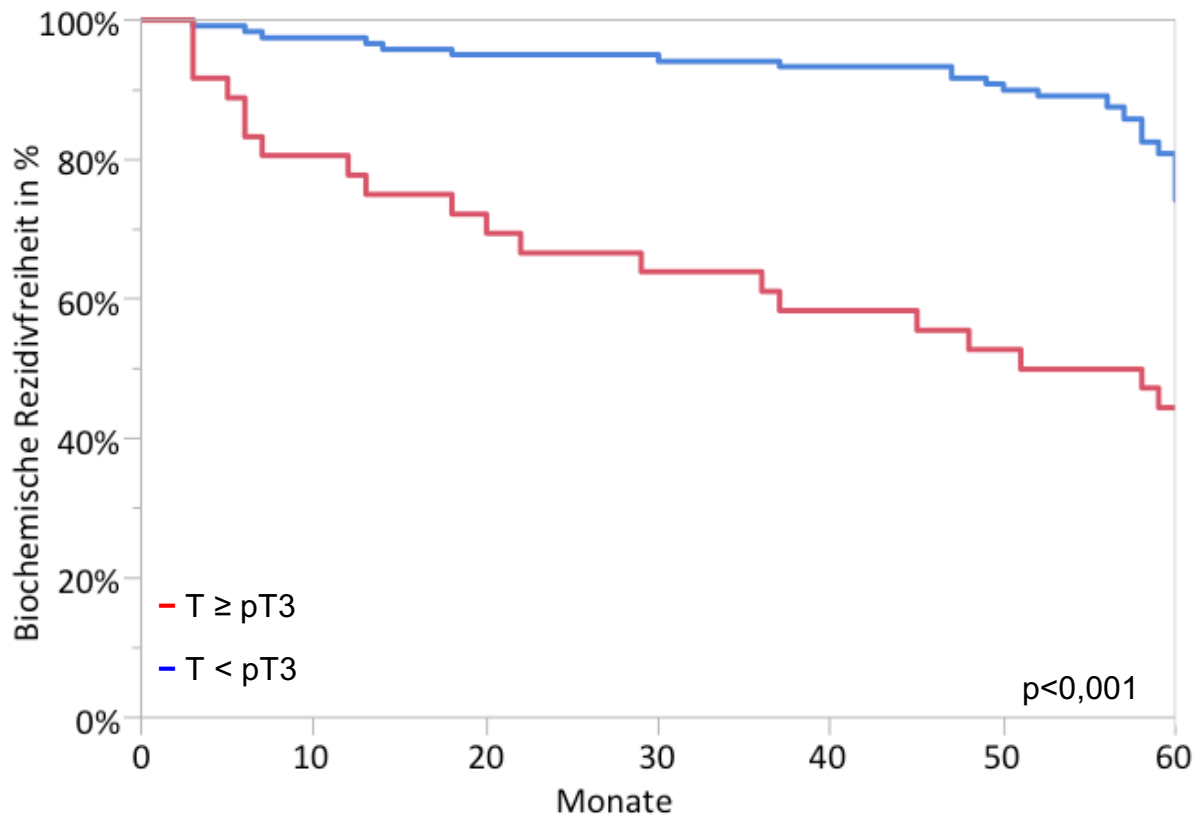


Abbildung 7: Kaplan-Meier-Analyse des Einflusses des pathologischen T-Stadiums zum Zeitpunkt der radikalen Prostatektomie auf die biochemische Rezidivfreiheit. Die blaue Kurve repräsentiert Patienten mit pathologischem Tumorstadium $< pT3$. Die rote Kurve die der Patienten mit $\geq pT3$ ($p < 0,001^*$).

3.2.4 Gleason-Summe

Die Kaplan Meier Analyse des Einflusses der Gleason-Summe bei Operation auf die biochemische Rezidivfreiheit in Monaten ist in Abb. 8 dargestellt. Es werden Patienten mit Gleason-Score 3-6 mit Patienten mit Gleason-Score 7 und mit Patienten mit Gleason-Score >7 miteinander verglichen ($p=0,047$).

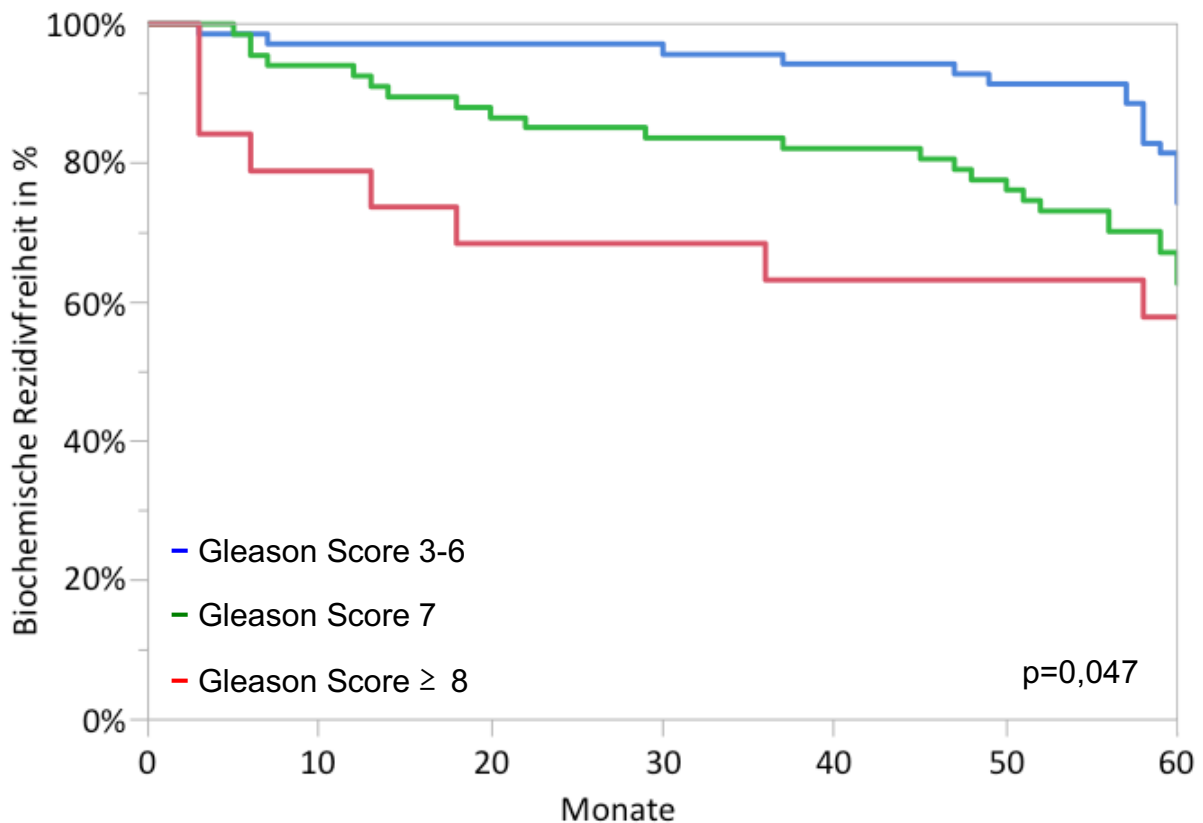


Abbildung 8: Kaplan-Meyer-Analyse des Einflusses der Gleason-Summe zum Zeitpunkt der radikalen Prostatektomie auf die biochemische Rezidivfreiheit. Die blaue Kurve repräsentiert die Patienten mit Gleason-Score von 3-6, die grüne Kurve die mit Gleason-Score von 7, und die rote Kurve die mit Gleason-Score ≥ 8 ($p=0,047$).

3.2.5 PSA-Werte

Die Kaplan Meier Analyse des Einflusses der Blut-PSA-Konzentration einen Tag vor Operation auf die biochemische Rezidivfreiheit in Monaten ist in Abb. 9 dargestellt. Es werden Patienten mit PSA > 10 ng/ml mit Patienten mit PSA ≤ 10 ng/ml verglichen (p=0,05).

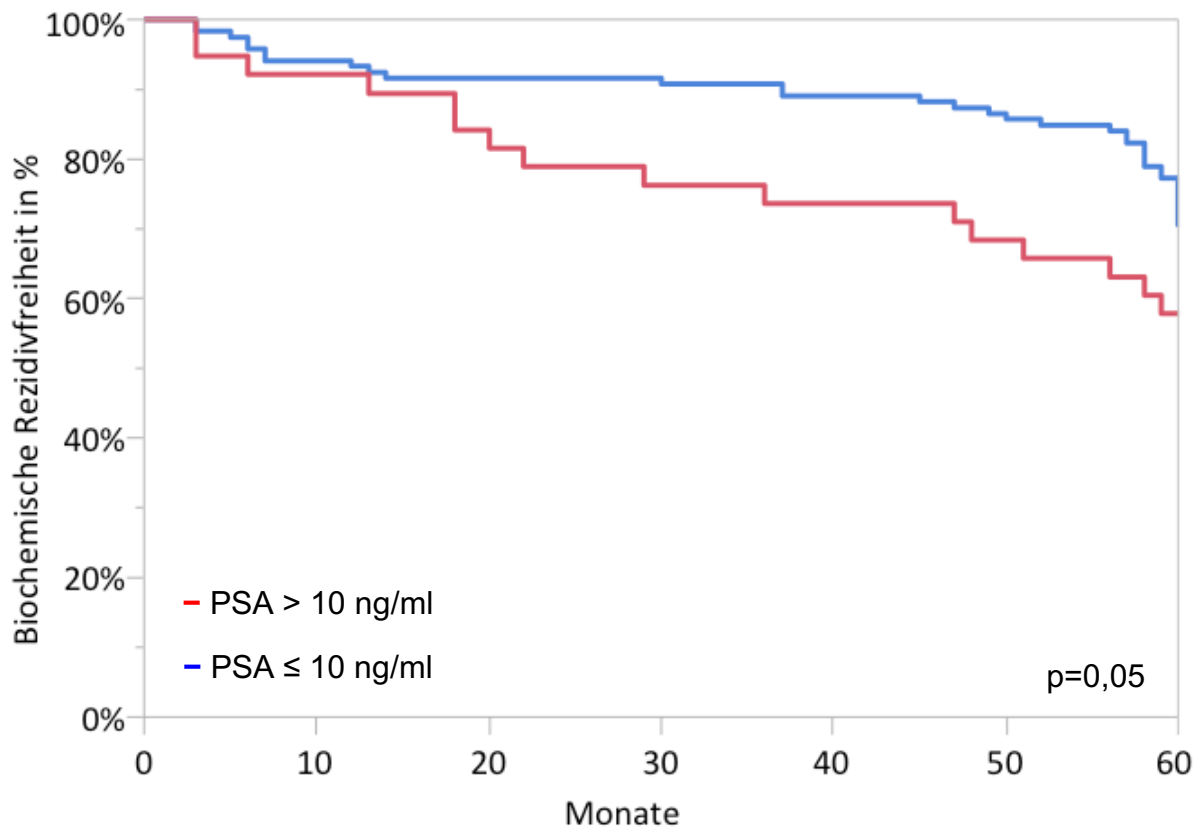


Abbildung 9: Kaplan-Meier-Analyse des Einflusses der Blut-PSA-Konzentration zum Zeitpunkt der radikalen Prostatektomie auf die biochemische Rezidivfreiheit. Die blaue Kurve repräsentiert die Patienten mit einem präoperativ bestimmten PSA-Wert von 10 ng/ml oder niedriger, die rote Kurve die mit PSA-Wert von über 10 ng/ml (p=0,05).

3.3 Korrelation von sRANKL-Konzentration und sRANKL-OPG-Quotienten mit etablierten Risikofaktoren

In Tabelle 7 wird die Serum-sRANKL-Konzentration und der sRANKL/OPG-Quotient mit den etablierten Risikofaktoren PSA-Wert, Gleason-Summe und pathologischem T-Stadium verglichen.

	[sRANKL] < Median (KI)	[sRANKL] ≥ Median (KI)	P
PSA Mittelwert	8,7 (7,1; 10,3) ng/ml	8,5 (6,9; 10,1) ng/ml	0,88
Gleason-Summe			
Median	7	6	
T-Stadium			
Median	T2b	T2b	

	[sRANKL] / [OPG] ≤ Median (KI)	[sRANKL] / [OPG] > Median (KI)	P
PSA Mittelwert	8,6 (7; 10,2) ng/ml	8,6 (7; 10,2) ng/ml	0,98
Gleason-Summe			
Median	7	6	
T-Stadium			
Median	T2b	T2b	

Tabelle 7: Vergleich der sRANKL-Serumkonzentrationen und des sRANKL-OPG-Quotienten mit den klassischen Risikofaktoren PSA-Wert, Gleason-Summe und pathologisches T-Stadium. Das Kollektiv wurde jeweils dichotomisiert, im oberen Abschnitt anhand der sRANKL-Serumkonzentration und im unteren Abschnitt anhand des sRANKL-OPG-Quotienten. Die Tabelle stellt jeweils den Vergleich der etablierten Risikofaktoren PSA, Gleason-Summe und T-Stadium zwischen diesen Gruppen dar.

3.3.1 Vergleich der klinischen Daten mit präoperativ gemessenen sRANKL- und OPG-Serumkonzentrationen

Tabelle 8 stellt Zusammenhänge zwischen pT-Stadium, Gleason-Score, und präoperativer PSA-Serumkonzentration sowie dem Alter der Patienten mit den präoperativen Serum-sRANKL- und OPG-Konzentrationen dar.

Variable	n	ø[sRANKL] (CI) in ng/ml	P	ø[OPG] (CI) in pg/ml	P
Tumor Stadium					
pT ≥ 3	36	11,4 (0,015; 1013,3)	0,94	73,2 (20,2; 127,2)	0,57
pT < 3	120	10,4 (0,015; 5499,2)		74,7 (32,2; 211,2)	
Gleason-Score					
≥ 7	86	9,0 (0,015; 2362,7)	0,23	75,1 (20,2; 127,2)	0,88
< 7	70	12,5 (0,015; 5499,2)		74,1 (32,6; 211,2)	
Präoperatives PSA					
> 10 ng/ml	38	14,8 (0,015; 1013,3)	0,45	73,1 (29,6; 101,4)	0,25
≤ 10 ng/ml	119	9,8 (0,015; 5499,2)		75,2 (20,2; 211,2)	
Alter					
> 63 Jahre	70	12,8 (0,015; 2362,7)	0,95	78,0 (36; 211,2)	0,02*
≥ 63 Jahre	88	9,6 (0,015; 5499,2)		73,1 (20,2; 127,2)	

Tabelle 8: Korrelation von sRANKL und OPG-Serumkonzentrationen mit etablierten Risikofaktoren sowie dem Alter. Das Patientenkollektiv wurde anhand der Charakteristika Tumor-Stadium, Gleason-Score, präoperativ gemessenes PSA und Alter dichotomisiert und auf Unterschiede in den präoperativen sRANKL und OPG Konzentrationen verglichen.

3.4 Korrelation von sRANKL und OPG mit rezidivfreier Überlebenszeit

Im vorigen Abschnitt wurde gezeigt, dass die etablierten Marker T-Stadium, präoperativ gemessener PSA-Wert und Gleason-Score die im Zuge dieser Studie erhobene progressionsfreie Überlebenszeit vorherzusagen vermögen. Nun soll untersucht werden, ob auch die klinisch nicht etablierten Serummarker sRANKL und OPG mit der rezidivfreien Überlebenszeit korrelieren.

3.4.1 sRANKL und OPG dichotomisiert vs. biochemisches Rezidiv

Für Tab. 9 wurden die Serum-sRANKL-Konzentrationen, die Serum-OPG-Konzentrationen und deren Quotienten dichotomisiert und gegen das Auftreten eines biochemischen Rezidivs aufgetragen. Tab. 10 zeigt das entsprechende relative Risiko und die Odds-Ratio für Patienten in der jeweiligen Gruppe.

	Gesamtes Kollektiv n=157	biochemisches Re- zidiv (n= 34)	Kein biochemisches Rezidiv (n= 123)
n [sRANKL]			
≥ Median	79 von 157	22 von 79 (28%)	57 von 79 (72%)
< Median	78 von 157	12 von 78 (15%)	66 von 78 (85%)
n [OPG]			
> Median	78 von 157	14 von 78 (18%)	64 von 78 (82%)
≤ Median	79 von 157	20 von 79 (25%)	59 von 79 (75%)
n ([sRANKL] / [OPG])			
> Median	78 von 157	23 von 78 (30%)	55 von 78 (70%)
≤ Median	79 von 157	11 von 79 (14%)	68 von 79 (86%)

Tabelle 9: Korrelation von nach Dichotomisierung erhöhtem sRANKL, OPG, oder sRANKL-OPG-Quotienten mit biochemischem Rezidiv. Es werden Patienten, bei denen nachgewiesenermaßen ein biochemisches Rezidiv auftrat (N=34), mit Patienten verglichen, bei denen zum Zeitpunkt ihrer letzten PSA-Messung noch kein biochemisches Rezidiv aufgetreten war (N=123). Vergleichskriterien sind Anteil der Patienten dieser Gruppen mit einer sRANKL-Konzentration auf oder über dem Median, sowie einer OPG-Konzentration und einem sRANKL-OPG-Quotienten oberhalb des jeweiligen Medians.

	Relatives Risiko (CI)	Odds-Ratio (CI)
n [sRANKL] \geq Median	1,81 (0,96; 3,40)	2,19 (0,99; 4,82)
n [OPG] > Median	0,71 (0,39; 1,30)	0,65 (0,30; 1,39)
n ([sRANKL] / [OPG]) > Median	2,12 (1,11; 4,04)	2,59 (1,56; 5,76)

Tabelle 10: Relatives Risiko und Odds-Ratio für das Auftreten eines biochemischen Rezidivs bei nach Dichotomisierung erhöhtem sRANKL-, OPG- sowie erhöhtem sRANKL-OPG-Quotienten.

3.4.2 Korrelation der präoperativen sRANKL-Serumkonzentration mit der Zeit bis zum Auftreten eines biochemischen Rezidivs

Die Kaplan Meier Analyse des Einflusses einer Serum-sRANKL-Konzentration auf oder oberhalb des Medians einen Tag vor Operation auf die biochemische Rezidivfreiheit in Monaten ist in Abb. 10 dargestellt ($p=0,02^*$).

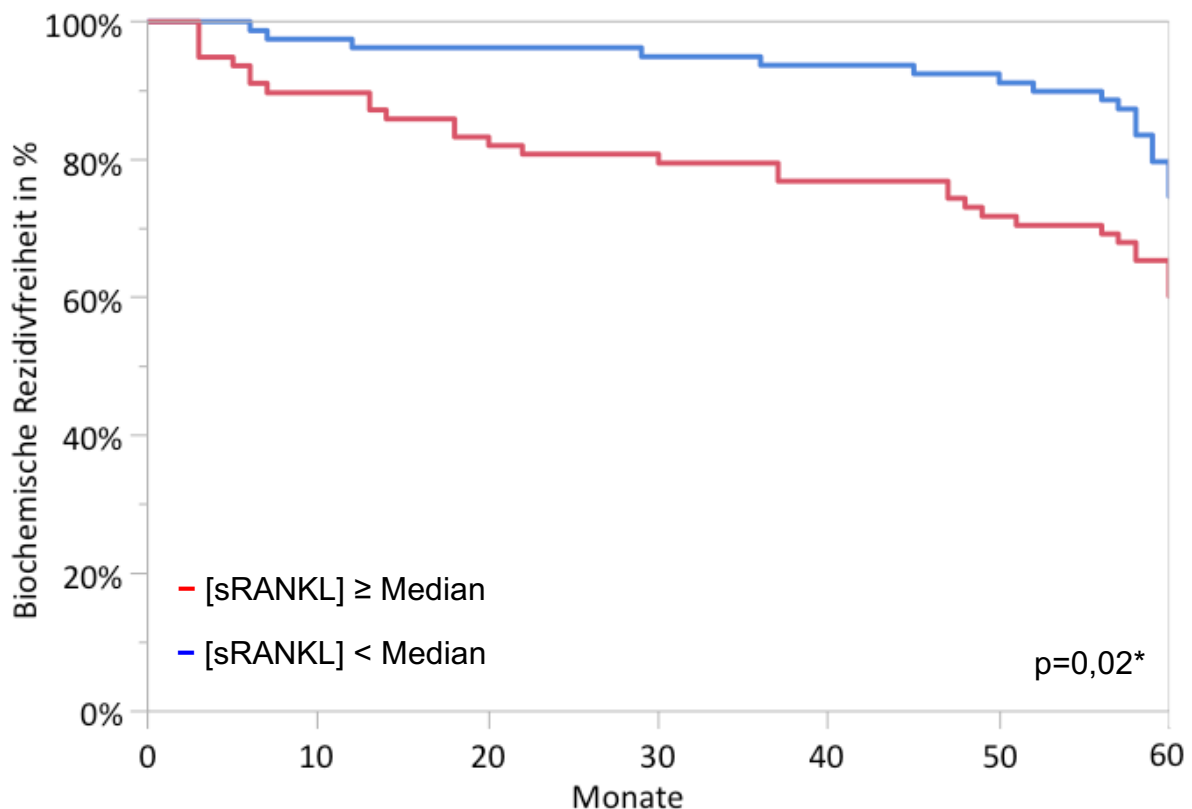


Abbildung 10: Kaplan-Meier-Analyse des Einflusses der Serum-sRANKL-Konzentration zum Zeitpunkt der radikalen Prostatektomie auf die 5-jährige biochemische Rezidivfreiheit. Die blaue Kurve repräsentiert die Patienten mit einem präoperativen sRANKL-Serumwert unterhalb des Medians ($=11,24 \mu\text{g/ml}$), die rote Kurve das der Patienten mit einem präoperativen sRANKL-Serumwert auf oder oberhalb des Medians ($p=0,02^*$).

3.4.3 Korrelation der präoperativen OPG-Serumkonzentration mit der Zeit bis zum Auftreten eines biochemischen Rezidivs

Die Kaplan Meier Analyse des Einflusses einer Serum-OPG-Konzentration oberhalb des Medians einen Tag vor Operation auf die biochemische Rezidivfreiheit in Monaten ist in Abb. 11 dargestellt ($p=0,12$).

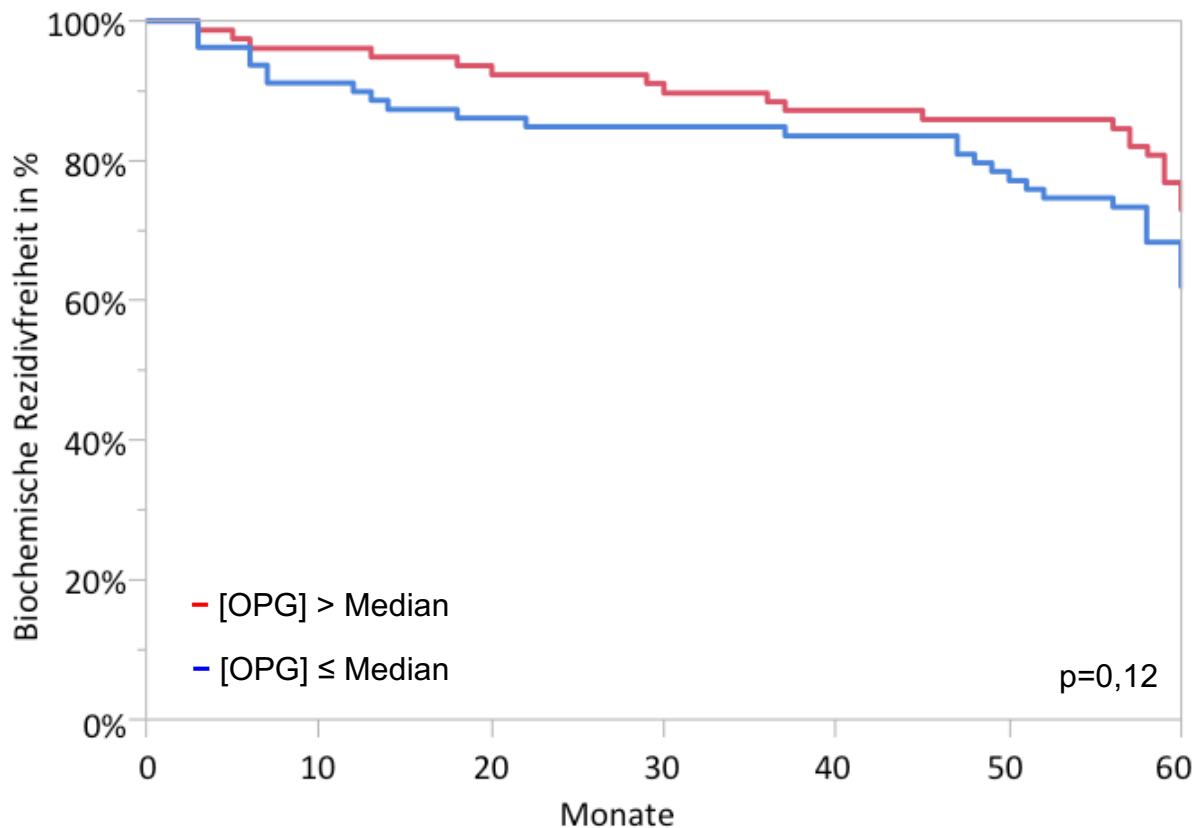


Abbildung 11: Kaplan-Meyer-Analyse des Einflusses der Serum-OPG-Konzentration auf die biochemische Rezidivfreiheit. Die blaue Kurve repräsentiert Patienten mit einer OPG-Konzentration auf oder unterhalb des Medians (= 74,4 pg/ml), die rote Kurve Patienten mit OPG-Konzentrationen oberhalb des Medians ($p=0,12$).

3.4.4 Korrelation des sRANKL-OPG-Quotienten mit dem progressionsfreien Überleben

Die Kaplan Meier Analyse des Einflusses eines sRANKL-OPG-Quotienten oberhalb des Medians einen Tag vor Operation auf die biochemische Rezidivfreiheit in Monaten ist in Abb. 12 dargestellt ($p=0,029^*$).

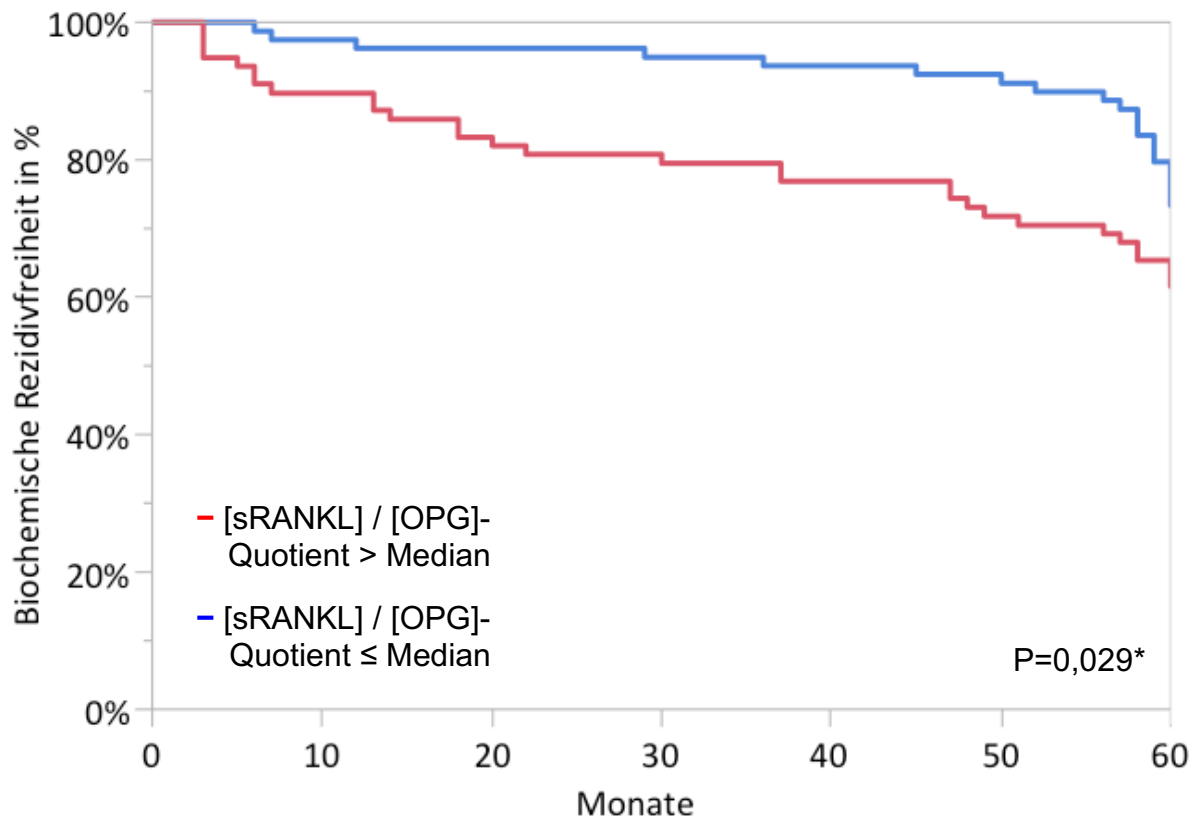


Abbildung 12: Kaplan-Meier-Analyse des Einflusses des sRANKL-OPG-Quotienten auf die biochemische Rezidivfreiheit. Die blaue Kurve repräsentiert Patienten mit [sRANKL] / [OPG]-Quotient auf oder unterhalb des Medians (Median Cut-off = 147), die rote Kurve Patienten mit [sRANKL] / [OPG]-Quotient oberhalb des Medians ($p=0,029^*$).

4 Diskussion

Die Rolle des RANKL-RANK-Signalwegs und der mit ihm in Zusammenhang stehenden Dysregulation des NF κ B-Signalweges ist schon seit Längerem Gegenstand intensiver Forschung. Die relativ hohe Konzentration von RANKL und RANK in Knochen-, Lymph- und Brustdrüsengewebe [37] lässt auf eine Rolle in der lokalen Stoffwechselregulation dieser Gewebe schließen. Eine nachgewiesene Rolle spielen RANKL und RANK physiologischerweise als Faktor bei der Aktivierung, Stimulierung und dem Überleben von Osteoklasten-Synzytien [77]. Darüber hinaus wurde eine essentielle Rolle bei der embryonalen Entwicklung der laktierenden Brustdrüse und des Lymphsystems [71] beschrieben. Weiterhin scheint der RANKL-RANK-Signalweg aber auch eine Rolle in der Biologie verschiedener Tumorarten zu spielen. Es wurde gezeigt, dass Veränderungen der sRANKL- und OPG-Konzentrationen im Serum, im Knochenmark und auch im primären sowie metastatischen Tumorgewebe von Patienten mit fortgeschrittenen Stadien des Prostatakarzinoms auftreten [82, 86], und dass der RANKL-RANK-Signalweg eine Rolle in der Pathogenese des Prostatakarzinoms spielt [87]. Daher stellte sich nunmehr die Frage, ob die Konzentrationen dieser Signalmoleküle im Serum von Patienten mit lokal begrenztem Prostatakarzinom möglicherweise eine Aussagekraft über deren Rezidivwahrscheinlichkeit nach radikaler Prostatektomie besitzen könnten.

Die vorliegende Studie konnte zeigen, dass eine erhöhte präoperative sRANKL-Konzentration und ein erhöhter präoperativer sRANKL-OPG-Quotient unabhängige Prädiktoren für das postoperativ vermehrte Auftreten eines biochemischen Rezidivs darstellen. Eine verminderte OPG-Konzentration wies zwar auf ein erhöhtes Risiko für ein biochemisches Rezidiv hin, jedoch erwies sich dieser Trend nach statistischer Analyse als nicht signifikant.

4.1 Etablierte Risikofaktoren korrelieren mit Zeit bis zum biochemischen Rezidiv, nicht jedoch mit sRANKL-Konzentration oder sRANKL-OPG-Quotient

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die etablierten Risikofaktoren T-Stadium, PSA-Wert und Gleason-Summe erwartungsgemäß mit der Wiederauftretswahrscheinlichkeit eines Prostatakarzinoms nach radikaler Prostatektomie korrelieren. Sie

korrelieren allerdings nicht mit der sRANKL-Konzentration und dem sRANKL-OPG-Quotienten (Siehe Abschnitt 3.2 bis 3.5). Es handelt sich somit beim sRANKL-OPG-Quotienten um eine von den etablierten Risikofaktoren unabhängige Variable (siehe Tab. 7 und Tab. 8). Dies bedeutet, dass die Bestimmung dieser Werte einen zusätzlichen Nutzen zur Analyse der etablierten Risikofaktoren erwarten lässt.

4.2 Erhöhtes OPG bei Patienten über 63 Jahren

Wie aus Tabelle 9 ersichtlich ist, war das OPG bei Patienten über 63 Jahren signifikant erhöht im Vergleich zu Jenen jünger als 63 Jahre ($p=0,02$). Diese Erkenntnis deckt sich mit anderen Studien, welche ebenfalls eine mit dem Alter ansteigende OPG-Plasmakonzentration zeigten. Diese lässt sich sowohl in weiblichen [90], als auch in gemischten Kohorten [91] feststellen. Kudlacek et al. konnten zeigen, dass OPG physiologischerweise bei Frauen ab dem 60. Lebensjahr und bei Männern ab dem 70. Lebensjahr ansteigt, jeweils 2,1 pg/ml/anno bei Frauen und 1,9 pg/ml/anno bei Männern. Es korrelierte bei beiden Geschlechtern invers mit dem iPTH-Serumspiegel, und bei Frauen zusätzlich mit dem Serum-Östradiol-Spiegel. Es korrelierte allerdings nicht mit der Knochenmineraldichte [92]. Dies lässt vermuten, dass der in dieser Studie gemessene altersabhängige OPG-Anstieg nicht pathophysiologisch mit der Anamnese des Prostatakarzinoms zusammenhängt, sondern Teil des physiologischen Alterungsprozesses zu sein scheint.

4.3 Potentieller Einfluss von Veränderungen des RANKL-RANK-Signalweges auf die Biologie des Prostata-Karzinoms

Es gibt Hinweise darauf, dass der RANKL-RANK-Signalweg eine Rolle bei Migration und zielgerichteter Metastasierung einiger Tumorarten spielt. Jones et al. konnten beispielsweise *in vitro* bei Zellreihen des malignen Melanoms, des Mammakarzinoms und des Prostatakarzinoms eine einem RANKL-Gradienten folgende Zellmigration beobachten, welche durch Zugabe von OPG unterbunden werden konnte. Dies konnten sie ebenfalls *in vivo* beobachten. Bei intrakardialer Injektion maligner Melanomzellen in Mäuse bildeten sich im Verlauf Metastasen in allen langen Knochen, Wirbelkörpern, Ovarien, Nebennieren und dem Plexus choroideus. Bei selbem Vorgehen, aber zusätzlicher Gabe von OPG, kam es zu einer deutlich geringeren Ausbildung von Knochenmetastasen bei sonst gleicher Metastasenausbildung [77]. Prostatakarzinomzellen, welche RANK auf ihrer Oberfläche exprimieren und im Blut zirkulieren,

lieren, könnten durch Chemotaxis in die Gewebe gelockt werden, in denen eine erhöhte RANKL-Konzentration vorherrscht, nämlich der Knochen, das lymphatische System und das Brustdrüsengewebe [37]. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, dass das Prostatakarzinom besonders häufig lymphogen und ossär metastasiert [15]. Diese These wird weiter durch die Ergebnisse von Chen et al. unterstützt, welche eine signifikant höhere RANK-Expression in Knochenmetastasen feststellten, verglichen mit dem Primärtumorgewebe [86] sowie die in dieser Studie gemessene höhere RANKL-Serumkonzentration bei Patienten, welche nach radikaler Prostatektomie ein biochemisches Rezidiv erlitten. Möglicherweise ist die erhöhte RANKL-Serumkonzentration ein Hinweis auf bereits bestehende Mikrometastasen, welche dann nach radikaler Prostatektomie zu einem biochemischen Rezidiv führen.

4.4 Ursprung der beobachteten Serum-sRANKL und -OPG Veränderungen beim lokal begrenzten Prostatakarzinom

Es wurde gezeigt, dass die Knochenmineraldichte bei Patienten mit Prostatakarzinom im Vergleich zu einer altersangepassten Kontrollgruppe schon vermindert ist bevor überhaupt Knochenmetastasen entstanden sind oder eine Androgenentzugstherapie eingeleitet worden ist [93]. Dies suggeriert, dass das Prostatakarzinom bereits im lokal begrenzten Stadium den Knochenstoffwechsel beeinflusst. Präklinische *in vivo* Studien zeigten, dass durch künstlich induzierte Osteoporose, herbeigeführt z.B. durch Vitamin-D-Entzug oder Gabe von Parathormon, die Krankheitsprogression und die Entwicklung von Knochenmetastasen bei Prostatakarzinom-Zellreihen erleichtert wird [94, 95].

Nun stellt sich die Frage, auf welche Weise das lokal begrenzte Prostatakarzinom den Knochenstoffwechsel beeinflussen könnte.

In primären Prostatakarzinomzellen herrscht eine vermehrte RANKL-Konzentration vor [83, 86, 96]. Möglicherweise produzieren Prostatakarzinomzellen RANKL [83], um autolog RANK auf Ihrer Oberfläche zu aktivieren, so den NFκB-Signalweg zu stimulieren und damit ihre Proliferation anzuregen und Apoptose zu vermeiden. Viele Gene, die durch NFκB-Aktivität induziert werden sind mit Tumorzellwachstum, Angiogenese und Invasion assoziiert [97]. Es wurde gezeigt, dass die NFκB-Aktivität in Prostatazellen mit dem Krankheitsstadium und der Malignität stark korreliert [98-100]. Der Pathomechanismus der autologen NFκB-Stimulation mittels des RANKL-RANK-

Signalweges könnte so zum Einen dem Wachstum und der Entdifferenzierung des Karzinoms dienen [97, 101] und zum Anderen als Nebeneffekt den physiologischen Knochenstoffwechsel beeinflussen. Dies könnte dann die Knochenmetastasierung des Karzinoms begünstigen.

Weiterhin könnte es erklären, wieso Patienten mit einer niedrigeren RANKL-Serumkonzentration in dieser Studie weniger häufig ein biochemisches Rezidiv erlitten. Möglicherweise hatten deren Tumoren eine niedrigere NF κ B-Aktivität und damit ein niedrigeres Wachstums- und Invasionspotential.

4.5 Mögliche Bedeutung knochenassoziierter Veränderungen im lokalisierten Tumorstadium

Als weiteren möglichen Effekt des vermehrten Knochenumsatzes bei Patienten mit Prostatakarzinom kann man das Freiwerden von in Knochenmatrix eingeschlossenen Wachstumsfaktoren diskutieren, welche dann in Konsequenz die Prostatakarzinomzellen hämatogen und zu einem späteren Zeitpunkt auch lokal zum Wachstum anregen könnten [102]. Zu diesen Faktoren gehört unter anderem der transforming growth factor β (TGF β), die insulin like growth factors (IGFs) und die bone morphogenic proteins (BMPs), welchen allen ein Einfluss auf die Krankheitsprogression des Prostatakarzinomes nachgewiesen wurde [103-105]. Diese Hypothese geht auf die auf den österreichischen Arzt Ernst Fuchs zurückzuführenden [106] und im Jahre 1889 von Stephen Paget als sog. Seed and Soil-Theorie publizierte Beobachtung [107] zurück, dass das Mikromilieu im Knochen ein besonders guter Ort zur Etablierung einer Prostatakarzinom-Metastase sei. Es ist in diesem Zusammenhang zum Einen denkbar, dass die in Knochensubstanz eingeschlossenen Wachstumsfaktoren das Prostatakarzinom hämatogen am Ort seiner Entstehung stimulieren, und zum Anderen, dass durch gesteigerten Knochenumsatz und damit lokal gesteigertem Platz- und Wachstumsfaktor-Angebot das Ansiedeln von sich in der Blutbahn befindlichen Prostatakarzinomzellen in Knochenumbauzonen erleichtert wird.

4.6 Denosumab

Ein therapeutisches Eingreifen in den RANKL-RANK-Signalweg ist beim Menschen zurzeit mithilfe von Denosumab, einem vollhumanisierten, monoklonalen anti-RANKL-Antikörper möglich. Denosumab zeigte eine höhere Effizienz als Zoledronsäure bei der Prävention von Knochenereignissen bei Patienten, die unter Knochen-

metastasen aufgrund eines Prostata- oder Mammakarzinoms leiden [108]. In einer randomisierten, placebokontrollierten Phase-3 Studie wurden 1432 metastasenfrie Patienten mit hormonrefraktärem Prostatakarzinom entweder mit Denosumab oder mit Placebo behandelt. Der primäre Endpunkt war knochenmetastasenfreies Überleben. In dieser Studie zeigte sich eine Verlängerung des metastasenfrien Überlebens um 4,2 Monate unter Denosumab-Therapie im Vergleich zu Placebo, eine Verlängerung der Zeit bis zum Auftreten der ersten Knochenmetastase um 3,7 Monate und eine 33% niedrigere Wahrscheinlichkeit, dass Knochenmetastasen symptomatisch werden. Das Gesamtüberleben zwischen den Gruppen unterschied sich nicht [109]. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass sich die den Knochenstoffwechsel betreffenden Marker unter Denosumab-Therapie signifikant von denen unter Placebo unterschieden.

4.7 Potentielle klinische Anwendung von Denosumab bei lokal begrenztem Tumorstadium

Die in den vorherigen Abschnitten diskutierten Studienergebnisse erlauben die Vermutung, dass RANKL-Stimulation auch im lokalen Stadium des Prostatakarzinoms zu Wachstum und zur Entdifferenzierung beiträgt. Aus diesem Grund wäre es sinnvoll zu untersuchen, ob durch Denosumab- oder OPG-Gabe bei Patienten mit hochdifferenziertem, nicht organüberschreitendem Prostatakarzinom eine Progressionsverzögerung zu erreichen wäre. Dies könnte beispielsweise im Rahmen einer randomisierten, doppelblinden Time-to-Progression-Studie untersucht werden. Für diese Studie würden sich Patienten eignen, die sich bei wenig riskantem, organbegrenztem Prostatakarzinom für Active Surveillance entscheiden. Hier könnte eine Gruppe mit Denosumab behandelt werden und die andere Gruppe mit Placebo. Wäre die Progressionsrate in der Denosumab-Gruppe geringer, würde dies die Hypothese, dass das Prostatakarzinom schon im lokal begrenzten Stadium auf RANKL-Stimulation zur weiteren Entdifferenzierung angewiesen sein könnte, stützen. Weiterhin könnte bei allen Patienten das Tumorgewebe aus den Stanzbiopsaten auf den Grad der RANKL- und RANK Expression untersucht werden, um zu beobachten, ob sich speziell bei der Untergruppe, welche RANKL und RANK exprimiert, die Zeit bis zur Stadienprogression verlängert. Zusätzlich könnte untersucht werden, ob der Grad der NFκB-Aktivität im Nucleolus mit der RANKL- und RANK-Expression auf der Zelloberfläche korreliert [99, 110].

4.8 Die sRANKL Konzentration und der sRANKL-OPG-Quotient als Prädiktoren für das biochemische Rezidiv

Bisher wird zur Risikoevaluation und für die Therapieentscheidung eines Prostatakarzinoms hauptsächlich auf die klassischen Risikofaktoren TNM-Stadium, Gleason-Score und PSA-Wert vertraut. Im Gesamtvergleich ist das Prostatakarzinom ein relativ langsam voranschreitendes Malignom und viele Männer erkranken erst in hohem Lebensalter daran. Daher besteht immer die Möglichkeit, dass ein erkrankter Patient nicht an seinem Prostatakarzinom, sondern vorher an einer anderen Erkrankung bzw. einem anderen Ereignis versterben wird. Weiterhin ist zu bedenken, dass eine radikale Prostatektomie mit erheblichem Risiko einhergeht die Lebensqualität des Patienten einzuschränken. Zu den häufigsten Komplikationen zählt Harninkontinenz und erektile bzw. sexuelle Dysfunktion [111]. Es kommt hinzu, dass heutzutage 40-50% aller neu diagnostizierten Prostatakarzinom-Fälle sehr früh im Stadium T1c oder benigner diagnostiziert werden [112]. Aus diesem Grund ist es üblich, auf einer fundierten Entscheidungsgrundlage zu diskutieren ob Watchful Waiting, Active Surveillance oder ein umgehend invasives, kuratives Vorgehen indiziert ist. Hierfür sind Informationen essentiell, die nach Ausschöpfung der konventionellen Diagnostik zur heutigen Zeit nicht immer ausreichend vorliegen. Dazu gehört beispielsweise abschätzen zu können, mit welcher Wahrscheinlichkeit es trotz einer erfolgreichen radikalen Prostatektomie zu einem Tumorrezidiv kommen wird. Zur Zeit kommt es, je nach Studie, bei 15-53% aller Patienten, die sich für einen kurativen Therapieversuch entscheiden im postoperativen Krankheitsverlauf zum Auftreten eines biochemischen Rezidivs [2, 18, 113-115]. Die vorliegende Studie trägt dazu bei, präoperativ das Rezidivrisiko nach radikaler Prostatektomie besser abschätzen zu können. Es wird gezeigt, dass eine präoperativ erhöhte sRANKL Konzentration und ein präoperativ erhöhter sRANKL-OPG-Quotient mit einer signifikant höheren Rezidivwahrscheinlichkeit nach radikaler Prostatektomie einhergehen.

Bei Patienten mit einer sRANKL-Serumkonzentration auf oder oberhalb des Medians war der Anteil derer, die nach fünf Jahren kein biochemisches Rezidiv erlitten 72%, und unterhalb des Medians 85% (Tab. 9; Abb. 10, $p=0,02^*$). Bei Patienten mit einem sRANKL-OPG-Quotienten oberhalb des Medians war der Anteil derer, die in 5 Jahren kein biochemisches Rezidiv erlitten 70%, derer auf oder unterhalb des Medians

86% (Tab. 9; Abb. 12, $p=0,029^*$). Ein sRANKL-OPG-Quotient oberhalb des Medians entspricht daher einem relativen Risiko von 2,12 und einer Odds Ratio von 2,59.

Zahlreiche weitere Serum- und Gewebemarkers wurden bereits beschrieben, welche statistisch mit dem Risiko, früher ein biochemisches Rezidiv zu erleiden, korrelieren. Hierzu gehören z.B. das Human glandular Kallikrein 2 (hK2) [116], Centromere protein F (CENPF) [117], c-Nrf-2 [118], Clusterin [119, 120], p27 [121], Schlüsselproteine apoptotischer Signalwege wie Ki67-LI, bcl-2 und bax [122, 123], P-Cadherin, oder der „EN-switch“ (eine Umkehr des physiologischen Verhältnisses zwischen N-Cadherin und E-Cadherin hin zu mehr N-Cadherin als E-Cadherin im Prostatakarzinomgewebe) [124, 125]. Darüber hinaus wurde ein erhöhtes Rezidivrisiko auch mit dem Vorliegen bestimmter Gene in Zusammenhang gebracht, darunter die Gene rs7827435 [126], c-MYC und PTEN [127], und auch mit dem Vorliegen der microRNA miR-449b [128]. Ein neuartiger, bisher wenig beschriebener Ansatz ist die Blutanalyse auf zirkulierende Tumorzellen [129]. Kattan et al. haben bereits 2003 ihr Nomogramm um die Marker TGF- β 1 und IL6R erweitert und konnten so die prognostische Genauigkeit von 75% auf 83% steigern [130].

Die Sensitivität des RANKL-OPG-Quotienten als Prädiktor für das postoperative Auftreten eines biochemischen Rezidivs innerhalb von fünf Jahren ist für sich betrachtet mit 0,68 relativ ungenau, ebenso seine Spezifität von 0,55. Dies kann verschiedene Ursachen haben. Beispielsweise, dass der RANKL-RANK-Signalweg nicht bei der Ätiopathogenese jedes Prostatakarzinomtyps eine Rolle spielt und seine Proteine somit auch nicht bei jedem Patienten prädiktiven Wert besitzen. Oder aber auch, dass die Messung der sRANKL- und OPG-Konzentration im peripheren Blut keine ausreichende Trennschärfe zulässt. Der diagnostische Zusatznutzen des sRANKL-OPG-Quotienten könnte in Kombination mit anderen Markern trotzdem hoch sein, da man ggf. durch Kombination mit anderen Markern die Sensitivität, wie Kattan et al. schon mit TGF- β 1 und IL6R gezeigt haben [130], steigern kann. Durch Einschließen des RANKL-OPG-Quotienten als zusätzlichen Faktor in dieses könnte die präoperative Aussagekraft möglicherweise nochmals erhöht werden.

Darüber hinaus sollte versucht werden, die Sensitivität und Spezifität des sRANKL-OPG-Quotienten selbst in Zukunft weiter zu verbessern. Mögliche Ansatzpunkte hierfür wären bspw. die Verwendung anderer Messmethoden, die kombinierte Messung

des sRANKL-OPG-Quotienten mit Downstream-Molekülen desselben Signalweges, oder die Bestimmung des sRANKL-OPG-Quotienten in Prostata-Stanzgewebe an Stelle von peripherem Blut. In diesem Zuge sollte evaluiert werden, ob die sRANKL-Konzentration im Blut direkt mit der RANKL-Konzentration in den Prostatakarzinomzellen korreliert, oder ob ggf. eine RANKL-Erhöhung im peripheren Blut erst verzögert oder gar unabhängig von jener im Prostatakarzinomgewebe auftritt. Falls dem so sei, könnte man durch die RANKL-Konzentrationsbestimmung im Prostatastanzbiopsat die prädiktive Aussagekraft dieses Biomarkers möglicherweise steigern.

Eine weitere bisher ungeklärte Frage ist, ob der sRANKL-OPG-Quotient ggf. eine prädiktive Aussagekraft für die Progressionswahrscheinlichkeit bei Patienten mit lokal begrenztem Prostatakarzinom hat. Dies könnte man mit einer prospektiven Studie bei Active Surveillance Patienten untersuchen.

4.9 Konsequenz eines erhöhten sRANKL-OPG-Quotienten für die Therapie des lokal begrenzten Prostatakarzinoms

Der erhöhte sRANKL-OPG-Quotient stellte sich in dieser Studie als unabhängiger Risikofaktor für das Wiederauftreten des Prostatakarzinoms nach erfolgreicher radikaler Prostatektomie dar. Es ist daher zu diskutieren, wie man im Rahmen der optimalen Patientenversorgung auf das Vorhandensein dieses Risikofaktors klinisch reagieren sollte.

Denosumab wurde bisher zur Prävention von Skelett ereignissen bei Patienten mit hormonrefraktärem Prostatakarzinom getestet und führte hier im Vergleich zu Placebo zu einer Verlängerung des metastasenf freien Überlebens, einer Verlängerung der Zeit bis zum Auftreten der ersten Knochenmetastase und einer niedrigeren Wahrscheinlichkeit, dass Knochenmetastasen symptomatisch werden (Siehe Abschnitt 4.4). Die Mehrzahl der Studien zu diesem Thema beschäftigt sich allerdings mit dem palliativen Nutzen einer Denosumab-Therapie bei bereits ausgeschöpften kurativen Therapiemöglichkeiten. Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurde keine Studie beschrieben, welche einen präventiven Nutzen einer Behandlung mit Denosumab für Patienten mit einem lokal begrenzten Prostatakarzinom niedrigen Stadiums untersucht.

Da der sRANKL-OPG-Signalweg, wie diese Studie zeigen konnte, schon im Wachstum des lokal begrenzten Prostatakarzinoms eine Rolle spielt, wäre ein präventiver

Nutzen einer Therapie mit Denosumab im lokal begrenzten Stadium, besonders bei solchen Patienten mit erhöhtem sRANKL-OPG-Quotienten im Serum, durchaus denkbar.

Dies könnte sich in einem verbesserten rezidivfreien Überleben nach radikaler Prostatektomie ausdrücken. Eine prospektive Studie, in der eine Patientenkohorte mit lokal begrenztem Prostatakarzinom in eine mit Denosumab und eine mit Placebo zu behandelnde Gruppe randomisiert würde, könnte hierüber Klarheit schaffen. Würde man das rezidivfreie Überleben dieser beiden Gruppen nach radikaler Prostatektomie vergleichen, ließe sich zum Einen zeigen ob eine perioperative Denosumab-Therapie die Rezidivwahrscheinlichkeit beim Prostatakarzinom senkt, und zum Anderen, ob dieser Effekt bei Patienten mit erhöhtem präoperativen sRANKL-OPG-Quotient ausgeprägter ist als bei Patienten mit niedrigem präoperativen sRANKL-OPG-Quotienten.

4.10 Limitationen der vorliegenden Arbeit

Prospektive Studien sind retrospektiven Studien überlegen [131]. Dies wird u.a. damit begründet, dass retrospektive Studien leichter durch verschiedene Bias-Faktoren verfälscht werden können. Hierzu gehört das Erinnerungsbias, also, dass Patienten oder Ärzte sich ggf. verzerrt an Ereignisse erinnern, und so durch ihre Angaben das Studienergebnis verfälschen. Auch wenn dies in dieser Studie möglich war, ist es doch recht unwahrscheinlich, dass gleichzeitig einem Patienten und seinem behandelnden Arzt Fehler bei der Angabe des Zeitpunktes der Erstdiagnose eines biochemischen Rezidivs unterlaufen. Ein weiteres Bias bei retrospektiven Studien ist der Bestätigungsfehler, bei dem bei exponierten Personen genauer nach dem Eintreten eines Effekts gefahndet wird als bei nicht-exponierten Personen. Dies ist im Falle dieser Studie ebenfalls vernachlässigbar, da der PSA-Wert ein Standard-Nachsorgeparameter ist, und unabhängig vom präoperativen Krankheitsstadium des Patienten regelmäßig bestimmt wird.

Es wäre hingegen möglich, dass beispielsweise durch Nichteinhalten der Nachsorgetermine Patienten zu spät ihre PSA-Messung erhielten und somit ggf. ein aufgetretenes biochemisches Rezidiv zu spät erkannt wurde. Dies könnte das Ergebnis der Studie hinsichtlich ihrer Aussagekraft negativ beeinflusst haben. Es kommt hinzu, dass keine abschließende PSA-Messung durchgeführt wurde, sondern mit den pati-

entenspezifischen Nachsorgeintervallen gearbeitet wurde. Somit blieb die Möglichkeit bestehen, dass Patienten ggf. nach Ende ihrer letzten Messung, innerhalb der Studienperiode doch noch ein biochemisches Rezidiv erlitten haben könnten, welches dann nicht erfasst worden wäre.

Ebenfalls ist zu bedenken, dass die Anzahl der Patienten zu gering war, um die beobachteten Ereignisse auf verlässliche Art und Weise komplexen multifaktoriellen Unabhängigkeitsberechnungen zu unterziehen. Daher kann man nicht sicher feststellen, ob die neu beschriebenen Marker sRANKL und sRANKL-OPG-Quotient auch in weiteren, größer angelegten Studien mit zusätzlichen Variablen unabhängig bleiben werden. Aufgrund der sehr niedrigen Anzahl von Patienten, die im Verlauf der Studie Knochenmetastasen entwickelten, konnte die prognostische Wertigkeit der Serumkonzentrationen von RANKL-Signalwegs-Proteinen auf die Ausbildung von Knochenmetastasen nicht untersucht werden.

5 Zusammenfassung

Eine Vielzahl von Studien zeigte bereits auf, dass der RANKL-RANK-OPG-Signalweg eine bedeutende Rolle in der Pathogenese des Prostatakarzinomes spielt. Die prognostische Wertigkeit der Serumkonzentrationen von RANKL und OPG für das Wiederauftreten eines Prostatakarzinomes nach radikaler Prostatektomie wurde allerdings bisher nicht ausreichend erforscht.

Dies ist die erste Studie, welche die prognostische Wertigkeit von Serum-Proteinen des RANKL-RANK-OPG-Signalweges bei Patienten mit lokal begrenztem Prostatakarzinom untersucht. Es wurde retrospektiv ein Fünf-Jahres-Follow-Up einer Kohorte von 157 Patienten, die sich an der urologischen Universitätsklinik Tübingen einer Prostatektomie unterzogen hatten, erhoben und mit präoperativen Serumkonzentrationen von sRANKL- und OPG verglichen. Eine erhöhte präoperative sRANKL-Konzentration und ein erhöhter präoperativer sRANKL-OPG-Quotient erwiesen sich als unabhängige Prädiktoren für das postoperativ vermehrte Auftreten eines biochemischen Rezidivs. Bei Patienten mit einer sRANKL-Serumkonzentration auf oder oberhalb des Medians war der Anteil derer, die nach fünf Jahren kein biochemisches Rezidiv erlitten 72%, und unterhalb des Medians 85% (Tab. 9; Abb. 10, $p=0,02^*$). Bei Patienten mit einem sRANKL-OPG-Quotienten oberhalb des Medians war der Anteil derer, die in 5 Jahren kein biochemisches Rezidiv erlitten 70%, derer auf oder unterhalb des Medians 86% (Tab. 9; Abb. 12, $p=0,029^*$). Ein sRANKL-OPG-Quotient oberhalb des Medians entspricht daher einem relativen Risiko von 2,12 bzw. einer Odds Ratio von 2,59. Eine verminderte OPG-Konzentration wies zwar auf ein erhöhtes Risiko für ein biochemisches Rezidiv hin, jedoch erwies sich dieser Trend nach statistischer Analyse als nicht signifikant. Es zeigte sich jedoch eine mit anderen Studien übereinstimmende, altersabhängige Steigerung der OPG-Serumkonzentration.

Diese Daten lassen die Hypothese zu, dass ein therapeutisches Eingreifen in den RANKL-Signalweg zu einer verbesserten Krankheitsprognose für Prostatakarzinom-Patienten führen kann. Der Ursprung einer erhöhten sRANKL-Serumkonzentration bei Prostatakarzinompatienten - entweder aus Tumorzellen oder aus dem Knochenmark - bleibt weiterhin zu identifizieren.

6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Anatomie der Prostata.....	9
Abbildung 2: Schematische Darstellung der RANK-vermittelten intrazellulären Signalkaskade	19
Abbildung 3: Vereinfachte Darstellung der RANKL-RANK-OPG-Funktion im Knochen	21
Abbildung 4: Grafische Darstellung der Verteilung der präoperativen sRANKL- Serumkonzentrationen.	33
Abbildung 5: Grafische Darstellung der Verteilung der präoperativen OPG- Serumkonzentrationen.	34
Abbildung 6: Kaplan-Meyer-Analyse des Einflusses des Alters zum Zeitpunkt der radikalen Prostatektomie auf die biochemische Rezidivfreiheit in Monaten	36
Abbildung 7: Kaplan-Meyer-Analyse des Einflusses des pathologischen T-Stadiums zum Zeitpunkt der radikalen Prostatektomie auf die biochemische Rezidivfreiheit.....	37
Abbildung 8: Kaplan-Meyer-Analyse des Einflusses der Gleason-Summe zum Zeitpunkt der radikalen Prostatektomie auf die biochemische Rezidivfreiheit. ...	38
Abbildung 9: Kaplan-Meyer-Analyse des Einflusses der Blut-PSA-Konzentration zum Zeitpunkt der radikalen Prostatektomie auf die biochemische Rezidivfreiheit ...	39
Abbildung 10: Kaplan-Meyer-Analyse des Einflusses der Serum-sRANKL- Konzentration zum Zeitpunkt der radikalen Prostatektomie auf die 5-jährige biochemische Rezidivfreiheit.....	44
Abbildung 11: Kaplan-Meyer-Analyse des Einflusses der Serum-OPG-Konzentration auf die biochemische Rezidivfreiheit.....	45
Abbildung 12: Kaplan-Meyer-Analyse des Einflusses des sRANKL-OPG-Quotienten auf die biochemische Rezidivfreiheit.....	46

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Korrelation zwischen biochemischem Rezidiv und klassischen Risikofaktoren	30
Tabelle 2: Verteilung der Tumorstadien	31
Tabelle 3: Verteilung der Gleason-Summe	32
Tabelle 4: Präoperativ gemessene PSA-Verteilung.	32
Tabelle 5: Tabellarische Darstellung der Verteilung der präoperativen sRANKL-Serumkonzentrationen.	33
Tabelle 6: Tabellarische Darstellung der Verteilung der präoperativen OPG-Serumkonzentrationen.	34
Tabelle 7: Vergleich der sRANKL-Serumkonzentrationen und des sRANKL-OPG-Quotienten mit den klassischen Risikofaktoren PSA-Wert, Gleason-Summe und pathologisches T-Stadium.....	40
Tabelle 8: Korrelation von sRANKL und OPG-Serumkonzentrationen mit etablierten Risikofaktoren sowie dem Alter	41
Tabelle 9: Korrelation von nach Dichotomisierung erhöhtem sRANKL, OPG, oder sRANKL-OPG-Quotienten mit biochemischem Rezidiv	42
Tabelle 10: Relatives Risiko und Odds-Ratio für das Auftreten eines biochemischen Rezidivs bei nach Dichotomisierung erhöhtem sRANKL, OPG sowie erhöhtem sRANKL-OPG-Quotienten.	43

8 Literaturverzeichnis

1. Schünke M, S.E., Schumacher U, *Prometheus, Hals und Innere Organe*. Thieme, 2006.
2. Manski, D., *Urologie-Lehrbuch*. 2012.
3. Rohde V, K.A., Wasem J, Aidelsburger P, *Prostataerkrankungen, in Gesundheitsberichterstattung des Bundes*. 2007.
4. Deutschland, S.B., *Statistik der Sterbefälle nach Geschlecht*. 2012.
5. globocan, *Estimated cancer Incidence, Mortality, Prevalence and Disability-adjusted life years (DALYs) Worldwide in 2008*, in *International Agency for Research on Cancer*. 2008.
6. Manfred Wirth, L.W., Rolf Ackermann, Winfried Alberti, Clemens Albrecht, Bernt Göckel-Beining, Michael Fröhner, Wolfgang Hinkelbein, Kurt Miller, Herbert Rübben, Thomas Wiegel, Johannes Wolff, Bernhard Wörmann, *Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms*. DGU, 2011.
7. Bott, S.R.J., et al., *Prostate cancer management: (1) an update on localised disease*. Postgrad Med J, 2003. **79**(936): p. 575-580.
8. Husmann G, K.P.K.P., Bertz J, Haberland J, Kraywinkel K, Wolf U, *Krebs in Deutschland 2005 / 2006 Häufigkeiten und Trends*. RKI, 2010. **7**(Eine gemeinsame Veröffentlichung des Robert Koch-Instituts und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.).
9. Hebert, J.R., et al., *Nutritional and socioeconomic factors in relation to prostate cancer mortality: a cross-national study*. J Natl Cancer Inst, 1998. **90**(21): p. 1637-47.
10. Denis, L., M.S. Morton, and K. Griffiths, *Diet and its preventive role in prostatic disease*. Eur Urol, 1999. **35**(5-6): p. 377-87.
11. Gong, Z., et al., *Obesity, diabetes, and risk of prostate cancer: results from the prostate cancer prevention trial*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2006. **15**(10): p. 1977-83.
12. Ornish, D., et al., *Intensive lifestyle changes may affect the progression of prostate cancer*. J Urol, 2005. **174**(3): p. 1065-9; discussion 1069-70.
13. Johns, L.E. and R.S. Houlston, *A systematic review and meta-analysis of familial prostate cancer risk*. BJU Int, 2003. **91**(9): p. 789-94.

14. Mottet, N., et al., *Guidelines on Prostate Cancer*. European Association of Urology, 2015.
15. Apolo, A.B., N. Pandit-Taskar, and M.J. Morris, *Novel tracers and their development for the imaging of metastatic prostate cancer*. J Nucl Med, 2008. **49**(12): p. 2031-41.
16. Todenhöfer, T., et al., *[Treatment of metastatic bone disease and treatment-induced osteoporosis in prostate cancer. Evolution of osteoprotective strategies]*. Urologe A, 2011. **50**(9): p. 1055-1063.
17. Gasser, T., *Basiswissen Urologie*. Springer-Verlag, 2011: p. 271.
18. Heidenreich, A., et al., *EAU guidelines on prostate cancer. Part 1: screening, diagnosis, and treatment of clinically localised disease*. Eur Urol, 2011. **59**(21056534): p. 61-71.
19. Humphrey, P.A., *Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate*. Mod Pathol, 2004. **17**(3): p. 292-306.
20. Epstein, J.I., et al., *Update on the Gleason grading system for prostate cancer: results of an international consensus conference of urologic pathologists*. Adv Anat Pathol, 2006. **13**(1): p. 57-9.
21. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, D.K. and AWMF), *Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms, Kurzversion 3.1, AWMF Registernummer: 043/022OL, <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Leitlinien.7.0.html> (Zugriff am: 13.09.2015)*. 2014.
22. Hugosson, J., et al., *Mortality results from the Goteborg randomised population-based prostate-cancer screening trial*. Lancet Oncol, 2010. **11**(8): p. 725-32.
23. Partin, A.W., et al., *Analysis of percent free prostate-specific antigen (PSA) for prostate cancer detection: influence of total PSA, prostate volume, and age*. Urology, 1996. **48**(6A Suppl): p. 55-61.
24. Catalona, W.J., et al., *Measurement of prostate-specific antigen in serum as a screening test for prostate cancer*. N Engl J Med, 1991. **324**(17): p. 1156-61.
25. Hammerer, P. and M. Lein, *Stellenwert der PSA-Bestimmung zur Früherkennung des Prostatakarzinoms*. Dtsch Arztebl International, 2004. **101**(26): p. 1892-.

26. Candas, B., et al., *Evaluation of prostatic specific antigen and digital rectal examination as screening tests for prostate cancer*. Prostate, 2000. **45**(1): p. 19-35.
27. Lee, F., S.T. Torp-Pedersen, and R.D. McLeary, *Diagnosis of prostate cancer by transrectal ultrasound*. Urol Clin North Am, 1989. **16**(4): p. 663-73.
28. Lee, G., et al., *Trans-rectal ultrasound guided biopsy of the prostate: nationwide diversity in practice and training in the United Kingdom*. Int Urol Nephrol, 2007. **39**(1): p. 185-8.
29. Berges R, W.L., *Das 1-2-3 Der Prostata*. 2010: Dachverband der Prostatazentren Deutschlands e.v.
30. Bill-Axelson, A., et al., *Radical prostatectomy versus watchful waiting in early prostate cancer*. N Engl J Med, 2011. **364**(18): p. 1708-17.
31. Mottet, N., et al., *EAU guidelines on prostate cancer. Part II: Treatment of advanced, relapsing, and castration-resistant prostate cancer*. Eur Urol, 2011. **59**(4): p. 572-583.
32. Epstein, J.I., G. Pizov, and P.C. Walsh, *Correlation of pathologic findings with progression after radical retropubic prostatectomy*. Cancer, 1993. **71**(11): p. 3582-93.
33. Anderson, D.M., et al., *A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function*. Nature, 1997. **390**(6656): p. 175-9.
34. Yasuda, H., et al., *Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(7): p. 3597-602.
35. Walsh, N.C., et al., *Activated human T cells express alternative mRNA transcripts encoding a secreted form of RANKL*. Genes Immun, 2013. **14**(5): p. 336-45.
36. Kartsogiannis, V., et al., *Localization of RANKL (receptor activator of NF kappa B ligand) mRNA and protein in skeletal and extraskeletal tissues*. Bone, 1999. **25**(5): p. 525-34.
37. Keck AV, P.M., *Knochenstoffwechsel bei malignen Erkrankungen*. Journal für Mineralstoffwechsel, 2003. **10**: p. 6-11.
38. Boissy, P., et al., *An assessment of ADAMs in bone cells: absence of TACE activity prevents osteoclast recruitment and the formation of the marrow cavity in developing long bones*. FEBS Lett, 2003. **553**(3): p. 257-61.

39. Saito, K., et al., *Conditional inactivation of TNFalpha-converting enzyme in chondrocytes results in an elongated growth plate and shorter long bones*. PLoS One, 2013. **8**(1): p. e54853.
40. Nakashima, T., et al., *Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF-kappaB ligand: modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **275**(3): p. 768-75.
41. Lacey, D.L., et al., *Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation*. Cell, 1998. **93**(2): p. 165-76.
42. Gao, Y.H., et al., *Potential role of cbfa1, an essential transcriptional factor for osteoblast differentiation, in osteoclastogenesis: regulation of mRNA expression of osteoclast differentiation factor (ODF)*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **252**(3): p. 697-702.
43. Roodman, G.D., *Mechanisms of bone metastasis*. N Engl J Med, 2004. **350**(16): p. 1655-1664.
44. Wong, B.R., et al., *The TRAF family of signal transducers mediates NF-kappaB activation by the TRANCE receptor*. J Biol Chem, 1998. **273**(43): p. 28355-9.
45. Hofbauer, L.C., et al., *The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption*. J Bone Miner Res, 2000. **15**(1): p. 2-12.
46. Silva, I. and J.C. Branco, *Rank/Rankl/opg: literature review*. Acta Reumatol Port, 2011. **36**(3): p. 209-18.
47. Kanazawa, K. and A. Kudo, *Self-assembled RANK induces osteoclastogenesis ligand-independently*. J Bone Miner Res, 2005. **20**(11): p. 2053-60.
48. Darnay, B.G., et al., *Activation of NF-kappaB by RANK requires tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 6 and NF-kappaB-inducing kinase. Identification of a novel TRAF6 interaction motif*. J Biol Chem, 1999. **274**(12): p. 7724-31.
49. Wong, B.R., et al., *TRANCE, a TNF family member, activates Akt/PKB through a signaling complex involving TRAF6 and c-Src*. Mol Cell, 1999. **4**(6): p. 1041-9.
50. Ishida, N., et al., *Large scale gene expression analysis of osteoclastogenesis in vitro and elucidation of NFAT2 as a key regulator*. J Biol Chem, 2002. **277**(43): p. 41147-56.

51. Matsuo, K., et al., *Fosl1 is a transcriptional target of c-Fos during osteoclast differentiation*. Nat Genet, 2000. **24**(2): p. 184-7.
52. Takayanagi, H., et al., *Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts*. Dev Cell, 2002. **3**(6): p. 889-901.
53. Walsh, M.C. and Y. Choi, *Biology of the RANKL-RANK-OPG System in Immunity, Bone, and Beyond*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 511.
54. Moynagh, P.N., *The NF-kappaB pathway*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 20): p. 4589-92.
55. Bonizzi, G. and M. Karin, *The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity*. Trends Immunol, 2004. **25**(6): p. 280-8.
56. Memet, S., *NF-kappaB functions in the nervous system: from development to disease*. Biochem Pharmacol, 2006. **72**(9): p. 1180-95.
57. Aktan, F., *iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation*. Life Sci, 2004. **75**(6): p. 639-53.
58. Poligone, B. and A.S. Baldwin, *Positive and negative regulation of NF-kappaB by COX-2: roles of different prostaglandins*. J Biol Chem, 2001. **276**(42): p. 38658-64.
59. Aubin, J.E. and E. Bonnellye, *Osteoprotegerin and its ligand: a new paradigm for regulation of osteoclastogenesis and bone resorption*. Osteoporos Int, 2000. **11**(11): p. 905-13.
60. Tsuda, E., et al., *Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **234**(1): p. 137-42.
61. Kwon, B.S., et al., *TR1, a new member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, induces fibroblast proliferation and inhibits osteoclastogenesis and bone resorption*. Faseb j, 1998. **12**(10): p. 845-54.
62. Yun, T.J., et al., *OPG/FDCR-1, a TNF receptor family member, is expressed in lymphoid cells and is up-regulated by ligating CD40*. J Immunol, 1998. **161**(11): p. 6113-21.
63. Simonet, W.S., et al., *Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density*. Cell, 1997. **89**(2): p. 309-19.
64. Khosla, S., *Minireview: the OPG/RANKL/RANK system*. Endocrinology, 2001. **142**(12): p. 5050-5.

65. Moverare-Skrtic, S., et al., *Osteoblast-derived WNT16 represses osteoclastogenesis and prevents cortical bone fragility fractures*. Nat Med, 2014. **20**(11): p. 1279-88.
66. Ärzteschaft, A.d.d., *Xgeva® (Denosumab)*. 2011.
67. Furlow, B., *US FDA advisory panel rejects early denosumab therapy*. The Lancet Oncology, 2012. **13**(3): p. e94.
68. Dusso, A.S., A.J. Brown, and E. Slatopolsky, *Vitamin D*. Am J Physiol Renal Physiol, 2005. **289**(1): p. F8-28.
69. Dougall, W.C., et al., *RANK is essential for osteoclast and lymph node development*. Genes Dev, 1999. **13**(18): p. 2412-24.
70. Kim, D., et al., *Regulation of peripheral lymph node genesis by the tumor necrosis factor family member TRANCE*. J Exp Med, 2000. **192**(10): p. 1467-78.
71. Kong, Y.Y., et al., *OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis*. Nature, 1999. **397**(6717): p. 315-23.
72. Mueller, C.G. and E. Hess, *Emerging Functions of RANKL in Lymphoid Tissues*. Front Immunol, 2012. **3**: p. 261.
73. Fata, J.E., et al., *The osteoclast differentiation factor osteoprotegerin-ligand is essential for mammary gland development*. Cell, 2000. **103**(1): p. 41-50.
74. Kim, N.S., et al., *Receptor activator of NF-kappaB ligand regulates the proliferation of mammary epithelial cells via Id2*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(3): p. 1002-13.
75. Akiyama, T., et al., *The tumor necrosis factor family receptors RANK and CD40 cooperatively establish the thymic medullary microenvironment and self-tolerance*. Immunity, 2008. **29**(3): p. 423-37.
76. Akiyama, T., et al., *Regulations of gene expression in medullary thymic epithelial cells required for preventing the onset of autoimmune diseases*. Front Immunol, 2013. **4**: p. 249.
77. Jones, D.H., et al., *Regulation of cancer cell migration and bone metastasis by RANKL*. Nature, 2006. **440**(7084): p. 692-6.
78. Schramek, D., et al., *Osteoclast differentiation factor RANKL controls development of progestin-driven mammary cancer*. Nature, 2010. **468**(7320): p. 98-9102.

79. Santini, D., et al., *Receptor activator of NF- κ B (RANK) expression in primary tumors associates with bone metastasis occurrence in breast cancer patients.* PLoS One, 2011. **6**(21559440).
80. Mikami, S., et al., *Increased RANKL expression is related to tumour migration and metastasis of renal cell carcinomas.* J Pathol, 2009. **218**(4): p. 530-9.
81. Li, X., et al., *Potential role of the OPG/RANK/RANKL axis in prostate cancer invasion and bone metastasis.* Oncol Rep, 2014. **32**(6): p. 2605-11.
82. Todenhofer, T., et al., *Alterations of the RANKL pathway in blood and bone marrow samples of prostate cancer patients without bone metastases.* Prostate, 2012.
83. Perez-Martinez, F.C., et al., *Receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL) as a novel prognostic marker in prostate carcinoma.* Histol Histopathol, 2008. **23**(6): p. 709-715.
84. Miller, R.E., et al., *RANK ligand inhibition plus docetaxel improves survival and reduces tumor burden in a murine model of prostate cancer bone metastasis.* Mol Cancer Ther, 2008. **7**(7): p. 2160-9.
85. Armstrong, A.P., et al., *RANKL acts directly on RANK-expressing prostate tumor cells and mediates migration and expression of tumor metastasis genes.* Prostate, 2008. **68**(1): p. 92-9104.
86. Chen, G., et al., *Expression of RANKL/RANK/OPG in primary and metastatic human prostate cancer as markers of disease stage and functional regulation.* Cancer, 2006. **107**(2): p. 289-298.
87. Kiefer, J.A., et al., *The effect of osteoprotegerin administration on the intra-tibial growth of the osteoblastic LuCaP 23.1 prostate cancer xenograft.* Clin Exp Metastasis, 2004. **21**(5): p. 381-7.
88. Kirk, R., *Statistics: An Introduction.* Cengage Learning, 2007.
89. Zöfel, P., *Statistik verstehen: ein Begleitbuch zur computergestützten Anwendung.* Pearson Deutschland GmbH, 2001.
90. Oh, E.S., et al., *Circulating osteoprotegerin levels are associated with age, waist-to-hip ratio, serum total cholesterol, and low-density lipoprotein cholesterol levels in healthy Korean women.* Metabolism, 2005. **54**(1): p. 49-54.
91. Mazziotti, G., et al., *Increased serum osteoprotegerin values in long-lived subjects: different effects of inflammation and bone metabolism.* Eur J Endocrinol, 2006. **154**(3): p. 373-7.

92. Kudlacek, S., et al., *Serum levels of osteoprotegerin increase with age in a healthy adult population*. Bone, 2003. **32**(6): p. 681-6.
93. Hussain, S.A., et al., *Immediate dual energy X-ray absorptiometry reveals a high incidence of osteoporosis in patients with advanced prostate cancer before hormonal manipulation*. BJU Int, 2003. **92**(7): p. 690-694.
94. Zheng, Y., et al., *Vitamin D deficiency promotes prostate cancer growth in bone*. Prostate, 2011. **71**(9): p. 1012-1021.
95. Schneider, A., et al., *Bone turnover mediates preferential localization of prostate cancer in the skeleton*. Endocrinology, 2005. **146**(4): p. 1727-1736.
96. Santini, D., et al., *Expression pattern of receptor activator of NF κ B (RANK) in a series of primary solid tumors and related bone metastases*. J Cell Physiol, 2011. **226**(3): p. 780-784.
97. Uzzo, R.G., et al., *Diverse effects of zinc on NF-kappaB and AP-1 transcription factors: implications for prostate cancer progression*. Carcinogenesis, 2006. **27**(10): p. 1980-1990.
98. Fradet, V., et al., *Nuclear factor-kappaB nuclear localization is predictive of biochemical recurrence in patients with positive margin prostate cancer*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(24): p. 8460-8464.
99. Lessard, L., et al., *Nuclear localization of nuclear factor-kappaB p65 in primary prostate tumors is highly predictive of pelvic lymph node metastases*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(19): p. 5741-5745.
100. Domingo-Domenech, J., et al., *Activation of nuclear factor-kappaB in human prostate carcinogenesis and association to biochemical relapse*. Br J Cancer, 2005. **93**(11): p. 1285-1294.
101. Dai, Y., et al., *Natural proteasome inhibitor celastrol suppresses androgen-independent prostate cancer progression by modulating apoptotic proteins and NF-kappaB*. PLoS One, 2010. **5**(21170316).
102. Dougall, W.C. and M. Chaisson, *The RANK/RANKL/OPG triad in cancer-induced bone diseases*. Cancer Metastasis Rev, 2006. **25**(4): p. 541-9.
103. Franco, O.E., et al., *Altered TGF- β signaling in a subpopulation of human stromal cells promotes prostatic carcinogenesis*. Cancer Res, 2011. **71**(4): p. 1272-1281.
104. Yuen, H.-F., et al., *The prognostic significance of BMP-6 signaling in prostate cancer*. Mod Pathol, 2008. **21**(12): p. 1436-1443.

105. Uzoh, C.C., et al., *Insulin-like growth factor-binding protein-2 promotes prostate cancer cell growth via IGF-dependent or -independent mechanisms and reduces the efficacy of docetaxel*. Br J Cancer, 2011. **104**(10): p. 1587-1593.
106. Majumder, S., *Stem Cells and Cancer*. Springer Science & Business Media, 2009.
107. Paget, S., *The distribution of secondary growths in cancer of the breast*. 1889. Cancer Metastasis Rev, 1889. **8**(2): p. 98-101.
108. Fizazi, K., et al., *Denosumab versus zoledronic acid for treatment of bone metastases in men with castration-resistant prostate cancer: a randomised, double-blind study*. Lancet, 2011. **377**(9768): p. 813-822.
109. Smith, M.R., et al., *Denosumab and bone-metastasis-free survival in men with castration-resistant prostate cancer: results of a phase 3, randomised, placebo-controlled trial*. Lancet, 2012. **379**(9810): p. 39-46.
110. Golovine, K., et al., *Depletion of intracellular zinc increases expression of tumorigenic cytokines VEGF, IL-6 and IL-8 in prostate cancer cells via NF-kappaB-dependent pathway*. Prostate, 2008. **68**(13): p. 1443-1449.
111. Fowler, F.J., Jr., et al., *Patient-reported complications and follow-up treatment after radical prostatectomy. The National Medicare Experience: 1988-1990 (updated June 1993)*. Urology, 1993. **42**(6): p. 622-9.
112. Klotz, L., *Active surveillance for prostate cancer: trials and tribulations*. World J Urol, 2008. **26**(5): p. 437-42.
113. Cooperberg, M.R., et al., *The University of California, San Francisco Cancer of the Prostate Risk Assessment score: a straightforward and reliable preoperative predictor of disease recurrence after radical prostatectomy*. J Urol, 2005. **173**(6): p. 1938-42.
114. Lu-Yao, G.L., et al., *Follow-up prostate cancer treatments after radical prostatectomy: a population-based study*. J Natl Cancer Inst, 1996. **88**(3-4): p. 166-73.
115. Partin, A.W., et al., *Evaluation of serum prostate-specific antigen velocity after radical prostatectomy to distinguish local recurrence from distant metastases*. Urology, 1994. **43**(5): p. 649-59.
116. Steuber, T., et al., *Risk assessment for biochemical recurrence prior to radical prostatectomy: significant enhancement contributed by human glandular kallikrein 2 (hK2) and free prostate specific antigen (PSA) in men with moderate PSA-elevation in serum*. Int J Cancer, 2006. **118**(5): p. 1234-40.

117. Zhuo, Y.J., et al., *Enhanced expression of centromere protein F predicts clinical progression and prognosis in patients with prostate cancer*. Int J Mol Med, 2015.
118. Raatikainen, S., et al., *Increased nuclear factor erythroid 2-related factor 2 expression predicts worse prognosis of prostate cancer patients treated with radical prostatectomy*. Hum Pathol, 2014. **45**(11): p. 2211-7.
119. Miyake, H., et al., *Enhanced expression of the secreted form of clusterin following neoadjuvant hormonal therapy as a prognostic predictor in patients undergoing radical prostatectomy for prostate cancer*. Oncol Rep, 2005. **14**(5): p. 1371-5.
120. Miyake, H., et al., *Serum level of clusterin and its density in men with prostate cancer as novel biomarkers reflecting disease extension*. Urology, 2010. **75**(2): p. 454-9.
121. Freedland, S.J., et al., *Preoperative p27 status is an independent predictor of prostate specific antigen failure following radical prostatectomy*. J Urol, 2003. **169**(4): p. 1325-30.
122. Pollack, A., et al., *Molecular markers of outcome after radiotherapy in patients with prostate carcinoma: Ki-67, bcl-2, bax, and bcl-x*. Cancer, 2003. **97**(7): p. 1630-8.
123. Miyake, H., et al., *Expression of potential molecular markers in prostate cancer: correlation with clinicopathological outcomes in patients undergoing radical prostatectomy*. Urol Oncol, 2010. **28**(2): p. 145-51.
124. Gravdal, K., et al., *A switch from E-cadherin to N-cadherin expression indicates epithelial to mesenchymal transition and is of strong and independent importance for the progress of prostate cancer*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(23): p. 7003-11.
125. Miyake, H. and M. Fujisawa, *Prognostic prediction following radical prostatectomy for prostate cancer using conventional as well as molecular biological approaches*. Int J Urol, 2013. **20**(3): p. 301-11.
126. Huang, C.Y., et al., *Genetic variants in the Hippo pathway predict biochemical recurrence after radical prostatectomy for localized prostate cancer*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 8556.
127. Van der Kwast, T.H., *Prognostic prostate tissue biomarkers of potential clinical use*. Virchows Arch, 2014. **464**(3): p. 293-300.

128. Mortensen, M.M., et al., *High miR-449b expression in prostate cancer is associated with biochemical recurrence after radical prostatectomy*. BMC Cancer, 2014. **14**: p. 859.
129. Pal, S.K., et al., *Detection and Phenotyping of Circulating Tumor Cells in High-Risk Localized Prostate Cancer*. Clin Genitourin Cancer, 2014.
130. Kattan, M.W., et al., *The addition of interleukin-6 soluble receptor and transforming growth factor beta1 improves a preoperative nomogram for predicting biochemical progression in patients with clinically localized prostate cancer*. J Clin Oncol, 2003. **21**(19): p. 3573-9.
131. Bacchieri, A. and G. Della Cioppa, *Fundamentals of Clinical Research: Bridging Medicine, Statistics and Operations (Google eBook)*. Springer Science & Business Media, 2007.

9 Anhang



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

Universitätsklinikum Tübingen Klinik für Urologie

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

Hoppe-Seyler-Str. 3
D-72076 Tübingen

24h-Info-Telefon: ☎ 07071 / 29 – 86000
Sekretariat: ☎ 07071 / 29 – 86613
Poliklinik: ☎ 07071 / 29 – 86670
OP-Terminvergabe: ☎ 07071 / 29 – 84097
Telefax: ☎ 07071 / 29 – 5092
E-Mail: urologie@med.uni-tuebingen.de
Internet: www.uro-tuebingen.de

06.06.2011



An Herrn Dr. med.
[Redacted]
Tübingen

Sehr geehrter Herr Kollege [Redacted]

aus unseren Unterlagen geht hervor, dass bei Ihrem Patienten Herrn [Redacted] geb. [Redacted], am 11.03.2005 in unserem Hause eine radikale Prostatektomie durchgeführt wurde.
Die Urologische Klinik der Universität Tübingen führt momentan ein Forschungsprojekt zum Krankheitsverlauf des Prostatakarzinoms durch.
Für eine vollständige Auswertung unserer Ergebnisse fehlen uns noch einige wichtige klinische Daten des Patienten. Dabei handelt es sich um Daten des weiteren Krankheitsverlaufs.
Wir wären Ihnen sehr dankbar, wenn Sie uns durch Beantworten der Fragen beim Abschluss dieses Projektes helfen würden.

Vielen Dank für Ihre Kooperation und mit freundlichen Grüßen

Prof. Dr. med. A. Stenzl
Ärztlicher Direktor d. Klinik

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

Dr. med. T. Todenhöfer
Assistent d. Klinik

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

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

3. Metastasen entwickelt? Nein Ja , _____ , _____
Datum Lokalisation

4. Ist der Patient verstorben? Nein Ja , _____
Datum

4a) an den Folgen des Prostatakarzinoms Ja Nein

5. Ihre Kommentare _____

Stellvertreter:
Prof. Dr. Karl-Dietrich Sievert
☎ 07071 / 29-80349

Leitender Oberarzt:
Prof. Dr. Christian Schwentner
☎ 07071 / 29-80349

Oberärzte:
PD Dr. Jens Bedke
☎ 07071 / 29-80349
Dr. David Schilling
☎ 07071 / 29-80349
Dr. Jörg Seibold
☎ 07071 / 29-80349

Pflegedienstleitung:
Jürgen Weber
☎ 07071 / 29-86686

Bereichscontrolling / Medizintechnik / EDV:
Dipl. Ing. Martin Schreiber
☎ 07071 / 29-85074

System-Administration:
Andreas Mutsch
☎ 07071 / 29-87203
Andreas Lohmeier
☎ 07071 / 29-85861

Med. Dokumentation:
Lutz Wulf
☎ 07071 / 29-86636

Labor Uro- Onkologie:
Dipl. Biol. Jörg Hennenlotter
☎ 07071 / 29-86609

Labor Gewebezüchtung:
Dr. rer. nat. Gerhard Feil
☎ 07071 / 29-86657

Bereich klin. Studien:
Dr. Susan Feyerabend
☎ 07071 / 29-87235

RÜCKFAX BITTE AN 07071-29-5092

Anhang 1: Exemplarisches Fax zur Follow-up-Erhebung im Rahmen dieser Studie.



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

Universitätsklinikum Tübingen

Klinik für Urologie

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



Hoppe-Seyler-Str. 3
D-72076 Tübingen

24h-Info-Telefon: ☎ 07071 / 29 – 86000
Sekretariat: ☎ 07071 / 29 – 86613
Poliklinik: ☎ 07071 / 29 – 86670
OP-Terminvergabe: ☎ 07071 / 29 – 84097
Telefax: 07071 / 29 – 5092
E-Mail: urologie@med.uni-tuebingen.de
Internet: www.uro-tuebingen.de

Ankündigung einer telefonischen Befragung zu Ihrem Krankheitsverlauf

Sehr geehrter Herr XXXX,

am XX.XX.XXXX wurden Sie an unserer Klinik wegen eines Prostatakarzinoms operiert.

Für die Durchführung einer wissenschaftlichen Studie, in der untersucht werden soll, wie sich bestimmte Botenstoffe im Körper auf den weiteren klinischen Verlauf eines Prostatakarzinompatienten nach der Operation auswirken, wird Sie einer unserer Mitarbeiter Herr Philipp Leidenberger oder Alexander Wald in den nächsten Tagen telefonisch kontaktieren.

Sie werden als erstes um Ihr Einverständnis an der Befragung gebeten, dieses ist selbstverständlich freiwillig. Aus einer Nicht-Teilnahme werden Ihnen keinerlei Nachteile entstehen.

Weiterhin wird er Sie über den Inhalt und den Zweck des Telefonats aufklären und Ihnen einige Fragen zum weiteren Verlauf Ihrer Erkrankung seit dem damaligen Zeitpunkt stellen. Die gestellten Fragen betreffen einen eventuellen Wiederanstieg des PSA-Wertes und ein eventuelles Wiederauftreten der Tumorerkrankung seit der Operation.

Die beiden Mitarbeiter der Klinik unterliegen der ärztlichen Schweigepflicht und alle von Ihnen erhobene Daten werden streng nach den Richtlinien des Datenschutzes bearbeitet

Wir bedanken uns im Voraus ganz herzlich für Ihre Mithilfe und würden uns freuen, wenn Sie unsere Studie durch Ihre Teilnahme unterstützen könnten, und wir damit die Behandlungsmöglichkeiten des Prostatakarzinoms weiter verbessern könnten.

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

Mit freundlichen Grüßen

Prof. Dr. med. C. Schwentner
Ltd. OA d. Klinik f. Urologie

P. Leidenberger
Studienkoordination

A. Wald
Studienkoordination

Stellvertreter:
Prof. Dr. Karl-Dietrich Sievert
☎ 07071 / 29-80349

Leitender Oberarzt:
Prof. Dr. Christian Schwentner
☎ 07071 / 29-80349

Oberärzte:
Dr. Jens Bedke
☎ 07071 / 29-80349

Dr. David Schilling
☎ 07071 / 29-80349

Dr. Jörg Seibold
☎ 07071 / 29-80349

Pflegedienstleitung:
Jürgen Weber
☎ 07071 / 29-86686

Bereichscontrolling /
Medizintechnik / EDV:
Dipl. Ing. Martin Schreiber
☎ 07071 / 29-85074

System-Administration:
Andreas Mutsch
☎ 07071 / 29-87203
Andreas Lohmeier
☎ 07071 / 29-85861

Med. Dokumentation:
Lutz Wulf
☎ 07071 / 29-86636

Labor Uro- Onkologie:
Dipl. Biol. Jörg Hennenlotter
☎ 07071 / 29-86609

Labor Gewebezüchtung:
Dr. rer. nat. Gerhard Feil
☎ 07071 / 29-86657

Bereich klin. Studien:
Dr. Susan Feyerabend
☎ 07071 / 29-87235

Anhang 2: Exemplarisches Anschreiben an die an der Studie teilnehmenden Patienten zur Ankündigung der telefonischen Befragung.

10 Erklärung zum Eigenanteil

Ich erkläre hiermit, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen zur Promotion eingereichte Arbeit mit dem Titel:

„Der prädiktive Wert präoperativer Receptor-activator-of-nuclear-factor-kappa-B-Ligand- und Osteoprotegerin -Serumkonzentrationen für das Wiederauftreten eines Prostatakarzinoms nach radikaler Prostatektomie“

selbstständig verfasst, nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen als solche gekennzeichnet habe. Ich versichere an Eides statt, dass diese Angaben wahr sind und dass ich nichts verschwiegen habe. Mir ist bekannt, dass die falsche Abgabe einer Versicherung an Eides statt mit Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe bestraft wird.

Alle aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken und Abbildungen sind als solche kenntlich gemacht worden.

Bei der Follow-up-Datenerhebung, der Digitalisierung der Daten sowie bei der Organisation der Datenbank und der Serumproben habe ich mit Philipp Leidenberger im Rahmen eines gemeinschaftlichen Forschungsprojektes zu gleichen Teilen zusammengearbeitet.

Die ELISA-Messung der Serumkonzentrationen von sRANKL und OPG im Labor der Universitätsklinik für Urologie in Tübingen wurde von Frau Andrea Hohneder durchgeführt.

Bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse half mir Dr. Todenhöfer. Alle Graphen und Tabellen, sowie die statistischen Ergebnisse die in dieser Arbeit aufgeführt sind wurden von mir selbst eigenständig errechnet und erstellt.

Alexander A. W. Wald

11 Veröffentlichung

Im Zusammenhang mit dieser Dissertation entstandene Veröffentlichung:

Todenhöfer, T., et al. (2013). "Serum receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) levels predict biochemical recurrence in patients undergoing radical prostatectomy." BJU Int.

12 Danksagung

Herrn Professor Dr. med. A. Stenzl danke ich für die Überlassung des Themas, des Arbeitsplatzes, der Mittel, sowie die Chance, in seiner Abteilung promovieren zu dürfen, sehr herzlich.

Herrn Professor Dr. med. C. Schwentner danke ich sehr für die Betreuung meiner Forschungsarbeit und das Korrekturlesen meines Manuskriptes.

Bei Herrn Dr. med. T. Todenhöfer möchte ich mich sehr herzlich für die gute Beaufsichtigung und Zusammenarbeit während der Planung, Datenerheben und Datenauswertung, sowie für die Korrekturen meiner frühen Manuskripte, selbst von Übersee aus, bedanken.

Äußerst dankbar bin ich außerdem Herrn Jörg Hennenlotter, der zu jeder Zeit, selbst wenn er eigentlich keine Zeit hatte, ein offenes Ohr für wissenschaftliche, organisatorische und persönliche Probleme hatte, immer sofort helfend beistand, und ohne dessen kompetente Hilfe und Motivation dieses und andere Projekte um einiges schwieriger zu bewältigen gewesen wären.

Sehr herzlich möchte ich auch meinem guten Freund Philipp Leidenberger für die produktive Zusammenarbeit und Diskussion danken, sowie dafür, dass die Arbeit an dieser Forschungsarbeit ohne seine gute Laune und sein großes Engagement wahrscheinlich nicht einmal Ansatzweise so viel Spaß gemacht hätte.

Frau Andrea Hohner möchte ich sehr für die Konzentrationsmessungen der hier untersuchten Marker und die Hilfe bei der Organisation der Serumproben danken.

Dank gebührt auch dem übrigen Team der urologischen Klinik Tübingen, insbesondere dem des Labors, für die Hilfsbereitschaft, die zeitweise Überlassung ihres Arbeitsplatzes sowie die immer netten Unterhaltungen.

Last but not least möchte ich gerne meiner Familie dafür danken, dass sie mich fortwährend moralisch unterstützte und dies immer noch tut, etliche Male meine Manuskripte korrekturles und immer für mich da war und ist, in guten wie in schweren Zeiten. Ohne euch hätte ich das nicht geschafft!