

Aus der Universitätsklinik für Urologie Tübingen

**Evaluation von Alterationen innerhalb der mTOR-Regulation  
entlang der Progression zum metastasierten  
Prostatakarzinom – Immunhistochemische Untersuchungen  
mittels Tissue-Microarray-Technik**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von

**Geiges, Annabella Christina**

2019

Dekan:

Professor Dr. I. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. Dr. A. Stenzl

2. Berichterstatter:

Professor Dr. J. Schittenhelm

Tag der Disputation:

07.08.2019

*„Der Beginn aller Wissenschaften ist das Erstaunen, dass die Dinge sind, wie sie sind.“*

*Aristoteles*



# Inhalt

<b>I.</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>9</b>
<b>I.1</b>	<b>Das Prostatakarzinom .....</b>	<b>9</b>
I.1.1	Epidemiologische Aspekte, Risiko- und Schutzfaktoren .....	9
I.1.2	Klinische Symptomatik.....	10
I.1.3	Primärdiagnostik.....	11
I.1.4	Tumorklassifikation .....	14
I.1.5	Therapiemöglichkeiten des nichtmetastasierten Prostatakarzinoms.....	17
I.1.6	Fortgeschrittenes Prostatakarzinom .....	19
I.1.7	Prognostische Faktoren.....	23
<b>I.2</b>	<b>Das mTOR-System .....</b>	<b>25</b>
I.2.1	Aufbau, Funktion und Regulation des mTOR-Systems .....	25
I.2.2	Die Bedeutung des mTOR-Signalwegs bei der Karzinogenese .....	29
I.2.3	Die Bedeutung des mTOR-Signalwegs beim Fortschreiten verschiedener Tumoren.....	31
I.2.4	Die Relevanz des Signalwegs bei der Progression des Prostatakarzinoms .....	34
I.2.5	Der mTOR-Signalweg und das kastrationsresistente Prostatakarzinom .....	35
<b>I.3</b>	<b>Zielgerichtete Therapie - mTOR-Inhibition .....</b>	<b>37</b>
I.3.1	Arten der mTOR-Inhibition .....	37
I.3.2	Einsatz.....	39
I.3.3	mTOR-Inhibition zur Behandlung fortgeschrittener Stadien des Prostatakarzinoms .....	41
<b>II.</b>	<b>Fragestellung.....</b>	<b>43</b>
<b>III.</b>	<b>Material und Methodik.....</b>	<b>44</b>
<b>III.1</b>	<b>Ethik.....</b>	<b>44</b>
<b>III.2</b>	<b>Datenschutz und -sicherheit.....</b>	<b>44</b>
<b>III.3</b>	<b>Patientenkollektiv der Studie.....</b>	<b>45</b>
III.3.1	Einschluss- und Ausschlusskriterien .....	45
III.3.2	Gewebegruppen der Studie .....	47

<b>III.4</b>	<b>Anfertigung der Datenbanken</b> .....	<b>48</b>
<b>III.5</b>	<b>Aufbereitung des OP-Materials</b> .....	<b>49</b>
III.5.1	Prostatagewebe von radikalen Prostatektomien .....	49
III.5.2	Prostatagewebe von TVP und Zystoprostatektomien.....	50
III.5.3	Prostatagewebe von TUR-P und palliativen TUR-P .....	50
<b>III.6</b>	<b>Tissue-Microarray</b> .....	<b>51</b>
III.6.1	Allgemeine Aspekte.....	51
III.6.2	Tissue-Microarray-Anfertigung.....	52
<b>III.7</b>	<b>Weitere Aufarbeitung zu Mikroskopiepräparaten</b> .....	<b>53</b>
<b>III.8</b>	<b>Nachstanzen</b> .....	<b>54</b>
<b>III.9</b>	<b>Immunhistochemische Färbung</b> .....	<b>54</b>
III.9.1	Allgemeine Aspekte.....	55
III.9.2	Die Dextran-Polymer-Methodik .....	55
III.9.3	Ausführung der immunhistochemischen Färbung am TMA .....	55
<b>III.10</b>	<b>Überprüfung der deklarierten Gewebegruppe</b> .....	<b>58</b>
<b>III.11</b>	<b>Verbundprojekt</b> .....	<b>58</b>
<b>III.12</b>	<b>Histologische Evaluierung der immunhistochemischen Färbung</b> .....	<b>59</b>
III.12.1	Erfassung des Expressionsverhaltens .....	59
III.12.2	Interpretation des Expressionsverhaltens.....	60
III.12.3	Synchronisation des Expressionsverhaltens in die Datenbanken .....	68
<b>III.13</b>	<b>Statistische Auswertungen der Datenbanken</b> .....	<b>68</b>
<b>III.14</b>	<b>Verwendete Programme und technische Erfassung der Färbung</b> .....	<b>69</b>
<b>IV.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>70</b>
<b>IV.1</b>	<b>Charakteristika des Studienkollektivs</b> .....	<b>70</b>
<b>IV.2</b>	<b>Immunhistochemisches Expressionsverhalten</b> .....	<b>72</b>
IV.2.1	Immunhistochemisches Färbeergebnis von mTOR.....	72
IV.2.2	Immunhistochemisches Färbeergebnis von p-mTOR.....	73
IV.2.3	Immunhistochemisches Färbeergebnis von 4E-BP1 .....	74
<b>IV.3</b>	<b>Ergebnisse bezüglich der Dignität der untersuchten Gewebe</b> .....	<b>76</b>
IV.3.1	Expression von mTOR in Bezug auf die Gewebedignität .....	76
IV.3.2	Expression von p-mTOR in Bezug auf die Gewebedignität.....	77

IV.3.3	Expression von mTOR unter Berücksichtigung der Aktivierung von mTOR in Bezug auf die Gewebedignität .....	77
IV.3.4	Expression von 4E-BP1 in Bezug auf die Gewebedignität .....	78
IV.3.5	Expression von 4E-BP1 unter Beachtung der intrazellulären Lokalisation in Bezug auf die Gewebedignität .....	79
IV.3.6	Korrelation der untersuchten Proteinparameter unter Beachtung der Gewebedignität .....	80
<b>IV.4</b>	<b>Ergebnisse bezüglich der Diversität im Prostataraum.....</b>	<b>82</b>
IV.4.1	Expression der Parameter in Bezug auf die Diversität unter Berücksichtigung der zellulären Lokalisation bei 4E-BP1 .....	84
IV.4.2	Expression der Parameter in Bezug auf die Diversität unter Berücksichtigung des Gleason-Scores .....	84
<b>IV.5</b>	<b>Expression der verschiedenen Parameter im Tumorgewebe in Bezug auf patientenindividuelle und klinische Daten.....</b>	<b>87</b>
IV.5.1	Korrelation der Expression der verschiedenen Parameter im Tumorgewebe mit patientenindividuellen Daten .....	87
IV.5.2	Expression der verschiedenen Parameter in Bezug auf klinische Daten .....	88
<b>IV.6</b>	<b>Ergebnisse hinsichtlich des Hormonabhängigkeitsstatus der untersuchten metastasierten Tumoren .....</b>	<b>93</b>
<b>IV.7</b>	<b>Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse - Gegenüberstellung der Gewebegruppen gemäß der Progressionssequenz .....</b>	<b>95</b>
IV.7.1	Gegenüberstellung der mittleren Expressionen entlang der Progressionssequenz .....	96
IV.7.2	Gegenüberstellung der maximalen Expressionen entlang der Progressionssequenz .....	99
IV.7.3	Gegenüberstellung der Expression von 4E-BP1 unter Beachtung der zellulären Lokalisation entlang der Progressionssequenz .....	100
<b>V.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>101</b>
<b>V.1</b>	<b>Expressionen der untersuchten Parameter im benignen und tumorösen Gewebe.....</b>	<b>102</b>
V.1.1	Die Bedeutung bei der Tumorentstehung .....	105

<b>V.2</b>	<b>Diversität im Prostataraum lokal begrenzter Karzinome - Betrachtung des dem Tumor angrenzenden Gewebes .....</b>	<b>106</b>
V.2.1	Diagnostische Implikationen .....	109
<b>V.3</b>	<b>Expressionen der Marker hinsichtlich der Tumorprogression – Betrachtung des Tumorgrades und klinisch-pathologischer Parameter .....</b>	<b>110</b>
V.3.1	Prognostische Implikationen.....	112
<b>V.4</b>	<b>Metastasierung des Tumors.....</b>	<b>114</b>
V.4.1	mTOR-Inhibition und der Effekt auf Metastasen .....	117
<b>V.5</b>	<b>Hormonsensitives und kastrationsresistentes PCA .....</b>	<b>120</b>
V.5.1	Bedeutung für die Therapie .....	122
<b>V.6</b>	<b>Grenzen der vorliegenden Arbeit.....</b>	<b>125</b>
<b>V.7</b>	<b>Schlussfolgerung .....</b>	<b>126</b>
<b>VI.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>128</b>
<b>VII.</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>131</b>
<b>VII.1</b>	<b>Verzeichnisse .....</b>	<b>131</b>
VII.1.1	Abkürzungen.....	131
VII.1.2	Tabellen .....	136
VII.1.3	Abbildungen.....	138
VII.1.4	Literaturverzeichnis .....	142
<b>VII.2</b>	<b>Ehrenwörtliche Erklärung zum Eigenanteil .....</b>	<b>176</b>
<b>VII.3</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>177</b>



# I. Einleitung

## I.1 Das Prostatakarzinom

Beim Adenokarzinom der Prostata handelt es sich um einen malignen Tumor des exokrinen Drüsengewebes der Vorsteherdrüse, die beim Mann anatomisch extraperitoneal unterhalb der Harnblase liegt und als Geschlechtsdrüse 15-30 % der Samenflüssigkeit produziert. (Hautmann & Gschwend 2014, Hammes et al. 2015)

Das Prostatakarzinom (PCA) wächst in der Regel langsam und zunächst innerhalb der Prostata, kann jedoch die Organkapsel durchbrechen und dann lokal fortschreiten. Ab einer gewissen Tumorgroße kann es zur Metastasierung überwiegend in Lymphknoten und ins Skelett kommen. (Jacobs 1983, Logothetis & Lin 2005)

### I.1.1 Epidemiologische Aspekte, Risiko- und Schutzfaktoren

Das Prostatakarzinom stellt in Deutschland, wie auch in Europa, die am häufigsten diagnostizierte Krebserkrankung beim Mann dar. (Damber & Aus 2008, Kaatsch et al. 2013) Außerdem weist der Tumor in den USA die zweithöchste malignombedingte Mortalität des Mannes auf, hier zu Lande nach dem Bronchial- und Kolonkarzinom die dritthäufigste. (Crawford 2003, Hricak et al. 2007, Maruthappu et al. 2015)

Nach Angaben des Robert-Koch Institut (RKI) erkrankten 2014 in Deutschland 57.370 Männer an dem von der Vorsteherdrüse ausgehenden malignen Tumor und 13.704 Männer verstarben. (Robert Koch Institut 2017) Seit 1999 ist ein Anstieg der jährlich neu auftretenden Prostatakarzinome um mehr als 50 % zu verzeichnen. (Kaatsch et al. 2013) Die Zahl der Neuerkrankungen stieg nicht zuletzt auch durch die wachsende Anerkennung der Bedeutung des PSA-Werts für die PCA-Diagnostik an. (Haberland et al. 2010, Becker 2011)

Die Risikofaktoren, an einem PCA zu erkranken, lassen sich in beeinflussbare und nicht beeinflussbare Faktoren unterteilen. Als wichtigster nicht beeinflussbarer Faktor gilt das Alter. (Ferlay et al. 2010) So werden kaum Erkrankungen bei Männern unter 50 Jahren diagnostiziert. 85 % der Betroffenen sind älter als 65 Jahre. Zudem steigt die Sterberate bei Männern, die älter als 85 Jahre sind, auf bis zu 75 % an. (Gronberg 2003, Hautmann

et al. 2007) Auch bei ethnischen Gruppen zeigen sich Unterschiede in der Häufigkeit von Neuerkrankungen: So haben Afroamerikaner verglichen mit weißen europäischstämmigen Männern in den USA eine 58 % höhere Inzidenzrate. (Cuzick et al. 2014) Des Weiteren spielt die genetische Disposition eine Rolle. So verdoppelt sich das Risiko an einem Prostatakarzinom zu erkranken bereits, wenn ein direkter Verwandter erkrankt ist. (Steinberg et al. 1990, Carter et al. 1992)

Ein beeinflussbarer Faktor ist dagegen die Ernährung. So wird zum Beispiel ein erhöhter Konsum von Fleisch- und Milchprodukten und Lebensmitteln mit einem hohen Anteil an gesättigten Fettsäuren wie  $\alpha$ -Linolensäure mit einem höheren Risiko in Verbindung gebracht, an einem PCA zu erkranken. (Harvei et al. 1997, Giovannucci et al. 2007) Ebenso gilt die Hemmung der körpereigenen Vitamin-D-Produktion als potentiell kanzerogen. (Chan et al. 1998, Chan et al. 2001)

Ein protektiver Faktor in Bezug auf die Ernährung scheint hingegen der Verzehr von Gemüse wie zum Beispiel Tomaten oder Sojabohnen zu sein. Bei Sojabohnen geht man bedingt durch den hohen Gehalt von Phytoöstrogenen wie Flavonoiden von einer auch das PCA betreffenden antikanzerogenen Wirkung aus. Bei Tomaten soll Lykopen dafür verantwortlich sein. So ließe sich zudem die geringere Inzidenz bei Asiaten und Vegetariern erklären. (Denis et al. 1999, Ellinger et al. 2009) Des Weiteren scheinen sich eine physische Fitness und ein regulärer Body-Mass-Index als präventiv für das Entstehen eines PCAs auszuwirken. (Giovannucci et al. 2007, Liu et al. 2011) Weiter hat eine diabetische Stoffwechsellage möglicherweise durch IGF-Rezeptortypen einen negativ prognostischen Einfluss. (Heni et al. 2012)

### I.1.2 Klinische Symptomatik

Da der Tumor in 85 % der Fälle in der peripheren Drüsenzzone entsteht und sich zu Beginn innerhalb der Kapsel ausbreitet, ist er im Anfangsstadium symptomlos und wird somit vom Erkrankten zunächst nicht wahrgenommen. Sein in der Regel langsames Wachstum unterscheidet das PCA von anderen bösartigen Tumoren. Im fortgeschrittenen Stadium können dann obstruktive oder irritative Miktionsbeschwerden bei einer möglichen Infiltration des Blasenhalses oder der Urethra auftreten. In einigen Fällen kommt es auch zur Hämatospermie. Auch Impotenz oder eine einseitige Harnstauung können als Symptome von Infiltrationen ins umliegende Gewebe auftreten. (von Rundstedt et al.

2008) Haben sich im fortgeschrittenen Stadium bereits Metastasen in Lymphknoten oder im Skelettsystem entwickelt, sind die Symptome vielfältig. (Schmelz et al. 2014)

### I.1.3 Primärdiagnostik

Eine gewissenhafte Diagnostik bildet auch beim PCA die Grundlage für die möglichst gute Detektion eines eventuell vorhandenen Tumors und für die Therapieentscheidung im weiteren Verlauf.

Die gängigsten Untersuchungsmethoden bei Verdacht auf eine maligne Entartung der Vorsteherdrüse sind die digital-rektale Untersuchung (DRU), die transrektale Ultraschalluntersuchung (TRUS) und die PSA-Bestimmung einer dem Patienten zuvor entnommenen Blutprobe. Liegt dann der Verdacht auf ein PCA vor, können letztlich nur eine Stanzbiopsie und die anschließende histologische Begutachtung des Gewebes über einen möglichen Tumor Gewissheit bringen. Sofern es sich tatsächlich um ein PCA handelt, wird mit verschiedenen weiteren Verfahren versucht, die Größe, die Richtung, das Maß der Ausbreitung (Ausbreitungsdiagnostik) und die Malignität abzuschätzen, bevor mit der Therapie begonnen wird.

#### I.1.3.1 Digital-rektale Untersuchung (DRU)

Die digital-rektale Untersuchung gehört neben dem TRUS und der Serum-PSA-Bestimmung zur Standard-Basisdiagnostik. Unter der Voraussetzung, dass sich der Tumor in der peripheren posterolateralen Drüsenzzone befindet, der Patient bereits Miktionsbeschwerden hat und der Tumor mindestens ein Volumen von 0,2 ml ausfüllt, erweisen sich 15-40 % der Palpationsbefunde als manifeste tumoröse Läsion. (Richie et al. 1993) Da diese Methode zur Diagnose eine relativ geringe Sensitivität besitzt, stark vom Können des Behandlers abhängt und kleine Tumoren oft unentdeckt bleiben, ist sie jedoch als singuläres PCA-Detektionsmittel ungeeignet. (Quinlan et al. 2007, Stenzl 2009, Wirth et al. 2011)

#### I.1.3.2 Transrektale Ultraschalluntersuchung (TRUS)

Da die konventionelle Graustufen-Sonographie eine ähnlich geringe Sensitivität (< 40 %) wie die DRU aufweist, ist sie allein ebenso ungeeignet für eine definitive Diagnosestellung. So sind 50 % der PCAs, die größer als 1 cm sind, sonografisch nicht darstellbar. (Schmelz et al. 2014) Die Ultraschallsonographie-gesteuerte 18-G-

Prostatastanzbiopsie ist bei einer auffälligen DRU oder einem erhöhten PSA-Wert das Mittel der Wahl, um einen Tumor zu diagnostizieren oder gegebenenfalls auszuschließen. (Rifkin 1998, Ghafoori et al. 2015) Durch die Weiterentwicklung der verschiedenen Sonografie-Techniken wie Farbdoppler-Ultraschall, Power-Doppler Ultraschall, kontrastverstärkte Ultraschall-Bildgebung und Elastographie wurde die Relevanz des Ultraschalls in der PCA-Diagnostik zudem deutlich gesteigert. (Pallwein et al. 2007)

### I.1.3.3 PSA-Bestimmung

Die Bestimmung der prostataspezifischen Antigen (PSA)-Konzentration im Blut ist der am häufigsten verwendete Tumormarker weltweit. Die von den Epithelzellen der prostatistischen Ausführungsgänge in geringen Mengen physiologisch produzierte kallikreinähnliche Serinprotease dient als Parameter zur Früherkennung, Stadieneinteilung, zur abschätzenden Prognose und Nachkontrolle des PCAs. (Stephan et al. 2009) Das PSA ist ein Glykoprotein, welches Organspezifität aufweist. Jedoch ist es nicht tumorspezifisch. Es kann neben dem Vorhandensein eines Tumors zum Beispiel auch bei einer Prostatitis oder einer benignen Hypertrophie erhöhte Werte zeigen. (Rohde et al. 2006)

Trotz des verbreiteten Gebrauchs der PSA-Bestimmung zur PCA-Diagnostik ist sie kein zuverlässiger Indikator für einen Tumor. Der kritische PSA-Grenzwert, ab dem in der Regel eine Stanzbiopsie empfohlen wird, beträgt 4,0 ng/ml. (Brawley et al. 2009) Dennoch haben 65–70 % der Männer mit einem erhöhten PSA-Wert zwischen 4–10 ng/ml negative Biopsieergebnisse. Dazu gehören mehr als 10 % der 50 bis 69 Jahre alten Männer. (Donovan et al. 2003, Draisma et al. 2009) Die hohe Rate an Überdiagnosen und unnötigen Biopsien auf Grund eines erhöhten PSA-Werts werden daher stark kritisiert. (Roobol et al. 2010) Eine weitere Schwierigkeit ist die schlechte Sensitivität des Tests bei der Detektion klinisch relevanter Tumoren, besonders im fortgeschrittenen Stadium, die paradoxerweise niedrige PSA-Werte aufweisen können. Bis zu 15 % der an einem PCA Erkrankten weisen einen niedrigeren PSA-Wert als 4 ng/ml auf, was bei alleiniger PSA-Wert-Diagnostik zu unerkannten Tumoren führt. (Thompson et al. 2004) Dennoch ist die PSA-Bestimmung in Sensitivität und Spezifität der DRU sowie der TRUS überlegen und trägt einen entscheidenden Anteil zu Früherkennung und Screening des PCA bei. (Shetty

& Cerny 1992, Catalona et al. 1994) Die Tabelle 1 zeigt, wie das PCA-Risiko mit steigendem PSA-Wert zunimmt.

PSA (ng/ml)	Absolutes Risiko in % für die Diagnose eines PCA	Absolutes Risiko in % für die Diagnose eines fortgeschrittenen PCA	Risikogruppe	Kontrollintervall
1,46	18	6,1	Hohes Risiko	1-2 Jahre
1,07	14	4,2		
0,95	12	6,6	Mittleres Risiko	Max. 4 Jahre
0,83	11	3,0		
0,63	7,7	2,1	Geringes Risiko	5-10 Jahre
0,42	4,7	1,2		
0,82	2,5	0,6		

Tabelle 1: Übersicht über die in Lilja et al. 2011 ermittelten Risiken in Abhängigkeit des PSA-Wertes und über die von den Autoren der Studie vorgeschlagenen Kontrollintervalle (Lilja et al. 2011, Krebsgesellschaft & Deutsche Krebshilfe 2016)

Obwohl die Bestimmung des PSA-Wertes die Diagnostik des PCA revolutioniert hat, muss die PSA-Früherkennung weiter verbessert werden. Geeignete Biomarker, die dazu beitragen könnten, sollten verstärkt untersucht werden. (Shen & Abate-Shen 2010)

#### I.1.3.4 PCA3-Test

Der PCA3-Test dient als Biomarker dem Nachweis von PCA3-positiven Tumorzellen im Urin. Der PCA3-Test hängt wie der PSA-Wert teilweise von der Größe der Prostata ab. Der Marker kommt in PCA-Krebszellen jedoch in 100-fach höheren Konzentrationen vor als in gesundem Gewebe. Damit ist er durch seine hohe Spezifität abgesehen von den Kosten der PSA-Bestimmung überlegen. (Nakanishi et al. 2008, Auprich et al. 2011)

Der PCA3-Test hilft, Patienten mit einer hohen Wahrscheinlichkeit für eine positive Biopsie zu detektieren und verhindert damit unnötige Biopsien. Obwohl der Test keine direkte Risikoklassifikation vornehmen kann, wird vermutet, dass es eine Korrelation zwischen der Aggressivität des Tumors und PCA3 gibt. Das könnte beispielsweise bei einer Active- Surveillance-Therapie hilfreich sein. (Haese et al. 2008, Auprich et al. 2011, Truong et al. 2013) Zudem besteht ein Zusammenhang zwischen der Tumorgöße und dem PCA3-Score. (Nakanishi et al. 2008) Bei Männern mit persistierenden hohen PSA-Werten und vielfachen negativen Biopsieergebnissen kann der PCA3-Test Aufklärung bringen. (Loeb 2008)

### I.1.3.5 Diagnostische Stanzbiopsie

Letzten Endes kann eine eindeutige Diagnose nur durch die Entnahme von Prostatagewebe gestellt werden. Eine Stanzbiopsie wird bei einem auffälligen DRU-Befund, bei einem PSA-Wert  $> 4$  ng/ml oder  $> 3$  ng/ml und einem freien PSA  $< 15$  % oder einer auffälligen PSA-Velocity empfohlen. (Harris & Lohr 2002, Hörtl et al. 2008, Brooks et al. 2010, Carroll et al. 2016, Krebsgesellschaft & Deutsche Krebshilfe 2016)

Ultraschallgezielte transrektale Stanzbiopsie mit 18 G Nadeln ist die am weitesten verbreitete Methode. Viele Jahre lang war die Sextantenbiopsie die Standardprozedur der Prostatadiagnostik. Jedoch kann man die Detektionsrate stark erhöhen, wenn bei normal großen Prostatae bis 50 Mikroliter 8-12 und bei größeren 12-14 systematische Stanzen ausgeführt werden. (Mariappan et al. 2004, Heidenreich et al. 2008) Um diese Anzahl der Stanzen zu erreichen und Schmerzen zu vermeiden, wird vor dem Eingriff in der Regel eine periprostatistische infiltrative Lokalanästhesie durchgeführt. (Aus et al. 2005, Hergan et al. 2007) Um einer Entzündung vorzubeugen, ist eine Antibiotika-Prophylaxe mit Gyrasehemmern stets empfohlen. (Aus et al. 1996) Die Anzahl positiver Biopsien und das Ausmaß des Befalls der jeweiligen Stanzzyylinder sind bei systematischer Biopsietechnik ein Maß für das Tumolvolumen. Sie haben damit prognostischen Aussagewert und sind Parameter für die histologische Gradeinteilung und Therapieentscheidung. (Shetty & Cerny 1992, Schmelz et al. 2014)

Trotz des großen molekularen Arsenal, das den Pathologen heute zur Verfügung steht, um die gewonnenen Gewebeproben zu untersuchen, fehlt es noch an Biomarkern, die genauer zwischen insignifikanten, kurablen und letalen PCAs differenzieren können. (Kristiansen 2012) Auch könnten nach erfolgter Biopsie mittels geeigneter Biomarker bereits Aussagen zu einem möglichen Erfolg einer Therapie mittels zielgerichteter Arzneien wie mTOR-Inhibitoren getroffen werden und somit die Patienten herausgefiltert werden, die von einer derartigen Therapie profitieren würden.

### I.1.4 Tumorklassifikation

Damit der Arzt die richtige Behandlung auswählen und eine Prognose abgeben kann, muss der Tumor klassifiziert werden. Im histopathologischen Befund sollten der Gleason-Grad, der Tumorstadium und die Tumorausdehnung für jeden positiven Stanzzyylinder angegeben sein. (Stenzl 2009)

#### I.1.4.1 Typing

Unter Typing versteht man die Bestimmung des Tumor-Typs. Hierbei werden gutartige Veränderungen und Präkanzerosen von einem Prostatakarzinom abgegrenzt. Dabei sind vor allem die low grade PIN (prostatistische intraepitheliale Neoplasie) und die high grade PIN von Bedeutung. Während es sich bei der low grade PIN um eine gutartige Veränderung der Drüsenzellen handelt, ist die high grade PIN eine mögliche Krebsvorstufe. (Bostwick 1995)

#### I.1.4.2 TNM-System

Das TNM-System bietet eine weltweit einheitliche Stadieneinteilung von Krebserkrankungen gemäß ihrer klinisch und falls möglich histopathologisch bestimmten anatomischen Ausbreitung. (Wittekind & Oberschmid 2010) So werden bei der TNM-Klassifikation die Größe und lokale Tumorextension des Primärtumors (T), der regionäre Lymphknotenbefall (N) und Fernmetastasen (M) beurteilt, um mit Hilfe des Tumorstadiums bei der Diagnosestellung nicht nur die Wachstumsrate und das Ausmaß des Tumors, sondern auch die Art des Tumors und die Tumor-Wirtsbeziehung zu veranschaulichen. (Wittekind & Meyer 2013) Die TNM-Klassifikation des PCA sieht wie folgt aus:

Stadium	Charakteristikum
	<b>T-Primärtumor</b>
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
T1	Klinisch nicht erkennbarer Tumor, der weder tastbar noch in den bildgebenden Verfahren sichtbar ist
T1a	Tumor zufälliger histologischer Befund in 5 % oder weniger des resezierten Gewebes
T1b	Tumor zufälliger histologischer Befund in mehr als 5 % des resezierten Gewebes
T1c	Tumor durch Nadelbiopsie diagnostiziert (nicht palpabel, Diagnose durch PSA-Erhöhung)
T2	Tumor auf die Prostata begrenzt
T2a	Tumor infiltriert die Hälfte eines Lappens oder weniger
T2b	Tumor infiltriert mehr als die Hälfte eines Lappens
T2c	Tumor infiltriert beide Lappen
T3	Tumorausbreitung extrakapsulär
T3a	Extrakapsuläre Ausbreitung (ein- oder beidseitig) ohne Befall der Samenblasen
T3b	Tumor infiltriert Samenblase(n) und/oder Blasen Hals
T4	Tumorinfiltriert benachbarte Strukturen (Sphincter externus, Rektum, Levator-Muskulatur, Beckenwand)

Stadium	Charakteristikum
<b>N-Regionäre Lymphknoten</b>	
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Kein Anhalt für regionäre Lymphknotenmetastasen
N1	Regionäre Lymphknotenmetastasen
<b>M-Fernmetastasen</b>	
MX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	Kein Anhalt für Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen
M1a	Nicht regionärer Lymphknotenbefall
M1b	Knochenmetastasen
M1c	Andere Fernmetastasen

Tabelle 2: TNM-Klassifikation des PCA (Wittekind 2010)

### I.1.4.3 Gleason-Score (Histopathologisches Grading)

Das Gleason-Grading nutzt man zur histopathologischen Beurteilung des Prostatagewebes. Um den Gleason-Score zu ermitteln, bewertet man die Drüsenarchitektur der entnommenen Stanzzyylinder nach ihrer Differenzierung. Das häufigste und zweithäufigste Zellvorkommen wird in die Grade 1-5 (1= gut differenziert; 5= wenig differenziert) eingeteilt (s. Abbildung 1).

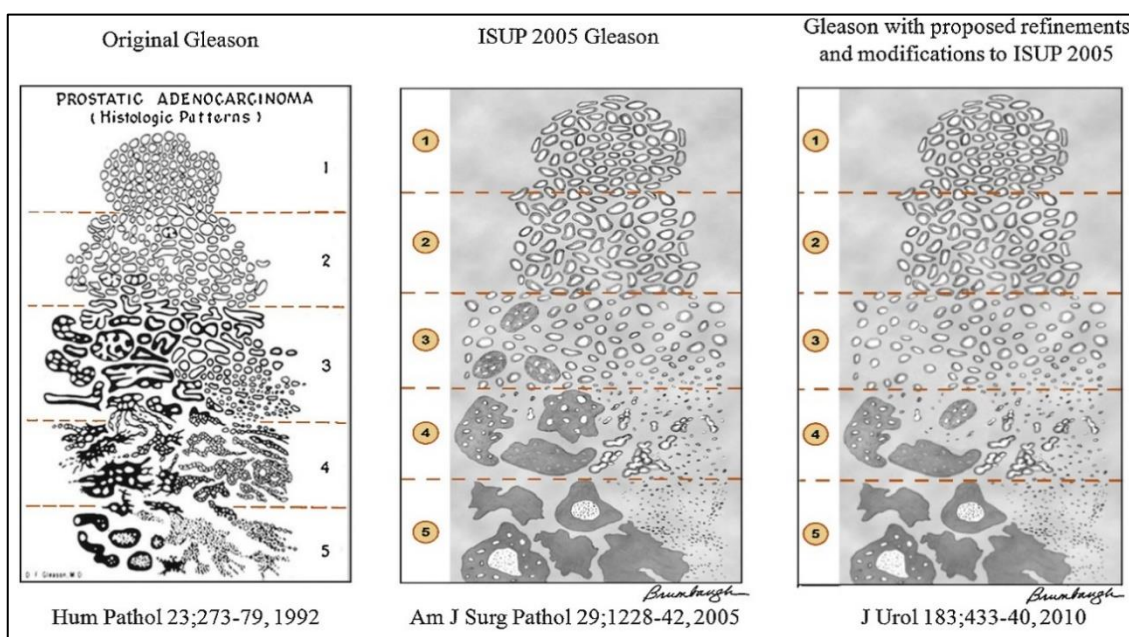


Abbildung 1: Übersicht über das originale Gleason-Grading 1992 und die beiden modifizierten Ausführungen aus den Jahren 2005 und 2010 (Brimo et al. 2013)

Der Score wird errechnet, indem man die beiden Grade addiert. (Gleason 1992) Daraus ergeben sich als mögliche errechenbare Werte die Scores 2-10. Aufgrund schlechter Reproduzierbarkeit sollen jedoch nur noch Gleason-Grade 6-10 zugeteilt werden.



(Epstein et al. 2005) Der Gleason-Score der Biopsie korreliert mit der lokalen Ausdehnung des Tumors und dem Lymphknotenstatus. Deswegen verschlechtert sich die Prognose bei einem Gleason-Score über 7. (Schmelz et al. 2014) Zudem besteht ein Zusammenhang zwischen dem Gleason-Score und den Überlebensraten nach einer radikalen Prostatektomie (RPE). (Narain et al. 2001) Weltweit hat sich entsprechend der Konsensuskonferenz der Gleason-Score der International Society of Urological Pathology (ISUP) aus dem Jahre 2005 etabliert. Die überarbeitete Version (2014) ist in Tabelle 3 dargestellt. (Epstein et al. 2005, Epstein 2010, Epstein et al. 2016)

Gleason	Prognostic Grade Group
3 + 3 = 6	I
3 + 4 = 7a	II
4 + 3 = 7b	III
8	IV
9-10	V

Tabelle 3: ISUP-Gleason-Nomenklatur 2014 (Epstein et al. 2016)

### I.1.5 Therapiemöglichkeiten des nichtmetastasierten Prostatakarzinoms

Als Therapiemöglichkeiten des nicht metastasierten lokal begrenzten und lokal fortgeschrittenen PCAs stehen vielfältige Optionen zur Verfügung. Die wichtigsten sind: Active Surveillance (AS), die Radikale Prostatektomie (RPE), die Strahlentherapie (RT) und die hormonablativ Therapie (HAT).

Active Surveillance (AS), aktive Überwachung oder verzögerte Behandlung beschreibt das Aufschieben der kurativen Behandlung eines Low-risk-PCAs bis sie nötig wird. Mit diesem Therapieansatz können einigen Männern mit einem Tumor im Frühstadium die Nebenwirkungen einer Therapie erspart werden, ohne ihr Überleben zu gefährden. (Parker 2004)

Unter der radikalen Prostatektomie (RPE) versteht man die komplette Resektion der Prostata, der anhängenden Samenblasen und eines Abschnitts der Samenleiter. (Rohde et al. 2006) Die RPE reduziert die krankheitsspezifische Mortalität, die allgemeine Mortalität, das Risiko für eine lokale Progression des PCA und für Metastasen. (Bill-Axelson et al. 2005) Sofern die Befunde, die präoperativ vorliegen, für einen organbegrenzten Tumor sprechen und eine Lebenserwartung von mindestens zehn Jahren gegeben ist, wird eine radikale Prostatektomie angestrebt. (Rohde et al. 2006) Studien

zeigen, dass bezüglich der Gesamtmortalität und der krankheitsspezifischen Mortalität die RPE gegenüber dem Watchful Waiting signifikante Vorteile besitzt. (Holmberg et al. 2002, Bill-Axelsson et al. 2008)

Radioonkologische Therapiemöglichkeiten mit ähnlich gutem Outcome wie die RPE liefern die perkutane Bestrahlung (externe Radiatio in konventioneller Technik, externe 3-D-konformale und externe intensitätsmodulierte Radiatio (IMR)) und die Implantation von radioaktivem Material mittels Sonographie (LDR-Brachytherapie (Low-Dose-Rate; Seedimplantation), HDR-Brachytherapie (High-Dose-Rate; Afterloading)). Diese Therapien haben wie die RPE in der Regel eine kurative Intention. (Hakenberg et al. 2003, Rohde et al. 2006)

Die meisten Prostatakarzinome sind hormonabhängige Tumoren, die durch Androgene wachstumsstimuliert und kontrolliert werden. Eine neoadjuvante oder adjuvante Hormonentzugstherapie (HAT) vor oder nach einer kurativen Therapie kann deswegen sinnvoll sein. Für die lokalisierten Intermediate- und High-risk- PCAs ist nachgewiesen, dass die Parameter lokale Kontrolle des Tumors und progressionsfreies Überleben nach einer Radiotherapie durch eine adjuvante androgenablativ Therapie deutlich verbessert werden können. (Schmelz et al. 2014)

Derzeit gibt es einige neue Behandlungsmethoden, die sich neben den etablierten Therapien als Optionen anbieten. Eine Methode ist die gezielte thermische Zerstörung des bösartigen Gewebes der Prostata mit Hilfe von hochintensivem fokussiertem Ultraschall (HIFU). Der Tumor kann auf diese Weise minimalinvasiv und mit minimierten Nebenwirkungen behandelt werden. (Eberli et al. 2014) Eine weitere Therapieoption ist die Kryotherapie, bei der im Gegensatz zum HIFU die Tumorzellen mittels starker Kälte zerstört werden sollen. Beide Therapieformen sollen sich vor allem als Salvage-Therapien bei rezidiviertem, noch nicht metastasiertem PCA eignen, werden aber momentan noch von keiner deutschen Leitlinie zur Therapie des PCA empfohlen. (Autran-Gomez et al. 2012, Krebsgesellschaft & Deutsche Krebshilfe 2016)

## I.1.6 Fortgeschrittenes Prostatakarzinom

### I.1.6.1 Metastatische Tumorausbreitung und Klinische Symptomatik

Metastasen entstehen üblicherweise zunächst lymphogen. Die Lymphknoten in der *Fossa obturatoria* und der Iliakalgefäße sind die ersten Orte der lymphogenen Streuung. Die nächste Station sind die präsakralen und inguinalen Lymphknoten und die Lymphknoten entlang der paraaortalen Region. Erst danach werden die mediastinalen und supraclaviculären Lymphknoten infiltriert. Der durch die Lymphmetastasen behinderte Lymphabfluss führt in der Regel zu Lymphödemem vor allem der unteren Extremitäten. In seltenen Fällen treten auch Harnleiterobstruktionen bei maligner retroperitonealer Fibrosierung auf. (Hautmann & Gschwend 2014, Schmelz et al. 2014)

Die hämatogene Aussaat beim PCA betrifft bevorzugt das Skelettsystem. Am häufigsten sind die Lendenwirbelkörper, das proximale Femur, das Becken, die thorakalen Wirbelkörper, die Rippen, das Sternum und der Schädel betroffen. Zunächst zeigen im Allgemeinen die zentralen, später die peripheren Skelettabschnitte Tumorabsiedlungen. (Hautmann & Gschwend 2014) Die Erkrankten leiden aufgrund der Metastasen häufig an Knochenschmerzen und Anämien. Außerdem neigen sie zu Knochenbrüchen. Dies kann zu neurologischen Ausfällen bis hin zur Querschnittsläsion führen. (Loidl et al. 2014)

Im späten Stadium der Erkrankung sind auch viszerale Organe wie die Lunge, die Leber und die Nebenniere von Metastasierungen betroffen. (Hautmann & Gschwend 2014, Stenzl et al. 2014)

### I.1.6.2 Diagnostik der metastatischen Ausbreitung

#### I.1.6.2.1 Positive Lymphknoten

Gibt es bei einem größeren Tumor den Verdacht auf pelvine Lymphknotenmetastasierung wird im Normalfall ein CT empfohlen. (Schmelz et al. 2014) Jedoch sind die zur Verfügung stehenden bildgebenden Verfahren Ultraschall, Lymphographie, CT und MRT für den sicheren Nachweis für Lymphknotenmetastasen zu ungenau. Nur die operative Lymphadenektomie z.B. mittels Laparoskopie der regionalen Lymphknoten der Prostata, die Lymphknotenkette der *Fossa obturatoria*, ermöglicht ein genaues N-Staging. (Fahlenkamp et al. 1997) Bei einem Gleason-Score größer als 7 oder dem

Tumorstadium T3/T4 können bereits bei ca. einem Viertel der Patienten befallene Lymphknoten (N1) nachgewiesen werden. (Abuzallouf et al. 2004)

#### I.1.6.2.2 Ossäre Metastasen

Knochenmetastasen findet man bei ca. 85 % der Männer, die an einem PCA sterben. Bei einem PSA-Wert über 10 ng/ml sind bei 2,3 % der Patienten Knochenmetastasen zu erwarten, bei einem PSA-Wert über 20 ng/ml steigt die Prävalenz auf ca. 16 %, bei einem Gleason-Score über 7 auf 28 % und bei dem Tumorstadium T3/T4 auf 47 %. Meist handelt es sich um osteoblastische Metastasen, Hyperkalzämien sind selten. (Abuzallouf et al. 2004, Gillessen & Strasser 2006)

Zur Festlegung des Therapiekonzepts, zur Therapieüberwachung und zur Prognose ist die Kenntnis eines metastatischen Befalls des Skelettsystems von großer Bedeutung. (Rubens 1998) Zur Diagnostik einer Skelettmastasierung stehen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung: Die Skelettszintigrafie, die MRT, das konventionelle Röntgen und die CT. (Ketelsen et al. 2008)

#### I.1.6.3 Therapie des lymphknotenpositiven Prostatakarzinoms

Als lokale Therapieoptionen für Patienten mit gesicherten Lymphknotenmetastasen stehen die operative Entfernung und die Strahlentherapie zur Verfügung. Systemisch kann eine sofortige oder verzögerte hormonablative Therapie in Betracht kommen. (Swanson et al. 2006)

#### I.1.6.4 Therapiemöglichkeiten des metastasierten Prostatakarzinoms

Bei der Therapie des metastasierten PCA steht im Gegensatz zum lokal begrenzten PCA die palliative Intention im Vordergrund. Neben dem wachsamem Beobachten (WW) gibt es Therapieoptionen, die die Progredienz der Erkrankung hinauszögern können. Sofern eine Therapie ausbleibt, beträgt die Überlebenszeit bei bekannten Metastasen ca. drei Jahre (s. Tabelle 4).

Stadium	Metastasen vorhanden	Mortalität 5-10 Jahre
T1a	0 %	2 %
T1b	25 %	20 %
T2a	15 %	20 %
T2c	35 %	70 %
T3	50 %	75%
N1, M1	100 %	> 50 % (3 Jahre)

Tabelle 4: Natürlicher Krankheitsverlauf unbehandelter Patienten nach Catalona et al. (Hautmann & Gschwend 2014)

#### I.1.6.4.1 Hormonentzug

Hormonablative Maßnahmen aller Art stellen die systemische Standardbehandlung mit palliativem Charakter für das fortgeschrittene und metastasierte PCA dar. (Rini & Small 2002, Lee et al. 2014) Das Prinzip bei der Behandlung besteht in einer Verlangsamung des Wachstums der hormonsensitiven, neoplastischen Prostatazellen durch die Senkung des Androgenspiegels und/oder die Blockade der Androgenwirkung. (Rohde et al. 2006) Ein häufiges Problem bei Patienten mit PCA ist im Verlauf der Krankheit die Schmerzsymptomatik. Deswegen ist die Schmerztherapie häufig ein wichtiger Fokus bei der Behandlung. Bei 80–90 % der Patienten kommt es durch eine hormonablative Therapie zur Verbesserung der Knochenschmerzen und damit zu einem guten Ansprechen auf die Therapie. (Gillessen & Strasser 2006)

##### I.1.6.4.1.1 Orchiektomie (Chirurgische Kastration)

Die chirurgische Kastration ist die medizinisch älteste Therapie, um einen Testosterontzug zu bewirken. Bei der Orchiektomie wird durch die Entfernung des Hodenparenchyms und der darin enthaltenen Leydig'schen Zellen als wesentliche Produktionsstätte des Testosterons (> 95 %) der Serumtestosteronspiegel auf Werte unter 0,5 ng/ml gesenkt (Kastrationsniveau). (Rohde et al. 2006, Wörmann & Wolff 2010)

##### I.1.6.4.1.2 GnRH-Analoga (LHRH-Agonisten, LHRH-Analoga)

Die subkutane Applikation von GnRH -Analoga (Gonadotropin-Releasing-Hormon ) gilt als die Standardhormontherapie und findet in Form von Depotpräparaten einen breiten klinischen Einsatz zur Behandlung des lokal fortgeschrittenen und metastasierten PCAs. (Heidenreich et al. 2014) Durch die kontinuierliche LHRH-Rezeptor-Stimulation (luteinisierendes Hormon Releasing-Hormon) und die dadurch ausgelöste Abnahme der Rezeptorzahl der Hypophyse wird die Senkung des Testosteronspiegels im Blut bis auf

Kastrationsniveau bewirkt, weshalb man auch von medikamentöser Kastration spricht. Der Kastrationsspiegel wird zwei bis vier Wochen nach Therapiebeginn erreicht. (Mohler 2014) Während dieser Zeit kann es zu einem Flare-up-Phänomen kommen, das zusätzlich durch die Gabe eines Antiandrogens behandelt wird. (Rohde et al. 2006, Schally et al. 2015, Vis et al. 2015)

#### I.1.6.4.1.3 Antiandrogene

Antiandrogene wirken als Antagonisten im Bereich des Androgenrezeptors. Man unterteilt sie in nichtsteroidale (z.B. Flutamid, Nilutamid, Bicalutamid) und steroidale (Cyproteronacetat, Medoxyprogesteronacetat) Antiandrogene. Nichtsteroidale Antiandrogene weisen keinen zusätzlichen endokrinen Effekt auf. Dagegen haben die steroidalen Antiandrogene durch ihre gestagene Wirkung auch einen antigonadotropen Effekt. Das führt zusätzlich zu einer verminderten LH-Produktion (luteinisierendes Hormon) und damit zu einer Senkung des Testosteronspiegels. (Ebert et al. 2001)

#### I.1.6.4.2 Chemotherapie

Die Option der kombinierten Hormon-Chemotherapie hat die Erstlinientherapie des metastasierten, hormonsensitiven Prostatakarzinoms verändert. (Sweeney et al. 2015, James et al. 2016) Bei Patienten mit gutem Allgemeinzustand ist Mittel der ersten Wahl zusätzlich zur Androgendeprivation eine Chemotherapie mit Docetaxel. Laut deutschen Leitlinien soll die Docetaxelgabe innerhalb von 4 Monaten nach Beginn der Androgendeprivation beginnen. Insgesamt werden 6 Zyklen alle drei Wochen in einer Dosierung von 75 mg/m<sup>2</sup> empfohlen. (Krebsgesellschaft & Deutsche Krebshilfe 2016)

#### I.1.6.4.3 Aspekte der symptomatischen Therapie

Des Weiteren spielt die Palliativmedizin beim fortgeschrittenen und vor allem beim metastasierten PCA, insbesondere bei den durch Knochenmetastasen ausgelösten Schmerzen, eine wesentliche Rolle bei der Linderung der Beschwerden und der damit einhergehenden Verbesserung der Lebensqualität. Hierbei können eine externe Strahlentherapie, eine Radionuklidtherapie oder eine medikamentöse Therapie beispielsweise mit Bisphosphonaten zum Einsatz kommen. (Berruti et al. 2001, Coleman 2001, Saad & Schulman 2004)

### I.1.6.5 Aspekte der Therapie des kastrationsresistenten Prostatakarzinoms

Trotz anhaltender Hormondeprivation wachsen vorübergehend nicht proliferierende Tumorzellen durchschnittlich nach 18 bis 24 Monaten weiter. Dann handelt es sich um ein kastrationsresistentes Prostatakarzinom (CRPC), das nicht mehr hormonsensitiv ist. (Rohde et al. 2006, Korzeniewski et al. 2013, Merseburger et al. 2013) Kommt es nach der Ausschöpfung weiterer hormonablativer Maßnahmen wie der maximalen Androgenblockade (MAB) erneut zu einer Progredienz des Tumors und sind ausgedehnte Metastasierungen vorhanden, ist die Indikation für eine Chemotherapie, auch unter dem Gesichtspunkt der Verbesserung der Lebensqualität, gegeben. (Group 2000, Wirth & Nippgen 2003) Seit TAX 327 (Tannock et al. 2004) und SWOG 99-16 (Petrylak et al. 2004) gilt die Behandlung mit dem Taxan Docetaxel als Goldstandard der primären Therapie des CRPC. Auch die Möglichkeit einer Therapie mittels Abirateron oder Sipuleucel-T als Erstlinientherapie ist gegeben. (Kantoff et al. 2010, Ryan et al. 2015) Es sollten allerdings alle für eine Therapieentscheidung wichtige Faktoren wie die Symptomatik, die Nebenwirkungen der Therapieoptionen, die Komorbidität, die Lokalisation von Metastasen und die generelle Tumorlast berücksichtigt werden. (Krebsgesellschaft & Deutsche Krebshilfe 2016) Bei Knochenmetastasen stehen Radium-223 (Parker et al. 2017), Bisphosphonate oder Denosumab zur Verfügung. Als Second-line-Therapie hat sich Cabazitaxel oder Mitoxantron bewährt. (Michels et al. 2006, Attard et al. 2015, Francini et al. 2015) Zudem können Enzalutamid oder Abirateronacetat in Kombination mit Prednison das Gesamtüberleben mit CRPC verlängern. (Cabot et al. 2012, Ryan et al. 2015)

Trotz dieser Möglichkeiten ist die Therapie des CRPC gerade im Hinblick auf das Überleben sehr eingeschränkt. Aus diesem Grund sollten neue Therapien z.B. auf molekularer Ebene wie die in dieser Arbeit beleuchtete mTOR-Inhibition auf ihre Wirksamkeit beim CRPC untersucht werden.

### I.1.7 Prognostische Faktoren

Insgesamt erwies sich eine Kombination aus PSA-Wert, klinisch bestimmtem Tumorstadium und nach der Stanzbiopsie erhobenem Gleason-Score in Bezug auf die Bestimmung der lokalen Tumorextension als guter Prädiktor und auch als prognostischer

Anhaltspunkt. (Partin et al. 2001) Jedoch lassen sich erst nach der operativen Entfernung der Prostata definitive Aussagen über die Tumorausdehnung und eine mögliche Metastasierung machen.

Zudem können Nomogramme wie zum Beispiel die Partin-Tabellen und die Kattan-Nomogramme herangezogen werden. Hierbei wird mit Hilfe des PSA-Werts, dem Gleason-Score und dem DRU-Befund präoperativ versucht, das Tumorstadium noch besser vorherzusagen, um die Wahrscheinlichkeit für eine mögliche Tumorprogression und die Möglichkeit für ein Rezidiv zu ermitteln. (Kattan et al. 1999, Partin et al. 2001, Graefen et al. 2004) In letzter Zeit werden bei prognostischen Fragen auch die Bildgebung mit mpMRT (multiparametrische Magnetresonanztomographie der Prostata) und die PET-MRT als Kombination aus Magnetresonanztomographie (MRT) und Positronenemissionstomographie (PET) vermehrt herangezogen. (Roosen 2014, Asbach et al. 2015, Knorr et al. 2017, Liehr et al. 2017) Trotzdem sind die Möglichkeiten für prognostische Aussagen sehr begrenzt. Diagnostischer und auch prognostischer Goldstandard ist nach wie vor die konventionelle Histologie. Im Gegensatz zum Mammakarzinom, wo molekulare Biomarker als prognostische Indikatoren seit langem erfolgreich eingesetzt werden, ist diese Entwicklung beim Prostatakarzinom noch nicht angekommen. (Beenken et al. 2001, Dhanasekaran et al. 2001, Tsutsui et al. 2003, Makretsov et al. 2004, Kristiansen 2009) Zum einen könnte man durch eine präzisere Einschätzung der Tumorausdehnung und -aggressivität viele Patienten vor einer Übertherapie bewahren und zum anderen den vorselektierten und geeigneten Patienten eine individualisierte und rechtzeitige Therapie ermöglichen. (Kristiansen 2009) Deshalb wurden in den letzten Jahren verstärkt unterschiedliche molekulare Ansätze wie beispielsweise der Verlust der PTEN-Expression in PCA-Tumorzellen untersucht, um noch genauere prognostische Aussagen insbesondere über eine mögliche Metastasierung treffen zu können. (Schmitz et al. 2007) Ein vielversprechender Ansatz scheinen auch die verschiedenen molekularen Komponenten des mTOR-Signalwegs zu sein. Dieser wird in der vorliegenden Arbeit unter anderem als möglicher prognostischer Faktor näher untersucht.



## I.2 Das mTOR-System

Mechanistic Target of Rapamycin (mTOR; einst: mammalian Target of Rapamycin) ist eine zytosolische Serin-Threonin-Kinase. Seinen Namen erhielt mTOR, weil man erkannte, dass es die Zielstruktur des Immunsuppressivums Rapamycin im Säugetier darstellt. (Keith & Schreiber 1995, Bosotti et al. 2000, Shaw & Cantley 2006, Liu & Zheng 2007, Seeliger et al. 2007, Iwenofu et al. 2008, Zoncu et al. 2011, Laplante & Sabatini 2012) Das Polypeptid besteht aus 2549 Aminosäuren und gehört zu einem Proteinkomplex, dem mTOR-System, das das Zellwachstum, den Zellzyklus und die Proliferation der Zelle über verschiedene Signalkaskaden reguliert. (Loewith et al. 2002, Hay & Sonenberg 2004) Das mTOR-System kontrolliert die Translation von mRNA, die für Proteine kodiert, die für das Fortschreiten des Zellzyklus in der G1-Phase und für den Übergang von der G1-Phase in die S-Phase benötigt werden. (Bjornsti & Houghton 2004, Hay & Sonenberg 2004) mTOR steuert zudem den Metabolismus der Zelle, die Organisation des Aktinskeletts, die Angiogenese und die Apoptose in Abhängigkeit vom Nährstoffangebot, von der Sauerstoffkonzentration, von Wachstumsfaktoren, Zytokinen, Hormonen, Mitogenen und anderen zellulären Stimuli. (Franke et al. 2003, Bjornsti & Houghton 2004, Hay & Sonenberg 2004, Mamane et al. 2006, Guertin & Sabatini 2007, Efeyan & Sabatini 2010) Somit kontrolliert mTOR das Überleben einer Zelle. (Mungamuri et al. 2006, DeBerardinis et al. 2008, Yuan et al. 2009, Laplante & Sabatini 2012) Es konnte darüber hinaus festgestellt werden, dass das mTOR-System bei vielen Krankheiten wie Adipositas, Diabetes Typ 2, neurodegenerativen Erkrankungen und auch bei Malignomen eine Rolle spielt. (Yuan et al. 2009, Laplante & Sabatini 2012)

### I.2.1 Aufbau, Funktion und Regulation des mTOR-Systems

Die Kinase mTOR (Molekülmasse: 298 kDa), die vor allem über den Wachstumsfaktor-PI3K-Akt-Signalweg agiert, liegt mit anderen Proteinen in zwei verschiedenen Proteinkomplexen vor: mTOR Komplex 1 (mTORC1) und 2 (mTORC2). Die beiden Komplexe weisen eine unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber Rapamycin auf. mTORC 1 wird durch Rapamycin und seine Analoga gehemmt, mTORC2 nicht. (Loewith et al. 2002, Guertin & Sabatini 2005, Shaw & Cantley 2006, Johnson et al. 2010, Bitting & Armstrong 2013)

Beide mTOR-Komplexe sind ähnlich groß, wobei mTORC1 aus 6 und mTORC2 aus 7 Proteinen besteht. Sie verfügen jeweils über das eigentliche mTOR-Protein, das mammalian LST8/G-protein  $\beta$ -subunit like protein (mLST8/G $\beta$ L (Kim et al. 2003, Jacinto et al. 2004)), das DEP domain containing mTOR-interacting protein (DEPTOR (Peterson et al. 2009)) und den Tti1/Tel2 complex (Kaizuka et al. 2010). Für mTORC1 sind das regulatory-associated protein of mTOR (Raptor (Hara et al. 2002, Kim et al. 2002)) und proline-rich Akt substrate 40 kDa (PRAS40 (Sancak et al. 2007, Thedieck et al. 2007, Vander Haar et al. 2007, Wang et al. 2007)) spezifisch. Bei mTORC2 sind hingegen das Protein rapamycin-insensitive companion of mTOR (Rictor (Jacinto et al. 2004, Sarbassov et al. 2004)), mSIN1 (mammalian stress-activated map kinase-interacting protein 1 (Frias et al. 2006, Jacinto et al. 2006)) und protein observed with rictor 1 and 2 (protor1/2 (Pearce et al. 2007, Thedieck et al. 2007, Pearce et al. 2011)) beteiligt. Raptor und Rictor fungieren dabei als Adaptorproteine, die den mTOR-Komplexen Substrate präsentieren und mit anderen Proteinen interagieren. (Sarbassov et al. 2004, Pearce et al. 2007, Thedieck et al. 2007)

Die Aktivierung von mTORC1 führt zur Phosphorylierung von zwei regulatorischen Proteinen des Zellzyklus und des Zellwachstums: 4E-BP1 (eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1) und S6K1 (protein S6 kinase 1). (Flynn & Proud 1995, Fingar et al. 2002, Dann et al. 2007, Meyuhav 2008, Ma & Blenis 2009, Vinod & Venkatesh 2009)

Durch die Phosphorylierung des Translationsinhibitors 4E-BP1 wird eIF4E freigesetzt und damit die Inhibition der Translation aufgehoben. So kann der Translations-Initiations-Komplex (eIF4E) an mRNA-Transkripte binden und damit eine cap-abhängige Translation initiieren, was zur vermehrten Synthese von Proteinen führt, die die Zellproliferation und das Zellwachstum regulieren. (Gingras et al. 2001)

Die Phosphorylierung des Proteins S6K1 führt zu dessen Aktivierung. S6K1 treibt die Protein-Biosynthese durch Aktivierung des Proteins S6 an, das die Translation von ribosomalen Proteinen und Elongationsfaktoren bewältigt. (Fingar et al. 2002, Meyuhav 2008) Es bindet zudem an die mitochondriale Membran und inaktiviert dort das proapoptotische Molekül BAD. (Jiang & Liu 2008) Außerdem aktiviert S6K1 die wachstumsregulatorischen Proteine Hypoxie-induzierter Factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) und den

eukaryotischen Elongationsfaktor 2 (eEF2). (Wang et al. 2001, Cam et al. 2010, Dodd et al. 2015) S6K1 ist zudem in der Lage, mTORC1 mittels positivem Feedbackloop zu phosphorylieren und so die Aktivität der Kinase anzuregen.

mTORC2 aktiviert die Proteinkinase B (Akt) durch Phosphorylierung an Ser473. (Sarbasov et al. 2005, Seeliger et al. 2007, Russell et al. 2011) Akt wiederum hemmt die Apoptose durch die Deaktivierung von für die Regulation der Apoptose zuständigen Proteinen. (Cardone et al. 1998, Brunet et al. 1999) mTORC2 kann außerdem die Kinase SGK1 (serum-, and glucocorticoid-induced protein kinase 1) und die Proteinkinase C (PKC  $\alpha$ ) durch Phosphorylierung aktivieren und reguliert durch die Phosphorylierung der kleinen GTPasen Rho und Rac die Organisation des Aktinskeletts. (Jacinto et al. 2004, Sparks & Guertin 2010)

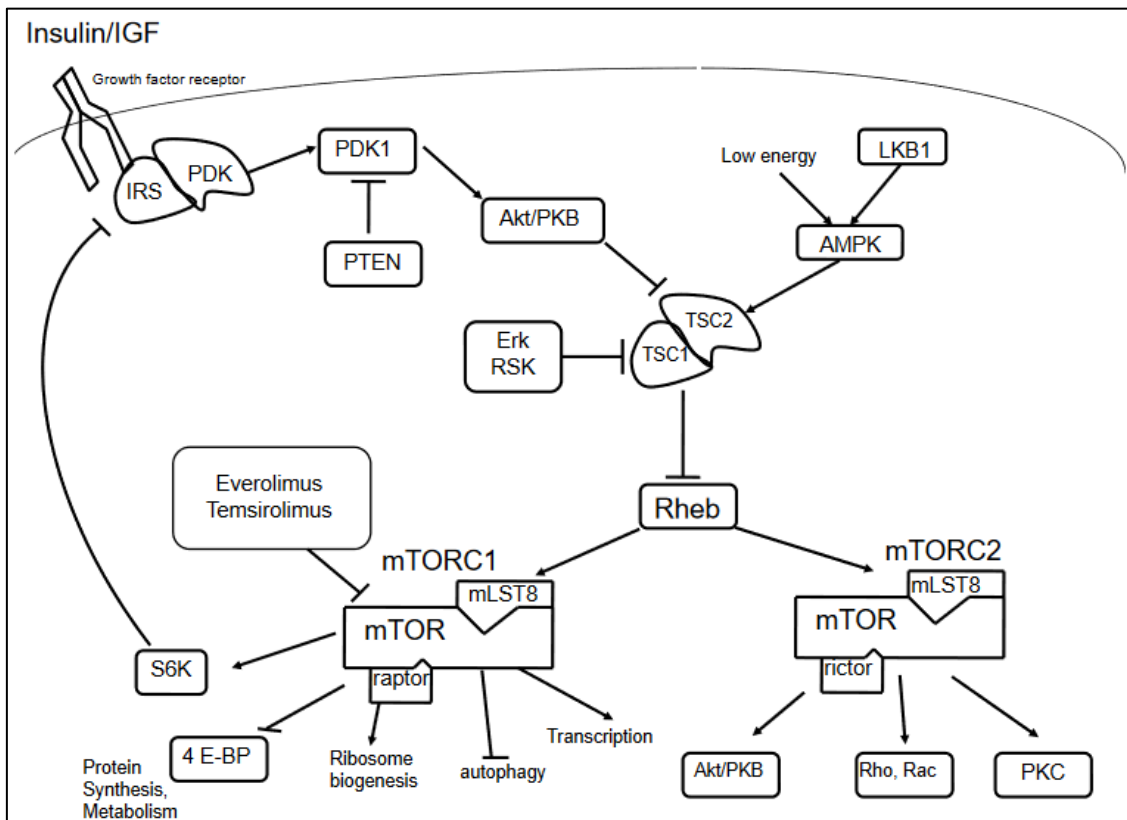


Abbildung 2: Schematische Darstellung der mTOR-Regulation (L Burgio et al. 2012)

Der mTOR Signalweg wird in normalen Zellen über positive und negative Signale reguliert. Zu den positiven Regulatoren zählen Wachstumsfaktoren wie der Insulin-like growth factor 1 (IGF 1) sowie die VEGFs (vascular endothelial growth factors), Zytokine wie Interleukin 2 (IL-2) und Hormone wie das Peptid Insulin, die alle ihre positiven

Signale mTOR gegenüber über den PI3K-Akt-Signalweg vermitteln. (Seeliger et al. 2007) Zu den wichtigsten negativen Regulatoren des PI3K-Akt-Signalwegs zählen hingegen der TSC (Tuberous Sclerosis Complex) und PTEN (Phosphatase and Tensin homolog) wie in Abbildung 2 zu erkennen. (Wu et al. 1998, Ramaswamy et al. 1999, Efeyan & Sabatini 2010, Zinzalla et al. 2011)

TSC ist ein Heterodimer bestehend aus zwei Proteinen: TSC1 (Hamartin) und TSC2 (Tuberin). TSC2 ist hierbei die katalytische Untereinheit und ein GTPase aktivierendes Protein (GAP), das die mit Ras verwandte kleine GTPase Rheb (Ras-homologe-enriched-in-brain) inaktiviert. In vitro Experimente zeigen, dass Rheb wiederum die Kinaseaktivität von mTORC1 verstärkt. (Inoki et al. 2003, Inoki et al. 2006, Sancak et al. 2007, Vander Haar et al. 2007) Wird also der TSC1/2-Komplex entweder durch eine Mutation wie beispielsweise bei der tuberösen Sklerose oder durch Wachstumssignale der Zelle inaktiviert, führt das zur gesteigerten Aktivität von Rheb und somit von mTOR. (Crino et al. 2006) Im Gegensatz dazu inhibiert PRAS40 (proline-rich Akt substrate of 40 kDa) die Rheb-GTP-abhängige mTORC1-Aktivität und ist in Zellen stabil mit mTORC1 assoziiert. In intakten normalen Zellen zwingt Akt Rheb-GTP und PRAS40 trotz ihrer antagonistischen Wirkungen miteinander zu kommunizieren. Akt phosphoryliert PRAS40 und reduziert damit seine Fähigkeit mTORC1 zu inhibieren. (Sancak et al. 2007) Akt ist zudem in der Lage, TSC2 zu phosphorylieren. Dadurch verringert sich die inhibitorische Wirkung von TSC auf mTOR. (Yuan et al. 2009)

Neben der möglichen Phosphorylierung von mTOR durch S6K1 an Ser2448 (Chiang & Abraham 2005), ist auch Akt in der Lage, mTOR an Ser2448 zu phosphorylieren. (Li et al. 2015) mTOR hat verschiedene Phosphorylierungsstellen. Man konnte feststellen, dass der mTORC1-Komplex mTOR mit der Phosphorylierungsstelle Ser2448 beinhaltet, wohingegen der mTORC2-Komplex vor allem aus mTOR mit der Phosphorylierung an Ser2481 besteht. (Copp et al. 2009) Die Phosphorylierung von mTOR führt unweigerlich zur Aktivierung der Kinase. Die Phosphorylierungsstelle des verwendeten Primärantikörpers p-mTOR war in der vorliegenden Arbeit Ser2448.

## I.2.2 Die Bedeutung des mTOR-Signalwegs bei der Karzinogenese

Man hat bereits vor einigen Jahren erkannt, dass die Veränderung eines einzelnen Schrittes im mTOR-Signalweg unter Umständen zu einer veränderten Zelldynamik und letztlich zur Tumorentstehung führen kann. (Tee & Blenis 2005, Mamane et al. 2006, Grant 2008) So konnte bei zahlreichen Tumoren wie dem Nierenzellkarzinom, dem Melanom und dem Mammakarzinom bereits gezeigt werden, dass die Hochregulation des mTOR-Signalübertragungswegs eine große Rolle bei der Karzinogenese spielt. (Iwenofu et al. 2008) Eine vermehrte mTOR-Aktivität führt unter anderem zur gesteigerten Synthese von verschiedenen Proteinen wie beispielsweise Cyclin-D1, das beim Ablauf des Zellzyklus relevant ist, und HIFs (Hypoxie-induzierte Faktoren), die zur vermehrten Angiogenese führen, indem sie die Expression von Wachstumsfaktoren wie den VEGFs (vascular Endothelial growth factors) und PDGF $\beta$  (platelet-derived growth factor- $\beta$ ) vorantreiben. (Yuan et al. 2009) Außerdem wirkt mTOR positiv auf den Metabolismus von Krebszellen, indem es die Akt-abhängige Glukoseaufnahme in die Zellen begünstigt. (Zoncu et al. 2011) Ein Beispiel für den Zusammenhang zwischen mTOR und der Entstehung von Tumoren zeigt unter anderem auch die Erforschung des TSC1/TSC2-Komplexes. Man erkannte, dass Mutationen der Gene, die für den TSC1/TSC2-Komplex codieren, die Erbkrankheit tuberöse Sklerose (TSC) zur Folge haben. Die verminderte oder fehlerhafte Ausbildung des Komplexes, der für die Aktivitätsminderung insbesondere von mTORC1 verantwortlich ist, geht bei dieser Erkrankung mit tumorösen Veränderungen verschiedener Organe einher. (Jones et al. 1999, Crino et al. 2006, Guertin & Sabatini 2007, Laplante & Sabatini 2012)

Neben mTOR wurde in der vorliegenden Arbeit ein Fokus auf die phosphorylierte Form von mTOR, p-mTOR, gelegt. Zudem wurde der Translationsinhibitor 4E-BP1 untersucht, der dem mTOR-Komplex nachgeschaltet ist. Zahlreiche Studien zeigen einen Zusammenhang zwischen diesen Proteinen und der Entstehung von Tumoren. Beim Kolonkarzinom z.B. ist sowohl die Expression von mTOR als auch von p-mTOR verglichen mit intakter Kolonmukosa signifikant erhöht. (Xu et al. 2011) Auch beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle und beim Ovarialkarzinom konnte während der Karzinogenese ein Anstieg der p-mTOR-Expression beobachtet werden. (Altomare et al. 2004, Yang et al. 2013, Martins et al. 2016)

4E-BP1 kann an 7 Stellen phosphoryliert werden. mTOR ist in der Lage, 4 dieser Stellen zu phosphorylieren und die Initiation der Translation cap-abhängiger mRNAs zu ermöglichen. Diese Phosphorylierungsstellen sind Threonin 37, 46 und 70 und Serin 65. (Tee & Blenis 2005, Averous & Proud 2006, Armengol et al. 2007) Ebenso wie bei mTOR und p-mTOR scheint die Expression von 4E-BP1 bei der Entstehung verschiedener Tumoren verändert zu sein. Hierbei zeigt sich aber nicht wie bei mTOR und p-mTOR eine erhöhte Expression in den meisten Tumoren, sondern eine verminderte, was sich durch die vermehrte Phosphorylierung durch mTOR erklären lassen könnte. Beim Kardiakarzinom zeigt sich beispielsweise eine signifikant verminderte Expression von 4E-BP1 im Vergleich zu normalem Gewebe des Mageneingangs. (Yang et al. 2013)

Dass der Signalweg bei der Karzinogenese eine wichtige Rolle spielt, wird auch deutlich, wenn man sich mit Veränderungen der Phosphatase PTEN, die upstream von mTOR als Tumorsuppressor agiert, auseinandersetzt. (Grant 2008) Wird PTEN aktiviert, führt das normalerweise zum Zelltod durch Einleitung der Apoptose. (Salmena et al. 2008) Kommt es zu Mutationen an PTEN, kann das Enzym seine Funktion als Tumorsuppressor jedoch nicht mehr wahrnehmen. Das führt zur unkontrollierten Zellvermehrung, was bei zahlreichen Tumoren beobachtet werden kann. (Li et al. 1997, Steck et al. 1997)

#### I.2.2.1 Relevanz bei der Entstehung des Prostatakarzinoms

Die Vermutung liegt nahe, dass auch bei der Entstehung des PCA eine Veränderung der Expressionen der drei Proteinparameter festzustellen ist. Eine Verbindung zwischen dem mTOR-Signalweg und der Entstehung einer prostatichen intraepithelialen Neoplasie (PIN) konnte bereits in einer Studie mit Mäusen gezeigt werden. So induzierte aktiviertes Akt, das man Mäusen verabreichte, eine PIN. (Majumder et al. 2004) Zudem konnte festgestellt werden, dass die mTOR-Expression bei Gewebe, das aus einer PIN stammt, höher ist als bei Normalgewebe. (Kremer et al. 2006) Des Weiteren scheint mTORC2 eine besondere Rolle bei der Genese eines PCA zuzukommen. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass mTORC2 die Voraussetzung für die PCA-Entstehung bei Mäusen ist, denen der Tumorsuppressor PTEN fehlt. (Hietakangas & Cohen 2008, Guertin et al. 2009) Zudem deutet vieles darauf hin, dass auch eine veränderte Expression von 4E-BP1 bei der Entstehung eines Prostatakarzinoms von Bedeutung sein könnte. (Kremer et al. 2006)

### I.2.3 Die Bedeutung des mTOR-Signalwegs beim Fortschreiten verschiedener Tumoren

Die Relevanz des mTOR-Signalwegs bei der Progression von malignen Vorgängen wird vor allem deutlich, wenn man sich Studien zu der aktivierten Kinase ansieht. Denn mTOR ist erst in der aktivierten Form, p-mTOR, in der Lage seine Substrate 4E-BP1 und S6K1 zu phosphorylieren (s. Kapitel Aufbau, Funktion und Regulation des mTOR-Systems). Dass die Expression von p-mTOR mit der Progression von Tumoren im Zusammenhang steht, zeigt eine Studie über Magenkrebs. Mittels Tissue Microarrays und Immunhistochemie wurde die Beziehung zwischen der Expression von p-mTOR und der Lymphknotenmetastasierung untersucht. Mit diesen Methoden, die auch der vorliegenden Arbeit zu Grunde liegen, wurde herausgefunden, dass die Expression von p-mTOR im Gewebe von Karzinomen ohne Lymphknotenmetastasierung gering war im Vergleich zu Gewebe von Karzinomen mit vielen ( $> 16$ ) befallenen Lymphknoten. Zudem wurde die Auswirkung der Expression von p-mTOR auf die 5-Jahres-Überlebensrate untersucht. So überlebten deutlich mehr Patienten mit ausgeprägter Lymphknotenmetastasierung ( $> 16$ ) weitere 5 Jahre, wenn das untersuchte Gewebe keine oder nur eine geringe p-mTOR-Expression zeigte. Patienten, deren Gewebe eine hohe p-mTOR-Expression aufwies, lebten kürzer. (An et al. 2010) Eine weitere Studie zu Magenkrebs bekräftigt diese Ergebnisse. Eine positive Korrelation zwischen der zytoplasmatischen p-mTOR-Expression und der Anzahl der involvierten Lymphknoten und dem Tumorstadium war bei einer Vielzahl der untersuchten Tumoren zu beobachten. (Murayama et al. 2009) Auch bei Brustgewebe konnte ein Zusammenhang zwischen dem gehäuften Vorkommen der phosphorylierten Form von mTOR und der Entstehung und dem Fortschreiten von Tumoren festgestellt werden. Des Weiteren wurde für das Mammakarzinom gezeigt, dass eine verstärkte p-mTOR-Expression in der Regel mit kürzeren Überlebenszeiten zusammenhing. (Zhou et al. 2004) Auch beim Plattenepithelkarzinom des Penis konnte gezeigt werden, dass die p-mTOR Expression in Tumorgewebe verglichen mit normalem Gewebe erhöht ist und dass eine starke Überexpression von p-mTOR bei vielen Tumoren, die bereits Metastasen in Lymphknoten gebildet hatten, zu beobachten war. (Ferrandiz-Pulido et al. 2013) Des Weiteren konnten bei einer Studie mit Patienten, die an einem neuroendokrinen Tumor der Bauchspeicheldrüse (pNET) erkrankt waren, sowohl m-TOR als auch p-mTOR-

Überexpressionen bei einer großen Zahl der Tumoren festgestellt werden. Bei p-mTOR schien zudem der Differenzierungsgrad mit der Expression im Zusammenhang zu stehen. Denn eine Überexpression von p-mTOR wurde bei 67 % der schlecht differenzierten und nur bei 27 % der gut differenzierten Tumoren beobachtet. (Shida et al. 2010)

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen zeigte eine Studie über das Bronchialkarzinom keine statistisch signifikante Korrelation zwischen der Expression sowohl von mTOR als auch von p-mTOR und der Prognose der Patienten, die an der Studie teilnahmen. (Li et al. 2015) In einer anderen Studie konnte bei dieser Art von Tumor hingegen ein Zusammenhang zwischen der p-mTOR-Expression und der Tumorgroße festgestellt werden, der allerdings der Expressionsbeobachtung im Magenkarzinom und Mammakarzinom widerspricht. Die größeren Tumoren wiesen hier deutlich geringere p-mTOR-Expressionen auf als die kleineren. (Ali et al. 2011)

Eine weitere Studie zeigte, dass die Aktivierung von mTOR auch beim Endometriumkarzinom eine Rolle spielt. Die Studienergebnisse zeigten in diesem Fall, dass die Expression von p-mTOR bei Karzinomen, die eine starke Infiltration ins Myometrium aufwiesen, signifikant verringert war. Auch wurde gezeigt, dass die Patientinnen mit p-mTOR-positiven Tumoren durchschnittlich länger krankheitsfrei überlebten. (Choi et al. 2010) Diese Ergebnisse stehen jedoch wie die Ergebnisse von Ali et al. zum Bronchialkarzinom im Kontrast zu den oben bereits beschriebenen Beobachtungen bei vielen Karzinomen, dass die weiter fortgeschrittenen Tumoren eine erhöhte p-mTOR-Expression aufweisen. Eine andere Studie zum Endometriumkarzinom stellte ferner den umgekehrten Zusammenhang fest. Eine hohe p-mTOR-Expression war hier überwiegend in fortgeschrittenen Tumoren zu beobachten und in vielen Fällen mit einer Metastasierung in Lymphknoten verbunden. (Darb-Esfahani et al. 2009)

Eine Studie über das Kardiakarzinom, das den Magenkarzinomen zugerechnet wird, beweist, dass sowohl mTOR als auch p-mTOR in Karzinomgewebe, aber auch in normaler Magenschleimhaut zu finden sind. Die mTOR-Expression war hier bei Karzinomgewebe geringer als bei normalem Gewebe, während die p-mTOR-Expression im Gegensatz zu den Ergebnissen der oben erwähnten Studien zum Magenkrebs keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gewebearten zeigte. Bei der Betrachtung



des Verhältnisses zwischen der p-mTOR- und der mTOR-Expression fiel jedoch auf, dass das Krebsgewebe eine deutliche höhere p-mTOR-Expression in Relation zur mTOR-Expression aufwies als das gesunde Gewebe. Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass weniger die Überexpression von p-mTOR an sich als vielmehr die Aktivierung von mTOR durch dessen Phosphorylierung eine Rolle bei der Entstehung und insbesondere bei der Progression von Tumoren spielt. (Yang et al. 2013)

Auch 4E-BP1 scheint eine wesentliche Bedeutung bei der Progression von Tumoren zu spielen. (De Benedetti & Graff 2004) Die Phosphorylierung des Translationsinhibitors 4E-BP1 führt wie oben bereits beschrieben zu einer Auflösung der Bindung zwischen 4E-BP1 und eIF4E und damit letztlich zum Start der Translation verschiedener cap-abhängiger mRNAs, die für Proteine kodieren, die für das Zellwachstum und die Zellproliferation zuständig sind. Für Tumoren, bei denen die Translation ihrer onkogenen mRNAs hochgefahren wird, würde das in der logischen Konsequenz bedeuten, dass überwiegend die phosphorylierte Form von 4E-BP1, p4E-BP1 und der ungebundene Initiationsfaktor eIF4E exprimiert sein dürften und die Expression des unphosphorylierten Translationsinhibitors 4E-BP1 vermindert sein müsste.

Tatsächlich konnte bei experimentellen Versuchen gezeigt werden, dass eine Überexpression von eIF4E in einer vermehrten Translation von onkogenen mRNAs resultiert. (Ruggero et al. 2004) Dagegen führt die Reduktion der eIF4E-Expression und die damit einhergehende geringere Translation der onkogenen mRNA in experimentellen Modellen zur Apoptose von malignen Zellen und zur Unterdrückung von Tumorinvasion und Metastasierung. (Rinker - Schaeffer et al. 1993, Herbert et al. 2000, Graff et al. 2007)

Eine veränderte 4E-BP1-Expression beobachtet man bei verschiedenen Kopf- und Halstumoren und bei einigen Tumoren des Gastrointestinaltrakts. (Nathan et al. 2004) So zeigten Martin et al. in ihrer Studie zu Tumoren des Gastrointestinaltrakts, dass eine negative Korrelation zwischen der 4E-BP1-Expression und der Tumorprogression zu erkennen war. (Martín et al. 2000) Weiterhin erkannte man, dass der Verlust der Funktion von 4E-BP1 eine Epithelial-mesenchymale Transition indizieren kann und die Fähigkeit von Krebszellen zur Metastasierung erhöht. (Wang et al. 2014)

Zu diesen Beobachtungen passt auch die Erkenntnis, dass die Überexpression der phosphorylierten Form von 4E-BP1 mit einer schlechteren Prognose und Tumorprogress bei Brustkrebs und beim Ovarialkarzinom assoziiert ist. (Castellvi et al. 2006, Armengol et al. 2007, Rojo et al. 2007) In einer weiteren Studie zu Brustkrebs konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von 4E-BP1 mit dem Fortschreiten des Tumors assoziiert werden kann und das krankheitsfreie Überleben bei einer Überexpression vermindert ist. (Zhou et al. 2004)

#### I.2.4 Die Relevanz des Signalwegs bei der Progression des Prostatakarzinoms

Dass der mTOR-Signalweg nicht nur eine zentrale Rolle bei der Entstehung eines Tumors der Prostata, sondern auch beim Tumorprogress und bei der Metastasierung spielt, konnte bis dato von zahlreichen Studien bestätigt werden. (Kaarbø et al. 2010, Bitting & Armstrong 2013, Edlind & Hsieh 2014) So konnten für nahezu 100 % der metastasierten Tumoren Veränderungen wie Mutationen, veränderte Proteinexpressionen und Veränderungen der Kopienzahl im PI3K/Akt/mTOR-Signalweg festgestellt werden. (Taylor et al. 2010) Auch wird mTOR eine zentrale Rolle beim metastasierten PCA zugeschrieben, weil sein Einfluss auf das Tumorstadium durch die Regulation von HIF1 $\alpha$  (Hudson et al. 2002) und die Inhibition von TGF $\beta$ 1 (transforming growth factor- $\beta$ 1) groß ist. (Van der Poel 2004) Zudem zeigt eine neue Studie von Tanesa et al., dass die Aktivität der Enzymsysteme Glyoxalase 1 (Glo1) und Glyoxalase 2 (Glo2) vermutlich beide eine Rolle beim Tumorprogress des PCA spielen und über den PTEN/PI3K/Akt/mTOR-Signalweg gesteuert werden. (Tanesa et al. 2017)

Auf der anderen Seite gibt es Beobachtungen, die gegen eine Relevanz beim PCA-Progress sprechen. So erkannten Ko et al. zum Beispiel keinen signifikanten Unterschied im p-mTOR-Proteinanteil zwischen HGPIN und PCA, weshalb die Autoren vermuten, dass der Akt/mTOR-Signalweg doch eine limitierte Rolle in der Progression des PCA spielt. (Ko et al. 2014)

Wie der Initiationsfaktor 4E-BP1 und der PCA-Tumorprogress korreliert sind, wurde von Graff et al. bereits 2009 untersucht. Mittels Immunhistochemie wurde deutlich, dass sowohl eine signifikant erhöhte eIF4E als auch p-4E-BP1-Expression beim

fortgeschrittenen Prostatakarzinom im Vergleich zur benignen Prostatahyperplasie (BPH) zu beobachten ist. Vor allem für eIF4E zeigte sich deutlich, dass alle untersuchten Gewebe die gleiche prozentuale Zahl an gefärbten Zellen aufwiesen, sich die Zellen jedoch in ihrer zytoplasmatischen Färbeintensität unterschieden. Bei BPH war die eIF4E-Färbeintensität gering, bei low grade PCA (Gleason-Score < 7) war die Färbeintensität etwas stärker und bei high grade PCA (Gleason-Score  $\geq$  7) war sie sehr stark. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass erhöhte Expressionen von eIF4E und p-4E-BP mit geringerem Patientenüberleben korrelieren, wohingegen eine gleichmäßige 4E-BP1-Expression signifikant mit einem besseren Patientenüberleben zusammenhängt. (Graff et al. 2009)

Welche Rolle das mTOR-System beim Progress des PCAs tatsächlich spielt, ist bisher nicht eindeutig erforscht. Deswegen befasst sich die vorliegende Arbeit unter anderem mit dieser Frage.

### I.2.5 Der mTOR-Signalweg und das kastrationsresistente Prostatakarzinom

Dass eine Verbindung zwischen dem mTOR-Signalweg und dem Androgenrezeptor (AR) besteht, ist bisher nicht eindeutig ersichtlich, kann aber vermutet werden. (Edlind & Hsieh 2014) Einige Studien lassen auf eine gegenseitige Beeinflussung schließen. Man erkannte beispielsweise, dass eine Unregelmäßigkeit im PI3K-Akt-mTOR-Signalweg, die aus dem Verlust von PTEN resultiert, die Entstehung einer Androgenunabhängigkeit begünstigt und letztlich zum CRPC führt. (Wang et al. 2003, Jiao et al. 2007) Es wurde zudem deutlich, dass der Verlust von PTEN bei Prostata-Epithelzellen dazu führen kann, dass weniger AR-Zielgene transkribiert werden, was eine Verbindung des mTOR- und des AR-Signalwegs bekräftigt. (Carver et al. 2011, Mulholland et al. 2011)

Eine mögliche Verbindung der beiden Signalwege könnte auch in der Aktivierung des AR unabhängig von seinen Liganden durch die Hochregulation des Akt/mTOR- und ERK/MAPK (extracellular-signal regulated kinase /mitogen-activated protein kinase; s. Abbildung 3 E) Signalwegs bestehen. (Shen & Abate-Shen 2010)

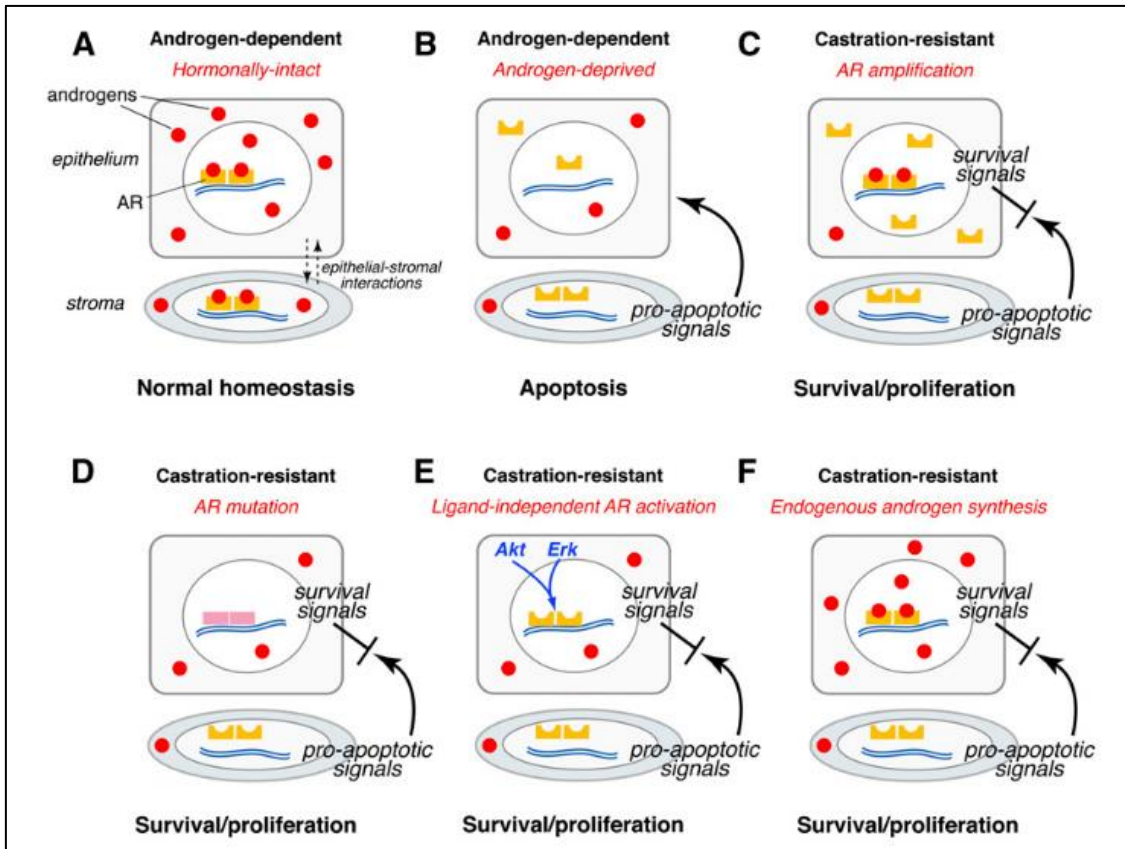


Abbildung 3: Die Rolle des AR im CRPC. A: der AR hält die Homöostase sowohl im epithelialen als auch im stromalen Gewebe in der normalen Prostata aufrecht, B: Während der Androgenablation senden die stromalen Zellen parakrine proapoptotische Signale, die auf die benachbarten epithelialen Zellen wirken und die Rückbildung der normalen Prostata indizieren, C-F: Kastrationsresistenz kann durch eine Vielzahl an molekularen Mechanismen getriggert werden: C: AR-Amplifikation, D: AR-Mutation, E: Liganden-unabhängige AR-Aktivierung durch die Hochregulation anderer Signalwege wie dem Akt/mTOR- oder ERK/MAPK-Signalweg, F: endogene Biosynthese von Androgenen durch die Tumorzellen (Shen & Abate-Shen 2010)

## I.3 Zielgerichtete Therapie - mTOR-Inhibition

Dass das Wachstum verschiedener Tumoren durch die Inhibition des mTOR-Signalwegs eingeschränkt werden kann, verdeutlicht, wie sehr der Signalweg bei der Tumorprogression involviert ist. Zielgerichtete Krebstherapien greifen in die zytologischen und biologischen Eigenschaften der Krebszellen ein. Sie behindern die Tumorzellen beispielsweise in ihrem Stoffwechsel oder der Angiogenese oder regen sie zur Apoptose an. (Ghobrial et al. 2005, Roukos 2009, Awada et al. 2015) In Bezug auf das PCA erscheinen molekulare Ansätze wie Signaltransduktionsinhibitoren besonders vielversprechend. Beim Nierenzellkarzinom hat sich die Therapie mit Hilfe dieser Inhibitoren bereits etabliert. (Morgan et al. 2009) Für das fortgeschrittene Mammakarzinom wurde gezeigt, dass bei postmenopausalen Frauen mit Hormonrezeptor-positivem Karzinom das progressionsfreie Überleben durch die Inhibition des mTOR-Signalwegs verbessert werden kann. (Baselga et al. 2012) Deswegen scheint die Möglichkeit zu bestehen, dass das molekulare Targeting des mTOR-Pathways auch bei der Therapie von fortgeschrittenen Stadien des PCA und eventuell auch des CRPC neue Türen öffnet.

### I.3.1 Arten der mTOR-Inhibition

Neben den allosterischen mTOR-Inhibitoren Rapamycin und seinen Derivaten, die zur ersten Generation der mTOR-Inhibitoren zählen und vor allem mTORC1 hemmen, gibt es indes eine zweite Generation der mTOR-Inhibitoren. Hierzu zählt zum Beispiel Sapanisertib (MLN0128, INK128). (Benjamin et al. 2011) Diese Inhibitoren konkurrieren mit ATP am katalytischen Zentrum von mTOR und sind somit in der Lage, neben mTORC1 auch mTORC2 zu inhibieren. (Guertin & Sabatini 2009)

#### I.3.1.1 Rapamycin und seine Derivate

Der meist erforschte mTOR-Inhibitor ist Rapamycin (Synonym: Sirolimus), was als makrozyklisches Antibiotikum von dem Streptomyzeten *Streptomyces hygroscopicus* produziert wird. Rapamycin und seine Derivate hemmen die Aktivität von mTOR, indem es ein Komplex mit dem Immunophilin FKBP12 (FK506-binding protein of 12 kDa) bildet, das an eine Region des C-Terminus von mTOR, genannt FRB (FKBP12-rapamycin binding), bindet (s. Abbildung 4). Diese grenzt an das katalytische Zentrum von mTOR. (Choi et al. 1996, García-Echeverría 2010) Zu den bekanntesten Anologa

(engl. rapalogs) von Rapamycin gehören Temsirolimus (CCI-779), Everolimus (RAD001) und Ridaforolimus/Deforolimus (AP23573, MK-8669). (Faivre et al. 2006)

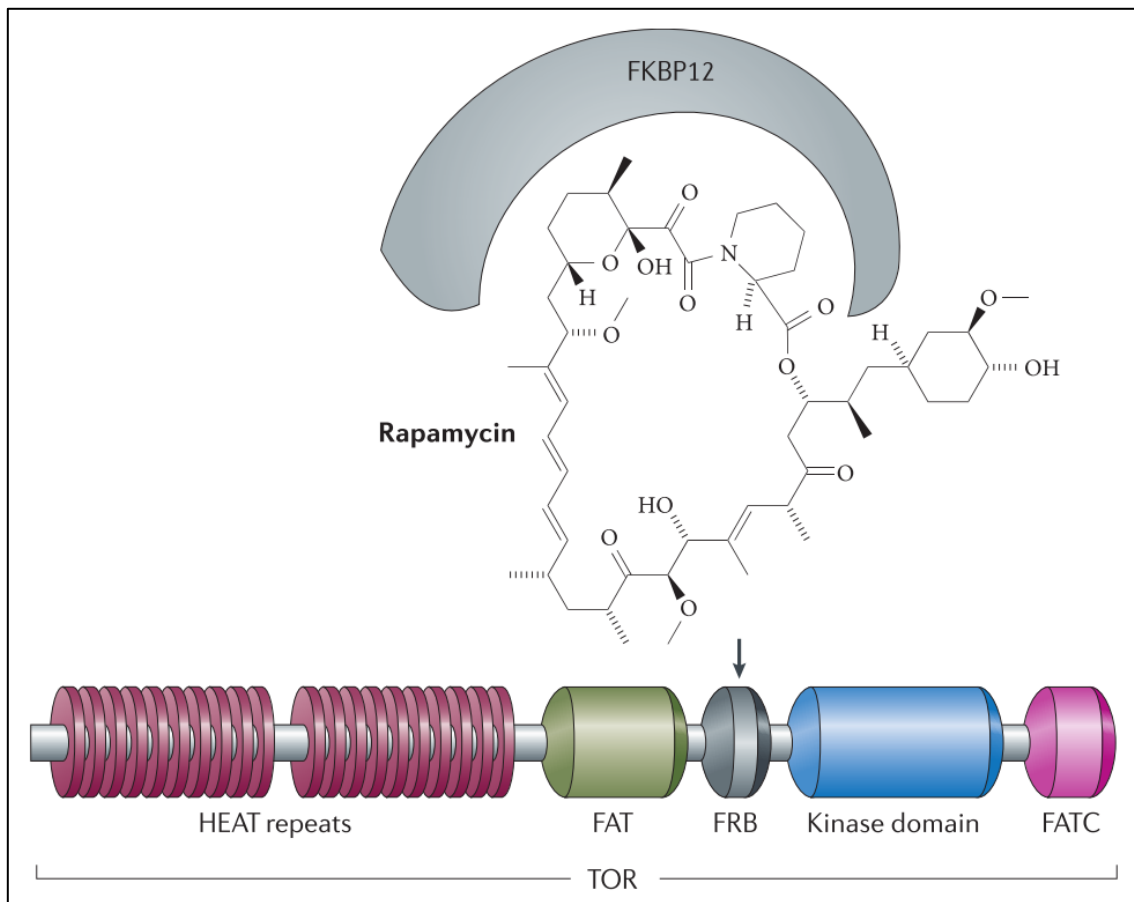


Abbildung 4: TOR und Rapamycin (Benjamin et al. 2011)

### I.3.1.2 Zweite Generation: ATP-kompetitive mTOR-Inhibitoren

Rapamycin ist ein allosterischer mTOR-Inhibitor. Im Gegensatz dazu sind die neueren mTOR-Inhibitoren ATP-Analoga. Diese verringern die Aktivität der Kinase mTOR, indem sie mit ATP um die Kinase-Domäne bei mTOR konkurrieren. ATP ist das physiologische Substrat, das seine Phosphatgruppe abgibt, damit mTOR die nachgeschalteten Proteine wie 4E-BP1 phosphorylieren kann. So inhibieren diese dualen Inhibitoren alle Kinase-abhängigen Funktionen von mTORC1 und mTORC2 und verhindern damit auch die rückwirkende Aktivierung der PI3K/Akt-Signalkaskade. (Benjamin et al. 2011) Zur zweiten Generation gehören auch die dualen mTOR/PI3K-Inhibitoren, die wirksam mTORC1, mTORC2 und zusätzlich alle katalytischen Isoformen von PI3K hemmen und somit ein breiteres Wirkungsspektrum besitzen. (Zaytseva et al. 2012) Zu den mTOR-Inhibitoren der zweiten Generation gehören neben

Sapanisertib zum Beispiel Dactolisib (BEZ235) und Voxalisib (XL765). (Zheng & Jiang 2015)

### I.3.1.3 Die dritte Generation der mTOR Inhibitoren

Da man erkannte, dass Mutationen entweder in der FRB- oder der Kinasedomäne von mTOR eine Resistenz gegenüber den Inhibitoren der ersten und der zweiten Generation indizieren können, wurde eine weitere Form der mTOR-Inhibition entwickelt. RapaLink-1 z.B. enthält Rapamycin, welches an einen ATP-kompetitiven mTOR-Inhibitor gekoppelt ist und durch die bivalente Wirkung die Inhibition der mutierten Bereiche erzielt. (Rodrik-Outmezguine et al. 2016, Conciatori et al. 2018) So zeigte sich, dass RapaLink-1 im Gegensatz zu den früheren Inhibitoren in präklinischen Studien die p-4E-BP1-Level niedriger hält und die Zellproliferation besser eindämmen kann. Ob ein Erfolg im klinischen Studiendesign ebenfalls realisierbar ist, bleibt abzuwarten. (Conciatori et al. 2018)

### I.3.2 Einsatz

Rapamycin hat zunächst aufgrund seiner hemmenden Wirkung auf T-Zellen nur als immunsupprimierendes Medikament Verwendung gefunden. 1999 erhielt es seine Zulassung von der Food and Drug Administration (FDA) in der Transplantationsmedizin, in welcher das Medikament seitdem zur Verhinderung von Organabstoßungen eingesetzt wird. (Klintmalm & Nashan 2014, Xie et al. 2016) Seit 2003 werden auch in der Kardiologie Stents eingesetzt, die mit Rapamycin beschichtet sind. So konnte die Anzahl an Stentverschlüssen durch die Neubildung von Gewebe deutlich gesenkt werden. (Sehgal 2003)

Auch bei Karzinomen zeigten mTOR-Inhibitoren zum Teil eine gute Wirkung. So ist Everolimus bei der Behandlung des Nierenzellkarzinoms, des mit der tuberösen Sklerose assoziierten subependymalen Riesenzellastrozytoms, neuroendokrinen Tumoren der Bauchspeicheldrüse und beim Mammakarzinom (ER+) zugelassen. (Dienstmann et al. 2014) Temsirolimus ist ebenfalls beim fortgeschrittenen Nierenzellkarzinom und beim Mantelzell-Lymphom als medikamentöse Therapieoption zugelassen. (Dienstmann et al. 2014, Xie et al. 2016) Neben dem Nierenzellkarzinom konnte auch beim Blasenkarzinom bei Inhibition des mTOR-Signalwegs eine Reduktion der Zellproliferation beobachtet

werden. (Dancey 2005, Vignot et al. 2005, Ching & Hansel 2010) Rapamycin zeigte sich auch bei einigen Tumoren als potentiell effektiv bei der Prävention einer Metastasenbildung. (Boffa et al. 2004, Zhou & Huang 2010) So konnte man z.B. beim Nierenzellkarzinom erkennen, dass Rapamycin nicht nur das Tumorwachstum sondern auch eine Metastasierung des Primärtumors in die Lunge verhindern kann. (Luan et al. 2003) Der inhibitorische Effekt von Rapamycin auf die Bildung von Metastasen könnte unter anderem daran liegen, dass durch die mTOR-Hemmung die Produktion verschiedener Wachstumsfaktoren verringert wird, für die gezeigt wurde, dass sie z.B. bei der Entstehung von Knochenmetastasen beim Mammakarzinom eine Rolle spielen. (Yin et al. 1999, Luan et al. 2003, Zhou & Huang 2010) Auch wurde in verschiedenen Studien der Effekt von Rapamycin auf die Lymphangiogenese und die Bildung von Lymphknotenmetastasen untersucht. Es stellte sich heraus, dass Rapamycin die Anzahl der Lymphgefäße im Bereich eines Tumors und die Metastasierung in regionale Lymphknoten signifikant verringern kann. (Huber et al. 2007, Kobayashi et al. 2007, Seeliger et al. 2007)

Trotz dieser guten Studienlage zeigten Rapamycin und seine Derivate nur limitierte klinische Erfolge gerade im Hinblick auf das Therapieansprechen von soliden Tumoren. (Carew et al. 2011, Zheng & Jiang 2015, Conciatori et al. 2018)

Im Vergleich zu Rapamycin und seinen Analoga zeigten die mTOR-Hemmer der zweiten Generation eine größere Wirksamkeit in Bezug auf die Inhibition der Zellproliferation und die Apoptoseinduktion sowohl von im Labor kultivierten Tumorzellen als auch bei Tiermodellen. Auch konnte man sehen, dass einige Rapamycin-resistente Tumoren auf diese Therapie ansprachen. (Bhagwat et al. 2011, Serova et al. 2013, Lou et al. 2014, Zheng & Jiang 2015) So haben es zahlreiche Inhibitoren wie BEZ235 und INK128 nach erfolgreichen Phase-I-Ergebnissen aufgrund geringer Toxizität und relativ guter Wirksamkeit in Phase-II-Studien zahlreicher fortgeschrittener solider Tumoren geschafft. (Pallet & Legendre 2013, Zheng & Jiang 2015, Xie et al. 2016) Auch kombinierte Therapien der mTOR und PI3K-Inhibitoren mit bereits etablierten Arzneien werden derzeit vermehrt in unterschiedlichen Studienmodellen und bei verschiedenen Karzinomen geprüft. (Zaytseva et al. 2012, Xie et al. 2016, Di Leo et al. 2017, Pons-Tostivint et al. 2017)



### I.3.3 mTOR-Inhibition zur Behandlung fortgeschrittener Stadien des Prostatakarzinoms

Bereits 2014 erkannten Majumder et al., dass die Inhibition von mTOR die Apoptose von Zellen einer PIN bei Mäusen indizieren kann. (Majumder et al. 2004) Auch die Proliferation von PC3-Prostatakarzinomzellen konnte im präklinischen Studienmodell durch die Inhibition des Signalweges wirksam gestoppt werden. (Wu et al. 2005) Allerdings zeigten trotz des bedeutenden Erfolgs von Rapamycin und seinen Analoga in der Therapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms (Motzer et al. 2008, Kwitkowski et al. 2010) und bei neuroendokrinen Tumoren der Bauchspeicheldrüse (Yao et al. 2011), verschiedene Studien mit mTOR-Inhibitoren bei Männern mit fortgeschrittenem PCA nur sehr geringe bis gar keine radiographisch sichtbaren Anzeichen eines Tumorrückgangs oder eines PSA-Ansprechens. Auch die Zeit von 2-3 Monaten bis zur klinischen Progression des Tumors nach Therapiebeginn ergab keinen Hinweis auf ein Ansprechen der Therapie. (Amato et al. 2008, Bitting & Armstrong 2013, Templeton et al. 2013) Eine Studie in der Patienten mit CRPC eine Behandlung mit Everolimus und dem Chemotherapeutikum Gefitinib erhielten, zeigte auch kein signifikantes Therapieansprechen. (Rathkopf et al. 2015, Graham et al. 2018)

Eine mögliche Erklärung für die limitierte klinische Effizienz der allosterischen mTOR-Inhibitoren beim fortgeschrittenen PCA könnte darin bestehen, dass diese Inhibitoren nicht in der Lage sind, Rapamycin-resistente Substrate wie 4E-BP1 und Akt in ausreichendem Maße zu inhibieren. (Feldman et al. 2009, Thoreen et al. 2009, Hsieh et al. 2010, Edlind & Hsieh 2014) Zudem war zu beobachten, dass es durch die mTOR-Hemmung paradoxerweise zur Aktivierung von Akt und eIF4E kommen kann. (Sun et al. 2005)

Eine bessere Inhibition der mTOR-Substrate konnte bisweilen bei der zweiten Generation beobachtet werden. So zeigte der duale PI3K/mTORC-Inhibitor BEZ235 eine Reduktion des Tumolvolumens bei Mäusen, die durch den Verlust von PTEN an einem PCA erkrankten. In Kombination mit dem Androgenrezeptor-Signalweg-Inhibitor Enzalutamid konnte man sogar noch bessere Ergebnisse sehen. (Carver et al. 2011) Floc'h et al. zeigten ebenfalls im Mausmodell, dass eine Kombination aus mTOR und Akt-Hemmung als Therapie des CRPC effektiv ist. Sie bedienten sich bei ihrer Studie des

selektiven Akt-Inhibitors MK-2206 und Ridaforolimus (MK-8669). (Floc'h et al. 2012)  
Diese Studien machen deutlich, dass eine alleinige Inhibition des mTOR-Signalwegs beim fortgeschrittenen PCA nicht ausreichend ist. Möglicherweise kann eine Kombinationstherapie aus AR-, PI3K und mTOR-Signalweg-Inhibitoren im klinischen Outcome die notwendigen Erfolge liefern. (Carver et al. 2011, Edlind & Hsieh 2014)

Dies sollte weiter erforscht werden. Denn neben der richtigen Kombination der verschiedenen Signalwegsinhibitoren, die gemeinsam eine Potenzierung des antikarzinogenen Effektes auch beim fortgeschrittenen PCA erzielen könnten, muss der richtige Zeitpunkt einer solchen Therapie abgepasst werden. Zudem könnte man im Vorfeld mittels molekularer Untersuchung von bereits gewonnenem Gewebe diejenigen Patienten selektieren, bei denen ein Therapieansprechen wahrscheinlich ist, um die Misserfolge zu verhindern.

## II. Fragestellung

Ziel dieser Arbeit war es, die drei Marker mTOR, p-mTOR und 4E-BP1 hinsichtlich ihres Expressionsverhaltens entlang der Tumorprogression zu untersuchen. Hierfür wurde ein großes Kollektiv von Gewebe aus benignen Prostatae und Tumoren aller Stadien analysiert, um einen direkten Vergleich der Gewebegruppen machen zu können und die Aktivität des mTOR-Systems in Bezug auf das Fortschreiten des Tumors hin zum metastasierten kastrationsresistenten Prostatakarzinom zu beleuchten. Das wurde in der Art bisher noch nicht durchgeführt.

Es sollten für folgende Fragen Antworten gefunden werden:

- Können bereits erkannte Zusammenhänge zwischen der Proteinexpression und der Dignität des Gewebes bestätigt werden?
- Wie verhält sich lichtmikroskopisch benignes  $\leq 5$  mm *versus*  $\geq 10$  mm vom Tumor entfernt angrenzendes Gewebe im Hinblick auf die Parameter?
- Bestehen Korrelationen zwischen klinisch-pathologischen Parametern sowie dem Tumorgrad und der Expression der Marker?
- Kann man aus den Ergebnissen Konsequenzen für die Diagnostik und Prognostik ableiten?
- Wie zeigen sich die Expression von 4E-BP1 in Bezug auf die zelluläre Lokalisation bei der Progression des Tumors?
- Könnte die Inhibition des mTOR-Signalwegs der Metastasierung des Tumors entgegen?
- Wie verhalten sich die Marker im metastasierten hormonsensitiven und kastrationsresistenten Gewebe und ergeben sich therapeutische Implikationen aus den Beobachtungen?

### III. Material und Methodik

Zur Durchführung dieser Studie fanden ausschließlich die im folgenden Kapitel beschriebenen Materialien und Methoden Verwendung.

#### III.1 Ethik

Alle Patienten, deren Gewebeproben für diese Studie herangezogen wurden, wurden bezüglich der Studienteilnahme sowohl schriftlich als auch mündlich unmissverständlich aufgeklärt und haben vor der Operation der wissenschaftlichen Verwendung des asservierten Gewebes in geschriebener Form zugestimmt. Bei der Ausführlichkeit der Patientenaufklärung wurde kein Unterschied bezüglich Operationsgrund oder Operationsmethode gemacht. Alle Patienten erhielten die gleichen Informationen zur Studienteilnahme.

Dem Ethikantrag (Nr. 842/2016BO2) zur Bearbeitung von Schnittpräparaten des verwendeten Arrays wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät und vom Universitätsklinikum Tübingen am 18.01.2017 uneingeschränkt stattgegeben.

#### III.2 Datenschutz und -sicherheit

Der Umgang mit persönlichen Daten der Patienten, die an dieser Studie teilnahmen, geschah jederzeit vertraulich und unter Einhaltung des Datenschutzgesetzes. Die Erhebung von klinischen Daten der Patienten vor der Anonymisierung der Datenbanken erfolgte ausschließlich von unmittelbar Mitwirkenden dieser Studie, die der ärztlichen Schweigepflicht unterlagen. Nach Erstellung der Datenbanken erfolgte die Datenverarbeitung ausschließlich in anonymisierter Form, indem jedem Patienten eine laufende Nummer (1, 2, 3 usw.) zugeteilt wurde, die den Namen ersetzte. Weder Initialen noch Geburtsdaten fanden sich in diesen anonymisierten Datenbanken. Dadurch wurde verhindert, dass sensible Daten in Umlauf gelangen und es konnte mit einer Datenbank gearbeitet werden, die ausschließlich Zahlen enthält. Die Bearbeitung der Daten erfolgte ausschließlich mittels eines Rechners, der abgekoppelt vom internen Netzwerk der Klinik war und keinen Internetanschluss besaß. Zudem wurden die Datenbanken fortwährend mittels eines Passwortes geschützt, um sie vor dem eventuellen Zugang von Unbefugten zu bewahren.

### III.3 Patientenkollektiv der Studie

Das Gesamtkollektiv dieser Studie umfasst ausschließlich männliche Patienten, die sich im Zeitraum von Mai 2003 bis Oktober 2014 in der Klinik für Urologie des Universitätsklinikums Tübingen an der Prostata operieren ließen.

Das Gewebe der verwendeten Prostatæ stammt sowohl von Patienten, die einen Tumor hatten als auch von solchen mit BPH. Es wurden zum einen die Patienten ausgewählt, bei denen vor der Operation eine transrektale ultraschallgestützte Prostatabiopsie vorgenommen wurde und bei denen im Anschluss an die histopathologische Diagnosesicherung eine radikale Prostatektomie erfolgte. Zum anderen wurden die Patienten ausgewählt, die als Therapie des fortgeschrittenen PCA eine palliative TUR-P erhielten. Hinzu kamen die Patienten, die sich entweder aufgrund eines Harnblasenkarzinoms oder BPH einer operativen Therapie unterzogen. Hierbei wurden die Patienten ausgewählt, die mittels TVP, TUR-P oder radikaler Zystoprostatektomie therapiert worden waren.

Die Auswahl der Patienten erfolgte retrospektiv, nicht spezifizierend und nach den im Kapitel „Einschluss- und Ausschlusskriterien“ aufgezeigten Bedingungen.

#### III.3.1 Einschluss- und Ausschlusskriterien

Alle Studienteilnehmer waren Patienten der Klinik für Urologie des Universitätsklinikums Tübingen. Grundvoraussetzung für die Studienteilnahme war die Einwilligung des Patienten zur wissenschaftlichen Aufarbeitung und Verwendung des jeweils entnommenen Gewebes. Es wurden ausschließlich Präparate ausgewählt, bei denen so viel Material vorhanden war, dass die routinemäßige histopathologische Aufarbeitung und Beurteilung durch die Entnahme von Gewebe für diese Studie keine Beeinträchtigung erfuhr.

##### III.3.1.1 Gewebe von Prostatæ ohne malignes Prostatakarzinom

Dieser Gruppe gehören die Patienten an, die entweder aufgrund einer BPH oder aufgrund eines muskelfiltrierenden Harnblasenkarzinoms in Tübingen operiert worden sind. Sie erhielten eine TUR-P, TVP oder eine radikale Zystoprostatektomie (s. Kapitel „Patientenkollektiv der Studie“). Prämisse für die Aufnahme in die Studie war für diese Gewebegruppe, dass histologisch kein Tumor nachweisbar war. Sofern es sich um

Prostatae handelte, die bei einer Zystoprostatektomie entfernt worden waren, musste die Infiltration des Blasenkarzinoms oder ein zusätzliches Prostatakarzinom ausgeschlossen werden.

### III.3.1.2 Gewebe von Prostatae aus RPE nach gesicherter Diagnose mittels Biopsie

Alle Patienten dieser Gruppe unterzogen sich einer radikalen Prostatektomie nach bioptisch gesicherter Diagnose eines organbegrenzten PCA. Diese Patienten waren bis zum Zeitpunkt der Prostatektomie mit keiner Therapie vorbehandelt worden. Weder eine Radio- oder Chemotherapie noch weitere Therapien waren in der Klinik oder bei einem niedergelassenen Urologen begonnen worden. Eine weitere Prämisse war, dass das entnommene Gewebe routinemäßig histopathologisch aufbereitet wurde (s. Kapitel „Aufbereitung des OP-Materials“) und somit Paraffinblöcke und Großflächenschnitte („Whole-mount sections“) vorhanden und verfügbar waren. Des Weiteren wurden nur Tumoren in die Studie einbezogen, die vom Drüsengewebe der Prostata abstammten und bei denen im Zuge der pathologischen Verifikation die Lokalisation der tumorösen Areale klar erkennbar und gut vom gesunden Gewebe abgrenzbar waren. Einige zunächst ausgewählte Präparate, die sich ob der nicht klar vom gesunden Gewebe abgrenzbaren Tumorareale als ungeeignet erwiesen, wurden nicht mit in die Studie einbezogen.

### III.3.1.3 Gewebe von Prostatae mit fortgeschrittenem PCA (palliativ)

Die Patienten, die für diese Gruppe ausgewählt wurden, erhielten eine palliative Therapie mittels TUR-P. Zu dieser heterogenen Gruppe gehört das Gewebe von den Patienten mit metastasiertem PCA (M1). Die Tumoren unterscheiden sich nicht nur in Bezug auf das TNM-Stadium, sondern auch auf ihre Ansprechbarkeit auf eine Hormontherapie. Die Gruppe besteht sowohl aus hormonsensitiven als auch aus kastrationsresistenten Karzinomen. Ein PSA-Anstieg (über 0,2 ng/ml) oder eine Zunahme der krankheitsspezifischen Beschwerden unter einer suffizienten antiandrogenen Therapie markiert i. d. R. den Übergang eines hormonsensitiven PCAs in die kastrationsresistente Form. (Heidenreich et al. 2014) Die in dieser Studie untersuchte Fragestellung mit dem Fokus der Krankheitsprogression forderte, dass der Hormonstatus des untersuchten Gewebes eindeutig festgestellt werden konnte. Da drei Gewebeproben kein eindeutiger Status zugeordnet werden konnte, wurden diese aus der Studie entfernt.

### III.3.2 Gewebegruppen der Studie

Durch die Entnahmeorte der Gewebeproben aller Prostatae dieser Studie ergaben sich insgesamt 9 Gewebegruppen, die zusammen ein Progressionsarray darstellten. In Klammern befinden sich die jeweiligen Bezeichnungen auf den Arraymaps.

1. Benignes Prostatagewebe aus Prostatae ohne PCA; Gewebe aus TVP, TUR-P und Zystoprostatektomien („benigne“)
2. Benignes Prostatagewebe aus Prostatae mit organbegrenztem Low Gleason Tumor; Gewebe aus radikalen Prostatektomien;  
Entnahmeort: mind. 10 mm vom Tumor entfernt („fern“)
3. Benignes Prostatagewebe aus Prostatae mit organbegrenztem High Gleason Tumor; Gewebe aus radikalen Prostatektomien;  
Entnahmeort: mind. 10 mm vom Tumor entfernt („fern“)
4. Benignes Prostatagewebe aus Prostatae mit organbegrenztem Low Gleason Tumor, Gewebe aus radikalen Prostatektomien;  
Entnahmeort: weniger als 5 mm vom Tumor entfernt („nah“)
5. Benignes Prostatagewebe aus Prostatae mit organbegrenztem High Gleason Tumor, Gewebe aus radikalen Prostatektomien;  
Entnahmeort: weniger als 5 mm vom Tumor entfernt („nah“)
6. Prostatagewebe mit organbegrenztem Low Gleason Tumor;  
Gewebe aus einer RPE;  
Entnahmeort: im Tumorzentrum („Tumor“)
7. Prostatagewebe mit organbegrenztem High Gleason Tumor;  
Gewebe aus einer RPE;  
Entnahmeort: im Tumorzentrum („Tumor“)
8. Prostatagewebe mit fortgeschrittenem/metastasiertem hormonsensitivem Tumor (HS, M1); Gewebe aus palliativen TUR-P („palliativ“)
9. Prostatagewebe mit fortgeschrittenem kastrationsresistentem/metastasiertem Tumor (CR, M1); Gewebe aus palliativen TUR-P („palliativ“)

Aus dieser Auflistung lässt sich leicht erkennen, dass einige Prostatae und somit einige Patienten Mehrfachauflistungen in der Datenbank erzeugen, da ihr Prostatagewebe mehre

Entnahmeorte hat und dadurch verschiedene Gewebegruppen bedient. Zur Veranschaulichung dient Tabelle 5.

Prostata	Entnahmeort 1	Entnahmeort 2	Entnahmeort 3
Prostata mit Low Gleason Tumor	Histologisch benigne; weit vom Tumor entfernt ( $\geq 10$ mm)	Histologisch benigne; nah am Tumor ( $\leq 5$ mm)	Histologisch maligne; im Tumorzentrum
Prostata mit High Gleason Tumor	Histologisch benigne; weit vom Tumor entfernt ( $\geq 10$ mm)	Histologisch benigne; nah am Tumor ( $\leq 5$ mm)	Histologisch maligne; im Tumorzentrum

Tabelle 5: Übersicht über die Entnahmeorte bei RPE-Prostatae (Low und High Gleason)

### III.4 Anfertigung der Datenbanken

Alle relevanten Patientendaten und Befunde wurden retrospektiv aus den Patientenakten zusammengetragen und mit Microsoft Excel 2016<sup>®</sup> (Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim) zu zwei Datenbanken in Form von Excel-Tabellen zusammengesetzt.

Bei den Informationen, die die Datenbanken enthielten, handelte es sich um die Parameter Nachname, Vorname und Geburtsdatum des Patienten, Datum der Operation, Alter zum Zeitpunkt der Operation, Operationsverfahren, PSA-Wert vor der Operation, TNM-Stadium, Auftreten eines oder mehrerer Zweitmalignome und ob der Tumor komplett entfernt wurde oder ein Residualtumor zurückblieb. Wenn bei benignem Prostatagewebe ein maligner Tumor, zum Beispiel ein Harnblasenkarzinom, auftrat, wurde das ebenfalls in die Datenbank übertragen. Sofern eine antihormonelle Therapie zur Anwendung kam, wurde die Beschreibung bezüglich Art und Dauer dieser in die Datenbank aufgenommen. Der histopathologisch erfassten Gleason-Grade, der Gleason-Score und das TNM-Stadium des Karzinoms sowie die K-Nummer der Pathologie wurden außerdem in die Datenbanken übertragen.

Die erste Datenbank wurde so gestaltet, dass es möglich war, jedem Gewebeentnahmeort eine Nummer zuzuweisen. Das Aufführen aller Entnahmeorte führte dazu, dass Prostatae, die mehrere Entnahmeorte aufwiesen, Mehrfachauflistungen in der Datenbank erzeugten (s. Kapitel „Gewebeproben“). In dieser Datenbank konnte nach der Auswertung der immunhistochemischen Färbung der drei Marker der entsprechende Färb-Ergebniswert für jeden Dot der verschiedenen Entnahmeorte ergänzt werden.



Die zweite Datenbank beinhaltete jedes Prostatagewebe und somit jeden Patienten hingegen nur einmal ohne Berücksichtigung der Entnahmeorte. Diese Datenbank leitete sich von der ersten ab und diente der erleichterten Evaluation der Patientendaten.

Bei der Erstellung der Datenbanken fiel auf, dass 10 Patientenproben, die im Vorfeld zu den palliativen Proben hinzugefügt worden waren, einem nicht metastasierten PCA (M0) angehörten. Aufgrund dessen wurden diese Proben aus dem Kollektiv entfernt. Von den ursprünglich 124 Patienten wurden somit 3 Patienten durch die unmögliche Zuordnung hormonsensitiv/kastrationsresistent (s. Kapitel „Einschluss- und Ausschlusskriterien“) und 10 Patienten durch eine falsche Zuordnung aussortiert. Insgesamt betrug das Gesamtkollektiv letztlich 111 Patienten.

Nach der Erstellung der Datenbanken wurden diese anonymisiert und ausschließlich in dieser Form weiter ausgewertet.

### III.5 Aufbereitung des OP-Materials

Alle Organpräparate, die dieser Studie zu Grunde liegen, wurden freundlicherweise vom Institut für Pathologie der Universität Tübingen zur Verfügung gestellt. Sämtliche Gewebeproben stammen von formalin-fixiertem und in Paraffin eingebettetem Prostatagewebe. Die Aufbereitung erfolgte routinemäßig zur histologischen Bewertung der OP-Präparate.

#### III.5.1 Prostatagewebe von radikalen Prostatektomien

Zunächst wurden die operativ entfernten Prostataresektate zur Fixation 24 Stunden in 4,5%iger auf pH 7 gepufferter Formaldehyd-Lösung (SAV LP GmbH, Flintsbach am Inn, Deutschland) aufbewahrt und am folgenden Tag zur Bewertung des Resektionsrandes tuschemarkiert. Daraufhin erfolgte die Aufarbeitung der Prostatapräparate gemäß dem Stanford-Protokoll (Stamey et al. 1988) in horizontale 3-mm-Schnitte mit einer Schneidemaschine (V6, Bizerba, Balingen, Deutschland). Zuvor wurden Samenblasen, Samenleiter, Apex und Basis einer jeden Drüse abgesetzt. Alternierend wurden die Lamellen für die routinemäßige histopathologische Aufarbeitung zurechtgeschnitten und für die Großflächenaufarbeitung (Whole-mount sections) vollständig belassen. Danach erfolgte die Dehydrierung, Entfettung und das Einbetten in Paraffin mit Hilfe von

Einbettkassetten, die auf die Größe der Organpräparate abgestimmt waren (Makroflow-Kassetten, Microm International GmbH, Walldorf, Deutschland).

### III.5.1.1 Anfertigung der Großflächenschnitte und Verifikation

Von jedem Paraffinblock, der für diese Studie herangezogen wurde, wurde ein 5 µm dünner Großflächenschnitt angefertigt und auf einen großen Glasobjektträger (66x76 mm, R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland) aufgezogen. Dieser wurde anschließend mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt. Es folgte die Verifikation der Schnitte durch den erfahrenen Pathologen Dr. Marcus Scharpf. Dieser umrandete mit einem Filzstift auf jedem Objektträger die tumorösen Areale (circeln). So konnten die filzstiftmarkierten Schnitte als Schablone für die Herstellung der TMAs (Tissue-Microarrays, s. Kapitel „Tissue-Microarray-Anfertigung“) fungieren, indem sie die richtige Platzierung der Stanzen in den jeweiligen Paraffinblöcken vorgeben. Eine zusätzliche studienassoziierte Befundung der Präparate wurde von einem Kollegen in Pittsburgh durchgeführt, der die Schnitte ebenfalls markierte.

### III.5.2 Prostatagewebe von TVP und Zystoprostatektomien

Die Gewebeproben dieser Prostatae wurden ebenfalls in 4,5%iger auf pH 7 gepufferte Formaldehyd-Lösung konserviert und anschließend in Paraffin eingebettet. Die Tumormarkierung mit Filzstift (s. Kapitel „Anfertigung der Großflächenschnitte und Verifikation“) entfiel bei diesen Präparaten naturgemäß, da es sich um benignes Prostatagewebe von Patienten handelte, bei denen entweder eine benigne Prostatahyperplasie (TVP) oder ein Blasenkarzinom (Zystoprostatektomie) diagnostiziert worden war. Mit Hilfe eines zu dem Paraffinblock angefertigten HE-Schnittes wurde bei diesen Prostatae unter dem Mikroskop ein drüsenhaltiger repräsentativer Bereich herausgesucht, der sich für die Platzierung der Stanzen als geeignet zeigte.

### III.5.3 Prostatagewebe von TUR-P und palliativen TUR-P

Eine TUR-P ist die operative Therapie der Wahl bei einer fortgeschrittenen benignen Prostatahyperplasie. Bei Harnverhalt aufgrund eines fortgeschrittenen Prostatakarzinoms kommt häufig eine palliative TUR-P zur Anwendung. Die bei diesen Operationen gewonnenen Gewebe unterscheiden sich von den bisher genannten, da das entfernte Gewebe nicht die Prostata in toto betrifft. Bei einer TUR-P wird in der Regel lediglich

der periurethrale Teil der Prostata mittels hochfrequenzführender Schlinge entfernt. (Schmelz et al. 2014) Das entfernte Gewebe wurde ebenfalls in 4,5%iger auf pH 7 gepufferter Formaldehyd-Lösung konserviert und anschließend in Paraffin eingebettet. Auch hier dienten die HE-Schnitte des jeweiligen Paraffinblocks als Vorlage, um die Stanzen innerhalb des Drüsengewebes zu platzieren.

### III.6 Tissue-Microarray

Die Tissue-Mikroarray-Technik (TMA) ist in der Tumorpathologie eine viel genutzte und gut etablierte Methode, um Gewebe auf DNA-, RNA- oder Proteinebene zu untersuchen. (Rubin et al. 2002, Ramos-Vara 2005)

#### III.6.1 Allgemeine Aspekte

Die Technik des TMA wurde von Kononen et al. im Jahr 1998 begründet. (Kononen et al. 1998) Sie bietet gegenüber anderen Techniken zur Untersuchung von Gewebeproben zahlreiche Vorteile. Durch das Zusammensetzen von einer Vielzahl von Gewebeproben in Form von kleinen zylinderförmigen Stanzen zu Arrays kann Gewebe von einem großen Patientenkollektiv simultan in situ analysiert werden. (Nocito et al. 2001, Sauter 2012) Dadurch sind Untersuchungen schneller, übersichtlicher und unter Kostenersparnissen durchführbar. (Kallioniemi et al. 2001, Nocito et al. 2001, Milanes-Yearsley et al. 2002) Zudem wird die Gewebeerstörung bei der Materialgewinnung aus dem Spenderblock minimiert. (Nocito et al. 2001) Des Weiteren bietet die Technik den Vorteil, dass alle Proben unter den gleichen Bedingungen (Temperatur etc.) gefärbt werden können und somit insgesamt eine bessere Vergleichbarkeit der Gewebe gewährleistet wird. (Hsu et al. 2002) In vielen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass die TMA-Technik bei der Analyse von PCA-Biomarkern trotz der Heterogenität des Tumors sehr gute Ergebnisse liefern kann. (Perrone et al. 2000, Rubin et al. 2002, Varambally et al. 2002) Man unterscheidet bei der TMA-Technik zwischen der manuellen und der automatischen Herstellung. Die manuelle Applikation erlaubt eine Anordnung von bis zu 120, die automatische Applikation eine Anordnung von bis zu 1000 Gewebeproben in einem Paraffinblock. (Kramer et al. 2007)

### III.6.2 Tissue-Microarray-Anfertigung

Die Anfertigung der TMAs geschah von Hand mit einem Tissue Microarray Kit der Firma Beecher Instruments (MTA-I, Beecher Instruments Inc., Sun Prairie, Wisconsin, USA). Hierbei wurden zwei bis acht Stanzen mit einem Durchmesser von 1,0 mm aus dem Spenderblock (donor block) eines jeden Patienten entnommen und in einen Empfängerblock (recipient block) eingesetzt (s. Abbildung 5). Diesem nur aus Paraffin bestehenden Empfängerblock wurden in 1 mm Abständen bis zu 64 (8x8) zylindrische Stanzen mit demselben Durchmesser wie die Gewebestanzen entnommen. So entstanden zylindrische Hohlräume. Unmittelbar nach Entstehung eines jeden Hohlraumes wurde dieser mit der entsprechenden Spenderblock-Gewebestanze gefüllt.

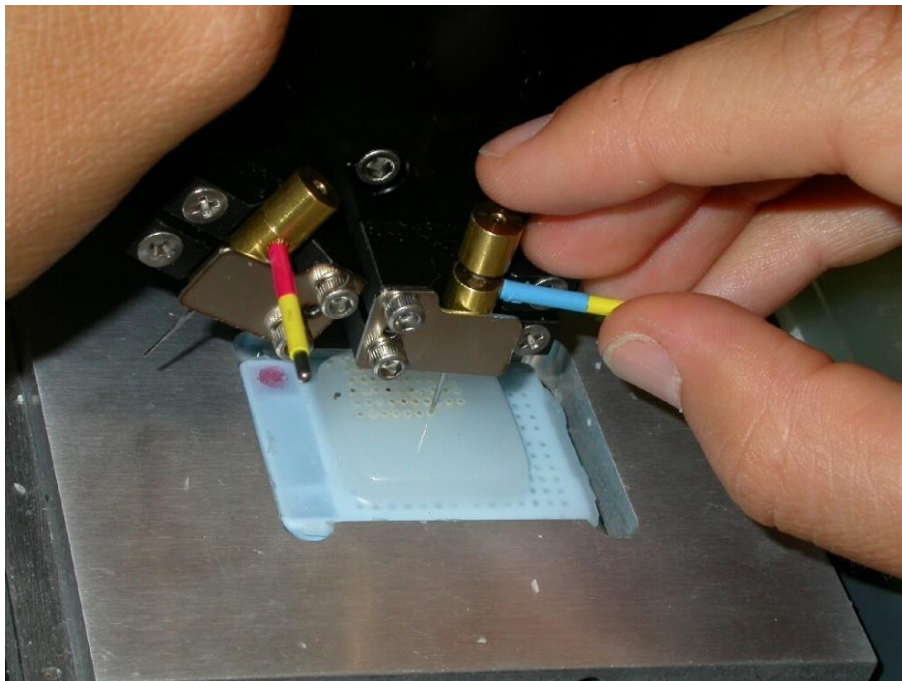


Abbildung 5: Herstellung eines Tissue-Mikroarrays; Quelle: Bildarchiv des Labors der Klinik für Urologie des Universitätsklinikums Tübingen

Die Anzahl der zylindrischen Stanzen einer jeden Prostata war hierbei abhängig von dem vorliegenden Präparat. Handelte es sich um eine Prostata mit Low Gleason oder High Gleason Tumor, die durch eine RPE entfernt worden war, wurden in der Regel zwei Stanzen im Tumorzentrum entnommen, vier Stanzen im direkt an den Tumor angrenzenden histologisch benignen Gewebe, das 0 bis 5 mm vom Tumor entfernt war (auf den Array-Maps mit „nah“ deklariert), und zwei Stanzen in dem von dem Tumor mindestens 10 mm entfernten histologisch benignen Gewebe (auf den Arraymaps mit „fern“ deklariert). Dies gelang mit Hilfe der HE-Großflächenschnitt-Schablonen (s.

Kapitel „Anfertigung der Großflächenschnitte und Verifikation“). Von den Prostatae, die mittels palliativer TUR-P entfernt worden waren, wurden zwei Stenzen des tumorösen Gewebes entnommen (auf den Arraymaps mit „palliativ“ deklariert). Handelte es sich um benignes Prostatagewebe, welches bei einer TUR-P, TVP oder Zystoprostatektomie entfernt wurde, wurden ebenfalls zwei Stenzen aus dem Drüsengewebe angefertigt (auf den Array-Maps mit „benigne“ deklariert).

Als Orientierungshilfe und zur genauen Identifikation der einzelnen Arrays wurden zusätzlich 3-5 Stenzen aus Schweinehodengewebe an verschiedenen Stellen und in unterschiedlicher Anordnung (überwiegend L- oder T-förmig) zu den Patientenproben in den Empfängerblock eingebracht.

So entstanden zunächst 10 Tissue-Microarrays mit den Gewebezylindern der an dieser Studie teilnehmenden Patienten.

### III.6.2.1 Arraymaps

Um die spätere Dokumentation der Mikroskopierergebnisse zu erleichtern, wurden passend zu den jeweiligen Arrays Auswertebögen, so genannte „Arraymaps“, erstellt (s. Kapitel „Interpretation des Expressionsverhaltens“). Diese spiegeln genau die Anordnung der Proben auf dem Objektträger wieder und erlaubten das Eintragen der in dieser Studie gewonnenen Daten.

## III.7 Weitere Aufarbeitung zu Mikroskopiepräparaten

Aus den produzierten TMA-Paraffinblöcken wurden im Anschluss 5 µm dicke Schnitte mit Hilfe eines Mikrotoms (Leica Rotationsmikrotom RM2125RT, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland) angefertigt. Das Glätten der Schnitte erfolgte im Paraffin-Streckbad (TFB 45, Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland) bei 48°C. Danach folgte das Aufbringen auf SuperFrost-plus-Objektträger (R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland). Im letzten Schritt wurden die fertig bestückten Objektträger bei 37°C zur Trocknung ca. 16 Stunden im Wärmeschrank (B40, Memmert, Schwabach, Deutschland) aufbewahrt. Durch die Anfertigung der dünnen Schnitte, entstanden aus den Gewebezylindern in den Paraffinblöcken Gewebepunkte (Dots) auf den Objektträgern (s. Abbildung 6).

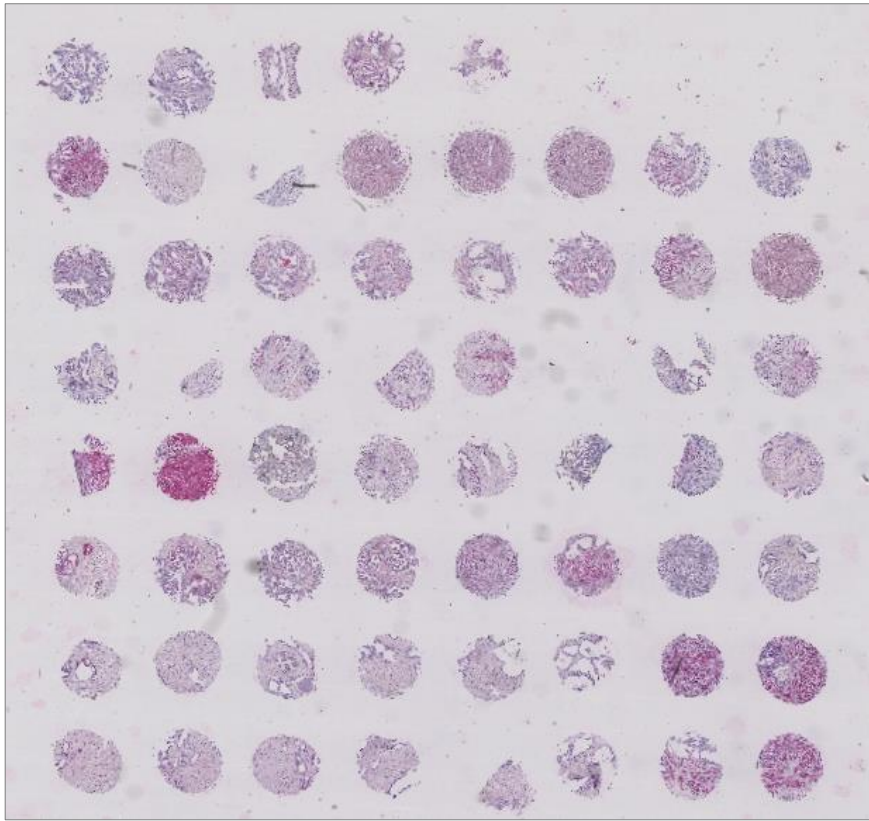


Abbildung 6: Die fertigen Dots auf einem Objektträger beispielhaft gezeigt an einem Array angefärbt mit 4E-BP1 bei 4-facher Vergrößerung

### III.8 Nachstanzen

Vor der immunhistochemischen Färbung erfolgte die erstmalige Sichtung der Gewebe der verschiedenen Arrays. Da sich die Gewebezylinder beim Anfertigen der mikroskopierbaren Schnitte zum Teil aus dem Empfängerblock herausgelöst hatten, abgeschwommen waren oder die sichtbaren Dots nur zusammengefaltet zu sehen waren, wurden drei weitere Tissue-Mikroarrays mit den verloren gegangenen oder nicht auswertbaren Geweben, sogenannten Nachstanzen, angefertigt. Damit wurde die Zahl der nicht auswertbaren Gewebeproben auf ein Minimum reduziert. Die Vorgehensweise der nachgestanzten Arrays entsprach hierbei der im Kapitel „Tissue-Mikroarray-Anfertigung“ bereits beschriebenen.

Die Anzahl der angefertigten Tissue-Mikroarrays betrug letztlich somit 13.

### III.9 Immunhistochemische Färbung

Die Immunhistochemie (IHC) beruht auf dem Prinzip der Antigen-Antikörperreaktion. Ziel ist es hierbei, Proteine oder andere Strukturen in biologischem Untersuchungsgut

(Gewebe) mit Hilfe von z.B. Antikörpern (AK), die an Farbstoffe gekoppelt sind, sichtbar zu machen. (Ramos-Vara 2005)

### III.9.1 Allgemeine Aspekte

Man unterscheidet in der IHC hauptsächlich direkte von indirekten Färbungen. Von der direkten Methode wird gesprochen, wenn ein primärer spezifischer AK, der mit einem Enzym konjugiert ist, unmittelbar an das Gewebe (Epitop) bindet. Die indirekte Methode hingegen besteht aus zwei Schritten: Als erstes bindet ein spezifischer unkonjugierter AK an das Epitop. Dann wird im zweiten Schritt ein enzymkonjugierter sekundärer AK aufgetragen, der an das F<sub>C</sub>-Fragment des zuvor aufgetragenen primären AK selektiv bindet. Als Epitopindikator dient dann ein Farbstoff, der in der ausgelösten Enzym-Substrat-Reaktion aus einem hinzugegebenen Chromogen entsteht. Der Vorteil dieser Methode ist die höhere Sensitivität, da mehrere sekundäre AK an einen primären AK binden können. (Ramos-Vara 2005, Aoki et al. 2010, Kerl et al. 2013)

### III.9.2 Die Dextran-Polymer-Methodik

Die in der vorliegenden Arbeit genutzte Färbemethode ist die Dextran-Polymerkonjugatmethode (EnVision™), die zu den Nachweisverfahren mit einer sehr hohen Sensitivität zählt. Hierbei ist der speziesspezifische sekundäre AK mit einem enzymmarkierten Polymer (Dextran) verbunden. Da es sich um die indirekte Zweischritt-Methode handelt, bindet zunächst der unkonjugierte primäre AK an das Epitop und daraufhin der sekundäre AK an den primären AK. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass die Dextrane mit sehr vielen Enzymen beladen werden können, was in einer stärkeren Chromogenumsetzung und damit in einer besseren Anfärbung des Epitops an der Stelle der Antigene resultiert. Zudem wird im Gegensatz zur Labeled (Strept-)Avidin-Biotin-Methode (LSAB) kein Biotin verwendet, was die Qualität der Färbung negativ beeinflussen kann. (Key 2006, Vosse et al. 2007, Kerl et al. 2013)

### III.9.3 Ausführung der immunhistochemischen Färbung am TMA

Die immunhistochemische Färbung wurde im uroonkologischen Labor des Universitätsklinikum Tübingen von Frau Ursula Kühs durchgeführt. Als erster Schritt, der vor der regelrechten Färbung der 5 µm dicken Gewebeschnitte durchgeführt werden musste, erfolgte das Abschmelzen des Paraffins. Die Entparaffinierung ist erforderlich, da es sich bei der Färbelösung um ein wässriges Medium handelt. Hierfür wurden die

Schnitte 30 min lang bei 58°C in einem Wärmeschrank (ED 53, Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland) aufbewahrt und anschließend dreimal für 10 min mit dem Intermedium Xylol inkubiert. Danach erfolgte die Rehydratisierung mit Alkohol in absteigender Konzentration, indem die Präparate jeweils zweimal 7 min mit 100 % Ethanol, zweimal 7 min mit 96 % Ethanol und einmal 7 min mit 70 % Ethanol durchtränkt wurden. Es folgte eine fünfminütige Spülung mit Aqua dest. Der nächste Schritt der Vorbehandlung war die Demaskierung. Für die AK mTOR und p-mTOR wurden die Schnitte 20 min lang und für 4E-BP1 dreimal 5 min lang in der Mikrowelle (Stufe 2) in Citratpuffer (10 mM, pH 6,0; hergestellt unter Kontrolle des pH-Werts aus 18 ml Stammpuffer A (Zitronensäure) + 82 ml Stammpuffer B (Natriumcitrat) und auf 1000 ml mit Aqua dest. aufgefüllt) gekocht. Darauf folgte ein dreißigminütiges Abkühlen auf Raumtemperatur (RT, ca. 21°C) und es wurde zweimal 5 min mit TBST-Pufferlösung (Tris-buffered Saline and Tween 20: 0,5 mol Tris, 0,15 mol NaCl, 0,1 % Tween 20; hergestellt aus 50 ml 1-molarem Tris, 50 ml 3-molarem NaCl und 1000 µl Tween 20) gewaschen. Um Reaktionen mit alkalischen Phosphatasen oder Peroxidasen zu vermeiden, wurde das Gewebe je nach Schnittgröße mit ca. 5-8 Tropfen Dualblock (Dual Endogenous Enzyme Block, Dako S2003, Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) ca. 10 min lang inkubiert und anschließend noch zweimal 5 min mit TBST-Pufferlösung gewaschen.

Im Anschluss an die Vorbehandlung erfolgte die Inkubation mit den für formalinfixierte, paraffinierte Gewebe passenden Primärantikörpern (mTOR, p-mTOR und 4E-BP1). Die Inkubation mit den verdünnten AK erfolgte über Nacht bei 4°C im Kühlschrank. Die optimale Konzentration der Primärantikörper in der Verdünnungsflüssigkeit (Dako S S0809, Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) wurde im Voraus bereits ermittelt. Die Verdünnung betrug für mTOR 1:25, für p-mTOR 1:50 und für 4E-BP1 1:100. Daraufhin wurde dreimal 5 min mit TBST-Pufferlösung gespült, um die Entfernung der überschüssigen AK sicherzustellen. Daraufhin wurden die Schnitte 30 min lang mit den sekundären Brücken-AK (LINK, Vial 1, Testkit EnVision™ G|2 System/AP Rabbit/Mouse, K5355, Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) inkubiert und erneut dreimal 5 min mit TBST-Pufferlösung gespült. Die Inkubation mit AP-Enzyme (ENHANCER, Vial 2, Testkit EnVision™ G|2 System/AP, Rabbit/Mouse, K5355, Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) für 30 min war der nächste



Schritt, der mit dreimal fünfminütigem Spülen mit TBST-Pufferlösung beendet wurde. Anschließend wurden die Proben für 12 min (mTOR), 9 min (p-mTOR) und 10 min (4E-BP1) in Permanent Red Arbeitslösung (1000 µl Permanent Red Substrat (Vial 3), 10 µl Liquid Permanent Red Chromogen (Vial 4), Testkit EnVision™ G2 System/AP Rabbit/Mouse, K5355, Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) gelagert. Dabei lief durch die Enzyme die Umwandlung von Chromogen in roten Farbstoff ab. Die Beendigung dieser Reaktion geschah durch zweimal fünfminütiges Spülen mit Aqua dest. Die Gegenfärbung zur Kontrastverstärkung erfolgte danach 40 sec (mTOR), 60 sec (p-mTOR) und 20 sec (4E-BP1) lang mit Hämatoxylin nach Mayer. Das restliche Hämatoxylin wurde mit Aqua dest. abgespült. Die Gewebeschnitte wurden daraufhin 7 min lang in Leitungswasser gebläut. Das Eindecken der Schnitte erfolgte mit Aquatex (Merck, Darmstadt, Deutschland) und zuletzt wurde ein Deckglas aufgebracht.

Als Primärantikörper wurden folgende monoklonalen Kaninchenantikörper verwendet: mTOR (7C10) Rabbit mAb (IHC Specific) #2983; p-mTOR (Ser2448) (49F9), Rabbit mAb (IHC Specific) #2976; 4E-BP1 (53H11) Rabbit mAb (IHC Specific) #9644. Alle Primärantikörper stammen von der Firma Cell Signaling Technology (Danvers, Massachusetts, USA; s. Tabelle 6).

Jegliche Reagenzien, die bei der Färbung der Schnitte Verwendung fanden, wurden den Herstellerangaben entsprechend aufbewahrt und vor Beginn der Inkubationsschritte auf RT gebracht.

Eine Qualitätskontrolle erfolgte bei allen Färbedurchgängen durch jeweils eine Positivkontrolle mit ausgewiesenem antigenträgendem humanem Gewebe und eine Negativkontrolle ohne Primärantikörper. Diese Kontrollen sichern die richtige Interpretation der immunhistochemischen Färbereaktion. (Dabbs 2013)

Primär-Antikörper	Phosphorylierungsstelle	Firma	Herkunft	Verdünnungsmedium	Verdünnung	Inkubationszeit	Inkubationstemperatur
mTOR	-	Cell Signaling Technology®	Kaninchen, monoklonal	Dako® S0809	1:25	18 h	4°C
p-mTOR	Ser2448	Cell Signaling Technology®	Kaninchen, monoklonal	Dako® S0809	1:50	18 h	4°C
4E-BP1	-	Cell Signaling Technology®	Kaninchen, monoklonal	Dako® S0809	1:100	18 h	4°C

Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Primärantikörper

### III.10 Überprüfung der deklarierten Gewebegruppe

Bevor die Evaluation der gefärbten Dots begonnen werden konnte, musste entschieden werden, ob der Dot der jeweiligen Gewebebezeichnung, die auf der Arraymap vermerkt war, gerecht wurde. Das bedeutet, dass ein Dot der Gewebegruppe „benigne“, „nah“ oder „fern“ keinen Tumor enthalten durfte. Die Dots der Gewebegruppe „Tumor“ und „palliativ“ hingegen mussten tumoröses Gewebe aufweisen. War dies nicht der Fall, konnte der Dot nicht gewertet werden. Diese Aufgabe wurde sehr sorgfältig mit Hilfe von Herrn Dr. Marcus Scharpf vorgenommen und sicherte die korrekte histologische Evaluation.

### III.11 Verbundprojekt

Durch die kompetente und freundliche Unterstützung von weiteren Doktoranden der Urologie, die an diesem Verbundprojekt arbeiteten, konnten die oben aufgeführten Arbeitsschritte organisiert und bewerkstelligt werden. Die Durchsicht der Patientenakten und die Erhebung der relevanten Daten zur Erstellung einer definitiven Datenbank, die die Basis der statistischen Auswertung bildete, übernahmen Herr Lennart Jobst und Herr Luca Ulrich. Die Erstellung des Tissue-Microarrays mit allen Maßnahmen, die zur Vorbereitung nötig waren, wurde durch Herrn Yannick Pach und Herrn David Rodriguez sehr sorgfältig durchgeführt.

## III.12 Histologische Evaluierung der immunhistochemischen Färbung

Im Anschluss an die durch die an diesem Verbundprojekt mitarbeitenden Doktoranden und Mitwirkenden dieser Studie durchgeführten Arbeitsschritte konnte durch mich die Auswertung der immunhistochemischen Färbung vorgenommen werden.

### III.12.1 Erfassung des Expressionsverhaltens

Die Erfassung des Expressionsverhaltens erfolgte zunächst durch Mikroskopieren mittels eines Zeiss-Universal-Lichtmikroskops (Zeiss Universal, Carl Zeiss, Jena, Deutschland) bei mittlerer konstanter Lichtintensität und bei 25-facher (Mäandern) bis 160-facher Vergrößerung, um sich eine Übersicht über die Gewebeproben (Dots) und ihre Färbung zu verschaffen.

Die Positivkontrollen (s. Kapitel „Praktische Durchführung der Färbung“) der drei Marker zeigten eine adäquate immunhistochemische Reaktion im Sinne einer ausgeprägten Anfärbbarkeit und die Negativkontrollen wie erwartet keine Reaktion.

Als erstes wurde jeder Dot charakterisiert, indem er mit zwei bis drei stichpunktartigen Sätzen beschrieben wurde. Die Beschreibung enthielt Informationen darüber, wie sich die Drüsen des jeweiligen Dots darstellten und ob die Färbung gleichmäßig sichtbar war. Einige Dots waren nur zur Hälfte sichtbar oder durch den Schneidevorgang vollständig herausgelöst. Auch das wurde notiert.

Als nächster Schritt schloss sich das Digitalisieren der Präparate an, indem die Objektträger mit den Gewebedots (Arrays) mit einem Objektträger-Scanner (Leica Slide Scanner SCN400, Leica Biosystems GmbH, Nussloch, Deutschland) eingescannt wurden. Die erhaltenen Datensätze waren insgesamt 31,16 Gigabyte (GB) groß, wobei die einzelnen Arrays eine Größe von 438 MB bis 1,06 GB hatten. Sie wurden auf einer externen Festplatte gespeichert.

Die Digitalisierung ermöglichte das Betrachten der Gewebedots mit Hilfe des zuvor kostenfrei heruntergeladenen Programms Aperio ImageScope (Leica Biosystems GmbH, Nussloch, Deutschland), eines Notebooks und eines an dieses Notebook angeschlossenen Monitors. Das Programm ImageScope ermöglichte es, die Gewebedots bis zu einer 200-

fachen Vergrößerung zu betrachten. Um eine bessere Vergleichbarkeit der einzelnen Gewebedots zu erzielen und einen Anhaltspunkt für die verschiedenen Färbeintensitäten zu haben, wurde mit dem Bildbearbeitungsprogramm Ulead PhotoImpact (Corel Corporation, Ottawa, Ontario, Kanada) ein Eich-Bild, das alle Färbeintensitäten beinhaltet, zusammengestellt. Hierfür wurden zunächst Screenshots der in den jeweiligen Intensitäten angefärbten Drüsenzellen angefertigt, die dann von oben nach unten in aufsteigender Färbeintensität zu einem einzigen Bild zusammengesetzt wurden (s. Abbildung 7).

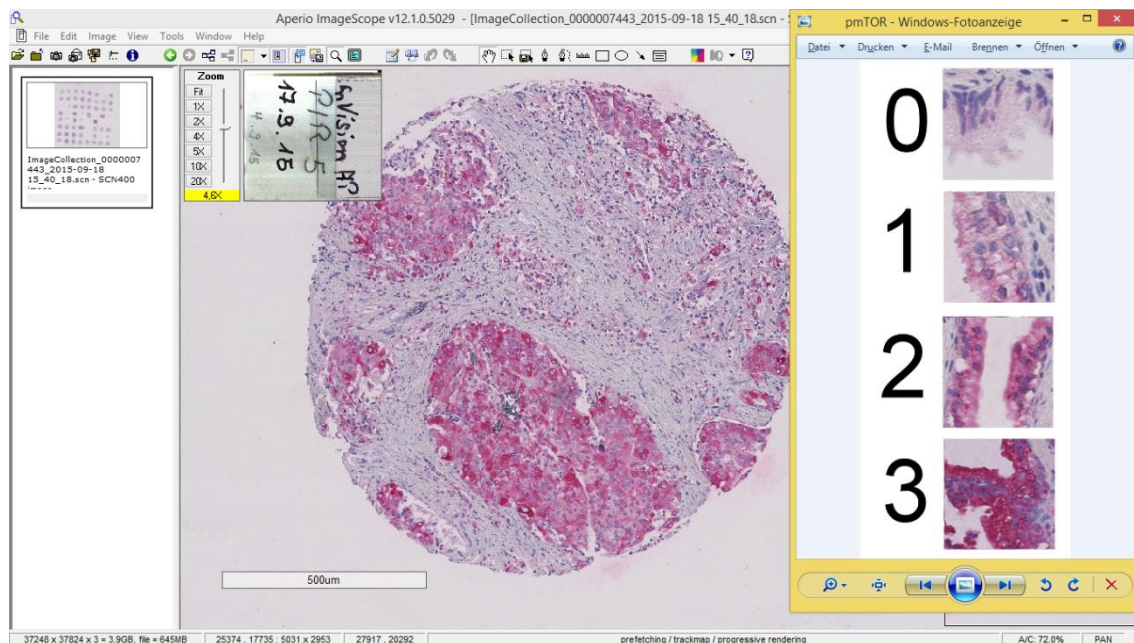


Abbildung 7: Beispiel für einen Dot (p-mTOR) bei 40-facher Vergrößerung und das dazugehörige Eich-Bild

Für die Herstellung der Eich-Bilder musste zunächst festgelegt werden, wie viele Färbeintensitäten es für eine Färbung geben soll und welche Dots diese am besten darstellen, um die Dots dann als „Musterdots“ repräsentativ für die jeweilige Färbeintensität heranziehen zu können. Das erforderte ein erneutes Mikroskopieren aller Dots.

### III.12.2 Interpretation des Expressionsverhaltens

Als nächstes schloss sich das Mikroskopieren mithilfe der angefertigten Eich-Bilder an. Der Vorteil dieses Mikroskopierens mit dem Notebook und Monitor lag darin, dass die Zellen auf einem großen Bildschirm betrachtet und nach Bedarf die Eich-Bilder für einen

direkten Vergleich eingeblendet werden konnten. Beides kam der analogen Bewertung der Färbeintensität der Drüsenzellen zugute.

Bewertet wurde zunächst ausschließlich die Färbeintensität der Zellen des Drüsenepithels. Da keine einheitliche Färbeintensität in den Dots zu erkennen war und sich bis auf einige Ausnahmen alle Drüsenzellen anfärbten, war ein Score wie der immunreaktive Score (IRS) nach Remmele und Stegner (Remmele & Stegner 1987, Li et al. 2008, Chuang et al. 2009) nicht verwendbar. Aus diesem Grund kam der semiquantitative H-Score (Detre et al. 1995, Theodorescu et al. 1997, Aye Thike 2001, Ishibashi et al. 2003, Nasir et al. 2011, Ferrandiz-Pulido et al. 2013) zur Anwendung, der sich für die zytoplasmatische Färbung aufgrund der Heterogenität der Färbeintensität der einzelnen Dots als am geeignetsten darstellte. Jeder Färbeintensität wurde jeweils ein Zahlenwert zugeordnet. Bei allen drei Proteinparametern (mTOR, p-mTOR und 4E-BP1) gab es 4 Intensitäten mit den Werten „0-3“. „0“ stellte dabei die nicht angefärbten Zellen, „1“ die schwach angefärbten Zellen, „2“ die Zellen mit mittlerer und 3 die Zellen mit höchster Färbeintensität dar. Des Weiteren war bei der Auswertung der Immunhistochemie für den Marker 4E-BP1 im Gegensatz zu mTOR und p-mTOR bei den meisten Dots eine Färbung der Kerne deutlich erkennbar (s. Abbildung 8).

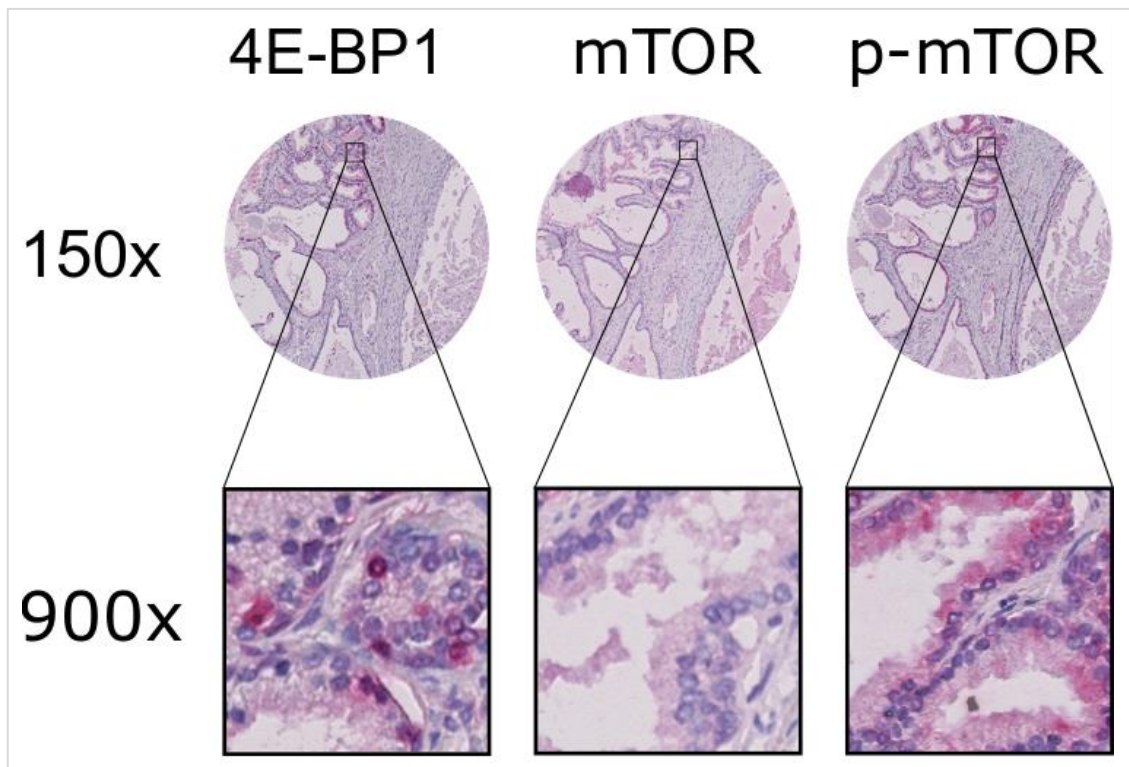


Abbildung 8: Beispiel für einen Dot, der bei 4E-BP1 im Gegensatz zu mTOR und p-mTOR eine Anfärbbarkeit der Kerne zeigt

Die Beobachtung, dass neben dem Zytoplasma auch die Kerne eine 4E-BP1- Expression aufwiesen, konnte bereits in verschiedenen Studien gemacht werden. So fanden z.B. Rong et al. in ihrer Studie heraus, dass ca. 30 % des Proteins im Nukleus lokalisiert war. (Rong et al. 2008) Auch Kasajima et al. erkannten eine Anfärbung der Kerne im Tumorgewebe, bewerteten diese jedoch aufgrund der geringen Färbeintensität nicht. (Kasajima et al. 2011) Im Gegensatz zu diesen beiden Studien erkannten Xu et al., die verschiedene Tumore, unter anderem auch PCA-Gewebe, mit 4E-BP1 anfärbten, keine zelluläre Anfärbbarkeit. (Xu et al. 2004)

Da in dieser Studie eine eindeutige Anfärbung der Kerne erkennbar war, wurde für 4E-BP1 eine weitere Einteilung für Aussagen, die die zelluläre Lokalisation betreffen, vorgenommen: Falls in einem Dot nahezu keine Kerne angefärbt waren ( $\leq 1\%$ ), erhielt er zusätzlich zu dem zytoplasmatischen Wert den nukleären Wert 0. Waren wenige Kerne angefärbt (2-10 %), so wurde ihm der Wert 1 zugeordnet. In dem Fall, dass mäßig viele Kerne angefärbt wurden (11-49 %), erhielt der Dot zusätzlich den Wert 2. Waren viele Kerne angefärbt ( $\geq 50\%$ ), wurde ihm der Wert 3 zugeordnet. Ein Zusammenhang zwischen der Färbeintensität und der angefärbten Kerne konnte zunächst jedoch nicht

ausgemacht werden. D. h. bei einem benignen Dot war die Färbeintensität der Zellen beispielsweise „1“ und der Wert der angefärbten Kerne „2“, wohingegen bei einem anderen die Intensität ebenfalls „1“ war, aber keine Kerne angefärbt waren (nukleärer Wert „0“). Aus diesem Grund wurde die Bewertung der Zellkerne unabhängig von der Anfärbbarkeit des Zytoplasmas der Zellen begutachtet.

So wurde jeder einzelne Dot der drei Proteinparameter am Monitor bezüglich der Färbeintensität der Drüsenzellen studiert. Um der Heterogenität der Anfärbbarkeit der Zellen in einem Dot Rechnung zu tragen, wurde der Dot in 10 %-Abstufungen beurteilt. Alle Drüsenzellen eines Dots zusammen entsprachen somit 100 %. Beispiel: ein Dot hat 20 % Zellen mit der zytoplasmatischen Färbeintensität 0, 10 % mit der Färbeintensität 1, 40 % Zellen mit der Färbeintensität 2 und 30 % Zellen mit der Färbeintensität 3. Die Gesamtwertung des Dots wurde dann aus den partikulären Werten errechnet, indem der Intensitätswert mit der Prozentzahl der in der jeweiligen Intensität angefärbten Zellen multipliziert und nachfolgend die Ergebnisse addiert wurden. In dem oben beschriebenen Beispiel bedeutet das:  $0 \cdot 20 + 1 \cdot 10 + 2 \cdot 40 + 3 \cdot 30 = 180$ . Diese Art der Dot-Bewertung kam insbesondere den mit p-mTOR angefärbten Geweben zugute. Denn eine Auffälligkeit bei dieser Färbung war, dass die Färbung insgesamt deutlich heterogener war als die von mTOR und 4E-BP1 und einige Drüsen in einem Dot z.T. sehr stark angefärbt waren, wohingegen der Rest des Dots eine geringere Anfärbbarkeit aufwies (= Verteilung der Färbung fokal, s. Abbildung 9).

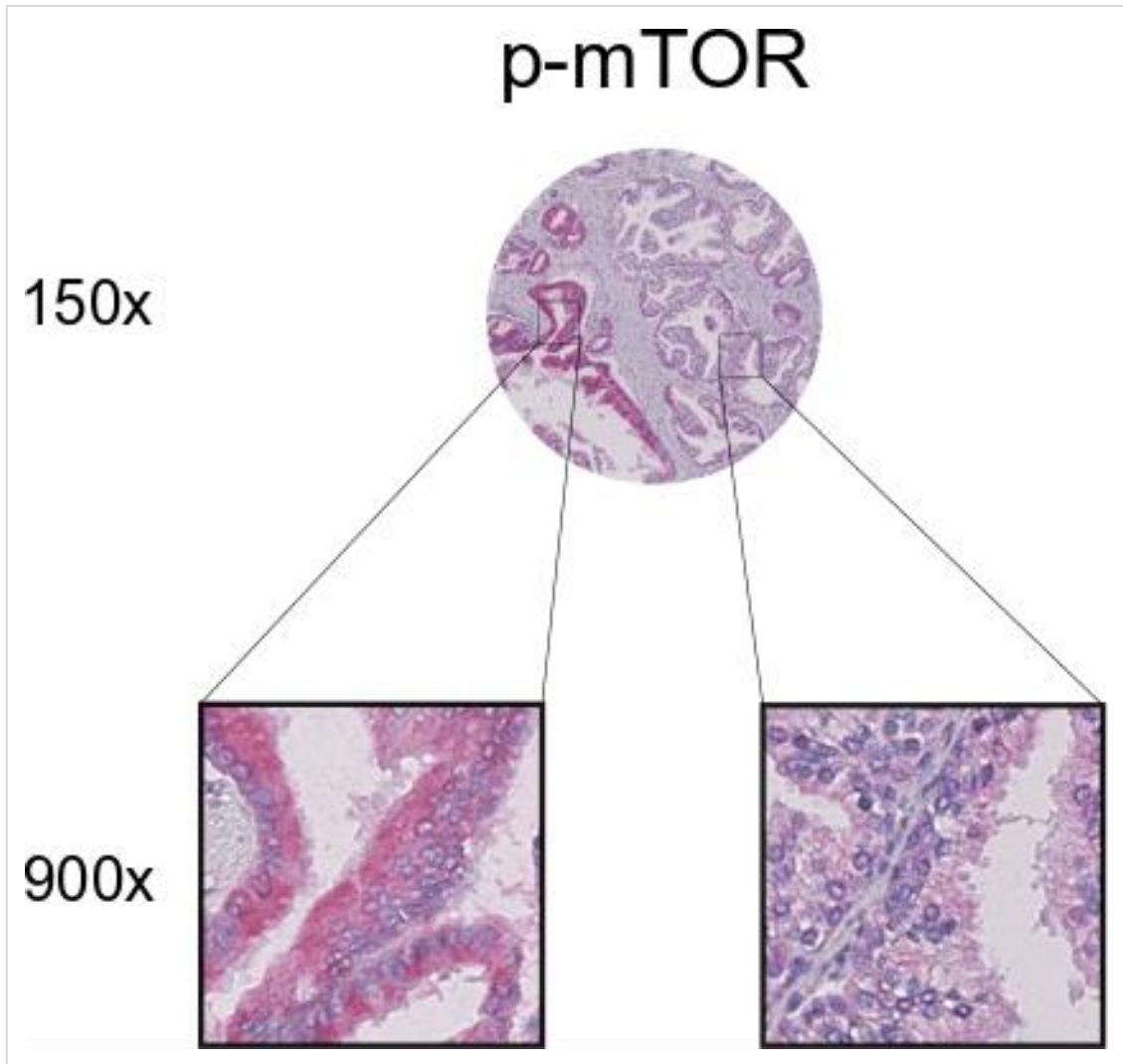


Abbildung 9: Beispiel für einen Dot (p-mTOR), der eine fokale Verteilung der Färbung zeigt

Eine weitere Besonderheit bei p-mTOR war, dass die Drüsenzellen innerhalb des luminalen Zytoplasmas und in der luminalen Zellwand zum Teil eine stärkere Anfärbbarkeit zeigten als innerhalb des basalen Zytoplasmas, was 2 verschiedene Farbeintensitäten in einer Zelle bedeutete (s. Abbildung 10). Um die Vergleichbarkeit der Dots trotzdem zu gewährleisten, erfolgte die Bewertung der Zellen wie im folgenden Beispiel erläutert: Alle Zellen (100 %) wiesen basal eine Farbeintensität von 1 auf und luminal eine Farbeintensität von 2, dann bedeutete das für die Berechnung des Scores: Luminal Farbeintensität 2 und basal Farbeintensität  $1 \cdot 50 + 2 \cdot 50 = 150$ . Ein weiteres Beispiel: 60 % der Zellen wiesen basal eine Farbeintensität von 2 auf und luminal eine



Färbeintensität von 3 auf, während die restlichen 40 % der Zellen eine Färbeintensität von 1 aufwiesen. Der Score berechnete sich dann wie folgt:  $30 \cdot 2 + 30 \cdot 3 + 40 \cdot 1 = 190$ .

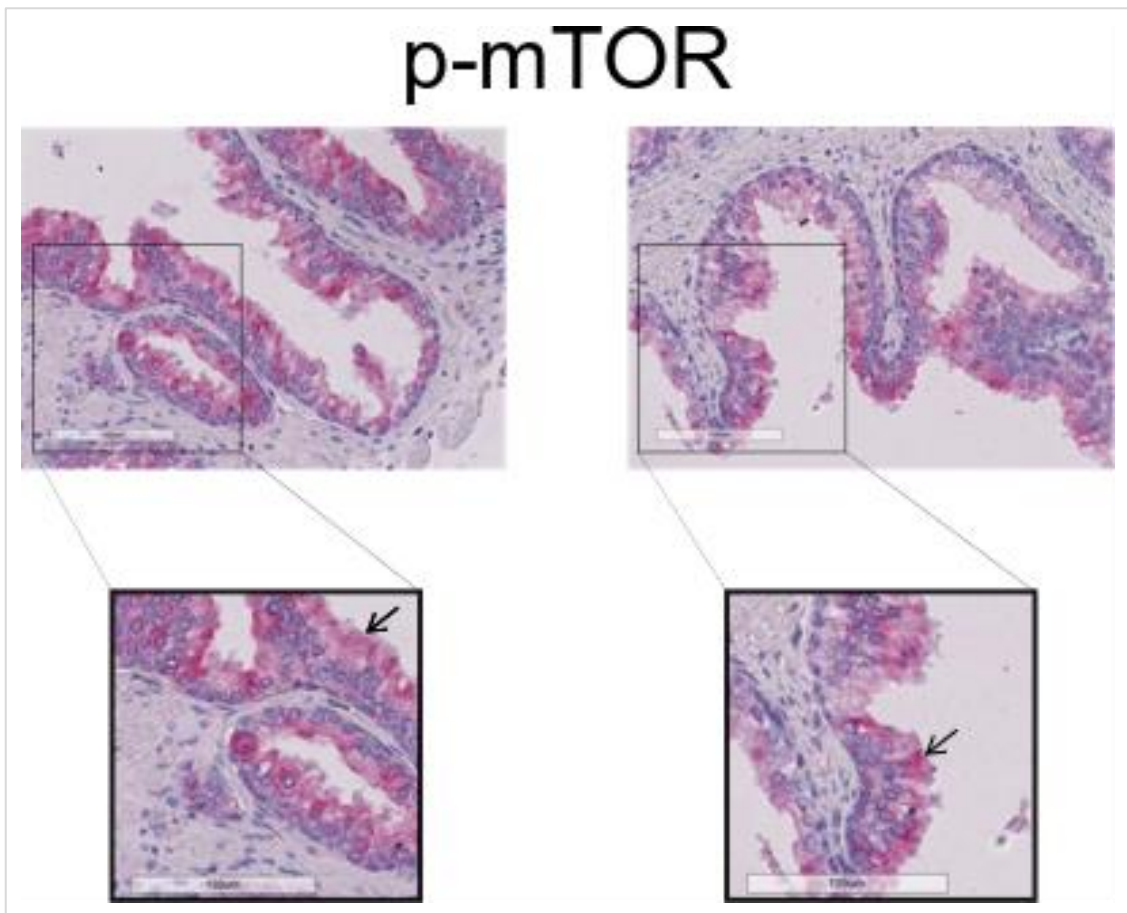


Abbildung 10: zwei Beispiele für Dots (p-mTOR), bei denen sich eine Zweifarbigkeit einiger Zellen zeigte (s. Pfeile)

Eine derartige Beschreibung der Färbeintensität mit einem numerischen Wert wurde für jeden Dot und jeden Marker durchgeführt. Das bedeutet, es existierte schließlich für jeden Dot genau ein Gesamtwert (s. Abbildung 11). Der niedrigste Gesamtwert betrug 0 Punkte, wenn alle Zellen (100 %) den Färbeintensitätswert 0 erhielten. Der höchste Gesamtwert (Score) von 300 Punkten wurde erreicht, wenn alle Zellen (100 %) die Färbeintensität 3 erhielten. Von 0 bis 300 konnte somit in 10er-Schritten jeder Gesamtwert vergeben werden. Sofern der Dot einen Score von 0-50 erhielt, war er insgesamt negativ, also wenig gefärbt. Bei einem Score von 51-100 war der Dot schwach positiv, bei 101-200 Punkten mäßig positiv und bei 201-300 Punkten stark positiv. Diese Scorewertung wurde bei allen

drei Markern angewendet. Die Dots, die mit 4E-BP1 markiert wurden, wurden zusätzlich mit der oben beschriebenen Wertung in Bezug auf die Kerne versehen.

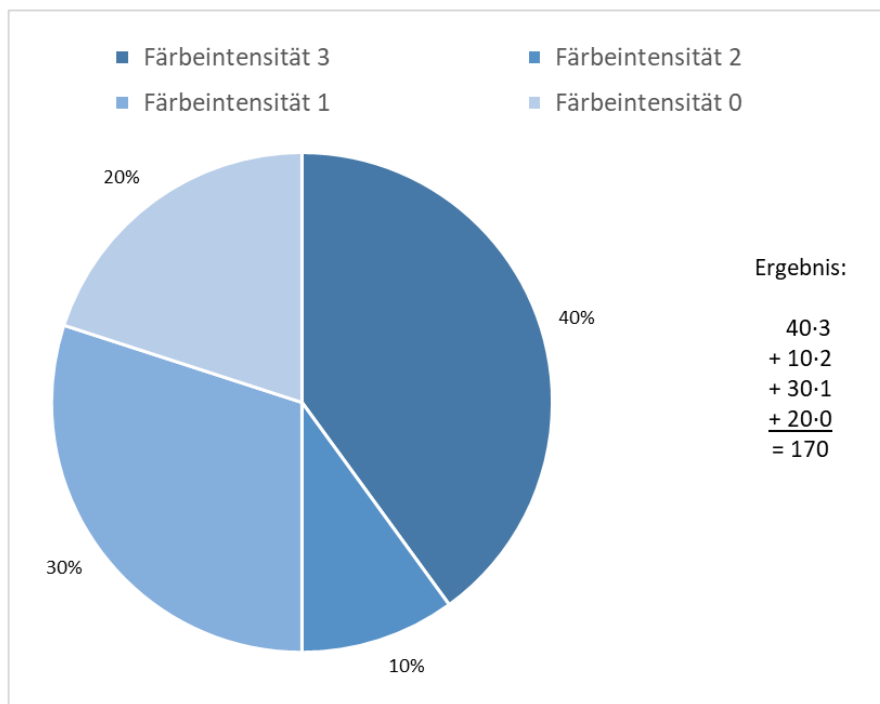


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Berechnung der Gesamtwerte anhand eines Beispieldots

Die zur Dokumentation der Mikroskopierergebnisse angefertigten Arraymaps dienten dem Eintrag der gewonnenen Einzel- und Gesamtwerte. Das Eintragen der Werte wurde verblindet durchgeführt. Zu den Informationen, die sich auf den Arraymaps befanden, zählten lediglich die K-Nummer der Pathologie, die Blocknummer des Paraffinblockes, aus dem das Gewebe stammte und die Zuordnung zu einer Gewebegruppe. Dadurch war nach der Bewertung aller Dots die Zuordnung zu den in den Datenbanken aufgelisteten Gewebeentnahmeorten gesichert. Während der Bewertung konnten hingegen keine Konklusionen auf die individuellen Patientendaten gezogen werden, was möglicherweise einen negativen Einfluss auf die Objektivität bei der Beurteilung der Färbung der einzelnen Dots gehabt hätte.

Auf diese Weise wurde jeder Dot zwei Mal mikroskopiert und jeweils ein Färbeintensitäts-Gesamtwert ermittelt. Im Fall von 4E-BP1 wurde zudem in den zwei Mikroskopierdurchgängen die Anzahl der angefärbten Kerne bestimmt. Bei der Bewertung der Dots war darauf zu achten, dass der zweite Mikroskopierdurchgang

zeitlich von dem ersten Durchgang entfernt war, damit die Erinnerung an die Dotwertung nicht mehr allzu präsent war.

Danach wurden die Ergebnisse beider Mikroskopierdurchgänge aufgedeckt und die Gesamtwerte miteinander verglichen. Sofern die Abweichung der beiden Ergebnisse mehr als 10 % ( $\cong$  30 Punkte) betrug, wurde ein drittes Mal mikroskopiert. Im Fall von 4E-BP1 wurde zudem ein drittes Mal mikroskopiert, wenn der zweite nukleäre Wert von dem ersten abwich. Somit existierten, je nachdem, ob der Dot zwei- oder dreimal mikroskopiert wurde, entsprechend viele Gesamtwerte. Um am Ende genau einen Wert pro Dot zu erhalten, wurde bei zwei Durchgängen wie folgt vorgegangen: Sofern der Gesamtwert des zweiten Mikroskopierdurchgangs derselbe war wie der des ersten, wurde dieser als Ergebniswert übernommen. Beispiel: 230 (erster Wert) und 230 (zweiter Wert); Ergebnis: 230. Bei einer Gesamtwert-Abweichung bis 30 Punkte wurde der Mittelwert aus beiden Durchgängen gebildet. Bei einer Abweichung von 10 oder 30 Punkten kam man somit auf ein Ergebniswert mit der Endziffer 5. Beispiel: 210 (erster Wert) und 220 (zweiter Wert); Ergebnis: 215. Sofern die Abweichung 20 Punkte betrug, hatte der Ergebniswert die Endziffer 0. Beispiel: 210 (erster Wert) 230 (zweiter Wert); Ergebnis: 220. Bei drei Mikroskopierdurchgängen wurden alle drei Gesamtwerte miteinander verglichen. Sofern der dritte Wert mit einem der beiden vorigen Werte identisch war, wurde dieser als Ergebniswert festgelegt. Bsp.: 140 (erster Wert), 180 (zweiter Wert) und 180 (dritter Wert); Ergebnis: 180. In dem Fall, dass der dritte ermittelte Wert genau den Mittelwert der anderen beiden Werte darstellte, wurde dieser übernommen. Bsp.: 120 (erster Wert), 160 (zweiter Wert) und 140 (dritter Wert); Ergebnis: 140. Falls weder der eine noch der andere oben beschriebene Fall zutraf, wurden die zwei am nächsten beieinander liegenden Werte herangezogen und aus ihnen der Mittelwert gebildet. Ein Wert fiel somit aus der Bewertung. Bsp.: 130 (erster Wert), 170 (zweiter Wert), 160 (dritter Wert); Ergebnis: 165.

Sofern bei der nukleären Bewertung von 4E-BP1 beide Mikroskopierdurchgänge die gleichen Werte aufwiesen, wurde dieser als Ergebniswert festgelegt. Beispiel: 1 (erster Wert) und 1 (zweiter Wert); Ergebnis: 1. In dem seltenen Fall, dass ein drittes Mal mikroskopiert werden musste, weil sich die ersten beiden Durchgänge unterschieden,

wurde der doppelt ermittelte Wert als Ergebniswert definiert. Beispiel: 2 (erster Wert), 1 (zweiter Wert) und 2 (dritter Wert); Ergebnis: 2.

Somit erhielt letztlich jeder Dot genau einen zytoplasmatischen Wert zwischen 0 und 300 und die Dots mit dem Marker 4E-BP1 zusätzlich einen nukleären Wert zwischen 0 und 3.

### III.12.3 Synchronisation des Expressionsverhaltens in die Datenbanken

Abschließend erfolgte das Übertragen der in die Arraymaps eingetragenen Ergebnisse in die Datenbanken. Gesetz den Fall, dass mehrere Dots einer Gewebegruppe eines Patienten und damit auch mehrere Ergebnisse existierten, wurden sowohl der Mittelwert als auch der höchste Wert dieser Ergebnisse (Mittelwert-Score und Maximalwert-Score) in den Datenbanken vermerkt, um die statistische Auswertung der Ergebnisse zu ermöglichen. Hierfür wurden die Überschriften „mTOR Mittelwert“, „mTOR Maximalwert“, „p-mTOR Mittelwert“, „p-mTOR Maximalwert“, „4E-BP1 Mittelwert“, „4E-BP1 Maximalwert“, „4E-BP1 Kern Mittelwert“ und „4E-BP1 Kern Maximalwert“ in den Datenbanken ergänzt. Somit wurden insgesamt acht Spalten hinzugefügt.

### III.13 Statistische Auswertungen der Datenbanken

Die statistische Evaluierung der in den Datenbanken zusammengetragenen Parameter wurde mit der Statistiksoftware JMP 13.0.0<sup>®</sup> (SAS Institute, Cary, North Carolina, USA) durchgeführt.

Als parameterfreier statistischer Test kam der Wilcoxon-Test zum Einsatz. Als Post-Hoc-Test wurde der Tukey-HSD-Test verwendet, mit dem alle Paare miteinander verglichen wurden. Regressionsanalysen wurden vorgenommen, um die Beziehungen zwischen mehreren unabhängigen Variablen zu modellieren.

Die bildliche Darstellung der Daten erfolgte auf Basis der von JMP erstellten Ergebnisse als Quantile. Die x-Achse wurde hierbei mit den ordinalen und nominalen Werten und die y-Achse mit den stetigen Werten bestückt.

Zur Veranschaulichung der Korrelation von zwei stetigen Werten wurde eine Ausgleichsgerade dargestellt.

Bei der Untersuchung der Kernanfärbung von 4E-BP1 wurden zur Verbildlichung Mosaikdiagramme erstellt. Die x-Achse wurde hier ebenfalls mit den ordinalen Werten bestückt. Die y-Achse zeigt den prozentualen Anteil der jeweils angefärbten Kerne. Die farbliche Abstufung entspricht den Scores 0 bis 3 (s. „Interpretation des Expressionsverhaltens“).

Das verwendete Signifikanzniveau lag bei 5 % ( $\alpha= 0,05$ ). Das heißt, es konnten jene Mittelwertunterschiede als signifikant erachtet werden, deren p-Wert unter 0,05 lag.

### III.14 Verwendete Programme und technische Erfassung der Färbung

- Literaturverwaltungsprogramm: EndNote X7.3.1<sup>®</sup> (Thomson Reuters, New York City, Vereinigte Staaten)
- Textverarbeitungsprogramm: Microsoft<sup>®</sup> Word 2016 (Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim)
- Erstellung der Tabellen: Microsoft<sup>®</sup> PowerPoint 2016 (Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim)
- Bildbearbeitungsprogramme: Ulead PhotoImpact 8.0<sup>®</sup> (Corel Corporation, Ottawa, Ontario, Kanada), Paint.NET 4.0.19<sup>®</sup> (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA), Inkscape 0.92.2<sup>®</sup> (Free Software Foundation, Boston, Massachusetts, USA)
- Bildbetrachtungssoftware: Aperio ImageScope 12.1.0<sup>®</sup> (Leica Biosystems GmbH, Nussloch, Deutschland)
- Statistiksoftware: JMP 13.0.0<sup>®</sup> (SAS Institute, Cary, North Carolina, USA)
- Datenbankerstellung: Microsoft Excel 2016<sup>®</sup> (Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim)
- Objektträger-Scanner: Leica Slide Scanner SCN400, (Leica Biosystems GmbH, Nussloch, Deutschland)

## IV. Ergebnisse

### IV.1 Charakteristika des Studienkollektivs

Von den insgesamt 111 Patienten dieser Studie litten 85 an einem Prostatakarzinom in unterschiedlichen Stadien. Bei 53 Patienten erfolgte eine radikale Prostatektomie. 32 der 85 Patienten mit PCA erhielten als Therapie des fortgeschrittenen PCA (M1) eine palliative TUR-P. Hinzu kamen 26 weitere Patienten, die sich entweder aufgrund eines Harnblasenkarzinoms oder BPH einer operativen Therapie unterzogen. Das Gewebe dieser 26 Patienten wies keinen malignen Tumor auf.

Das Patientenalter am Tag der Operation reichte von 51 bis 95 Jahre. Im Mittel betrug es 68,3 Jahre. Der Median lag bei 68 Jahren und die Standardabweichung bei 7,6 Jahren (bei n = 111). Der vor der Operation ermittelte PSA-Wert betrug im Durchschnitt 95,6 ng/ml. Der Median ergab 7,8 ng/ml und die Standardabweichung 485,9 ng/ml (bei n = 101).

Die Verteilung des Alters am Tag der OP und des PSA-Wertes vor der OP zeigte sich bei den verschiedenen Subkollektiven wie in Tabelle 7 aufgelistet.

	Patienten ohne PCA			Patienten mit PCA (M0)			Patienten mit PCA (M1)		
Anzahl gesamt	26			53			32		
	Spanne	Mittelwert	bei n=	Spanne	Mittelwert	bei n=	Spanne	Mittelwert	bei n=
Alter am Tag der OP (in Jahren)	55-82	70,5 (± 6,6)	26	51-78	64,4 (± 5,3)	53	54-95	72,8 (± 8,5)	32
PSA vor der OP (in ng/ml)	1,3-31,8	9,7 (± 8,2)	20	0,1-30	8,4 (± 5,9)	51	0-4757	301 (± 867,1)	30

Tabelle 7: Differenzierte Übersicht über das Alter am Tag der OP und den PSA-Wert vor der OP

Von den 26 Patienten ohne Prostatakarzinom, die in diese Studie aufgenommen wurden, sind 11 Patienten mittels TUR-P operiert worden. Bei 8 Patienten wurde eine transvesikale Prostata-Adenom-Enukleation durchgeführt und bei 7 Patienten eine radikale Zystoprostatektomie. Diese 7 Patienten litten alle an einem muskelinvasiven Blasenkarzinom. Sofern im Ergebnisteil von „benigne“ gesprochen wurde, bezog sich die Auswertung allein auf diese 26 Prostatae. Wenn die Bezeichnung „benignes Gewebe“ lautete, waren sowohl die Gewebeproben der 26 Prostatae, die keinen malignen Tumor aufwiesen, als auch die Gewebeproben aus tumorangrenzenden histologisch benignen Arealen inkludiert.

Die insgesamt 32 Patienten mit fortgeschrittenem PCA (M1) ließen sich in 14 Patienten mit hormonsensitivem und 18 Patienten mit kastrationsresistentem PCA aufteilen. Von diesen 32 Patienten wurden 28 mittels antiandrogener Therapie behandelt. Hier lag die Therapiedauer zwischen einem Monat und 180 Monaten. Im Durchschnitt betrug sie 32,3 Monate. Der Median ergab 15 Monate und die Standardabweichung 40,6 Monate (bei n = 28). Das N-Stadium dieser Patienten zeigte sich wie folgt:

		Patienten mit PCA (M1)
N-Stadium	0	3 (15%)
	1	17 (85%)
bei n=		20

Tabelle 8: N-Stadium der Patienten mit metastasiertem PCA

Die Verteilung des T-Stadium und des Gleason-Scores der organbegrenzten und metastasierten PCAs zeigte sich wie folgt:

		Patienten mit PCA (M0)	Patienten mit PCA (M1)
T-Stadium	T2a	5 (9,43%)	0 (0%)
	T2c	32 (60,38%)	2 (11,76%)
	T3a	12 (22,64%)	1 (5,88%)
	T3b	4 (7,55%)	3 (17,65%)
	T4	0 (0%)	11 (64,71%)
bei n=		53	17

Tabelle 9: Differenzierte Übersicht über das T-Stadium

		Patienten mit PCA (M0)	Patienten mit PCA (M1)
Gleason-Score	6	12 (22,64%)	0 (0%)
	7a	11 (20,75%)	1 (3,57%)
	7b	6 (11,32%)	0 (0%)
	8	10 (18,87%)	3 (10,71%)
	9	13 (24,53%)	21 (75%)
	10	1 (1,89%)	3 (10,71%)
bei n=		53	28

Tabelle 10: Differenzierte Übersicht über den Gleason-Score

## IV.2 Immunhistochemisches Expressionsverhalten

Es zeigten sich für die verschiedenen Antikörper unterschiedliche Färbeverhalten, die im Folgenden beschrieben sind.

### IV.2.1 Immunhistochemisches Färbeergebnis von mTOR

Die Färbung mit mTOR zeigte sich ausschließlich im Zytoplasma des Drüsenepithels. Sie war schwach rot und im gesamten Zytoplasma einer Zelle überwiegend einheitlich. Die Abbildung 12 zeigt exemplarisch an vier unterschiedlichen Dots, wie sich die Drüsen mit mTOR anfärben ließen. Bei mTOR ließen sich vier verschiedene Färbeintensitäten herausarbeiten, mit Hilfe derer ein Gesamtscore für jeden Dot berechnet werden konnte (s. Kapitel „Interpretation des Expressionsverhaltens“). Mit 0 sind die Zellen gekennzeichnet, die keine Färbung aufwiesen, und mit 3 die Zellen mit der stärksten Färbeintensität.



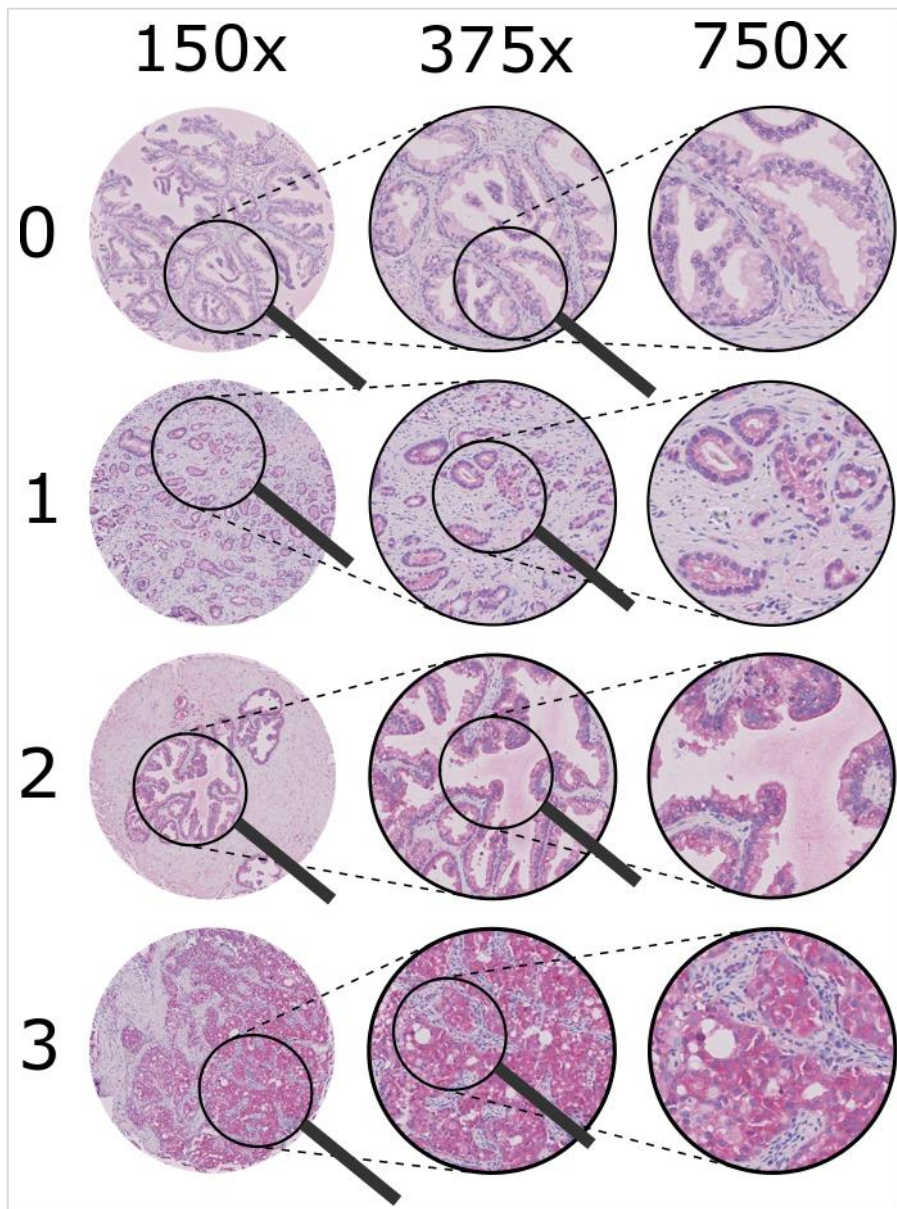


Abbildung 12: Färbeergebnis von mTOR: Intensitäten 0-3 bei drei Vergrößerungen

#### IV.2.2 Immunhistochemisches Färbeergebnis von p-mTOR

Die Färbung mit p-mTOR manifestierte sich ebenfalls im Zytoplasma des Drüsenepithels. Sie war leuchtend rot und im Zytoplasma einer Zelle z.T. inhomogen. Die Zellen zeigten innerhalb des luminalen Zytoplasmas und in der luminalen Zellwand zum Teil eine stärkere Anfärbbarkeit als basal, was 2 verschiedene Färbeintensitäten in einer Zelle bedeutete (s. Abbildung 10 im Kapitel „Interpretation des Expressionsverhaltens“). Eine weitere Auffälligkeit bei dieser Färbung war, dass die Färbung insgesamt deutlich heterogener war und einige Drüsen in einem Dot z.T. sehr stark angefärbt waren, wohingegen der Rest eine geringe Anfärbbarkeit aufwies (s. Abbildung 9 im Kapitel

„Interpretation des Expressionsverhaltens“). Wie bei mTOR zeigten sich bei p-mTOR vier verschiedene Färbeintensitäten, die in Abbildung 13 anhand von vier verschiedenen Dots beispielhaft abgebildet werden.

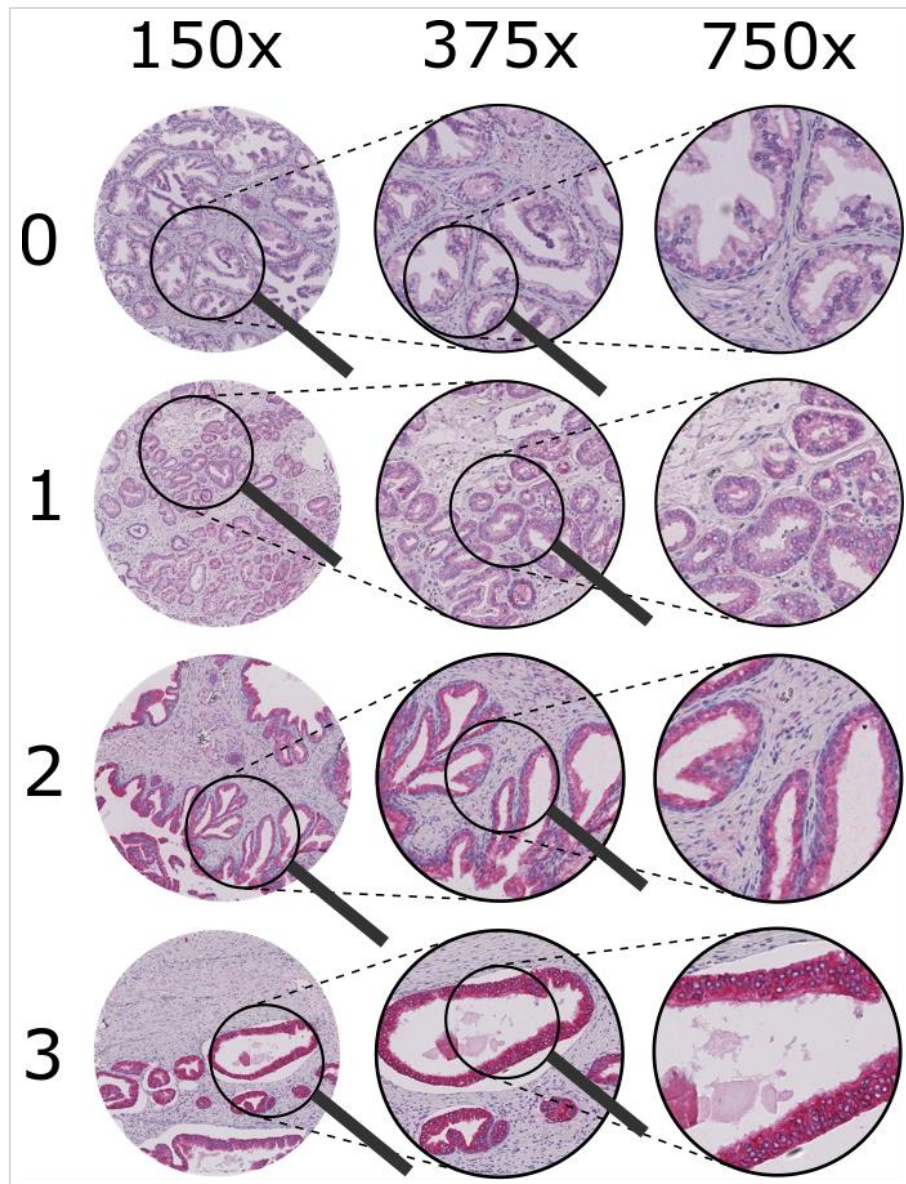


Abbildung 13: Färbeergebnis von p-mTOR: Intensitäten 0-3 bei drei Vergrößerungen

#### IV.2.3 Immunhistochemisches Färbeergebnis von 4E-BP1

4E-BP1 zeigte eine zytoplasmatisch leuchtend rote Färbung. Die Färbung stellte sich in einer Zelle homogen dar. Die Abbildung 14 zeigt exemplarisch an unterschiedlichen Dots und in drei Vergrößerungen, wie sich die Drüsen mit 4E-BP1 anfärben ließen. Bei 4E-BP1 ließen sich wie bei mTOR und p-mTOR vier verschiedene Färbeintensitäten herausarbeiten.



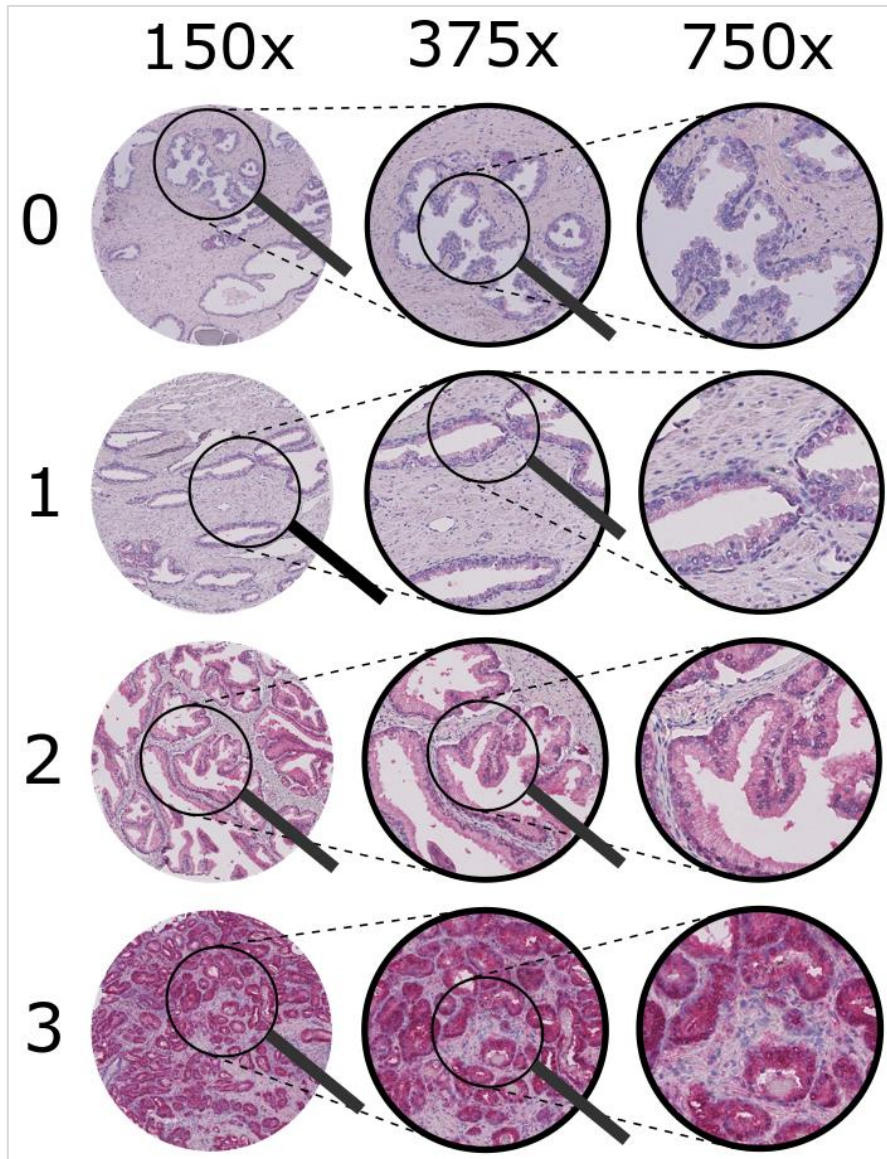


Abbildung 14: Färbeergebnis von 4E-BP1: Intensitäten 0-3 bei drei Vergrößerungen

Bei 4E-BP1 im Gegensatz zu mTOR und p-mTOR waren neben dem Zytoplasma zum Teil auch die Kerne angefärbt. Abbildung 15 zeigt exemplarisch an vier verschiedenen Dots, wie unterschiedlich stark die Anfärbbarkeit der Kerne schwankte. Es gab Dots, bei denen nahezu keine Kerne angefärbt waren (< 1 % der Kerne), bis hin zu Dots, bei denen mehr als 50 % der Kerne angefärbt waren.

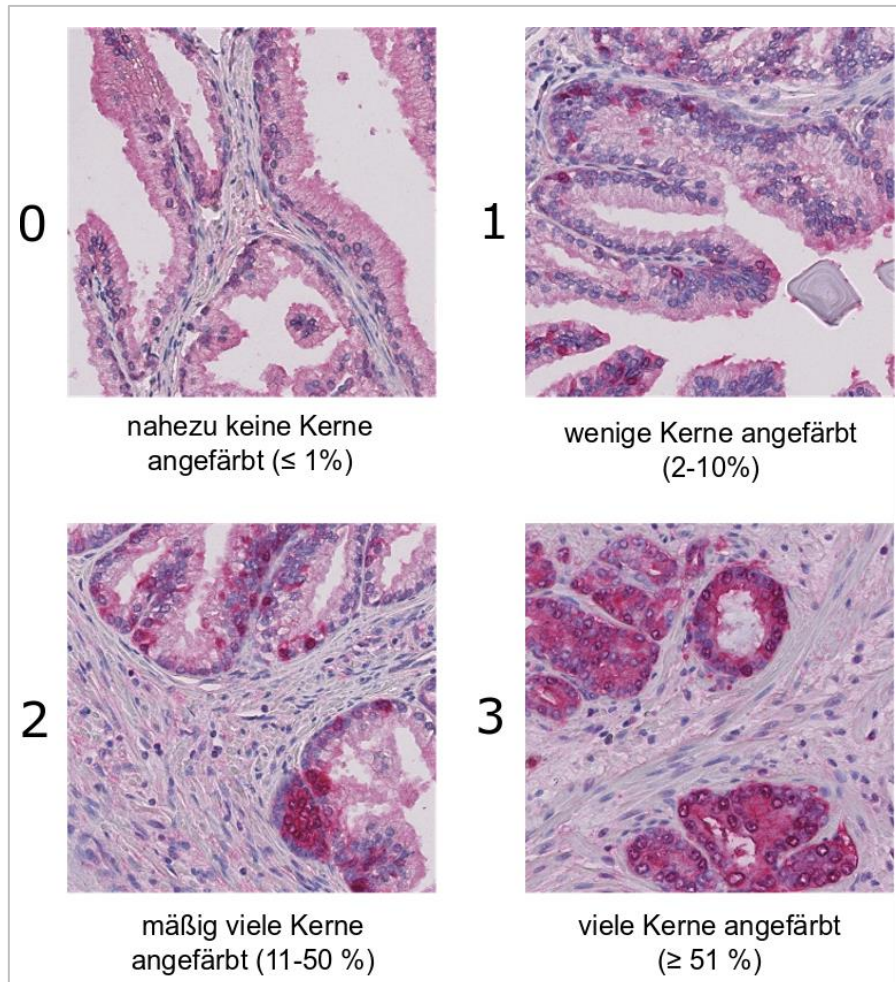


Abbildung 15: Beispiele aus verschiedenen Dots (4E-BP1), bei denen unterschiedlich viele Kerne angefärbt waren

### IV.3 Ergebnisse bezüglich der Dignität der untersuchten Gewebe

Bei der Betrachtung des Färbeverhaltens von Tumor- und Normalgewebe wurde das **Tumorgewebe** mit dem Gewebe aus den 26 benignen Prostatae und dem die Tumoren angrenzenden histologisch benignen Gewebe ( $\hat{=}$  **benignes Gewebe**) verglichen.

#### IV.3.1 Expression von mTOR in Bezug auf die Gewebedignität

Beim Vergleich des Tumorgewebes mit dem benignen Gewebe war der Unterschied nicht signifikant ( $p = 0,1418$ ). Das Tumorgewebe wies einen Median von 152,5 ( $M: 143,6$ ) auf, wohingegen das benigne Gewebe einen Median von 133,3 zeigte ( $M: 135,3$ ; s. Abbildung 16).

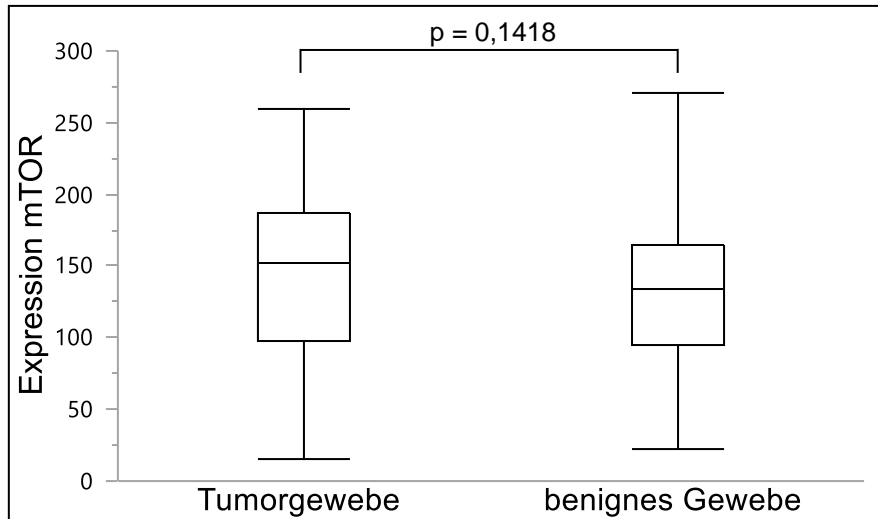


Abbildung 16: Vergleich der Expressionen von mTOR im Tumorgewebe (bei n = 83) und im benignen Gewebe (bei n = 127); p = 0,1418

### IV.3.2 Expression von p-mTOR in Bezug auf die Gewebedignität

Im Falle von p-mTOR ergaben sich mediane Werte von 162,0 (*M*: 156,4) und 195,0 (*M*: 191,3) für das Tumorgewebe und das benigne Gewebe ( $p < 0,0001$ ; s. Abbildung 17).

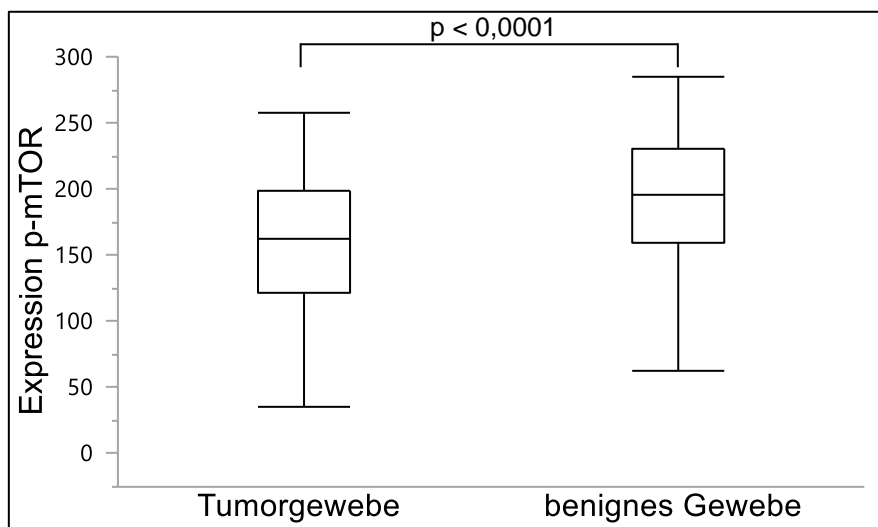


Abbildung 17: Vergleich der Expressionen von p-mTOR im Tumorgewebe (bei n = 81) und im benignen Gewebe (bei n = 126);  $p < 0,0001$

### IV.3.3 Expression von mTOR unter Berücksichtigung der Aktivierung von mTOR in Bezug auf die Gewebedignität

Der p-mTOR-Antikörper (p-mTOR (Ser2448): #2983 (49F9), Rabbit mAb (IHC Specific); Cell Signaling Technology (Danvers, Massachusetts, USA)) erkennt nur phosphoryliertes mTOR, also p-mTOR. Der mTOR-Antikörper (mTOR: #2983 (7C10), Rabbit mAb (IHC Specific); Cell Signaling Technology (Danvers, Massachusetts, USA))

hingegen erkennt laut Hersteller sowohl phosphoryliertes als auch unphosphoryliertes mTOR. Damit eine Beurteilung der Aktivierung von mTOR geschehen konnte, wurde der Quotient von p-mTOR zu mTOR (p-mTOR/mTOR) berechnet.

Es wurde bei dem Quotienten p-mTOR/mTOR deutlich, dass sich die Expression im tumorösen Gewebe mit dem Median von 1,0 ( $M: 1,3$ ) signifikant ( $p < 0,0001$ ) von dem benignen Gewebe mit dem Median von 1,5 ( $M: 1,7$ ) unterschied (s. Abbildung 18).

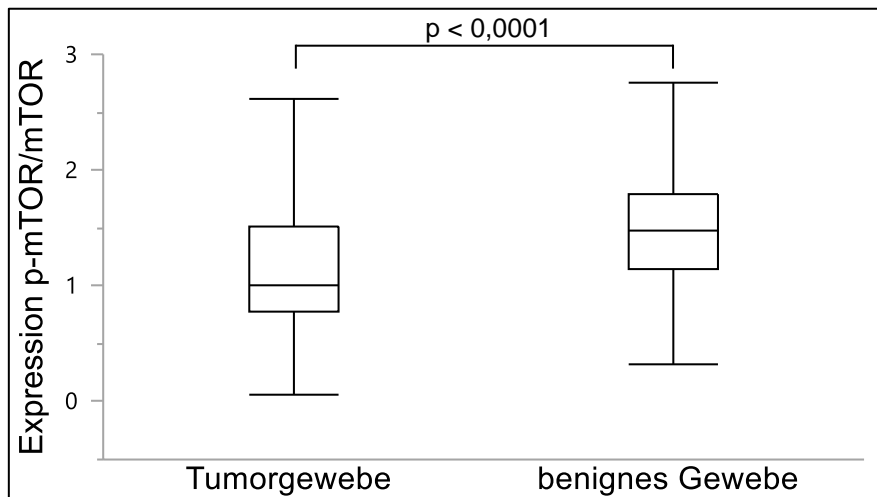


Abbildung 18: Vergleich der Expressionen von p-mTOR/mTOR im Tumorgewebe (bei  $n = 81$ ) und im benignen Gewebe (bei  $n = 126$ );  $p < 0,0001$

#### IV.3.4 Expression von 4E-BP1 in Bezug auf die Gewebedignität

Auch bei 4E-BP1 zeigte sich ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,0001$ ) zwischen den Expressions-Scores des Tumorgewebes und des benignen Gewebes. Der Median des Tumorgewebes belief sich auf 159,2 ( $M: 154,7$ ), wohingegen der Median des benignen Gewebes bei 105,0 ( $M: 108,0$ ) lag (s. Abbildung 19).

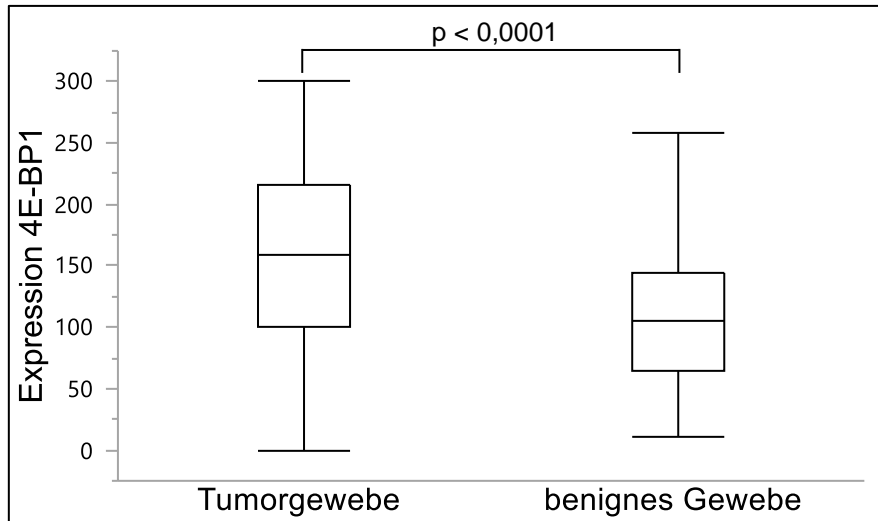


Abbildung 19: Vergleich der Expressionen von 4E-BP1 im Tumorgewebe (bei n = 82) und im benignen Gewebe (bei n = 123);  $p < 0,0001$

#### IV.3.5 Expression von 4E-BP1 unter Beachtung der intrazellulären Lokalisation in Bezug auf die Gewebedignität

Da sich bei 4E-BP1 anders als bei m-TOR und p-mTOR neben dem Zytoplasma auch die Kerne anfärben ließen, wurde, um eine Aussage über die zelluläre Lokalisation machen zu können, bei 4EBP1 über einen zusätzlichen Score (0-3) die Bewertung der Kerne vorgenommen (s. „Immunhistochemisches Färbeergebnis von 4E-BP1“).

Es zeigte sich, dass beim tumorösen Gewebe insgesamt deutlich mehr Kerne angefärbt waren als beim benignen Gewebe. Bei 20 % aller Tumordots waren mehr als 50 % (3) der Kerne angefärbt. Mehr als 50 % (3) aller Kerne waren beim benignen Gewebe hingegen nur in 4 % der Dots angefärbt (s.

Abbildung 20). Das Likelihood-Verhältnis lag bei  $< 0,0001$ . Der Median belief sich beim Tumorgewebe sowie beim benignen Gewebe auf 1.

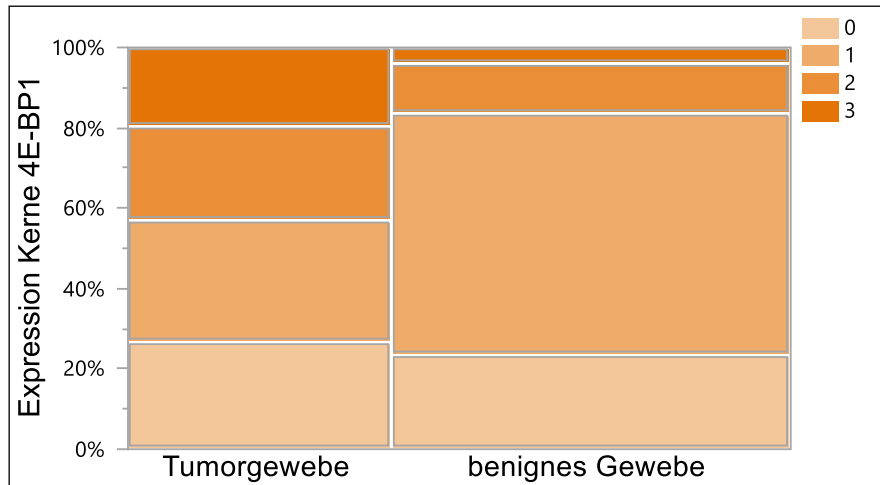


Abbildung 20: Schematische Darstellung des prozentualen Anteils der angefärbten Kerne im Tumorgewebe (bei n = 82) und im benignen Gewebe (bei n = 123);  $p < 0,0001$ .

#### IV.3.6 Korrelation der untersuchten Proteinparameter unter Beachtung der Gewebedignität

Beim Vergleich der Parameter untereinander zeigte sich eine positive Korrelation zwischen den Expressionen von p-mTOR und mTOR sowohl im Tumorgewebe ( $p = 0,0024$ ;  $r^2 = 0,111$ ) als auch im benignem Gewebe ( $p < 0,0001$ ;  $r^2 = 0,220$ ; s. Abbildung 21 A). Auch bei 4E-BP1 und mTOR zeigte sich eine positive Korrelation zwischen den Expressionen. Diese Korrelation war ebenfalls sowohl im Tumorgewebe ( $p = 0,0102$ ;  $r^2 = 0,080$ ) als auch im benignen Gewebe ( $p < 0,0001$ ;  $r^2 = 0,125$ ) auszumachen (s. Abbildung 21 B). Bei 4E-BP1 und p-mTOR wurde auch eine Korrelation deutlich. Die Korrelation war im Tumorgewebe verstärkt ( $p < 0,0001$ ;  $r^2 = 0,248$ ) und im benignen Gewebe ( $p = 0,0005$ ;  $r^2 = 0,095$ ) gering zu erkennen (s. Abbildung 21 C).



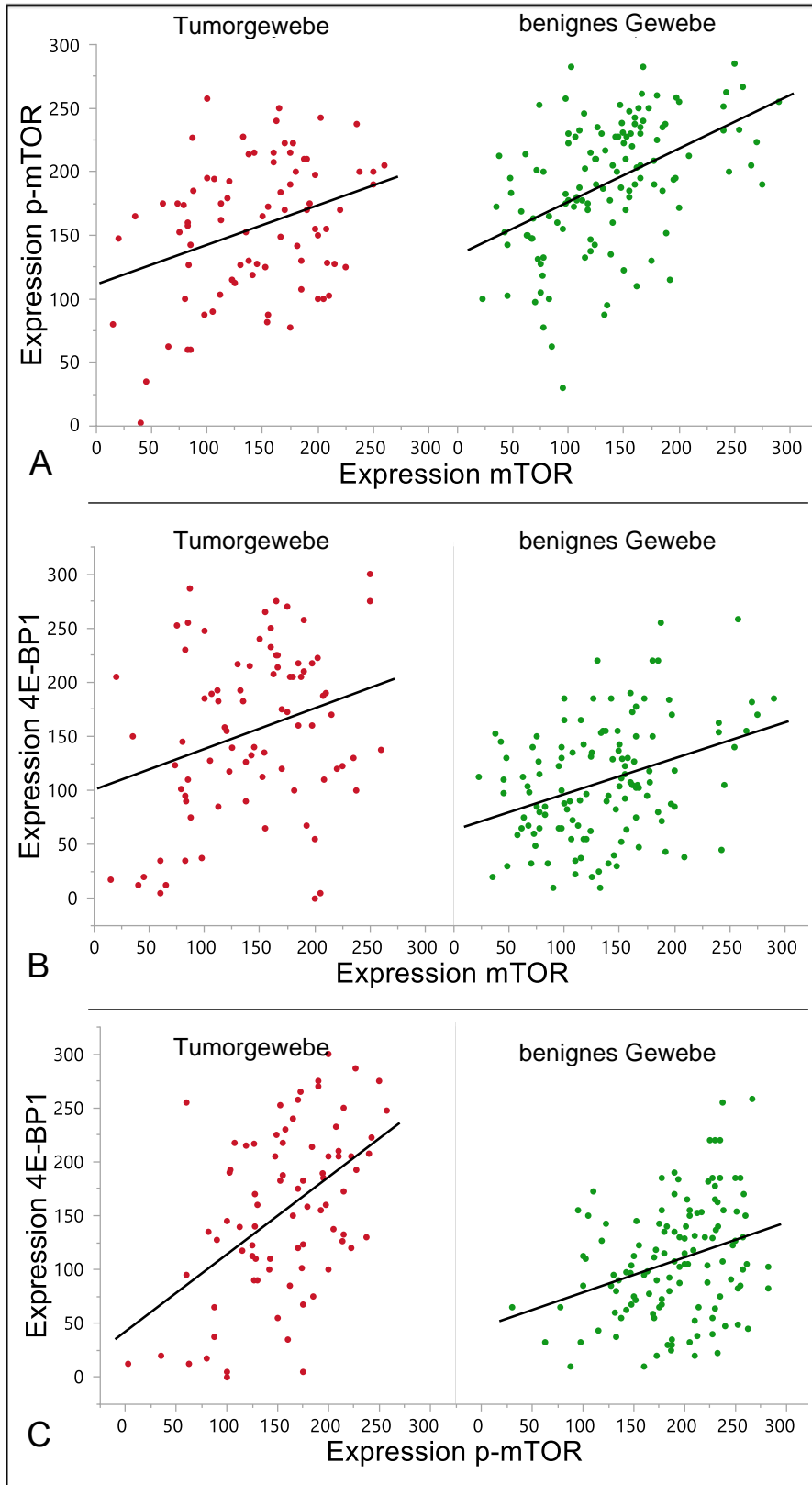


Abbildung 21: Korrelation der Expressionen der Proteinparameter im Tumorgewebe und im benignen Gewebe

Bei Betrachtung des Zytoplasmas und der Kerne bei 4E-BP1 zeigte sich ebenfalls eine Korrelation. Diese Korrelation war im Tumorgewebe ( $p < 0,0001$ ;  $r^2 = 0,569$ ) und im benignen Gewebe ( $p < 0,0001$ ;  $r^2 = 0,312$ ) sehr deutlich zu erkennen (s. Abbildung 22).

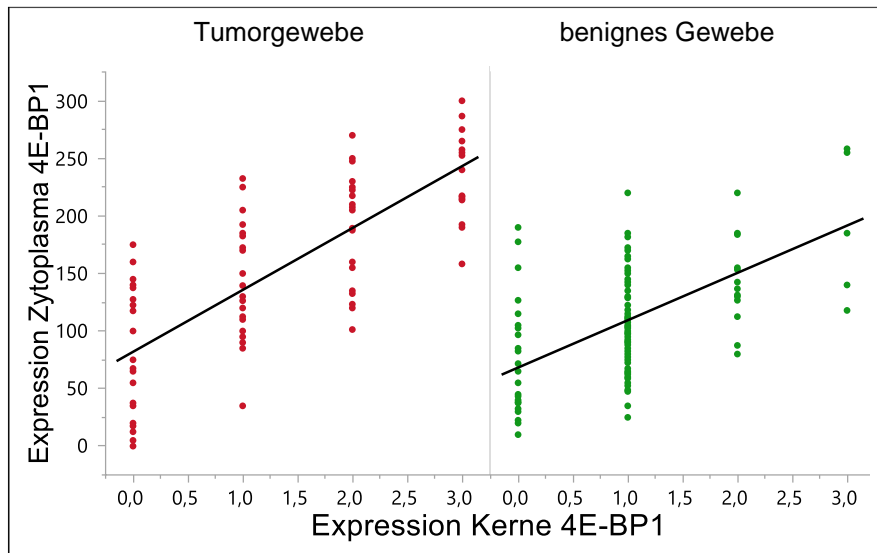


Abbildung 22: Korrelation der Expressionen der zellulären Lokalisation bei 4E-BP1 im Tumorgewebe und im benignen Gewebe

#### IV.4 Ergebnisse bezüglich der Diversität im Prostataraum

In diesem Abschnitt wurden die verschiedenen Entnahmeorte innerhalb der Prostatae betrachtet, die mittels RPE entfernt worden waren und ein organbegrenzt PCA (M0) aufwiesen. Neben dem Tumorgewebe (in den Abbildungen: **Tumor M0**) wurde das die Tumoren umgebende histologisch benigne Gewebe untersucht. Hier wurde zwischen **nah** (weniger als 5 mm vom Tumor entfernt) und **fern** (mindestens 10 mm vom Tumor entfernt) unterschieden. Um zusätzlich den Expressionsunterschied des die Tumoren umgebenden histologisch normalen Gewebes mit benignem nicht an einen malignen Tumor angrenzendem Gewebe zu untersuchen, wurde das Gewebe aus den 26 benignen Prostatae (in den folgenden Abbildungen: **benigne**) hinzugenommen. So ergab sich eine Sequenz aus vier Gewebegruppen.

Mediane betragen für mTOR beim tumorösen Gewebe (PCA M0) 152,5 ( $M$ : 144,8), beim tumornahen Gewebe 147,5 ( $M$ : 145,9), beim tumorfernen Gewebe 145,0 ( $M$ : 145,1) und beim benignen Gewebe 91,3 ( $M$ : 95,8). Die Differenz der Expressionen war sowohl zwischen dem Tumorgewebe (M0) und dem benignen Gewebe ( $p = 0,0011$ ) als auch zwischen dem tumornahen und dem benignen Gewebe ( $p = 0,0008$ ) als auch zwischen dem tumorfernen und dem benignen Gewebe signifikant ( $p = 0,0010$ ; s. Abbildung 23

A). Bei p-mTOR waren keine signifikanten Unterschiede auszumachen. Die medianen Werte der Expression vom Tumorgewebe hin zum benignen Gewebe sahen wie folgt aus: 175,0 (*M*: 176,3), 197,5 (*M*: 193,4), 205,0 (*M*: 199,5), 177,5 (*M*: 171,5 s. Abbildung 23 B). Bei dem Quotienten p-mTOR/mTOR war lediglich ein geringer signifikanter Unterschied zwischen dem Tumorgewebe (M0) zum benignen Gewebe zu erkennen ( $p = 0,0401$ ). Die Medianwerte betragen beim Tumorgewebe 1,2 (*M*: 1,5), beim tumornahen Gewebe 1,4 (*M*: 1,5), beim tumorfernen Gewebe 1,4 (*M*: 1,5) und beim benignen Gewebe bei 1,7 (*M*: 2,1; s. Abbildung 23 D). Die Mediane bei 4E-BP1 vom Tumorgewebe hin zum benignen Gewebe sahen wie folgt aus: 189,3 (*M*: 184,9), 96,7 (*M*: 105,2), 102,5 (*M*: 104,9), 126,7 (*M*: 119,6). Die Differenz war sowohl zwischen dem Tumorgewebe und dem benignen Gewebe als auch zwischen dem Tumorgewebe und dem tumorfernen Gewebe als auch zwischen dem Tumorgewebe und dem tumornahen Gewebe signifikant (alle:  $p < 0,0001$ ; s. Abbildung 23 C).

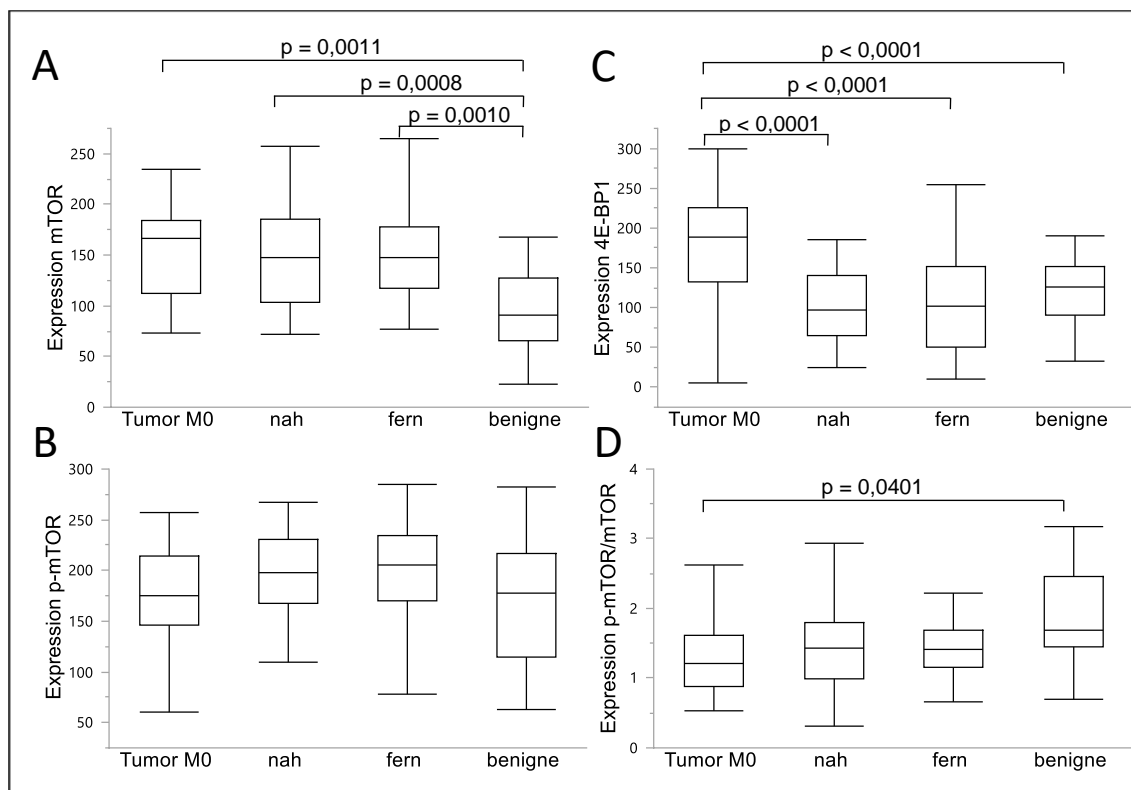


Abbildung 23: Vergleich der Expressionen aller Parameter in PCA M0 Gewebe in Abhängigkeit von der Lokalisation und Expression im benignen Gewebe aus Prostatae ohne malignen Tumor

#### IV.4.1 Expression der Parameter in Bezug auf die Diversität unter Berücksichtigung der zellulären Lokalisation bei 4E-BP1

Die Medianwerte betragen für die Kerne bei 4E-BP1 beim tumorösen Gewebe (PCA M0) 2 und bei den anderen Gewebegruppen 1. Die Differenz der Gruppen war mit  $p < 0,0001$  signifikant. Es zeigte sich, dass die Zahl der angefärbten Kerne vom Tumorgewebe hin zum benignen Gewebe abnahm. Beim Tumorgewebe waren bei vielen Dots (25 %) mehr als 50 % der Kerne angefärbt und nur bei 4 % der Dots waren weniger als 1 % (0) aller Kerne angefärbt. Beim tumornahen Gewebe waren bei 6 % Dots mehr als 50 % angefärbt (3) und bei 16 % waren weniger als 1 % (0) aller Kerne angefärbt. Beim tumorfernen Gewebe waren noch bei 4 % Dots mehr als 50 % der Kerne angefärbt (3) und bei 27 % waren weniger als 1 % (0) aller Kerne angefärbt. Eine Kernanfärbung von mehr als 50 % (3) war beim benignen Gewebe nicht zu finden, wohingegen eine Kernanfärbung von weniger als 1 % (0) bei 32 % der Dots erkennbar war (s. Abbildung 24).

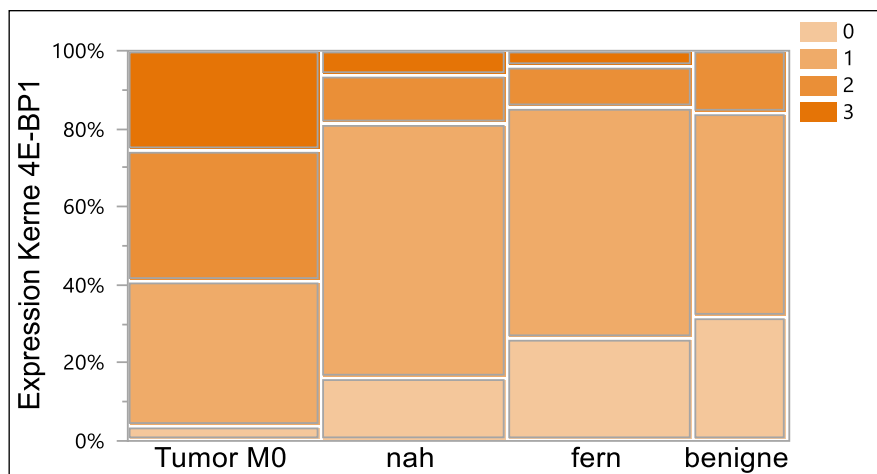


Abbildung 24: Darstellung des prozentualen Anteils der angefärbten Kerne bei 4E-BP1 in PCA M0 Gewebe in Abhängigkeit von der Lokalisation und Expression im benignen Gewebe aus Prostatae ohne malignen Tumor;  $p < 0,0001$

#### IV.4.2 Expression der Parameter in Bezug auf die Diversität unter Berücksichtigung des Gleason-Scores

Als nächstes folgte die Betrachtung der M0 Tumoren separat für low und high Gleason Karzinome. Zu den low Gleason Tumoren (**Tumor M0 LG**) zählten alle PCAs mit einem Gleason-Score von 7b und weniger. Den high Gleason Tumoren (**Tumor M0 HG**) waren dementsprechend alle Karzinome, die einen Gleason-Score von 8 und mehr aufwiesen, zugeordnet.

#### IV.4.2.1 M0 Low Gleason Tumoren

Es zeigte sich hier bei den Parametern ein ähnliches Bild wie bei der Betrachtung aller M0 Tumoren. Lediglich bei p-mTOR/mTOR bestand bei der separaten Betrachtung der low Gleason Tumoren kein signifikanter Unterschied zwischen dem Tumorgewebe und dem benignen Gewebe ( $p = 0,6526$ ). Die Mediane für den Quotienten p-mTOR/mTOR betragen beim low Gleason Tumorgewebe (PCA M0) 1,5 ( $M$ : 1,8), beim low Gleason tumornahen Gewebe 1,4 ( $M$ : 1,6) und beim low Gleason tumorfernen Gewebe 1,4 ( $M$ : 1,6).

Es zeigte sich wie bei der der Betrachtung aller M0 Tumoren, dass beim low Gleason Tumorgewebe insgesamt deutlich mehr Kerne (4E-BP1) angefärbt waren als beim low Gleason tumornahen, low Gleason tumorfernen und benignen Gewebe. Anders als bei der Betrachtung aller M0 Tumoren zeigte sich bei den low Gleason Tumoren jedoch, dass beim tumornahen Gewebe bei weniger Dots (4 %) mehr als 50 % (3) der Kerne angefärbt waren als beim tumorfernen Gewebe (7 %). Die Differenz der Gruppen war mit  $p < 0,0001$  signifikant (s. Abbildung 25).

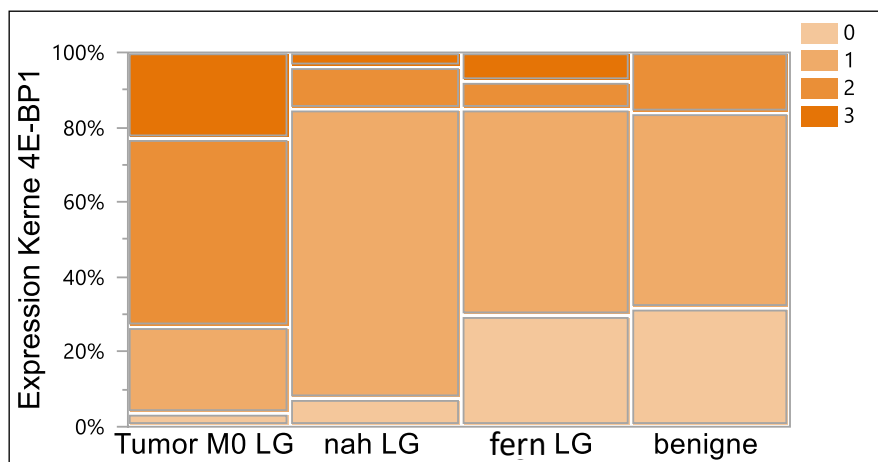


Abbildung 25: Darstellung des prozentualen Anteils der angefärbten Kerne bei 4E-BP1 in PCA M0 low Gleason Tumorgewebe in Abhängigkeit von der Lokalisation und Expression im benignen Gewebe aus Prostatae ohne malignen Tumor;  $p < 0,0001$

#### IV.4.2.2 M0 High Gleason Tumoren

Auch bei der separaten Betrachtung der high Gleason Tumoren zeigte sich bei den Parametern ein ähnliches Bild wie bei der Betrachtung aller organbegrenzten Tumoren. Es ließ sich jedoch bei p-mTOR /mTOR ein signifikanter Unterschied zwischen dem Tumorgewebe und dem benignen Gewebe ( $p = 0,0008$ ), zwischen dem tumornahen und

dem benignen Gewebe ( $p = 0,0358$ ) und zwischen dem tumorfernen und dem benignen Gewebe ( $p = 0,0193$ ) ausmachen. Die medianen Expressionen für p-mTOR/mTOR betragen beim tumorösen Gewebe (PCA M0) 1,1 (M: 1,2), beim tumornahen Gewebe 1,5 (M: 1,5) und beim tumorfernen Gewebe 1,4 (M: 1,4; s. Abbildung 26).

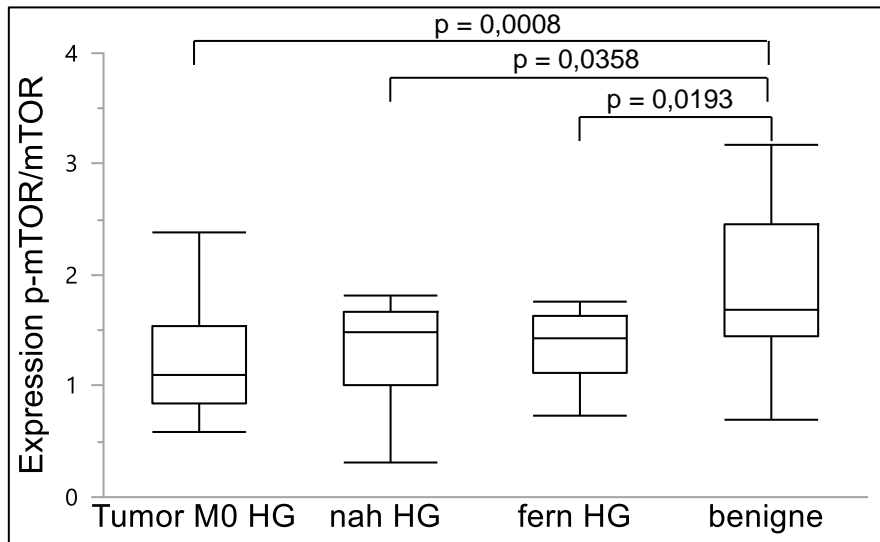


Abbildung 26: Vergleich der Expressionen von p-mTOR/mTOR in PCA M0 high Gleason Tumorgewebe in Abhängigkeit von der Lokalisation und Expression im benignen Gewebe aus Prostatae ohne malignen Tumor

Die Untersuchung der high Gleason Tumoren (M0) ergab anders als die Betrachtung aller M0 Tumoren, dass beim high Gleason tumorfernen Gewebe eine Kernanfärbung von mehr als 50 % (3) bei keinem Dot vorhanden war. Die Differenz der Gruppen war mit  $p = 0,0083$  signifikant (s. Abbildung 27).

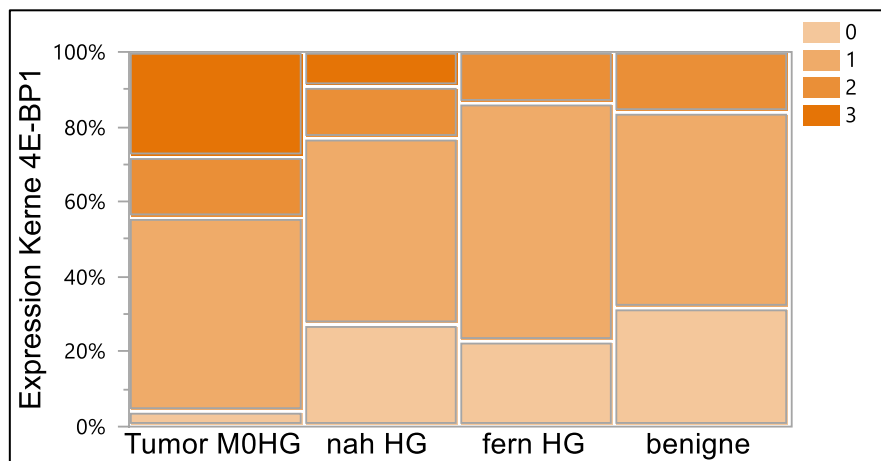


Abbildung 27: Darstellung des prozentualen Anteils der angefärbten Kerne bei 4E-BP1 in PCA M0 high Gleason Tumorgewebe in Abhängigkeit von der Lokalisation und Expression im benignen Gewebe aus Prostatae ohne malignen Tumor;  $p = 0,0083$

## IV.5 Expression der verschiedenen Parameter im Tumorgewebe in Bezug auf patientenindividuelle und klinische Daten

### IV.5.1 Korrelation der Expression der verschiedenen Parameter im Tumorgewebe mit patientenindividuellen Daten

Die gemittelten Expressionen wurden für jeden Parameter unter Berücksichtigung des M-Stadiums mit dem Patientenalter zum Zeitpunkt der OP und dem Tumormarker PSA korreliert und auf Zusammenhang hin überprüft.

#### IV.5.1.1 Expression und Alter innerhalb der organbegrenzten und metastasierten Prostatakarzinome

Eine Korrelation ( $p = 0,0029$ ) konnte bei mTOR beobachtet werden. Hierbei wurde deutlich, dass die mittlere mTOR-Expression eines jeden Patienten mit einem organbegrenzten Prostatakarzinom positiv mit dem Alter zum Zeitpunkt der OP korrelierte ( $r^2 = 0,167$ ; s. Abbildung 28 A). Eine Korrelation ( $p = 0,0008$ ) konnte auch bei dem Quotienten p-mTOR/mTOR beobachtet werden. Es wurde deutlich, dass die p-mTOR/mTOR-Expression eines jeden Patienten mit einem organbegrenzten Prostatakarzinom mit dem Alter zum Zeitpunkt der OP korrelierte ( $r^2 = 0,210$ ; s. Abbildung 28 B).

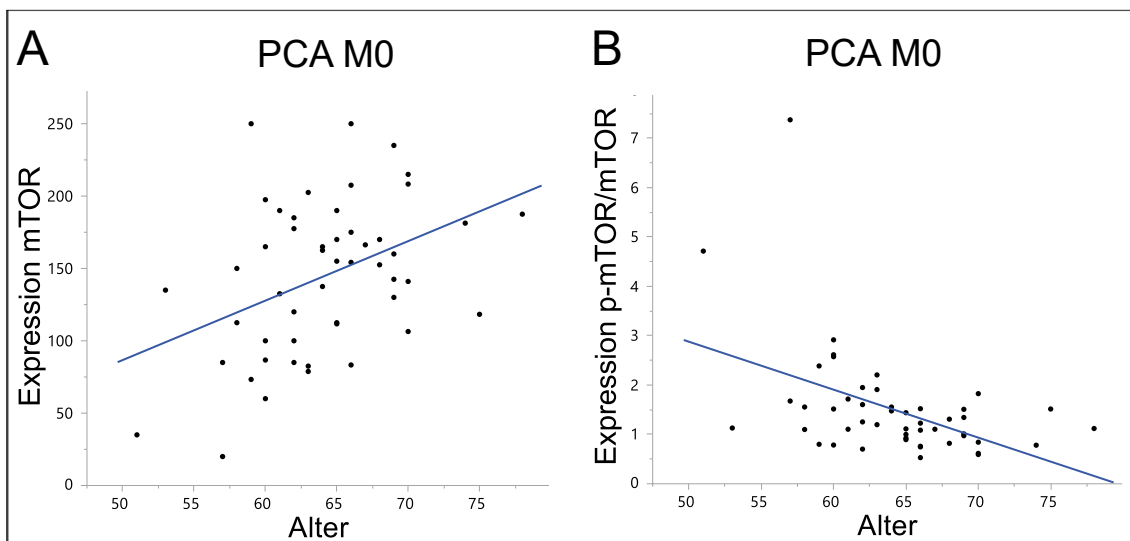


Abbildung 28: Korrelation der Expression von mTOR und p-mTOR/mTOR im Gewebe organbegrenzter Prostatakarzinome (PCA M0) mit dem Alter zum Zeitpunkt der OP (Alter)

Eine Korrelation ( $p = 0,0399$ ) konnte innerhalb der metastasierten Prostatakarzinome bei 4E-BP1 beobachtet werden. Man sah, dass die mittlere 4E-BP1-Expression eines jeden Patienten mit einem metastasierten Prostatakarzinom positiv mit dem Alter zum Zeitpunkt der OP korrelierte ( $r^2 = 0,138$ ; s. Abbildung 29).

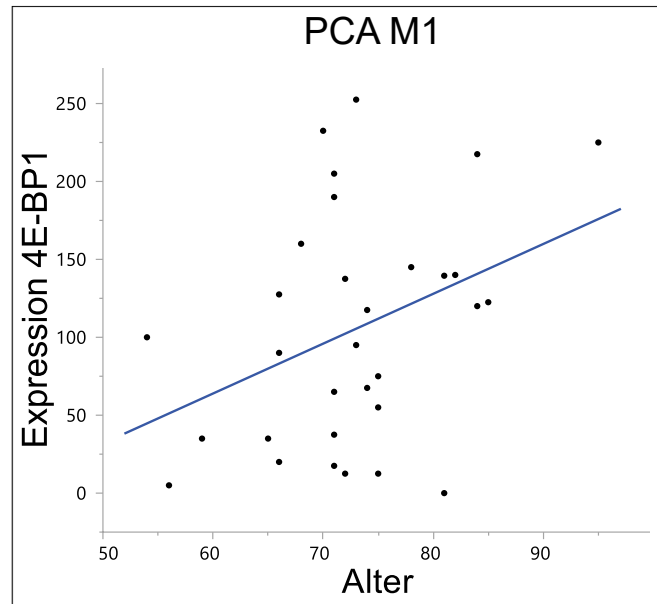


Abbildung 29: Korrelation der Expression von 4E-BP1 im Gewebe metastasierter Prostatakarzinome (PCA M1) mit dem Alter zum Zeitpunkt der OP (Alter)

#### IV.5.1.2 Expression und PSA-Wert innerhalb der organbegrenzten und metastasierten Prostatakarzinome

Signifikant mit dem PSA-Wert korrelierte bei den organbegrenzten Tumoren keiner der untersuchten Proteinparameter.

#### IV.5.2 Expression der verschiedenen Parameter in Bezug auf klinische Daten

##### IV.5.2.1 Expression der Parameter in Abhängigkeit des T-Stadiums der Prostatakarzinome

Hinsichtlich T-Stadium zeigten sich beim Zytoplasma bei p-mTOR/mTOR und 4E-BP1 signifikante Unterschiede (s. Tabelle 11).



Parameter	Median		Mittelwert		p-Wert (T < 3a vs. T ≥ 3a)
	T < 3a	T ≥ 3a	T < 3a	T ≥ 3a	
mTOR	141,0	165,0	135,9	149,7	0,2275
p-mTOR	173,2	155,0	176,5	152,5	0,0966
p-mTOR/mTOR	1,3	1,0	1,6	1,3	0,0455
4E-BP1	205,0	159,2	186,4	139,7	0,0137

Tabelle 11: Mediane, Mittelwerte und p-Werte der untersuchten Parameter im Hinblick auf das T-Stadium der Karzinome

Am gravierendsten zeigte sich der Unterschied für die Kerne bei 4E-BP1. Bei den Tumoren mit niedrigerem T-Stadium (< 3a) waren signifikant mehr Kerne angefärbt ( $p = 0,0068$ ) als bei solchen mit hohem T-Stadium ( $\geq 3a$ ). Der Median der Kernexpression bei den Prostatakarzinomen mit niedrigerem T-Stadium lag bei 2 und bei denen mit hohem T-Stadium bei 1. Bei 30 % aller Gewebedots aus PCAs mit niedrigem T-Stadium (< 3a) waren mehr als 50 % (3) der Kerne angefärbt, wohingegen bei den Gewebedots aus PCAs mit hohem T-Stadium ( $\geq 3a$ ) nur 13 % eine Kernanfärbung von mehr als 50 % (3) zeigten (s. Abbildung 30).

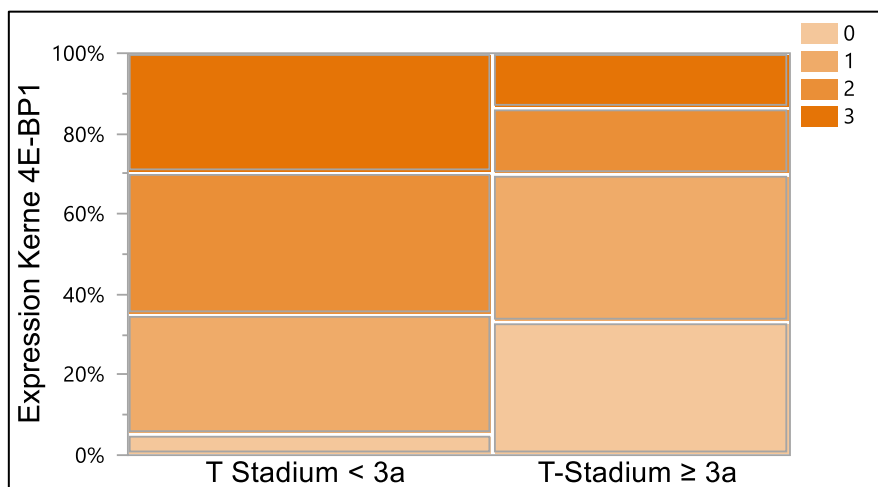


Abbildung 30: Schematische Darstellung des prozentualen Anteils der angefärbten Kerne im Tumorgewebe mit niedrigerem T-Stadium (< 3a) und mit hohem T-Stadium ( $\geq 3a$ ; bei  $n = 67$ ;  $p = 0,0068$ )

#### IV.5.2.2 Expression der Parameter in Abhängigkeit des N-Stadiums

Hinsichtlich N-Stadium zeigten bei den Parametern p-mTOR, p-mTOR/mTOR, 4E-BP1 und den Kernen bei 4E-BP1 signifikante Unterschiede. Tabelle 12 zeigt jeweils die Mediane, Mittelwerte und die p-Werte für alle zytoplasmatischen Expressionen der Parameter hinsichtlich N-Stadium (N0 vs. N1).

Parameter	Median		Mittelwert		p-Wert (N0 vs. N1)
	N0	N1	N0	N1	
mTOR	151,25	157,5	141,61	148,45	0,7470
p-mTOR	173,15	130,65	173,52	135,63	0,0112
p-mTOR/mTOR	1,21	0,88	1,56	1,03	0,0150
4E-BP1	190,9	111,65	181,25	115,16	0,0034

Tabelle 12: Mediane, Mittelwerte und p-Werte der untersuchten Parameter im Hinblick auf das N-Stadium der Karzinome

Bei den Kernen von 4E-BP1 zeigte sich, dass bei 27 % der Dots aus N0 PCAs mehr als 50 % (3) angefärbt waren. Bei Betrachtung der Gewebedots aus N1 PCAs waren bei 11 % mehr als 50 % (3) der Kerne angefärbt (s. Abbildung 31). Bei den N0 Tumoren waren demzufolge signifikant mehr Kerne angefärbt ( $p = 0,0018$ ) als bei den N1 Tumoren. Der Median der Kernexpression bei den N0 Prostatakarzinomen lag bei 2 und bei den Karzinomen mit Lymphmetastasen bei 0,5.

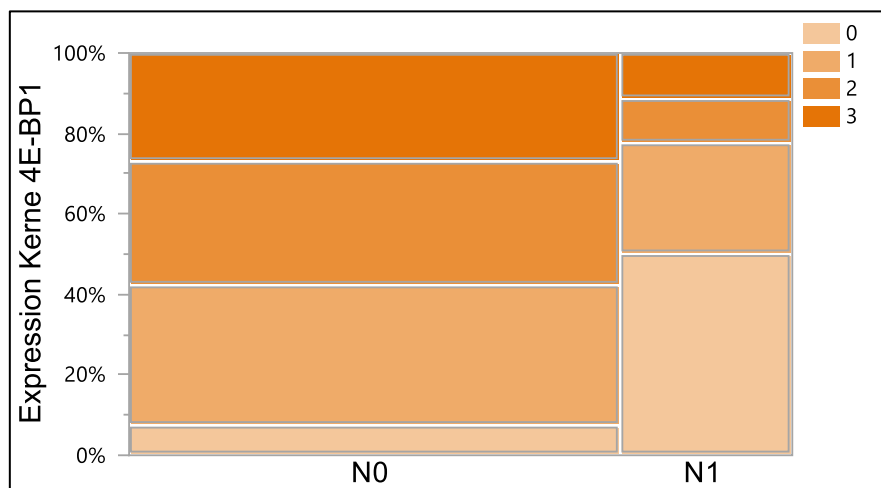


Abbildung 31: Schematische Darstellung des prozentualen Anteils der angefärbten Kerne im N0 und N1 Tumorgewebe (bei  $n = 70$ ;  $p = 0,0018$ )

#### IV.5.2.3 Gleason-Score

Bei der Untersuchung bezüglich des Färbeverhaltens des Gewebes im Hinblick auf den Gleason-Score (GS), wurden das Gewebe aller Tumoren mit niedrigerem GS ( $\leq 7b$ ) mit dem Tumorgewebe aller Karzinome mit hohem GS ( $> 7b$ ) verglichen. Es zeigten sich für p-mTOR/mTOR und 4E-BP1 signifikante Unterschiede (s. Tabelle 13).

Parameter	Median		Mittelwert		p-Wert (GS ≤ 7b vs. GS > 7b)
	GS ≤ 7b	GS > 7b	GS ≤ 7b	GS > 7b	
mTOR	139,3	166,3	132,9	152,1	0,1386
p-mTOR	173,2	155,0	175,4	149,7	0,0693
p-mTOR/mTOR	1,5	0,9	1,9	1,1	0,0021
4E-BP1	206,3	138,5	182,4	140,3	0,0117

Tabelle 13: Mediane, Mittelwerte und p-Werte der untersuchten Parameter im Hinblick auf den Gleason-Score (GS) der Karzinome

Es zeigte sich auch ein signifikanter Unterschied bei den Expressionen der Kerne bei 4E-BP1. Bei den Tumoren mit niedrigerem GS waren signifikant mehr Kerne angefärbt ( $p = 0,0002$ ) als bei solchen mit hohem GS. Der Median der Kernexpression bei den Prostatakarzinomen mit niedrigerem GS lag bei 2 und bei denen mit hohem GS bei 1. Bei 25 % aller Gewebedots aus PCAs mit niedrigem GS waren mehr als 50 % (3) der Kerne angefärbt, wohingegen bei den Gewebedots aus PCAs mit hohem GS nur 16 % eine Kernanfärbung von mehr als 50 % (3) zeigten (s. Abbildung 32).

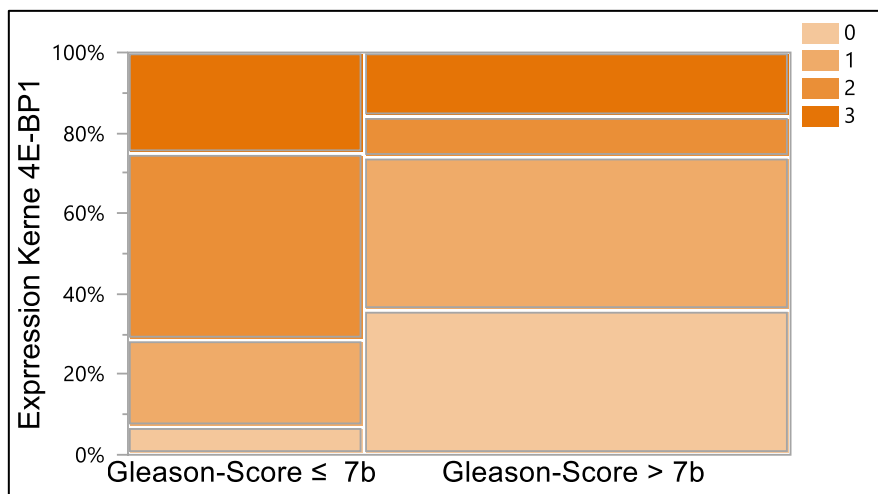


Abbildung 32: Schematische Darstellung des prozentualen Anteils der angefärbten Kerne im Tumorgewebe mit niedrigerem GS ( $\leq 7b$ ) und mit hohem GS ( $> 7b$ ; bei  $n = 78$ ;  $p = 0,0002$ )

#### IV.5.2.4 Ergebnisse der Parameter unter dem Aspekt der Malignität und der Metastasierung

Beim Vergleich des Gewebes aus benignen Prostatas (**ben.**) mit dem Gewebe aus organbegrenzten (**M0**) Tumoren und dem Gewebe metastasierter Tumoren (**M1**) ergaben sich für das zytoplasmatische Färbeverhalten aller Parameter signifikante Unterschiede.

Die nachfolgenden zwei Tabellen fassen die wichtigsten Werte bezüglich Medianen, Mittelwerten (Tabelle 14) und signifikanten p-Werten (Tabelle 15) übersichtlich zusammen.

Parameter	Median			Mittelwert		
	ben.	M0	M1	ben.	M0	M1
mTOR	91,3	152,5	150,0	95,8	144,8	141,7
p-mTOR	177,5	175,0	115,0	171,5	176,3	124,3
p-mTOR/mTOR	1,7	1,2	0,9	2,1	1,5	1,1
4E-BP1	126,7	189,3	100,0	119,6	184,9	105,0

Tabelle 14: Mediane und Mittelwerte der Expressionen der untersuchten Parameter in benignem Gewebe (ben.), in organbegrenzten Tumoren (M0) und in metastasierten Tumoren (M1)

Parameter	p-Wert			bei n=
	ben. vs. M0	ben. vs. M1	M0 vs. M1	
mTOR	0,0009	0,0053		109
p-mTOR		0,0022	<0,0001	107
p-mTOR/mTOR		0,0011		107
4E-BP1	0,0001		<0,0001	107

Tabelle 15: Signifikante Differenzen bei der Betrachtung von benignem Gewebe (ben.), organbegrenzten Tumoren (M0) und metastasierten Tumoren (M1)

Bei der Betrachtung der Kerne bei 4E-BP1 ergab sich folgendes Bild:

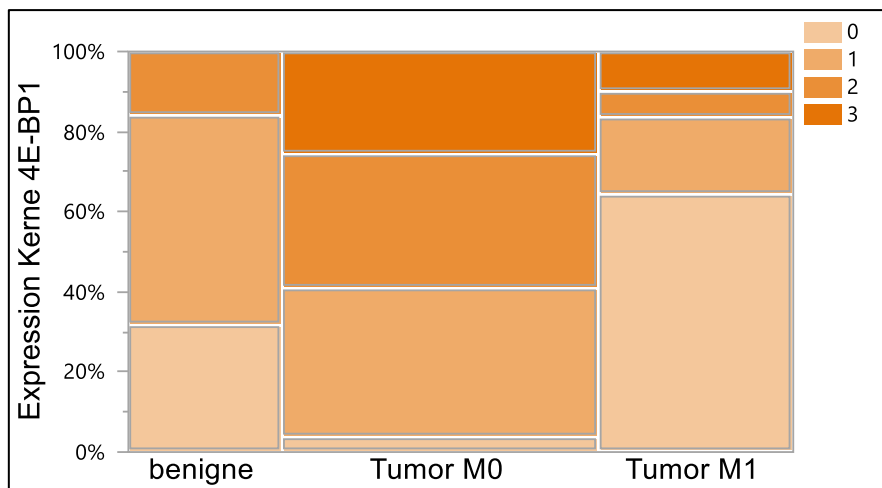


Abbildung 33: Darstellung des prozentualen Anteils der angefärbten Kerne bei 4E-BP1 im benignen Prostatagewebe (benigne), Gewebe organbegrenzter Karzinome (Tumor M0) und im Gewebe metastasierter Karzinome (Tumor M1); bei n = 107, p < 0,0001

Die Medianwerte betragen für die Kerne bei 4E-BP1 beim benignen Gewebe 1, beim Tumorgewebe organbegrenzter Karzinome (M0) 2 und beim Tumorgewebe metastasierter Prostatakarzinome (M1) 0. Die Differenz war mit  $p < 0,0001$  signifikant.

Es zeigte sich, dass beim Gewebe organbegrenzter Karzinome insgesamt deutlich mehr Kerne angefärbt waren als bei den anderen beiden Gewebegruppen. Bei den Dots aus Tumorgewebe organbegrenzter Karzinome zeigte sich eine Kernanfärbung von mehr als 50 % (3) in 25 % der Dots, während eine sehr geringe Zahl an angefärbten Kernen (weniger als 1 %  $\cong$  0) bei 4 % aller Dots vorkam. Bei den metastasierten Tumoren zeigte sich diese Verteilung wie folgt: Bei 10 % waren mehr als 50 % angefärbt (3) und bei 65 % weniger als 1 % (0). Beim benignen Gewebe zeigte sich, dass eine Kernanfärbung von mehr als 50 % (3) nicht zu finden war, während 32 % der Dots eine geringe Anfärbbarkeit der Kerne (weniger als 1 %  $\cong$  0) aufwies.

#### IV.6 Ergebnisse hinsichtlich des Hormonabhängigkeitsstatus der untersuchten metastasierten Tumoren

Bei der Betrachtung der 32 metastasierten Prostatakarzinome ließen sich sowohl bei den gemittelten Expressionen als auch bei den maximalen Expressionen für keinen der untersuchten Parameter signifikante Unterschiede beim Vergleich der Tumoren, die sensitiv auf Hormone reagieren (HS), mit den Tumoren, die kastrationsresistent sind (CR), ausmachen. Bei mTOR, p-mTOR und 4E-BP1 (s. Abbildung 34) ließ sich eine Abnahme der Expression im Gewebe der kastrationsresistenten Karzinome erkennen.

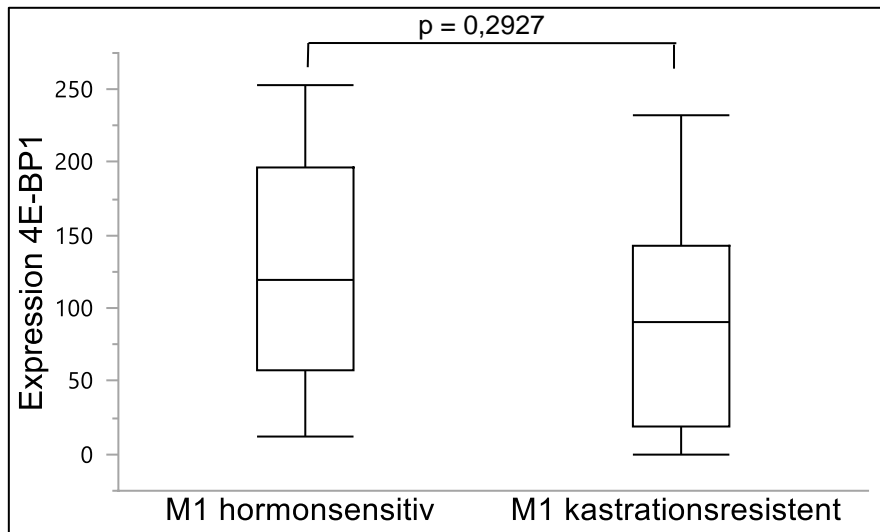


Abbildung 34: Vergleich der Expressionen von 4E-BP1 im Gewebe hormonsensitiver (bei n = 14) und kastrationsresistenter Tumoren (bei n = 17; p = 0,2927)

Auch die Kerne zeigten sich bei 4E-BP1 im Gewebe hormonsensitiver Tumoren etwas vermehrt angefärbt. Bei 57 % aller Gewebedots metastasierter hormonsensitiver Karzinome waren weniger als 1 % (0) aller Kerne angefärbt. Bei 14 % waren 2-10 % (1) der Kerne angefärbt. Bei 7 % waren 11-49 % (2) der Kerne angefärbt und bei 22 % waren mehr als 50 % (3) angefärbt. Die Verteilung zeigte sich bei den Tumordots metastasierter kastrationsresistenter Karzinome wie folgt: Bei 71 % waren weniger als 1 % (0) aller Kerne angefärbt. Bei 23 % waren 2-10 % (1) der Kerne angefärbt. Bei 6 % waren 11-49 % (2) der Kerne angefärbt und dass mehr als 50 % (0) der Kerne angefärbt waren, kam nicht vor (0 %).

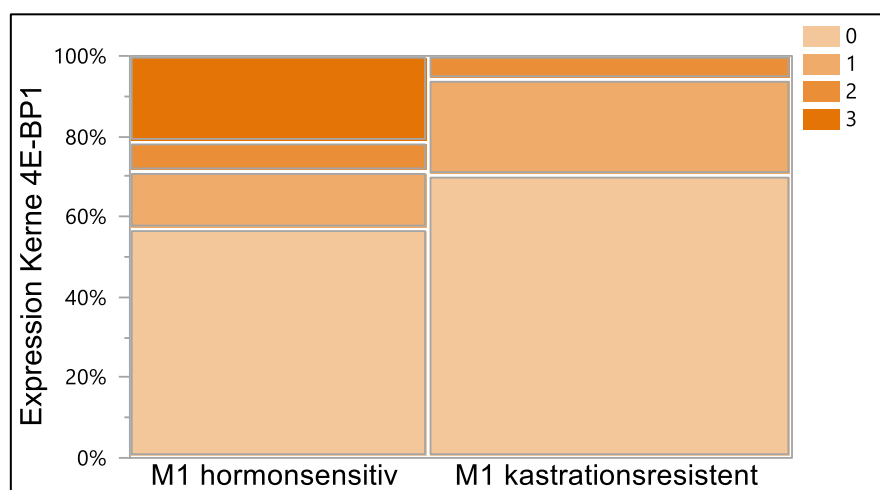


Abbildung 35: Schematische Darstellung des prozentualen Anteils der angefärbten Kerne im Gewebe metastasierter hormonsensitiver Tumoren (bei n = 14) und im Gewebe metastasierter kastrationsresistenter Tumoren (bei n = 17; p = 0,1477)

Es zeigte sich auch hier kein signifikanter Unterschied ( $p = 0,1477$ ) zwischen den Kernexpressionen des Gewebes metastasierter hormonsensitiver Karzinome und metastasierter kastrationsresistenter Karzinome. Der Median lag bei beiden Gewebegruppen bei 0.

Bei dem Quotienten p-mTOR/mTOR hingegen ließ sich beim Gewebe aus kastrationsresistenten Karzinomen im Vergleich zum Gewebe aus hormonsensitiven Tumoren eine geringe Zunahme der Expression erkennen, auch wenn diese ebenfalls nicht signifikant war. Alle relevanten zytoplasmatischen Expressionsergebnisse der untersuchten Proteinparameter und die p-Werte des Vergleichs hormonsensitive Karzinome *versus* kastrationsresistente Karzinome sind in der Tabelle 16 aufgelistet.

Parameter	Median		Mittelwert		p-Wert (HS vs. CR)
	M1 HS	M1 CR	M1 HS	M1 CR	
mTOR	160,7	141,3	152,6	133,2	0,4821
p-mTOR	125,0	100,0	130,3	120,0	0,3364
p-mTOR/mTOR	0,8	0,9	0,9	1,2	0,4005
4E-BP1	120,0	90,0	122,6	90,4	0,2927

Tabelle 16: Mediane, Mittelwerte und p-Werte der untersuchten Parameter im Hinblick auf den Hormonstatus der Karzinome

#### IV.7 Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse - Gegenüberstellung der Gewebegruppen gemäß der Progressionssequenz

Es wurden nachfolgend zusammenfassend die Gewebegruppen gemäß der Progressionssequenz Gewebe aus benignen Prostatae (**ben.**), an Tumor angrenzendes histologisch benignes Gewebe (**angr.**), Gewebe organbegrenzter low Gleason Tumoren (**M0 LG**), Gewebe organbegrenzter high Gleason Tumoren (**M0 HG**), Gewebe metastasierter hormonsensitiver Tumoren (**M1 HS**) und Gewebe metastasierter kastrationsresistenter Tumoren (**M1 CR**) dargestellt.

#### IV.7.1 Gegenüberstellung der mittleren Expressionen entlang der Progressionssequenz

Die Tabelle 17 zeigt alle Mediane und die Tabelle 18 alle Mittelwerte der Expressionen für die Gewebegruppen entlang der Progressionssequenz.

Parameter	Median					
	ben.	angr.	M0 LG	M0 HG	M1 HS	M1 CR
mTOR	91,3	146,7	141,8	166,3	160,7	141,3
p-mTOR	177,5	200,7	174,4	175,0	125,0	100,0
p-mTOR/mTOR	1,7	1,4	1,5	1,1	0,8	0,9
4E-BP1	126,7	99,2	206,3	185,0	120,0	90,0

Tabelle 17: Mediane der mittleren Expressionen der untersuchten Parameter entlang der Progressionssequenz

Parameter	Mittelwert					
	ben.	angr.	M0 LG	M0 HG	M1 HS	M1 CR
mTOR	95,8	145,5	137,5	152,4	152,6	133,2
p-mTOR	171,5	196,4	180,9	171,2	130,3	120,0
p-mTOR/mTOR	2,1	1,5	1,8	1,2	0,9	1,2
4E-BP1	119,6	105,1	187,4	182,3	122,6	90,4

Tabelle 18: Mittelwerte der mittleren Expressionen der untersuchten Parameter entlang der Progressionssequenz

Für mTOR zeigte sich, dass sich die mittlere Expression des high Gleason Tumorgewebes (M0 HG), des Gewebes aus metastasierten hormonsensitiven Tumoren (M1 HS) und des histologisch benignen angrenzenden Gewebes signifikant von dem benignen Gewebe unterschied (s. Abbildung 36). Die mittlere Expression von p-mTOR zeigte eine signifikante Differenz zwischen dem Gewebe aus metastasierten kastrationsresistenten Tumoren (M1 CR) und sowohl dem benignen Gewebe, dem angrenzenden Gewebe, dem low Gleason Tumorgewebe (M0) als auch dem high Gleason Tumorgewebe (M0). Außerdem zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen dem Gewebe aus metastasierten hormonsensitiven Tumoren (M1 HS) und dem angrenzenden Gewebe und zwischen dem low Gleason Tumorgewebe und dem Gewebe aus metastasierten hormonsensitiven Tumoren (M1 HS, s. Abbildung 37).

Bei den gemittelten Expressionen für den Quotienten p-mTOR/mTOR zeigte sich das high Gleason Tumorgewebe, das Gewebe aus metastasierten hormonsensitiven Tumoren



(M1 HS) und das Gewebe aus metastasierten kastrationsresistenten Tumoren (M1 CR) jeweils gegenüber dem benignen Gewebe als statistisch signifikant unterschiedlich. Man erkennt bei der Expression p-mTOR/mTOR ähnlich wie bei p-mTOR eine Abnahme der Expression bei metastasierten Tumoren. Die Expressionsabnahme beginnt bei p-mTOR/mTOR jedoch schon früher in der Sequenz als bei p-mTOR, nämlich bei den organbegrenzten high Gleason Tumoren (s. Abbildung 38).

Die Unterschiede der mittlere Expression zeigte sich bei 4E-BP1 vor allem beim Vergleich des low Gleason Tumorgewebes ( $p < 0,0001$ ) und des high Gleason Tumorgewebes ( $p < 0,0001$ ) jeweils zum Gewebe aus metastasierten kastrationsresistenten Tumoren sehr eindrücklich, aber auch das organbegrenzte low Gleason und high Gleason Tumorgewebe zeigten sich signifikant unterschiedlich zum angrenzenden Gewebe (beide  $p < 0,0001$ ). Alle signifikanten p-Werte sind der Abbildung 39 zu entnehmen.

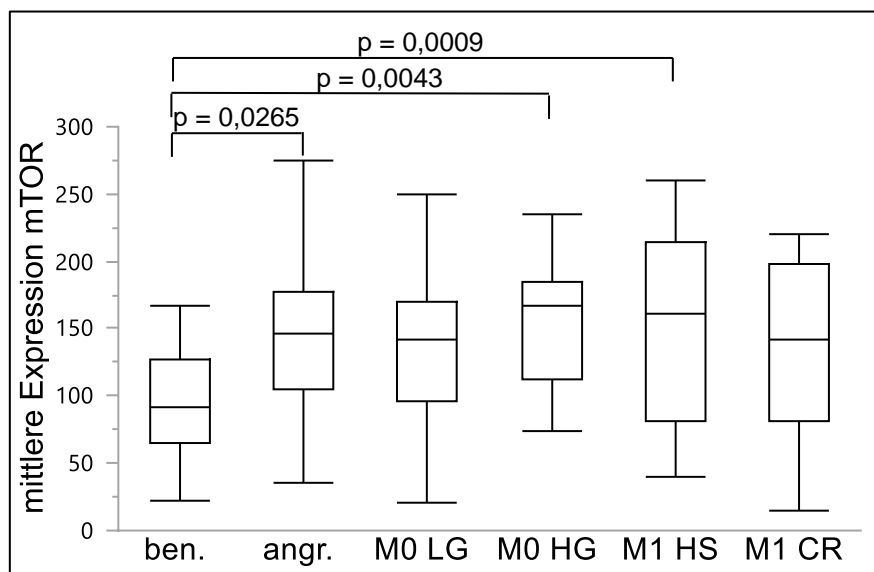


Abbildung 36: Vergleich der gemittelten Expressionen von mTOR entlang der Progressionssequenz, bei  $n = 210$

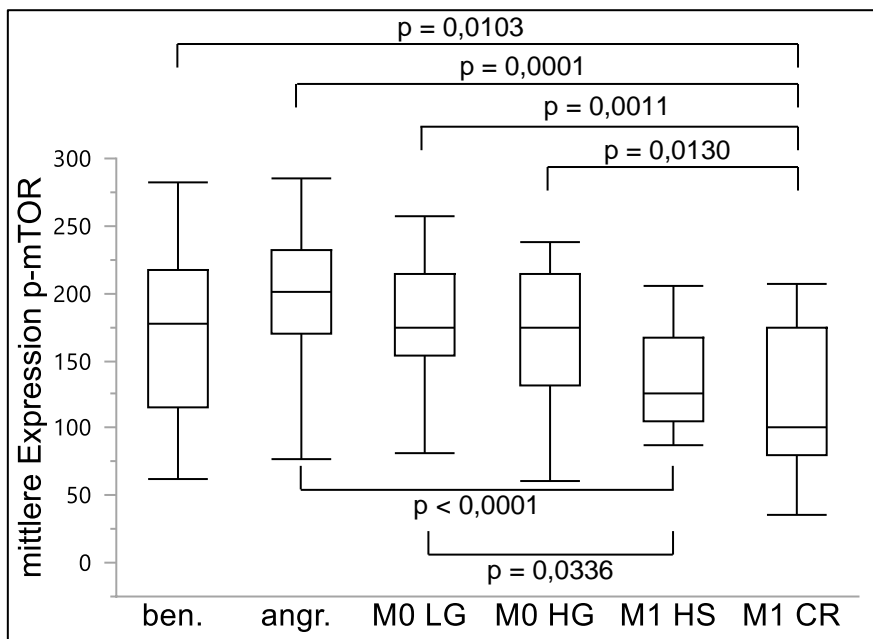


Abbildung 37: Vergleich der gemittelten Expressionen von p-mTOR entlang der Progressionssequenz, bei n = 207

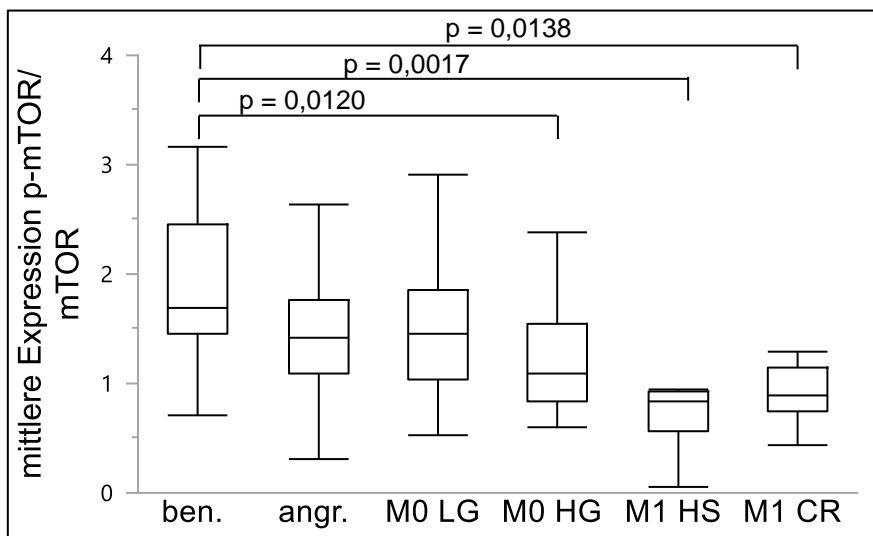


Abbildung 38: Vergleich der gemittelten Expressionen von p-mTOR/mTOR entlang der Progressionssequenz, bei n = 207

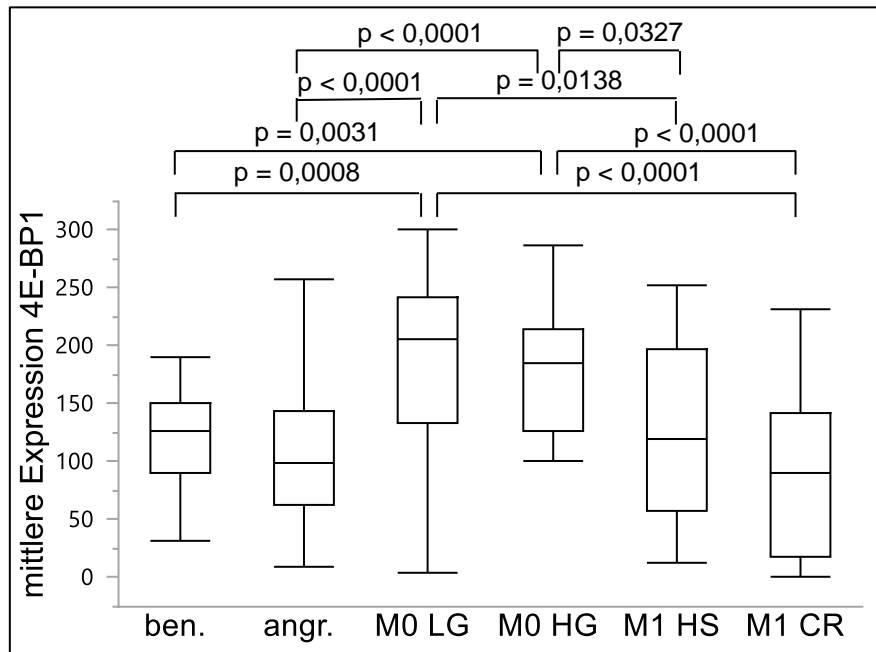


Abbildung 39: Vergleich der gemittelten Expressionen von 4E-BP1 entlang der Progressionssequenz, bei n = 205

#### IV.7.2 Gegenüberstellung der maximalen Expressionen entlang der Progressionssequenz

Die maximale Expression zeigte bei mTOR ähnliche signifikante Unterschiede wie die mittlere Expression. Ein zusätzlich signifikanter Unterschied im Vergleich zur mittleren Expression war zwischen dem organbegrenzten low Gleason Tumorgewebe (Median: 187,5; Mittelwert: 165,6) und dem benignen Gewebe (Median: 107,5; Mittelwert: 109,8) zu beobachten ( $p = 0,0118$ ). Bei der maximalen Expression von p-mTOR fiel auf, dass sich anders als bei der mittleren Expression ein geringer signifikanter Unterschied zwischen dem histologisch benignen an Tumor angrenzenden Gewebe (Median: 232,5; Mittelwert: 226,1) und dem benignen Gewebe (Median: 190,0; Mittelwert: 193,1) erkennen ließ ( $p = 0,0299$ ).

Auch bei p-mTOR ließ sich ein signifikanter Unterschied zwischen dem an Tumor angrenzenden Gewebe (Median: 1,3; Mittelwert: 1,4) und dem benignen Gewebe (Median: 1,7; Mittelwert: 2,1) erkennen ( $p = 0,0054$ ).

Bei der maximalen Expression von 4E-BP1 zeigte sich ebenfalls ein sehr ähnliches Bild wie bei der mittleren Expression. Auch hier zeigt sich wie bei der mittleren Expression ein signifikanter Unterschied zwischen dem organbegrenzten Gewebe (low Gleason: Median: 227,5; Mittelwert: 211,9; high Gleason: Median: 220,0; Mittelwert: 204,8) und

dem Gewebe aus metastasierten kastrationsresistenten Tumoren (Median: 135,0; Mittelwert: 119,1; low Gleason:  $p = 0,0001$ ; high Gleason:  $p = 0,0006$ ).

#### IV.7.3 Gegenüberstellung der Expression von 4E-BP1 unter Beachtung der zellulären Lokalisation entlang der Progressionssequenz

Es zeigte sich, dass beim low und high Gleason Tumorgewebe mehr Kerne angefärbt waren als bei den anderen Gewebegruppen. Mehr als 50 % (3) der Kerne waren im benignen Gewebe nicht angefärbt, bei 32 % waren weniger als 1 % (0) aller Kerne angefärbt (Median: 1). Beim angrenzenden Gewebe war eine Kernanfärbung von mehr als 50 % bei 5 % der Dots erkennbar und eine Kernanfärbung von weniger als 1 % bei 21 % (Median: 1). Bei den Dots aus organbegrenztem low Gleason Tumorgewebe zeigte sich, dass bei 23 % mehr als 50 % der Kerne angefärbt waren und bei 4 % weniger als 1 % (Median: 2). Beim high Gleason Tumorgewebe zeigte sich die Verteilung ähnlich: Bei 28 % der Dots waren mehr als 50 % der Kerne angefärbt und bei 4 % weniger als 1 % (Median: 1). Bei 21 % aller Gewebedots aus metastasierten hormonsensitiven Tumoren waren mehr als 50 % (0) aller Kerne angefärbt und bei 57 % waren weniger als 1 % (0) angefärbt (Median: 0). Beim Gewebe aus metastasierten kastrationsresistenten Karzinomen zeigte sich, dass bei keiner Probe (0 %) mehr als 50 % der Kerne angefärbt waren. Bei 71% der Proben waren weniger als 1 % aller Kerne angefärbt (Median: 0). Die Unterschiede zwischen den fünf Gruppen erwies sich als signifikant ( $p < 0,0001$ , s. Abbildung 40).

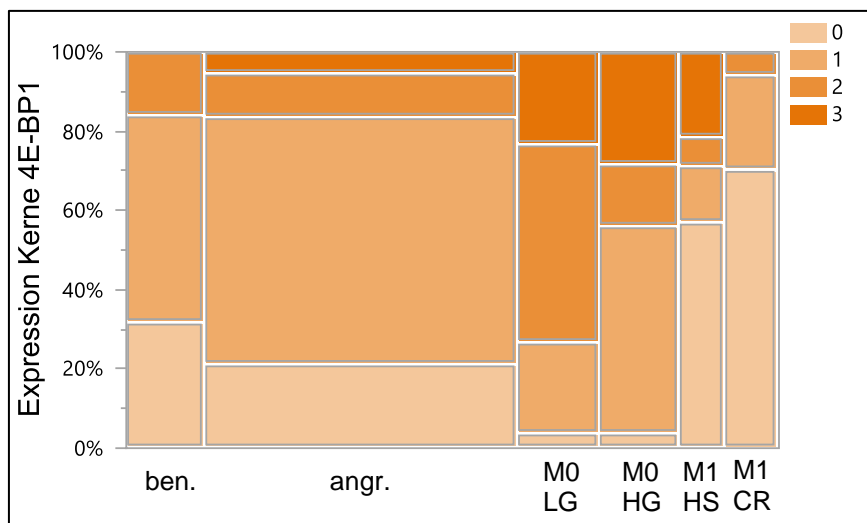


Abbildung 40: Darstellung des prozentualen Anteils der angefärbten Kerne bei 4E-BP1 entlang der Progressionssequenz, bei  $n = 205$ ;  $p < 0,0001$

## V. Diskussion

Der zu diskutierende thematische Schwerpunkt dieser Arbeit war die Frage nach der Expression und Rolle der dem mTOR-Signalweg zugehörigen Proteinparameter mTOR, p-mTOR und 4E-BP1 im Hinblick auf die Progression des Prostatakarzinoms.

Die Bedeutung des mTOR-Signalwegs bezüglich der Entstehung verschiedener Tumoren insbesondere des PCAs wurde in zahlreichen Studien eingehend beleuchtet. Wie sich der Signalweg aber entlang einer Progressionssequenz im direkten Vergleich von benignem Gewebe, von Gewebe tumorumgebender Areale, von Gewebe organbegrenzter Tumoren und Gewebe metastasierter hormonsensitiver und kastrationsresistenter Tumoren verhält, wurde in der Forschung des PCA bisher noch nicht genauer untersucht.

Wie sich die Markerexpressionen im Tumorgewebe und in dem Tumor angrenzenden histologisch benignen Gewebe verhalten und in wieweit man die Erkenntnisse für diagnostische Aussagen nutzen könnte, wurde in der vorliegenden Arbeit betrachtet. Ebenso wurde die Frage nach der prognostischen Bedeutung für die Marker besonders vor dem Hintergrund einer möglichen Übertherapie erörtert. Im Fokus dieser Arbeit stand jedoch das Gewebe fortgeschrittener PCAs. Gerade im Hinblick auf PCAs im metastasierten Stadium liegen bisher wenig Daten über molekulare Veränderungen der involvierten Signalwege vor. (Haffner et al. 2013) Auch ist unklar, inwieweit eine Inhibition des mTOR-Signalwegs die Metastasierung des Tumors verhindern kann und bis zu welchem Stadium der Erkrankung das Eingreifen in den Signalweg aus molekularbiologischer Sicht sinnvoll ist. Hierfür lieferten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit eindruckliche Antworten.

Einen klinischen Wendepunkt stellt zudem das Fortschreiten vom metastasierten hormonsensiblen hin zum hormonrefraktären PCA dar. (Talesa et al. 2017) Da das klinische Management für dieses nichtheilbare Stadium der Erkrankung bisher an seine Grenzen stößt, werden dringend neue Therapieansätze benötigt, die ein längeres Überleben generieren können. Die Arbeit untersuchte deshalb die Frage nach der möglichen Wirksamkeit einer Therapie mittels mTOR-Inhibition im hormonrefraktären Stadium.

Ein weiterer Fokus der Arbeit lag auf der Frage nach der zellulären Lokalisation der

Aktivierung des Signalweges. In verschiedenen Studien wurde bereits erkannt, dass die Antikörper mTOR und p-mTOR in unterschiedlichen Kompartimenten der Zelle verstärkt exprimiert wurden. (Zhang et al. 2002, Kremer et al. 2006, Giguere 2018) In der vorliegenden Arbeit ließ sich dies für die Kerne und das Zytoplasma bei 4E-BP1 ausmachen, was bis dato ein Novum darstellte.

Die Auswertung der vorliegenden Arbeit zeigte signifikante Ergebnisse, die in diesem Teil eingehend diskutiert werden sollen.

## V.1 Expressionen der untersuchten Parameter im benignen und tumorösen Gewebe

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten, dass die Expression von mTOR im Gewebe der Tumoren höher war als im benignen Gewebe. Ähnliche Beobachtungen konnten auch Kremer et al. machen, die ebenfalls mittels Immunhistochemie PCA-Gewebe und benignes Prostatagewebe analysierten. In den untersuchten PCA-Gewebeproben war die mTOR-Expression doppelt so hoch wie die im benignen Gewebe. Ebenso konnte im PIN-Gewebe eine mTOR-Überexpression bemerkt werden, die jedoch geringer war als die im malignen Tumorgewebe (Kremer et al. 2006). Eine Hochregulation von mTOR im PCA wurde auch von Morgan et al. beschrieben. In 30-50 % der PCAs konnte eine vermehrte Expression beobachtet werden. In den meisten Fällen war die Überexpression an den Verlust des Tumorsuppressors PTEN gekoppelt. (Morgan et al. 2009) Bei Schanz wurde ebenfalls deutlich, dass mTOR im Tumorzentrum stärkere Expressionen zeigte als im benignen Prostatagewebe. (Schanz 2014) Auch Jendrossek et al. erkannten eine erhöhte mTOR- Expression beim PCA. (Jendrossek et al. 2008)

p-mTOR zeigte in der vorliegenden Arbeit anders als mTOR eine signifikant geringere Expression im Tumorgewebe als im benignen Gewebe ( $p < 0,0001$ ). Dieses Ergebnis deckt sich mit den Ergebnissen von Müller et al. Unter Verwendung des gleichen p-mTOR-Antikörpers zeigte sich hier eine verringerte p-mTOR-Expression sowohl in der Membran als auch im Zytoplasma der Tumorzellen bei 29 % der Gewebedots. Ein kompletter Verlust der Expression war bei 24 % der untersuchten PCA -Gewebeproben ersichtlich. (Müller et al. 2013) Auch bei Evren et al. war eine Abnahme der p-mTOR-Expression im high-grade PIN-Gewebe hin zu High-Grade-Tumoren ersichtlich. (Evren

et al. 2010) Bei Kremer et al. zeigte sich ein uneinheitliches Bild: Beim Vergleich des Tumorgewebes mit dem Normalgewebe war eine erhöhte p-mTOR-Expression im Zytoplasma der Tumorzellen zu erkennen, die Membranen der Tumorzellen zeigten jedoch eine geringere Expression als die der benignen Drüsenzellen. (Kremer et al. 2006) Auf der anderen Seite existieren einige Studien, die eindeutig aussagten, dass p-mTOR im Tumorgewebe verglichen mit Normalgewebe verstärkte Expressionen aufwies: Bei Dai et al. beispielsweise erkannte man höhere p-mTOR-Expressionen beim untersuchten PCA-Gewebe verglichen mit Gewebeproben aus 20 Prostatae mit BPH (Dai et al. 2009) und bei Jendrossek et al. hatte fast die Hälfte der PCA-Proben eine erhöhte p-mTOR Expression. (Jendrossek et al. 2008) Auch Sutherland et al. konnten einen p-mTOR-Expressionsanstieg von benignem Gewebe über high-grade PIN hin zu Tumorgewebe erkennen. (Sutherland et al. 2014) Eine vermehrte Phosphorylierung von mTOR zeigte sich ferner nicht nur beim PCA sondern auch bei anderen Tumoren wie dem Ovarialkarzinom. (Altomare et al. 2004) Diese offensichtlich konträre Studienlage im Hinblick auf die p-mTOR-Expression könnte auf der Tatsache beruhen, dass in den verschiedenen Studien grundsätzlich andere Patientenkollektive untersucht wurden, die sich in ihrer ethnische Herkunft und zahlreichen weiteren Faktoren unterscheiden. Eine andere mögliche Erklärung für die Diskrepanzen wäre die Methode, mit der die Expression des Proteinparameters ausgewertet wurde, wobei der subjektive Aspekt einer Bewertung der Färbeintensität mit den Augen eine Rolle spielt. Ein weiterer Punkt, der kritisch betrachtet werden sollte, ist die Definition des benignen Gewebes in den verschiedenen Publikationen. In der vorliegenden Arbeit wurde das Tumorgewebe mit dem die Tumoren angrenzenden histologisch benignen Gewebe und dem Gewebe benigner Prostatae, die überwiegend aus BPHs stammten, verglichen. Aus histopathologischer Sicht ist dies sinnvoll, jedoch könnte eine molekularbiologisch stattgefundenen Veränderung des Gewebes sowohl aus den tumorumgebenden Bereichen als auch aus den BPH-Geweben die Ergebnisse beeinflusst haben. Prostatae ohne Anzeichen auf pathologische Veränderungen wurden in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht.

Auch der Aktivierungsstatus von mTOR (p-mTOR/mTOR) zeigte in der vorliegenden Arbeit eine signifikant geringere Expression im malignen im Vergleich zum benignen Gewebe ( $p < 0,0001$ ). Bei Kruck et al. wurde für das Nierenzellkarzinom das Gegenteil

gezeigt: Der Quotient von p-mTOR/mTOR wies im Tumorgewebe eine stärkere Expression auf als im benignen Gewebe. (Kruck et al. 2010) Schanz konnte im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit auch eine Expressionssteigerung des Aktivierungsstatus beim PCA im Vergleich zum benignen Prostatagewebe feststellen. (Schanz 2014) Dabei stellte Schanz das Tumorgewebe dem histologisch benignen den Tumor umgebenden Gewebe gegenüber. Das bei Schanz untersuchte Gewebe stammte aus benignen Arealen 0-10 mm vom Tumor entfernt und aus dem am weitesten vom Tumor entfernten Ort, wohingegen in der vorliegenden Arbeit lediglich die 0- mind. 10 mm vom Tumor entfernten benignen Bereiche untersucht wurden. Somit könnte man vermuten, dass die unterschiedlichen Ergebnisse der Studie im Vergleich zu der vorliegenden auf der Entfernung des entnommenen benignen Gewebes zum Tumorgewebe beruhen und molekulare Veränderungen, die bereits mit dem Tumor assoziiert sind, im bis zu 1 cm vom Tumor entfernten benignen Gewebe das Ergebnis der vorliegenden Arbeit beeinflusst haben.

In der vorliegenden Arbeit wurde deutlich, dass die Expression von 4E-BP1 im Zytoplasma des malignen Drüsengewebes signifikant höher war als im benignen Prostatagewebe. Diese Beobachtung deckt sich mit der Literatur: Bei Kremer et al. war eine erhöhte 4E-BP1-Expression bei 100 % der Gewebeproben aus PCA zu finden (Kremer et al. 2006). Auch Jendrossek et al. erkannten eine erhöhte Expression des Translationsinhibitors im PCA-Gewebe. (Jendrossek et al. 2008) Nicht nur eine 4E-BP1-Überexpression, sondern auch eine vermehrte Expression von eIF4E konnte in früheren Studien beobachtet werden. (De Benedetti & Graff 2004, Graff et al. 2009) Anders als beim PCA konnte beim Kardiakarzinom hingegen eine signifikant verminderte Expression von 4E-BP1 verglichen mit normalem Gewebe ausgemacht werden, während eine Überexpression von p-4E-BP1 im Tumorgewebe zu erkennen war. (Yang et al. 2013) In der vorliegenden Arbeit zeigte sich ähnlich der erhöhten zytoplasmatischen Expression von 4E-BP1 im Tumorgewebe, dass im tumorösen Gewebe signifikant mehr Kerne angefärbt waren als im benignen Gewebe. Vergleichbare immunhistochemische Untersuchungen zur zellulären Lokalisation von 4E-BP1 beim PCA fehlen. Für die phosphorylierte Form von 4E-BP1 konnte jedoch im Gewebe von Mammakarzinomen gezeigt werden, dass der phosphorylierte Translationsinhibitor sowohl im Zytoplasma als auch im Kern stark exprimiert war. (Ma et al. 2015) Eine Studie zum Ameloblastom



untersuchte ebenfalls die zelluläre Lokalisation von p-4E-BP1: Bei 23 Patienten (27 %) war eine Expression im Kern des untersuchten Gewebes und bei 55 (64,7 %) im Zytoplasma sichtbar. (Li et al. 2012)

### V.1.1 Die Bedeutung bei der Tumorentstehung

Die Bedeutung des intakten mTOR- Signalwegs bei der Tumorentstehung wurde in letzter Zeit zunehmend beleuchtet. Bei Versuchen mit Mäusen, die durch den Verlust von PTEN ein PCA entwickeln sollten, erkannte man, dass das Ausschalten des mTOR-Signalwegs zum Teil die Tumorentstehung in der Prostata inhibieren konnte. (Nardella et al. 2009) Dass Rictor als Bestandteil des mTOR-Komplex 2 Voraussetzung für die Entstehung von PCAs bei Mäusen ohne PTEN ist, stellte Guertin 2009 mittels Immunhistochemie fest. (Guertin et al. 2009)

Auch 4E-BP1 scheint eine entscheidende Rolle bei der Tumorentstehung zu spielen. Downstream von mTOR fungiert unphosphoryliertes 4E-BP1 als inhibierender Regulator der mRNA-Translation, indem es an den eukaryotischen Translations-Initiationsfaktor 4E (eIF4E) bindet. Bei der Phosphorylierung von 4E-BP1 dissoziiert das Protein und die cap-abhängige Translation kann durch den Initiationsfaktor begonnen werden. Somit trägt 4E-BP1 zur Regulation des Zellwachstums und Kontrolle des Zellzyklus bei. (Fingar et al. 2004) Vor diesem Hintergrund könnte man annehmen, dass die Hochregulation von 4E-BP1 im Prostatakarzinom wie in der vorliegenden Arbeit gesehen als Antwort auf eine vermehrte Expression von eIF4E zum Schutz vor einer molekularen Dysregulation und einer eventuell damit verbundenen malignen Veränderung des Gewebes dient. Das würde auch die Beobachtungen der Studie von Hsieh et al. erklären: Auf Basis von mRNA-Untersuchungen an einer humanen PCA-Zelllinie, die eine Doxycyclin-induzierbare dominant-negative Mutante von 4E-BP1 exprimiert, erkannte man, dass eine verstärkte 4E-BP1-Expression in einer signifikanten Abnahme der Invasion von PCA-Zellen resultierte. (Hsieh et al. 2012) Eine weitere Studie konnte demonstrieren, dass Patienten mit PCA länger lebten, wenn vermehrt 4E-BP1 vorhanden war, was ebenfalls eine protektive Eigenschaft des Translationsinhibitors vermuten lässt. (Graff et al. 2009) Neuere Studien bestätigen diese Theorie ebenso: Ding et al. zeigten 2018, dass bei Mäusen mit PTEN-Verlust und einer damit einhergehenden PCA-Entstehung eine

genetische Deletion sowohl von 4E-BP1 als auch 4E-BP2 alle Phasen der Tumorentstehung signifikant beschleunigen konnte. (Ding et al. 2018)

## V.2 Diversität im Prostataraum lokal begrenzter Karzinome - Betrachtung des dem Tumor angrenzenden Gewebes

Bei der Betrachtung der Prostatae, die mittels RPE entfernt worden waren und ein organbegrenzt PCA (M0) aufwiesen, wurden sowohl Stenzen aus dem Tumorgewebe, als auch aus dem angrenzenden benignen Gewebe entnommen. Zum einen wurde 0-5 mm vom Tumor entfernt gestanzt („nah“) und zum anderen mindestens 10 mm vom Tumor entfernt („fern“). Als Referenz wurde das Gewebe aus den 26 benignen Prostatae hinzugenommen. Das angrenzende Gewebe musste durch einen erfahrenen Pathologen als histologisch eindeutig benigne verifiziert werden, ansonsten wurde es nicht in die Auswertung einbezogen.

In anderen Studien zum PCA wurde oft kein Unterschied zwischen dem angrenzenden Gewebe, das sich in unmittelbarer Nähe des Tumors befindet und dem angrenzenden Gewebe, das sich in einem größeren Abstand vom Tumor befindet, gemacht. Somit erfolgte die Betrachtung des angrenzenden Gewebes in toto. (Rubin et al. 2002, Ozen et al. 2008) Dass das tumorumgebende Gewebe in Bezug auf die Konsistenz vom Tumorgewebe der Prostata abgrenzbar ist, zeigt eine Studie von Hoyt et al. Es wurde festgestellt, dass sich das Tumorgewebe als signifikant fester darstellte als das umgebende mikroskopisch benigne Gewebe. (Hoyt et al. 2008) Mittels TMA und Immunhistochemie konnte Merseburger für PTEN, p-Akt und p27<sup>Kip1</sup> (cyclin-dependent kinase inhibitor 1B) im an Tumor angrenzenden, aber histologisch benignen Gewebe erhöhte Expressionen der Parameter verglichen mit Gewebe benigner Prostatae finden. p-Akt und p27<sup>Kip1</sup> zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen dem angrenzenden und dem malignen Gewebe. Bei PTEN erkannte man allerdings im Tumorgewebe eine verringerte Expression des Markers und die höchste Expression in den angrenzenden Zonen. (Merseburger et al. 2006)

Bei Schanz, der ebenfalls mTOR, p-mTOR und 4E-BP1 untersuchte und wie in der vorliegenden Arbeit innerhalb des benignen Gewebes unter anderem zwischen benignem nah an Tumor angrenzendem (5 mm) und benignem weiter vom Tumor entferntem (10

mm) differenzierte, zeigte sich für alle drei Parameter, dass ein Expressionsanstieg von 10 mm vom Tumor entfernten Gewebe über das 5 mm entfernte hin zum Tumorgewebe erkennbar war. (Schanz 2014) Derartige Expressionsunterschiede innerhalb des angrenzenden Gewebes konnte die vorliegende Arbeit für mTOR und seinen Aktivierungsstatus nicht bestätigen. Bei mTOR wurde deutlich, dass die Expressionen im Tumorgewebe und im angrenzenden Gewebe („nah“ und „fern“) annähernd gleich hoch waren. Im Gewebe aus Prostatae ohne malignen Tumor war die Expression signifikant geringer. Beim Aktivierungsstatus konnte man ebenfalls sehen, dass die Expressionen sowohl im Tumorgewebe als auch im angrenzenden Gewebe („nah“ und „fern“) ähnlich waren. Im Gewebe der benignen Prostatae war die Expression höher. Bei der separaten Betrachtung der high Gleason Tumoren war erkennbar, dass das benigne Gewebe signifikant höhere Expressionen aufwies als die Gewebegruppen aus den tumortragenden Prostatae. Diese Expressionsbeobachtungen weisen darauf hin, dass das angrenzende Gewebe zwar morphologisch benigne scheint, aber auf molekularer Ebene bereits so starke Veränderungen in Richtung Tumor aufweist, dass eine konsequente Abgrenzung vom Tumorgewebe mittels der Parameter schwierig ist.

Diese Beobachtungen könnten für die Definition des R-Status von Bedeutung sein. Der chirurgische R-Status ist für die prognostische Evaluation neben dem Gleason-Grading und dem TNM- Status wichtig. Der histologische Nachweis von Tumorgewebe im Absetzungsrand (R1) ist mit einer erhöhten Rate an Tumorrezidiven verbunden. (Swindle et al. 2005, Vis et al. 2006, Krebsgesellschaft & Deutsche Krebshilfe 2016) Wenn ein mikroskopisch positiver Schnitttrand mit einem Gleason-Score von 7-10 verbunden war oder bereits eine Invasion in Lymphknoten stattgefunden hat, zeigte sich das höchste Risiko für ein biochemisches Rezidiv nach RPE. (Karakiewicz et al. 2005) Vor dem Hintergrund der Ergebnisse dieser Studie stellt sich die Frage, ob die Definition von R0 innerhalb der R-Klassifikation überdacht werden müsste und über die Standard-Histologie hinaus eine Anfärbung der Resektate mit mTOR und p-mTOR sinnvoll wäre, damit molekular verändertes Gewebe angrenzend an den Tumor erkannt und eine bessere prognostische Aussage getroffen werden kann. Zusätzlicher Aufwand und erhebliche Kosten der Methode müssten allerdings durch den positiven Effekt einer möglicherweise genaueren prognostischen Einschätzung gerechtfertigt werden. Um die Frage nach dem

prognostischen Stellenwert der Marker in Bezug auf den R-Status genauer zu beleuchten, müssten weitere Studien durchgeführt werden.

Weiter könnten die Marker bei transurethralen Resektionen der Prostata zur Detektion von möglichen Malignomen zum Einsatz kommen. Man muss bedenken, dass bei der transurethralen Resektion nur Gewebe der BPH, das heißt aus der Übergangszone, entnommen und untersucht wird. Die periphere Zone als Sitz der häufigsten Prostatakarzinome verbleibt trotz radikaler Entfernung der BPH. Hier können sich erneut Tumoren bilden oder noch Ausläufer des bei der transurethralen Resektion entfernten Tumors befinden. (Hautmann & Gschwend 2014) So könnte man das morphologisch benigne BPH-Gewebe mittels IHC untersuchen und erhöhte Marker-Expressionen könnten auf einen Tumor in der peripheren Zone hinweisen. Das in dieser Studie untersuchte benigne Gewebe zeigte für mTOR und p-mTOR im Vergleich zum malignomtragenden Gewebe deutliche Expressionsunterschiede. Wenn der Ansatz stimmt, könnte man annehmen, dass Patienten mit BPH keinen weiteren Tumor in der peripheren Zone aufweisen. Um das zu beweisen, fehlte in dieser Studie die Möglichkeit, da bei den TURPs nicht die periphere Zone entfernt wurde.

Für 4E-BP1 zeigte sich anders als bei den anderen Markern eine deutliche Abgrenzung des angrenzenden Gewebes zum malignen Gewebe. Das maligne Gewebe wies eine hohe Expression auf, während das angrenzende Gewebe („nah“ und „fern“) eine signifikant niedrigere Expression zeigte. Die Kernexpression bei 4E-BP1 ließ erkennen, dass die Zahl der angefärbten Kerne vom Tumorgewebe hin zum Gewebe der benignen Prostatae abnahm. Diese Expressionsunterschiede könnte man sich bei knappen R0-Resektionen zu Nutze machen. Für das Adenokarzinom des Pankreas konnte gezeigt werden, dass Patienten, die eine R1-Resektion erhielten, länger überlebten verglichen mit Patienten mit lokal fortgeschrittenem nicht mehr resezierbarem Karzinom. R0-Resektionen führten zu einem längeren Überleben verglichen mit R1-Resektionen. Jedoch konnte man sehen, dass dieser Überlebensvorteil verloren ging, wenn der Tumor nur 1 mm Abstand zum Resektionsrand aufwies, auch wenn keine direkte Beteiligung des Randes bestand. (Konstantinidis et al. 2013) Da 4E-BP1 in der vorliegenden Arbeit gut zwischen Tumor und benignem angrenzenden Gewebe differenzierte, könnte man eventuell bei Tumoren,

die mit sehr geringem Abstand zum morphologisch benignen Gewebe reseziert worden sind, durch eine Färbung mit 4E-BP1 die Prognose besser bewerten.

### V.2.1 Diagnostische Implikationen

Die mittels der Marker erkennbaren Veränderungen im umgebenden Gewebe der Prostatatumoren könnten auch für die Diagnostik im Sinne einer Verwendung bei der histologischen Untersuchung von Biopsiegewebe bedeutsam sein. So wären eventuell frühe Läsionen, bei denen sich bereits Veränderungen bemerkbar machen, die mit der konventionellen Histologie nicht erkennbar sind, besser detektierbar, und vor allem jüngere Patienten mit Vorläuferläsionen könnten profitieren. Allerdings muss hier die Gefahr der Übertherapie bedacht werden. So bestünde die Gefahr, dass vermehrt Tumoren diagnostiziert und therapiert werden, die zeitlebens nicht zu einer Symptomatik führen würden.

Ein weiterer diagnostischer Nutzen der Marker könnte in Bezug auf das Wiederholen von Biopsien bestehen. Komplikationen wie Infektionen nach Prostatabiopsie dürfen nicht unterschätzt werden (Loeb et al. 2011), weshalb eine mehrfache Biopsie möglichst vermieden werden sollte. Die Entscheidung, dem Patienten eine Nachbiopsie zu empfehlen, muss davon abhängig gemacht werden, wie wahrscheinlich ein positives Ergebnis beim zweiten Biopsieren ist. (Pinsky et al. 2007) Ein Punkt, der bei der Entscheidung für oder gegen eine Nachbiopsie einen großen Stellenwert hat, ist der PSA-Wert. Zackrisson konnte in einer Studie 2003 zeigen, dass 26 % der Männer mit negativen Biopsieergebnissen und steigendem PSA-Wert innerhalb von 4 Jahren einen Tumor entwickelten. (Zackrisson et al. 2003) Dennoch erweist sich das Management von Patienten mit negativen Biopsieergebnissen und trotzdem erhöhten PSA-Werten als schwierig, da eine klare Linie fehlt. (Anastasiadis et al. 2006) So könnten die Marker bei negativen Biopsien, die durch eine falsche Platzierung entstanden sind, und bei anhaltend hohem PSA-Wert wertvolle Hinweise auf Veränderungen im angrenzenden Gewebe geben und als Faktor bei der Abschätzung der Wahrscheinlichkeit für das Vorhandensein eines malignen Geschehens einbezogen werden, was die Entscheidung für oder gegen eine erneute Biopsie deutlich erleichtern sollte.

### V.3 Expressionen der Marker hinsichtlich der Tumorprogression – Betrachtung des Tumorgades und klinisch-pathologischer Parameter

In Bezug auf klinische Parameter erkannte man in der vorliegenden Arbeit, dass bei nicht metastasierten Tumoren die mTOR-Expression mit zunehmendem Alter anstieg und beim Aktivierungsstatus von mTOR war eine umgekehrte Korrelation des Markers zum Alter der Patienten zum Zeitpunkt der OP erkennbar. Bei metastasierten Tumoren hingegen zeigte sich, dass 4E-BP1 mit steigendem Alter vermehrt exprimiert wurde. Für die Kerne bei 4E-BP1 zeigte sich keine signifikante Korrelation. Dies ist besonders im Hinblick auf die Kern-Zytoplasma-Relation, die im bösartigen Tumor zum Kern hin verschoben ist, auffällig. (Thomas 2006) Somit zeigte sich, dass die Anfärbarkeit der Kerne bei den metastasierten Tumoren in Bezug auf das Alter unabhängig von ihrer Größe war. Bei allen Parametern waren die Expressionen bei niedrigerem T-Stadium ( $< 3a$ ) stärker als bei hohem T-Stadium ( $\geq 3a$ ). Außer bei mTOR, hier zeigte sich eine stärkere Anfärbarkeit der Dots bei höherem T-Stadium. Signifikante Expressionsunterschiede waren beim Aktivierungsstatus, bei 4E-BP1 und den Kernen bei 4E-BP1 ersichtlich. Bei den Kernen zeigte sich der deutlichste Unterschied: Es waren signifikant mehr Kerne angefärbt bei kleinerem T-Stadium des Tumors ( $p = 0,0068$ ). Hinsichtlich N-Stadium zeigten die Färbungen mit p-mTOR, p-mTOR/mTOR, 4E-BP1 und die Kerne bei 4E-BP1 signifikante Unterschiede. Bei fast allen Parametern waren höhere Expressionen bei N0-Tumoren als bei N1-Tumoren zu beobachten. Wie auch beim T-Stadium bildete mTOR eine Ausnahme. Hier zeigte sich eine höhere Expression bei Tumoren mit Lymphmetastasen. Bei der Untersuchung bezüglich des Färbeverhaltens des Gewebes im Hinblick auf den Gleason-Score ( $GS \leq 7b$  vs.  $> 7b$ ) zeigten sich für p-mTOR/mTOR und 4E-BP1 signifikante Unterschiede. Bei allen untersuchten Parametern außer bei mTOR war bei höherem GS eine geringere Expression erkennbar. Bei mTOR war eine vermehrte Expression bei höherem GS zu erkennen. Es zeigte sich auch ein signifikanter Unterschied bei den Kernen bei 4E-BP1. Bei den Tumoren mit niedrigerem GS waren signifikant mehr Kerne angefärbt als bei solchen mit hohem GS ( $p = 0,0002$ ). Somit wurde deutlich, dass sich beim Progress der Erkrankung im Gesamtbild eine verminderte mTOR-Aktivität abzeichnete. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass bei PCAs indiziert durch PTEN-Verlust, die Inhibition von PI3K und die mTOR

Inhibition mit dem dualen Kinaseinhibitor BEZ235 das Tumolvolumen von bestehenden Tumoren reduzierte, was die Aktivität des Signalwegs bei der Erhaltung tumoröser Geschehen demonstrierte. (Carver et al. 2011) Schon 1999 zeigte McMenamin, dass eine verringerte Expression von PTEN als Regulator des mTOR-Systems mit einem höheren Gleason-Score assoziiert war. (McMenamin et al. 1999) Diese Beobachtung passt zu den vorliegenden Ergebnissen, da man bei einer verringerten PTEN-Expression auch von einer geringeren mTOR-Aktivität ausgehen kann.

p-mTOR, der Aktivierungsstatus p-mTOR/mTOR und 4E-BP1 zeigten bei der Betrachtung des Gewebes wie oben beschrieben eine verringerte Expression bei der Progredienz des PCAs. Wie in der vorliegenden Arbeit war auch bei Müller et al. erkennbar, dass der Expressionsverlust von p-mTOR mit fortgeschrittenem Tumorstadium, höherem Gleason-Score und dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen einherging. (Müller et al. 2013) Für andere an der mTOR Signalkaskade beteiligte Bausteine konnte eine Überexpression beim Tumorprogress beobachtet werden. Bei der Untersuchung der Akt-Expression im benignen und malignen Prostatagewebe zeigte sich bei Lao et al. eine positive Korrelation zwischen dem Proteinparameter und dem Gleason Grad der Gewebeproben. Die meisten Tumoreale mit hohem Gleason Grad ließen eine starke Akt-Expression erkennen. (Liao et al. 2003) Beim Mammakarzinom zeigte sich, dass p-4E-BP1 überwiegend in schlecht differenzierten Tumoren exprimiert war und mit der Tumorgöße, mit dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen und lokalen Rezidiven korrelierte. Die Koexpression von p-4E-BP1 und p-eIF4G war an eine hohe Tumorproliferationsrate gekoppelt. (Rojo et al. 2007) Für Prostata-Tumorgewebe, das mit p-eIF4G angefärbt wurde, zeigte sich ebenso, dass Tumoren mit einem Gleason-Score über 7 eine signifikant höhere Expression aufwiesen als Tumoren mit einem Gleason-Score von 7 und weniger. (Furic et al. 2010) Bei Liao et al. zeigte sich neben der vermehrten Akt-Expression im Gewebe fortgeschrittener Tumoren auch eine Expressionskorrelation mit dem präoperativen PSA-Wert. (Liao et al. 2003) Dagegen war eine Korrelation der Parameterexpressionen und des präoperativen PSA-Werts in der vorliegenden Arbeit nicht festzustellen. Da eine Korrelation für einen Zusammenhang der Expressionen mit dem Progress des Tumors spräche, ist diese Beobachtung kritisch zu sehen.

### V.3.1 Prognostische Implikationen

Derzeit wird intensiv nach prognostisch relevanten Biomarkern gesucht, die - eventuell auch in Kombination - die Aggressivität des vorliegenden PCAs und damit den Krankheitsverlauf effektiver vorhersagen können als der Gleason-Score allein. (Cordon-Cardo et al. 2007, Shen & Abate-Shen 2010) Vor allem die Differenzierung zwischen indolenten und aggressiven Tumoren bei Patienten mit der Diagnose eines PCAs mit einem niedrigen Gleason-Score nach Biopsie, stellt sich als große klinische Herausforderung dar. (Sartor et al. 2008) Dieses Differenzierungsproblem führt unter anderem zu einer großen Übertherapie von Patienten, bei denen eine konservative Therapie ausreichend wäre. Insgesamt zieht das eine geringere Erfolgsquote nach sich, was das Überleben der Patienten anbelangt, da durch die Überdiagnose und die Übertherapie der Patienten mit indolentem PCA der Erfolg für die Patienten, die von einer Intervention profitieren, geschmälert wird. (Shen & Abate-Shen 2010)

Die in dieser Arbeit untersuchten Biomarker könnten in Hinblick auf prognostische Aussagen eine Hilfestellung geben und vor allem eine Kombination der Marker könnte prognostisch relevant sein. Die Überexpression von mTOR in Kombination mit dem Verlust von p-mTOR und 4E-BP1 stellte sich in den vorliegenden Ergebnissen als Prädiktor für das Fortschreiten des PCAs da. Vor allem bei 4E-BP1 zeigte sich eine stark verminderte Expression sowohl im Kern als auch im Zytoplasma bei fortgeschrittenem Stadium des Tumors. Im Gegensatz dazu erkannte man beim Ösophaguskarzinom eine signifikant höhere 4E-BP1-Expression bei T3N0M0-Tumoren als bei Tumoren im T4N1M0-Stadium. (Salehi & Mashayekhi 2006) Das Ergebnis der vorliegenden Studie lässt sich vielmehr mit einer Studie von Karlsson et al., in der Mammakarzinomgewebe untersucht wurde, vergleichen. Hier zeigte sich, dass eine nukleäre Expression des Proteins mit einem besseren klinischen Ergebnis verknüpft war, wohingegen eine hohe zytoplasmatische Expression und hohe mRNA-Level mit high-grade Tumoren und einer schlechteren Prognose korrelierten, was vermuten lässt, dass das Protein in verschiedenen Zellkompartimenten eine unterschiedliche Rolle spielt. (Karlsson et al. 2013) Schätzungsweise 30 % des Proteins sind im Zellkern lokalisiert, wo es die Verfügbarkeit von eIF4E für Translation regelt, indem es eIF4E im Kern zurückhält und so die Ribosomenbindung verhindert. (Rong et al. 2008) Hohe nukleäre Level des Proteins würden so die Translation inhibieren und dadurch auch die Proliferation von malignen



Zellen reduzieren, was die bessere Prognose erklären könnte. (Karlsson et al. 2013) Auch beim Nierenzellkarzinom wurde mittels TMA und immunhistochemischer Methodik deutlich, dass unterschiedliche Expressionen des mTOR vorgeschalteten Akt im Kern und im Zytoplasma mit einer unterschiedlichen Prognose einhergingen. Es zeigte sich, dass eine hohe nukleäre pAKT-Expression mit einer günstigen Prognose und eine hohe zytoplasmatische pAKT-Expression mit einer schlechten Prognose assoziiert war. (Pantuck et al. 2007) Die in dieser Studie ermittelten Ergebnisse legen im Gegensatz zu der Studie von Karlsson et al. zum Mammakarzinom die Vermutung nahe, dass der Verlust der Expression des Proteins beim Fortschreiten des Prostatakarzinoms nicht auf ein Kompartiment beschränkt ist, sondern die gesamte Zelle betrifft. Da die Betrachtung der Kerne ein signifikanteres Ergebnis lieferte als die des Zytoplasmas, würde es ausreichen sich bei der Untersuchung des Gewebes zu prognostischen Zwecken auf die Kerne zu konzentrieren.

Die Überexpression der aktivierten phosphorylierten Form und eine verminderte Expression von mTOR beim Progress des PCAs, wie sie in der vorliegenden Studie beobachtet werden konnte, wurde bereits bei anderen Karzinomen wie dem Magenkarzinom oder dem Adenokarzinom des Gallengangs deutlich. Hier konnte eine vermehrte p-mTOR-Expression mit einer schlechteren Prognose assoziiert werden. (Herberger et al. 2007, Yu et al. 2009) Auch beim Plattenepithelkarzinom des Ösophagus konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression mit einer schlechteren Prognose einherging. Sowohl die Gesamtmortalität als auch die spezifische Sterberate war erhöht. Allerdings zeigte sich in der Studie keine Korrelation mit einem klinischen oder pathologischen Parameter wie Alter, Geschlecht, histologischem Grading, T- oder N-Stadium. (Hirashima et al. 2010) Beim Magenkarzinom korrelierte eine Überexpression von p-mTOR signifikant mit dem Auftreten von Lymphmetastasen. (Yu et al. 2009) Bei Müller et al. zeigte sich, dass beim PCA der Verlust der Intensität von p-mTOR signifikant mit dem Auftreten eines biochemischen Rezidivs korrelierte. (Müller et al. 2013) Auf der anderen Seite zeigten Studien zum Ovarialkarzinom und zum Adenokarzinom der Lunge eine erhöhte p-mTOR Expression, wenn die Karzinome eine bessere Prognose aufwiesen. (Noske et al. 2008, Anagnostou et al. 2009) Möglicherweise resultieren diese Unterschiede des mTOR-Status im Hinblick auf die Progression und

damit auch auf die prognostische Bedeutung daraus, dass der Signalweg in verschiedenen Organen eine andere Entwicklung durchmacht.

Insgesamt ist die Relevanz der in der vorliegenden Studie betrachteten Marker in Hinsicht auf die prognostische Aussagekraft vor dem Hintergrund, dass es sich um eine retrospektiv aufgebaute Studie handelt, unter Vorbehalt zu sehen. Andere Studien zum PCA, die genauere prognostische Angaben machen können, enthalten so zum Beispiel Daten zum Überleben der Patienten. (Berney et al. 2009)

Der Einsatz von immunhistochemischen, DNA-zytometrischen oder molekularbiologischen Untersuchungen muss gerechtfertigt sein, indem der Mehraufwand, der mit diesen Methoden einhergeht, einen Nutzen für die Patienten darstellt. (Kristiansen 2012) Derzeit sind allerdings keine molekularen Biomarker bekannt, die eine bessere prognostische Einschätzung liefern als das Gleason Grading des Tumors. (True et al. 2006) Dennoch könnte man mittels der hier untersuchten Marker in Kombination mit dem Gleason-Grading eine bessere prognostische Vorhersagbarkeit erreichen. Deswegen sollten in Zukunft weitere Studien durchgeführt werden, die im Follow-Up die klinischen Ergebnisse wie die Rezidivrate und das Überleben näher beleuchten.

#### V.4 Metastasierung des Tumors

Knochen ist der bevorzugte Ort für Metastasen beim PCA. Man schätzt, dass ca. 70 % der fortgeschrittenen Prostatakarzinome Knochenmetastasen bilden. Trotz des großen Fortschritts in Forschung und Klinik beim Management des PCA, gibt es derzeit keine spezifischen Therapien für Patienten, die Rezidive und/oder Metastasen erleiden. Knochenmetastasen und die skelettbezogenen Komplikationen schränken die Lebensqualität der Patienten ein und stellen eine große Belastung für das Gesundheitssystem weltweit dar. (Logothetis & Lin 2005, Clemons et al. 2012, Bertoldo et al. 2014) Momentan stehen verschiedene Optionen zur Symptomlinderung zu Verfügung, eine Möglichkeit die Patienten zu heilen besteht derzeit allerdings nicht. In den vergangenen Jahren wurden verschiedene Ansätze entdeckt wie auf molekularer Ebene in die Signalwege beim PCA und seinem Progress hin zur Metastasierung eingegriffen werden kann. Ein gutes Beispiel hierfür ist Denosumab, was den RANKL-

Signalweg blockiert. (Yee & Raje 2012) Herr Yannick Pach hat sich innerhalb unseres Verbundprojektes in seiner Arbeit mit RANK und RANKL beim Progress des PCAs auseinandergesetzt und signifikante Ergebnisse der Markerexpressionen erhalten. (Y. Pach, persönliche Mitteilung)

Dass der mTOR-Signalweg eine Relevanz bei der Metastasierung von Tumoren hat, wurde beispielsweise für das kolorektale Karzinom gezeigt. So fanden Gulhati et al. heraus, dass mTORC 1 und 2 in der Lage sind eine epithelial-mesenchymale Transition (EMT) und die Metastasierung über den RhoA- und Rac1-Signalweg zu steuern. Eine erhöhte mTOR-Expression war sowohl in Primärtumoren als auch in Lebermetastasen zu finden und es waren keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Primärtumor und den Metastasen erkennbar. (Gulhati et al. 2011) Eine erhöhte mTOR-Expression war ebenso bei neuroendokrinen Tumoren des gastroenteropankreatischen Systems erkennbar. Bei Tumoren des Vorderdarms erkannte man eine signifikante erhöhte Expression, wenn Fernmetastasen vorhanden waren. (Kasajima et al. 2011) Bei Magenkrebs im pT2b-Stadium zeigte sich ebenfalls ein Anstieg der mTOR-Expression mit zunehmender Anzahl der Lymphknotenmetastasen. Auch eine Korrelation der Expression mit der krankheitsfreien Überlebenszeit war erkennbar. Eine Überexpression ging mit einer kürzeren Überlebenszeit einher. (An et al. 2010) Beim Chordom, einem Knochentumor der Wirbelsäule, wurde deutlich, dass bei Gewebe, das eine starke mTOR-Expression erkennen ließ, eine Tumorinvasion in das umliegende Muskelgewebe bereits stattgefunden hatte. (Chen et al. 2014)

Dass sich das mTOR-System und die beteiligten Proteine beim PCA im Ungleichgewicht befinden, konnten Taylor et al. 2010 für 42 % der lokal fortgeschrittenen Tumoren und für fast 100 % der fortgeschrittenen Tumoren bestätigen. (Taylor et al. 2010) 2003 zeigte Wang bereits, dass die prostataspezifische Deletion des Genes von PTEN bei Mäusen zum metastasierten PCA führte (Wang et al. 2003) Auch Hsieh erkannte, dass die vermehrte Aktivität von mTOR und die Deregulierung der Biosynthese aller mit dem System verbundenen Proteine als Grundvoraussetzung für die Bildung von Metastasen bei Mäusen mit PCA offenbarte. (Hsieh et al. 2012) Zudem wurde herausgefunden, dass das epitheliale Zelladhäsionsmolekül (EpCAM) über den PI3K/Akt/mTOR Signalweg mit der Metastasierung des PCA assoziiert ist. (Ni et al. 2013) Des Weiteren erkannte

man, dass das Zytokin Transforming Growth Factor-beta (TGF- $\beta$ ) die Metastasierung des PCA in den Knochen durch microRNA-96 und durch die Aktivierung des mTOR-Signalwegs fördert. (Siu et al. 2015)

Der molekulare Mechanismus der Regulation der Zellmotilität und der Metastasierung über den mTOR-Weg ist zurzeit noch nicht vollständig geklärt. Einer der vermuteten Ansätze ist, dass die Kontrolle der Dynamik des Aktinzytoskeletts und der Zellmotilität über die Modulierung der Expression und Aktivität der kleinen GTPasen wie RhoA, Rac1 und Cdc42 bewerkstelligt wird. Weiterhin spielen die durch mTOR gesteuerten Proteine S6K1 und 4E-BP1 vermutlich eine Rolle bei der Phosphorylierung von fokalen Zelladhäsions-Proteinen wie beispielsweise Paxillin. Zudem ist mTOR möglicherweise in der Lage die Metastasierung über die Veränderung der Tumorumgebung anzustoßen. (Zaytseva et al. 2012) Auch in der vorliegenden Arbeit stellte sich das die Tumoren umgebende Gewebe bereits verändert dar (s. V.2 ).

Die Ergebnisse, die die vorliegende Arbeit bezüglich des mTOR-Systems lieferte, zeigten eine Abnahme der Proteinexpressionen im Gewebe fernmetastasierter Tumoren und somit eine Weiterführung des Bildes, was bei der Betrachtung des T- und N-Stadiums und des Gleason-Scores bereits beobachtet werden konnte. Anders als beim T- und N-Stadium und beim Gleason-Score, wo eine geringe Überexpression von mTOR im fortgeschrittenen Stadium des PCA zu erkennen war, zeigte sich bei der Betrachtung der Tumoren mit Fernmetastasen im Gegensatz zu den nicht metastasierten Tumoren eine Abnahme der Expression.

Die Ergebnisse dieser Studie deuten darauf hin, dass die mTOR-Aktivierung im organbegrenzten Stadium des PCA eine Schlüsselrolle übernimmt und im fortgeschrittenen metastasierten Stadium die Aktivität des Signalwegs heruntergefahren wird. Während die Aktivierung des Signalwegs als Frühereignis beim PCA mit einem Gipfel in organbegrenzten Karzinomen zu sein scheint, deuten die evaluierten Ergebnisse darauf hin, dass die fortgeschrittenen Karzinome andere Signalwege benutzen, die nicht mit der Aktivierung des mTOR-Systems assoziiert sind, wie zum Beispiel der stromal cell-derived-factor-1/ CXCR4-Signalweg. (Taichman et al. 2002)

Wie beim Zytoplasma zeigten sich bei 4E-BP1 weniger Kerne im Gewebe metastasierter Tumoren angefärbt als bei organbegrenzten Karzinomen. Diese Beobachtung würde dafür sprechen, dass eine Übertragung des onkogenen Signals in den Kern bei Tumoren im frühen Stadium vonstattengeht und im metastasierten Stadium des Karzinoms dieses Signal nicht mehr übertragen wird, da es nicht mehr benötigt wird, um die malignen sich bereits verselbstständigten Prozesse aufrechtzuerhalten. Weitere Hinweise bezüglich der Aktivität des mTOR-Systems bei der Metastasierung des PCA ergeben sich indirekt bei der Betrachtung der mTOR-Inhibitoren, deren Wirkung auf maligne Knochentumoren und fortgeschrittene Karzinome im nächsten Punkt diskutiert wird.

#### V.4.1 mTOR-Inhibition und der Effekt auf Metastasen

Dass die Inhibition der mTOR-Signalkaskade bei verschiedenen Krebsarten im fortgeschrittenen metastasierten Stadium zu therapeutischen Erfolgen führt, zeigt beispielsweise Temsirolimus, ein Rapamycin-Analogon, was das Überleben von Patienten mit fortgeschrittenem Nierenzellkarzinom (RCC) verbessert. (Hudes et al. 2007) Der mTOR-Signalweg ist allerdings nur einer von vielen, in den bei der Erkrankung eingegriffen werden kann. (Ravaud et al. 2013) Ebenso zugelassen beim metastasierten klarzelligen RCC ist der mTOR- Inhibitor Everolimus. (Motzer et al. 2008, Rini et al. 2014) In Kombination mit Levatinib, einem VEGFR-Inhibitor, konnten beim metastasierten RCC in der Zweitlinienbehandlung gute therapeutische Erfolge erzielt werden. (Nabi et al. 2018) Weiter konnte man bei Kopf-/Halstumoren unter mTOR-Inhibition eine verminderte Lymphangiogenese und Metastasierung in Lymphknoten feststellen. (Patel et al. 2011)

Ein anderes Beispiel für die Wirkung des Eingriffs in den mTOR-Kreislauf auf die Metastasierung von Tumoren ist eine neue Studie von Hua und Kollegen. Ruscogenin, ein pflanzliches Pharmakon, bewirkte in Versuchen mit hepatozellulären Karzinomen eine Unterbrechung der Krebszellmigration und -invasion und eine Hemmung der Bildung metastatischer Herde im Lungengewebe. Über das Herunterregulieren der Phosphorylierung von Akt und mTOR verringerte Ruscogenin die Level von MMP-2, MMP-9, uPA, VEGF und HIF-1 $\alpha$ . (Hua et al. 2018)

Dass der Signalweg auch bei der Entstehung und Progression maligner Tumoren des Knochens involviert ist, lassen Studien erkennen, bei denen mTOR-Inhibitoren wie

Temsirolimus oder Ridaforolimus klinische Wirksamkeit bei Patienten mit primären Osteosarkomen zeigten. (Mita et al. 2013, Schwartz et al. 2013, Thornton et al. 2013) mTOR scheint bei der Osteoklastendifferenzierung beteiligt zu sein. Glantsching et al. bewiesen, dass M-CSF, RANKL und TNF- $\alpha$  – alle benötigt für das Überleben von Osteoklasten - ihren anti-apoptischen Effekt auf Osteoklasten mittels dem mTOR/S6K Signalweg ausüben, indem sie Osteoklasten mit Rapamycin behandelten und eine vermehrte Apoptose der Osteoklasten in vitro zu beobachten war. (Glantschnig et al. 2003) Auch Indo et al. zeigten, dass sowohl eine genetische als auch pharmakologische Inhibition von mTOR die Osteoklastendifferenzierung hemmt. (Indo et al. 2013) Kneissel und seine Kollegen konnten ebenfalls feststellen, dass Everolimus in der Lage ist, die Osteoklastendifferenzierung einzuschränken. (Kneissel et al. 2004)

Evidenz dafür, dass mTOR bei Knochenerkrankungen eine pathologische Rolle spielt, wurde auch durch eine experimentelle Studie zur rheumatoiden Arthritis anhand von Tiermodellen gezeigt. Durch mTOR-Inhibition mit Sirolimus oder Everolimus ließ sich hier eine reduzierte synoviale Osteoklastenbildung in vivo und eine vermehrte Apoptose der Osteoklasten in vitro erzielen. Außerdem zeigten sich bei mTOR-Inhibition weniger Knochenerosionen, weniger Schäden in der Knochenstruktur und weniger Knorpelverlust. (Cejka et al. 2010)

Auf der anderen Seite spielt mTOR wahrscheinlich auch eine Rolle bei der Differenzierung der Osteoblasten. Osteoblasten produzieren Osteoprotegerin (OPG), das RANKL antagonisiert und damit verhindert, dass RANKL an RANK, was sich auf der Osteoklastenoberfläche befindet, bindet. OPG hemmt Osteoklastendifferenzierung. Somit sind Osteoblasten mittels OPG in der Lage, der Osteoklastendifferenzierung zu entgegen. (Roodman 2004) Eine Verbindung des Signalweges und dem OPG-Spiegel wurde mittels Knochenmarksstammzellen von Mäusen untersucht. Die Behandlung mit Rapamycin führte zu einem Anstieg des OPG-Spiegels in diesen Zellen. (Mogi & Kondo 2009)

Verschiedene Studien haben die Effekte einer mTOR-Inhibition auf Knochentumoren und experimentelle Knochenmetastasen anhand von in vivo Modellen getestet (s. Tabelle 19). Hussein et. al zeigten, indem sie 4T1-Brustkrebszellen in die Tibiae von Mäusen injizierten und diese mit Rapamycin behandelten, dass der mTOR-Inhibitor in der Lage

ist, osteolytische Läsionen zu reduzieren und das Leben der behandelten Mäuse im Vergleich zu denen ohne Rapamycin-Gabe zu verlängern (21 vs. 16 Tage). (Hussein et al. 2012) Morgan et. al zeigten ähnliche Ergebnisse beim PCA. Auch sie injizierten Tumorzellen, C4-2 CaP-Zellen, in Mäusetibiae und behandelten die Tiere mit Everolimus, Docetaxel und Zoledronsäure einzeln und in Kombination. Dabei zeigte sich in vivo die stärkste Tumorreduktion im Knochen bei der Behandlung mit allen drei Medikamenten. (Morgan et al. 2008)

Tumor	behandelt mit	Effekt	Studie
Mammakarzinom	Rapamycin	<ul style="list-style-type: none"> <li>• reduzierte Anzahl osteolytischer Läsionen</li> <li>• Überleben verlängert (21 vs. 16 Tage)</li> </ul>	Hussein et al. (Hussein et al. 2012)
Neuroblastom	Rapamycin	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Höherer Serum-OPG-Spiegel</li> <li>• Erhöhte Knochendicke</li> </ul>	Hartwich et al. (Hartwich et al. 2013)
Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle	Temsirolimus	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Beeinträchtigung der Tumorbildung</li> <li>• Hemmung der Entstehung von osteolytischen Läsionen</li> </ul>	Okui et al. (Okui et al. 2011)
Osteoblastisches Osteosarkom	Everolimus + Zoledronsäure	<ul style="list-style-type: none"> <li>• langsamerer Tumorprogress</li> <li>• mehr Knochenmasse</li> </ul>	Moriceau et al. (Moriceau et al. 2010)
Osteolytisches Osteosarkom	Everolimus + Zoledronsäure	<ul style="list-style-type: none"> <li>• langsamerer Tumorprogress</li> <li>• mehr Knochenmasse</li> </ul>	Moriceau et al. (Moriceau et al. 2010)
Prostatakarzinom	Everolimus + Docetaxel + Zoledronsäure	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Verringerung des Tumolvolumens</li> </ul>	Morgan et al. (Morgan et al. 2008)

Tabelle 19: Methodisch unterschiedlich aufgebaute Studien an Mäusen, bei denen die Inhibition des mTOR-Signalwegs Effekte auf Tumoren im Knochen hatte (Bertoldo et al. 2014)

Die Mechanismen, die den in diesen Studien beobachteten Wirkungen der mTOR-Inhibition in Bezug auf maligne Prozesse im Knochen zugrunde liegen, sind bisher nicht vollständig geklärt. An sich sind drei mögliche Erklärungen denkbar: 1. Die mTOR-Inhibition erzielt ihren Effekt direkt in den Zellen des Knochenstoffwechsels und der Osteoklasten, 2. Die mTOR-Inhibition zeigt sich in den Tumorzellen der Knochenmetastasen oder 3. Die mTOR-Inhibition zeigt sich in den Primärtumorzellen. (Bertoldo et al. 2014) Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sprechen aufgrund der abnehmenden Expression der Marker im in den Knochen metastasierten PCA für letzteres und könnte erklären, warum die mTOR-Inhibition in der Praxis bei verschiedenen fortgeschrittenen Karzinomen, insbesondere beim PCA, nicht den Effekt hat, den man

sich erhofft hatte. Eine mögliche Erklärung liefert auch eine Studie von Hsieh, die den Grund für die Rapamycin-Resistenz von Karzinomen auf die ungenügende Inhibierung der Proteine, die mTOR nachgeschaltet sind, zurückführt wie die mTORC1-abhängige Überaktivierung von 4E-BP-eIF4E. (Hsieh et al. 2010) Für organbegrenzte PCAs kann diese Theorie mit der vorliegenden Studie unterstützt werden, da ein Anstieg der 4E-BP1-Expression bei diesen Tumoren beobachtet werden konnte. Eine Abnahme der Expression bei metastasierten Karzinomen spricht allerdings nicht dafür, dass eine ungenügende Hemmung des Translationsinitiationsfaktors der Grund für das Versagen der mTOR-Inhibitoren in diesem Stadium der Erkrankung ist.

Somit deuten die vorliegenden Ergebnisse der Studie darauf hin, dass eine frühe oder sogar präventive Hemmung von mTOR aufgrund der ersichtlichen Aktivität im organbegrenzten Stadium bessere Erfolge erzielen könnte als die Hemmung des Signalwegs im späten Stadium der Erkrankung. So könnten mTOR-Inhibitoren beispielsweise als chemopräventive Arznei bei Patienten eingesetzt werden, bei denen bei einer Biopsie eine benigne Prostatahyperplasie oder eine intraepitheliale Neoplasie und gleichzeitig eine Deletion von PTEN festgestellt wurde. (Tolcher 2004)

## V.5 Hormonsensitives und kastrationsresistentes PCA

Irgendwann kommt es unter einer suffizienten antiandrogenen Therapie unweigerlich dazu, dass das hormonsensitive PCA kastrationsresistent (früher androgenunabhängig) wird. Definiert ist dieser Zustand durch das Fortschreiten des Tumors mit steigendem PSA-Wert oder durch einen Krankheitsprogress, der sich z.B. in einer Zunahme der Symptome zeigt. (Shen & Abate-Shen 2010, Miller 2011) In diesem Stadium stehen den Klinikern nur wenig, lediglich palliative und symptomorientierte Therapieoptionen zur Verfügung. Seit der Veröffentlichung der randomisierten kontrollierten Studien TAX 327 (Tannock et al. 2004) und SWOG 99-16 (Petrylak et al. 2004) gilt das Taxan Docetaxel als therapeutischer Goldstandard beim kastrationsresistenten Prostatakarzinom. In beiden Studien zeigte sich bei den Patienten, die eine Chemotherapie mit Docetaxel bekamen, im Vergleich zur Therapie mit Mitoxantron (TAX 327: 18.9 vs. 16.5 Monate,  $p = 0,009$ ) oder Mitoxantron und Prednison (SWOG 99-16: 17.5 vs. 15.6 Monate,  $p = 0,02$ ) ein signifikanter Überlebensvorteil. Obwohl beide Studien eine klare Standardtherapie für Männer mit CRPC aufzeigt, wird hier deutlich, dass weitere Therapieoptionen benötigt



werden, die bessere Erfolge bezüglich des Überlebens liefern als 2,4 Monate. (Morgan et al. 2009) Neben der Therapie des CRPC zeigen aktuelle Phase-III-Studienergebnisse, dass eine Chemotherapie zusätzlich zu einer Hormontherapie auch beim hormonsensitiven fortgeschrittenen/metastasierten Prostatakarzinom Vorteile haben kann. Im Vergleich zur alleinigen hormonablativen Therapie brachte die frühe kombinierte Chemo-Hormontherapie mit Docetaxel einen medianen Überlebensvorteil von 13,6 Monaten (CHAARTED) (Sweeney et al. 2015) und von 15 Monaten (STAMPEDE) (James et al. 2016). So scheint ein früher Einsatz von Abirateronacetat in Kombination mit Prednison ein ähnliches Ergebnis zu erzielen wie eine frühe Chemotherapie (LATITUDE). (Fizazi et al. 2017)

Die Bedeutung des mTOR-Signalwegs bei der Entstehung des CRPCs und die Interaktion des Signalweges mit dem Androgenrezeptor (AR) sind bisher nur wenig erforscht. Auch wenn einige Studien eine Verbindung vermuten lassen, ist unklar, in welchem Umfang eine direkte Beeinflussung des Rezeptors stattfindet. (Lin et al. 2001, Yang et al. 2005) In der vorliegenden Arbeit zeigten sich für alle untersuchten Parameter außer für den Aktivierungsstatus von mTOR (p-mTOR/mTOR: 0,8 vs. 0,9) ein Abfall der Expression bei den metastasierten kastrationsresistenten Tumoren (CR) verglichen mit den metastasierten hormonsensitiven Tumoren (HS). Signifikant waren die Expressionsunterschiede jedoch bei keinem Parameter, was unter anderem auch auf die begrenzte Zahl der untersuchten Tumoren zurückzuführen sein könnte (HS: 14 vs. CR: 18). Eine Studie, in der ebenfalls bei fortgeschrittenen PCAs die mTOR-Expression ermittelt wurde, ist die von Audet-Walsh et al. Er und seine Kollegen fanden heraus, dass mTOR im Nukleus von Gewebe aus kastrationsresistenten Tumoren und Metastasen stärker exprimiert wurde als in den früheren Krankheitsstadien und die Expression als Indikator für eine schlechtere Prognose galt. (Audet-Walsh et al. 2017) Da in der vorliegenden Arbeit nicht die Kerne, sondern das Zytoplasma der Drüsenzellen betrachtet wurde, weil die Kerne keine wahrnehmbaren Unterschiede in der Anfärbbarkeit mit dem verwendeten mTOR-Antikörper aufwiesen, ist ein direkter Vergleich mit dieser Studie schwierig. Eine mögliche Erklärung für beide Ergebnisse wäre, dass die mTOR-Signalstruktur mit der Progression des Tumors zum CRPC in den Kern transferiert wird und somit im Zytoplasma eine geringere Expression beobachtet werden kann.

### V.5.1 Bedeutung für die Therapie

Man kann davon ausgehen, dass der PI3K/Akt/mTOR- und der Androgenrezeptor (AR)-Signalweg sich gegenseitig über einen komplexen Rückkopplungsmechanismus regulierend beeinflussen. (Carver et al. 2011, Mulholland et al. 2012, Bitting & Armstrong 2013) So regulieren entscheidende Faktoren des mTOR-Signalwegs direkt und indirekt die Expression und die transkriptionelle Aktivität des ARs. (Lin et al. 2001, Yang et al. 2005) Es zeigte sich beispielsweise, dass der mTOR-Signalweg den AR-Signalweg über die feedback Inhibition der Human Epidermal Growth Factor 2/3 Kinasen (HER2/3), die die Stabilität und Transkriptionsaktivität des AR unterstützen, hemmt. (Carver et al. 2011)

Eine Assoziation der Aktivität des mTOR-Signalwegs und dem AR beim fortgeschrittenen Prostatakarzinom wurde auch durch die Beobachtung deutlich, dass die Therapie mit Everolimus oder Rapamycin in einer erhöhten AR-Transkriptionsaktivität sowohl in androgenabhängigen als auch in androgenunabhängigen LNCaP-Zellen resultierte. (Lin et al. 2003, Cinar et al. 2005) Weiter konnten bei LNCaP-Prostatakarzinom-Zellen nach der Behandlung mit Antiandrogenen erhöhte Level von p-mTOR und p-Akt beobachtet werden. (Schayowitz et al. 2008)

Die präklinische Studienlage weist darauf hin, dass die Inhibition des mTOR-Signalwegs beim CRPC erfolgreich sein könnte. So erkannte man, dass androgenabhängige LNCaP-Prostatakarzinom-Zellen in vitro nur schwach auf eine Inhibierung von mTOR reagieren, während das Wachstum von kastrationsresistenten C4-2-Zellen durch die Inhibition signifikant verringert werden konnte. (Ghosh et al. 2005) Auch zeigten Kinkade et al. in einer präklinischen Studie, dass durch die Inhibition des mTOR- und ERK/MAPK-Signalwegs das Wachstum von CRPCs bei Mäusen verhindert werden konnte, was dafür sprechen würde, dass eine Kombinationstherapie mit Akt/mTOR- und/oder MAP-Kinase-Inhibitoren und einer Chemotherapie in diesem Stadium des Karzinoms auch im klinischen Studienmodell erfolgreich sein müsste. (Kinkade et al. 2008)

Im Gegensatz zu diesen Studienergebnissen weisen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit vielmehr darauf hin, dass sich die Aktivität des Signalweges mit zunehmender Progression und der Abnahme des Ansprechens auf Hormone verringert. Dies würde erklären, warum eine Inhibition von mTOR klinisch nicht erfolgreich bzw. zumindest als

Monotherapie beim CRPC nicht ausreichend ist. (Amato et al. 2008, Morgan et al. 2009, Templeton et al. 2013) So zeigten sich in Phase-II-Studien zum CRPC, bei denen die mTOR-Inhibitoren Everolimus und Temsirolimus als Monotherapie getestet wurden, kein gutes Therapieansprechen. (Armstrong et al. 2013, Templeton et al. 2013) Eine weitere Phase-II-Studie mit dem ATP-kompetitiven mTOR-Inhibitor MLN0128 bei 9 Patienten mit fortschreitendem CRPC, die zuvor Enzalutamid oder Abirateronacetat bekamen, musste aufgrund der starken Nebenwirkungen und der ausbleibenden Wirkung abgebrochen werden. Bei keinem Patienten war ein PSA-Rückgang oder eine Verringerung der Zahl der zirkulierenden Tumorzellen (CTC) im Blut während der Behandlung mit dem mTOR-Inhibitor zu beobachten. (Graham et al. 2018)

Nun könnte man sich überlegen, dass eine kombinierte Therapie mit einem mTOR-Inhibitor als zusätzliches Präparat eventuell wirksamer ist eine mTOR-Monotherapie

Diverse Studien zeigen jedoch, dass dies nicht der Fall ist. So zeigte die Kombitherapie aus Everolimus oder Temsirolimus und Docetaxel (Courtney et al. 2015, Emmenegger et al. 2015) oder Bicalutamid (Chow et al. 2016) keinen Vorteil. In einer Phase-I-Studie mit Abirateronacetat und BEZ235 beim metastasierten CRPC, einem dualen PI3K/mTOR-Inhibitor, zeigte sich ebenfalls kein objektives Therapieansprechen. Die Kombination aus Abirateron/Prednison und BEZ235 200 mg täglich wurde wegen der stark ausgeprägten Nebenwirkungen wie Mukositis, Hypotonie oder Dyspnoe bei 50 % der Patienten vorzeitig beendet. (Wei et al. 2017) Eine weitere Studie untersuchte die Kombinationstherapie aus Docetaxel, Bevacizumab und Everolimus bei unselektierten chemotherapie-naiven Patienten mit CRPC und kam zu dem Schluss, dass diese Kombination nicht wirksamer ist als eine Docetaxel Monotherapie und gleichzeitig ein größeres Risiko für starke Nebenwirkungen besteht. (Gross et al. 2018)

Ein Grund, warum die Therapie mit mTOR-Inhibitoren in den bisher durchgeführten Studien nicht die erhoffte Wirkung zeigt, könnte darin liegen, dass eine intrazelluläre Kommunikation und Produkthemmung zwischen den verschiedenen mitogenen Signalwegen besteht, so beispielsweise auch zwischen dem PI3K/AKT/mTOR- und dem Ras/Raf/Mek/Erk-Signalweg. Folglich reicht es vermutlich nicht, in einen einzelnen Schritt dieser Kaskade zu intervenieren, um das Fortschreiten des Tumors hin zur Kastrationsresistenz zu beeinflussen. (L Burgio et al. 2012, Bitting & Armstrong 2013)

So sprechen auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit dagegen, dass eine alleinige mTOR-Therapie in diesem Stadium der Erkrankung funktioniert. Die Therapie mit der Kombination eines mTOR-Inhibitors und einer Chemo- oder Hormontherapie wurde beim CRPC in randomisierten Phase-III-Studien bisher nicht getestet. (Gross et al. 2018) Deswegen muss die Wirksamkeit einer kombinierten Therapie aus Chemo/Hormontherapie und zielgerichteter Therapie mittels Signalweginhibitoren für das fortgeschrittene metastasierte PCA in verschiedenen Studienmodellen weiter untersucht werden. Auch sollte in künftigen Studien genauer beleuchtet werden, ob die Effektivität der Inhibitoren des mTOR-Signalwegs unter anderem davon abhängen könnte, wie weit fortgeschritten eine Hormontherapie bei den Patienten mit einem PCA schon ist.

## V.6 Grenzen der vorliegenden Arbeit

Durch die große Zahl der Stenzen, die auf dem aus 111 Patienten bestehenden Kollektiv basierend, mittels TMA hergestellt wurden, konnte eine gute Vergleichbarkeit der Gewebegruppen gewährleistet werden. Von jedem Prostatagewebe wurden bis zu 14 Stenzen entnommen, was zu einem großen Probenkollektiv führte. Dennoch sollte man bedenken, dass für die verschiedenen Gewebegruppen jeweils nur 26 (benignes Gewebe), 53 (organbegrenzt PCA) und 32 (metastasiertes PCA) Prostatatae als Untersuchungsgut dienten und die Repräsentativität somit eingeschränkt wurde.

Die Tatsache, dass durch die Technik des TMA lediglich wenige Millimeter kleine Stenzen aus den Prostatatae entnommen wurden, bietet zahlreiche Vorteile, wird der Heterogenität des PCAs jedoch nicht gerecht. (Ciccarese et al. 2017) Auch um diesem Problem zu entgegnen, wurden so zahlreich Dots aus der gleichen Gewebegruppe entnommen. Ein weiterer Punkt, der auf das Wesen des TMA zurückzuführen war, sollte Erwähnung finden: Trotz mehrfacher sorgfältiger histopathologischer Evaluation durch erfahrene Mitarbeiter der Studie, konnten einige Gewebeproben nicht gewertet werden, da es sich nicht um das deklarierte Gewebe der jeweiligen Gruppe handelte. Hinzu kam, dass bei der TMA-Herstellung einige Gewebedots abgeschwommen oder zerrissen sind. Dem wurde entgegnet, indem gezielt Nachstanzen der fehlenden oder beschädigten Gewebedots genommen wurden. Dennoch konnten nicht alle Proben bewertet werden.

Das Mikroskopieren geschah jederzeit unter Zuhilfenahme von auf dem individuellen Färbeverhalten der verschiedenen Proteinparameter basierenden Eich-Bildern. Mittels mehrfacher zeitlich voneinander getrennten Mikroskopierdurchgängen am Rechner durch ein geeignetes Computerprogramm wurde zusätzlich die Vergleichbarkeit der Gewebewertung erhöht. Außerdem wurde darauf geachtet, dass der Raum, wo das Mikroskopieren stattfand, stets in gleichem Maße abgedunkelt war. Trotzdem handelte es sich um eine subjektive Art der Auswertung, da die Färbung nicht in standardisierter maschineller Form bewertet wurde.

Letztlich handelte es sich bei der vorliegenden Studie um eine retrospektive Betrachtung, die aufgrund der fehlenden Daten bezüglich Follow-up keine Vorhersage über beispielsweise das Patientenüberleben zuließ, was die Betrachtung der Ergebnisse in Bezug auf prognostische Gesichtspunkte einschränkte.

## V.7 Schlussfolgerung

In dieser Arbeit konnten signifikante Expressionsunterschiede der analysierten Proteine mTOR, p-mTOR und 4E-BP1 als Bestandteile des mTOR-Signalwegs entlang der Progression des Prostatakarzinoms detektiert werden.

Es wurde ersichtlich, dass man mithilfe der Marker gut zwischen malignem und benignem Gewebe differenzieren kann. Eine signifikant verringerte Expression von p-mTOR und eine Überexpression von 4E-BP1 im malignen Gewebe wie sie in früheren Studien bereits beobachtet wurden, konnten in dieser Arbeit bestätigt werden.

Ein weiterer Aspekt, der im Hinblick auf mögliche Rebiopsien im klinischen Alltag relevant werden könnte und in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde, ist die Beobachtung, dass im die Tumoren angrenzenden lichtmikroskopisch benignen Gewebe erkennbare Veränderungen des Signalwegs gefunden wurden.

Weiterhin wurde eine deutlich verminderte Expression des aktivierten mTOR und 4E-BP1 im high Gleason Tumorgewebe verglichen mit low Gleason Tumorgewebe erkannt, was im Hinblick auf prognostische Fragestellungen hilfreich sein könnte.

Bezüglich der zellulären Expression des Translationsinitiationsfaktors 4E-BP1 erkannte man eine ähnliche Verteilung der Anfärbung des Zytoplasmas wie auch der Kerne beim Progress des Tumors. Da die Kerne z.B. bei der Betrachtung des Tumorstadiums deutlichere Ergebnisse lieferten als das Zytoplasma, könnte man sich in zukünftigen Studien auf die Betrachtung der Kerne fokussieren.

Deutlich wurde beim Progress des Tumors vor allem, dass eine Abnahme der Parameterexpression mit der Metastasierung des Karzinoms verbunden war, was zu der Annahme führt, dass es sich bei der Aktivierung von mTOR um ein frühes Ereignis beim PCA handelt. Gerade im Hinblick auf eine mögliche Therapie des fortgeschrittenen Malignoms und der Entgegnung der Metastasierung mittels zielgerichteter Therapie durch mTOR-Inhibitoren scheint der Signalweg nicht der richtige Angriffspunkt zu sein.

Bei der Betrachtung der metastasierten hormonsensitiven und kastrationsresistenten Tumore dieser Studie ließ sich eine weitere Abnahme der Proteinexpressionen im kastrationsresistenten Gewebe erkennen. Wenn man sich diese Ergebnisse ansieht, wird ersichtlich, warum TOR-Inhibitoren in den aktuellen Phase-III-Studien beim CRPC keine

Wirkungen zeigen. Aus diesem Grund sollten in Zukunft weitere Studien mit verschiedenen mTOR-Inhibitoren durchgeführt werden, die ihren Fokus stärker auf das organbegrenzte Stadium legen.

## VI. Zusammenfassung

Das Prostatakarzinom ist die am häufigsten diagnostizierte Krebsart bei Männern und belegt insgesamt den dritten Platz der durch ein Karzinom bedingten Todesursachen beim Mann. Ein Großteil der Karzinome wird im organbegrenzten Stadium erkannt und therapiert. Wenn im Verlauf der Krankheit ein Rezidiv mit Metastasenbildung entsteht oder der Tumor erst im fortgeschrittenen bereits metastasierten Stadium diagnostiziert wird, kann das Karzinom nur für eine begrenzte Zeit und lediglich unter palliativen Gesichtspunkten therapiert werden. Hierbei steht als Therapieoption die Beeinflussung des Androgenrezeptor-Signalwegs mittels Hormontherapie im Vordergrund. Kommt es letztlich trotz der Unterdrückung der Produktion von männlichen Geschlechtshormonen zur kastrationsresistenten Form des Karzinoms, stellt dies therapeutisch eine große Herausforderung dar. Neben vielen anderen Signalwegen spielt vor allem der mTOR-Signalweg beim PCA eine Rolle. Dass Alterationen des Signalwegs bei den meisten humanen Karzinomen zu finden sind und der Pathway bei der Entstehung des PCAs offenbar eine Schlüsselrolle einnimmt, konnte in zahlreichen Studien beobachtet werden. Inwieweit der Pathway bei der Progression des PCAs vom organbegrenzten zum metastasierten und letztlich hormonrefraktären Karzinom integriert ist und die beteiligten Proteine damit für diagnostische, prognostische und insbesondere therapeutische Ansätze im Sinne der gezielten Krebstherapie genutzt werden könnten, wurde in dieser Arbeit untersucht.

Mittels Tissue-Microarray-Technik und Immunhistochemie wurden in der vorliegenden Studie Prostata-Gewebeproben von 111 Patienten untersucht und die Expressionen von mTOR, p-mTOR und 4E-BP1 im Zytoplasma der Zellen mittels H-Score ausgewertet. Im Gegensatz zu mTOR und p-mTOR wurde bei 4E-BP1 eine differierende Anfärbbarkeit der Kerne beobachtet, weshalb hier eine Bewertung des Gewebes hinsichtlich der Anzahl der angefärbten Kerne vorgenommen wurde. Dies wurde in dieser Form bisher noch nicht untersucht. Das explorierte Gewebe stammte aus benignen Prostatae (26), Prostatae mit organbegrenztem Karzinom (53) und Prostatae mit metastasiertem Karzinom (32).

Die medianen Expressionen von mTOR im benignen Gewebe (ben.), im an Tumor angrenzenden Gewebe (anгр.), im Gewebe organbegrenzter low Gleason Tumoren (M0 LG), im Gewebe organbegrenzter high Gleason Tumoren (M0 HG), im Gewebe



metastasierter hormonsensitiver Tumoren (M1 HS) und im Gewebe metastasierter kastrationsresistenter Tumoren (M1 CR) beliefen sich auf: 91, 147, 142, 166, 161 und 141 (anгр., M0 HG und M1 HS signifikant unterschiedlich zu ben.). Bei p-mTOR ergaben sich folgende Expressionen: 178, 201, 174, 175, 125 und 100 (M1 CR signifikant unterschiedlich zu M0 HG, M0 LG, anгр. und ben. und M1 HS signifikant unterschiedlich zu M0 LG und anгр.). Der Quotient p-mTOR/ mTOR (Aktivierungsstatus von mTOR) erreichte Werte von 1,7; 1,4; 1,5; 1,1; 0,8 und 0,9 (M0 HG, M1 HS und M0 CR signifikant unterschiedlich zu ben.). Bei 4E-BP1 zeigten sich die Expressionen im Zytoplasma wie folgt: 127, 99, 206, 185, 120, 90 (M1 CR signifikant unterschiedlich zu M0 HG und M0 LG, M1 HS signifikant unterschiedlich zu M0 HG und M0 LG, M0 HG signifikant unterschiedlich zu anгр. und ben. und M0 LG signifikant unterschiedlich zu anгр. und ben.). Bei der Kernexpression von 4E-BP1 erkannte man eine Anfärbarkeit von mehr als der Hälfte der Kerne bei 0 % des benignen Gewebes. Bei den anderen Gewebegruppen ergaben sich folgende Anteile: 5 %, 23 %, 28 %, 21 %, 0 %. Die Verteilung einer geringen Kernanfärbung ( $\leq 1\%$  der Kerne angefärbt) zeigte sich dagegen wie folgt: 32 %, 21 %, 4 %, 4 %, 57 %, 71 % ( $p < 0,0001$ ). Bei der Betrachtung der Parameter in Bezug auf patientenindividuelle und klinische Daten zeigte sich bei den organbegrenzten Tumoren (PCA M0) eine positive Korrelation der mTOR-Expression ( $r^2 = 0,167$ ;  $p = 0,0029$ ) und eine negative Korrelation der p-mTOR/mTOR-Expression ( $r^2 = 0,210$ ;  $p = 0,0008$ ) mit dem Alter zum Zeitpunkt der OP. Bei den metastasierten Tumoren (PCA M1) ergab sich eine positive Korrelation der 4E-BP1-Expression (Zytoplasma) mit dem Alter zum Zeitpunkt der OP ( $r^2 = 0,138$ ;  $p = 0,0399$ ).

Es fiel auf, dass eine Aktivierung des mTOR-Signalwegs im die Tumoren umgebenden histologisch benignen Gewebe erkennbar war. Diese Beobachtung konnte bereits in früheren Studien gemacht werden. Diese Veränderungen im angrenzenden Gewebe deuten darauf hin, dass das umgebende Gewebe molekularbiologisch bereits in die malignen Prozesse involviert ist. Diese Tatsache könnte man sich diagnostisch z.B. bei der Prostatabiopsie zu Nutze machen. Prognostische Relevanz könnte darüber hinaus die Expression des Aktivierungsstatus haben. Im low Gleason Tumorgewebe zeigte sich eine deutlich geringere Expression als im high Gleason Tumorgewebe. Es wurde auch ersichtlich, dass ein Abfall der mTOR-Aktivität mit dem Progress der Erkrankung und insbesondere der Metastasierung einherging. So zeigten die metastasierten

kastrationsresistenten Karzinome gefolgt von den metastasierten hormonsensitiven Karzinomen die geringste Proteinexpression. Diese Ergebnisse decken sich mit den aktuellen klinischen Studien, bei denen eine Therapie mit mTOR-Inhibitoren keine Wirksamkeit bei PCAs im Endstadium zeigte. Vielmehr handelt es sich bei der Aktivierung von mTOR um ein frühes Ereignis. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie deuten somit darauf hin, dass die fortgeschrittenen PCAs andere Signalwege benutzen, die keine Assoziation zur Aktivierung des mTOR-Systems aufweisen. Um die Evidenz der vorliegenden Ergebnisse zu untermauern, sollten weitere experimentelle und klinische Studien folgen.

## VII. Anhang

### VII.1 Verzeichnisse

#### VII.1.1 Abkürzungen

Akt	Protein kinase B
al.	alii/aliae
angr.	angrenzend
AP	Alkalische Phosphatase
AP23573	Ridaforolimus/Deforolimus
AR	Androgenrezeptor
AS	Active Surveillance
ATP	Adenosintriphosphat
ben.	benigne
BEZ235	Dactolisib
BPH	Benigne Prostatahyperplasie
bzw.	beziehungsweise
CCI-779	Temsirolimus
Cdc42	Cell division control protein 42 homolog
CR	kastrationsresistent
CRPC	Kastrationsresistentes Prostatakarzinom
CT	Computertomographie
CTC	zirkulierende Tumorzellen
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
DEPTOR	DEP domain containing mTOR-interacting protein
dest.	destillata
d.h.	das heißt
DNA	Deoxyribonucleic acid
DRU	Digitale rektale Untersuchung
eEF2	eukaryotischer Elongationsfaktor 2
eIF4E	Eukaryotic translation initiation factor 4E
EMT	epithelial-mesenchymale Transition

ER+	Östrogenrezeptor positiv
ERK/Erk	extracellular-signal regulated kinase
etc.	et cetera
Fc	Fragment crystallisable
FDA	Food and Drug Administration
FKBP12	FK506-binding protein of 12 kDa
FRB	FKBP12-rapamycin binding
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GB	Gigabite
GβL	G-protein β-subunit like
Glo1	Glyoxalase 1
Glo2	Glyoxalase 2
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
GS	Gleason-Score
GTP	Guanosintriphosphat
h	hour, Stunde
HAT	hormonablative Therapie
HDR	High-Dose-Rate
HE	Hämatoxylin-Eosin
HER2/3	human epidermal growth factor 2/3
HG	high Gleason
HGPIN	hochgradig prostatiche intraepitheliale Neoplasie
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
HIFU	hochintensiver fokussierter Ultraschall
HS	hormonsensitiv
HSD	honest significant difference
i.d.R.	in der Regel
IGF 1	Insulin-like growth factor 1
IHC	Immunhistochemie
IL-2	Interleukin 2
IMR	intensitätsmodulierte Radiatio
Inc.	Incorporated

IRS	Immunreaktiver Score
LDR	Low-Dose-Rate
LG	low Gleason
LHRH	Luteinisierungs-Hormon-Releasing-Hormon
LNCaP	Lymph Node Carcinoma of the Prostate
LSAB	Labelled (Strept-)Avidin-Biotin
<i>M</i>	Mittelwert
MAB	maximalen Androgenblockade
mAb	monoclonal antibody
MAPK	mitogen-activated protein kinase
max.	Maximal
MB	Megabite
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor
ml	Milliliter
MLN0128	Sapanisertib
mLST8	Mammalian lethal with sec-13 protein 8
mm	Millimeter
mM	Millimol
MMP-2/-9	matrix metalloproteinase-2/-9
(mp)MRT	(multiparametrische) Magnetresonanztomographie (der Prostata)
mRNA	messenger ribonucleic acid
mSIN1	Mammalian stress-activated map kinase-interacting protein 1
mTOR	Mechanistic target of rapamycin
mTORC 1/2	Mechanistic target of rapamycin complex 1/2
ng	Nanogramm
Nr.	Nummer
OP	Operation
OPG	Osteoprotegerin
PCA	Prostatakarzinom
PCA3	Prostata Cancer Antigen 3
PDGF $\beta$	platelet-derived growth factor- $\beta$
PET	Positronen-Emissions-Tomographie

pH	potentia hydrogenii
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIN	Prostatische intraepitheliale Neoplasie
PKC $\alpha$	Proteinkinase C $\alpha$
p-mTOR	Phospho-mTOR
pNET	neuroendokriner Tumor der Bauchspeicheldrüse
PRAS40	Proline-rich Akt substrate 40 kDa
protor1/2	protein observed with rictor 1 and 2
PSA	Prostataspezifischen Antigen
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
p27 <sup>Kip1</sup>	cyclin-dependent kinase inhibitor 1B
RAD001	Everolimus
RANK	Receptor activator of nuclear factor kappa-B
RANKL	Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand
Raptor	Regulatory-associated protein of mammalian target of rapamycin
Ras	Rat sarcoma
Raf	Rat fibrosarcoma
RCC	Renal cell carcinoma
Rheb	Ras-homologe-enriched-in-brain
RhoA	Ras homolog gene family, member A
Rictor	Rapamycin-insensitive companion of mTOR
RKI	Robert-Koch-Institut
RNA	ribonucleic acid
RPE	Radikale Prostatektomie
R-Status	Resektionsstatus
RT	Raumtemperatur oder Radiotherapie
s.	siehe
sec	Sekunde
SGK1	serum-, and glucocorticoid-induced protein kinase 1
S6K1	S6-Kinase 1, auch p70S6 Kinase 1
TBST	Tris-buffered Saline and Tween
TGFb1	transforming growth factor-b1

TMA	Tissue microarray
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TNM	Tumor, Nodes, Metastasen
TRUS	Transrektaler Ultraschall
TSC	Tuberous Sclerosis Complex
TSC1	Hamartin
TSC2	Tuberin
TUR-P	Transurethrale Prostatektomie
TVP	Transvesikale Prostatektomie
uPA	urokinase-type plasminogen activator
USA	United States of America
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor
vs.	<i>versus</i>
WW	Watchful waiting
XL765	Voxalisib
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
%	Prozent
°C	Grad Celsius
4E-BP1	4E-binding protein 1
$\mu\text{m}$	Mikrometer
$\mu\text{l}$	Mikroliter
<	kleiner als
>	größer als

## VII.1.2 Tabellen

Tabelle 1: Übersicht über die in Lilja et al. 2011 ermittelten Risiken in Abhängigkeit des PSA-Wertes und über die von den Autoren der Studie vorgeschlagenen Kontrollintervalle (Lilja et al. 2011, Krebsgesellschaft & Deutsche Krebshilfe 2016).....	13
Tabelle 2: TNM-Klassifikation des PCA (Wittekind 2010).....	16
Tabelle 3: ISUP-Gleason-Nomenklatur 2014 (Epstein et al. 2016) .....	17
Tabelle 4: Natürlicher Krankheitsverlauf unbehandelter Patienten nach Catalona et al. (Hautmann & Gschwend 2014) .....	21
Tabelle 5: Übersicht über die Entnahmeorte bei RPE-Prostatae (Low und High Gleason).....	48
Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Primärantikörper.....	58
Tabelle 7: Differenzierte Übersicht über das Alter am Tag der OP und den PSA-Wert vor der OP.....	70
Tabelle 8: N-Stadium der Patienten.....	71
Tabelle 9: Differenzierte Übersicht über das T-Stadium.....	71
Tabelle 10: Differenzierte Übersicht über den Gleason-Score.....	71
Tabelle 11: Mediane, Mittelwerte und p-Werte der untersuchten Parameter im Hinblick auf das T-Stadium der Karzinome.....	89
Tabelle 12: Mediane, Mittelwerte und p-Werte der untersuchten Parameter im Hinblick auf das N-Stadium der Karzinome .....	90
Tabelle 13: Mediane, Mittelwerte und p-Werte der untersuchten Parameter im Hinblick auf den Gleason-Score (GS) der Karzinome .....	91
Tabelle 14: Mediane und Mittelwerte der Expressionen der untersuchten Parameter in benignem Gewebe (ben.), in organbegrenzten Tumoren (M0) und in metastasierten Tumoren (M1) .....	92
Tabelle 15: Signifikante Differenzen bei der Betrachtung von benignem Gewebe (ben.), organbegrenzten Tumoren (M0) und metastasierten Tumoren (M1).....	92
Tabelle 16: Mediane. Mittelwerte und p-Werte der untersuchten Parameter im Hinblick auf den Hormonstatus der Karzinome .....	95



Tabelle 17: Mediane der mittleren Expressionen der untersuchten Parameter entlang der Progressionssequenz .....	96
Tabelle 18: Mittelwerte der mittleren Expressionen der untersuchten Parameter entlang der Progressionssequenz .....	96
Tabelle 19: Methodisch unterschiedlich aufgebaute Studien an Mäusen, bei denen die Inhibition des mTOR-Signalwegs Effekte auf Tumoren im Knochen hatte (Bertoldo et al. 2014).....	119

### VII.1.3 Abbildungen

Abbildung 1: Übersicht über das originale Gleason-Grading 1992 und die beiden modifizierten Ausführungen aus den Jahren 2005 und 2010 (Brimo et al. 2013) .....	16
Abbildung 2: Schematische Darstellung der mTOR-Regulation (L Burgio et al. 2012).....	27
Abbildung 3: Die Rolle des AR im CRPC. A: der AR hält die Homöostase sowohl im epithelialen als auch im stromalen Gewebe in der normalen Prostata aufrecht, B: Während der Androgenablation senden die stromalen Zellen parakrine proapoptotische Signale, die auf die benachbarten epithelialen Zellen wirken und die Rückbildung der normalen Prostata indizieren, C-F: Kastrationsresistenz kann durch eine Vielzahl an molekularen Mechanismen getriggert werden: C: AR-Amplifikation, D: AR-Mutation, E: Liganden-unabhängige AR-Aktivierung durch die Hochregulation anderer Signalwege wie dem Akt/mTOR- oder ERK/MAPK-Signalweg, F: endogene Biosynthese von Androgenen durch die Tumorzellen (Shen & Abate-Shen 2010).....	36
Abbildung 4: TOR und Rapamycin (Benjamin et al. 2011).....	38
Abbildung 5: Herstellung eines Tissue-Mikroarrays; Quelle: Bildarchiv des Labors der Klinik für Urologie des Universitätsklinikums Tübingen.....	52
Abbildung 6: Die fertigen Dots auf einem Objektträger beispielhaft gezeigt an einem Array angefärbt mit 4E-BP1 bei 4-facher Vergrößerung .....	54
Abbildung 7: Beispiel für einen Dot (p-mTOR) bei 40-facher Vergrößerung und das dazugehörige Eich-Bild.....	60
Abbildung 8: Beispiel für einen Dot, der bei 4E-BP1 im Gegensatz zu mTOR und p-mTOR eine Anfärbbarkeit der Kerne zeigt .....	62
Abbildung 9: Beispiel für einen Dot (p-mTOR), der eine fokale Verteilung der Färbung zeigt .....	64
Abbildung 10: zwei Beispiele für Dots (p-mTOR), bei denen sich eine Zweifarbigkeit einiger Zellen zeigte (s. Pfeile).....	65

Abbildung 11: Schematische Darstellung der Berechnung der Gesamtwerte anhand eines Beispieldots.....	66
Abbildung 12: Färbeergebnis von mTOR: Intensitäten 0-3 bei drei Vergrößerungen.....	73
Abbildung 13: Färbeergebnis von p-mTOR: Intensitäten 0-3 bei drei Vergrößerungen.....	74
Abbildung 14: Färbeergebnis von 4E-BP1: Intensitäten 0-3 bei drei Vergrößerungen.....	75
Abbildung 15: Beispiele aus verschiedenen Dots (4E-BP1), bei denen unterschiedlich viele Kerne angefärbt waren .....	76
Abbildung 16: Vergleich der Expressionen von mTOR im Tumorgewebe (bei n = 83) und im benignen Gewebe (bei n = 127); p = 0,1418 .....	77
Abbildung 17: Vergleich der Expressionen von p-mTOR im Tumorgewebe (bei n = 81) und im benignen Gewebe (bei n = 126); p < 0,0001 .....	77
Abbildung 18: Vergleich der Expressionen von p-mTOR/mTOR im Tumorgewebe (bei n = 81) und im benignen Gewebe (bei n = 126); p < 0,0001.....	78
Abbildung 19: Vergleich der Expressionen von 4E-BP1 im Tumorgewebe (bei n = 82) und im benignen Gewebe (bei n = 123); p < 0,0001 .....	79
Abbildung 20: Schematische Darstellung des prozentualen Anteils der angefärbten Kerne im Tumorgewebe (bei n = 82) und im benignen Gewebe (bei n = 123); p < 0,0001.....	80
Abbildung 21: Korrelation der Expressionen der Proteinparameter im Tumorgewebe und im benignen Gewebe .....	81
Abbildung 22: Korrelation der Expressionen der zellulären Lokalisation bei 4E-BP1 im Tumorgewebe und im benignen Gewebe .....	82
Abbildung 23: Vergleich der Expressionen aller Parameter in PCA M0 Gewebe in Abhängigkeit von der Lokalisation und Expression im benignen Gewebe aus Prostatae ohne malignen Tumor.....	83
Abbildung 24: Darstellung des prozentualen Anteils der angefärbten Kerne bei 4E-BP1 in PCA M0 Gewebe in Abhängigkeit von der Lokalisation	

und Expression im benignen Gewebe aus Prostatae ohne malignen Tumor; $p < 0,0001$ .....	84
Abbildung 25: Darstellung des prozentualen Anteils der angefärbten Kerne bei 4E-BP1 in PCA M0 low Gleason Tumorgewebe in Abhängigkeit von der Lokalisation und Expression im benignen Gewebe aus Prostatae ohne malignen Tumor; $p < 0,0001$ .....	85
Abbildung 26: Vergleich der Expressionen von p-mTOR/mTOR in PCA M0 high Gleason Tumorgewebe in Abhängigkeit von der Lokalisation und Expression im benignen Gewebe aus Prostatae ohne malignen Tumor .....	86
Abbildung 27: Darstellung des prozentualen Anteils der angefärbten Kerne bei 4E-BP1 in PCA M0 high Gleason Tumorgewebe in Abhängigkeit von der Lokalisation und Expression im benignen Gewebe aus Prostatae ohne malignen Tumor; $p = 0,0083$ .....	86
Abbildung 28: Korrelation der Expression von mTOR und p-mTOR/mTOR im Gewebe organbegrenzter Prostatakarzinome (PCA M0) mit dem Alter zum Zeitpunkt der OP (Alter) .....	87
Abbildung 29: Korrelation der Expression von 4E-BP1 im Gewebe metastasierter Prostatakarzinome (PCA M1) mit dem Alter zum Zeitpunkt der OP (Alter).....	88
Abbildung 30: Schematische Darstellung des prozentualen Anteils der angefärbten Kerne im Tumorgewebe mit niedrigerem T-Stadium ( $< 3a$ ) und mit hohem T-Stadium ( $\geq 3a$ ; bei $n = 67$ ; $p = 0,0068$ ).....	89
Abbildung 31: Schematische Darstellung des prozentualen Anteils der angefärbten Kerne im N0 und N1 Tumorgewebe (bei $n = 70$ ; $p = 0,0018$ ).....	90
Abbildung 32: Schematische Darstellung des prozentualen Anteils der angefärbten Kerne im Tumorgewebe mit niedrigerem GS ( $\leq 7b$ ) und mit hohem GS ( $> 7b$ ; bei $n = 78$ ; $p = 0,0002$ ) .....	91
Abbildung 33: Darstellung des prozentualen Anteils der angefärbten Kerne bei 4E-BP1 im benignen Prostatagewebe (benigne), Gewebe	

organbegrenzter Karzinome (Tumor M0) und im Gewebe metastasierter Karzinome (Tumor M1); bei n = 107, p < 0,0001.....	92
Abbildung 34: Vergleich der Expressionen von 4E-BP1 im Gewebe hormonsensitiver (bei n = 14) und kastrationsresistenter Tumoren (bei n = 17; p = 0,2927) .....	94
Abbildung 35: Schematische Darstellung des prozentualen Anteils der angefärbten Kerne im Gewebe metastasierter hormonsensitiver Tumoren (bei n = 14) und im Gewebe metastasierter kastrationsresistenter Tumoren (bei n = 17; p = 0,1477).....	94
Abbildung 36: Vergleich der gemittelten Expressionen von mTOR entlang der Progressionssequenz, bei n = 210.....	97
Abbildung 37: Vergleich der gemittelten Expressionen von p-mTOR entlang der Progressionssequenz, bei n = 207.....	98
Abbildung 38: Vergleich der gemittelten Expressionen von p-mTOR/mTOR entlang der Progressionssequenz, bei n = 207.....	98
Abbildung 39: Vergleich der gemittelten Expressionen von 4E-BP1 entlang der Progressionssequenz, bei n = 205.....	99
Abbildung 40: Darstellung des prozentualen Anteils der angefärbten Kerne bei 4E-BP1 entlang der Progressionssequenz, bei n = 205; p < 0,0001.....	100

#### VII.1.4 Literaturverzeichnis

Abuzallouf, S., I. Dayes and H. Lukka (2004). "Baseline staging of newly diagnosed prostate cancer: a summary of the literature." *The Journal of urology* 171(6): 2122-2127.

Ali, G., L. Boldrini, A. Capodanno, S. Pelliccioni, A. Servadio, G. Crisman, A. Picchi, F. Davini, A. Mussi and G. Fontanini (2011). "Expression of p-AKT and p-mTOR in a large series of bronchopulmonary neuroendocrine tumors." *Experimental and therapeutic medicine* 2(5): 787-792.

Altomare, D. A., H. Q. Wang, K. L. Skele, A. De Rienzo, A. J. Klein-Szanto, A. K. Godwin and J. R. Testa (2004). "AKT and mTOR phosphorylation is frequently detected in ovarian cancer and can be targeted to disrupt ovarian tumor cell growth." *Oncogene* 23(34): 5853-5857.

Amato, R. J., J. Jac, T. Mohammad and S. Saxena (2008). "Pilot study of rapamycin in patients with hormone-refractory prostate cancer." *Clinical genitourinary cancer* 6(2): 97-102.

An, J. Y., K. M. Kim, M. G. Choi, J. H. Noh, T. S. Sohn, J. M. Bae and S. Kim (2010). "Prognostic role of p-mTOR expression in cancer tissues and metastatic lymph nodes in pT2b gastric cancer." *International journal of cancer* 126(12): 2904-2913.

Anagnostou, V. K., G. Bepler, K. N. Syrigos, L. Tanoue, S. Gettinger, R. J. Homer, D. Boffa, F. Detterbeck and D. L. Rimm (2009). "High expression of mammalian target of rapamycin is associated with better outcome for patients with early stage lung adenocarcinoma." *Clinical Cancer Research* 15(12): 4157-4164.

Anastasiadis, A. G., M. P. Lichy, U. Nagele, M. A. Kuczyk, A. S. Merseburger, J. Hennenlotter, S. Corvin, K.-D. Sievert, C. D. Claussen and A. Stenzl (2006). "MRI-guided biopsy of the prostate increases diagnostic performance in men with elevated or increasing PSA levels after previous negative TRUS biopsies." *European urology* 50(4): 738-749.

Aoki, V., J. X. Sousa Jr, L. M. Fukumori, A. M. Périgo, E. L. Freitas and Z. N. Oliveira (2010). "Direct and indirect immunofluorescence." *Anais brasileiros de dermatologia* 85(4): 490-500.

Armengol, G., F. Rojo, J. Castellví, C. Iglesias, M. Cuatrecasas, B. Pons, J. Baselga and S. R. y Cajal (2007). "4E-binding protein 1: a key molecular "funnel factor" in human cancer with clinical implications." *Cancer research* 67(16): 7551-7555.

Armstrong, A. J., T. Shen, S. Halabi, G. Kemeny, R. L. Bitting, P. Kartcheske, E. Embree, K. Morris, C. Winters and T. Jaffe (2013). "A phase II trial of temsirolimus in men with castration-resistant metastatic prostate cancer." *Clinical genitourinary cancer* 11(4): 397-406.

Asbach, P., M. Haas and B. Hamm (2015). "MRT der Prostata." *Der Radiologe* 55(12): 1088-1096.

Attard, G., C. Parker, R. A. Eeles, F. Schroder, S. A. Tomlins, I. Tannock, C. G. Drake and J. S. de Bono (2015). "Prostate cancer." *Lancet*.

Audet-Walsh, E., C. R. Dufour, T. Yee, F. Z. Zouanat, M. Yan, G. Kalloghlian, M. Vernier, M. Caron, G. Bourque, E. Scarlata, L. Hamel, F. Brimo, A. G. Aprikian, J. Lapointe, S. Chevalier and V. Giguere (2017). "Nuclear mTOR acts as a transcriptional integrator of the androgen signaling pathway in prostate cancer." *Genes Dev*.

Auprich, M., A. Bjartell, F. K. Chun, A. de la Taille, S. J. Freedland, A. Haese, J. Schalken, A. Stenzl, B. Tombal and H. van der Poel (2011). "Contemporary role of prostate cancer antigen 3 in the management of prostate cancer." *Eur Urol* 60(5): 1045-1054.

Aus, G., G. Ahlgren, S. Bergdahl and J. Hugosson (1996). "Infection after transrectal core biopsies of the prostate--risk factors and antibiotic prophylaxis." *Br J Urol* 77(6): 851-855.

Aus, G., J. E. Damber and J. Hugosson (2005). "Prostate biopsy and anaesthesia: an overview." *Scand J Urol Nephrol* 39(2): 124-129.

Autran-Gomez, A. M., R. M. Scarpa and J. Chin (2012). "High-intensity focused ultrasound and cryotherapy as salvage treatment in local radio-recurrent prostate cancer." *Urol Int* 89(4): 373-379.

Averous, J. and C. Proud (2006). "When translation meets transformation: the mTOR story." *Oncogene* 25(48): 6423-6435.

Awada, G., H. R. Kourie and A. H. Awada (2015). "Novel mechanisms and approaches in the medical therapy of solid cancers." *Discov Med* 20(108): 33-41.

Aye Thike, M. J. C., Stephanie Fook-Chong, Puay Hoon Tan, Aye (2001). "Immunohistochemical expression of hormone receptors in invasive breast carcinoma: correlation of results of H-score with pathological parameters." *Pathology* 33(1): 21-25.

Baselga, J., M. Campone, M. Piccart, H. A. Burris III, H. S. Rugo, T. Sahmoud, S. Noguchi, M. Gnant, K. I. Pritchard and F. Lebrun (2012). "Everolimus in postmenopausal hormone-receptor-positive advanced breast cancer." *New England Journal of Medicine* 366(6): 520-529.

Becker, N. (2011). "Epidemiologie des Prostatakarzinoms." *Der Radiologe* 51(11): 922-929.

Beenken, S. W., W. E. Grizzle, D. R. Crowe, M. G. Conner, H. L. Weiss, M. T. Sellers, H. Krontiras, M. M. Urist and K. I. Bland (2001). "Molecular biomarkers for breast cancer prognosis: coexpression of c-erbB-2 and p53." *Annals of surgery* 233(5): 630.

Benjamin, D., M. Colombi, C. Moroni and M. N. Hall (2011). "Rapamycin passes the torch: a new generation of mTOR inhibitors." *Nature reviews Drug discovery* 10(11): 868-880.

- Berney, D., A. Gopalan, S. Kudahetti, G. Fisher, L. Ambroisine, C. Foster, V. Reuter, J. Eastham, H. Moller and M. Kattan (2009). "Ki-67 and outcome in clinically localised prostate cancer: analysis of conservatively treated prostate cancer patients from the Trans-Atlantic Prostate Group study." *British journal of cancer* 100(6): 888.
- Berruti, A., L. Dogliotti, M. Tucci, R. Tarabuzzi, D. Fontana and A. Angeli (2001). "Metabolic bone disease induced by prostate cancer: rationale for the use of bisphosphonates." *The Journal of urology* 166(6): 2023-2031.
- Bertoldo, F., F. Silvestris, T. Ibrahim, F. Cognetti, D. Generali, C. I. Ripamonti, D. Amadori, M. A. Colleoni, P. Conte and L. Del Mastro (2014). "Targeting bone metastatic cancer: Role of the mTOR pathway." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer* 1845(2): 248-254.
- Bhagwat, S. V., P. C. Gokhale, A. P. Crew, A. Cooke, Y. Yao, C. Mantis, J. Kahler, J. Workman, M. Bittner and L. Dudkin (2011). "Preclinical characterization of OSI-027, a potent and selective inhibitor of mTORC1 and mTORC2: distinct from rapamycin." *Molecular cancer therapeutics* 10(8): 1394-1406.
- Bill-Axelson, A., L. Holmberg, F. Filén, M. Ruutu, H. Garmo, C. Busch, S. Nordling, M. Häggman, S.-O. Andersson and S. Bratell (2008). "Radical prostatectomy versus watchful waiting in localized prostate cancer: the Scandinavian prostate cancer group-4 randomized trial." *Journal of the National Cancer Institute* 100(16): 1144-1154.
- Bill-Axelson, A., L. Holmberg, M. Ruutu, M. Häggman, S.-O. Andersson, S. Bratell, A. Spångberg, C. Busch, S. Nordling and H. Garmo (2005). "Radical prostatectomy versus watchful waiting in early prostate cancer." *New England Journal of Medicine* 352(19): 1977-1984.
- Bitting, R. L. and A. J. Armstrong (2013). "Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in castration-resistant prostate cancer." *Endocrine-related cancer* 20(3): R83-R99.
- Bjornsti, M.-A. and P. J. Houghton (2004). "The TOR pathway: a target for cancer therapy." *Nature Reviews Cancer* 4(5): 335-348.
- Boffa, D. J., F. Luan, D. Thomas, H. Yang, V. K. Sharma, M. Lagman and M. Suthanthiran (2004). "Rapamycin inhibits the growth and metastatic progression of non-small cell lung cancer." *Clinical cancer research* 10(1): 293-300.
- Bosotti, R., A. Isacchi and E. L. Sonnhammer (2000). "FAT: a novel domain in PIK-related kinases." *Trends in biochemical sciences* 25(5): 225-227.
- Bostwick, D. G. (1995). "High grade prostatic intraepithelial neoplasia. The most likely precursor of prostate cancer." *Cancer* 75(S7): 1823-1836.
- Brawley, O. W., D. P. Ankerst and I. M. Thompson (2009). "Screening for prostate cancer." *CA: a cancer journal for clinicians* 59(4): 264-273.



Brimo, F., R. Montironi, L. Egevad, A. Erbersdobler, D. W. Lin, J. B. Nelson, M. A. Rubin, T. van der Kwast, M. Amin and J. I. Epstein (2013). "Contemporary grading for prostate cancer: implications for patient care." *European urology* 63(5): 892-901.

Brooks, D. D., A. M. Wolf, R. A. Smith, C. Dash and I. Guessous (2010). "Prostate cancer screening 2010: updated recommendations from the American Cancer Society." *Journal of the National Medical Association* 102(5): 423-429.

Brunet, A., A. Bonni, M. J. Zigmund, M. Z. Lin, P. Juo, L. S. Hu, M. J. Anderson, K. C. Arden, J. Blenis and M. E. Greenberg (1999). "Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor." *cell* 96(6): 857-868.

Cabot, R. C., N. L. Harris, E. S. Rosenberg, J.-A. O. Shepard, A. M. Cort, S. H. Ebeling, E. K. McDonald, H. I. Scher, K. Fizazi and F. Saad (2012). "Increased survival with enzalutamide in prostate cancer after chemotherapy." *New England Journal of Medicine* 367(13): 1187-1197.

Cam, H., J. B. Easton, A. High and P. J. Houghton (2010). "mTORC1 signaling under hypoxic conditions is controlled by ATM-dependent phosphorylation of HIF-1 $\alpha$ ." *Molecular cell* 40(4): 509-520.

Cardone, M. H., N. Roy, H. R. Stennicke, G. S. Salvesen, T. F. Franke, E. Stanbridge, S. Frisch and J. C. Reed (1998). "Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation." *Science* 282(5392): 1318-1321.

Carew, J. S., K. R. Kelly and S. T. Nawrocki (2011). "Mechanisms of mTOR inhibitor resistance in cancer therapy." *Targeted oncology* 6(1): 17-27.

Carroll, P. R., J. K. Parsons, G. Andriole, R. R. Bahnson, E. P. Castle, W. J. Catalona, D. M. Dahl, J. W. Davis, J. I. Epstein and R. B. Etzioni (2016). "NCCN guidelines insights: prostate cancer early detection, version 2.2016." *Journal of the National Comprehensive Cancer Network* 14(5): 509-519.

Carter, B. S., T. H. Beaty, G. D. Steinberg, B. Childs and P. C. Walsh (1992). "Mendelian inheritance of familial prostate cancer." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(8): 3367-3371.

Carver, B. S., C. Chapinski, J. Wongvipat, H. Hieronymus, Y. Chen, S. Chandarlapaty, V. K. Arora, C. Le, J. Koutcher and H. Scher (2011). "Reciprocal feedback regulation of PI3K and androgen receptor signaling in PTEN-deficient prostate cancer." *Cancer cell* 19(5): 575-586.

Castellvi, J., A. Garcia, F. Rojo, C. Ruiz-Marcellan, A. Gil, J. Baselga and S. Ramon y Cajal (2006). "Phosphorylated 4E binding protein 1: a hallmark of cell signaling that correlates with survival in ovarian cancer." *Cancer* 107(8): 1801-1811.

Catalona, W. J., J. P. Richie, F. R. Ahmann, M. A. Hudson, P. T. Scardino, R. C. Flanigan, J. B. deKernion, T. L. Ratliff, L. R. Kavoussi, B. L. Dalkin and et al. (1994). "Comparison of digital rectal examination and serum prostate specific antigen in the early detection of

prostate cancer: results of a multicenter clinical trial of 6,630 men." *J Urol* 151(5): 1283-1290.

Cejka, D., S. Hayer, B. Niederreiter, W. Sieghart, T. Fuereder, J. Zwerina and G. Schett (2010). "Mammalian target of rapamycin signaling is crucial for joint destruction in experimental arthritis and is activated in osteoclasts from patients with rheumatoid arthritis." *Arthritis & Rheumatology* 62(8): 2294-2302.

Chan, J. M., E. Giovannucci, S. O. Andersson, J. Yuen, H. O. Adami and A. Wolk (1998). "Dairy products, calcium, phosphorous, vitamin D, and risk of prostate cancer (Sweden)." *Cancer Causes Control* 9(6): 559-566.

Chan, J. M., M. J. Stampfer, J. Ma, P. H. Gann, J. M. Gaziano and E. L. Giovannucci (2001). "Dairy products, calcium, and prostate cancer risk in the Physicians' Health Study." *Am J Clin Nutr* 74(4): 549-554.

Chen, K., J. Mo, M. Zhou, G. Wang, G. Wu, H. Chen, K. Zhang and H. Yang (2014). "Expression of PTEN and mTOR in sacral chordoma and association with poor prognosis." *Med Oncol* 31(4): 886.

Chiang, G. G. and R. T. Abraham (2005). "Phosphorylation of mammalian target of rapamycin (mTOR) at Ser-2448 is mediated by p70S6 kinase." *Journal of Biological Chemistry* 280(27): 25485-25490.

Ching, C. B. and D. E. Hansel (2010). "Expanding therapeutic targets in bladder cancer: the PI3K/Akt/mTOR pathway." *Laboratory investigation* 90(10): 1406-1414.

Choi, C. H., J.-S. Lee, S. R. Kim, T.-J. Kim, J.-W. Lee, B.-G. Kim and D.-S. Bae (2010). "Clinical significance of pmTOR expression in endometrioid endometrial carcinoma." *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 153(2): 207-210.

Choi, J., J. Chen, S. L. Schreiber and J. Clardy (1996). "Structure of the FKBP12-rapamycin complex interacting with binding domain of human FRAP." *Science* 273(5272): 239-242.

Chow, H., P. M. Ghosh, R. deVere White, C. P. Evans, M. A. Dall'Era, S. A. Yap, Y. Li, L. A. Beckett, P. N. Lara and C. X. Pan (2016). "A phase 2 clinical trial of everolimus plus bicalutamide for castration-resistant prostate cancer." *Cancer* 122(12): 1897-1904.

Chuang, W.-Y., C.-J. Yeh, Y.-C. Wu, Y.-K. Chao, Y.-H. Liu, C.-K. Tseng, H.-K. Chang, H.-P. Liu and C. Hsueh (2009). "Tumor cell expression of podoplanin correlates with nodal metastasis in esophageal squamous cell carcinoma."

Ciccarese, C., F. Massari, R. Iacovelli, M. Fiorentino, R. Montironi, V. Di Nunno, F. Giunchi, M. Brunelli and G. Tortora (2017). "Prostate cancer heterogeneity: Discovering novel molecular targets for therapy." *Cancer Treat Rev* 54: 68-73.

Cinar, B., A. De Benedetti and M. R. Freeman (2005). "Post-transcriptional regulation of the androgen receptor by Mammalian target of rapamycin." *Cancer research* 65(7): 2547-2553.

Clemons, M., K. Gelmon, K. Pritchard and A. Paterson (2012). "Bone-targeted agents and skeletal-related events in breast cancer patients with bone metastases: the state of the art." *Current Oncology* 19(5): 259.

Coleman, R. (2001). "Metastatic bone disease: clinical features, pathophysiology and treatment strategies." *Cancer treatment reviews* 27(3): 165-176.

Conciatori, F., L. Ciuffreda, C. Bazzichetto, I. Falcone, S. Pilotto, E. Bria, F. Cognetti and M. Milella (2018). "mTOR Cross-Talk in Cancer and Potential for Combination Therapy." *Cancers* 10(1): 23.

Copp, J., G. Manning and T. Hunter (2009). "TORC-specific phosphorylation of mammalian target of rapamycin (mTOR): phospho-Ser2481 is a marker for intact mTOR signaling complex 2." *Cancer research* 69(5): 1821-1827.

Cordon-Cardo, C., A. Kotsianti, D. A. Verbel, M. Teverovskiy, P. Capodieci, S. Hamann, Y. Jeffers, M. Clayton, F. Elkhettabi and F. M. Khan (2007). "Improved prediction of prostate cancer recurrence through systems pathology." *The Journal of clinical investigation* 117(7): 1876-1883.

Courtney, K. D., J. B. Manola, A. A. Elfiky, R. Ross, W. K. Oh, J. T. Yap, A. D. Van den Abbeele, C. W. Ryan, T. M. Beer and M. Loda (2015). "A phase I study of everolimus and docetaxel in patients with castration-resistant prostate cancer." *Clinical genitourinary cancer* 13(2): 113-123.

Crawford, E. D. (2003). "Epidemiology of prostate cancer." *Urology* 62(6 Suppl 1): 3-12.

Crino, P. B., K. L. Nathanson and E. P. Henske (2006). "The tuberous sclerosis complex." *New England Journal of Medicine* 355(13): 1345-1356.

Cuzick, J., M. A. Thorat, G. Andriole, O. W. Brawley, P. H. Brown, Z. Culig, R. A. Eeles, L. G. Ford, F. C. Hamdy, L. Holmberg, D. Ilic, T. J. Key, C. La Vecchia, H. Lilja, M. Marberger, F. L. Meyskens, L. M. Minasian, C. Parker, H. L. Parnes, S. Perner, H. Rittenhouse, J. Schalken, H. P. Schmid, B. J. Schmitz-Drager, F. H. Schroder, A. Stenzl, B. Tombal, T. J. Wilt and A. Wolk (2014). "Prevention and early detection of prostate cancer." *Lancet Oncol* 15(11): e484-492.

Dabbs, D. J. (2013). *Diagnostic immunohistochemistry*, Elsevier Health Sciences.

Dai, B., Y. Y. Kong, D. W. Ye, C. G. Ma, X. Zhou and X. D. Yao (2009). "Activation of the mammalian target of rapamycin signalling pathway in prostate cancer and its association with patient clinicopathological characteristics." *BJU international* 104(7): 1009-1016.

- Damber, J. E. and G. Aus (2008). "Prostate cancer." *Lancet* 371(9625): 1710-1721.
- Dancey, J. E. (2005). "Inhibitors of the mammalian target of rapamycin." *Expert opinion on investigational drugs* 14(3): 313-328.
- Dann, S. G., A. Selvaraj and G. Thomas (2007). "mTOR Complex1-S6K1 signaling: at the crossroads of obesity, diabetes and cancer." *Trends Mol Med* 13(6): 252-259.
- Darb-Esfahani, S., A. Faggad, A. Noske, W. Weichert, A.-C. Buckendahl, B. Müller, J. Budczies, A. Röske, M. Dietel and C. Denkert (2009). "Phospho-mTOR and phospho-4EBP1 in endometrial adenocarcinoma: association with stage and grade in vivo and link with response to rapamycin treatment in vitro." *Journal of cancer research and clinical oncology* 135(7): 933-941.
- De Benedetti, A. and J. R. Graff (2004). "eIF-4E expression and its role in malignancies and metastases." *Oncogene* 23(18): 3189-3199.
- DeBerardinis, R. J., J. J. Lum, G. Hatzivassiliou and C. B. Thompson (2008). "The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation." *Cell metabolism* 7(1): 11-20.
- Denis, L., M. S. Morton and K. Griffiths (1999). "Diet and its preventive role in prostatic disease." *Eur Urol* 35(5-6): 377-387.
- Detre, S., G. S. Jotti and M. Dowsett (1995). "A " quickscore " method for immunohistochemical semiquantitation: validation for oestrogen receptor in breast carcinomas." *Journal of Clinical Pathology* 48(9): 876-878.
- Dhanasekaran, S. M., T. R. Barrette, D. Ghosh, R. Shah, S. Varambally, K. Kurachi, K. J. Pienta, M. A. Rubin and A. M. Chinnaiyan (2001). "Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer." *Nature* 412(6849): 822-826.
- Di Leo, A., K. S. Lee, E. Ciruelos, P. Lønning, W. Janni, R. O'Regan, M. M. Reynier, D. Kalev, D. Egle and T. Csoszi (2017). Abstract S4-07: BELLE-3: A phase III study of buparlisib+ fulvestrant in postmenopausal women with HR+, HER2-, aromatase inhibitor-treated, locally advanced or metastatic breast cancer, who progressed on or after mTOR inhibitor-based treatment, AACR.
- Dienstmann, R., J. Rodon, V. Serra and J. Tabernero (2014). "Picking the point of inhibition: a comparative review of PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitors." *Molecular cancer therapeutics* 13(5): 1021-1031.
- Ding, M., T. H. Van der Kwast, R. N. Vellanki, W. D. Foltz, T. D. McKee, N. Sonenberg, P. P. Pandolfi, M. Koritzinsky and B. G. Wouters (2018). "The mTOR Targets 4E-BP1/2 Restrains Tumor Growth and Promotes Hypoxia Tolerance in PTEN-driven Prostate Cancer." *Molecular Cancer Research: molcanres*. 0696.2017.

Dodd, K., J. Yang, M. Shen, J. Sampson and A. Tee (2015). "mTORC1 drives HIF-1 $\alpha$  and VEGF-A signalling via multiple mechanisms involving 4E-BP1, S6K1 and STAT3." *Oncogene* 34(17): 2239-2250.

Donovan, J., F. Hamdy, D. Neal, T. Peters, S. Oliver, L. Brindle, D. Jewell, P. Powell, D. Gillatt, D. Dedman, N. Mills, M. Smith, S. Noble and A. Lane (2003). "Prostate Testing for Cancer and Treatment ( ProtecT) feasibility study." *Health Technol Assess* 7(14): 1-88.

Draisma, G., R. Etzioni, A. Tsodikov, A. Mariotto, E. Wever, R. Gulati, E. Feuer and H. de Koning (2009). "Lead time and overdiagnosis in prostate-specific antigen screening: importance of methods and context." *J Natl Cancer Inst* 101(6): 374-383.

Eberli, D., A. Mortezaei and T. Sulser (2014). "[Focal therapy-a new era in the treatment of prostate cancer]." *Praxis (Bern 1994)* 103(7): 391-397.

Ebert, T., J. E. Altwein and M. Wirth (2001). "Primäre Hormontherapie beim fortgeschrittenen Prostatakarzinom." *Deutsches Arzteblatt-Arztliche Mitteilungen-Ausgabe A* 98(5): 255-258.

Edlind, M. P. and A. C. Hsieh (2014). "PI3K-AKT-mTOR signaling in prostate cancer progression and androgen deprivation therapy resistance." *Asian J Androl* 16(3): 378-386.

Efeyan, A. and D. M. Sabatini (2010). "mTOR and cancer: many loops in one pathway." *Current opinion in cell biology* 22(2): 169-176.

Ellinger, S., J. Ellinger, S. Müller and P. Stehle (2009). "Tomaten und Lycopin in Prävention und Therapie–Gibt es eine Evidenz bei Prostataerkrankungen?" *Aktuelle Urologie* 40(01): 37-43.

Emmenegger, U., C. M. Booth, S. Berry, S. S. Sridhar, E. Winkvist, N. Bandali, A. Chow, C. Lee, P. Xu and S. Man (2015). "Temsirrolimus maintenance therapy after docetaxel induction in castration-resistant prostate cancer." *The oncologist* 20(12): 1351-1352.

Epstein, J. I. (2010). "An update of the Gleason grading system." *The Journal of urology* 183(2): 433-440.

Epstein, J. I., W. C. Allsbrook, Jr., M. B. Amin and L. L. Egevad (2005). "The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma." *Am J Surg Pathol* 29(9): 1228-1242.

Epstein, J. I., L. Egevad, M. B. Amin, B. Delahunt, J. R. Srigley and P. A. Humphrey (2016). "The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) consensus conference on Gleason grading of prostatic carcinoma." *The American journal of surgical pathology* 40(2): 244-252.

Evren, S., A. Dermen, G. Lockwood, N. Fleshner and J. Sweet (2010). "Immunohistochemical examination of the mTORC1 pathway in high grade prostatic

intraepithelial neoplasia (HGPIN) and prostatic adenocarcinomas (PCa): a tissue microarray study (TMA)." *The Prostate* 70(13): 1429-1436.

Fahlenkamp, D., W. Müller, B. Schönberger and S. Loening (1997). "Laparoskopische pelvine Lymphadenektomie (LPLA) in der Diagnostik des lokoregionären Prostatakarzinoms." *Aktuelle Urologie* 28(01): 35-42.

Faivre, S., G. Kroemer and E. Raymond (2006). "Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents." *Nature reviews Drug discovery* 5(8): 671.

Feldman, M. E., B. Apsel, A. Uotila, R. Loewith, Z. A. Knight, D. Ruggero and K. M. Shokat (2009). "Active-site inhibitors of mTOR target rapamycin-resistant outputs of mTORC1 and mTORC2." *PLoS Biol* 7(2): e1000038.

Ferlay, J., H. R. Shin, F. Bray, D. Forman, C. Mathers and D. M. Parkin (2010). "Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008." *Int J Cancer* 127(12): 2893-2917.

Ferrandiz-Pulido, C., E. Masferrer, A. Toll, J. Hernandez-Losa, S. Mojal, R. M. Pujol, S. R. y Cajal, I. de Torres and V. Garcia-Patos (2013). "mTOR signaling pathway in penile squamous cell carcinoma: pmTOR and peIF4E over expression correlate with aggressive tumor behavior." *The Journal of urology* 190(6): 2288-2295.

Fingar, D. C., C. J. Richardson, A. R. Tee, L. Cheatham, C. Tsou and J. Blenis (2004). "mTOR controls cell cycle progression through its cell growth effectors S6K1 and 4E-BP1/eukaryotic translation initiation factor 4E." *Molecular and cellular biology* 24(1): 200-216.

Fingar, D. C., S. Salama, C. Tsou, E. Harlow and J. Blenis (2002). "Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E." *Genes & development* 16(12): 1472-1487.

Fizazi, K., N. Tran, L. E. Fein, N. Matsubara, A. Rodríguez Antolín, B. Y. Alekseev, M. Ozguroglu, D. Ye, S. Feyerabend and A. Protheroe (2017). LATITUDE: A phase III, double-blind, randomized trial of androgen deprivation therapy with abiraterone acetate plus prednisone or placebos in newly diagnosed high-risk metastatic hormone-naïve prostate cancer, American Society of Clinical Oncology.

Floc'h, N., C. W. Kinkade, T. Kobayashi, A. Aytes, C. Lefebvre, A. Mitrofanova, R. D. Cardiff, A. Califano, M. M. Shen and C. Abate-Shen (2012). "Dual targeting of the Akt/mTOR signaling pathway inhibits castration-resistant prostate cancer in a genetically engineered mouse model." *Cancer research* 72(17): 4483-4493.

Flynn, A. and C. G. Proud (1995). "The role of eIF4 in cell proliferation." *Cancer surveys* 27: 293-310.

Francini, E., A. I. Fiaschi, R. Petrioli, L. Laera, V. Bianco, R. Ponchietti and G. Roviello (2015). "Tolerability of cabazitaxel in patients with metastatic castration-resistant

prostate cancer progressing after docetaxel and abiraterone acetate: a single-institution experience." *Anticancer Drugs*.

Franke, T. F., C. P. Hornik, L. Segev, G. A. Shostak and C. Sugimoto (2003). "PI3K/Akt and apoptosis: size matters." *Oncogene* 22(56): 8983-8998.

Frias, M. A., C. C. Thoreen, J. D. Jaffe, W. Schroder, T. Sculley, S. A. Carr and D. M. Sabatini (2006). "mSin1 is necessary for Akt/PKB phosphorylation, and its isoforms define three distinct mTORC2s." *Current Biology* 16(18): 1865-1870.

Furic, L., L. Rong, O. Larsson, I. H. Koumakpayi, K. Yoshida, A. Brueschke, E. Petroulakis, N. Robichaud, M. Pollak and L. A. Gaboury (2010). "eIF4E phosphorylation promotes tumorigenesis and is associated with prostate cancer progression." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(32): 14134-14139.

García-Echeverría, C. (2010). "Allosteric and ATP-competitive kinase inhibitors of mTOR for cancer treatment." *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 20(15): 4308-4312.

Ghafoori, M., M. Velayati, M. Aliyari Ghasabeh, M. Shakiba and M. Alavi (2015). "Prostate Biopsy Using Transrectal Ultrasonography; The Optimal Number of Cores Regarding Cancer Detection Rate and Complications." *Iran J Radiol* 12(2): e13257.

Ghobrial, I. M., T. E. Witzig and A. A. Adjei (2005). "Targeting apoptosis pathways in cancer therapy." *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 55(3): 178-194.

Ghosh, P. M., S. N. Malik, R. G. Bedolla, Y. Wang, M. Mikhailova, T. J. Prihoda, D. A. Troyer and J. I. Kreisberg (2005). "Signal transduction pathways in androgen-dependent and-independent prostate cancer cell proliferation." *Endocrine-related cancer* 12(1): 119-134.

Giguere, V. (2018). "Canonical signaling and nuclear activity of mTOR-a teamwork effort to regulate metabolism and cell growth." *Febs j*.

Gillessen and Strasser (2006). "Therapiemöglichkeiten bei fortgeschrittenem Prostatakarzinom: Treatment for patients with advanced prostate cancer." *Therapeutische Umschau* 63(2): 157-162.

Gingras, A.-C., B. Raught and N. Sonenberg (2001). "Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR." *Genes & development* 15(7): 807-826.

Giovannucci, E., Y. Liu, E. A. Platz, M. J. Stampfer and W. C. Willett (2007). "Risk factors for prostate cancer incidence and progression in the health professionals follow-up study." *International Journal of Cancer* 121(7): 1571-1578.

Glantschnig, H., J. Fisher, G. Wesolowski, G. Rodan and A. Reszka (2003). "M-CSF, TNF $\alpha$  and RANK ligand promote osteoclast survival by signaling through mTOR/S6 kinase." *Cell death and differentiation* 10(10): 1165.

- Gleason, D. F. (1992). "Histologic grading of prostate cancer: a perspective." *Hum Pathol* 23(3): 273-279.
- Graefen, M., H. Huland, L. Pientka, K. Miller and H. Rübber (2004). "Serie Prostatakarzinom: Indikation zur kurativen Therapie des Prostatakarzinoms. Stellenwert von Nomogrammen in der Prognoseabschätzung und Therapieberatung." *Dtsch Arztebl* 101: 2619-2622.
- Graff, J. R., B. W. Konicek, R. L. Lynch, C. A. Dumstorf, M. S. Dowless, A. M. McNulty, S. H. Parsons, L. H. Brail, B. M. Colligan and J. W. Koop (2009). "eIF4E activation is commonly elevated in advanced human prostate cancers and significantly related to reduced patient survival." *Cancer research* 69(9): 3866-3873.
- Graff, J. R., B. W. Konicek, T. M. Vincent, R. L. Lynch, D. Monteith, S. N. Weir, P. Schwier, A. Capen, R. L. Goode and M. S. Dowless (2007). "Therapeutic suppression of translation initiation factor eIF4E expression reduces tumor growth without toxicity." *The Journal of clinical investigation* 117(117 (9)): 2638-2648.
- Graham, L., K. Banda, A. Torres, B. S. Carver, Y. Chen, K. Pisano, G. Shelkey, T. Curley, H. I. Scher and T. L. Lotan (2018). "A phase II study of the dual mTOR inhibitor MLN0128 in patients with metastatic castration resistant prostate cancer." *Investigational new drugs*: 1-10.
- Grant, S. (2008). "Cotargeting survival signaling pathways in cancer." *The Journal of clinical investigation* 118(9): 3003.
- Gronberg, H. (2003). "Prostate cancer epidemiology." *Lancet* 361(9360): 859-864.
- Gross, M. E., T. B. Dorff, D. I. Quinn, P. M. Diaz, O. O. Castellanos and D. B. Agus (2018). "Safety and Efficacy of Docetaxel, Bevacizumab, and Everolimus for Castration-resistant Prostate Cancer (CRPC)." *Clinical genitourinary cancer* 16(1): e11-e21.
- Group, P. C. T. C. (2000). "Maximum androgen blockade in advanced prostate cancer: an overview of the randomised trials." *The Lancet* 355(9214): 1491-1498.
- Guertin, D. A. and D. M. Sabatini (2005). "An expanding role for mTOR in cancer." *Trends in molecular medicine* 11(8): 353-361.
- Guertin, D. A. and D. M. Sabatini (2007). "Defining the role of mTOR in cancer." *Cancer cell* 12(1): 9-22.
- Guertin, D. A. and D. M. Sabatini (2009). "The pharmacology of mTOR inhibition." *Sci Signal* 2(67): e24.
- Guertin, D. A., D. M. Stevens, M. Saitoh, S. Kinkel, K. Crosby, J.-H. Sheen, D. J. Mullholland, M. A. Magnuson, H. Wu and D. M. Sabatini (2009). "mTOR complex 2 is required for the development of prostate cancer induced by Pten loss in mice." *Cancer cell* 15(2): 148-159.



- Gulhati, P., K. A. Bowen, J. Liu, P. D. Stevens, P. G. Rychahou, M. Chen, E. Y. Lee, H. L. Weiss, K. L. O'Connor and T. Gao (2011). "mTORC1 and mTORC2 regulate EMT, motility, and metastasis of colorectal cancer via RhoA and Rac1 signaling pathways." *Cancer research* 71(9): 3246-3256.
- Haberland, J., J. Bertz, U. Wolf, T. Ziese and B. M. Kurth (2010). "German cancer statistics 2004." *BMC Cancer* 10: 52.
- Haese, A., A. de la Taille, H. van Poppel, M. Marberger, A. Stenzl, P. F. Mulders, H. Huland, C. C. Abbou, M. Remzi, M. Tinzl, S. Feyerabend, A. B. Stillebroer, M. P. van Gils and J. A. Schalken (2008). "Clinical utility of the PCA3 urine assay in European men scheduled for repeat biopsy." *Eur Urol* 54(5): 1081-1088.
- Haffner, M. C., T. Mosbrugger, D. M. Esopi, H. Fedor, C. M. Heaphy, D. A. Walker, N. Adejola, M. Gürel, J. Hicks and A. K. Meeker (2013). "Tracking the clonal origin of lethal prostate cancer." *The Journal of clinical investigation* 123(11): 4918-4922.
- Hakenberg, O., M. Wirth, T. Hermann, P. Alken, G. Kovacs, R. Müller, L. Ahlemann and K. Schalkhäuser (2003). "Recommendations for the treatment of localized prostate cancer by permanent interstitial brachytherapy." *Urologia internationalis* 70(1): 15-20.
- Hammes, C., E. Heinrich, T. Lingenfelder and C. Cotic (2015). *BASICS Urologie*, "Elsevier, Urban&FischerVerlag".
- Hara, K., Y. Maruki, X. Long, K.-i. Yoshino, N. Oshiro, S. Hidayat, C. Tokunaga, J. Avruch and K. Yonezawa (2002). "Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action." *Cell* 110(2): 177-189.
- Harris, R. and K. N. Lohr (2002). "Screening for prostate cancer: an update of the evidence for the U.S. Preventive Services Task Force." *Ann Intern Med* 137(11): 917-929.
- Hartwich, J. E., W. S. Orr, C. Y. Ng, Y. Spence, J. M. McLaughlin, W. L. Furman, L. M. McGregor and A. M. Davidoff (2013). "Rapamycin increases neuroblastoma xenograft and host stromal derived osteoprotegerin inhibiting osteolytic bone disease in a bone metastasis model." *Journal of pediatric surgery* 48(1): 47-55.
- Harvei, S., K. S. Bjerve, S. Tretli, E. Jellum, T. E. Røsbjerg and L. Vatten (1997). "Prediagnostic level of fatty acids in serum phospholipids: omega-3 and omega-6 fatty acids and the risk of prostate cancer." *Int J Cancer* 71(4): 545-551.
- Hautmann, R. and J. E. Gschwend (2014). *Urologie*, Springer-Verlag.
- Hautmann, R., R. Küfer and M. Bamberg (2007). "Prostatakarzinom." *Der Onkologe* 13(8): 667-668.
- Hay, N. and N. Sonenberg (2004). "Upstream and downstream of mTOR." *Genes & development* 18(16): 1926-1945.

Heidenreich, A., G. Aus, M. Bolla, S. Joniau, V. B. Matveev, H. P. Schmid and F. Zattoni (2008). "EAU guidelines on prostate cancer." *Eur Urol* 53(1): 68-80.

Heidenreich, A., P. J. Bastian, J. Bellmunt, M. Bolla, S. Joniau, T. van der Kwast, M. Mason, V. Matveev, T. Wiegel, F. Zattoni and N. Mottet (2014). "EAU guidelines on prostate cancer. Part II: Treatment of advanced, relapsing, and castration-resistant prostate cancer." *Eur Urol* 65(2): 467-479.

Heni, M., J. Hennenlotter, M. Scharpf, S. Z. Lutz, C. Schwentner, T. Todenhöfer, D. Schilling, U. Kühns, V. Gerber and F. Machicao (2012). "Insulin receptor isoforms A and B as well as insulin receptor substrates-1 and-2 are differentially expressed in prostate cancer." *PloS one* 7(12): e50953.

Herberger, B., H. Puhalla, M. Lehnert, F. Wrba, S. Novak, A. Brandstetter, B. Gruenberger, T. Gruenberger, R. Pirker and M. Filipits (2007). "Activated mammalian target of rapamycin is an adverse prognostic factor in patients with biliary tract adenocarcinoma." *Clinical Cancer Research* 13(16): 4795-4799.

Herbert, T. P., R. Fåhræus, A. Prescott, D. P. Lane and C. G. Proud (2000). "Rapid induction of apoptosis mediated by peptides that bind initiation factor eIF4E." *Current Biology* 10(13): 793-796.

Hergan, L., C. Kashefi and J. K. Parsons (2007). "Local anesthetic reduces pain associated with transrectal ultrasound-guided prostate biopsy: a meta-analysis." *Urology* 69(3): 520-525.

Hietakangas, V. and S. M. Cohen (2008). "TOR complex 2 is needed for cell cycle progression and anchorage-independent growth of MCF7 and PC3 tumor cells." *BMC cancer* 8(1): 282.

Hirashima, K., Y. Baba, M. Watanabe, R.-i. Karashima, N. Sato, Y. Imamura, Y. Hiyoshi, Y. Nagai, N. Hayashi and K.-i. Iyama (2010). "Phosphorylated mTOR expression is associated with poor prognosis for patients with esophageal squamous cell carcinoma." *Annals of surgical oncology* 17(9): 2486-2493.

Holmberg, L., A. Bill-Axelson, F. Helgesen, J. O. Salo, P. Folmerz, M. Häggman, S.-O. Andersson, A. Spångberg, C. Busch and S. Nordling (2002). "A randomized trial comparing radical prostatectomy with watchful waiting in early prostate cancer." *New England journal of medicine* 347(11): 781-789.

Hörtl, W., W. Loidl, M. Rauchenwald, M. Müller, M. Klimpfinger, A. Schratte-Sehn and C. Brössner (2008). "Prostatabiopsie-Leitlinien des Arbeitskreises für Urologische Onkologie AUO der Österreichischen Gesellschaft für Urologie und Andrologie." *J Urol Urogynäkol* 15(4): 7-13.

Hoyt, K., B. Castaneda, M. Zhang, P. Nigwekar, P. A. di Sant'Agnese, J. V. Joseph, J. Strang, D. J. Rubens and K. J. Parker (2008). "Tissue elasticity properties as biomarkers for prostate cancer." *Cancer Biomarkers* 4(4-5): 213-225.

- Hricak, H., P. L. Choyke, S. C. Eberhardt, S. A. Leibel and P. T. Scardino (2007). "Imaging prostate cancer: a multidisciplinary perspective." *Radiology* 243(1): 28-53.
- Hsieh, A. C., M. Costa, O. Zollo, C. Davis, M. E. Feldman, J. R. Testa, O. Meyuhas, K. M. Shokat and D. Ruggero (2010). "Genetic dissection of the oncogenic mTOR pathway reveals druggable addiction to translational control via 4EBP-eIF4E." *Cancer cell* 17(3): 249-261.
- Hsieh, A. C., Y. Liu, M. P. Edlind, N. T. Ingolia, M. R. Janes, A. Sher, E. Y. Shi, C. R. Stumpf, C. Christensen and M. J. Bonham (2012). "The translational landscape of mTOR signalling steers cancer initiation and metastasis." *Nature* 485(7396): 55.
- Hsu, F. D., T. O. Nielsen, A. Alkushi, B. Dupuis, D. Huntsman, C. L. Liu, M. Van de Rijn and C. B. Gilks (2002). "Tissue microarrays are an effective quality assurance tool for diagnostic immunohistochemistry." *Modern pathology* 15(12): 1374-1380.
- Hua, H., Y. Zhu and Y. H. Song (2018). "Ruscogenin suppressed the hepatocellular carcinoma metastasis via PI3K/Akt/mTOR signaling pathway." *Biomed Pharmacother* 101: 115-122.
- Huber, S., C. Bruns, G. Schmid, P. Hermann, C. Conrad, H. Niess, R. Huss, C. Graeb, K. Jauch and C. Heeschen (2007). "Inhibition of the mammalian target of rapamycin impedes lymphangiogenesis." *Kidney international* 71(8): 771-777.
- Hudes, G., M. Carducci, P. Tomczak, J. Dutcher, R. Figlin, A. Kapoor, E. Staroslawska, J. Sosman, D. McDermott and I. Bodrogi (2007). "Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma." *New England Journal of Medicine* 356(22): 2271-2281.
- Hudson, C. C., M. Liu, G. G. Chiang, D. M. Otterness, D. C. Loomis, F. Kaper, A. J. Giaccia and R. T. Abraham (2002). "Regulation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  expression and function by the mammalian target of rapamycin." *Molecular and cellular biology* 22(20): 7004-7014.
- Hussein, O., K. Tiedemann, M. Murshed and S. V. Komarova (2012). "Rapamycin inhibits osteolysis and improves survival in a model of experimental bone metastases." *Cancer letters* 314(2): 176-184.
- Indo, Y., S. Takeshita, K. A. Ishii, T. Hoshii, H. Aburatani, A. Hirao and K. Ikeda (2013). "Metabolic regulation of osteoclast differentiation and function." *Journal of Bone and Mineral Research* 28(11): 2392-2399.
- Inoki, K., Y. Li, T. Xu and K.-L. Guan (2003). "Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling." *Genes & development* 17(15): 1829-1834.
- Inoki, K., H. Ouyang, T. Zhu, C. Lindvall, Y. Wang, X. Zhang, Q. Yang, C. Bennett, Y. Harada and K. Stankunas (2006). "TSC2 integrates Wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by AMPK and GSK3 to regulate cell growth." *Cell* 126(5): 955-968.

- Ishibashi, H., T. Suzuki, S. Suzuki, T. Moriya, C. Kaneko, T. Takizawa, M. Sunamori, M. Handa, T. Kondo and H. Sasano (2003). "Sex steroid hormone receptors in human thymoma." *J Clin Endocrinol Metab* 88(5): 2309-2317.
- Iwenofu, O. H., R. D. Lackman, A. P. Staddon, D. G. Goodwin, H. M. Haupt and J. S. Brooks (2008). "Phospho-S6 ribosomal protein: a potential new predictive sarcoma marker for targeted mTOR therapy." *Modern Pathology* 21(3): 231-237.
- Jacinto, E., V. Facchinetti, D. Liu, N. Soto, S. Wei, S. Y. Jung, Q. Huang, J. Qin and B. Su (2006). "SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity." *Cell* 127(1): 125-137.
- Jacinto, E., R. Loewith, A. Schmidt, S. Lin, M. A. Rüegg, A. Hall and M. N. Hall (2004). "Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive." *Nature cell biology* 6(11): 1122-1128.
- Jacobs, S. C. (1983). "Spread of prostatic cancer to bone." *Urology* 21(4): 337-344.
- James, N. D., M. R. Sydes, N. W. Clarke, M. D. Mason, D. P. Dearnaley, M. R. Spears, A. W. Ritchie, C. C. Parker, J. M. Russell and G. Attard (2016). "Addition of docetaxel, zoledronic acid, or both to first-line long-term hormone therapy in prostate cancer (STAMPEDE): survival results from an adaptive, multiarm, multistage, platform randomised controlled trial." *The Lancet* 387(10024): 1163-1177.
- Jendrossek, V., M. Henkel, J. Hennenlotter, U. Vogel, U. Ganswindt, I. Müller, R. Handrick, A. G. Anastasiadis, M. Kuczyk and A. Stenzl (2008). "Analysis of complex protein kinase B signalling pathways in human prostate cancer samples." *BJU international* 102(3): 371-382.
- Jiang, B.-H. and L.-Z. Liu (2008). "Role of mTOR in anticancer drug resistance: perspectives for improved drug treatment." *Drug Resistance Updates* 11(3): 63-76.
- Jiao, J., S. Wang, R. Qiao, I. Vivanco, P. A. Watson, C. L. Sawyers and H. Wu (2007). "Murine cell lines derived from Pten null prostate cancer show the critical role of PTEN in hormone refractory prostate cancer development." *Cancer research* 67(13): 6083-6091.
- Johnson, S. M., P. Gulhati, B. A. Rampy, Y. Han, P. G. Rychahou, H. Q. Doan, H. L. Weiss and B. M. Evers (2010). "Novel expression patterns of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway components in colorectal cancer." *Journal of the American College of Surgeons* 210(5): 767-776.
- Jones, A. C., M. M. Shyamsundar, M. W. Thomas, J. Maynard, S. Idziaszczyk, S. Tomkins, J. R. Sampson and J. P. Cheadle (1999). "Comprehensive mutation analysis of TSC1 and TSC2—and phenotypic correlations in 150 families with tuberous sclerosis." *The American Journal of Human Genetics* 64(5): 1305-1315.
- Kaarbø, M., Ø. L. Mikkelsen, L. Malerød, S. Qu, V. H. Lobert, G. Akgul, T. Halvorsen, G. M. Mælandsmo and F. Saatcioglu (2010). "PI3K-AKT-mTOR pathway is dominant

over androgen receptor signaling in prostate cancer cells." *Analytical Cellular Pathology* 32(1-2): 11-27.

Kaatsch, P., C. Spix, S. Hentschel, A. Katalinic, S. Luttmann, C. Stegmaier, S. Caspritz, J. Cernaj, A. Ernst and J. Folkerts (2013). "Krebs in Deutschland 2009/2010."

Kaizuka, T., T. Hara, N. Oshiro, U. Kikkawa, K. Yonezawa, K. Takehana, S.-i. Iemura, T. Natsume and N. Mizushima (2010). "Tti1 and Tel2 are critical factors in mammalian target of rapamycin complex assembly." *Journal of Biological Chemistry* 285(26): 20109-20116.

Kallioniemi, O.-P., U. Wagner, J. Kononen and G. Sauter (2001). "Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer." *Human molecular genetics* 10(7): 657-662.

Kantoff, P. W., C. S. Higano, N. D. Shore, E. R. Berger, E. J. Small, D. F. Penson, C. H. Redfern, A. C. Ferrari, R. Dreicer and R. B. Sims (2010). "Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer." *New England Journal of Medicine* 363(5): 411-422.

Karakiewicz, P. I., J. A. Eastham, M. Graefen, I. Cagiannos, P. D. Stricker, E. Klein, T. Cangiano, F. H. Schröder, P. T. Scardino and M. W. Kattan (2005). "Prognostic impact of positive surgical margins in surgically treated prostate cancer: multi-institutional assessment of 5831 patients." *Urology* 66(6): 1245-1250.

Karlsson, E., G. Pérez-Tenorio, R. Amin, J. Bostner, L. Skoog, T. Fornander, D. C. Sgroi, B. Nordenskjöld, A.-L. Hallbeck and O. Stål (2013). "The mTOR effectors 4EBP1 and S6K2 are frequently coexpressed, and associated with a poor prognosis and endocrine resistance in breast cancer: a retrospective study including patients from the randomised Stockholm tamoxifen trials." *Breast Cancer Research* 15(5): R96.

Kasajima, A., M. Pavel, S. Darb-Esfahani, A. Noske, A. Stenzinger, H. Sasano, M. Dietel, C. Denkert, C. Röcken and B. Wiedenmann (2011). "mTOR expression and activity patterns in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours." *Endocrine-related cancer* 18(1): 181-192.

Kattan, M. W., T. M. Wheeler and P. T. Scardino (1999). "Postoperative nomogram for disease recurrence after radical prostatectomy for prostate cancer." *J Clin Oncol* 17(5): 1499-1507.

Keith, C. T. and S. L. Schreiber (1995). "PIK-related kinases: DNA repair, recombination, and cell cycle checkpoints." *SCIENCE-NEW YORK THEN WASHINGTON-*: 50-50.

Kerl, H., C. Garbe, L. Cerroni and H. Wolff (2013). *Histopathologie der Haut*, Springer-Verlag.

Ketelsen, D., M. Röhke, P. Aschoff, A. Merseburger, M. Lichy, M. Reimold, C. Claussen and H. Schlemmer (2008). "Nachweis ossärer Metastasen des Prostatakarzinoms-

Vergleich der Leistungsfähigkeit der Ganzkörper-MRT und der Skelettszintigrafie." *Fortschr Röntgenstr* 180(8): 746-752.

Key, M. (2006). "▪ Immunohistochemistry Staining Methods." *Education Guide Immunohistochemical Staining Methods Fourth Edition*: 47.

Kim, D.-H., D. D. Sarbassov, S. M. Ali, J. E. King, R. R. Latek, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst and D. M. Sabatini (2002). "mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery." *Cell* 110(2): 163-175.

Kim, D. H., D. D. Sarbassov, S. M. Ali, R. R. Latek, K. V. Guntur, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst and D. M. Sabatini (2003). "GbetaL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR." *Mol Cell* 11(4): 895-904.

Kinkade, C. W., M. Castillo-Martin, A. Puzio-Kuter, J. Yan, T. H. Foster, H. Gao, Y. Sun, X. Ouyang, W. L. Gerald and C. Cordon-Cardo (2008). "Targeting AKT/mTOR and ERK MAPK signaling inhibits hormone-refractory prostate cancer in a preclinical mouse model." *The Journal of clinical investigation* 118(9): 3051-3064.

Klintmalm, G. B. and B. Nashan (2014). "The role of mTOR inhibitors in liver transplantation: reviewing the evidence." *Journal of transplantation* 2014.

Kneissel, M., N.-H. Luong-Nguyen, M. Baptist, R. Cortesi, S. Zumstein-Mecker, S. Kossida, T. O'Reilly, H. Lane and M. Susa (2004). "Everolimus suppresses cancellous bone loss, bone resorption, and cathepsin K expression by osteoclasts." *Bone* 35(5): 1144-1156.

Knorr, K., M. Eiber, T. Maurer, H.-J. Wester and K. Scheidhauer (2017). "PET-CT/-MRT der Prostata." *Der Radiologe* 57(8).

Ko, Y. H., H. Miyake, H. M. Behnsawy, J. Cheon and M. Fujisawa (2014). "Limited significance of activated Akt-mammalian target of rapamycin signaling pathway in prostate cancer progression." *Urol Int* 93(2): 146-151.

Kobayashi, S., T. Kishimoto, S. Kamata, M. Otsuka, M. Miyazaki and H. Ishikura (2007). "Rapamycin, a specific inhibitor of the mammalian target of rapamycin, suppresses lymphangiogenesis and lymphatic metastasis." *Cancer science* 98(5): 726-733.

Kononen, J., L. Bubendorf, A. Kallionimeni, M. Bärlund, P. Schraml, S. Leighton, J. Torhorst, M. J. Mihatsch, G. Sauter and O.-P. Kallionimeni (1998). "Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens." *Nature medicine* 4(7): 844-847.

Konstantinidis, I. T., A. L. Warshaw, J. N. Allen, L. S. Blaszkowsky, C. Fernandez-del Castillo, V. Deshpande, T. S. Hong, E. L. Kwak, G. Y. Lauwers and D. P. Ryan (2013). "Pancreatic ductal adenocarcinoma: is there a survival difference for R1 resections versus locally advanced unresectable tumors? What is a "true" R0 resection?" *Annals of surgery* 257(4): 731-736.

- Korzeniewski, N., M. Tapia-Laliena, Y. Tolstov, S. Pahernik, B. Hadaschik, M. Hohenfellner and S. Duensing (2013). "Neue präklinische Modelle und Biomarker beim Prostatakarzinom." *Der Urologe* 52(9): 1256-1260.
- Kramer, M. W., A. S. Merseburger, J. Hennenlotter and M. Kuczyk (2007). "Tissue microarrays in clinical urology—Technical considerations." *Scandinavian journal of urology and nephrology* 41(6): 478-484.
- Krebsgesellschaft, D. and A. Deutsche Krebshilfe (2016). Leitlinienprogramm Onkologie. Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms, Langversion 3.1, 2014 AWMF Registernummer: 034/022OL.
- Kremer, C. L., R. R. Klein, J. Mendelson, W. Browne, L. K. Samadzedeh, K. Vanpatten, L. Highstrom, G. A. Pestano and R. B. Nagle (2006). "Expression of mTOR signaling pathway markers in prostate cancer progression." *The Prostate* 66(11): 1203-1212.
- Kristiansen, G. (2009). "Immunohistochemische Algorithmen in der Prostatadiagnostik." *Der Pathologe* 30(2): 146-153.
- Kristiansen, G. (2012). "Diagnostic and prognostic molecular biomarkers for prostate cancer." *Histopathology* 60(1): 125-141.
- Kruck, S., J. Bedke, J. Hennenlotter, P. A. Ohneseit, U. Kuehs, E. Senger, K.-D. Sievert and A. Stenzl (2010). "Activation of mTOR in renal cell carcinoma is due to increased phosphorylation rather than protein overexpression." *Oncology reports* 23(1): 159-163.
- Kwitkowski, V. E., T. M. Prowell, A. Ibrahim, A. T. Farrell, R. Justice, S. S. Mitchell, R. Sridhara and R. Pazdur (2010). "FDA approval summary: temsirolimus as treatment for advanced renal cell carcinoma." *The oncologist* 15(4): 428-435.
- L Burgio, S., F. Fabbri, I. J Seymour, W. Zoli, D. Amadori and U. De Giorgi (2012). "Perspectives on mTOR inhibitors for castration-refractory prostate cancer." *Current cancer drug targets* 12(8): 940-949.
- Laplane, M. and D. M. Sabatini (2012). "mTOR signaling in growth control and disease." *Cell* 149(2): 274-293.
- Lee, G. T., D. I. Kang, Y. S. Ha, Y. S. Jung, J. Chung, K. Min, T. H. Kim, K. H. Moon, J. M. Chung, D. H. Lee, W. J. Kim and I. Y. Kim (2014). "Prostate cancer bone metastases acquire resistance to androgen deprivation via WNT5A-mediated BMP-6 induction." *Br J Cancer* 110(6): 1634-1644.
- Li, J., C. Yen, D. Liaw, K. Podsypanina, S. Bose, S. I. Wang, J. Puc, C. Miliaresis, L. Rodgers and R. McCombie (1997). "PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer." *science* 275(5308): 1943-1947.

- Li, L., D. Liu, Z.-X. Qiu, S. Zhao, L. Zhang and W.-M. Li (2015). "The Prognostic Role of mTOR and P-mTOR for Survival in Non-Small Cell Lung Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis." *PloS one* 10(2): e0116771.
- Li, N., M. Zhong and M. Song (2012). "Expression of phosphorylated mTOR and its regulatory protein is related to biological behaviors of ameloblastoma." *Int J Clin Exp Pathol* 5(7): 660-667.
- Li, W., D. Tan, Z. Zhang, J. J. Liang and R. E. Brown (2008). "Activation of Akt-mTOR-p70S6K pathway in angiogenesis in hepatocellular carcinoma." *Oncology reports* 20(4): 713-719.
- Liao, Y., R. Grobholz, U. Abel, L. Trojan, M. S. Michel, P. Angel and D. Mayer (2003). "Increase of AKT/PKB expression correlates with gleason pattern in human prostate cancer." *International journal of cancer* 107(4): 676-680.
- Liehr, U., D. Baumunk, S. Blaschke, F. Fischbach, B. Friebe, F. König, A. Lemke, P. Mittelstädt, M. Pech and M. Porsch (2017). "Die Vorsteherdrüse—was möchte der Urologe vom Radiologen wissen?"
- Lilja, H., A. M. Cronin, A. Dahlin, J. Manjer, P. M. Nilsson, J. A. Eastham, A. S. Bjartell, P. T. Scardino, D. Ulmert and A. J. Vickers (2011). "Prediction of significant prostate cancer diagnosed 20 to 30 years later with a single measure of prostate-specific antigen at or before age 50." *Cancer* 117(6): 1210-1219.
- Lin, H.-K., Y.-C. Hu, L. Yang, S. Altuwaijri, Y.-T. Chen, H.-Y. Kang and C. Chang (2003). "Suppression versus induction of androgen receptor functions by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in prostate cancer LNCaP cells with different passage numbers." *Journal of Biological Chemistry* 278(51): 50902-50907.
- Lin, H.-K., S. Yeh, H.-Y. Kang and C. Chang (2001). "Akt suppresses androgen-induced apoptosis by phosphorylating and inhibiting androgen receptor." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98(13): 7200-7205.
- Liu, X. and X. S. Zheng (2007). "Endoplasmic reticulum and Golgi localization sequences for mammalian target of rapamycin." *Molecular biology of the cell* 18(3): 1073-1082.
- Liu, Y., F. Hu, D. Li, F. Wang, L. Zhu, W. Chen, J. Ge, R. An and Y. Zhao (2011). "Does physical activity reduce the risk of prostate cancer? A systematic review and meta-analysis." *Eur Urol* 60(5): 1029-1044.
- Loeb, S. (2008). "Does PCA3 help identify clinically significant prostate cancer?" *Eur Urol* 54(5): 980-981.
- Loeb, S., H. B. Carter, S. I. Berndt, W. Ricker and E. M. Schaeffer (2011). "Complications after prostate biopsy: data from SEER-Medicare." *The Journal of urology* 186(5): 1830-1834.



Loewith, R., E. Jacinto, S. Wullschleger, A. Lorberg, J. L. Crespo, D. Bonenfant, W. Oppliger, P. Jenoe and M. N. Hall (2002). "Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control." *Molecular cell* 10(3): 457-468.

Logothetis, C. J. and S.-H. Lin (2005). "Osteoblasts in prostate cancer metastasis to bone." *Nature Reviews Cancer* 5(1): 21-28.

Loidl, W., F. Luger and A. Roosen (2014). "Kastrationsrefraktäres Prostatakarzinom (CRPC)." *Der Urologe* 53(3): 391-402.

Lou, H.-z., X.-c. Weng, H.-m. Pan, Q. Pan, P. Sun, L.-l. Liu and B. Chen (2014). "The novel mTORC1/2 dual inhibitor INK-128 suppresses survival and proliferation of primary and transformed human pancreatic cancer cells." *Biochemical and biophysical research communications* 450(2): 973-978.

Luan, F. L., R. Ding, V. K. Sharma, W. J. Chon, M. Lagman and M. Suthanthiran (2003). "Rapamycin is an effective inhibitor of human renal cancer metastasis1." *Kidney international* 63(3): 917-926.

Ma, B. L., M. H. Shan, G. Sun, G. H. Ren, C. Dong, X. Yao and M. Zhou (2015). "Immunohistochemical analysis of phosphorylated mammalian target of rapamycin and its downstream signaling components in invasive breast cancer." *Mol Med Rep* 12(4): 5246-5254.

Ma, X. M. and J. Blenis (2009). "Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control." *Nature reviews Molecular cell biology* 10(5): 307-318.

Majumder, P. K., P. G. Febbo, R. Bikoff, R. Berger, Q. Xue, L. M. McMahon, J. Manola, J. Brugarolas, T. J. McDonnell and T. R. Golub (2004). "mTOR inhibition reverses Akt-dependent prostate intraepithelial neoplasia through regulation of apoptotic and HIF-1-dependent pathways." *Nature medicine* 10(6): 594-601.

Makretsov, N. A., D. G. Huntsman, T. O. Nielsen, E. Yorida, M. Peacock, M. C. Cheang, S. E. Dunn, M. Hayes, M. van de Rijn and C. Bajdik (2004). "Hierarchical clustering analysis of tissue microarray immunostaining data identifies prognostically significant groups of breast carcinoma." *Clinical cancer research* 10(18): 6143-6151.

Mamane, Y., E. Petroulakis, O. LeBacquer and N. Sonenberg (2006). "mTOR, translation initiation and cancer." *Oncogene* 25(48): 6416-6422.

Mariappan, P., W. L. Chong, M. Sundram and S. R. Mohamed (2004). "Increasing prostate biopsy cores based on volume vs the sextant biopsy: a prospective randomized controlled clinical study on cancer detection rates and morbidity." *BJU Int* 94(3): 307-310.

Martín, M. E., M. I. Pérez, C. Redondo, M. I. Álvarez, M. Salinas and J. L. Fando (2000). "4E binding protein 1 expression is inversely correlated to the progression of

gastrointestinal cancers." *The international journal of biochemistry & cell biology* 32(6): 633-642.

Martins, F., S. C. de Sousa, E. Dos Santos, S. B. Woo and M. Gallottini (2016). "PI3K-AKT-mTOR pathway proteins are differently expressed in oral carcinogenesis." *J Oral Pathol Med*.

Maruthappu, M., J. Watkins, A. Taylor, C. Williams, R. Ali, T. Zeltner and R. Atun (2015). "Unemployment and prostate cancer mortality in the OECD, 1990-2009." *Ecancermedicalscience* 9: 538.

McMenamin, M. E., P. Soung, S. Perera, I. Kaplan, M. Loda and W. R. Sellers (1999). "Loss of PTEN expression in paraffin-embedded primary prostate cancer correlates with high Gleason score and advanced stage." *Cancer research* 59(17): 4291-4296.

Merseburger, A., M. Kuczyk and J. Wolff (2013). "Pathophysiologie und Androgendeprivationstherapie des kastrationsresistenten Prostatakarzinoms." *Der Urologe* 52(2): 219-225.

Merseburger, A. S., J. Hennenlotter, P. Simon, C. C. Müller, U. Kühs, R. Knüchel-Clarke, J. W. Moul, A. Stenzl and M. A. Kuczyk (2006). "Activation of the PKB/Akt pathway in histological benign prostatic tissue adjacent to the primary malignant lesions." *Oncology reports* 16(1): 79-83.

Meyuhas, O. (2008). "Physiological roles of ribosomal protein S6: one of its kind." *International review of cell and molecular biology* 268: 1-37.

Michels, J., T. Montemurro, N. Murray, C. Kollmannsberger and K. Nguyen Chi (2006). "First-and second-line chemotherapy with docetaxel or mitoxantrone in patients with hormone-refractory prostate cancer." *Cancer* 106(5): 1041-1046.

Milanes-Yearsley, M., M. E. H. Hammond, T. F. Pajak, J. S. Cooper, C. Chang, T. Griffin, D. Nelson, G. Laramore and M. Pilepich (2002). "Tissue micro-array: a cost and time-effective method for correlative studies by regional and national cancer study groups." *Modern pathology* 15(12): 1366-1373.

Miller, K. (2011). "Castration resistant prostate cancer 2011." *Aktuelle Urologie* 42(2): 95-102.

Mita, M. M., J. Gong and S. P. Chawla (2013). "Ridaforolimus in advanced or metastatic soft tissue and bone sarcomas." *Expert review of clinical pharmacology* 6(5): 465-482.

Mogi, M. and A. Kondo (2009). "Down-regulation of mTOR leads to up-regulation of osteoprotegerin in bone marrow cells." *Biochemical and biophysical research communications* 384(1): 82-86.

Mohler, J. L. (2014). "Concept and viability of androgen annihilation for advanced prostate cancer." *Cancer* 120(17): 2628-2637.

Morgan, T. M., T. D. Koreckij and E. Corey (2009). "Targeted therapy for advanced prostate cancer: inhibition of the PI3K/Akt/mTOR pathway." *Current cancer drug targets* 9(2): 237.

Morgan, T. M., T. E. Pitts, T. S. Gross, S. L. Poliachik, R. L. Vessella and E. Corey (2008). "RAD001 (Everolimus) inhibits growth of prostate cancer in the bone and the inhibitory effects are increased by combination with docetaxel and zoledronic acid." *The Prostate* 68(8): 861-871.

Moriceau, G., B. Ory, L. Mitrofan, C. Riganti, F. Blanchard, R. Brion, C. Charrier, S. Battaglia, P. Pilet and M. Denis (2010). "Zoledronic acid potentiates mTOR inhibition and abolishes the resistance of osteosarcoma cells to RAD001 (Everolimus): pivotal role of the prenylation process." *Cancer research: canres.* 0578.2010.

Motzer, R. J., B. Escudier, S. Oudard, T. E. Hutson, C. Porta, S. Bracarda, V. Grünwald, J. A. Thompson, R. A. Figlin and N. Hollaender (2008). "Efficacy of everolimus in advanced renal cell carcinoma: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase III trial." *The Lancet* 372(9637): 449-456.

Mulholland, D. J., N. Kobayashi, M. Ruscetti, A. Zhi, L. M. Tran, J. Huang, M. Gleave and H. Wu (2012). "Pten loss and RAS/MAPK activation cooperate to promote EMT and metastasis initiated from prostate cancer stem/progenitor cells." *Cancer research* 72(7): 1878-1889.

Mulholland, D. J., L. M. Tran, Y. Li, H. Cai, A. Morim, S. Wang, S. Plaisier, I. P. Garraway, J. Huang and T. G. Graeber (2011). "Cell autonomous role of PTEN in regulating castration-resistant prostate cancer growth." *Cancer cell* 19(6): 792-804.

Müller, J., A. Ehlers, L. Burkhardt, H. Sirma, T. Steuber, M. Graefen, G. Sauter, S. Minner, R. Simon and T. Schlomm (2013). "Loss of pSer2448-mTOR expression is linked to adverse prognosis and tumor progression in ERG-fusion-positive cancers." *International journal of cancer* 132(6): 1333-1340.

Mungamuri, S. K., X. Yang, A. D. Thor and K. Somasundaram (2006). "Survival signaling by Notch1: mammalian target of rapamycin (mTOR)-dependent inhibition of p53." *Cancer Research* 66(9): 4715-4724.

Murayama, T., M. Inokuchi, Y. Takagi, H. Yamada, K. Kojima, J. Kumagai, T. Kawano and K. Sugihara (2009). "Relation between outcomes and localisation of p-mTOR expression in gastric cancer." *British journal of cancer* 100(5): 782-788.

Nabi, S., E. R. Kessler, B. Bernard, T. W. Flaig and E. T. Lam (2018). "Renal cell carcinoma: a review of biology and pathophysiology." *F1000Research* 7.

Nakanishi, H., J. Groskopf, H. A. Fritsche, V. Bhadkamkar, A. Blase, S. V. Kumar, J. W. Davis, P. Troncoso, H. Rittenhouse and R. J. Babaian (2008). "PCA3 molecular urine assay correlates with prostate cancer tumor volume: implication in selecting candidates for active surveillance." *J Urol* 179(5): 1804-1809; discussion 1809-1810.

- Narain, V., F. J. Bianco, Jr., D. J. Grignon, W. A. Sakr, J. E. Pontes and D. P. Wood, Jr. (2001). "How accurately does prostate biopsy Gleason score predict pathologic findings and disease free survival?" *Prostate* 49(3): 185-190.
- Nardella, C., A. Carracedo, A. Alimonti, R. M. Hobbs, J. G. Clohessy, Z. Chen, A. Egia, A. Fornari, M. Fiorentino and M. Loda (2009). "Differential requirement of mTOR in post-mitotic tissues and tumorigenesis." *Science signaling* 2(55): ra2.
- Nasir, A., D.-T. Chen, M. Gruidl, E. B. Henderson-Jackson, C. Venkataramu, S. M. McCarthy, H. L. McBride, E. Harris, N. Khakpour and T. J. Yeatman (2011). "Novel molecular markers of malignancy in histologically normal and benign breast." *Pathology research international* 2011.
- Nathan, C.-A. O., N. Amirghahari, F. Abreo, X. Rong, G. Caldito, M. L. Jones, H. Zhou, M. Smith, D. Kimberly and J. Glass (2004). "Overexpressed eIF4E is functionally active in surgical margins of head and neck cancer patients via activation of the Akt/mammalian target of rapamycin pathway." *Clinical Cancer Research* 10(17): 5820-5827.
- Ni, J., P. Cozzi, J. Hao, J. Beretov, L. Chang, W. Duan, S. Shigdar, W. Delprado, P. Graham and J. Bucci (2013). "Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) is associated with prostate cancer metastasis and chemo/radioresistance via the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway." *The international journal of biochemistry & cell biology* 45(12): 2736-2748.
- Nocito, A., J. Kononen, O. P. Kallioniemi and G. Sauter (2001). "Tissue microarrays (TMAs) for high-throughput molecular pathology research." *International Journal of Cancer* 94(1): 1-5.
- Noske, A., J. L. Lindenberg, S. Darb-Esfahani, W. Weichert, A.-C. Buckendahl, A. Röske, J. Sehouli, M. Dietel and C. Denkert (2008). "Activation of mTOR in a subgroup of ovarian carcinomas: correlation with p-eIF-4E and prognosis." *Oncology reports* 20(6): 1409-1417.
- Okui, T., T. Shimo, N. M. M. Hassan, T. Fukazawa, N. Kurio, M. Takaoka, Y. Naomoto and A. Sasaki (2011). "Antitumor effect of novel HSP90 inhibitor NVP-AUY922 against oral squamous cell carcinoma." *Anticancer research* 31(4): 1197-1204.
- Ozen, M., C. Creighton, M. Ozdemir and M. Ittmann (2008). "Widespread deregulation of microRNA expression in human prostate cancer." *Oncogene* 27(12): 1788.
- Pallet, N. and C. Legendre (2013). "Adverse events associated with mTOR inhibitors." *Expert opinion on drug safety* 12(2): 177-186.
- Pallwein, L., M. Mitterberger, J. Gradl, F. Aigner, W. Horninger, H. Strasser, G. Bartsch, D. zur Nedden and F. Frauscher (2007). "Value of contrast-enhanced ultrasound and elastography in imaging of prostate cancer." *Curr Opin Urol* 17(1): 39-47.

Pantuck, A. J., D. B. Seligson, T. Klatte, H. Yu, J. T. Leppert, L. Moore, T. O'toole, J. Gibbons, A. S. Beldegrun and R. A. Figlin (2007). "Prognostic relevance of the mTOR pathway in renal cell carcinoma." *Cancer* 109(11): 2257-2267.

Parker, C. (2004). "Active surveillance: towards a new paradigm in the management of early prostate cancer." *Lancet Oncol* 5(2): 101-106.

Parker, C. C., R. E. Coleman, O. Sartor, N. J. Vogelzang, D. Bottomley, D. Heinrich, S. I. Helle, J. M. O'Sullivan, S. D. Fosså and A. Chodacki (2017). "Three-year Safety of Radium-223 Dichloride in Patients with Castration-resistant Prostate Cancer and Symptomatic Bone Metastases from Phase 3 Randomized Alpharadin in Symptomatic Prostate Cancer Trial." *European urology*.

Partin, A. W., L. A. Mangold, D. M. Lamm, P. C. Walsh, J. I. Epstein and J. D. Pearson (2001). "Contemporary update of prostate cancer staging nomograms (Partin Tables) for the new millennium." *Urology* 58(6): 843-848.

Patel, V., C. A. Marsh, R. T. Dorsam, C. M. Mikelis, A. Masedunskas, P. Amornphimoltham, C. A. Nathan, B. Singh, R. Weigert and A. A. Molinolo (2011). "Decreased lymphangiogenesis and lymph node metastasis by mTOR inhibition in head and neck cancer." *Cancer research* 71(22): 7103-7112.

Pearce, L. R., X. Huang, J. Boudeau, R. Pawlowski, S. Wullschleger, M. Deak, A. F. Ibrahim, R. Gourlay, M. A. Magnuson and D. R. Alessi (2007). "Identification of Protor as a novel Rictor-binding component of mTOR complex-2." *Biochem J* 405(3): 513-522.

Pearce, L. R., E. M. Sommer, K. Sakamoto, S. Wullschleger and D. R. Alessi (2011). "Protor-1 is required for efficient mTORC2-mediated activation of SGK1 in the kidney." *Biochem J* 436(1): 169-179.

Perrone, E. E., C. Theoharis, N. R. Mucci, S. Hayasaka, J. M. Taylor, K. A. Cooney and M. A. Rubin (2000). "Tissue microarray assessment of prostate cancer tumor proliferation in African-American and white men." *Journal of the National Cancer Institute* 92(11): 937-939.

Peterson, T. R., M. Laplante, C. C. Thoreen, Y. Sancak, S. A. Kang, W. M. Kuehl, N. S. Gray and D. M. Sabatini (2009). "DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival." *Cell* 137(5): 873-886.

Petrylak, D. P., C. M. Tangen, M. H. Hussain, P. N. Lara Jr, J. A. Jones, M. E. Taplin, P. A. Burch, D. Berry, C. Moinpour and M. Kohli (2004). "Docetaxel and estramustine compared with mitoxantrone and prednisone for advanced refractory prostate cancer." *New England Journal of Medicine* 351(15): 1513-1520.

Pinsky, P. F., E. D. Crawford, B. S. Kramer, G. L. Andriole, E. P. Gelmann, R. Grubb, R. Greenlee and J. K. Gohagan (2007). "Repeat prostate biopsy in the prostate, lung, colorectal and ovarian cancer screening trial." *BJU international* 99(4): 775-779.

- Pons-Tostivint, E., B. Thibault and J. Guillermet-Guibert (2017). "Targeting PI3K signaling in combination cancer therapy." *Trends in cancer* 3(6): 454-469.
- Quinlan, M. R., S. Teahan, D. Mulvin and D. M. Quinlan (2007). "Is digital rectal examination still necessary in the early detection of prostate cancer?" *Ir J Med Sci* 176(3): 161-163.
- Ramaswamy, S., N. Nakamura, F. Vazquez, D. B. Batt, S. Perera, T. M. Roberts and W. R. Sellers (1999). "Regulation of G1 progression by the PTEN tumor suppressor protein is linked to inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96(5): 2110-2115.
- Ramos-Vara, J. (2005). "Technical aspects of immunohistochemistry." *Veterinary Pathology Online* 42(4): 405-426.
- Rathkopf, D. E., S. M. Larson, A. Anand, M. J. Morris, S. F. Slovin, D. R. Shaffer, G. Heller, B. Carver, N. Rosen and H. I. Scher (2015). "Everolimus combined with gefitinib in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer: Phase 1/2 results and signaling pathway implications." *Cancer* 121(21): 3853-3861.
- Ravaud, A., M. Gross-Goupil and J. Bellmunt (2013). *Combination therapy in metastatic renal cell cancer. Seminars in oncology*, Elsevier.
- Remmele, W. and H. Stegner (1987). "Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue." *Der Pathologe* 8(3): 138.
- Richie, J. P., W. J. Catalona, F. R. Ahmann, M. A. Hudson, P. T. Scardino, R. C. Flanigan, J. B. deKernion, T. L. Ratliff, L. R. Kavoussi, B. L. Dalkin, W. B. Waters, M. T. MacFarlane and P. C. Southwick (1993). "Effect of patient age on early detection of prostate cancer with serum prostate-specific antigen and digital rectal examination." *Urology* 42(4): 365-374.
- Rifkin, M. D. (1998). "Prostate cancer: the diagnostic dilemma and the place of imaging in detection and staging." *World journal of urology* 16(1): 76-80.
- Rini, B. I., J. Bellmunt, J. Clancy, K. Wang, A. G. Niethammer, S. Hariharan and B. Escudier (2014). "Randomized phase III trial of temsirolimus and bevacizumab versus interferon alfa and bevacizumab in metastatic renal cell carcinoma: INTORACT trial." *J Clin Oncol* 32(8): 752-759.
- Rini, B. I. and E. J. Small (2002). "Hormone-refractory Prostate Cancer." *Curr Treat Options Oncol* 3(5): 437-446.
- Rinker-Schaeffer, C. W., J. R. Graff, A. De Benedetti, S. G. Zimmer and R. E. Rhoads (1993). "Decreasing the level of translation initiation factor 4E with antisense RNA causes reversal of ras-mediated transformation and tumorigenesis of cloned rat embryo fibroblasts." *International journal of cancer* 55(5): 841-847.

Robert Koch Institut. (2017, 06.12.2017). "Prostatakarzinom ICD-10 C61." from [https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Prostatakrebs/prostatakrebs\\_node.html](https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Prostatakrebs/prostatakrebs_node.html).

Rodrik-Outmezguine, V. S., M. Okaniwa, Z. Yao, C. J. Novotny, C. McWhirter, A. Banaji, H. Won, W. Wong, M. Berger and E. de Stanchina (2016). "Overcoming mTOR resistance mutations with a new-generation mTOR inhibitor." *Nature* 534(7606): 272.

Rohde, V., K. Grabein, F. Hessel, U. Siebert and J. Wasem (2006). "Orchiektomie versus medikamentöse Therapie mit LH-RH-Analoga zur Behandlung des fortgeschrittenen Prostatakarzinoms." *GMS Health Technol Assess* 2.

Rojo, F., L. Najera, J. Lirola, J. Jiménez, M. Guzmán, M. D. Sabadell, J. Baselga and S. R. y Cajal (2007). "4E-binding protein 1, a cell signaling hallmark in breast cancer that correlates with pathologic grade and prognosis." *Clinical Cancer Research* 13(1): 81-89.

Rong, L., M. Livingstone, R. Sukarieh, E. Petroulakis, A.-C. Gingras, K. Crosby, B. Smith, R. D. Polakiewicz, J. Pelletier and M. A. Ferraiuolo (2008). "Control of eIF4E cellular localization by eIF4E-binding proteins, 4E-BPs." *Rna* 14(7): 1318-1327.

Roobol, M. J., E. W. Steyerberg, R. Kranse, T. Wolters, R. C. van den Bergh, C. H. Bangma and F. H. Schroder (2010). "A risk-based strategy improves prostate-specific antigen-driven detection of prostate cancer." *Eur Urol* 57(1): 79-85.

Roodman, G. D. (2004). "Mechanisms of bone metastasis." *New England Journal of Medicine* 350(16): 1655-1664.

Roosen, A. (2014). "Wie wird Prostatakrebs heute diagnostiziert?" *MMW-Fortschritte der Medizin* 156(21-22): 67-71.

Roukos, D. H. (2009). "Mea culpa with cancer-targeted therapy: new thinking and new agents design for novel, causal networks-based, personalized biomedicine."

Rubens, R. D. (1998). "Bone metastases--the clinical problem." *Eur J Cancer* 34(2): 210-213.

Rubin, M. A., R. Dunn, M. Strawderman and K. J. Pienta (2002). "Tissue microarray sampling strategy for prostate cancer biomarker analysis." *The American journal of surgical pathology* 26(3): 312-319.

Rubin, M. A., M. Zhou, S. M. Dhanasekaran, S. Varambally, T. R. Barrette, M. G. Sanda, K. J. Pienta, D. Ghosh and A. M. Chinnaiyan (2002). " $\alpha$ -Methylacyl coenzyme A racemase as a tissue biomarker for prostate cancer." *Jama* 287(13): 1662-1670.

Ruggero, D., L. Montanaro, L. Ma, W. Xu, P. Londei, C. Cordon-Cardo and P. P. Pandolfi (2004). "The translation factor eIF-4E promotes tumor formation and cooperates with c-Myc in lymphomagenesis." *Nature medicine* 10(5): 484-486.

Russell, R. C., C. Fang and K.-L. Guan (2011). "An emerging role for TOR signaling in mammalian tissue and stem cell physiology." *Development* 138(16): 3343-3356.

Ryan, C. J., M. R. Smith, K. Fizazi, F. Saad, P. F. Mulders, C. N. Sternberg, K. Miller, C. J. Logothetis, N. D. Shore, E. J. Small, J. Carles, T. W. Flaig, M. E. Taplin, C. S. Higano, P. de Souza, J. S. de Bono, T. W. Griffin, P. De Porre, M. K. Yu, Y. C. Park, J. Li, T. Kheoh, V. Naini, A. Molina and D. E. Rathkopf (2015). "Abiraterone acetate plus prednisone versus placebo plus prednisone in chemotherapy-naive men with metastatic castration-resistant prostate cancer (COU-AA-302): final overall survival analysis of a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 study." *Lancet Oncol* 16(2): 152-160.

Saad, F. and C. C. Schulman (2004). "Role of bisphosphonates in prostate cancer." *European urology* 45(1): 26-34.

Salehi, Z. and F. Mashayekhi (2006). "Expression of the eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) and 4E-BP1 in esophageal cancer." *Clinical biochemistry* 39(4): 404-409.

Salmena, L., A. Carracedo and P. P. Pandolfi (2008). "Tenets of PTEN tumor suppression." *Cell* 133(3): 403-414.

Sancak, Y., C. C. Thoreen, T. R. Peterson, R. A. Lindquist, S. A. Kang, E. Spooner, S. A. Carr and D. M. Sabatini (2007). "PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase." *Molecular cell* 25(6): 903-915.

Sarbassov, D. D., S. M. Ali, D.-H. Kim, D. A. Guertin, R. R. Latek, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst and D. M. Sabatini (2004). "Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton." *Current biology* 14(14): 1296-1302.

Sarbassov, D. D., D. A. Guertin, S. M. Ali and D. M. Sabatini (2005). "Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex." *Science* 307(5712): 1098-1101.

Sartor, A. O., H. Hricak, T. M. Wheeler, J. Coleman, D. F. Penson, P. R. Carroll, M. A. Rubin and P. T. Scardino (2008). "Evaluating localized prostate cancer and identifying candidates for focal therapy." *Urology* 72(6): S12-S24.

Sauter, G. (2012). *TMA-Technik in der onkologischen Diagnostik*. Forum, Springer.

Schally, A. V., N. L. Block and F. G. Rick (2015). "New therapies for relapsed castration-resistant prostate cancer based on peptide analogs of hypothalamic hormones." *Asian J Androl*.

Schanz, M. (2014). "Immunohistochemische Untersuchungen zur lokoregionären Verteilung von mTOR, p-mTOR und 4E-binding protein im Prostataraum tumortragender Prostaten mittels der Tissue Microarray-Technik – Bedeutung für die Tumorbilogie, Diagnostik und Therapie des Prostatakarzinoms."

Schayowitz, A., G. Sabnis, V. C. Njar and A. M. Brodie (2008). "Synergistic effect of a novel antiandrogen, VN/124-1, and signal transduction inhibitors in prostate cancer



progression to hormone independence in vitro." *Molecular Cancer Therapeutics* 7(1): 121-132.

Schmelz, J.-U., C. Sparwasser and W. Weidner (2014). *Facharztwissen Urologie-Differenzierte Diagnostik und Therapie*. Berlin, Heidelberg, Springer- Verlag.

Schmitz, M., G. Grignard, C. Margue, W. Dippel, C. Capesius, J. Mossong, M. Nathan, S. Giacchi, R. Scheiden and N. Kieffer (2007). "Complete loss of PTEN expression as a possible early prognostic marker for prostate cancer metastasis." *International journal of cancer* 120(6): 1284-1292.

Schwartz, G. K., W. D. Tap, L.-X. Qin, M. B. Livingston, S. D. Undevia, B. Chmielowski, M. Agulnik, S. M. Schuetze, D. R. Reed and S. H. Okuno (2013). "Cixutumumab and temsirolimus for patients with bone and soft-tissue sarcoma: a multicentre, open-label, phase 2 trial." *The lancet oncology* 14(4): 371-382.

Seeliger, H., M. Guba, A. Kleespies, K.-W. Jauch and C. J. Bruns (2007). "Role of mTOR in solid tumor systems: a therapeutical target against primary tumor growth, metastases, and angiogenesis." *Cancer and Metastasis Reviews* 26(3-4): 611-621.

Sehgal, S. (2003). *Sirolimus: its discovery, biological properties, and mechanism of action*. Transplantation proceedings, Elsevier.

Serova, M., A. de Gramont, A. Tijeras-Raballand, C. Dos Santos, M. E. Riveiro, K. Slimane, S. Faivre and E. Raymond (2013). "Benchmarking effects of mTOR, PI3K, and dual PI3K/mTOR inhibitors in hepatocellular and renal cell carcinoma models developing resistance to sunitinib and sorafenib." *Cancer chemotherapy and pharmacology* 71(5): 1297-1307.

Shaw, R. J. and L. C. Cantley (2006). "Ras, PI (3) K and mTOR signalling controls tumour cell growth." *Nature* 441(7092): 424-430.

Shen, M. M. and C. Abate-Shen (2010). "Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges." *Genes & development* 24(18): 1967-2000.

Shetty, S. D. and J. C. Cerny (1992). "The current role of prostatic acid phosphatase and prostate-specific antigen in the management of prostate cancer." *Henry Ford Hosp Med J* 40(1-2): 93-98.

Shida, T., T. Kishimoto, M. Furuya, T. Nikaido, K. Koda, S. Takano, F. Kimura, H. Shimizu, H. Yoshidome and M. Ohtsuka (2010). "Expression of an activated mammalian target of rapamycin (mTOR) in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors." *Cancer chemotherapy and pharmacology* 65(5): 889-893.

Siu, M., Y. Tsai, Y. Chang, J. Yin, F. Suau, W. Chen and Y. Liu (2015). "Transforming growth factor- $\beta$  promotes prostate bone metastasis through induction of microRNA-96 and activation of the mTOR pathway." *Oncogene* 34(36): 4767.

Sparks, C. and D. Guertin (2010). "Targeting mTOR: prospects for mTOR complex 2 inhibitors in cancer therapy." *Oncogene* 29(26): 3733-3744.

Stamey, T., J. McNeal, F. Freiha and E. Redwine (1988). "Morphometric and clinical studies on 68 consecutive radical prostatectomies." *The Journal of urology* 139(6): 1235-1241.

Steck, P. A., M. A. Pershouse, S. A. Jasser, W. A. Yung, H. Lin, A. H. Ligon, L. A. Langford, M. L. Baumgard, T. Hattier and T. Davis (1997). "Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers." *Nature genetics* 15(4): 356-362.

Steinberg, G. D., B. S. Carter, T. H. Beaty, B. Childs and P. C. Walsh (1990). "Family history and the risk of prostate cancer." *The prostate* 17(4): 337-347.

Stenzl, A. (2009). *Prostatakarzinom: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge*. Tübingen, Südwestdeutsches Tumorzentrum.

Stenzl, A., T. Fehm, L. C. Hofbauer and F. Jakob (2014). *Knochenmetastasen: Pathophysiologie, Diagnostik und Therapie*-Unter Mitarbeit von T. Todenhöfer, Springer-Verlag.

Stephan, C., T. Kopke, A. Semjonow, M. Lein, S. Deger, M. Schrader, K. Miller and K. Jung (2009). "Discordant total and free prostate-specific antigen (PSA) assays: does calibration with WHO reference materials diminish the problem?" *Clin Chem Lab Med* 47(11): 1325-1331.

Sun, S.-Y., L. M. Rosenberg, X. Wang, Z. Zhou, P. Yue, H. Fu and F. R. Khuri (2005). "Activation of Akt and eIF4E survival pathways by rapamycin-mediated mammalian target of rapamycin inhibition." *Cancer research* 65(16): 7052-7058.

Sutherland, S. I., R. Pe Benito, S. M. Henshall, L. G. Horvath and J. G. Kench (2014). "Expression of phosphorylated-mTOR during the development of prostate cancer." *The Prostate* 74(12): 1231-1239.

Swanson, G. P., I. M. Thompson and J. Basler (2006). "Treatment options in lymph node-positive prostate cancer." *Cancer* 106(12): 2531-2539.

Sweeney, C. J., Y.-H. Chen, M. Carducci, G. Liu, D. F. Jarrard, M. Eisenberger, Y.-N. Wong, N. Hahn, M. Kohli and M. M. Cooney (2015). "Chemohormonal therapy in metastatic hormone-sensitive prostate cancer." *New England Journal of Medicine* 373(8): 737-746.

Swindle, P., J. A. Eastham, M. Otori, M. W. Kattan, T. Wheeler, N. Maru, K. Slawin and P. T. Scardino (2005). "Do margins matter? The prognostic significance of positive surgical margins in radical prostatectomy specimens." *The Journal of urology* 174(3): 903-907.

Taichman, R. S., C. Cooper, E. T. Keller, K. J. Pienta, N. S. Taichman and L. K. McCauley (2002). "Use of the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 pathway in prostate cancer metastasis to bone." *Cancer research* 62(6): 1832-1837.

Talesa, V. N., I. Ferri, G. Bellezza, H. D. Love, A. Sidoni and C. Antognelli (2017). "Glyoxalase 2 Is Involved in Human Prostate Cancer Progression as Part of a Mechanism Driven By PTEN/PI3K/AKT/mTOR Signaling With Involvement of PKM2 and ER $\alpha$ ." *The Prostate* 77(2): 196-210.

Tannock, I. F., R. de Wit, W. R. Berry, J. Horti, A. Pluzanska, K. N. Chi, S. Oudard, C. Théodore, N. D. James and I. Turesson (2004). "Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer." *New England Journal of Medicine* 351(15): 1502-1512.

Taylor, B. S., N. Schultz, H. Hieronymus, A. Gopalan, Y. Xiao, B. S. Carver, V. K. Arora, P. Kaushik, E. Cerami and B. Reva (2010). "Integrative genomic profiling of human prostate cancer." *Cancer cell* 18(1): 11-22.

Tee, A. R. and J. Blenis (2005). *mTOR, translational control and human disease. Seminars in cell & developmental biology*, Elsevier.

Templeton, A. J., V. Dutoit, R. Cathomas, C. Rothermundt, D. Bärtschi, C. Dröge, O. Gautschi, M. Borner, E. Fechter and F. Stenner (2013). "Phase 2 trial of single-agent everolimus in chemotherapy-naïve patients with castration-resistant prostate cancer (SAKK 08/08)." *European urology* 64(1): 150-158.

Thedieck, K., P. Polak, M. L. Kim, K. D. Molle, A. Cohen, P. Jenö, C. Arriemerlou and M. N. Hall (2007). "PRAS40 and PRR5-like protein are new mTOR interactors that regulate apoptosis." *PloS one* 2(11): e1217-e1217.

Theodorescu, D., S. R. Broder, J. C. Boyd, S. E. Mills and H. F. Frierson (1997). "Cathepsin D and chromogranin A as predictors of long term disease specific survival after radical prostatectomy for localized carcinoma of the prostate." *Cancer* 80(11): 2109-2119.

Thomas, C. (2006). "Histopathologie, 13." Auflage, Abbildungs(4.37).

Thompson, I. M., D. K. Pauler, P. J. Goodman, C. M. Tangen, M. S. Lucia, H. L. Parnes, L. M. Minasian, L. G. Ford, S. M. Lippman, E. D. Crawford, J. J. Crowley and C. A. Coltman, Jr. (2004). "Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level  $\leq$  4.0 ng per milliliter." *N Engl J Med* 350(22): 2239-2246.

Thoreen, C. C., S. A. Kang, J. W. Chang, Q. Liu, J. Zhang, Y. Gao, L. J. Reichling, T. Sim, D. M. Sabatini and N. S. Gray (2009). "An ATP-competitive mammalian target of rapamycin inhibitor reveals rapamycin-resistant functions of mTORC1." *Journal of Biological Chemistry* 284(12): 8023-8032.

Thornton, K., A. Chen, M. Trucco, P. Shah, B. Wilky, N. Gul, M. Carrera-Haro, M. F. Ferreira, U. Shafique and J. Powell (2013). "A dose-finding study of temsirolimus and

liposomal doxorubicin for patients with recurrent and refractory bone and soft tissue sarcoma." *International journal of cancer* 133(4): 997-1005.

Tolcher, A. W. (2004). "Novel therapeutic molecular targets for prostate cancer: the mTOR signaling pathway and epidermal growth factor receptor." *The Journal of urology* 171(2): S41-S44.

True, L., I. Coleman, S. Hawley, C.-Y. Huang, D. Gifford, R. Coleman, T. M. Beer, E. Gelmann, M. Datta and E. Mostaghel (2006). "A molecular correlate to the Gleason grading system for prostate adenocarcinoma." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(29): 10991-10996.

Truong, M., B. Yang and D. F. Jarrard (2013). "Toward the detection of prostate cancer in urine: a critical analysis." *J Urol* 189(2): 422-429.

Tsutsui, S., S. Ohno, S. Murakami, A. Kataoka, J. Kinoshita and Y. Hachitanda (2003). "Prognostic significance of the combination of biological parameters in breast cancer." *Surgery today* 33(2): 151-154.

Van der Poel, H. (2004). "Mammalian target of rapamycin and 3-phosphatidylinositol 3-kinase pathway inhibition enhances growth inhibition of transforming growth factor- $\beta$ 1 in prostate cancer cells." *The Journal of urology* 172(4P1): 1333-1337.

Vander Haar, E., S.-i. Lee, S. Bandhakavi, T. J. Griffin and D.-H. Kim (2007). "Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40." *Nature cell biology* 9(3): 316-323.

Varambally, S., S. M. Dhanasekaran, M. Zhou, T. R. Barrette, C. Kumar-Sinha, M. G. Sanda, D. Ghosh, K. J. Pienta, R. G. Sewalt and A. P. Otte (2002). "The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer." *Nature* 419(6907): 624-629.

Vignot, S., S. Faivre, D. Aguirre and E. Raymond (2005). "mTOR-targeted therapy of cancer with rapamycin derivatives." *Annals of oncology* 16(4): 525-537.

Vinod, P. K. U. and K. V. Venkatesh (2009). "Quantification of the effect of amino acids on an integrated mTOR and insulin signaling pathway." *Molecular BioSystems* 5(10): 1163-1173.

Vis, A. N., F. H. Schröder and T. H. van der Kwast (2006). "The actual value of the surgical margin status as a predictor of disease progression in men with early prostate cancer." *European urology* 50(2): 258-265.

Vis, A. N., T. M. van der Sluis, H. H. Al-Itejawi, R. J. van Moorselaar and E. J. Meuleman (2015). "Risk of disease flare with LHRH agonist therapy in men with prostate cancer: myth or fact?" *Urol Oncol* 33(1): 7-15.

von Rundstedt, F., A. Brandt, D. Lazica, M. Mathers and S. Roth (2008). "Behandlung von spezifischen Komplikationen des lokal fortgeschrittenen Prostatakarzinoms." *Der Urologe* 47(11): 1453-1459.

Vosse, B. A., W. Seelentag, A. Bachmann, F. T. Bosman and P. Yan (2007). "Background staining of visualization systems in immunohistochemistry: comparison of the Avidin-Biotin Complex system and the EnVision+ system." *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology* 15(1): 103-107.

Wang, J., Q. Ye and Q. B. She (2014). "New insights into 4E-BP1-regulated translation in cancer progression and metastasis." *Cancer Cell Microenviron* 1(5).

Wang, L., T. E. Harris, R. A. Roth and J. C. Lawrence (2007). "PRAS40 regulates mTORC1 kinase activity by functioning as a direct inhibitor of substrate binding." *Journal of Biological Chemistry* 282(27): 20036-20044.

Wang, S., J. Gao, Q. Lei, N. Rozengurt, C. Pritchard, J. Jiao, G. V. Thomas, G. Li, P. Roy-Burman and P. S. Nelson (2003). "Prostate-specific deletion of the murine Pten tumor suppressor gene leads to metastatic prostate cancer." *Cancer cell* 4(3): 209-221.

Wang, X., W. Li, M. Williams, N. Terada, D. R. Alessi and C. G. Proud (2001). "Regulation of elongation factor 2 kinase by p90RSK1 and p70 S6 kinase." *The EMBO journal* 20(16): 4370-4379.

Wei, X. X., A. C. Hsieh, W. Kim, T. Friedlander, A. M. Lin, M. Louttit and C. J. Ryan (2017). "A phase I study of abiraterone acetate combined with BEZ235, a dual PI3K/mTOR inhibitor, in metastatic castration resistant prostate cancer." *The oncologist* 22(5): 503-e543.

Wirth, M. and J. Nippgen (2003). "Chemotherapie beim hormonrefraktären Prostatakarzinom." *Der Urologe, Ausgabe A* 42(11): 1453-1460.

Wirth, M., L. Weißbach, R. Ackermann, W. Alberti, C. Albrecht, B. Göckel-Beining, M. Fröhner, W. Hinkelbein, K. Miller and H. Rübben (2011). "Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms." AWMF, Düsseldorf.

Wittekind, C. and H.-J. Meyer (2013). *TNM: Klassifikation maligner Tumoren*, John Wiley & Sons.

Wittekind, C. and B. Oberschmid (2010). "TNM-Klassifikation maligner Tumoren 2010." *Der Pathologe* 31(5): 333-338.

Wörmann, B. and J. Wolff (2010). "Die systemische Therapie des metastasierten Prostatakarzinoms." *Der Urologe* 49(2): 221-227.

Wu, L., D. C. Birlle and I. F. Tannock (2005). "Effects of the mammalian target of rapamycin inhibitor CCI-779 used alone or with chemotherapy on human prostate cancer cells and xenografts." *Cancer research* 65(7): 2825-2831.

Wu, X., K. Senechal, M. S. Neshat, Y. E. Whang and C. L. Sawyers (1998). "The PTEN/MMAC1 tumor suppressor phosphatase functions as a negative regulator of the

phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95(26): 15587-15591.

Xie, J., X. Wang and C. G. Proud (2016). "mTOR inhibitors in cancer therapy." *F1000Research* 5.

Xu, G., W. Zhang, P. Bertram, X. F. Zheng and H. McLeod (2004). "Pharmacogenomic profiling of the PI3K/PTEN-AKT-mTOR pathway in common human tumors." *Int J Oncol* 24(4): 893-900.

Xu, Q., L. Wang and M. Zhong (2011). "Clinical significance of mTOR and p-mTOR protein expression in human colorectal carcinomas." *Asian Pac J Cancer Prev* 12: 2581-2584.

Yang, H. Y., L. Y. Xue, L. X. Xing, J. Wang, J. L. Wang, X. Yan and X. H. Zhang (2013). "Putative role of the mTOR/4E-BP1 signaling pathway in the carcinogenesis and progression of gastric cardiac adenocarcinoma." *Mol Med Rep* 7(2): 537-542.

Yang, L., S. Xie, M. S. Jamaluddin, S. Altuwaijri, J. Ni, E. Kim, Y.-T. Chen, Y.-C. Hu, L. Wang and K.-H. Chuang (2005). "Induction of androgen receptor expression by phosphatidylinositol 3-kinase/Akt downstream substrate, FOXO3a, and their roles in apoptosis of LNCaP prostate cancer cells." *Journal of Biological Chemistry* 280(39): 33558-33565.

Yao, J. C., M. H. Shah, T. Ito, C. L. Bohas, E. M. Wolin, E. Van Cutsem, T. J. Hobday, T. Okusaka, J. Capdevila and E. G. de Vries (2011). "Everolimus for advanced pancreatic neuroendocrine tumors." *New England Journal of Medicine* 364(6): 514-523.

Yee, A. J. and N. S. Raje (2012). "Denosumab, a RANK ligand inhibitor, for the management of bone loss in cancer patients." *Clinical interventions in aging* 7: 331.

Yin, J. J., K. Selander, J. M. Chirgwin, M. Dallas, B. G. Grubbs, R. Wieser, J. Massagué, G. R. Mundy and T. A. Guise (1999). "TGF- $\beta$  signaling blockade inhibits PTHrP secretion by breast cancer cells and bone metastases development." *Journal of Clinical Investigation* 103(2): 197.

Yu, G., J. Wang, Y. Chen, X. Wang, J. Pan, G. Li, Z. Jia, Q. Li, J. C. Yao and K. Xie (2009). "Overexpression of phosphorylated mammalian target of rapamycin predicts lymph node metastasis and prognosis of chinese patients with gastric cancer." *Clinical Cancer Research* 15(5): 1821-1829.

Yuan, R., A. Kay, W. J. Berg and D. Lebowitz (2009). "Targeting tumorigenesis: development and use of mTOR inhibitors in cancer therapy." *J Hematol Oncol* 2(1): 45.

Zackrisson, B., G. Aus, H. Lilja, P. Loding, C.-G. Pihl and J. Hugosson (2003). "Follow-up of men with elevated prostate-specific antigen and one set of benign biopsies at prostate cancer screening." *European urology* 43(4): 327-332.

Zaytseva, Y. Y., J. D. Valentino, P. Gulhati and B. M. Evers (2012). "mTOR inhibitors in cancer therapy." *Cancer letters* 319(1): 1-7.

Zhang, X., L. Shu, H. Hosoi, K. G. Murti and P. J. Houghton (2002). "Predominant nuclear localization of mammalian target of rapamycin in normal and malignant cells in culture." *Journal of Biological Chemistry* 277(31): 28127-28134.

Zheng, Y. and Y. Jiang (2015). "mTOR Inhibitors at a Glance." *Molecular and cellular pharmacology* 7(2): 15.

Zhou, H. and S. Huang (2010). "mTOR signaling in cancer cell motility and tumor metastasis." *Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression* 20(1).

Zhou, X., M. Tan, V. S. Hawthorne, K. S. Klos, K.-H. Lan, Y. Yang, W. Yang, T. L. Smith, D. Shi and D. Yu (2004). "Activation of the Akt/mammalian target of rapamycin/4E-BP1 pathway by ErbB2 overexpression predicts tumor progression in breast cancers." *Clinical Cancer Research* 10(20): 6779-6788.

Zinzalla, V., D. Stracka, W. Oppliger and M. N. Hall (2011). "Activation of mTORC2 by association with the ribosome." *Cell* 144(5): 757-768.

Zoncu, R., A. Efeyan and D. M. Sabatini (2011). "mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing." *Nature reviews Molecular cell biology* 12(1): 21-35.

## VII.2 Ehrenwörtliche Erklärung zum Eigenanteil

Ich, Annabella Christina Geiges, bestätige hiermit, dass ich das vorliegende zur Promotion eingereichte Manuskript mit dem Titel:

**„Evaluation von Alterationen innerhalb der mTOR-Regulation entlang der Progression zum metastasierten Prostatakarzinom – Immunhistochemische Untersuchungen mittels der Tissue-Microarray-Technik“**

selbstständig verfasst und lediglich die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe. Übernommene Abbildungen, Tabellen, Formulierungen und Gedankengut sind als solche kenntlich gemacht worden.

Die Arbeit wurde in der Klinik für Urologie des Universitätsklinikums Tübingen unter Betreuung von Herrn Professor Dr. Dr. Arnulf Stenzl und Herrn Dipl.-Biol. Jörg Hennenlotter durchgeführt. Die Konzeption dieser Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Dipl.-Biol. Jörg Hennenlotter und Herrn Professor Dr. Tilman Todenhöfer. Die Auswahl des Patientenkollektivs geschah durch Herrn Yannick Pach und Herrn David Rodriguez mit Hilfe von Herrn Dr. Johannes Mischinger. Die Herstellung der TMA-Paraffinblöcke, die in dieser Arbeit Verwendung fanden, erfolgte in erster Linie durch Herrn Yannick Pach und Herrn David Rodriguez. An der Bearbeitung der Datenbanken mit den klinischen Patienteninformationen waren Herr Lennart Jobst und Herr Luca Ulrich maßgeblich beteiligt. Die Verifikation der Schnitte übernahm der Pathologe Dr. Marcus Scharpf. Zudem erfolgte eine studienbezogene histopathologische Beurteilung der Präparate durch einen Mitarbeiter in Pittsburgh. Die immunhistochemische Färbung wurde von Frau Ursula Kühs im Labor der Klinik für Urologie vorgenommen. Die Erhebung, Auswertung und Interpretation aller Daten dieser Studie erfolgte ausschließlich durch mich. Herr Dipl.-Biol. Jörg Hennenlotter gab als Betreuer dieser Arbeit wertvolle Tipps und Anregungen bei der Verschriftlichung des Erfassten und unterstützte mich mit Tim Neumann bei der statistischen Evaluation der Datenbanken.



### VII.3 Danksagung

Zunächst gilt mein Dank meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Dr. A. Stenzl, der mir die Möglichkeit gab, meine Dissertation an dieser herausragenden Klinik zu verfassen, mir freie Hand bei der Auswahl des Themas ließ und zuletzt die Durchsicht meines Manuskripts übernahm.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dipl.-Biol. J. Hennenlotter für die Betreuung bei der Verfassung der Dissertation und für die großartige immanente Hilfestellung bei der Bewältigung aller aufkommenden Fragen und Problematiken. Ich hätte mir keinen besseren Betreuer wünschen können.

Bei Herrn Prof. Dr. T. Todenhöfer und Tim Neumann bedanke ich mich für die wertvollen Tipps bezüglich der statistischen Aufarbeitung der Ergebnisse.

Ich danke zudem Herrn Yannick Pach und Herrn David Rodriguez sehr für die Anfertigung der TMAs und Herrn Dr. J. Mischinger für die Hilfe bei der zuvor bewerkstelligten Auswahl des Patientenkollektivs.

Auch bei Herrn Luca Ulrich und Herrn Lennart Jobst möchte ich mich hiermit für die gewissenhafte Bearbeitung der Datenbanken und den stetigen Austausch bedanken. Beide gaben mir oftmals hilfreiche Anregungen.

Der medizinisch-technischen Assistentin Frau Ursula Kühs aus dem urologischen Labor gilt außerdem mein herzlicher Dank für die sorgfältige Färbung der in dieser Arbeit ausgewerteten Schnitte und für die Hilfe bei Fragen zu den methodischen Angelegenheiten. Zudem danke ich dem gesamten Labor der Urologie und der Pathologie der Universität Tübingen für die Bereitstellung aller für diese Studie notwendigen Materialien, Geräte und vor allem für die Überlassung der Gewebeblöcke.

Herzlichst bedanke ich mich zudem bei Herrn Dr. S. Rausch, der für das Einscannen der Arrays immer wieder nach Stuttgart ans IKP (Institut für klinische Pharmakologie) fuhr und mich damit sehr unterstützte.

Herrn Dr. M. Scharpf spreche ich hiermit meinen aufrichtigen Dank für die gründliche Verifikation der Schnitte aus.

Ferner möchte ich mich bei Herrn Dr. Hannes von Sievers dafür bedanken, dass er mir stets ohne zu zögern bei allen technischen Fragen in Bezug auf das Mikroskopieren weiterhalf.

Des Weiteren möchte ich mich hiermit bei allen Freunden bedanken, die mir in der Zeit der Niederschrift dieser Arbeit zur Seite standen und mich, jeder auf seine ganz eigene Weise, immer wieder motivierten.

Mein letzter, aber deswegen nicht minderer Dank gilt meiner Familie, die mich immer nach Kräften sowohl emotional als auch finanziell unterstützte, mir Energie gab und mich niemals an meinen Entscheidungen zweifeln ließ.