

Aus der  
Universitätsklinik für Urologie Tübingen

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

**Immunhistochemische Untersuchungen zur Biologie  
und prognostischen Wertigkeit von mTOR, p-mTOR  
und 4E-BP beim organbegrenzten Prostatakarzinom  
mittels der Tissue Microarray-Technik**

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

**vorgelegt von  
Wurm, Thomas Manfred**

**2024**

Dekan:

Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter:

Professor Dr. Arnulf Stenzl

2. Berichterstatter:

Professor Dr. H.-C. Bösmüller

Tag der Disputation:

30.10.2024

# Inhalt

<b>I</b>	<b><u>EINLEITUNG</u></b> .....	<b>18</b>
<b>I.1</b>	<b><u>DAS PROSTATAKARZINOM</u></b> .....	<b>18</b>
I.1.2	PROGNOSE UND REZIDIVDIAGNOSTIK DES PROSTATAKARZINOMS	28
<b>I.2</b>	<b><u>HETEROGENITÄT DES PROSTATAKARZINOMS</u></b> .....	<b>36</b>
<b>I.3</b>	<b><u>DAS SIGNALSYSTEM UM MTOR</u></b> .....	<b>40</b>
I.3.2	4E-BP1 ALS DOWNSTREAM TARGET VON MTOR	46
I.3.3	4E-BP1 IN DER TUMORENTSTEHUNG, -ENTWICKLUNG UND -THERAPIE	47
I.3.4	ONKOLOGISCHE BEDEUTUNG VON MTOR	49
<b>I.4</b>	<b><u>FRAGESTELLUNG DER ARBEIT</u></b> .....	<b>54</b>
<b>II</b>	<b><u>MATERIAL UND METHODEN</u></b> .....	<b>56</b>
<b>II.1</b>	<b><u>PRÜFUNG ETHISCHER BELANGE UND ETHIKVOTUM</u></b> .....	<b>56</b>
<b>II.2</b>	<b><u>DATENSCHUTZBELANGE</u></b> .....	<b>56</b>
<b>II.3</b>	<b><u>DETERMINIERUNG UND REKRUTIERUNG DER STUDIEN-POPULATION</u></b> .....	<b>57</b>
II.3.1	EINSCHLUSSKRITERIEN	57
II.3.2	AUSSCHLUSSKRITERIEN	58
<b>II.4</b>	<b><u>DATENBANKERSTELLUNG UND -VERARBEITUNG</u></b> .....	<b>58</b>
<b>II.5</b>	<b><u>AUFBEREITUNG DES OPERATIONSPRÄPARATES UND ASSERVIERUNG DER GEWEBEPROBEN</u></b> ....	<b>59</b>
<b>II.6</b>	<b><u>HISTOPATHOLOGISCHE BEURTEILUNG DES ASSERVIERTEN GEWEBES</u></b> .....	<b>61</b>
<b>II.7</b>	<b><u>TISSUE MICROARRAY</u></b> .....	<b>62</b>
II.7.1	DIE TECHNISCHE VORGEHENSWEISE	62
II.7.2	HERSTELLUNG DES TISSUE MICROARRAYS	63
II.7.3	SCHNITTPRÄPARATE DES PARAFFINGEWEBEBLOCKS – TISSUE MICROARRAY	65
<b>II.8</b>	<b><u>IMMUNHISTOCHEMIE</u></b> .....	<b>66</b>
II.8.1	ALLGEMEINES FUNKTIONSPRINZIP	66
II.8.2	POLYMERKONJUGAT-METHODE (ENVISION™)	66
II.8.3	DURCHFÜHRUNG DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN FÄRBUNG	67
<b>II.9</b>	<b><u>EVALUATION UND INTERPRETATION DES MIKROSKOPISCH ERFASSTEN EXPRESSIONS- VERHALTENS</u></b> .....	<b>71</b>
II.9.1	SCORE NACH REMMELE UND STEGNER	72
II.9.2	VALIDIERUNG DER ROHDATEN DER MIKROSKOPISCHEN AUS-WERTUNG	73
<b>II.10</b>	<b><u>ERHEBUNG DES POSTOPERATIVEN KRANKHEITS-VERLAUFS</u></b> .....	<b>74</b>
II.10.2	TELEFONISCHER PATIENTENKONTAKT	74
<b>II.11</b>	<b><u>STATISTISCHE AUSWERTUNG DER DATENBÄNKE</u></b> .....	<b>75</b>
<b>II.12</b>	<b><u>ZUSÄTZLICH VERWENDETE SOFTWARE</u></b> .....	<b>77</b>

<b>III</b>	<b><u>ERGEBNISSE</u></b>	<b>78</b>
<b>III.1</b>	<b><u>PATIENTENKOLLEKTIV UND CHARAKTERISTIKA DER STUDIENPOPULATION</u></b>	<b>78</b>
<b>III.2</b>	<b><u>BESCHREIBUNG UND VERTEILUNGEN DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN FÄRBERGEBNISSE</u></b>	<b>80</b>
<b>III.3</b>	<b><u>ERGEBNISSE HINSICHTLICH DER LOKALISATIONEN GEGENÜBER DER INVASIONSFRONT VOR DEM HINTERGRUND INTRAPROSTATISCHER TUMORHETEROGENITÄT</u></b>	<b>83</b>
<b>III.4</b>	<b><u>EXPRESSIONSCHARAKTERISTIKA IN BEZUG AUF KLINISCH-PATHOLOGISCHE PARAMETER</u></b>	<b>90</b>
<b>III.5</b>	<b><u>EXPRESSION DER MARKER HINSICHTLICH IHRER BEDEUTUNG FÜR PROGNOTISCHE AUSSAGEN ZUM KRANKHEITSVERLAUF</u></b>	<b>92</b>
<b>IV</b>	<b><u>DISKUSSION</u></b>	<b>108</b>
<b>IV.1</b>	<b><u>WESEN DER ARBEIT UND SYNOPSIS DER ERGEBNISSE</u></b>	<b>108</b>
<b>IV.2</b>	<b><u>MARKEREXPRESSION IM BEZUG ZUR MALIGNITÄT DES GEWEBES</u></b>	<b>109</b>
IV.2.1	MTOR EXPRESSION IM BEZUG ZUR MALIGNITÄT DES GEWEBES	109
IV.2.2	P-MTOR EXPRESSION IM BEZUG ZUR MALIGNITÄT DES GEWEBES	110
IV.2.3	P-MTOR / MTOR QUOTIENT IM BEZUG ZUR MALIGNITÄT DES GEWEBES	113
IV.2.4	4E-BP1 EXPRESSION IM BEZUG ZUR MALIGNITÄT DES GEWEBES	114
IV.2.5	ZUSAMMENFASSUNG DER EXPRESSIONSCHARAKTERISTIKEN IM BEZUG ZUR MALIGNITÄT DES GEWEBES	115
<b>IV.3</b>	<b><u>INTRATUMORALE HETEROGENITÄT UND BEZUG ZUR INVASIONSFRONT</u></b>	<b>116</b>
<b>IV.4</b>	<b><u>MARKEREXPRESSIONEN UND DEREN PROGNOTISCHE WERTIGKEIT</u></b>	<b>120</b>
<b>IV.5</b>	<b><u>PROGNOTISCHE WERTIGKEIT DER EXPRESSIONEN VOR DEM HINTERGRUND DER TUMORHETEROGENITÄT</u></b>	<b>123</b>
<b>IV.6</b>	<b><u>LIMITATIONEN DER ARBEIT</u></b>	<b>128</b>
<b>IV.7</b>	<b><u>SCHLUSSFOLGERUNG</u></b>	<b>130</b>
<b>V</b>	<b><u>ZUSAMMENFASSUNG</u></b>	<b>131</b>
<b>VI</b>	<b><u>PUBLIKATION DER ERGEBNISSE</u></b>	<b>133</b>
<b>VII</b>	<b><u>LITERATURVERZEICHNIS</u></b>	<b>134</b>
<b>VIII</b>	<b><u>ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL</u></b>	<b>159</b>
	<b><u>LEBENS LAUF</u></b>	<b>162</b>

## Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** Beispielhafte Darstellung der Heterogenität von Histologie und biochemischen Markern im Prostataraum (aus Merseburger et al. (2006)).  
.....38
- Abbildung 2:** Schematische Darstellung der mTOR Signalwege im PI3K/AKT/mTOR Signalweg (übernommen aus Wullschleger et al., 2006). Während der Rapamycin-sensitive mTORC1 Komplex Faktoren reguliert, welche letztlich das Größenwachstum der Zelle bestimmen, reguliert der Rapamycin-insensitive mTORC2 Komplex das Aktin-Cytoskelett und somit die „Form“ der Zelle. mTORC1 reagiert auf Insulin und Insulin-like growth factors (IGF), sowie auf Stress, den Energiezustand der Zelle und auf Nährstoffe wie Aminosäuren. Für mTORC2 werden diese Zusammenhänge ebenfalls vermutet. Spitze Pfeile deuten eine Aktivierung an, stumpfe Pfeile eine Hemmung (Wullschleger et al., 2006). ..... 46
- Abbildung 3:** Histopathologisch befundeter HE-Schnitt mit eingezeichnetem, farbig gehaltenen Tumorareal einer Prostata und studienbedingten Entnahmeorten nach Schema. Probenentnahmeorte in Bezug zur Invasionsfront des Tumorareals (rot eingefärbt) auf dem Schnittpräparat. Korrespondierende Probenbiopsien wurden zur Erstellung des Tissue Microarray verwendet: **Schwarz:** Tumorzentrum (gemäß A aus II.6), **Grün:** Tumordinvasionsfront (B) maligne Histologie, **Blau:** Tumordinvasionsfront (C) benigne Histologie, **Rot:** Tumor-entfernt liegendes benignes Prostatagewebe (D) (Russo et al., 2019). .....59
- Abbildung 4:** Natives Prostatektomiepräparat links apikal, rechts basal, Ansicht von anterior, Foto Urologie Tübingen. ....60
- Abbildung 5:** Lamelliertes Prostata-Operationspräparat nach Fixierung in Formalin. Diese Horizontallamellen wurden dann repräsentativ in

Routineförmchen zugeschnitten. Rechts apikale Lamelle, links basale Lamelle. ....	61
<b>Abbildung 6:</b> Tissue Microarrayer MTA1 von Beecher Instruments in Verwendung (Foto Urologie Tübingen). ....	63
<b>Abbildung 7:</b> Randomisierte Anordnung der Gewebedots im Tissue Microarray gemäß Lokalisation der entnommenen Proben (verändert nach Abbildung 5).....	64
<b>Abbildung 8:</b> Tissue Microarray – Block mit der Zusammenstellung der Studienproben. ....	65
<b>Abbildung 9:</b> Technik der Immunhistochemie, <b>links:</b> allgemeines Funktionsprinzip, <b>rechts:</b> Polymerkonjugat-Methode (Grafik: Tim Neumann, nach Staining Manual, Dako, Glostrup, Dänemark). Der Primärantikörper (Primär-AK) bindet an das Antigen (AG). Mehrere, an ein Polysaccharidmolekül gebundene, Sekundär-Antikörper (Sekundär-AK) binden an den Primär-Antikörper. Durch gleichzeitige Kopplung von Enzymen an das Polysaccharidmolekül wird die Bindung sichtbar gemacht. ....	67
<b>Abbildung 10:</b> Händisch durchgeführte immunhistochemische Färbung auf der Färbekbank, Foto U. Kühs. ....	69
<b>Abbildung 11 A-D:</b> Exemplarische Gewebedots aus 4E-BP Immunhistochemie, <b>A</b> Normales Prostatagewebe; <b>B-D</b> Prostatakarzinom-Gewebe unterschiedlich starker Expression. ....	81
<b>Abbildung 12 A-C:</b> Exemplarische Darstellung des mikroskopischen Bildes der immunhistochemischen Färbung auf mTOR. <b>A</b> Normales Prostatagewebe; <b>B</b> Prostatakarzinom mit starker Expression; <b>C</b> , Prostatakarzinom mit schwacher Expression. 40x Vergrößerung. ....	81
<b>Abbildung 13 A-C:</b> Exemplarische Darstellung des mikroskopischen Bildes der immunhistochemischen Färbung auf p-mTOR. <b>A</b> Normales Prostatagewebe;	

<b>B</b> Prostatakarzinom mit starker Expression; <b>C</b> , Prostatakarzinom mit schwacher Expression. 40x Vergrößerung. ....	82
<b>Abbildung 14 A-C:</b> Exemplarische Darstellung des mikroskopischen Bildes der immunhistochemischen Färbung auf 4E-BP1. <b>A</b> Normales Prostatagewebe (*); angrenzend an Prostatakarzinom-Gewebe (**); <b>B</b> Prostatakarzinom mit starker Expression; <b>C</b> , Prostatakarzinom mit schwacher Expression. <b>A,C</b> 40x Vergrößerung, <b>B</b> 100x Vergrößerung. ....	83
<b>Abbildung 15:</b> Expressionsverhalten der Marker mTOR, p-mTOR und 4E-BP1 in Abhängigkeit der Lokalisation des Gewebes innerhalb der Prostata in Abhängigkeit der Invasionsfront des Prostatakarzinoms, Entnahmeorte A-D gemäß Darstellung im Methodenteil und Tabelle 7, als oberes Streumaß dient der SEM, post-hoc Vergleich der Gruppen mittels Wilcoxon Test für jedes Paar. Nach Bonferroni korrigiertes $\alpha$ Level: $p \approx 0.0083$ . ....	85
<b>Abbildung 16:</b> Färbeintensität von mTOR in benignem und in malignem Prostatagewebe nach Zusammenfassung der Entnahmeorte A mit B und C mit D zu den Gruppen "Tumorgewebe" bzw. „benignes Gewebe“. $p < 0.0001$ . ....	86
<b>Abbildung 17:</b> Darstellung des mittleren Aktivierungsstatus von mTOR, ermittelt durch Quotientenbildung von p-mTOR / mTOR, in den verschiedenen Entnahmeorten. Fehlerbalken entsprechend dem SEM. ....	89
<b>Abbildung 18:</b> Darstellung des Zusammenhangs zwischen Expression von mTOR (rot entspricht Expression unter Median, blau entspricht Expression über und gleich dem Median) im jeweiligen Probenentnahmeort (Tumorzentrum, Tumorrand, tumorfern) und dem Eintreten eines biochemischen Rezidivs nach Prostatektomie. Kaplan-Meier-Kurven: Wahrscheinlichkeit kein Rezidiv zu erleiden (y-Achse) gegen Follow-up Dauer (x-Achse) in Monaten. ....	94
<b>Abbildung 19:</b> Darstellung des Zusammenhangs zwischen schwacher (rot) und starker (blau) Expression von mTOR in Lokalisation B (Tumorrand) und der	

Zeit bis zum Eintreten eines biochemischen Rezidivs nach Prostatektomie.  
Kaplan-Meier-Kurve. Zensuren und Events = +. ....95

**Abbildung 20:** Darstellung des Zusammenhangs zwischen schwacher (rot) und starker (blau) Expression von p-mTOR in Lokalisation A (Tumorzentrum) und der Zeit bis zum Eintreten eines biochemischen Rezidivs nach Prostatektomie. Kaplan-Meier-Kurve. ....96

**Abbildung 21:** Darstellung des Zusammenhangs zwischen schwacher (rot) und starker (blau) Expression von 4E-BP1 in Lokalisation A (Tumorzentrum) und der Zeit bis zum Eintreten eines biochemischen Rezidivs nach Prostatektomie. Kaplan-Meier-Kurve. ....97

**Abbildung 22:** Subgruppeneinteilung nach Müller et al. Von den untersuchten Tumoren mit vorliegender ERG-Fusion wiesen 14% eine Deletion von PTEN auf, von denen wiederum die p-mTOR negativen Tumoren mit einem signifikant schlechteren Outcome der jeweiligen Patienten bezüglich eines Rezidivs einher gingen. (Muller et al., 2013).....112

## TABELLENVERZEICHNIS

**Tabelle 1:** TNM-Klassifikation des Prostatakarzinoms nach UICC 2009 (Wittekind, 2016, Prien and Christmann, 2018). ....24

**Tabelle 2:** Zusammenfassung überlebens- und progressionsassoziierter Proteine in Prostatakarzinomgeweben unterschiedlicher Stadien; nach (Buhmeida et al., 2006), (Martin et al., 2011), (Pentyala et al., 2016). (\* signifikante p-Werte sofern angegeben).....31

**Tabelle 3:** Ergebnis des Immunoreactive Score (IRS) nach Remmele & Stegner (1987). Der prozentuale Wert der angefärbten Zellen wird mit der vorherrschenden Färbintensität (SI) multipliziert und ergibt damit den IRS. ....73

**Tabelle 4:** Darstellung der Verteilung des T-Stadiums der Patienten. ....78



<b>Tabelle 5:</b> Detaillierte Darstellung der Verteilung des Gleason Scores der Patienten. ....	79
<b>Tabelle 6:</b> Zusammenfassende Darstellung der Eigenschaften des Patientenkollektivs. ....	80
<b>Tabelle 7 A-D:</b> Expression von mTOR, p-mTOR und 4E-BP1 in den Lokalisationen A aus dem Tumorzentrum des Haupttumors; B aus dem histologisch malignen Bereich der Invasionsfront; C aus dem histologisch benignen Bereich der Invasionsfront; D aus am weitesten von allen Tumorealen entferntem benignem Gewebe. P-Werte wurden mittels Wilcoxon/Kruskal-Wallis Rangsummen Test ermittelt. ....	84
<b>Tabelle 8:</b> Mittlere Färbeintensität von mTOR, p-mTOR und 4E-BP1 in benignem und malignem Gewebe der Prostata. p-Werte wurden mittels Wilcoxon/Kruskal-Wallis Rangsummen Test ermittelt. ....	87
<b>Tabelle 9:</b> Spearmans Rangkorrelationskoeffizient (Spearmans $\rho$ ) für alle Parameterpaare in den Gewebegruppen A&B ("Tumorgewebe") und C&D („benignes Gewebe“). Statistisch signifikante Ergebnisse mit * markiert. ...	87
<b>Tabelle 10:</b> Spearmans Rangkorrelationskoeffizient (Spearmans $\rho$ ) zwischen allen benignen und malignen Geweben für alle untersuchten Parameter. Statistisch signifikante Ergebnisse mit * markiert. ....	88
<b>Tabelle 11:</b> Gegenüberstellung der Proteinexpression in Low Gleason und High Gleason Gewebe, gruppiert nach Entnahmeort. Ermittlung des p-Werts mittels Rangsummentest unter Verwendung der Chi-Quadrat-Approximation. Korrigiertes $\alpha$ Level: 0.00625. ....	91
<b>Tabelle 12:</b> Gegenüberstellung der Proteinexpression in Gruppe 1 (T-Stadium < T3a) und Gruppe 2 (T-Stadium $\geq$ T3a) nach Entnahmeort unterschieden. Korrigiertes $\alpha$ Level für die Vergleiche in „Tumorzentrum“ und „Tumorrand“: 0.00625. ....	92

<b>Tabelle 13:</b> Log-Rank Testung zwischen den Überlebenskurven für hohe bzw. niedrige Expression von mTOR im jeweiligen Entnahmeort. ....	93
<b>Tabelle 14:</b> Log-Rank Testung zwischen den Überlebenskurven für hohe bzw. niedrige Expression von p-mTOR im jeweiligen Entnahmeort. Im benignen Rand lag der Medianwert der Expression bei 0, weshalb nicht zwischen Über- bzw. Unterexpression unterschieden wurde. Keine Auswertung für benignen Rand möglich. ....	96
<b>Tabelle 15:</b> Log-Rank Testung zwischen den Überlebenskurven für hohe bzw. niedrige Expression von 4E-BP1 im jeweiligen Entnahmeort. ....	98
<b>Tabelle 16:</b> Log-Rank Testung zwischen den Überlebenskurven für einen hohen bzw. niedrigen Quotienten zwischen p-mTOR und mTOR im jeweiligen Entnahmeort. ....	98
<b>Tabelle 17:</b> Effekt der Proteinexpressionen in Tumorzentrum (A), Tumorrand (B) und der zusammengefassten Gewebegruppe „Tumorgewebe“ (Mittelwerte aus A+B) auf die Wahrscheinlichkeit, ein biochemisches Rezidiv zu erleiden. Signifikante Ergebnisse mit * markiert. ....	101
<b>Tabelle 18:</b> Effektzusammenfassung der Modelleinflüsse samt mTOR Expression im Tumorzentrum (A) auf die zeitabhängige Wahrscheinlichkeit, ein biochemisches Rezidiv zu erleiden. Signifikante Ergebnisse mit * markiert. ....	102
<b>Tabelle 19:</b> Effektzusammenfassung der Modelleinflüsse samt mTOR Expression im Tumorrand (B) auf die zeitabhängige Wahrscheinlichkeit, ein biochemisches Rezidiv zu erleiden. Signifikante Ergebnisse mit * markiert. ....	102
<b>Tabelle 20:</b> Effektzusammenfassung der Modelleinflüsse samt mTOR Expression im Tumorgewebe (Mittelwerte aus A+B) auf die zeitabhängige Wahrscheinlichkeit, ein biochemisches Rezidiv zu erleiden. Signifikante Ergebnisse mit * markiert. ....	103

<b>Tabelle 21:</b> Effektzusammenfassung der Modelleinflüsse samt p-mTOR Expression im Tumorzentrum (A) auf die zeitabhängige Wahrscheinlichkeit, ein biochemisches Rezidiv zu erleiden. Signifikante Ergebnisse mit * markiert. ....	104
<b>Tabelle 22:</b> Effektzusammenfassung der Modelleinflüsse samt p-mTOR Expression im Tumorrand (B) auf die zeitabhängige Wahrscheinlichkeit, ein biochemisches Rezidiv zu erleiden. Signifikante Ergebnisse mit * markiert. ....	104
<b>Tabelle 23:</b> Effektzusammenfassung der Modelleinflüsse samt p-mTOR Expression im Tumorgewebe (Mittelwerte aus A+B) auf die zeitabhängige Wahrscheinlichkeit, ein biochemisches Rezidiv zu erleiden. Signifikante Ergebnisse mit * markiert. ....	105
<b>Tabelle 24:</b> Effektzusammenfassung der Modelleinflüsse samt 4E-BP1 Expression im Tumorzentrum (A) auf die zeitabhängige Wahrscheinlichkeit, ein biochemisches Rezidiv zu erleiden. Signifikante Ergebnisse mit * markiert. ....	106
<b>Tabelle 25:</b> Effektzusammenfassung der Modelleinflüsse samt 4E-BP1 Expression im Tumorrand (B) auf die zeitabhängige Wahrscheinlichkeit, ein biochemisches Rezidiv zu erleiden. Signifikante Ergebnisse mit * markiert. ....	106
<b>Tabelle 26:</b> Effektzusammenfassung der Modelleinflüsse samt 4E-BP1 Expression im Tumorgewebe (Mittelwerte aus A+B) auf das zeitabhängige Risiko, ein biochemisches Rezidiv zu erleiden. Signifikante Ergebnisse mit * markiert. ....	107

## Verwendete Abkürzungen

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
40S	Eukaryotic small ribosomal subunit
4E-BP	Eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein
4E-BP1	Eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1
4E-BP2	Eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 2
A. dest.	Aqua destillata
AG	Antigen
AK	Antikörper
AKT	Proteinkinase(n) B
AKT1S1	Proline-rich AKT1 substrate 1
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
AP	Alkalische Phosphatase
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
Aqua dest.	Aqua destillata
AS	Active surveillance
Atg13	Autophagy-related protein 13
Atg4C	Cysteine protease ATG4C
ATP	Adenosintriphosphat
AUA	American Urological Association
BAD	Bcl-2-Antagonist of Cell Death
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BCR	biochemisches Rezidiv
BECN1	Für Beclin 1 kodierendes Gen
BPH	benigne Prostatahyperplasie
B-Raf	serine/threonine-protein kinase B-Raf
BRT	Brachytherapie
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CDKN1B	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B
cm	Centimeter
CNA	copy number alteration
d.h.	das heißt
DEPTOR	DEP domain-containing mTOR-interacting protein
DNA	Deoxyribonucleic acid
DRU	Digital-rektale Untersuchung
EAU	European Association of Urology
ebd.	ebenda
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eIF4E	Eukaryotic translation initiation factor 4E

eIF4F	Eukaryotic initiation factor 4F
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
FAT Domäne	FRAP-ATM-TTRAP Domäne
Fc Region	fragment crystallizable region
FIP200	FAK family kinase-interacting protein of 200 kDa
FISH	Fluoreszenz in-situ Hybridisierung
FKBP12	12-kDa FK506-binding protein
FRAP	FKBP12-rapamycin complex-associated protein
FRB Domäne	FKBP-rapamycin-binding Domäne
Grb10	Growth factor receptor-bound protein 10
GS	Gleason Score
Gy	Gray, Joule / kg
H.E.	Hämatoxylin-Eosin
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HDR BRT	High-Dose-Rate Brachytherapie
HR	Hazard Ratio
HT	Hormonentzugstherapie
IGF	Insulin like growth factor
IHC	Immunhistochemie
IL-24	Interleukin 24
IQR	interquartile range (Interquartilsabstand)
IRs	insulin receptor substrate
IRS	Immunoreaktiver Score
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KRPC	Kastrationsresistentes Prostatakarzinom
LA	Lymphadenektomie
LDR BRT	Low-Dose-Rate Brachytherapie
mAb	monoclonal Antibody (monoklonaler Antikörper)
Mcl-1	Induced myeloid leukemia cell differentiation protein
MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase
min	Minuten
ml	Milliliter
MLST8	mammalian lethal with SEC13 protein 8
mm	Millimeter
mmol	Millimol
mol	Einheiten in Mol
mRNA	messenger ribonucleic acid
mSin1	mammalian stress-activated map kinase-interacting protein 1
mTOR	mechanistic Target of Rapamycin
mTORC1	mTOR complex 1
mTORC2	mTOR complex 2
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
OP	Operation
p27 <sup>Kip1</sup>	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B
p-4E-BP1	phosphorylated 4E-BP1

p53	Tumor protein p53, auch: cellular tumor antigen p53
p-AKT	phosphorylated AKT
PCA	Prostatakarzinom
PDK1	phosphoinositide-dependent kinase-1
p-eIF4E	phosphorylated eIF4E
pH	potentia Hydrogenii
phospho-mTOR	phosphorylated mTOR
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
p-mTOR	phosphorylated mTOR
PPZ	Prozentzahl positiv gefärbter Zellen
PRAS40	Proline-rich AKT1 substrate 1
Protor-1	Proline-rich protein 5
Protor-2	Proline-Rich Protein 5-Like
pRT	perkutane Radiotherapie
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
Raptor	Regulatory-associated protein of mTOR
REDD1	regulated in development and DNA damage responses 1
Rheb	Ras homolog enriched in brain
rictor	rapamycin-insensitive companion of mTOR
RPTOR	Regulatory-associated protein of mTOR
RPX	Radikale Prostatektomie
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
S6K1	Ribosomal protein S6 kinase beta-1
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
Ser	Serin
SGK1	serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1
SI	Staining Index
SNP	single nucleotide polymorphism
StD	Standard Deviation (Standardabweichung)
SVN	single nucleotide variants
TBST	TRIS buffered Saline with Tween
Tel2	DNA replication checkpoint protein tel2
TFEB	Transcription factor EB
Thr	Threonin
TMA	Tissue Microarray
TOR	Target of Rapamycin
TOS-Motiv	mTOR signalling Motiv
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRUS	Transrektaler Ultraschall
TSC	Tuberous sclerosis complex
TSC1	Tuberous sclerosis 1
TSC2	Tuberous sclerosis 2
Tti1	TEL2-interacting protein 1
ULK1	unc-51-like kinase 1
WW	Watchful waiting
µm	Mikrometer

# I EINLEITUNG

## I.1 DAS PROSTATAKARZINOM

Als Prostatakarzinom (PCA) wird das Adenokarzinom der Prostata bezeichnet, also eine Proliferation epithelialer Drüsenzellen. Das Epithelkarzinom der Prostata ist weltweit 2018 mit knapp 1,3 Millionen Fällen die 3 häufigste Krebsart überhaupt und die zweithäufigste Krebsart bzw. die fünft häufigste Todesursache unter Männern. In West Europa lag 2018 die Inzidenz bei 75,8 bzw. die Mortalitätsrate bei 10,1 (Bray et al., 2018).

### I.1.1.1 ÄTIOLOGIE, VORKOMMEN, RISIKOFAKTOREN

Wie bei fast allen Tumorerkrankungen ist bei der Genese des Prostatakarzinoms von einem multifaktoriellen Geschehen auszugehen. Hierbei sind das Patientenalter, die Ernährungsweise, genetische Prädispositionen und epigenetische Einflüsse relevante Risikofaktoren. Mit zunehmendem Alter zeigt sich ein starker Anstieg der Inzidenz, insbesondere ab dem 50. Lebensjahr, während das mittlere Erkrankungsalter 2009/2010 in Deutschland bei 70 Jahren lag (Bertz et al., 2010, Kaatsch et al., 2013). Weiterhin konnte durch Migrationsstudien der Einfluss von Umweltfaktoren auf die Genese des Prostatakarzinoms gezeigt werden. So wurde nachgewiesen, dass Männer aus Japan, einem Land mit einer niedrigen Prävalenz für das PCA, nach Emigration in die USA im Laufe ihres Lebens eine höhere Prävalenz aufweisen, als nicht-emigrierte Japaner, sich das Auftreten eines PCA also allein durch Änderung der Umwelteinflüsse und auch Lebensgewohnheiten beeinflussen lässt (Grönberg, 2003). Ein ähnlicher Zusammenhang konnte bei PCA-Patienten nachgewiesen werden, die ihren bisherigen Lebensstil drastisch änderten und so das Voranschreiten der Grunderkrankung ausbremsen oder gar umkehren konnten (Ornish et al., 2005). So wird insbesondere die Ernährungsweise als ein wichtiger Faktor für das erhöhte Auftreten von fortgeschrittenen Prostatakarzinomen in den westlichen Industrienationen diskutiert, welche sich durch hohe Mengen an Kohlenhydraten und tierischen Fetten sowie relativ geringen Mengen an

Ballaststoffen auszeichnet (Hebert et al., 1998, Stenzl et al., 2009). Gleichzeitig werden protektive Faktoren in Lebensmitteln wie Isoflavone aus Sojaprodukten oder auch Lignane und Carotinoide diskutiert und beispielsweise mit der geringen Inzidenz des PCA in asiatischen Ländern mit hohem Soja-Konsum und dem geringen Konsum tierischer Fette in Verbindung gebracht (Denis et al., 1999, Magee and Rowland, 2004, Stenzl et al., 2009). Zu guter Letzt ist die genetische Prädisposition für das Auftreten eines PCA und ihre Erbllichkeit ein viel diskutierter und wichtiger Einflussfaktor der Erkrankung. Nach dem Durchbruch der modernen Sequenzierungsmethoden wurden diese ebenfalls zur Analyse von Karzinomen eingesetzt. Laut Meikle et al. beträgt das Risiko 88%, selbst mit 85 Jahren an einem PCA zu erkranken, sofern ein Verwandter ersten Grades bereits an einem PCA erkrankt ist (Meikle et al., 1985). Gleichzeitig steigt das Erkrankungsrisiko bis um den Faktor 11 an, sofern mehr als ein Verwandter an einem PCA erkrankt ist (Meikle et al., 1985, Johns and Houlston, 2003).

#### I.1.1.2 KLINIK DES PROSTATAKARZINOMS

Zumeist präsentiert sich das PCA im Frühstadium als symptomlose Erkrankung, welche lediglich durch Kontrolluntersuchungen wie die Bestimmung des prostataspezifischen Antigens (PSA), die Digital-Rektale Untersuchung und multiparametrisches MRT der Prostata detektiert und endgültig per Gewebsbiopsie bestätigt wird. Im fortgeschrittenen Stadium des PCA kann es jedoch zu Miktionsbeschwerden, Impotenz, Inkontinenz, Hämaturie, Hämatospermie oder pathologischer Frakturen durch die Gewebsproliferation des Organs, Tumorinfiltrate oder Metastasen auftreten. Diese Symptome sind allerdings keine Alleinstellungsmerkmale des PCA und ermöglichen damit keine Diagnosestellung.

#### I.1.1.3 FRÜHERKENNUNG UND DIAGNOSTIK DES PROSTATAKARZINOMS

Im heutigen klinischen Alltag stützt sich die Früherkennung und Diagnostik des Prostatakarzinoms auf vier Grundpfeiler: die Anamnese und manuelle körperliche Untersuchung, Laborparameter wie PSA, bildgebende Verfahren und



letztlich die feingewebliche Untersuchung durch die Pathologie nach erfolgter Biopsie. Dabei sind die digital-rektale Untersuchung und die Bestimmung des PSA-Wertes im Serum zur Früherkennung empfohlen, während eine Primärdiagnostik bei Verdacht auf PCA durch eine Biopsie gesichert wird. Bildgebende Verfahren wie transrektaler Ultraschall sind hierbei lediglich ergänzend empfohlen (Deutsche Krebsgesellschaft et al., 2019) (S3 Leitlinie).

#### I.1.1.4 DIGITAL-REKTALE UNTERSUCHUNG

Unter der digital-rektalen Untersuchung (DRU) wird die Palpation der Prostata über den Enddarm verstanden. Hierbei können Prostatakarzinome ab einer gewissen Größe als tastsuspekt auffallen. In Verbindung mit der Bestimmung des PSA Wertes stellt die DRU eine empfohlene Methode zur frühzeitigen Detektion des PCA dar, jedoch stellte sie sich als alleinige Maßnahme zur Früherkennung als unterlegen heraus, da nur wenige Prostatakarzinome durch die DRU allein festgestellt wurden. (Deutsche Krebsgesellschaft et al., 2019, Gosselaar et al., 2008a, Richie et al., 1993)

#### I.1.1.5 PROSTATASPEZIFISCHES ANTIGEN

Das Prostataspezifische Antigen (PSA) ist ein Glykoprotein, welches als Enzym der Verflüssigung des Samenkoagels dient und dem Ejakulat während der männlichen Ejakulation beigemischt wird. Es wird im männlichen Körper lediglich in Prostatagewebe in hohem Maße gefunden und kann in geringen Mengen im Blutserum nachgewiesen werden. Die physiologische Funktion der Serinprotease PSA wurde erstmals in den 1980er und 1990er Jahren erkannt und beschrieben und seither zur Früherkennung des PC herangezogen (Lilja and Abrahamsson, 1988, Lilja, 1993, Schröder et al., 2009). Aufgrund der Messung des prostataspezifischen Antigens im Serum werden heute die meisten PCA Frühdiagnosen gestellt (Ito et al., 2000, Schroder et al., 2008). Es konnte gezeigt werden, dass ein PCA Screening durch die PSA-Bestimmung im Serum die PCA Mortalität um bis zu 27% senken kann (Schroder et al., 2014). Jedoch wurde bereits früh die Problematik erkannt, dass der im Serum gemessene PSA-Wert auch durch andere Faktoren als nur ein PCA erhöht sein kann. Zu diesen

Faktoren gehören benigne Prostatahyperplasien, Entzündungen der Prostata aber auch mechanische Belastungen des Prostatagewebes. Dieser Tatsache ist die häufiger auftretende Überdiagnostik geschuldet, welche sich durch falsch-positive Testergebnisse darstellt und die Problematik optimaler Cut-Off Werte für diesen Parameter hervorhebt. (McGregor et al., 1998, Etzioni et al., 2002, Schroder and Roobol, 2009)

#### I.1.1.6 TRANSREKTALER ULTRASCHALL

Der transrektale Ultraschall (TRUS), ein bildgebendes Verfahren zur direkteren echographischen Untersuchung der Prostata mittels rektaler Ultraschallsonde, stellte sich alleinig als ein ungeeignetes Screening-Werkzeug heraus, jedoch konnten per geführter Biopsie in echoreichen Arealen gezielt Proben aus klinisch relevanten Prostatakarzinomen gewonnen werden, welche nicht durch eine standardmäßige systematische Biopsie getroffen worden wären (Gosselaar et al., 2008b). Der Zugewinn an Präzision durch eine systematische TRUS-geführte Prostatabiopsie macht diese zur empfohlenen diagnostischen Methodik (Heidenreich et al., 2014, Deutsche Krebsgesellschaft et al., 2019).

#### I.1.1.7 MULTIPARAMETRISCHES MRT DER PROSTATA

Mit dem mpMRT der Prostata steht seit geraumer Zeit ein bildgebendes Instrumentarium zur Diagnostik und Einteilung der Prostata nach radiologischen Kriterien bezüglich der Dignität etwaiger Läsionen nach dem Prostate Imaging Reporting & Data System (PI-RADS) zur Verfügung (Haider et al., 2021).

#### I.1.3.5 PROSTATABIOPSIE

Die stanzbiopsische Sicherung stellt bisher immer noch den Goldstandard in der Diagnostik des Prostatakarzinoms dar (Fei, 2019). Sie ist bei einer suspekten DRU, einem auffallenden Anstieg des PSA-Wertes bei gleicher Messmethodik oder einem PSA-Wert über 4ng/ml indiziert und stellt die einzig gewisse Diagnosemöglichkeit dar, da bisher kein nicht-invasives Verfahren eine ausreichende Spezifität zur sicheren Diagnostik aufweist.

#### I.1.1.8 KLASSIFIKATION DES PROSTATAKARZINOMS

Da sich die Therapieempfehlungen eines auf die Prostata begrenzten Tumors stark von der eines kapselüberschreitend wachsenden oder gar metastasierten Prostatakarzinoms unterscheidet, steht vor der Wahl der Therapie stets die Klassifikation des vorliegenden Tumorgeschehens hinsichtlich Wachstumsmuster und Wachstumsstadium. Ersteres wird dabei nach S3 Leitlinien als das sogenannte Grading durch den Gleason Score nach ISUP 2014 / WHO 2016 ausgedrückt, letzteres spiegelt sich in der TNM-Klassifikation nach UICC wider (Deutsche Krebsgesellschaft et al., 2019).

#### I.1.1.9 TUMORGRADING NACH GLEASON

Das Grading des Tumors beabsichtigt eine Erfassung des Grades der Differenzierung maligner Zellformationen vom gesunden Gewebe. Nach S3 Leitlinie soll diese Differenzierung bei der Prostata mittels der Gleason Summe erfolgen (Deutsche Krebsgesellschaft et al., 2019). Dazu wird das entnommene Gewebe histologisch untersucht und nach typischen Wachstumsmustern des entarteten Drüsengewebes klassifiziert. Für jede Gewebeprobe werden die in ihr auftretenden Differenzierungsgrade als Werte zwischen 1 und 5 ermittelt (Epstein et al., 2016b). Dabei ist unter einem Wert von 1 Tumorgewebe mit einem hohen Differenzierungsgrad und daher niedrigem Malignitätsgrad zu verstehen, während eine Wertung von 5 für stark entdifferenziertes Tumorgewebe mit hohem Malignitätsgrad vergeben wird. Anschließend wird aus zwei Kriterien eine Summe, die sogenannte Gleason Summe (Gleason Score) gebildet: der Differenzierungsgrad des am häufigsten vorkommenden Wachstumsmusters wird zum höchsten gefundenen Grad addiert. So sind theoretisch Gleason Summen Werte zwischen 2 und 10 möglich, wobei nach der letzten Aktualisierung des Gleason Scorings im Jahr 2014 die Unterscheidung in lediglich 5 Gradierungsgruppen empfohlen wurde: Gleason 6 (3+3), Gleason 7a (3+4), 7b (4+3), Gleason 8, 9 und 10 (Humphrey, 2004, Epstein et al., 2016b). Eine Gleason Summe unter 6 wird in der Regel nur als Zufallsbefund ermittelt, zum Beispiel nach pathologischer Aufarbeitung von Prostatagewebe mit benigner Hyperplasie, wohingegen hohe Gleason Summen über 7 oftmals bereits mit einer klinischen Symptomatik einhergehen. Es konnten bereits Zusammenhänge zwischen der Gleason Summe und dem Tumolvolumen,

einem kapselüberschreitenden Wachstum des Tumors und einem erhöhten Risiko für Knochenmetastasen nachgewiesen werden. (Humphrey, 2004)

#### I.1.1.10 TUMORSTAGING NACH TNM

Das Tumorstaging eines Prostatakarzinoms soll nach Leitlinie gemäß der allgemeinen TNM-Klassifikation erfolgen (Deutsche Krebsgesellschaft et al., 2019). Diese beschreibt in einer Kodierung die Ausdehnung des Tumorwachstums (T-Stadium, T), die Infiltration von Lymphknoten (N-Stadium, N) sowie das Vorliegen von Metastasen (M-Stadium, M). Hierbei wird jeder Schlüssel separat in Abstufungen angegeben (**Tabelle 1**).

<b>T-Stadium</b>	<b>(Ausdehnung und Größe des Primärtumors)</b>
<b>TX</b>	Primärtumor nicht beurteilbar
<b>T0</b>	Kein Hinweis auf Existenz eines Primärtumors
<b>T1</b>	Tumor klinisch nicht auffällig, nicht tastbar
T1a	Zufallsbefund, histologischer Nachweis von Tumorzellen in Prostatagewebe, maximal 5% des gewonnenen Gewebes betroffen
T1b	Zufallsbefund, histologischer Nachweis von Tumorzellen in Prostatagewebe, mehr als 5% des gewonnenen Gewebes betroffen
T1c	Tumorbefund in Gewebe aus Nadelbiopsie.
<b>T2</b>	Tastbarer Tumor, Wachstum auf die Prostata begrenzt.
T2a	Tumor in weniger als 50 % eines Seitenlappens
T2b	Tumor in mehr als 50 % eines Seitenlappens
T2c	Tumor in beiden Seitenlappen

<b>T3</b>	Tumor wächst über Prostatakapsel hinaus. Lokal fortgeschrittenes Prostatakarzinom.
T3a	Tumorausbreitung ein- oder beidseitig über Prostatakapsel hinaus, Samenblasen tumorfrei.
T3b	Tumorausbreitung ein- oder beidseitig über Prostatakapsel hinaus und in Samenblasen
<b>T4</b>	Tumorausbreitung in Nachbarstrukturen oder nicht verschiebbar.
<b>N-Stadium (Regionärer Lymphknotenbefall)</b>	
<b>NX</b>	Regionäre Lymphknoten nicht beurteilbar
<b>N0</b>	Kein Anhalt für regionäre Lymphknotenmetastasen
<b>N1</b>	Regionäre Lymphknotenmetastasen nachweisbar
<b>M-Stadium (Existenz von Fernmetastasen)</b>	
<b>M0</b>	Kein Anhalt für die Existenz von Fernmetastasen
<b>M1</b>	Fernmetastasen nachweisbar
M1a	Fernmetastasen in nicht-regionären Lymphknoten nachweisbar
M1b	Knochenmetastasen nachweisbar
M1c	Fernmetastasen in anderen Organen nachweisbar

**Tabelle 1:** TNM-Klassifikation des Prostatakarzinoms nach UICC 2009 (Wittekind, 2016, Prien and Christmann, 2018).

Da das volle TNM-Stadium eines Prostatakarzinoms erst nach stattgefundenener radikaler Prostatektomie mit Lymphadenektomie sowie eventueller Ganzkörperszintigraphie und multiparametrischer Magnetresonanztomographie abgeschätzt werden kann, existieren für die jeweiligen Schlüssel auch Kodierungen, die eine mangelhafte Beurteilbarkeit erfassen. (Wittekind, 2016) Im

klinischen Alltag existieren die Begriffe des lokal begrenzten (T1-2, N0, M0), des lokal fortgeschrittenen (T3-4, N0, M0) und des fortgeschrittenen bzw. metastasierten Prostatakarzinoms (N1 oder M1) (Deutsche Krebsgesellschaft et al., 2019).

#### I.1.1.11 THERAPIE DES LOKAL BEGRENZTEN PROSTATAKARZINOMS

Grundsätzlich wird bei der Therapie eines Prostatakarzinoms zwischen der Therapie eines lokal begrenzten PCA, also eines PCA ohne kapselüberschreitendes Wachstum, und der Therapie eines fortgeschrittenen PCA mit Infiltration benachbarter Gewebe oder gar Metastasierung unterschieden. Während im ersten Fall eine kurative Absicht primär durch radikale Prostatektomie (RPX) aber auch durch Strahlentherapie verfolgt wird, erfolgt bei einer fortgeschrittenen Erkrankung eine ausgedehntere Therapie, teils noch mit kurativem, teils aber auch schon palliativem Gedanken, insbesondere durch Hormonkastration oder Chemotherapie.

#### I.1.1.12 WATCHFUL WAITING & ACTIVE SURVEILLANCE

Die beiden Therapieansätze watchful waiting (WW) („wachsames Abwarten“) und active surveillance (AS) („aktive Überwachung“) beschreiben konservative Therapien, welche ein notwendiges kuratives Eingreifen in die Erkrankung erst bei Auftreten einer Symptomatik (WW) oder einem feststellbaren beschleunigten Fortschreiten des Karzinoms (AS) indizieren. Beide Therapieformen verfolgen das Ziel, klinisch insignifikante Prostatakarzinome von solchen zu unterscheiden, welche einen schnellen Progress aufweisen und noch zu Lebzeiten des Patienten symptomatisch werden könnten. Da jedoch festgestellt wurde, dass das Lebenszeitrisiko, an einem PCA zu erkranken, bei 15% bis 20% liegt, was nahe legt, dass sich nicht alle Prostatakarzinome klinisch manifestieren (Karavitikis et al., 2011). Andere Daten sprechen davon, dass je nach Altersgruppe bis zu zwei Drittel aller Männer im Laufe ihres Lebens an einem Prostatakarzinom erkranken, jedoch bei über 80% der Erkrankten eine Symptomatik ausbleibt und die 5-Jahres-Überlebensrate bei diesen Patienten bei 100% liegt (Robert Koch-Institut, 2007). Um eine Überbehandlung der Patienten

zu vermeiden, zielen die Ansätze WW und AS darauf ab, den Verlauf der diagnostizierten Grunderkrankung zu beobachten. Während die Ziele beider Therapien also ähnlich sind, unterscheiden Sie sich in der Vorgehensweise.

Der Active Surveillance Ansatz sieht eine Intervention mit kurativer Absicht erst vor, wenn von einem Fortschreiten des PCA ausgegangen werden kann. Hier müssen dafür einige Grundbedingungen wie eine passende Charakteristik des Tumors erfüllt sein und Kontrolluntersuchungen in engen zeitlichen Abständen erfolgen. Diese Kontrolluntersuchungen umfassen die PSA-Messung im Serum, jedoch auch wiederholte Biopsien. Der Zeitpunkt des Eingreifens wird in Abhängigkeit von der PSA-Verdoppelungszeit und einem Fortschreiten des Tumors im Biopsat abhängig gemacht. (Parker, 2004). Dem behandelten Patienten muss deutlich gemacht werden, dass die Risiken einer klassischen kurativen Therapie durch wiederholte Kontrolluntersuchungen und unter Umständen auch durch eine vermehrte psychische Belastung aufgrund des „nicht-behandelns trotz Krebs“ erkaufte wird (van den Bergh et al., 2010).

#### I.1.1.13 RADIKALE PROSTATEKTOMIE – OPERATIVE THERAPIE

Die RPX, also die vollständige Entfernung der Prostata samt Samenblasen, hat sich als die Standardbehandlung des lokal begrenzt wachsenden Prostatakarzinoms etabliert. Sie stellt nach Leitlinie eine primäre Therapieoption sowohl bei lokal begrenztem, als auch bei lokal fortgeschrittenem, nicht metastasiertem PCA dar (Deutsche Krebsgesellschaft et al., 2019). Die Wirksamkeit dieser Behandlungsmethode im Vergleich zu watchful waiting und active surveillance gilt als unumstritten (Bill-Axelsson et al., 2008, Bill-Axelsson et al., 2011). Da jedoch bei lokal fortgeschrittenen Karzinomen vom Grad T>2c ein höheres Risiko für einen nach erfolgter RPX verbleibenden Residualtumor (R1-Resektion) besteht, empfiehlt sich die alleinige RPX ohne begleitende Therapie nur bei solchen Tumoren niedrigen Stadiums (Swindle et al., 2005). Neben der klassischen offenen retropubischen RPX existiert der perineale Zugang sowie laparoskopische Verfahren mit oder ohne Roboterassistenz. Moderne Operationsverfahren wie die Roboter-assistierte RPX („daVinci“) scheinen einige Vorteile in Bezug auf die Nachwirkungen des Eingriffs wie beispielsweise

geringeren intraoperativen Blutverlust zu haben, sind jedoch noch mit relativ hohen Kosten im Vergleich zur konservativen Methodik verbunden (Stenzl et al., 2009, Mundhenk et al., 2013, Yun et al., 2019, Preisser et al., 2019). Neben den allgemeinen Risiken eines operativen Eingriffs ist bei einer radikalen Prostatektomie auf mögliche Harninkontinenz und Potenzverlust durch Muskel- bzw. Nervenschädigung hinzuweisen (Stenzl et al., 2009).

#### I.1.1.14           RADIOTHERAPIE

Die Strahlentherapie des Prostatakarzinoms unterscheidet die perkutane Radiotherapie (pRT) und die Brachytherapie (BRT), wobei die BRT noch einmal in eine Low-Dose-Rate BRT (LDR BRT, dauerhafte Implantation schwach radioaktiven Materials in das Tumorgewebe) und in eine High-Dose-Rate BRT (HDR BRT, kurzzeitige Einbringung stärker radioaktiven Materials in das Tumorgewebe) unterteilt wird. In beiden Fällen wird eine möglichst gezielte Schädigung von Tumorzellen durch energiereiche Strahlung oder Teilchenstrahlung angestrebt, wobei die an das Gewebe abgegebene Energie in der Einheit Gray (Gy, Joule / kg) gemessen wird. (Michel et al., 2016) Die S3 Leitlinie Prostatakarzinom empfiehlt die pRT als „eine primäre Therapieoption beim lokal begrenzten Prostatakarzinom aller Risikogruppen“ (Deutsche Krebsgesellschaft et al., 2019). Die therapeutische Wirksamkeit im Vergleich mit der RPX gilt als gut belegt. So wird nach bisheriger Datenlage der Strahlentherapie bei lokalisiertem PCA ein zur RPX gleichwertiges Outcome nachgesagt, wobei Studien bessere Ergebnisse der RPX in Bezug auf das Auftreten eines biochemischen Rezidivs (PSA relapse) sehen. (Hakenberg et al., 2003, Stenzl et al., 2009, Michel et al., 2016).



## I.1.2 PROGNOSE UND REZIDIVDIAGNOSTIK DES PROSTATAKARZINOMS

### I.1.2.1 PROGNOSEABSCHÄTZUNG

Im Allgemeinen wird die Prognose des lokalisierten Prostatakarzinoms als gut erachtet. So liegt die relative 5-Jahres-Überlebensrate bei kapselbegrenztem Wachstum und ohne regional fortgeschrittenem Wachstum mit Infiltration von umliegendem Gewebe oder Lymphknoten bei fast 100% (Siegel et al., 2012, Noone et al., 2018). Hat sich durch einen Progress der Grunderkrankung ein kastrationsresistentes Prostatakarzinom entwickelt, so verschlechtert sich die Prognose im Allgemeinen deutlich. Bei Vorliegen eines fernmetastasierten Prostatakarzinoms (M1 Stadium) lag die relative 5-Jahres-Überlebensrate in der US-Amerikanischen Bevölkerung in den Jahren 2001 bis 2007 nur noch bei etwa 29% (Siegel et al., 2012). Seit der breitflächigen Anwendung der PSA Bestimmung im Serum kam es zu einem starken Anstieg der Diagnose von Prostatakarzinomen im Frühstadium oder von Karzinomen mit niedrigem oder mittlerem Differenzierungsgrad (Lawrentschuk and Klotz, 2010). Diese frühe Diagnose birgt das Problem einer anschließenden Übertherapie des Patienten durch operative oder radiotherapeutische Maßnahmen, obwohl die aktive Überwachung zumindest eine vorläufige Behandlungsstrategie darstellen könnte (McGregor et al., 1998, Lu-Yao et al., 2009). So weisen Daten darauf hin, dass bis zu 70% der Patienten mit low-Grade Tumoren (Gleason Score kleiner 7) und bis zu 20% der Patienten mit einem Gleason-7 Prostatakarzinom innerhalb von 15 Jahren nach Diagnose nicht mit einem klinisch bedeutsamen Fortschreiten der Grunderkrankung zu rechnen hätten, selbst wenn das Karzinom unbehandelt bleibt (Albertsen et al., 2005). Dieses Problem macht es besonders notwendig, die klinische Signifikanz eines Karzinoms einzuschätzen und eine Prognose zum möglichen Krankheitsverlauf geben zu können, um die passende Therapie zu wählen. Insbesondere gilt es, Karzinome mit einem großen Potenzial für schnellen Progress schon in frühem Stadium zu identifizieren und von Karzinomen abzugrenzen, die zu Lebzeiten des Patienten zu keiner Problematik führen würden.

### I.1.2.2 ETABLIERTE KLINISCHE FAKTOREN MIT PROGNOTISCHER SIGNIFIKANZ

Beim Prostatakarzinom haben sich unterschiedliche klinische Faktoren, vor allem aus der Histo-Pathologie, als für die Prognose relevant erwiesen. Hierunter fallen insbesondere die Beurteilung der Differenzierung der Tumorzellen nach dem Gleason Score (Gleason and Mellinger, 1974, Epstein et al., 2016a, Chen and Zhou, 2016) sowie die Erfassung der Ausdehnung des Primärtumors, einer möglichen lymphonodalen Metastasierung und der Information über bestehende Fernmetastasen nach der TNM Klassifikation (Wittekind, 2016). Diese zwei Faktoren stellen immer noch die Grundpfeiler für die Prognostik und insbesondere die Wahl der angebrachten primären Therapieform dar. Weiterhin bietet die Beobachtung eines Tumorwachstums entlang der Perineuralscheiden bzw. ein Einwachsen in Blutgefäße eine wichtige zusätzliche Information für die Prognose (Zareba et al., 2017, van den Ouden et al., 1998). Zu guter Letzt stellt der Erfolg einer Resektion „im Gesunden“ im Falle einer radikalen Prostatektomie einen wichtigen prognostischen Faktor für den weiteren Verlauf der Erkrankung und deren Therapiebedarf dar (Zhang et al., 2018). Mittels Nomogrammen wie beispielsweise denen den Partin-Tabellen wurde erfolgreich versucht, mehrere bekannte Faktoren wie zum Beispiel den PSA-Wert, das Ergebnis einer DRU und den Gleason Score zu kombinieren und so eine bessere Vorhersage zum Tumorstadium nach Operation zu ermöglichen (Partin et al., 1997, Kattan et al., 1998, Kattan et al., 1999, Graefen et al., 2002, Makarov et al., 2007). Ähnlich versucht die Risikoklassifizierung nach D'Amico, Patienten nach erfolgter RPX in drei Progress-Risikogruppen einzuteilen (D'Amico et al., 1998).

Trotz dieser umfassenden Charakterisierung der Tumoren und deren Wachstum zeigen sich die obigen Faktoren in der Praxis allein als noch nicht absolut verlässlich bezüglich Prädiktion des individuellen Krankheitsverlaufs. Eine Bewegung weg von der alleinigen feingeweblichen Untersuchung und Kategorisierung hin zur zusätzlichen individuellen biochemischen und molekularen Inspektion und Klassifizierung erscheint als potenzieller nächster Schritt.

### I.1.2.3 MOLEKULARE MARKER MIT POTENZIELLER PROGNOTISCHER SIGNIFIKANZ

Die Bedeutung spezifischer gewebebasierter Biomarker für das Prostatakarzinom ist Gegenstand aktueller Forschung (Kristiansen, 2012). Dabei wurde bisher eine Vielzahl an signifikanten Einflussfaktoren ausgemacht. Allein die Entdeckung und Erforschung von Assoziationen bekannter Proteine bzw. deren Expression mit dem Krankheitsverlauf bzw. Tumorprogress hat seit der breiten Anwendung von Immunohistochemie und der tissue-microarray Technik schlagartig zugenommen. **Tabelle 2** zeigt eine Auswahl solcher Proteine (Buhmeida et al., 2006, Martin et al., 2011, Pentyala et al., 2016).

<b>Molekularer Marker</b>	<b>Überlebensassoziation (p*, Quelle)</b>	<b>Progressionsassoziation (p*, Quelle)</b>
α-catenin		(Richmond et al., 1997)
AKT	(0.0376, Li et al., 2009)	(0.0270, Li et al., 2009)
AR	(<0.01, Segawa et al., 2001) (<0.02, Miyoshi et al., 2003)	(<0.03, Sadi and Barrack, 1993) (Taplin et al., 1995)
bcl-2	(0.045, Concato et al., 2009)	(<0.004, Bauer et al., 1996) (<0.001, Mackey et al., 1998) (0.001, Stackhouse et al., 1999) (Scherr et al., 1999)
E-cadherin		(<0.005, Umbas et al., 1994) (Richmond et al., 1997)
EGFR		(<0.0001, Schlomm et al., 2007)
FASN	(0.02, Nguyen et al., 2010)	
GSK3β		(0.0001, Eichenauer et al., 2019)
IGF-1		(<0.05, Yu et al., 2001)
Interleukin-6		(Adler et al., 1999) (Shariat et al., 2001a)
Ki-67	(<0.001, Bettencourt et al., 1996) (<0.02, Aaltomaa et al., 1997) (<0.0001, Pollack et al., 2004)	(<0.02, Bubendorf et al., 1996) (0.0445-0.0001, Pollack et al., 2004)
MIB-1	(<0.001, Dunsmuir et al., 2000)	
MUC1		(<0.003, Lapointe et al., 2004)

p16		(0.002, Lee et al., 1999)
p21	(Aaltomaa et al., 1999)	(0.01, Aaltomaa et al., 1999)
p27	(<0.01, Yang et al., 1998)	(<0.008, Yang et al., 1998) (0.047, Tsihlias et al., 1998) (<0.001, Vis et al., 2000, <0.01, Vis et al., 2002) (0.029, Halvorsen et al., 2003)
p53	(<0.011, Kuczyk et al., 1998) (0.02, Grignon et al., 1997) (0.014, Che et al., 2007) (0.022, Concato et al., 2009)	(<0.018, Bauer et al., 1996) (<0.007, Shurbaji et al., 1995) (0.04-0.001, Grignon et al., 1997) (0.004, Stackhouse et al., 1999) (Scherr et al., 1999)
p-AKT		(0.0001, Ayala et al., 2004)
PTEN		(0.029, Halvorsen et al., 2003) (0.0001, Bramhecha et al., 2019) (0.0081-0.0078, McMenamin et al., 1999)
TGF-beta1	(0.006, Wikstrom et al., 1998)	(Wikstrom et al., 1998) (Shariat et al., 2001b) (Adler et al., 1999)

**Tabelle 2:** Zusammenfassung überlebens- und progressionsassoziierter Proteine in Prostatakarzinomgeweben unterschiedlicher Stadien; nach (Buhmeida et al., 2006), (Martin et al., 2011), (Pentyala et al., 2016). (\* signifikante p-Werte sofern angegeben)

Neben einer veränderte Proteinexpression in Tumorzellen wurden weitere Faktoren mit möglichem prognostischem Wert entdeckt. So konnte gezeigt werden, dass die Methylierung bestimmter Gene, beispielsweise PITX2, eine prognostische Wertigkeit bezüglich der Zeit bis zu einem PSA Rezidiv (biochemisches Rezidiv) aufweist (Weiss et al., 2009, Banez et al., 2010, Schatz et al., 2010, Vinarskaja et al., 2013).

Als weiterer Faktor wurde die Fusion bestimmter Gene diskutiert und nachgewiesen. Im Prostatakarzinom zeigte sich insbesondere die Fusion des TMPRSS2-Gens zu TMPRSS2-ERG als prognostischer Faktor hinsichtlich der Entwicklung eines kastrationsresistenten PCA durch Störung des Androgenrezeptor-Signalwegs (Yu et al., 2010a, Wang et al., 2006, Demichelis

et al., 2007, Wang et al., 2017). Diese Genfusion konnte in etwa 50% aller untersuchten Prostatakarzinome nachgewiesen werden (Tomlins et al., 2005).

In neueren Arbeiten wurden zudem sogenannte genetische Biomarker Panels untersucht, also die Auswertung mehrerer genetischer Marker, deren Ergebnisse in einem gemeinsamen Score zusammengefasst werden (Kretschmer et al., 2017). So konnte für den OncotypeDX genomic prostate score® (Genomic health, Redwood City, USA) eine prognostische Wertigkeit hinsichtlich des Tumorstadiums und Gleason Scores sowie des Auftretens eines biochemischen Rezidivs gezeigt werden, was bisher jedoch noch nicht in multizentrischen Studien nachgewiesen wurde (Klein et al., 2014, Cullen et al., 2015, Mottet et al., 2017).

Für den Prolaris® Test (Myriad Genetics Inc., Salt Lake City, USA) konnte ebenfalls eine prognostische Wertigkeit bezüglich der Zeit bis zum Auftreten eines BCR, dem krebsbezogenen Überleben (Cancer-specific survival, CSS) und dem Auftreten von Metastasen nachgewiesen werden (Cuzick et al., 2011, Freedland et al., 2013, Bishoff et al., 2014, Cuzick et al., 2015). Zudem konnte gezeigt werden, dass Urologen ihre Risikoeinschätzung und Behandlung nach Auswertung des im Prolaris® Test verwendeten CCP Score in vielen Fällen anpassen würden und dass die Auswertung des CCP Score zu einer teils starken Verringerung an Eingriffsempfehlungen und daraus resultierend zu einer deutlichen Reduktion der operativen Eingriffe und Radiotherapien führte (Crawford et al., 2014, Shore et al., 2014). Jedoch führen die Leitlinien der EAU und AUA an, dass noch keine prospektiven multizentrischen Studien zu diesem Test durchgeführt wurden bzw. dass noch nicht klar erwiesen wurde, dass der CCP Score bei der Auswahl von Patienten für eine active surveillance Therapie eine wesentliche Rolle spielt (Mottet et al., 2017, Sanda et al., 2017, Kretschmer et al., 2017).

Bei Decipher® (GenomeDX, Vancouver, Canada) handelt es sich ebenfalls um ein Genpanel Test, welcher auf der Signatur von 22 Genen basiert. Nach Expertenmeinung kann das Decipher® Panel unter Berücksichtigung anderer Faktoren zur klinischen Entscheidungsfindung verwendet werden, wenn es um die adjuvante Radiotherapie eines Hochrisikopatienten geht (Ross et al., 2013).

Nach AUA Richtlinien hat sich das Decipher® Panel noch nicht als essentiell nützlich in der Auswahl von Patienten für eine Active Surveillance Therapie erwiesen (Sanda et al., 2017). (Kretschmer et al., 2017)

Einzelne Parameter der Signalwege im Prostatakarzinom sind zwar beleuchtet, jedoch bleiben die weitreichenden Auswirkungen von individuellen Veränderungen dieser Parameter weiterhin unbekannt oder unerklärt. Für die Prognoseabschätzung, viel mehr aber für die molekulare Charakterisierung des individuellen Prostatakarzinoms sind daher dringend valide molekulare Parameter notwendig, deren Aussagekraft durch Eigenschaften im Gefüge der Tumorbio­logie begründbar ist. Von diesen Parametern ist also verlangt, dass nicht allein ein Effekt im Tumorgewebe, beispielsweise eine veränderte Proteinexpression, bekannt ist, sondern auch, dass der Grund dieser Veränderung erklärbar ist.

#### I.1.2.4 THERAPIE DES FORTGESCHRITTENEN PROSTATAKARZINOMS

Unter dem fortgeschrittenen PCA wird das lokal fortgeschrittene (T3-4, N0, M0) und des fortgeschrittenen bzw. metastasierten Prostatakarzinom (N1 oder M1) verstanden. Aufgrund des zusätzlichen tumortragenden, eventuell nichtprostat­ischen Gewebes bedarf das fortgeschrittene PCA einer weitaus individuelleren Therapie. Das Therapiespektrum reicht dabei von chirurgischen Maßnahmen wie der RPX mit adjuvanter Radiotherapie, im Falle von Lymphknotenmetastasen auch der Lymphadenektomie, über Strahlentherapieoptionen, teils mit palliativer Absicht, über die Hormonenzugstherapie bis hin zur Chemotherapie.

#### I.1.2.5 LYMPHADENEKTOMIE

Die Lymphadenektomie (LA), insbesondere die laparoskopische pelvine LA, der lokoregionären Lymphknoten rund um die Prostata stellt die einzig sichere Methodik zur Abschätzung des N-Stadiums dar (Fahlenkamp et al. 1997). Im Rahmen eines lokal fortgeschrittenen PCA empfiehlt die S3 Leitlinie trotz nicht belegtem prognostischen Nutzen eine LA, da diese Informationen für eine

eventuelle adjuvante Therapie liefern kann (Studer, 2004). Sofern ein High Risk PCA vorliegt, sprechen die Leitlinien zumindest aus, dass die extendierte pelvine LA angeboten werden soll. Die histologische Sicherung von Lymphknotenmetastasen schlägt sich in den Therapieempfehlungen nieder. So soll im Falle einer geplanten Strahlentherapie und positivem Lymphknotenbefund ein zusätzlicher adjuvanter Hormonentzug erfolgen. Nach bereits erfolgter RPX und positivem Lymphknotenbefund kann eine adjuvante hormonablative Therapie zumindest angeboten werden. (Deutsche Krebsgesellschaft et al., 2019)

#### I.1.2.6 HORMONENTZUGSTHERAPIE

Unter einer Hormonentzugstherapie (HT) wird im Rahmen einer Prostatakreberkrankung die Senkung des Testosteronspiegels des Patienten auf ein Niveau unter 0.5 ng/ml im Serum verstanden. Ziel ist dabei die Minderung des testosteronabhängigen Wachstums des Drüsenepithels, wobei auch ein Großteil der malignen Epithelzellen in ihrer Proliferation gehemmt werden, was erstmals bei kastrierten Männern und unter Östrogenverabreichung beobachtet wurde (Huggins and Hodges, 1941).

Die HT wird im Rahmen eines hormonsensitiven PCA bei bestehender Metastasierung empfohlen. Als Behandlungsoptionen stehen hier sowohl die chemische Kastration durch LHRH-Analoga oder Antiandrogene, als auch die chirurgische Kastration durch Orchiektomie zur Verfügung. Weiterhin kann die HT in Kombination mit einer Chemotherapie durchgeführt werden. (Deutsche Krebsgesellschaft et al., 2019)

Als Problem der HT kann neben den Nebenwirkungen eines Testosteronmangels (Androgen-Entzugssyndrom: Hitzewallungen, Libidoverlust, erektile Dysfunktion, Gynäkomastie, allgemeine Leistungsminderung und Stoffwechselveränderungen, Muskelabbau, Verringerung der Knochendichte) die Entstehung eines kastrationsresistenten Prostatakarzinoms angesehen werden: durch die selektive Minderung der Proliferation testosteronabhängiger Tumorklone verbleiben und proliferieren insbesondere die Androgen-unabhängigen Zellen, das Tumorgeschehen wird vom Hormonentzug nicht mehr

beeinflusst. (Huggins and Hodges, 1941, Schulman et al., 2010, Michel et al., 2016) Die Entstehung des kastrationsresistenten PCA unter HT ist somit, trotz anfänglicher Verkleinerung des Tumors, nicht zu verhindern (Rini and Small, 2002)

#### I.1.2.7 KASTRATIONSRESISTENTES PROSTATAKARZINOM

Ein Prostatakarzinom gilt als kastrationsresistent (auch: hormonrefraktär), wenn das im Serum gemessene PSA bei drei Messungen in zweiwöchigem Abstand trotz mindestens vierwöchiger HT und einem Testosteronwert unter 0.5 ng/ml im Serum sowie sekundärer hormoneller Maßnahmen (z.B. Antiandrogen-Gabe, Östrogengabe) stetig ansteigt (Stenzl et al., 2009). Das kastrationsresistente Prostatakarzinom (KRPC) gilt als nicht heilbar. Als weitere Therapieoptionen steht aktuell neben dem WW-Ansatz, steroidaler Behandlung (Dexamethason, Prednisolon, Prednison) und Radium-223 insbesondere die Chemotherapie in erster und zweiter Behandlungslinie zur Verfügung. (Deutsche Krebsgesellschaft et al., 2019)

#### I.1.2.8 CHEMOTHERAPIE

Lange galt Docetaxel in Kombination mit Prednison als das Chemotherapeutikum der Wahl zur Behandlung des KRPC. Als Erstlinientherapie für Patienten mit metastasiertem, progredientem PCA empfiehlt die Leitlinie heute bei entsprechender Entscheidung des Patienten gegen ein Abwarten Docetaxel, den Androgenrezeptor Inhibitor Enzalutamid oder Abirateron (in Kombination mit Prednison / Prednisolon) (Tannock et al., 2004, Bono et al., 2011, Scher et al., 2012, Ryan et al., 2013, Deutsche Krebsgesellschaft et al., 2019). Als medikamentöse Zweitlinientherapie nach Docetaxel stellen Abirateron, Enzalutamid und Cabazitaxel valide Behandlungsoptionen dar (de Bono et al., 2010, Bono et al., 2011, Fizazi et al., 2012, Scher et al., 2012, Deutsche Krebsgesellschaft et al., 2019)

#### I.1.2.9 NEUE THERAPIESTRATEGIEN FÜR DAS KASTRATIONSRESISTENTE PROSTATAKARZINOM

Aktuell gilt das KRPC als das Endstadium der Erkrankung, das mittlere Überleben wird auf 9 bis 27 Monate geschätzt (Heidenreich et al., 2014). Wie



zuvor beschrieben, lassen sich zwei Probleme der bisherigen Therapie des KRPC festhalten. Zum einen ist das KRPC vermutlich in den meisten Fällen ein Resultat einer durchgeführten HT (Rini and Small, 2002). Zum anderen gilt es offensichtlich, neue Signalwege analog zum Androgen-abhängigen Wachstum das PCA zu entdecken, bei denen ein medikamentöses Eingreifen Wirkung im KRPC zeigt. Neuere Ansätze stellen hier Immuntherapien durch Vakzinierung oder die Behandlung mit Enzalutamid, Apalutamid, Darolutamid, Olaparib dar. (Bedke et al., 2012, Scher et al., 2012, Thomas and Schrader, 2023) Unter den interessanten Signalwegen hebt sich insbesondere der PI3K/AKT/mTOR Signalweg um mTOR (mechanistic Target of Rapamycin, früher mammalian Target of Rapamycin) als relevanter Wachstumssignalweg im CRPC, jedoch auch in anderen menschlichen Tumoren hervor (Nakabayashi et al., 2012). So konnte bereits bei Patienten mit metastasiertem Nierenzellkarzinom ein verlängertes Überleben durch die Behandlung mit Temsirolimus, einem mTOR Inhibitor, nachgewiesen werden (Hudes et al., 2007). Ebenso zeigt Everolimus als mTOR Inhibitor eine Verlängerung des progressionsfreien Überlebens in bestimmten Subgruppen des Mammakarzinoms (Baselga et al., 2011, Lee et al., 2015). Im Prostatakarzinom konnten indes keine bzw. nur geringe Einflüsse einer Behandlung durch mTOR Inhibitoren nachgewiesen werden, wobei angemerkt werden muss, dass es sich um Phase-II-Studien mit geringer Patientenzahl unter 40 Patienten handelte, weshalb auch eine Subgruppenanalyse wie beim Mammakarzinom nicht möglich war (Armstrong et al., 2010, Nakabayashi et al., 2012, Kruczek et al., 2013, Templeton et al., 2013, Statz et al., 2016). Als weitere auf den mTOR Signalweg einwirkende Substanzen mit möglicher therapeutischer Wirkung im KRPC wurden zudem Ardisianon und Ligustrazin diskutiert, wobei hier nur *in-vitro*-Studien vorliegen (Yu et al., 2013, Han et al., 2015).

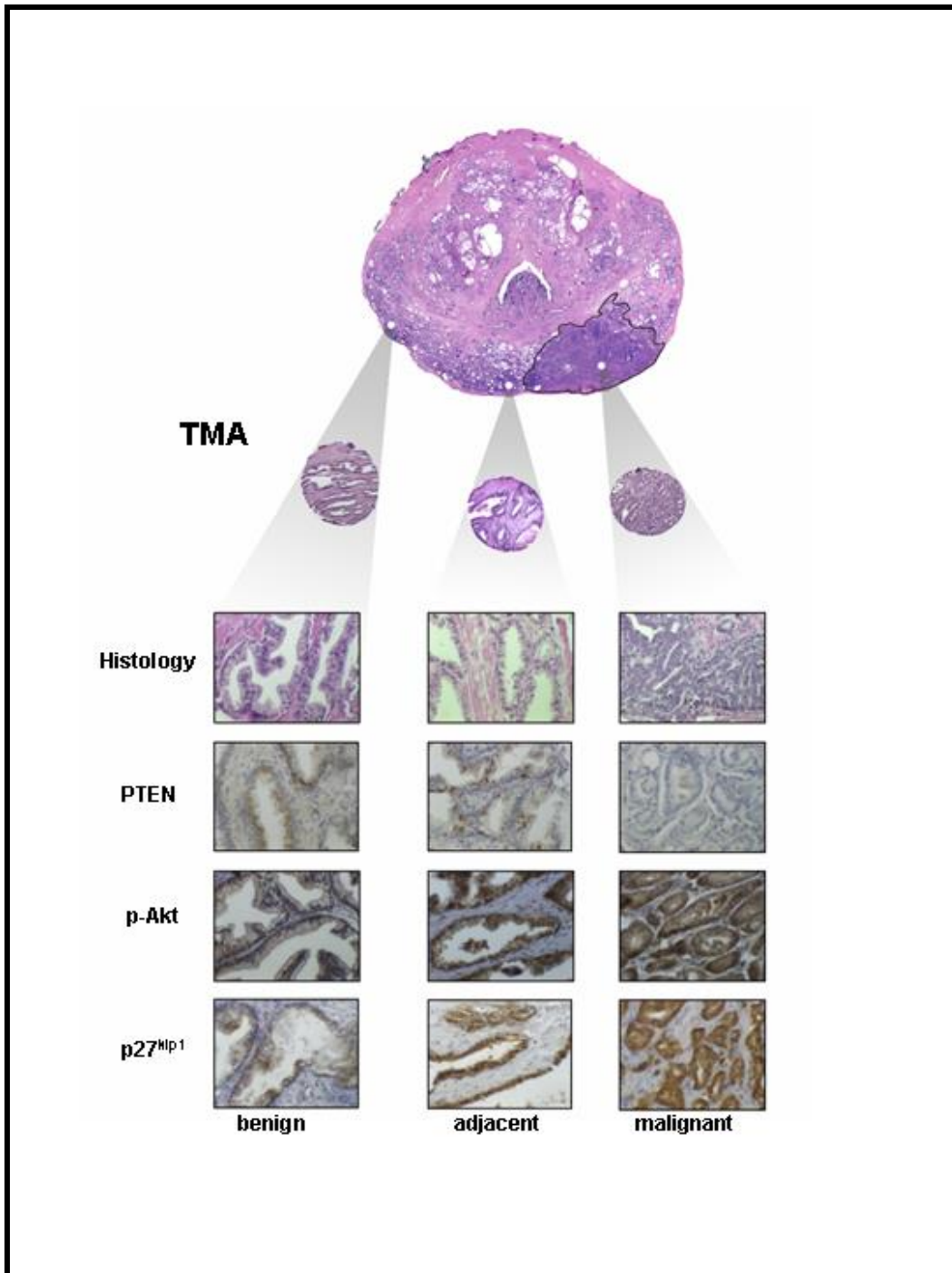
## I.2 HETEROGENITÄT DES PROSTATAKARZINOMS

Das Prostatakarzinom ist durch ein multifokales Tumorstadium charakterisiert (Tolkach and Kristiansen, 2018). Hierunter wird das zeitgleiche Wachstum räumlich getrennter Tumorherde in der Prostata verstanden, die zusätzlich

unterschiedliche Wachstumsmuster aufweisen können, was die pathologische Einschätzung erschwert.

Multifokales Wachstum tritt im PCA häufiger auf als unifokales und ist meist mit einem größeren Prostatavolumen verbunden. Es scheint jedoch keine Auswirkung auf das biologische Verhalten zu haben (Stamatiou et al., 2009). Ebenso scheint eine klinische Relevanz der Multifokalität nur in seltenen Fällen zu bestehen (Delacroix and Ward, 2010). Die Heterogenität bezüglich der Wachstumsmuster im Sinne der Gleason Scores unterschiedlicher Tumorherde derselben Prostata bei multifokalem Wachstum ist ebenfalls bekannt (Ruijter et al., 1996).

Neben der klinischen, morphologischen und räumlichen Heterogenität konnte ebenso eine molekulare und genetische Heterogenität festgestellt werden. So zeigte sich, dass multifokale Tumoren eine hohe Heterogenität bezüglich copy number alterations (CNA), also Veränderungen der Anzahl an Kopien eines gewissen Genabschnittes, bezüglich des allgemeinen Auftretens von Veränderungen im Genom (genomic rearrangements) und bezüglich sogenannter single nucleotide variants (SVN), einer Form von Einzelnukleotid-Polymorphismen (single nucleotide polymorphism, SNP) aufweisen (Boutros et al., 2015, Gu et al., 2008). Generell scheinen multifokale Tumoren eine hohe genetische Heterogenität aufzuweisen. So berichten Løvf et al., dass 76% aller untersuchten multifokalen Tumoren keine übereinstimmenden Punktmutationen in den verschiedenen Foci aufwiesen, die übereinstimmenden Punktmutationen nur selten in Genen gefunden wurden, die mit einem Tumorgeschehen assoziiert werden und dass CNAs der DNA nur in seltenen Fällen in zwei unterschiedlichen Foci derselben Prostata gefunden werden konnten (Løvf et al., 2019). (Tolkach and Kristiansen, 2018)



**Abbildung 1:** Beispielhafte Darstellung der Heterogenität von Histologie und biochemischen Markern im Prostataraum (aus Merseburger et al. (2006)).

Mittels Sequenzierung des gesamten Genoms eines Patienten mit multifokalem, metastasiertem PCA konnte bereits exemplarisch gezeigt werden, dass letztlich nicht der Tumorherd mit dem höchsten Staging und Gleason Score für das

Versterben des Patienten verantwortlich war, sondern dass die tödliche Metastasierung von einem Klon aus dem Primärtumor mit relativ niedrigem Risikograd aus ging (Haffner et al., 2013). Dies widerspricht der allgemeinen Annahme, dass zur Prognoseabschätzung das Tumorareal mit dem höchsten Gleason Score bzw. der größten Ausbreitung ausschlaggebend sei, so dass davon ausgegangen werden kann, dass eine einzelne Biopsie keinen Aufschluss über das tumoröse Gesamtgeschehen geben kann (Gerlinger et al., 2012). Diese als Indexläsion (engl. index lesion) bezeichneten größten Tumorareale standen lange im Fokus der Untersuchungen, während den sekundären Arealen eine zweitrangige Bedeutung beigemessen wurde (Stamey et al., 2001). Es wurde jedoch nachgewiesen, dass beispielsweise die Stanzbiopsie der Prostata bei vorliegender Tumor-Multifokalität in ihrer Aussagekraft beschränkt sein kann (Wei, 2010, Tosoian and Epstein, 2017). Die genetische und proteomische Heterogenität menschlicher Tumoren konnte erst jüngst mittels neuer bildanalytischer Verfahren quantifiziert werden: es zeigte sich, dass viele der untersuchten Tumoren, darunter auch das Prostatakarzinom, neben einer interfokalen Heterogenität auch eine intrafokale Heterogenität aufweisen, also eine stark unterschiedliche genetische und proteomische Ausstattung einzelner Zellen in der gleichen Tumorentität (Zhong et al., 2016). Im Prostatagewebe konnte ebenso eine molekulare Heterogenität nachgewiesen werden, wobei sich diese nicht allein auf das Tumorgewebe beschränkte, sondern sich auch insbesondere im direkt angrenzenden Normalgewebe zeigte (**Abbildung 1**) (Merseburger et al., 2006). Insofern stellt die Heterogenität des PCA ein Problem in der Diagnostik dar, weiterhin ergeben sich aus ihr neue Möglichkeiten und Fragestellungen in der Forschung (Shoag and Barbieri, 2016, Tosoian and Antonarakis, 2017). So wäre es durchaus denkbar, dass sich das biochemische Tumorgeschehen über den histologischen Tumor hinaus entwickelt, weshalb dies in der Fragestellung dieser Arbeit miterfasst werden soll.

## I.3 DAS SIGNALSYSTEM UM MTOR

Die Entstehung eines Prostatakarzinoms ist Ergebnis eines multifaktoriellen Geschehens, auch auf molekularer Ebene. Dabei scheinen diverse Gen-Alterationen mit einem Erkrankungsrisiko einher zu gehen (Barbieri et al., 2013, Mitchell and Neal, 2015). Infolge dieser Alterationen kommt es zu Veränderungen in unterschiedlichen Signalwegen der Zelle.

Das Enzym mTOR (mechanistic target of rapamycin, früher: mammalian target of rapamycin) ist ein Schlüsselprotein im PI3K/AKT/mTOR Signalweg. Dem PI3K/AKT/mTOR Signalweg werden verschiedene Aufgaben zugeschrieben, darunter die Regulierung des Zellüberlebens, der Differenzierung, Zellwachstum sowie Zellproliferation, des Stoffwechsels, der Zellmigration sowie der Angiogenese. Dabei stellen die PI3K Lipid-Kinasen eine Schnittstelle zwischen extrazellulären Wachstumssignalen und der intrazellulären Signaltransduktion dar (Edlind and Hsieh, 2014). Es konnte bereits in vielen humanen Tumortypen nachgewiesen werden, dass der PI3K/AKT/mTOR Signalweg eine Schlüsselrolle in der Tumorgenese und der Entwicklung einer Therapieresistenz spielt (McCubrey et al., 2011, Rhonda and Andrew, 2013). So konnte auch im PCA die Aktivierung des Signalwegs mit einer Tumorprogression in Verbindung gebracht werden (Pourmand et al., 2007, Reid et al., 2010, Taylor et al., 2010). Infolge dessen wird untersucht, inwiefern ein Eingreifen in den PI3K/AKT/mTOR Signalweg eine Therapiemöglichkeit beim KRPC darstellen kann (Rhonda and Andrew, 2013).

### I.3.1.1 BEDEUTUNG VON MTOR IN DER ZELLBIOLOGIE

Die Serin/Threonin-Kinase TOR (Target of Rapamycin) wurde nach der Isolierung von Rapamycin aus dem Bakterium *Streptomyces hygroscopicus* als dessen Bindungsziel identifiziert und erstmals in Hefen entdeckt sowie untersucht, wobei die immunsuppressive und proliferationshemmende Wirkung von Rapamycin im Vordergrund stand (Heitman et al., 1991, Wullschleger et al., 2006). Erst später erkannte man, dass TOR auch in allen Eukaryoten und somit auch in allen Säugetieren (engl. mammals) vorkommt, woraus der Name mTOR

abgeleitet wurde (Hay and Sonenberg, 2004, Hall, 2008). Im Menschen wird mTOR auf dem gleichnamigen Gen (auch: FRAP) kodiert (Zerbino et al., 2017).

Als Mediator spielt mTOR eine Schlüsselrolle in der Transduktion von Signalen, die letztlich das Zellwachstum beeinflussen. Diese Transduktion geschieht jedoch abhängig von Co-Faktoren wie Stressoren, dem Energiezustand der Zelle sowie dem Nähr- und Sauerstoffangebot. (Laplante and Sabatini, 2012) Die Signaltransduktion wird nicht allein durch mTOR erwirkt, denn mTOR stellt lediglich die katalytische Untereinheit zweier Proteinkomplexe namens mTORC1 und mTORC2 (mTOR complex 1, mTOR complex 2) dar, welche im Folgenden genauer betrachtet werden sollen.

#### I.3.1.2 mTORC1

mTORC1 setzt sich aus der Kinase mTOR selbst und den Proteinen MLST8 (mammalian lethal with SEC13 protein 8), DEPTOR (DEP domain-containing mTOR-interacting protein), sowie einem Tti1/Tel2 Komplex zusammen. Hinzu kommen die Proteine RPTOR (Regulatory-associated protein of mTOR, auch Raptor genannt) und PRAS40 (Proline-rich AKT1 substrate 1, auch AKT1S1), welche nur in mTORC1, nicht aber in mTORC2 zu finden sind. (Laplante and Sabatini, 2012).

Die Aktivität von mTORC1 wird durch unterschiedliche Faktoren beeinflusst. Hierzu zählen neben aktivierenden Faktoren wie zellexternen Wachstumsfaktoren (Insulin, Insulin like growth factor (IGF)), Energie in Form von ATP (Adenosintriphosphat) und insbesondere einer gesteigerten Verfügbarkeit von Nährstoffen wie Glucose, Sauerstoff und vor allem Aminosäuren auch hemmende Faktoren wie Stress durch Energie- und Sauerstoffmangel aber auch durch DNA-Schäden und die Hemmung durch Rapamycin (Shaw and Cantley, 2006, Gwinn et al., 2008, Kim et al., 2008, Brugarolas et al., 2004, Feng et al., 2007). (Hall, 2008, Saxton and Sabatini, 2017) Als wichtigster bisher bekannter Regulator der mTORC1 Aktivität kann der TSC-Komplex (Tuberous sclerosis complex) angesehen werden. Er besteht aus TSC1 (auch: Hamartin) und TSC2 (auch: Tuberin) und stellt eine zentrale Einheit

im Upstream von mTOR bzw. mTORC1 und vermutlich auch mTORC2 dar (siehe auch **Abbildung 2**), indem er diese indirekt hemmt (Manning and Cantley, 2003, Manning and Cantley, 2007). Diese indirekte Hemmung erfolgt zumindest im Falle von mTORC1 durch Dephosphorylierung des mTORC1-aktivierenden Rheb (Ras homolog enriched in brain), welches folglich diese aktivierende Rolle nicht mehr einnehmen kann (Inoki et al., 2002).

Im Gegensatz zu mTORC2 kann mTORC1 direkt durch Rapamycin gehemmt werden. Dies geschieht durch die Bildung eines Komplexes aus Rapamycin und dem Protein FKBP12 (12-kDa FK506-binding protein), welcher das im mTORC1 gebundene mTOR hemmt, jedoch nicht mit mTOR im mTORC2 interagiert. (Brown et al., 1994, Laplante and Sabatini, 2012)

Zu den bekannten Substraten des mTORC1 gehören verschiedenste Proteine, darunter TFEB (Transcription factor EB), welches die Lysosombiogenese reguliert (Settembre et al., 2012), Grb10 (Growth factor receptor-bound protein 10), ein Regulatorprotein der Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK) Signaltransduktion (Yu et al., 2011), ein Proteinkomplex namens ULK1/Atg13/FIP200 (unc-51-like kinase 1 / Autophagy-related protein 13 / FAK family kinase-interacting protein of 200 kDa), welcher die Autophagozytose einleiten kann (Jung et al., 2009), sowie die vermutlich prominentesten Substrate S6K1 (Ribosomal protein S6 kinase beta-1) und 4E-BP1 (Eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1), welche beide die Proteinsynthese der Zelle regulieren (Gingras et al., 1998, Brown et al., 1995). (Edlind and Hsieh, 2014)

Als Mediator zwischen oben genannten Aktivatoren/Inhibitoren und Substraten stellt mTORC1 einen zentralen Regulator der Protein-, Lipid- und Nucleotidsynthese sowie kataboler Prozesse wie der Autophagozytose dar und steuert so das Gleichgewicht zwischen anabolen und katabolen Prozessen (Saxton and Sabatini, 2017). Als Schlüsselsubstrate können hierbei 4E-BP1 und S6K1 angesehen werden, beides Moleküle mit großem Einfluss auf die Proteinbiosynthese. eIF4F (Eukaryotic initiation factor 4F) stellt einen Proteinkomplex dar, welcher die Bindung von Ribosomen an mRNA vermittelt und so die Translationsrate in den meisten Situationen limitiert (Gingras et al.,

1999b). Als Translationsregulator bindet 4E-BP1 an eIF4E (Eukaryotic translation initiation factor 4E), einen Teil von eIF4F, und verhindert so die Rekrutierung der 40S ribosomal subunit an das 5'-Ende jeglicher eukaryotischer mRNA (Teleman et al., 2005). mTORC1 phosphoryliert 4E-BP1 und kann so die Bindung an eIF4E auflösen, womit die hemmende Wirkung auf die mRNA-Translation aufgehoben wird (Gingras et al., 1999a). S6K1 wird durch mTORC1 phosphoryliert, was die Aktivierung von S6K1 durch PDK1 erlaubt. Aktiviertes S6K1 wiederum phosphoryliert und aktiviert verschiedene Proteine, die mit der mRNA-Translation in Zusammenhang stehen, darunter auch eIF4B (Eukaryotic translation initiation factor 4B), ebenfalls eine Untereinheit von eIF4F, welche diese aktivieren kann (Holz et al., 2005, Saxton and Sabatini, 2017). Damit anabole Prozesse zurückgefahren werden, wenn entsprechend ungünstige Voraussetzungen wie ein Nährstoff- und Energiemangel herrschen, wird die mTORC1 Aktivität durch unterschiedliche Signalwege gehemmt, insbesondere über den bereits angesprochenen TSC-Komplex. Eine Aktivierung von TSC kann dabei beispielsweise durch einen Energiemangel erfolgen, welcher letztlich zu einer Aktivierung von AMPK (AMP-aktivierte Proteinkinase) führt, das wiederum RPTOR in mTORC1 phosphoryliert und mTORC1 somit hemmt (Gwinn et al., 2008). Als weiterer hemmender Mechanismus ist die durch Erbgutschäden verursachte Aktivierung des Proteins p53 (auch bekannt als tumor protein p53) und die darauffolgende gesteigerte Expression von TSC2 und PTEN (Phosphatase and Tensin homolog) bekannt, welche ebenfalls eine mTORC1 Hemmung nach sich zieht (Feng et al., 2005, Feng et al., 2007). Ebenso wird durch Hypoxie eine Hemmung von mTORC1 über den TSC-Komplex zusammen mit REDD1 (regulated in development and DNA damage responses 1) induziert (DeYoung et al., 2008). Neben diesen TSC1/2-Abhängigen Hemmungsmechanismen sind auch solche Mechanismen bekannt, die unabhängig vom TSC-Komplex sind, darunter beispielsweise die direkte Inhibierung von mTORC1 durch AMPK und auch DEPTOR (Efeyan and Sabatini, 2010, Saxton and Sabatini, 2017). Eine komplette Hemmung von mTORC1 durch Rapamycin und eine verringerte Folgehemmung des downstream-Proteins 4E-BP1 scheint indes nicht möglich, weshalb selektive mTOR-Hemmer mit



entsprechender Inhibition von downstream-Proteinen Gegenstand der aktuellen Forschung sind (Choo et al., 2008, Jhanwar-Uniyal et al., 2015, Fan et al., 2006).

#### I.3.1.3 mTORC2

mTORC2 setzt sich ebenfalls aus mTOR selbst und den Proteinen MLST8 (mammalian lethal with SEC13 protein 8), DEPTOR (DEP domain-containing mTOR-interacting protein), sowie einem Tti1/Tel2 Komplex zusammen. Hinzu kommen die mTORC2 spezifischen Proteine rictor (rapamycin-insensitive companion of mTOR), mSin1 (mammalian stress-activated map kinase-interacting protein 1) sowie Protor-1 oder Protor-2. (Laplante and Sabatini, 2012). Im Gegensatz zu mTORC1 gilt mTORC2 als akut Rapamycin-insensitiv, wobei eine längere Behandlung mittels Rapamycin die mTORC2-Signaltransduktion außer Kraft setzen kann, was darauf zurück geführt wird, dass an Rapamycin/FKBP12-Komplexe gebundenes mTOR keine neuen mTORC2 Komplexe bilden kann (Lamming et al., 2012, Saxton and Sabatini, 2017).

mTORC2 gilt als der bisher weniger untersuchte mTOR-Komplex, weshalb hier weniger auf mTORC2 eingegangen werden soll. Für mTORC2 werden ähnliche Aktivierungsmechanismen wie für mTORC1 vermutet. So konnte gezeigt werden, dass Wachstumsfaktoren ebenfalls mTORC2 aktivieren, die genaue Aktivierungskaskade ist jedoch noch unbekannt (Hall, 2008). Hierin spielt ebenfalls der TSC-Komplex eine aktivierende Rolle, der exakte Mechanismus gilt jedoch als unerforscht, es wird eine direkte Bindung an mTORC2 vermutet (Huang et al., 2008).

Zu den bekannten Substraten des mTORC2 gehören unter anderem die Proteinkinasen AKT (Proteinkinase B, auch PKB oder AKT/PKB) und SGK1 (serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1). Die Aktivierung von AKT benötigt die Phosphorylierung an Thr308 und Ser473, wobei letztere von dem im mTORC2 vorliegenden mTOR-rictor-Komplex abhängt. Dieser phosphoryliert AKT direkt und erleichtert gleichzeitig die Phosphorylierung von AKT an Thr308 durch PDK1 (phosphoinositide-dependent kinase-1) (Sarbasov et al., 2005). PDK1 wiederum phosphoryliert SGK1, mTORC2 spielt somit eine essentielle Rolle in der Aktivierung von SGK1 (Garcia-Martinez and Alessi, 2008). Dies

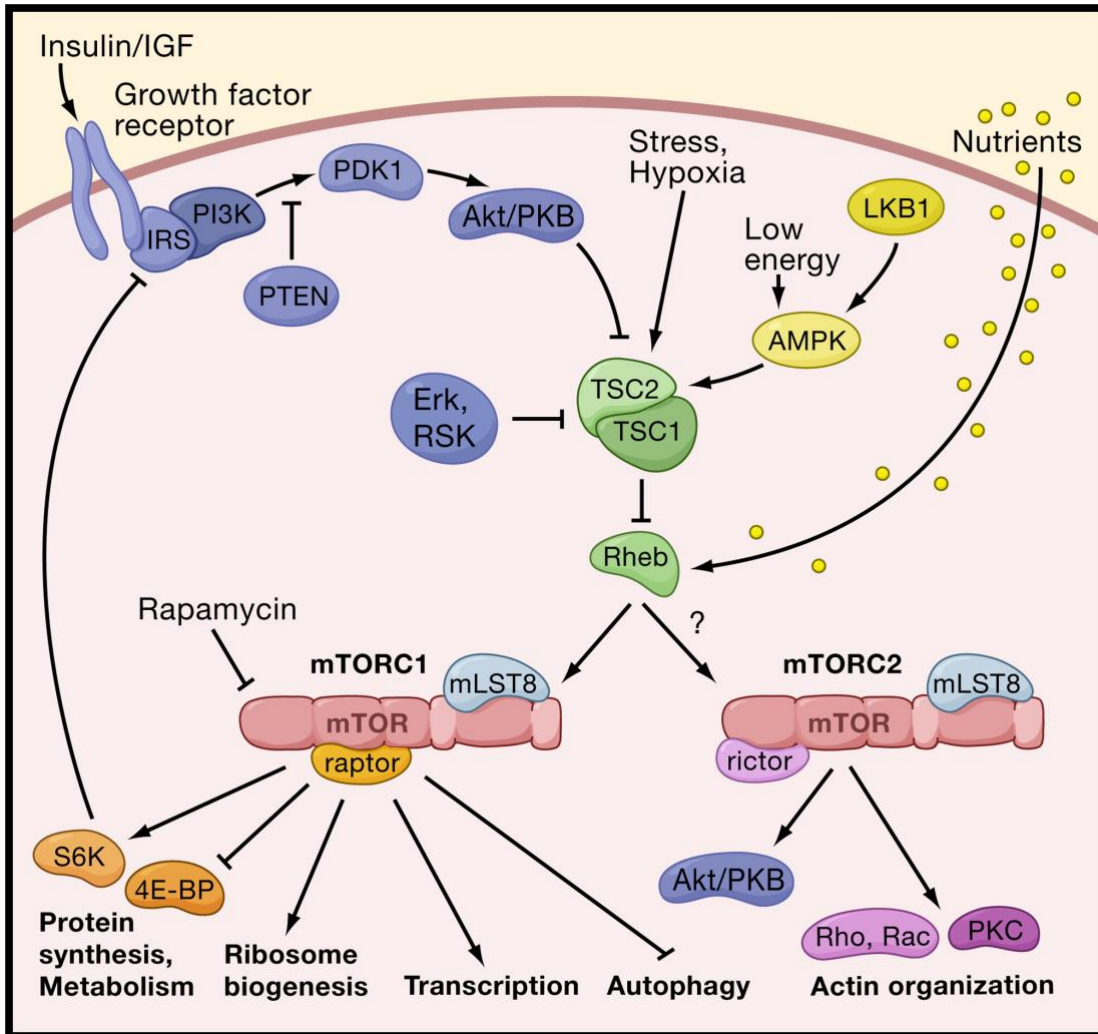
bestätigt sich auch in der Beobachtung, dass sowohl der mSin1-, als auch der Protor-Bestandteil von mTORC2 eine Protein-Interaktion mit SGK1 fördert (Lu et al., 2011, Pearce et al., 2011). (Zoncu et al., 2011)

Über die Regulation von mTORC2 ist weniger bekannt. Wachstumsfaktoren können mTORC2 beeinflussen, indem sie förderlich auf die Assoziation von Ribosomen mit mTORC2 wirken (Jhanwar-Uniyal et al., 2015). Diese können mTORC2 direkt aktivieren und so die AKT Signalkaskade stimulieren (Zinzalla et al., 2011, Jhanwar-Uniyal et al., 2015). Auch Auf diesen Weg kann TSC1/2 sowohl über mTORC1 als auch über mTORC2 positiv auf AKT wirken.

#### I.3.1.4 MTOR UND AKT

Die Serin/Threonin-Kinase AKT (Proteinkinase B, auch PKB oder AKT/PKB) liegt im menschlichen Körper in drei Formen (PKB $\alpha$ , PKB $\beta$ , PKB $\gamma$ ) vor und aktiviert als Proteinkinase andere Proteine durch Phosphorylierung. Es konnte gezeigt werden, dass AKT eine wichtige Rolle im zellulären Überleben in unterschiedlichen Geweben spielt, da es beispielsweise in die Apoptose involvierte Proteine wie BAD (Bcl-2-Antagonist of Cell Death) hemmt, wodurch die Hemmung von Bcl-2, einem Regulator der Apoptose-Einleitung, aufgehoben wird (Datta et al., 1997). (Edlind and Hsieh, 2014)

AKT wird durch die PI3Ks aktiviert und hemmt den TSC-Komplex, wodurch die Hemmung von mTORC1 und vermutlich auch mTORC2 aufgehoben werden kann (Wullschleger et al., 2006). Gleichzeitig kann aktiviertes mTORC2 ebenfalls AKT aktivieren, wodurch es zu einer positiven Feedback-Schleife kommt, welche jedoch negativ durch aktiviertes mTORC1 beeinflusst wird: dieses aktiviert S6K1, welches wiederum den IRs/PI3K Komplex hemmt und somit indirekt AKT inhibiert (**Abbildung 2**) (Sarbasov et al., 2005, Wullschleger et al., 2006) (Manning and Cantley, 2007).



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung der mTOR Signalwege im PI3K/AKT/mTOR Signalweg (übernommen aus Wullschleger et al., 2006). Während der Rapamycin-sensitive mTORC1 Komplex Faktoren reguliert, welche letztlich das Größenwachstum der Zelle bestimmen, reguliert der Rapamycin-insensitive mTORC2 Komplex das Aktin-Cytoskelett und somit die „Form“ der Zelle. mTORC1 reagiert auf Insulin und Insulin-like growth factors (IGF), sowie auf Stress, den Energiezustand der Zelle und auf Nährstoffe wie Aminosäuren. Für mTORC2 werden diese Zusammenhänge ebenfalls vermutet. Spitze Pfeile deuten eine Aktivierung an, stumpfe Pfeile eine Hemmung (Wullschleger et al., 2006).

### I.3.2 4E-BP1 ALS DOWNSTREAM TARGET VON MTOR

Das Eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E)-binding protein 1 (4E-BP1) wird im Menschen vom EIF4EBP1-Gen kodiert und gilt als Translations-Repressor Protein. Es zählt neben S6K und AKT zu den bekanntesten

Substraten des mTOR-Signalwegs. Als Translations-Repressor bindet 4E-BP1 an eIF4E, den limitierenden Faktor des Proteinkomplexes, welcher die kleinen ribosomalen Untereinheiten 40S (ribosomal subunit 40S) an das 5' Ende von mRNAs rekrutiert und die Translation einleitet. Der inhibierende mTORC1 Komplex verhindert diese Bindung, so dass eIF4E ungebunden ist und die Translation durch 40S stattfinden kann. Eine Aktivierung von mTORC1 gilt somit auch als ein Initiator der Proteinbiosynthese. (National Center for Biotechnology Information, 2004, Qin et al., 2016, Brunn et al., 1997)

Die eigentliche Phosphorylierung von 4E-BP1 durch mTOR geschieht durch eine Vermittlung über das TOS-Motiv (mTOR signalling Motiv), welches mit dem mTOR/raptor Komplex in mTORC1 interagiert und so die mehrfache Phosphorylierung durch mTOR ermöglicht (Schalm et al., 2003). Es konnte gezeigt werden, dass das 4E-BP1 bei der Einleitung der zellulären Apoptose durch den gehemmten mTOR-Stoffwechsel sowie Caspasenabspaltung dephosphoryliert wird, wodurch es zu einer vermehrten Bindung und Hemmung von eIF4E kommt, was eine Translationshemmung in den in Apoptose befindlichen Zellen zur Folge hat (Tee and Proud, 2000, Tee and Proud, 2002, Constantinou et al., 2008).

### I.3.3 4E-BP1 IN DER TUMORENTSTEHUNG, -ENTWICKLUNG UND -THERAPIE

Die Dysregulation der cap-Abhängigen mRNA Translation und somit der Genexpression und Proteinsynthese, insbesondere durch Veränderungen im eIF4F Komplex, wird mit der Entstehung und dem Fortschreiten von Krebserkrankungen in Verbindung gebracht. Es wird vermutet, dass eine solche Dysregulation, beispielsweise durch eine gesteigerte Expression von eIF4E oder eine verringerte Expression der hemmenden 4E binding Proteine (4E-BPs), insbesondere die vermehrte Translation von Onkogenen begünstigt. (She, 2015) So konnte in epithelialen Colon-Krebszelllinien im Tierversuch gezeigt werden, dass ein Verlust der 4E-BP1 Funktionalität durch Gen-Silencing in einer verstärkten Zellmigration resultiert und dass ebenfalls die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) eingeleitet werden kann (Cai et al., 2014). Diese

Ergebnisse werden durch eine andere Arbeitsgruppe gestützt, die eine signifikante inverse Korrelation zwischen der 4E-BP1 Expression und dem Fortschreiten gastrointestinaler Tumoren belegen konnte (Martin et al., 2000). Ebenso wurde bereits im Brust-, Ovarial- und Prostatakarzinom gezeigt, dass die Expression des phosphorylierten 4E-BP1 (p-4E-BP1) mit fortschreitender Malignität und einer schlechteren Prognose korreliert, was p-4E-BP1 zu einem hochrelevanten Marker für potentielle Malignität macht (Armengol et al., 2007). Im Mausmodell konnte ferner gezeigt werden, dass ein Gen-Silencing von 4E-BP1 und 4E-BP2 (4E binding protein 2) zu einer höheren Anfälligkeit für die Entwicklung eines Lungenkarzinoms nach Verabreichung des karzinogenen Stoffes 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone führte, was die Rolle der 4E-BPs als „Wächter“ der Translation unterstreicht (Kim et al., 2009). Weiterhin zeigte sich die Aktivierung bzw. Re-Aktivierung von eIF4F nach Hemmung als essentiell in der Entstehung von Brustkrebs, wobei eine Hemmung durch 4E-BP1 mit mutierten Phosphorylierungsstellen erfolgte, was eine Bindung und Hemmung von 4E-BP1 durch mTORC1 verhinderte (Avdulov et al., 2004).

Aus prognostischer Sicht scheinen die 4E binding Proteine ebenfalls interessant. So konnte der Quotient zwischen eIF4E und 4E-BPs im Mausmodell indizieren, inwiefern sich die entsprechenden Krebszellen als sensibel gegenüber einer mTOR Hemmung zeigten (Alain et al., 2012). Gleiches konnte in Ösophagus-Karzinomzellen für die mTOR Hemmung mittels Rapamycin nachgewiesen werden (Hsu et al., 2015). Ebenso scheint das Phosphorylierungslevel von 4E-BP1 Auswirkungen auf die Effektivität des mTOR Inhibitors PP242 (auch bekannt als Torkinib) in Colonkarzinomen zu nehmen, die bestimmte Mutationen aufweisen (Ducker et al., 2014). Eine starke Expression des durch 4E-BPs gehemmten eIF4F Komplexes scheint ein Indikator für eine angeborene oder erworbene Resistenz bei Krebstherapien zu sein, die auf die Kinasen B-Raf oder MEK (Mitogen-activated protein kinase kinase) abzielen (Boussemart et al., 2014). (Cai et al., 2014, She, 2015)

Paradoxerweise zeigte sich in einigen Studien, dass 4E-BP1 in manchen Tumoren, darunter auch dem Prostatakarzinom, häufig überexprimiert ist und

dass diese Überexpression mit einer schlechten Prognose verbunden werden konnte, was eine intensivere Erforschung dieses Proteins und seiner umliegenden Mechanismen nahelegt (Wang et al., 2016, Qin et al., 2016)

#### I.3.4 ONKOLOGISCHE BEDEUTUNG VON MTOR

Im Zusammenhang mit unterschiedlichen Tumoren konnte bisher eine Veränderung in den Signalwegen rund um die mTOR-Komplexe beobachtet werden, eine Dysregulation des mTOR Signalweges findet sich in etwa 50% aller menschlicher Tumoren (Zhang et al., 2011). So ist eine Mutation in den TSC1- und TSC2-Genen Hauptursache für die tuberöse Sklerose, eine Erbkrankheit, welche sich durch eine fehlerhafte oder mangelnde Bildung des TSC1/2-Komplexes und somit einer mangelnden Hemmung der mTOR-Komplexe auszeichnet und deren klinisches Bild unter anderem durch das Auftreten von Fibromen, Angiomyolipomen, kortikalen und subkortikalen Knoten und Astrozytomen geprägt ist (Crino et al., 2006). Weiterhin zeigen sich im Upstream beider mTOR-Komplexe in Tumoren unterschiedlichster Gewebearten Mutationen in sogenannten Protoonko- und Tumorsuppressorgenen wie beispielsweise AKT, PI3K, der Ras GTPase oder auch PTEN und p53, wodurch es zu einer Übermittlung fehlerhafter Signale an mTORC1 und mTORC2 kommen kann (Yi and Luring, 2016, Samuels and Waldman, 2010, Bos, 1989, Milella et al., 2015, Muller and Vousden, 2013).

Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass eIF4E in Lymphomen das zelluläre Überleben sichert, indem es die Expression des apoptosehemmenden Mcl-1 (Induced myeloid leukemia cell differentiation protein) hochreguliert (Michels et al., 2005, Wendel et al., 2007). Phosphorylierung von 4E-BP1 durch mTORC1 bewirkt eine Aufhebung der Bindung von 4E-BP1 an eIF4E, wodurch letzteres aktiviert wird. Zudem wird angenommen, dass eine fortwährende Aktivierung des mTORC1 eine Tumorentstehung durch Unterdrückung der Autophagozytose begünstigt. So konnte gezeigt werden, dass in vielen Fällen von Brustkrebs, Ovarialkrebs und Prostatakrebs monoallelische Löschungen von BECN1, dem für das das Autophagozytose-Protein Beclin 1 kodierenden Gen, vorliegen und

dass im Mausmodell eine künstlich herbeigeführte Störung von Beclin 1 zu einem vermehrten spontanen Auftreten von malignen und prämaligen Läsionen führt (Qu et al., 2003). Selbiges wurde für die Cystein-Proteinase Atg4C/autophagin-3 im Mausmodell gezeigt (Marino et al., 2007). Die Autophagozytose kann somit als ein tumorsuppressiver Mechanismus angesehen werden (Yue et al., 2003). Eine Hemmung von mTOR, beispielsweise herbeigeführt durch Nährstoffmangel, scheint die Autophagozytose zu induzieren, wohingegen eine vermehrte, anhaltende Aktivierung von mTOR die Autophagozytose wieder zu dämpfen scheint (Yu et al., 2010b). (Zoncu et al., 2011)

Eine direkte Beteiligung von mTOR bei der Tumorentstehung wird durch die Aktivierung von AKT und SGK1 vermutet, wobei AKT verschiedene zelluläre Funktionen wie das Überleben, die Zellteilung und die Nahrungsaufnahme fördert und SGK1 eine tumorfördernde Funktionsweise hinsichtlich des ausbreitenden Wachstums bis hin zur Metastasierung aufzeigt, welche durch Hemmung von SGK1 und auch mTOR beeinflusst werden kann (Manning and Cantley, 2007, Liu et al., 2018).

Obwohl bei unterschiedlichen Karzinomen insbesondere in drei prominenten Regionen von mTOR, der FAT, FRB und Kinase Domäne, aktivierende Mutationen vorgefunden wurden, scheint die Rolle der mTOR-Komplexe in der Tumorgenese vor allem die eines Vermittlers dysregulierter Signale zu sein (Hardt et al., 2011, Saxton and Sabatini, 2017).

Wie erwähnt, beeinflusst das mTORC1-Signalling maßgeblich die Aktivität von eIF4E, welches nicht nur Mcl-1 in Lymphomen hochregulieren kann, sondern auch initial tumoröse Veränderungen in Fibroblasten hervorzurufen vermag (Lazaris-Karatzas et al., 1990). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine vermehrte Phosphorylierung von eIF4E die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) und Metastasenbildung fördert, die Tumorgenese beschleunigt und im Prostatakarzinom mit einer fortgeschrittenen Erkrankung assoziiert ist (Robichaud et al., 2015, Wendel et al., 2007, Furic et al., 2010). Eine Überexpression von eIF4E findet sich neben dem PCA ebenfalls in weiteren humanen Krebsformen, was die Bedeutung von 4E-BP1 als Inhibitor von eIF4E

unterstreicht und die Bedeutung von mTORC1 als Inhibitor von 4E-BP1 hervorhebt (Siddiqui and Sonenberg, 2015).

#### I.3.4.1 DAS MTOR SYSTEM BEIM PROSTATAKARZINOM

Es konnte durch Genomanalysen in Prostatakarzinomgewebe festgestellt werden, dass der PI3K Signalweg, in welchem mTOR die Rolle eines Signalvermittlers übernimmt, in bis zu 42% der untersuchten Fälle von lokal begrenzten PCAs und in bis zu 100% der Fälle von metastasierten PCAs Veränderungen aufweist (Taylor et al., 2010). Ebenso zeigen sich auf Proteinebene in diesem Signalweg häufig Expressionslevel über oder unter dem Niveau der Expressionslevel in benignem Gewebe (Kremer et al., 2006).

Wie bereits in I.3.4 erwähnt, konnte einer Hemmung von mTOR und SGK1 nachgewiesen werden, dass diese durch eine resultierende gesteigerte Autophagozytose zu einem geringeren Metastasierungsrisiko im Prostatakarzinom führt (Liu et al., 2018). Ebenso zeigt sich im Prostatakarzinom die mTOR-abhängige Phosphorylierung von eIF4E als Notwendigkeit für die Tumorgenese durch Überexpression weiterer damit im Zusammenhang stehender Proteine, wobei jedoch eine stärkere Präsenz der phosphorylierten Form p-eIF4E mit einem Fortschreiten der Erkrankung assoziiert werden konnte (Furic et al., 2010, Graff et al., 2009). 4E-BP1, Inhibitor von eIF4E, findet sich im Prostatakarzinom ebenfalls häufig überexprimiert, konnte jedoch im Tierversuch durch ein mTOR knockdown herunter reguliert werden (Kremer et al., 2006, Du et al., 2014).

Als weiterem wichtigem Effektor konnte auch AKT eine Rolle in der Entwicklung des PCA nachgewiesen werden, wobei hier die Beeinflussung von mTORC1 durch AKT bzw. die Beeinflussung von AKT durch mTORC2 in Erinnerung gerufen werden soll. Es zeigte sich, dass sich eine verstärkte Aktivität von AKT im PCA-Gewebe in einem beschleunigten Tumorstadium äußert. So konnte insbesondere in Androgen-unabhängigen PCA-Zelllinien ein solcher Effekt beobachtet werden, welcher letztlich auf die geringere Expression von CDKN1B



(Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B, auch p27<sup>Kip1</sup>) durch die vermehrte AKT-Aktivität zurückgeführt wurde. (Graff et al., 2000, Majumder et al., 2003, Edlind and Hsieh, 2014) Die vermehrte Phosphorylierung von AKT konnte zudem mit einem schlechteren klinischen Outcome in Verbindung gebracht werden (Kreisberg et al., 2004). Im Mausmodell konnte erfolgreich gezeigt werden, dass ein knockdown der mTOR Gene zu einer Abnahme an AKT führt (Du et al., 2014).

Für S6K, welches ein direktes Substrat von mTORC1 ist, konnte nachgewiesen werden, dass seine Überexpression in Tumorzelllinien zu einem verbesserten Überleben, einer höheren Migrationsbereitschaft sowie einer Docetaxel-Resistenz der Zellen führte und im Mausmodell die Entstehungsrate von Tumoren erhöhte. Ein knockdown der entsprechenden Gene bzw. eine Hemmung von S6K verbesserte diese Beobachtungen. (Amaral et al., 2016) Durch ein knockdown der mTOR Gene konnte ebenfalls eine Minderung der S6K Level im Mausmodell erreicht werden (Du et al., 2014). In PCA Zelllinien konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Inhibierung von mTOR bzw. S6K zu einer Reduktion der Mcl-1 Expression führt, was die Zellen anfälliger für eine Behandlung mittels IL-24 (Interleukin 24) machte, einem Protein, dem Tumorsuppressive Eigenschaften durch Apoptoseeinleitung zugeschrieben werden (Du et al., 2015). Eine Hemmung des mTOR Signalweges bei gleichzeitiger Gabe von IL-24 zeigte in einem kleinen Tierversuch ein signifikant vermindertes Tumorwachstum (Du et al., 2015).

Trotz all dieser Einflussmöglichkeiten von mTOR auf die Entstehung und insbesondere auf das Fortschreiten des Prostatakarzinoms konnten bisherige Studien, die eine Hemmung von mTOR vorsahen, keine Behandlungserfolge bei PCA-Patienten mit oder ohne KRPC vorweisen. Zwar scheint eine Hemmung von mTOR durch Rapamycin eine reduzierte phosphorylierung von 4E-BP1 zur Folge zu haben, wodurch eIF4E und somit der eIF4F-Komplex verstärkt gehemmt wird (Sun et al., 2005). Jedoch ist hier weiterhin die scheinbar paradoxe Beobachtung zu vermerken, dass neben eIF4E auch 4E-BP1 in Prostatakarzinomen überexprimiert zu sein scheint und mit einer schlechteren Prognose einher geht (Wang et al., 2016). Neuere, erfolgsversprechende Ansätze sehen daher eine

gleichzeitige Hemmung von mTOR und weiteren Schlüsselproteinen wie beispielsweise PI3K vor. (Statz et al., 2016, Tang and Ling, 2014).

Die Untersuchungen von Veränderungen rund um mTOR im PCA scheinen trotz bisher scheinbar erfolgloser medikamentöser Intervention dennoch aus prognostischer Sicht weiterhin von Interesse. So konnte bereits im fortgeschrittenen oesophagialen Plattenepithelkarzinom festgestellt werden, dass eine starke Expression von mTOR und phosphoryliertem mTOR (p-mTOR) im Tumorgewebe mit einem signifikant geringeren Gesamtüberleben einhergeht (Wu et al., 2018). Ein solcher Zusammenhang konnte ebenfalls in frühen Stadien des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms festgestellt werden (Dhillon et al., 2010, Gately et al., 2012). Ebenso konnte eine Korrelation von schlechterem Gesamtüberleben mit einer starken Expression von p-mTOR im Tumorgewebe von Gliom-Patienten festgestellt werden (Liu et al., 2017). Beim Magenkarzinom konnte eine stärkere Expression von p-mTOR mit einer insgesamt schlechteren Prognose und einem kürzeren Gesamtüberleben in Verbindung gebracht werden (Cao et al., 2017). Vor diesem Hintergrund scheint die Untersuchung dieses Sachverhaltes beim Prostatakarzinom als gerechtfertigt. Aufgrund der bekannten Tumorerogenität beim PCA scheint es jedoch von besonderem Interesse, die Untersuchungen nicht nur im Gewebe aus dem Zentrum der Tumoren durchzuführen, sondern auch die Übergangsregionen und das benigne Gewebe zu untersuchen.

## I.4 FRAGESTELLUNG DER ARBEIT

Beim Prostatakarzinom sind nur wenige molekulare Prognosemarker bekannt. Möglicherweise spielt bei der Bewertung dieser Marker die Heterogenität des Prostatakarzinoms eine einflussnehmende Rolle, zur individuellen Beurteilung der Prognose aufgrund eines molekularen Markers muss die jeweils aggressivste Stelle des lokalen Tumorgewebes betrachtet werden, ansonsten würde das Ergebnis verfälscht werden.

Deshalb soll diese Arbeit beispielhaft am mTOR-System untersuchen, inwieweit Heterogenitäten der Expression innerhalb des (tumortragenden) Prostatariums auftreten -dabei soll vor allem Augenmerk auf die Invasionsfront gerichtet werden- und inwieweit diese sich im Krankheitsverlauf wiederfinden.

Mittels immunhistochemischer Untersuchungen zur Expression von Schlüsselparametern des mTOR-Signalwegs mTOR, p-mTOR und 4E-BP1 in Geweben des Prostatakarzinoms und in angrenzenden normalen Prostatageweben soll ein besseres tumorbiologisches Verständnis des Prostatakarzinoms zu gewinnen. Dabei sollten relevante Proteindysregulationen hauptsächlich auf ihre potenzielle Wertigkeit für die Vorhersage des Weiteren individuellen Krankheitsverlaufs nach erfolgter Prostatektomie hin untersucht werden. Aspekte der Gewebheterogenität und lokoregionärer Verteilung der molekularen Ausstattung in Tumor-tragenden Prostataen sollen in Betracht gezogen werden: Es sollen einerseits Untersuchungen erfolgen, die potenzielle Unterschiede zwischen den Verhältnissen im Zentrum der Tumoren und den Verhältnissen an deren Invasionsfront aufzeigen würden, andererseits sollen in der vorliegenden Arbeit auch Verhältnisse im benachbarten Normalgewebe der Prostata angerissen werden.

Dabei sollen diese Expressionen mit klinischen Daten in Bezug gesetzt werden, um die prognostischen Informationen zu erhalten. Den Schwerpunkt sollen dabei Korrelationen mit Follow-up Informationen des Kollektivs bilden. So sollen die untersuchten Parameter auf ihre Eignung als Biomarker geprüft werden. Neben der prognostischen Signifikanz bildet dabei der Einbezug lokaler Verhältnisse potenzielle Relevanz für gewebediagnostische Fragestellungen, genauso wie die

zu erwartenden tumorbiologischen Ergebnisse im Zusammenhang mit möglichen therapeutischen Ansätzen einer mTOR-Inhibitionstherapie interpretiert werden können.

## II MATERIAL UND METHODEN

### II.1 PRÜFUNG ETHISCHER BELANGE UND ETHIKVOTUM

Die retrospektive Erfassung des Kollektivs, die Erfassung der klinischen Daten zum Zeitpunkt der Probenasservation sowie die Nachbeobachtung der Krankheitsverläufe wurden vor Beginn der Studie bei der Ethikkommission des Universitätsklinikums Tübingen zur Begutachtung eingereicht. Dabei wurde insbesondere auf das modellierte Patientenkollektiv sowie dessen Selektierung anhand von festgelegten Ein- bzw. Ausschlusskriterien und der späteren Rekrutierung eingegangen. Der Antrag zur Prüfung Ethischer Belange enthielt ferner eine Beschreibung zum Umgang der erhobenen klinischen Daten sowie der Daten, welche durch Nachbeobachtung und Befragung der Patienten erhoben werden sollten. Hierauf wird in II.2 „Datenschutzbelange“ ausführlicher eingegangen. Die vorliegende Arbeit erhielt von der Ethikkommission des Universitätsklinikums Tübingen das positive Ethik-Votum Nummer 290/2010BO2 vom 10. Februar 2011 für den Arbeitstitel „Retrospektive immunhistochemische Untersuchungen zur Expression von Proteinparametern des mTOR-Signalwegs beim Prostatakarzinom mittels der Tissue Micro Array Technik“.

### II.2 DATENSCHUTZBELANGE

Bei der Erhebung und Auswertung der Daten diese Arbeit betreffend wurden alle persönlichen Patientendaten unter strengen Datenschutzauflagen sowie unter Beachtung des Datenschutzgesetzes erfasst und in pseudonymisierter Form verarbeitet. insbesondere bei einer telefonischen Evaluation des postoperativen Verlaufs waren die Patienten zuvor postalisch über den Anruf informiert worden und die Telefonate wurden ausschließlich von Telefonanschlüssen der urologischen Universitätsklinik Tübingen und ausschließlich von Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Klinik geführt. Sie unterlagen ebenfalls der ärztlichen Schweigepflicht, worauf die Patienten zu Beginn des Gesprächs nochmals ausdrücklich hingewiesen wurden. Der Umgang mit den erhobenen Daten wurde den Patienten bei der telefonischen Befragung explizit erläutert. Hierbei wurde

besonderer Wert gelegt, den teilnehmenden Patienten die Pseudonymisierung sowie eine durch technische Mittel abgesicherte elektronische Speicherung zu garantieren, wie sie die Leitlinien zur Datensicherheit des Klinikums vorschreiben.

## II.3 DETERMINIERUNG UND REKRUTIERUNG DER STUDIEN-POPULATION

Die vorliegende Studie umfasst Proben von Patienten, die sich in dem Zeitraum von 2002 bis 2004 einer radikalen Prostatektomie (RPX) an der Urologischen Klinik des Universitätsklinikums in Tübingen unterzogen. Das Kollektiv wurde konsekutiv nach den unter Punkt II.3.1 und II.3.2 aufgeführten Ein- und Ausschlusskriterien ausgewählt. Die eingeschlossenen Probanden befanden sich nach präoperativem Erkenntnisstand alle in einem lokalisierten Krankheitsstadium. Der zurückliegende Zeitraum ist gewählt worden, damit Nachbeobachtungen möglich waren.

Die aus den Akten zusammengetragenen Daten eines jeden Patienten umfassten Name, Alter zum Operations-Zeitpunkt, präoperativer PSA-Wert, postoperatives TNM-Stadium, postoperativer Gleason Score sowie den Resektions-Status (R-Status) des Präparats.

Das endgültige Studienkollektiv bildete eine Population von 114 Patienten.

### II.3.1 EINSCHLUSSKRITERIEN

- Es sollte eine rein retrospektive Analyse von paraffinierten und asservierten Gewebepblöcken durchgeführt werden, die im Rahmen von radikalen Prostatektomien im Zeitraum zwischen 2002 und 2004 routinemäßig angefertigt wurden. Dieser zurückliegende Zeitraum ist gewählt worden, damit Nachbeobachtungen möglich waren.

- Gewebe von Patienten, die sich aufgrund eines bioptisch gesicherten Adenokarzinoms einer Prostatektomie unterzogen, welches routinemäßig histopathologisch aufgearbeitet wurde.
- Paraffinmaterial im Routinearchiv verfügbar

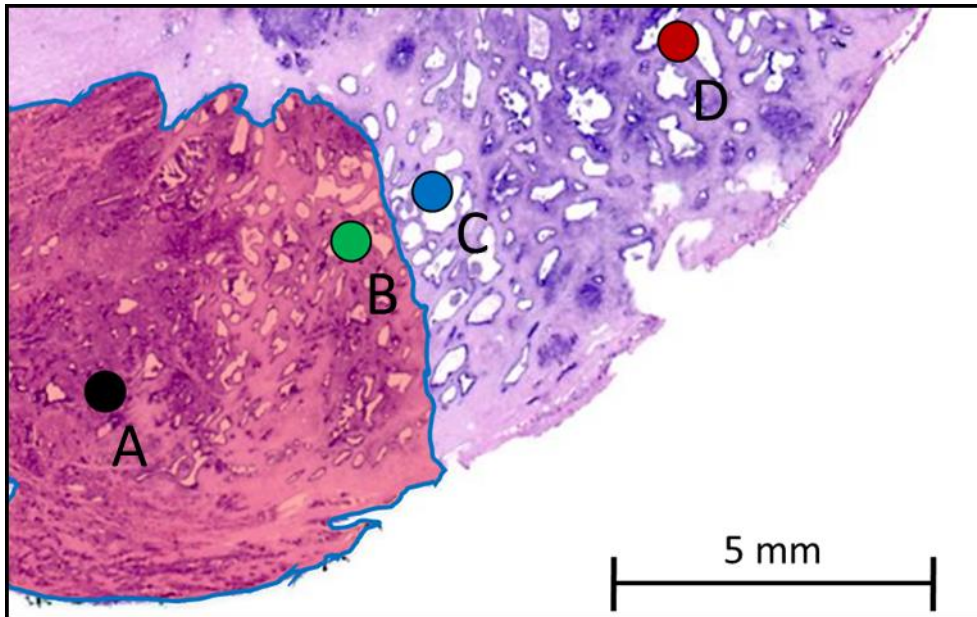
#### II.3.2 AUSSCHLUSSKRITERIEN

- Fehlende Verfügbarkeit der Paraffinblöcke oder Großflächenschnitte.
- Wenn -theoretisch denkbar- durch die Entnahme von Gewebe nicht mehr genügend Material für die weitere routinemäßige Aufbewahrungspflicht verbleiben würde.
- Darüber hinaus kam es bei Vorliegen eines Malignoms, das nicht vom Drüsengewebe abstammte oder unklarer Lokalisation des Tumorareals nach histologischer Sichtung, zum Ausschluss des Patienten.

## II.4 DATENBANKERSTELLUNG UND -VERARBEITUNG

Aus den elektronischen Patientenakten wurden retrospektiv personenbezogene Befunde und klinische Daten erfasst und mittels Microsoft Excel 2013® (Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim) in eine Excel-Tabelle eingetragen. Hierbei handelte es sich zum Einen um patienten- oder probenbezogene klinische Parameter wie das Patientenalter zum Zeitpunkt der Operation, den PSA-Wert vor der Operation oder Informationen zu relevanten Zweiterkrankungen, zum Anderen auch um die histopathologisch erfassten Informationen wie den Gleason Score und den Resektionsstatus des Präparats nach Entfernung der Prostata oder einer vorliegenden synchronen lymphogenen Metastasierung.

In der Datenbank erhielt jeder Entnahmeort eine fortlaufende Probennummer zugewiesen, um nach mikroskopischer Auswertung den entsprechenden Färbescore hinzufügen zu können. Diese Datenzusammenstellung war Basis für die statistischen Auswertungen der Studie. Die Ergebnisse jedes Probenortes gemäß Abbildung 5 wurden später gesondert dem jeweiligen Patienten und seinen klinischen Daten zugeordnet.

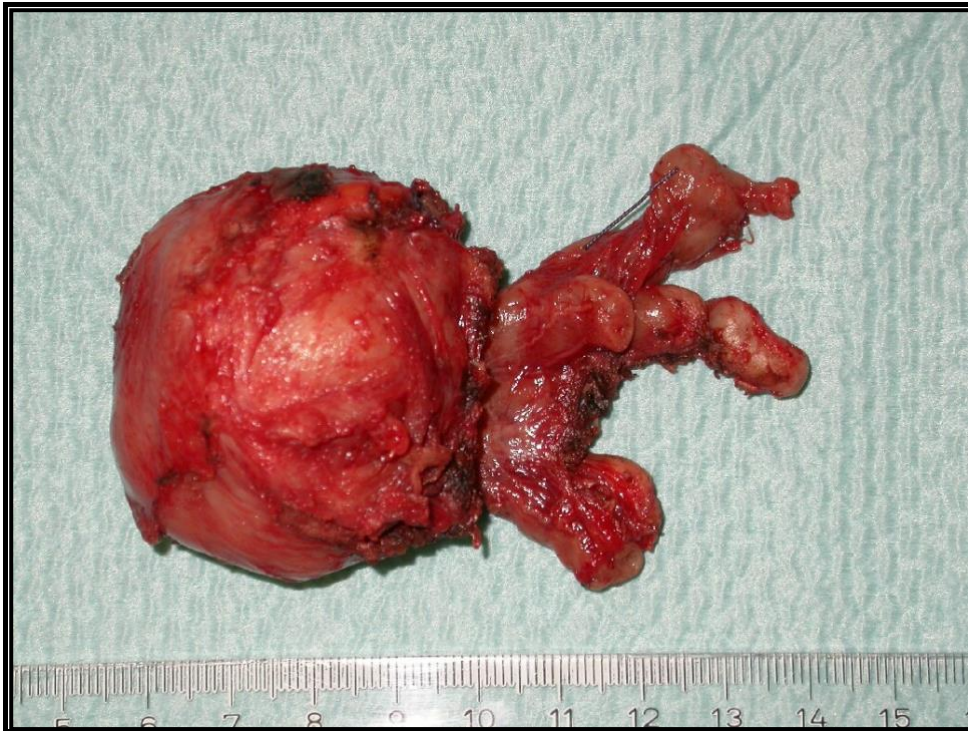


**Abbildung 3:** Histopathologisch befundeter HE-Schnitt mit eingezeichnetem, farbig gehaltenen Tumorareal einer Prostata und studienbedingten Entnahmeorten nach Schema. Probenentnahmeorte in Bezug zur Invasionsfront des Tumorareals (rot eingefärbt) auf dem Schnittpräparat. Korrespondierende Probenbiopsien wurden zur Erstellung des Tissue Microarray verwendet: **Schwarz:** Tumorzentrum (gemäß A aus II.6), **Grün:** Tumordinvasionsfront (B) maligne Histologie, **Blau:** Tumordinvasionsfront (C) benigne Histologie, **Rot:** Tumor-entfernt liegendes benignes Prostatagewebe (D) (Russo et al., 2019).

## II.5 AUFBEREITUNG DES OPERATIONSPRÄPARATES UND ASSERVIERUNG DER GEWEBEPROBEN

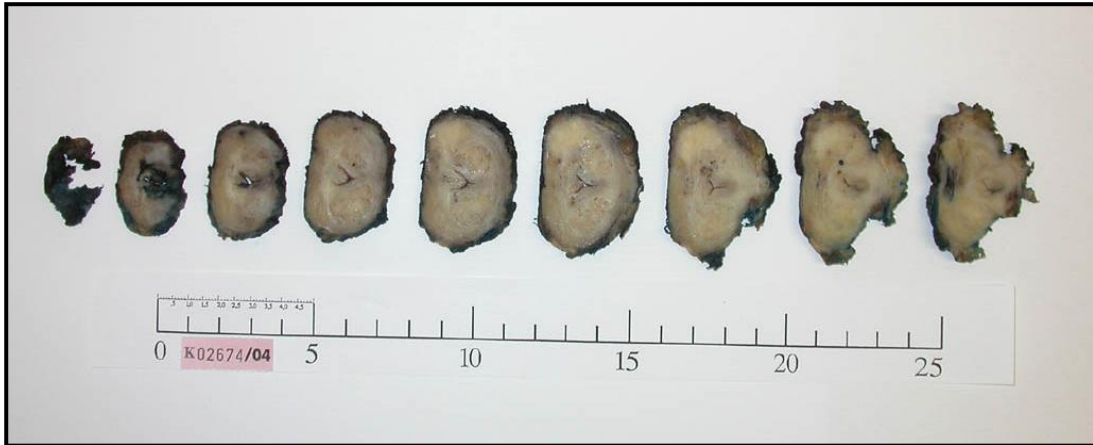
Das studienbedingt untersuchte Gewebe stammte aus routinemäßigen Aufarbeitungen der Operationspräparate. Die Aufarbeitung des Präparats, das bei radikalen Prostatektomien gewonnen wurde (siehe Abbildung 4), erfolgte nach Routine-Protokoll. Hierbei wurde die Drüse nach der Absetzung zuerst für 24h in Formalin (SAV-Formaldehydlösung neutral gepuffert 4,5%, SAV-LP, Flintsbach) fixiert.





**Abbildung 4:** Natives Prostatektomiepräparat links apikal, rechts basal, Ansicht von anterior, Foto Urologie Tübingen.

Im Rahmen des makroskopischen Zuschnitts des Präparats wurden die relevanten Absetzungen an Apex, Basis, Samenleitern und Samenblasen entnommen und als Kapselpräparate verarbeitet. Anschließend wurde das Präparat in mehrere relevante, höhentransversale Flächen senkrecht zum Rektum zerteilt (Abbildung 5). Repräsentative Lamellen gelangten dann durch weiteren Zuschnitt in routinemäßige Gewebeförmchen der histopathologischen Aufarbeitung (Einbettkassetten IP II, Leica Biosystems Richmond Inc., Richmond IL, USA).



**Abbildung 5:** Lamelliertes Prostata-Operationspräparat nach Fixierung in Formalin. Diese Horizontallamellen wurden dann repräsentativ in Routineförmchen zugeschnitten. Rechts apikale Lamelle, links basale Lamelle.

Danach folgte die Dehydrierung der Präparate in routinemäßig verwendeten Automaten (Shandon Pathcentre, Thermo scientific, Waltham, MS, USA) im Institut für Pathologie. Nach der Dehydrierung folgte das Einbetten der Gewebeproben in Paraffin mit Hilfe der Gewebe-Einbettkassetten (Leica IP II). An einem Gießautomaten (TBS 88, Medite Medizintechnik, Burgdorf, Deutschland). Pro Paraffinblock wurde dann mittels eines Mikrotoms (Rotationsmikrotom 1512, Leitz, Wetzlar, Deutschland) jeweils ein 5-10  $\mu$ m dünner Schnitt angefertigt und auf einen routinemäßigen Objektträger (71 x 26 mm, Langenbrinck, Emmendingen) aufgezogen. Diese Schnitte wurden dann mittels der morphologischen Hämatoxylin-Eosin (H.E.) gefärbt.

## II.6 HISTOPATHOLOGISCHE BEURTEILUNG DES ASSERVIERTEN GEWEBES

Es folgte dann die studienbedingte histopathologische Beurteilung durch einen erfahrenen Pathologen (PD Dr. med. U. Vogel). Auf den H.E.-Schnitten wurden hierbei die Tumoreale exakt mit einem Folienstift umrandet. Diese Vorlagen dienten als Schablone für die entsprechenden Paraffinblöcke, aus welchen die Stanzzyylinder zur Erstellung der Tissue Microarray (TMA) entnommen wurden.

Dabei wurden in Abhängigkeit der verlaufenden und filzstiftmarkierten Tumorearealgrenze aus definierten Arealen je ein Gewebezylinder für den späteren Tissue Microarray entnommen (Abbildung 3).

- A. Aus dem Tumorzentrum des Haupttumors des Präparats, dabei wurde durch Sichten der gesamten Schnittserie der Haupttumor identifiziert und aus dessen Zentrum, d.h. dem am weitesten von allen seinen Rändern entfernten Ort, eine Probe genommen.
- B. und C. Dann wurden aus dem Bereich der Invasionsfront, also dem Rand des markierten Tumorareals, mehrere Proben genommen und dem TMA zugefügt. Durch die spätere histologische Determinierung konnten diese dann entweder zu B (im Fall einer malignen Histologie) oder zu C (im Falle einer benignen normalen Prostatahistologie) zugeschlagen werden.
- D. aus einem Ort der, nach Sichtung der Gesamtserie der Schnittpräparate des Patienten als der Ort der am weitesten von alle Tumorarealen des Patienten entfernt ist und benigne Histologie aufweist.

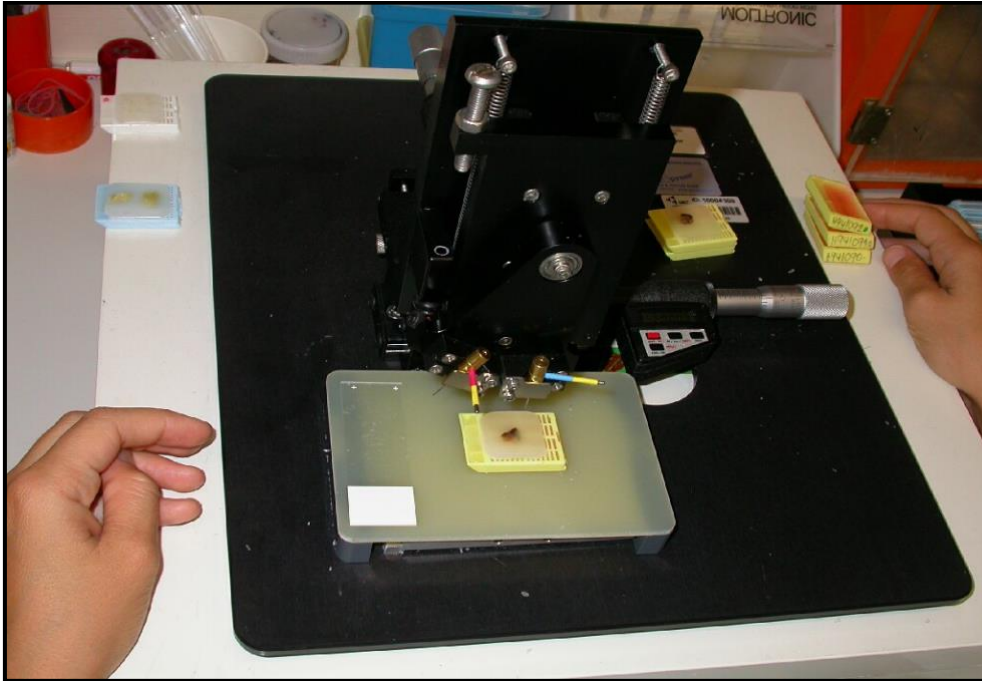
So wurde durch die Abfolge der Probenorte eine vermutete Kaskade entlang des Weges vom Zentrum über die Grenze hinweg bis hin zu weit vom Tumorareal entfernten normalen Prostatagewebe nachgezeichnet.

## II.7 TISSUE MICROARRAY

### II.7.1 DIE TECHNISCHE VORGEHENSWEISE

Das Tissue Microarray (TMA) Verfahren ermöglicht eine gebündelte Untersuchung verschiedener Gewebeproben auf unterschiedlichste Biomarker. Durch das Zusammenfassen einer größeren Anzahl an Einzelbiopsien zu einer Probenmatrix auf einem einzigen Paraffinblock kann das Vorkommen (die Expression) des gewählten Markers in diesen Proben untereinander quantitativ mittels Immunhistochemie standardisiert verglichen werden. Erstmals kam die TMA Technik in dieser Form durch Kononen et al. im Jahre 1998 zur Anwendung (Kononen et al. 1998) und gilt heute als etabliert für experimentelle Anwendungen

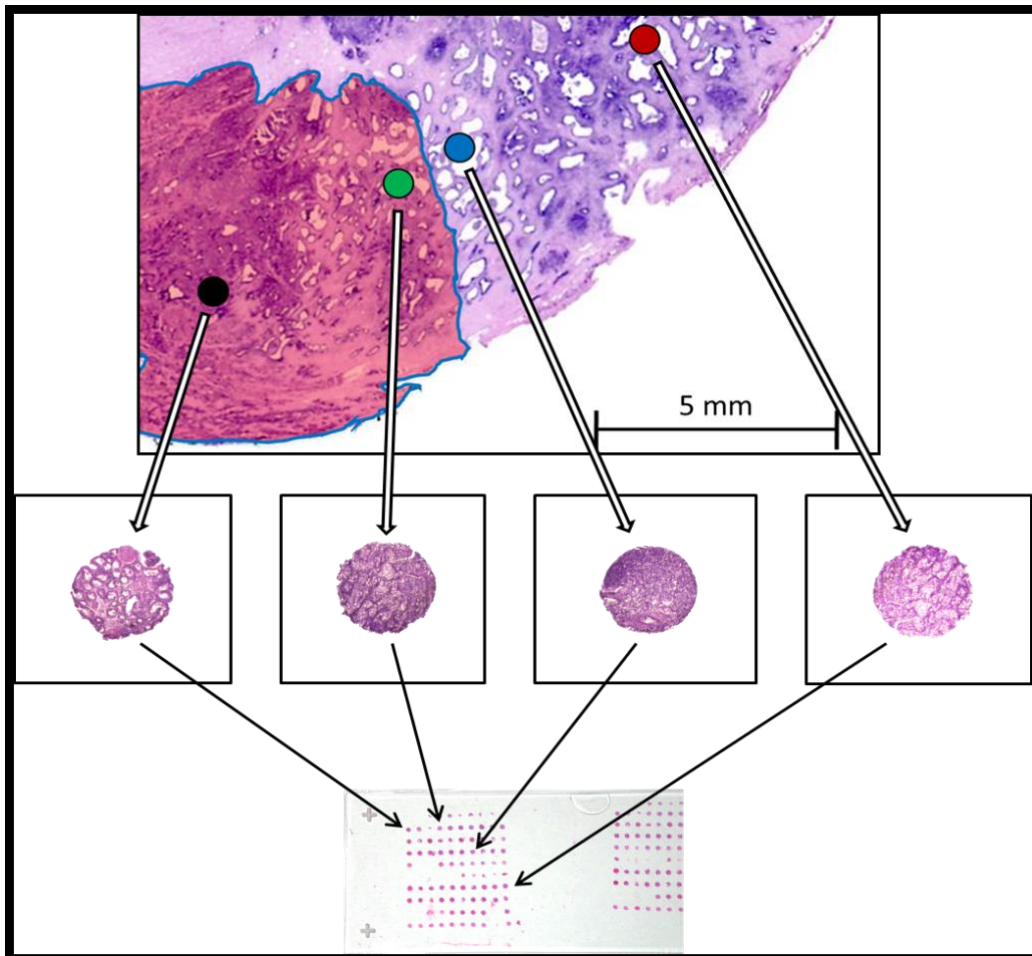
(Merseburger et al. 2006).



**Abbildung 6:** Tissue Microarrayer MTA1 von Beecher Instruments in Verwendung (Foto Urologie Tübingen).

#### II.7.2 HERSTELLUNG DES TISSUE MICROARRAYS

Zur Herstellung des TMA wurde ein manueller Tissue microarrayer (MTA I, Beecher Instruments Inc., Sun Prairie, USA, Abbildung 6) verwendet. Die Apparatur ermöglicht ein einfaches Extrahieren der Probenbiopsien aus einem Spenderblock („donor“) und das exakte Einsetzen dieser Biopsien in die Probenmatrix auf dem Empfängerblock („recipient“). Dabei wurden aus den in Abbildung 3 genannten Bereichen des Prostatamaterials Stanzbiopsien mit einem Probendurchmesser von 1mm entnommen und durch Justierung mittels Mikrometerschrauben in Abständen von 0.7mm in den Empfängerblock eingebracht. Die vier unterschiedlichen Probenentnahmeorte aus einem Spenderblock wurden hinsichtlich Ihrer Lage zum Tumorareal und dessen Grenze ausgewählt (siehe Abbildung 7).



**Abbildung 7:** Randomisierte Anordnung der Gewebedots im Tissue Microarray gemäß Lokalisation der entnommenen Proben (verändert nach Abbildung 5).

Der leere Empfängerblock wurde durch ausgießen eines Leica IP II Förmchens an der medite Gießstation erstellt und anschließend mittels eines Mikrotoms auf eine Höhe von 4-5mm Paraffin abgeflacht und plan geschnitten. Das Einbringen der Gewebeproben in den TMA erfolgte durch Ausstanzen eines Loches im leeren Empfängerblock, das anschließende Entnehmen der Probebiopsie aus dem Prostatamaterial und das darauffolgende Einlassen des so gewonnenen Gewebezyinders in das zuvor gestanzte Loch im Empfängerblock/recipient. Das Einlassen erfolgte dabei in Reihen und Spalten mit einem jeweiligen Abstand von 0.7mm zueinander, sodass als Endergebnis eine rechteckige Probenmatrix aus Gewebepunkten („dots“) entstand. Zur späteren korrekten Ausrichtung des geschnittenen TMA unter einem Mikroskop wurden an vordefinierten Positionen

in der Matrix andersartige und gut von Prostatagewebe unterscheidbare Gewebeproben (Hodenparenchym) als Landmarken eingebettet. So entstanden Abfolgen von Gewebebiopsiereihen im Paraffinblock (Abbildung 8), diese Serie von Blöcken bildet den Tissue Microarray.



**Abbildung 8:** Tissue Microarray – Block mit der Zusammenstellung der Studienproben.

Zur endgültigen Fixierung der Gewebebiopsien im Empfängerblock wurde dieser mittels eines im Wärmeschrank auf ca. 60°C aufgewärmten Glasobjektträgers angeschmolzen, um die Gewebezylinder mit dem Trägermaterial zu verbinden.

### II.7.3 SCHNITTPRÄPARATE DES PARAFFINGEWEBEBLOCKS – TISSUE MICROARRAY

Es folgte die Weiterverarbeitung zu Objektträger Mikroskopiepräparaten. Die mit den Biopsien versehenen Empfängerblöcke wurden mittels eines Mikrotoms (Rotationsmikrotom 1512, Leitz, Wetzlar) geschnitten und die Schnitte (5-7µm) im Wasserbad (TFB 45, Medite GmbH, Burgdorf) bei 48°C geglättet. Anschließend wurden die Schnitte auf Superfrost-Plus-Objektträger (Langenbrinck, Emmendingen) aufgezogen weiterhin über Nacht bei 37°C in einem Wärmeschrank (ED 35, WTB Binder/Tuttlingen) getrocknet.

Jeweils eine Serie der so entstandenen Schnittserien aller TMA - Blöcke des Kollektivs wurden dann mittels H.E. Färbung gefärbt und der histopathologischen Befundung -und damit der Verifikation der jeweiligen Dot-Histologie und vor Allem auch der endgültigen Einteilung der Biopsien aus dem Tumorrandbereich in maligne (innerhalb der Invasionsfrontgrenze) und benigne (außerhalb) zugeführt.

## II.8 IMMUNHISTOCHEMIE

### II.8.1 ALLGEMEINES FUNKTIONSPRINZIP

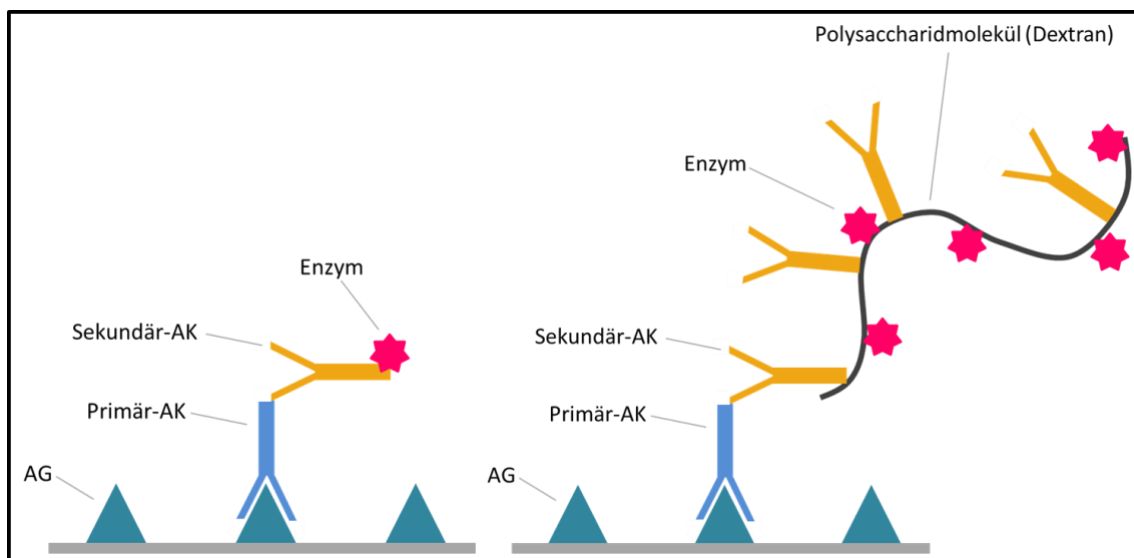
Zur relativ exakten Ermittlung der Expression bestimmter Gene eignet sich die Erfassung auf Proteinebene. Letztere wird im Allgemeinen als die funktionelle/funktionale Ebene betrachtet. Durch Erfassung der Genexpression auf dieser Ebene ist evaluierbar, ob das betrachtete Gen auch tatsächlich transkribiert und translatiert wurde.

Durch Verwendung spezifisch bindender Antikörper (AK) ermöglicht das Prinzip der Immunhistochemie (IHC) den Nachweis eines ausgewählten Antigens (AG) im Probenmaterial, indem jene AKs spezifisch an Epitope des AG binden. Durch anschließendes Anwenden eines Nachweissystems können Intensität und Lokalisationen dieser Bindungen sichtbar gemacht werden. Hierbei werden zwei Nachweismethoden unterschieden: von der direkten Nachweismethode spricht man, wenn an den spezifisch bindenden AK selbst ein Enzym gekoppelt ist. Bei der indirekten Methode hingegen ist das Enzym an einen sekundären AK gekoppelt, welcher spezifisch an die Fc Region des primären, an das zu detektierende AG bindenden, AK bindet (Abbildung 9 links).

Durch Zugabe von Chromogen wird der Ort der Antikörperbindung sichtbar gemacht, indem es durch das gekoppelte Enzym zu einem Farbstoff umgesetzt wird.

### II.8.2 POLYMERKONJUGAT-METHODE (ENVISION™)

Bei den untersuchten TMAs wurde für alle drei Parameter der Studie die indirekte immunhistochemische Polymerkonjugat-Methode angewandt. Hierbei sind die Sekundär-AK an ein Polysaccharidmolekül gebunden. Durch die gleichzeitige Kopplung von Enzymmolekülen an das Dextranmolekül kommt es durch die Konjugate zu einer Verstärkung des Signals. Gleichzeitig entfällt ein dritter Schritt, bei dem bisher das Enzym gesondert hinzugegeben werden musste (siehe **Abbildung 9** rechts).



**Abbildung9:** Technik der Immunhistochemie, **links:** allgemeines Funktionsprinzip, **rechts:** Polymerkonjugat-Methode (Grafik: Tim Neumann, nach Staining Manual, Dako, Glostrup, Dänemark). Der Primärantikörper (Primär-AK) bindet an das Antigen (AG). Mehrere, an ein Polysaccharidmolekül gebundene, Sekundär-Antikörper (Sekundär-AK) binden an den Primär-Antikörper. Durch gleichzeitige Kopplung von Enzymen an das Polysaccharidmolekül wird die Bindung sichtbar gemacht.

### II.8.3 DURCHFÜHRUNG DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN FÄRBUNG

Alle Reagenzien wurden streng nach den Herstellerangaben gelagert, verwendet und vor ihrer Verwendung auf Raumtemperatur (ca. 18-21°C) gebracht. Alle Färbungen wurden händisch durchgeführt (siehe **Abbildung 10**).



### II.8.3.1 FÄRBUNG FÜR MTOR

Zu Beginn wurden die 4-6µm dicken Paraffinschnitte im Wärmeschrank (ED 35, WTB Binder/Tuttlingen) über Nacht bei 37°C getrocknet. Vor Färbebeginn wurden die Schnitte 30min bei 58°C im Wärmeschrank gelagert, um das Paraffin grob abzuschmelzen. Anschließend wurde dieser Vorgang des Entparaffinierens chemisch durch dreimalige zehninütige Inkubation im Lösungsmittel Xylol weiter fortgeführt. Es folgte die Rehydrierung durch eine absteigende Alkoholreihe mit jeweils 2 x 7 Minuten 100% und 2 x 7min 96% Ethanol, weiterhin 1 x 7 Minuten 70% Ethanol. Danach wurde für 5 Minuten mit *Aqua dest.* gespült.

Bei der Fixierung der Präparate können Aldehydquervernetzungen entstehen, die die Antigen-Bindungsstellen verdecken können. Um diese potenziellen Bindepunkte freizulegen, folgte daraufhin der Demaskierungs-Schritt. Dies erfolgte durch 20-minütiges Kochen in TRIS/EDTA-Puffer (1,21 g TRIS, 0,37g EDTA einwiegen, auf 1000ml mit *A. dest.*, pH 9,0) in der Mikrowelle (Moulinex Micro Chef MO 500) bei 600 Watt (Stufe 2). Der Puffer wurde unmittelbar vor seiner Verwendung angesetzt. Nachdem sie 30 Minuten bei Raumtemperatur abkühlten, wurden die Präparate für 2 x 5 Minuten mit TBST-Pufferlösung (TRIS buffered Saline with Tween 20 = 0,5 mol TRIS, 0,3 mol NaCl, 0,1 % Tween 20 d.h. 50 ml 1 molar TRIS A + 100 ml 3 molar NaCl B + 1000 µl Tween 20) gewaschen.

Zur Verhinderung von unspezifischen Reaktionen durch Gewebssperoxidasen oder endogene Alkalische Phosphatasen (AP) wurde anschließend das Gewebe mit (je nach Schnittgröße) 5 – 8 Tropfen vom Dualblock (Dual Endogenous Enzyme Block, Dako S2003, Dako, Glostrup, Dänemark), einer gebrauchsfertigen Lösung bestehend aus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Levamisol, für 10 Minuten inkubiert. Danach wurde für 2 x 5 Minuten mit TBST gewaschen.

Jetzt folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper mTOR (7C10), Rabbit mAb (IHC Specific) # 2983 (Cell Signaling Cell Signaling Technology Inc., Beverly, MA, USA) in einer Verdünnung von 1:50. Das optimale Verdünnungsverhältnis wurde bereits zuvor durch sukzessive Probefärbungen ermittelt. Das

Verdünnungsmedium wurde gebrauchsfertig von der Firma Dako bezogen (Dako Diluent S S0809, Dako). Die Inkubationszeit betrug 120 ( $\pm$ 1) Minuten bei Raumtemperatur.

Um die ungebundenen und damit überschüssigen Antikörpermoleküle zu entfernen, wurde drei Mal für 5 Minuten mit TBST gespült.



**Abbildung 10:** Händisch durchgeführte immunhistochemische Färbung auf der Färbebank, Foto U. Kühs.

Es folgte der sekundäre LINK (Brücken)-AK aus dem Testkit EnVision™ G|2 System/AP Rabbit/Mouse, K5355 („Vail 1“, Dako), der für 30 ( $\pm$ 1) Minuten inkubiert wurde. Nach erneutem Waschen für 3 x 5 Minuten in TBST, wurde mit AP Enzyme (Testkit EnVision™ G|2 System/AP Rabbit/Mouse, K5355, „Vail 2“) als signal enhancer (Signalverstärker) ebenfalls für 30 ( $\pm$ 1) Minuten inkubiert. Überschüssige Lösung wurde abermals mit TBST durch 3 x 5 Minuten Spülung entfernt.

Daran schloss sich das Inkubieren der Proben in Permanent Red Arbeitslösung (Testkit EnVision™ G|2 System/AP Rabbit/Mouse, Code K5355, Arbeitslösung =

1000 µl Permanent Red Substrat („Vail 3“) 10 µl Permanent Red Chromogen („Vail 4“) für 15 Minuten an. In dieser Reaktion wurde das Chromogen durch die gebundenen Enzyme in einen sichtbaren, leuchtend roten Farbstoff umgewandelt. Diese Reaktion wurde durch Spülung und 2 x 5-minütiges Inkubieren in *Aqua bidest.* beendet.

Danach wurde die Gegenfärbung mit Hämatoxylin nach Mayer durchgeführt. Nach 20 Sekunden wurde mit *Aqua bidest.* gespült, um das überschüssige Färbemittel zu entfernen. Anschließend wurde 7 Minuten unter Leitungswasser gespült, um die Präparate durch Erhöhen des pH-Wertes zu bläuen.

Zuletzt wurden die Schnitte mit dem wässrigen Eindeckmittel Aquatex (Merck, Darmstadt) konserviert und mit einem Deckglas eingedeckt.

#### II.8.3.2 FÄRBUNG FÜR P-MTOR

Das Protokoll zur Färbung von p-mTOR wurde prinzipiell analog dem Protokoll für mTOR durchgeführt, Verwendung fand hier allerdings der Primärantikörper phospho-mTOR (Ser2448) (49F9) Rabbit mAb (IHC Specific) # 2976 von Cell Signaling in einer Verdünnung von 1:50 in Verdünnungsmedium Dako S S0809 für 60 (±1) Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Der Demaskierungsschritt erfolgte hier durch 30-minütiges Kochen in Citratpuffer (10mmol, pH 6,0, 18 ml Stammpuffer A (Zitronensäure) + 82 ml Stammpuffer B (Natriumcitrat) gemischt, auf 1000 ml mit *A. dest* aufgefüllt, pH kontrolliert) in der genannten Mikrowelle (Stufe 2), und anschließendes Abkühlen für 30 Minuten bei Raumtemperatur.

Die Inkubation in Permanent Red Arbeitslösung erfolgte nur für 10 Minuten bei sonst analoger Vorgehensweise.

#### II.8.3.3 FÄRBUNG FÜR 4E-BP1

Das Protokoll zur Färbung von 4E-BP1 wurde prinzipiell analog dem mTOR Protokoll durchgeführt, Verwendung fand hier allerdings der Primärantikörper 4E-BP1 (53H11) Rabbit mAb # 9644 von Cell Signaling in einer Verdünnung von

1:100 in Verdünnungsmedium Dako S S0809 für 60 ( $\pm$ 1) Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Der Demaskierungsschritt erfolgte, analog zu der von p-mTOR, durch 30 Minuten kochen in Citratpuffer (10mmol, pH 6,0) in der genannten Mikrowelle (Stufe 2), gefolgt von 30 Minuten abkühlen bei Raumtemperatur.

Die Inkubation in Permanent Red Arbeitslösung erfolgte auch (analog p-mTOR) für 10 Minuten bei sonst identischer Vorgehensweise.

#### II.8.3.4 KONTROLLEN UND VALIDITÄT DER ANTIKÖRPER

Die immunhistochemischen Färbungen wurden bei allen Antikörpern durch jeweils eine Positiv- und Negativkontrolle überprüft und validiert.

Als Positivkontrolle fungierte für mTOR, p-mTOR und 4E-BP jeweils ein Gewebeschnitt aus einem Mammakarzinom, als Negativkontrolle fungierte jeweils ein Präparat Mammakarzinom, in dessen Färbekaskade der primäre Antikörper nicht aufgebracht wurde.

Bei allen drei Primärantikörpern handelt es sich um monoklonale Kaninchenantikörper, die vom Hersteller explizit für die Verwendung bei formalinfixierten, paraffinierten Humangewebe empfohlen werden.

## II.9 EVALUATION UND INTERPRETATION DES MIKROSKOPISCH ERFASSTEN EXPRESSIONS-VERHALTENS

Die Auswertung erfolgte semiquantitativ anhand der Färbeintensität und der Färbediversivität entlang des Gewebedots mittels eines etablierten Scoring-Systems. Auf Auswertebögen, die in ihrem Aufbau der Dot-Anordnung des Objektträgers entsprachen (array maps), wurde der jeweilige Score des Einzeldots vermerkt. Die Beurteilung geschah dabei verblindet und anonymisiert. Jedem einzelnen Gewebepunkt wurde eine Nummer zugewiesen. Dadurch konnten bei der Auswertung keinerlei Rückschlüsse auf persönliche Daten und

klinisch-pathologische Parameter des Patienten sowie zur Lokalisation der Stanze gezogen werden. Bei Entblindung und beim Eintrag war jedoch eine eindeutige Zuordnung in der Tabelle möglich.

Beurteilt wurde mittels eines Zeiss Universal-Lichtmikroskops (Zeiss Universal, Carl Zeiss, Jena) bei für jede Vergrößerung konstant gehaltener Lichtintensität, stetigen Umgebungsbedingungen und 160-facher Vergrößerung. Zur genaueren Betrachtung wurde stets auch das Objektiv mit 400-facher Vergrößerung eingesetzt, dabei wurde dann die Lichtintensität an diese Vergrößerung (immer gleich) angepasst.

#### II.9.1 SCORE NACH REMMELE UND STEGNER

Zur mikroskopischen Auswertung konnte der Immunoreaktive Score (IRS) nach Remmele & Stegner (1987) herangezogen werden (siehe **Tabelle 3**). Wichtig für die Verwendung dieser Auswertemethode ist eine größtenteils homogene Verteilung der Färbung. Damit kann für die Intensität des jeweilig betrachteten Gewebeausschnitts (z.B. des Dots) jeweils eine vorherrschende Färbeintensität angegeben werden. Für die untersuchten Marker war dies zutreffend, sodass dieser Score Anwendung finden konnte. Die weitere Determinierung des Färbereignisses erfolgt dann über die Flächenverteilung dieser vorherrschenden Intensität.

Für das Errechnen des IRS gilt dabei: Erst wird die Prozentzahl der gefärbten (positiven) Zellen (PPZ) auf einer Skala von 0 (keine positiven Drüsenzellen) bis 4 (mehr als 80% angefärbte Drüsenzellen, siehe Tabelle 3) beurteilt. In einem zweiten Schritt wird Intensität der Färbung (Staining Index, SI) anhand einer Einteilung von 0 (negativ) bis 3 (stark angefärbt, Tabelle 3) klassifiziert. Der Immunoreaktive Score ergibt sich aus dem Produkt von PPZ und SI (Remmele und Stegner 1987).

Prozent positive Zellen der Fläche		Staining Index (SI)		Immunoreactive Score (IRS)	
0	0%	0	Negativ	0	Negativ
1	<10%	1	Schwache Expression	1-3	Schwach
2	10-50%	2	Mäßige Expression	4-7	Mäßig
3	51-80%	3	Starke Expression	8-12	Stark
4	>80%				

**Tabelle 3:** Ergebnis des Immunoreactive Score (IRS) nach Remmele & Stegner (1987). Der prozentuale Wert der angefärbten Zellen wird mit der vorherrschenden Färbeintensität (SI) multipliziert und ergibt damit den IRS.

#### II.9.2 VALIDIERUNG DER ROHDATEN DER MIKROSKOPISCHEN AUS-WERTUNG

Bei der mikroskopischen Evaluation wurde jeder Marker in einem zweiten Validierungsdurchgang von einer verblindeten zweiten befundenden Person ohne Kenntnis der Zahlen des ersten Durchlaufs ausgewertet und in gleicher Weise in der vordefinierten Numerik dargestellt.

Gab es bei den den Ergebnissen der Remmele & Stegner Methode Abweichungen zwischen den beiden Befundenden, wurde vom zweiten Befundenden ein drittes Mal, ebenfalls verblindet, ausgewertet. Dies erfolgte bei Abweichungen von mehr als 25% des absoluten Wertes oder bei einem Befund von 0 in einem Fall und einem Befund von ungleich 0 im Ergebnis des zweiten Befundenden.

Bei dieser Zählmethode wurde weiterhin im Falle keiner Maßnahmen-erforderlichen Abweichung der Mittelwert der beiden Durchläufe errechnet und für die statistischen Berechnungen weiterverwendet. Im Falle eines notwendig

gewordenen dritten Durchlaufs wurde bei den nunmehr 3 vorliegenden Werten das vom mittleren Wert am stärksten abweichende Ergebnis gestrichen und aus den verbleibenden zwei Werten ebenfalls der Mittelwert gebildet.

Die Daten der vollständig ausgefüllten Auswertebögen wurden anschließend in die Datenbank mit den klinisch-pathologischen Parametern der Patienten übertragen.

## II.10 ERHEBUNG DES POSTOPERATIVEN KRANKHEITS- VERLAUFS

Zur Darstellung der prognostischen Wertigkeit der verschiedenen Parameter wurde deren Expression in den Tumorzentren und den Tumorrändern (maligne Seite der Invasionsfront) dem individuellen Krankheitsverlauf des Patienten gegenübergestellt. Zur Erhebung dieses Verlaufs wurden verschiedene Quellen genutzt.

### II.10.1.1 IN HOUSE FOLLOW-UP

Durch das klinikintern verwendete Krankenhausinformationssystem i.s.h.med® (Cerner Corporation, North Kansas City, Missouri, USA) wurden die digitalen Patientenakten der eingeschlossenen Patienten eingesehen. Dabei wurden die jeweils nach dem Zeitpunkt der Prostatektomie stattgefundenen Besuche des Patienten gesichtet und die relevanten Daten des Krankheitsverlaufs erhoben. Im Falle einer vorliegenden Information, weniger als 6 Monate zum Zeitpunkt der Erhebung zurückliegend, wurde damit die Erhebung abgeschlossen, ansonsten wurde wie in den Punkten II.10.2. – II.10.3. beschrieben weiter verfahren.

### II.10.1.2 FAXABFRAGE BEI NIEDERGELASSENEN PRAXEN

In einem weiteren Schritt wurden die mit der Nachsorge der Patienten betrauten niedergelassenen Haus- oder Fachärzte per Fax zur Krankengeschichte der betreffenden Patienten befragt und der Status des betreffenden Patienten erhoben. Insbesondere das Auftreten eines biochemischen Rezidivs im Beobachtungszeitraum wurde erhoben.

### II.10.2 TELEFONISCHER PATIENTENKONTAKT

In einzelnen Fällen wurden die Patienten direkt telefonisch kontaktiert. Vorher wurde ihnen ein Informationsschreiben zugesandt, das den geplanten Anruf ankündigt und insbesondere die Freiwilligkeit der Studienteilnahme beschreibt. Die Eingangsfrage des Anrufs war dabei stets die Frage nach der Teilnahme zur Studie. Im direkten Gespräch wurde dann der Status des Krankheitsverlaufs erhoben.

#### II.10.2.1 ENDPUNKTE DER VERLAUFSDARSTELLUNGEN

Da im Kollektiv innerhalb des Beobachtungszeitraums nur sehr wenige Patienten (tumorabhängig) verstarben, wurde einzig das Auftreten eines biochemischen Rezidivs (BCR) als Event für die Kaplan-Meier Darstellungen und deren Berechnungen gewählt. Das Auftreten eines BCR wurde dabei nach internationalem Konsens als das mindestens zweimalige, konsekutive Messen eines PSA-Wertes von mindestens 0,2 ng/ml oder mehr nach erfolgter radikaler Prostatektomie festgelegt (Boccon-Gibod et al., 2004).

## II.11 STATISTISCHE AUSWERTUNG DER DATENBÄNKE

Die erfassten Daten wurden in Microsoft Excel 2016® (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, Vereinigte Staaten) tabellarisch zusammengetragen. Zur statistischen Auswertung der Daten wurde das folgende Programm verwendet: JMP 13.0® (SAS Inc., Cary, NC, USA).

Die Beschreibungen des Kollektivs und des allgemeinen Färbeverhaltens der Marker erfolgte deskriptiv. Die Expressionen der Färbungen wurden mittels Normal-Quantile-Plot auf eine Normalverteilung untersucht. In zweifelhaften Fällen wurde anschließend Shapiro-Wilks W Test zu Rate gezogen. Aufgrund der ordinalen Charakteristik des verwendeten Färbescorers sowie der Tatsache, dass sich in keinem Färbeergebnis eine Normalverteilung zeigte, wurden zur Hypothesentestung stets parameterfreie Tests verwendet. Als statistische Tests zur Korrelation der stetig dargestellten Expressionen in den verschiedenen Lokalisationen A-D kam der Rangsummen Test nach Wilcoxon/Kruskal-Wallis zum Einsatz, unter anschließender post-hoc Analyse mittels Wilcoxon Test für



jedes Paar. Das Signifikanzniveau wurde stets mittels Bonferroni-Korrektur auf multiples Testen angepasst, das initiale Signifikanzniveau lag stets bei  $p < 0,05$ .

Zur Betrachtung unterschiedlich differenzierter Gruppen wurden die stetigen Expressionsdaten sowie die Tumorcharakteristika „Staging“ und „Gleason-Summe“ nach dem jeweiligen Medianwert als Cut-off Grenze der Gruppencharakteristik dichotomisiert.

Die Gegenüberstellung der Ergebnisse mit den individuellen klinischen Daten erfolgte im Falle von dichotomisierten ordinalen Daten ebenfalls mittels des Wilcoxon/Kruskal-Wallis Rangsummen Tests und im Falle von stetigen Daten mittels Rangkorrelationskoeffizient (Spearman's  $\rho$ ).

Die grafische Aufarbeitung der Ergebnisse bei stetigen Werten der Ordinate und ordinalen bzw. nominalen Werteverteilungen der Abszisse erfolgte in Form von Säulendiagrammen. Hierbei wurde der Mittelwert der Expression des jeweiligen Proteinparameters als Säule dargestellt, als Streuungsmaß diente der Standardfehler des Mittelwertes (SEM).

Zur Darstellung von Zusammenhängen der jeweiligen Expressionen und dem Krankheitsverlauf wurden die Färbeergebnisse aller Gewebeentnahmeorte (Lokalisationen A, B, C und D) durch deren Medianwert dichotomisiert (in jeweils „schwache Expression“ und „starke Expression“) und nach der Kaplan-Meier Methode aufgetragen. Dies erfolgte dabei für den zeitlichen Endpunkt „Zeit bis Biochemisches Rezidiv“. Als Prüfung auf statistische Unterschiedlichkeit erfolgte jeweils die Dokumentation des Log-Rang Testes. Zudem erfolgten anschließende univariate Analysen mittels Cox Regression, sowie multivariate Analysen für jeden Parameter, um die Unabhängigkeit der Einflüsse der nicht-dichotomisierten Proteinexpressionen von anderen klinischen Parametern mit bekanntem Einfluss zu untersuchen und für jeden Einfluss eine Hazard Ratio (HR) zu berechnen (Cox, 1972). p-Werte wurden hier mittels des Effekt-Likelihood-Verhältnistests ermittelt.

## II.12 ZUSÄTZLICH VERWENDETE SOFTWARE

Außer den bereits genannten Programmen wurden weiterhin verwendet: EndNote 21<sup>®</sup> (Clarivate Analytics, Philadelphia, Vereinigte Staaten von Amerika & London, Vereinigtes Königreich) zur Verwaltung der Literatur. Zur Erstellung der Grafiken: ebenfalls JMP 13.0 sowie Microsoft PowerPoint 2021<sup>®</sup> (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, Vereinigte Staaten). Zur Textverarbeitung wurde Microsoft Word 2021<sup>®</sup> (Microsoft Corporation) eingesetzt.

### III ERGEBNISSE

#### III.1 PATIENTENKOLLEKTIV UND CHARAKTERISTIKA DER STUDIENPOPULATION

Grundlage der vorliegenden Arbeit bildeten die Prostatapräparate der 114 definitiv eingeschlossenen Patienten.

Das Durchschnittsalter der Patienten belief sich auf 64,2 Jahre (Median: 65 Jahre), wobei das Alter des ältesten Patienten zum Operationszeitpunkt 75 Jahre und das des jüngsten Patienten 50 Jahre betrug.

Gemäß postoperativer histopathologischer Aufarbeitung lag das T-Stadium im Bereich von T2a bis T3b (siehe Tabelle 4). Ein Lymphknotenbefall (N1) wurde bei 5 Patienten dokumentiert (pNx bei n=6 Patienten).

T-Stadium	Anzahl
T2a	12
T2b	6
T2c	59
T3a	17
T3b	20
T4	0
	n = 114

**Tabelle 4:** Darstellung der Verteilung des T-Stadiums der Patienten.

Der Gleason Score (GS) der Prostata nach OP verteilte sich wie in Tabelle 5 dargestellt.

Gleason Score (GS)	Anzahl
--------------------	--------

3	2
4	5
5	37
6	16
7	1
7a	30
7b	14
8	4
9	3
10	1
Nicht erfasst	1
	n = 114

**Tabelle 5:** Detaillierte Darstellung der Verteilung des Gleason Scores der Patienten.

Die präoperativ ermittelte PSA-Werte beliefen sich im Durchschnitt auf 10.3 (Median: 9.0) in einem Bereich von 0.1 bis 49.0 ng/ml (n = 106).

Bei lediglich 27 Patienten lag der Befund eines histologisch gesicherten mikroskopischen Residualtumors (R1) vor. Der Resektionsstatus konnte bei n=4 Patienten nicht endgültig abgeklärt werden.

Die Eigenschaften des Patientenkollektivs sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Anzahl der Patienten	n=114
Alter, Median (IQR)	65.0 (60.0-69.0)
PSA, Median (IQR)	9.0 (5.3-12.9)

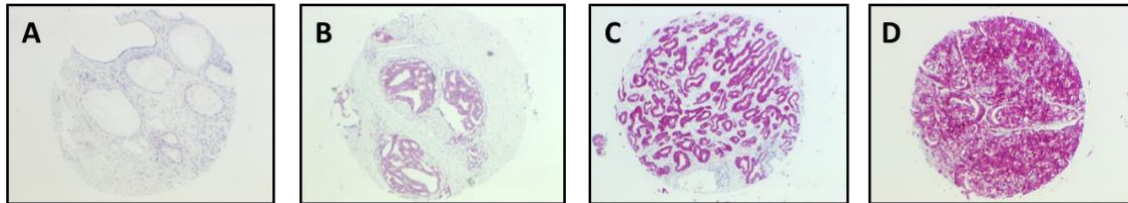
Lymphknotenmetastasen, n (%)	5 (4.3)
Bilaterale Verteilung, n (%) (Erhebungen, n)	92 (86,0) (106)
T Stadium, n (%)	
T2	77 (67.6)
T3a	17 (14.9)
T3b	20 (17.5)
Gleason Score, n (%)	
≤ 6	60 (53.1)
7	45 (39.8)
8-10	8 (7.1)
Perineurale Invasion, n (%) (Erhebungen, n)	33 (42.9) (77)
Positiver Schnittrand, n (%) (Erhebungen, n)	27 (24.5) (110)
IQR = interquartile range; PSA = Prostataspezifisches Antigen	

**Tabelle 6:** Zusammenfassende Darstellung der Eigenschaften des Patientenkollektivs.

### III.2 BESCHREIBUNG UND VERTEILUNGEN DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN FÄRBEERGEBNISSE

Für die immunhistochemischen Färbungen der TMAs, zeigten sich in Abhängigkeit des betrachteten Markers die im Folgenden dargestellten mikroskopisch sichtbaren Färbeergebnisse. Übersichtsbilder der Gewebedots am Beispiel von 4E-BP1 in Abbildung 11. Zu jeder Färbung wurde die Verteilung der Ergebnisse mittels Normal-Quantile-Plot auf eine Normalverteilung

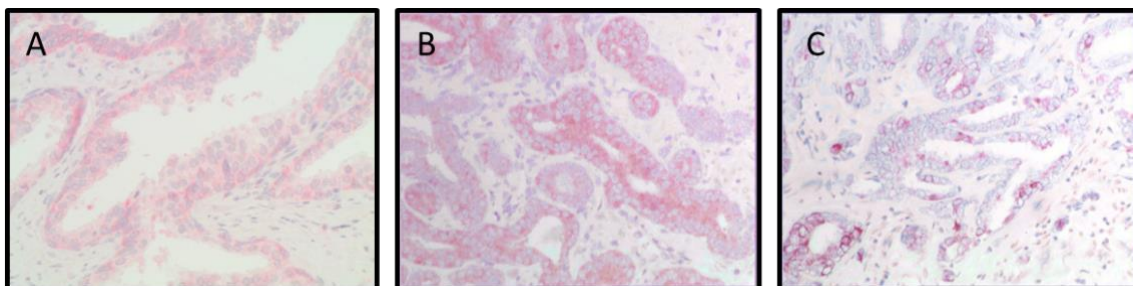
untersucht. Diese Untersuchungen zeigten stets deutlich eine abweichende Verteilung. Auf eine Testung mittels Shapiro-Wilks W Test wurde daher verzichtet.



**Abbildung 11 A-D:** Exemplarische Gewebedots aus 4E-BP Immunhistochemie, **A** Normales Prostatagewebe; **B-D** Prostatakarzinom-Gewebe unterschiedlich starker Expression.

### III.2.1.1 MIKROSKOPISCHES FÄRBEERGEBNIS FÜR MTOR

Bei mTOR stellte sich die Färbung der Gewebedots meist so homogen dar, dass eine vorherrschende Expressionsstärke angegeben werden konnte. Bei sehr geringen Expressionen waren teilweise nur einzelne Zellen angefärbt. Die Lokalisation zeigte sich ausschließlich zytoplasmatisch (**Abbildung 12**).

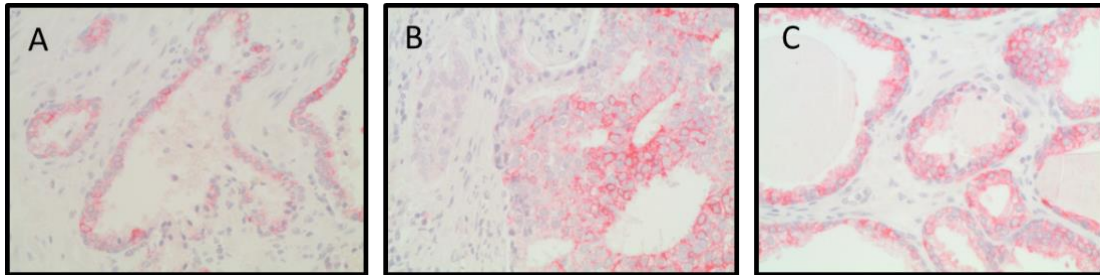


**Abbildung 12 A-C:** Exemplarische Darstellung des mikroskopischen Bildes der immunhistochemischen Färbung auf mTOR. **A** Normales Prostatagewebe; **B** Prostatakarzinom mit starker Expression; **C**, Prostatakarzinom mit schwacher Expression. 40x Vergrößerung.

In sehr seltenen Fällen war auch eine geringe Färbung des Kerns festzustellen. In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch lediglich das zytoplasmatisch lokalisierte mTOR beurteilt. Der Färbescore aller betrachteten Gewebedots betrug im Median 8.0 mit einer IQR von 4.0-12.0, Mittelwert 7.63 SEM 0,2, Range 0-12 (n = 364).

### III.2.1.2

### MIKROSKOPISCHES FÄRBEERGEBNIS FÜR P-MTOR



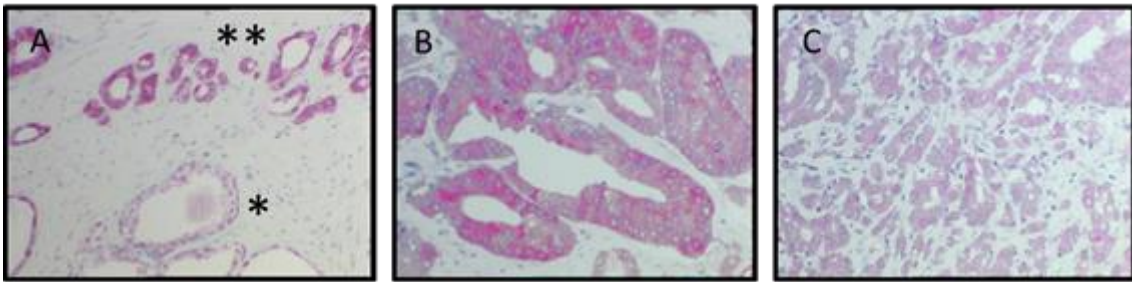
**Abbildung 13 A-C:** Exemplarische Darstellung des mikroskopischen Bildes der immunhistochemischen Färbung auf p-mTOR. **A** Normales Prostatagewebe; **B** Prostatakarzinom mit starker Expression; **C**, Prostatakarzinom mit schwacher Expression. 40x Vergrößerung.

Die immunhistochemische Expression von p-mTOR war stets sehr homogen über den gesamten Dot verteilt. Bei der Beurteilung zeigte sich eine durchweg zytoplasmatische Rotfärbung (**Abbildung 13**). Der Färbescore aller betrachteten Gewebedots betrug im Median 5,5 mit einer IQR von 2.0-8.0, Mittelwert 5,44, SEM 0,2 (n = 380).

### III.2.1.3

### MIKROSKOPISCHES FÄRBEERGEBNIS FÜR 4E-BP1

Auch die Färbung von 4E-BP1 verteilte sich sehr homogen über das Prostatagewebe. Neben einer deutlichen, intensiven Anfärbung des Zytoplasmas konnte man vereinzelt auch eine sehr geringe Anfärbung des Kerns feststellen, die jedoch in dieser Beurteilung nicht weiter berücksichtigt wurde. Der Färbescore aller betrachteten Gewebedots betrug im Median 4.0 mit einer IQR von 2.0-8.0, Mittelwert 5,4, SEM 0,2 (n=370). Bereits in der ersten Sichtung der Präparate fiel der augenscheinliche Unterschied zwischen Normalgewebe der Prostata und Prostatakarzinom auf (**Abbildung 14A**).



**Abbildung 14 A-C:** Exemplarische Darstellung des mikroskopischen Bildes der immunhistochemischen Färbung auf 4E-BP1. **A** Normales Prostatagewebe (\*); angrenzend an Prostatakarzinom-Gewebe (\*\*); **B** Prostatakarzinom mit starker Expression; **C**, Prostatakarzinom mit schwacher Expression. **A,C** 40x Vergrößerung, **B** 100x Vergrößerung.

### III.3 ERGEBNISSE HINSICHTLICH DER LOKALISATIONEN GEGENÜBER DER INVASIONSFRONT VOR DEM HINTERGRUND INTRAPROSTATISCHER TUMORHETEROGENITÄT

Bei vergleichender Betrachtung des Färbeverhaltens von Tumor- und angrenzendem Normalgewebe wurden die Tumorzentren jedes einzelnen Areals mit Randbereichen des Tumors, unmittelbar angrenzendem Normalgewebe und weit entferntem benignen Gewebe der Prostata verglichen. Damit wurde eine gedachte Sequenz Tumorzentrum, maligne Tumordinvasionsfront, benigne Tumordinvasionsfront und ‚am weitesten entfernter benigner Ort‘ als Lauflinie der argumentativen Betrachtung geschaffen.

	Gewebeentnahmeort				
Parameter	A	B	C	D	p-Wert zwischen allen Gruppen (Rangsummentest)

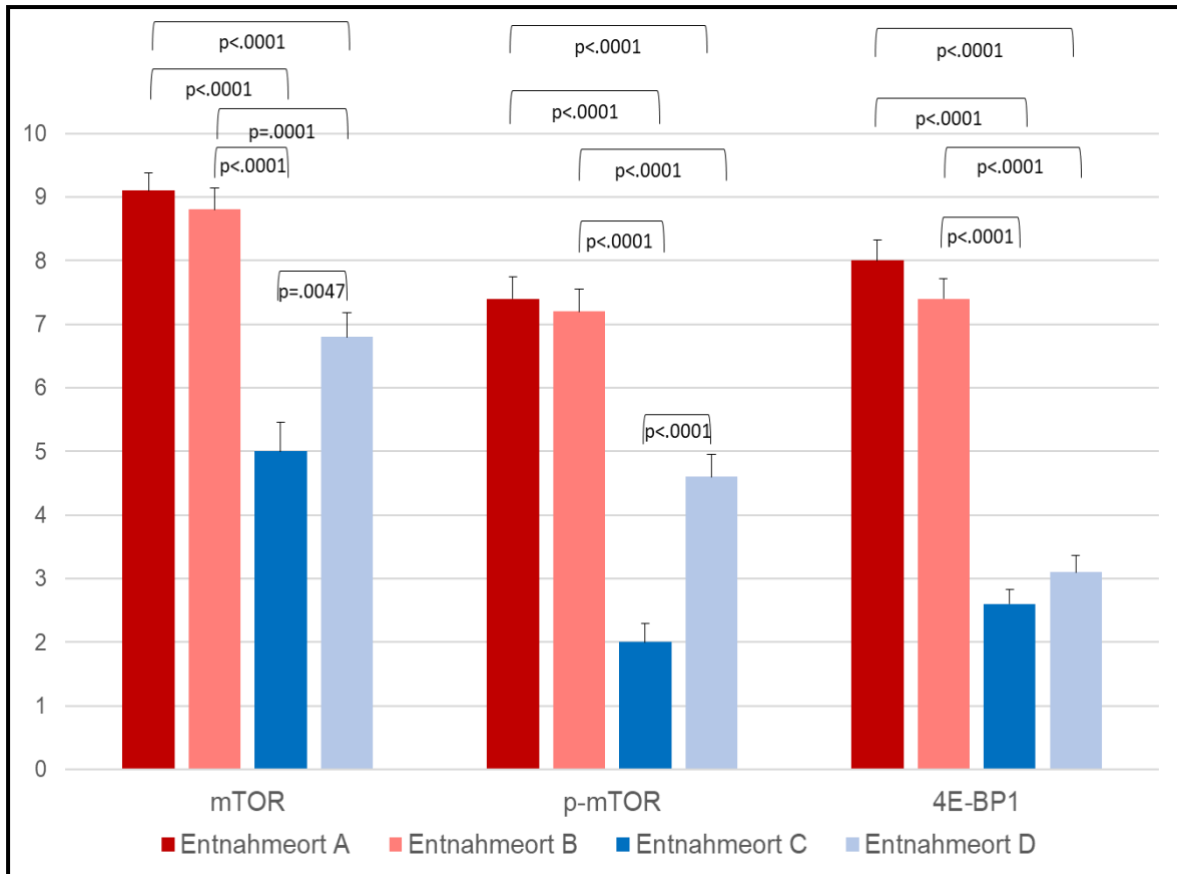


mTOR, Mittel ( $\pm$ StD)	9.13 (2.86)	8.79 (3.34)	4.98 (3.78)	6.80 (3.72)	<0.01
p-mTOR, Mittel ( $\pm$ StD)	7.38 (3.47)	7.16 (3.55)	1.98 (2.65)	4.63 (3.52)	<0.01
4E-BP1, Mittel ( $\pm$ StD)	7.95 (3.29)	7.36 (3.16)	2.57 (1.99)	3.10 (2.63)	<0.01
StD: Standard Deviation (Standardabweichung)					

**Tabelle 7 A-D:** Expression von mTOR, p-mTOR und 4E-BP1 in den Lokalisationen **A** aus dem Tumorzentrum des Haupttumors; **B** aus dem histologisch malignen Bereich der Invasionsfront; **C** aus dem histologisch benignen Bereich der Invasionsfront; **D** aus am weitesten von allen Tumorealen entferntem benignem Gewebe. P-Werte wurden mittels Wilcoxon/Kruskal-Wallis Rangsummen Test ermittelt.

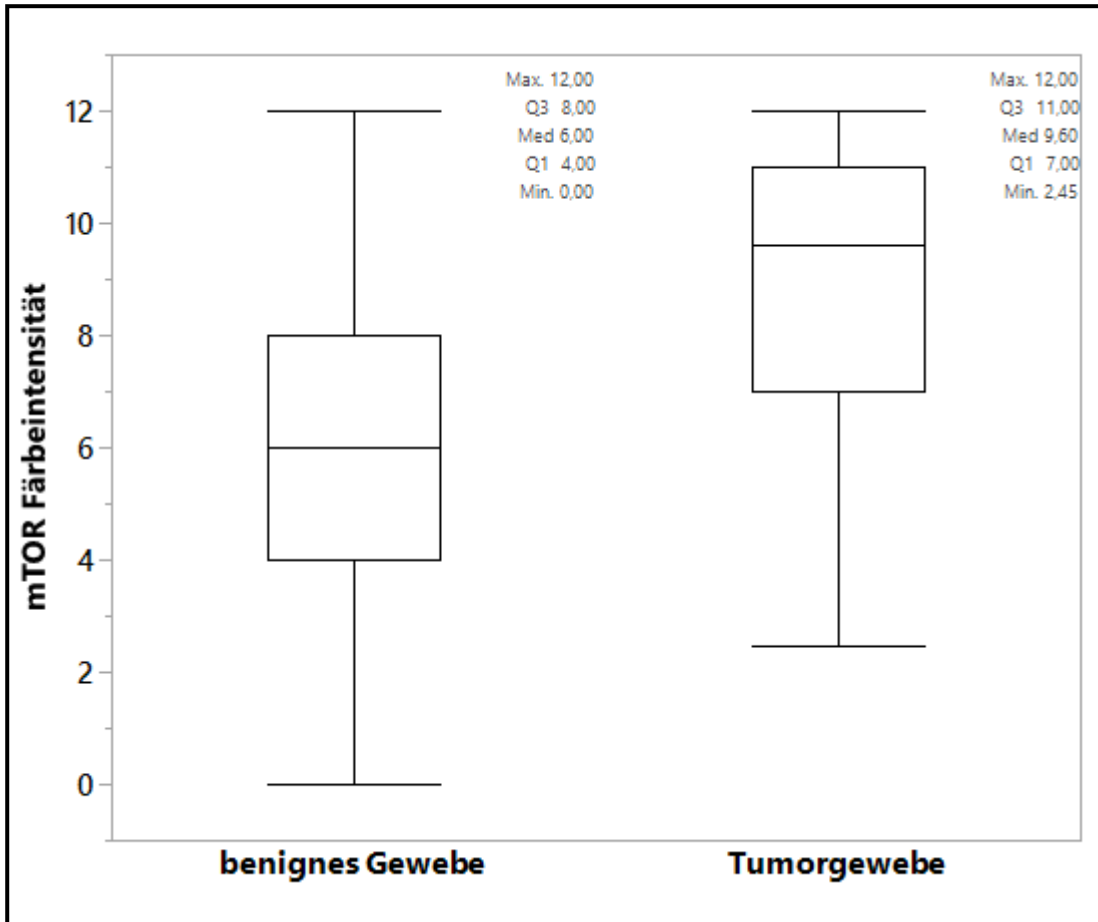
Es zeigten sich die in Tabelle 7 und Abbildung 15 dargestellten Ergebnisse. Deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Lokalisationen ergaben für alle 3 Marker einen signifikanten allgemeinen Unterschied (Rangsummen Test nach Wilcoxon). Mittels des nachgeschalteten Tests konnten noch die in Abbildung 17 dargestellten Unterschiede zwischen den entsprechenden Paaren gefunden werden. In diesen multiplen Vergleichen zwischen den Gruppen fanden sich signifikante Differenzen zwischen allen Gruppen ( $p < 0.0001$ ) mit Ausnahme von A vs. B in allen 3 Markern und im Vergleich von 4E-BP1 aus den Orten C und D (**Abbildung 15**).

Alle Parameter, am deutlichsten 4E-BP1, zeigten sich wesentlich geringer im Normalgewebe der Prostata als im Tumorgewebe des Prostatakarzinoms exprimiert. Dabei fiel weiterhin auf, dass unmittelbar angrenzende Normalgewebe sogar noch geringere Expression aufwiesen, als Entferntere.



**Abbildung 15:** Expressionsverhalten der Marker mTOR, p-mTOR und 4E-BP1 in Abhängigkeit der Lokalisation des Gewebes innerhalb der Prostata in Abhängigkeit der Invasionsfront des Prostatakarzinoms, Entnahmeorte A-D gemäß Darstellung im Methodenteil und Tabelle 7, als oberes Streumaß dient der SEM, post-hoc Vergleich der Gruppen mittels Wilcoxon Test für jedes Paar. Nach Bonferroni korrigiertes  $\alpha$  Level:  $p \approx 0.0083$ , signifikante Ergebnisse eingetragen.

Nach Zusammenfassung der Gewebe gleicher Dignität (Entnahmeorte A mit B, sowie C mit D) und Mittelwertbildung ergaben sich im Vergleich zu benignem Gewebe signifikant höhere Färbeintensitäten für mTOR im Tumorgewebe (Mediane: 6.0; 9.6;  $p < 0.0001$ ) (**Abbildung 16**).



**Abbildung 16:** Färbeintensität von mTOR in benignem und in malignem Prostatagewebe nach Zusammenfassung der Entnahmeorte A mit B und C mit D zu den Gruppen "Tumorgewebe" bzw. „benignes Gewebe“.  $p < 0.0001$ .

Für die gleich gruppierte Untersuchung bezüglich p-mTOR und 4E-BP1 zeigt sich derselbe Sachverhalt: beide Parameter weisen im Tumorgewebe eine signifikant stärkere Färbeintensität auf (**Tabelle 8**).

	benignes Gewebe	Tumorgewebe	p-Wert
mTOR, Mittel ( $\pm$ StD)	5.75 (2.74)	8.95 (2.61)	$< 0.0001$
p-mTOR, Mittel ( $\pm$ StD)	3.22 (2.25)	7.26 (3.11)	$< 0.0001$

4E-BP1, Mittel ( $\pm$ StD)	2.99 (1.82)	7.65 (2.80)	< 0.0001
-----------------------------	-------------	-------------	----------

**Tabelle 8:** Mittlere Färbeintensität von mTOR, p-mTOR und 4E-BP1 in benignem und malignem Gewebe der Prostata. p-Werte wurden mittels Wilcoxon/Kruskal-Wallis Rangsummen Test ermittelt.

Zur Ermittlung eventueller Korrelationen zwischen den Expressionscharakteristika wurde der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman für alle Parameterpaare in den Gewebegruppen „Tumorgewebe“ und „benignes Gewebe“ ermittelt (**Tabelle 9**). Es zeigten sich statistisch signifikante positive Korrelationen zwischen 4E-BP1 und mTOR sowohl in benignem wie auch in malignem Gewebe. Weiterhin zeigte sich eine signifikante positive Korrelation zwischen der Expression von mTOR und p-mTOR in benignem Gewebe. Für die übrigen Parameterpaare konnte statistisch nichts nachgewiesen werden. Es könnte daher eine Korrelation bestehen, dies muss jedoch nicht der Fall sein. Ebenso wurde die statistische Korrelation der Expression für Parameter in benignem und malignem Gewebe ermittelt. Es zeigte sich eine statistisch signifikante positive Korrelation zwischen der Expression von p-mTOR in benignem und malignem Gewebe (**Tabelle 10**).

Protein	mTOR, $\rho$ (p)		p-mTOR, $\rho$ (p)		4E-BP1, $\rho$ (p)	
	A&B	C&D	A&B	C&D	A&B	C&D
mTOR	-	-	0.1819 (0.0746)	0.3545 ( <b>0.0092*</b> )	0.2069 ( <b>0.0454*</b> )	0.4357 ( <b>0.0010*</b> )
p-mTOR	0.1819 (0.0746)	0.3545 ( <b>0.0092*</b> )	-	-	0.1521 (0.1391)	0.1074 (0.3905)
4E-BP1	0.2069 ( <b>0.0454*</b> )	0.4357 ( <b>0.0010*</b> )	0.1521 (0.1391)	0.1074 (0.3905)	-	-

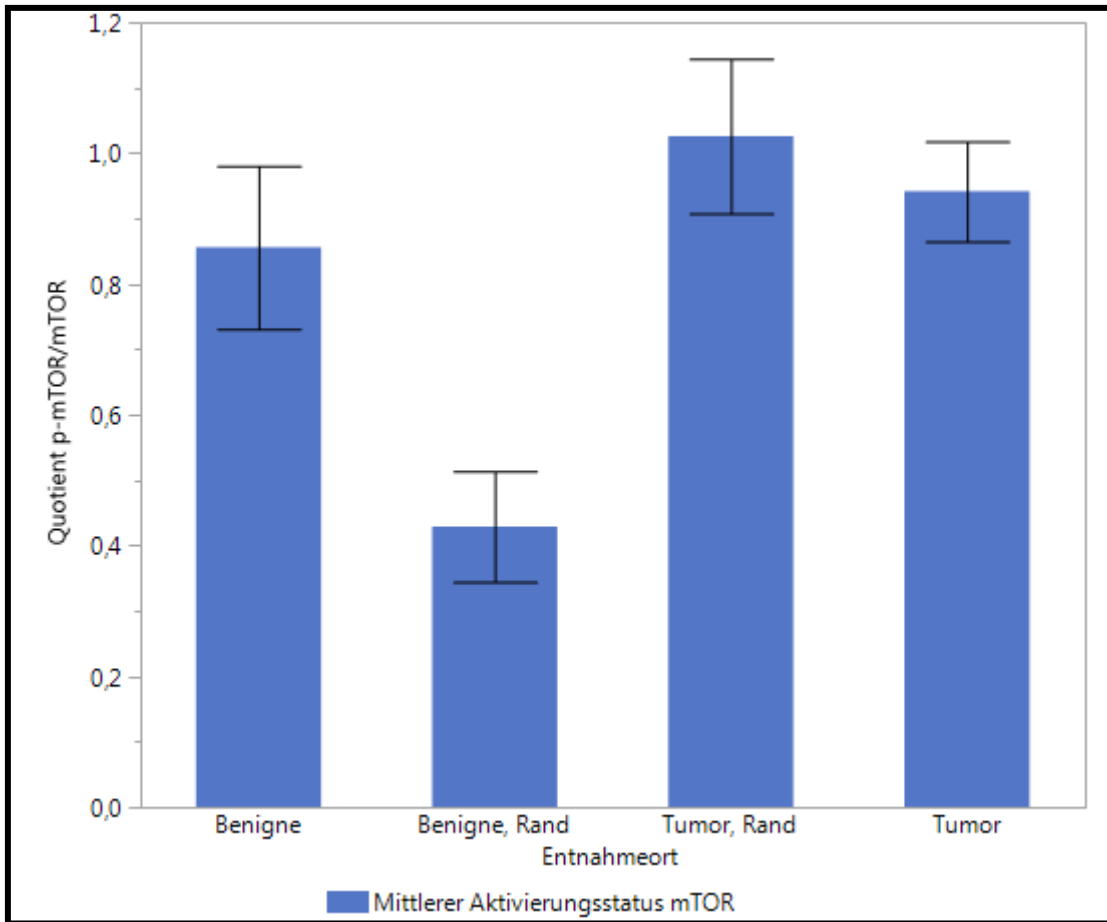
**Tabelle 9:** Spearmans Rangkorrelationskoeffizient (Spearmans  $\rho$ ) für alle Parameterpaare in den Gewebegruppen A&B („Tumorgewebe“) und C&D („benignes Gewebe“). Statistisch signifikante Ergebnisse mit \* markiert.

Protein, Dignität	Protein, Dignität	Spearmans $\rho$	p
mTOR, benigne Gewebe	mTOR, maligne Gewebe	0,0567	0,6562
p-mTOR, benigne Gewebe	p-mTOR, maligne Gewebe	0,3277	<b>0,0034*</b>
p-mTOR/mTOR, benigne Gewebe	p-mTOR/mTOR, maligne Gewebe	0,0513	0,7262
4E-BP1, benigne Gewebe	4E-BP1, maligne Gewebe	0,2052	0,0907

**Tabelle 10:** Spearmans Rangkorrelationskoeffizient (Spearmans  $\rho$ ) zwischen allen benignen und malignen Geweben für alle untersuchten Parameter. Statistisch signifikante Ergebnisse mit \* markiert.

### III.3.1.1 DARSTELLUNG DES AKTIVIERUNGSSTATUS VON MTOR

Um eine Aussage über den Aktivierungsstatus von mTOR zu treffen, wurde der Quotient von p-mTOR zu mTOR gebildet. Dieser gibt Auskunft über den Anteil von aktivem, phosphoryliertem mTOR. Der monoklonale mTOR-Antikörper (7C10, #2983, Cell Signaling, Beverly, MA, USA) erkennt sowohl unphosphoryliertes als auch phosphoryliertes mTOR, wohingegen der gewählte phospho-mTOR-Antikörper lediglich das phosphorylierte mTOR anzeigt (Ser2448; 49F9, #2976, Cell Signaling, Beverly, MA, USA) (Schanz, 2015).



**Abbildung 17:** Darstellung des mittleren Aktivierungsstatus von mTOR, ermittelt durch Quotientenbildung von p-mTOR / mTOR, in den verschiedenen Entnahmeorten. Fehlerbalken entsprechend dem SEM.

Die Ergebnisse zeigen, dass insbesondere der Aktivierungsstatus von mTOR in benignem, an Tumor angrenzendem Gewebe signifikant geringer ist, als der Aktivierungsstatus im malignen Tumorrand (Abbildung 17, Medianwerte: 0.25, 0,833,  $p < 0.0001^*$ ). Weiterhin unterscheidet sich der Aktivierungsstatus im an Tumoren angrenzenden benignen Gewebe signifikant von dem im Tumorzentrum (0.25, 0.804,  $p < 0.0001^*$ ), sowie von dem im benignen Gewebe (0.25, 0.666,  $p = 0.0007^*$ ). Bei den restlichen Vergleichen zeigte sich unter einem Bonferroni korrigierten  $\alpha$  Level ( $< 0.0083$ ) kein statistisch signifikanter Unterschied.

Bei Zusammenfassung der Entnahmeorte A und B zur Gruppe „Tumorgewebe“, sowie C und D zur Gruppe „benigne Gewebe“ ergab sich weiterhin ein signifikant

höherer Quotient p-mTOR/mTOR in den Tumorgeweben (Mittelwert (Median): 0.92 (0.83), 0.71 (0.5); p-Wert: 0.0009).

### III.4 EXPRESSIONSCHARAKTERISTIKA IN BEZUG AUF KLINISCH-PATHOLOGISCHE PARAMETER

Für die Korrelation der Expressionsdaten mit den patientenindividuellen Eigenschaften wurden individuelle Expressionsergebnisse aus der Lokalisation A mit dem histologischen Gleason Score, unterteilt in „Low Gleason“ entsprechend <7a nach Definition im Methodenteil, und „High Gleason Score“ genauso wie mit dem T-Stadium des Patienten, wiederum unterteilt in „<3a“ und „≥3a“ verglichen.

#### III.4.1.1 EXPRESSION IN ABHÄNGIGKEIT DES GLEASON SCORES

Es wurden die jeweiligen Färbeergebnisse eines Parameters und Entnahmeortes aus Low Gleason Geweben mit den entsprechenden Färbeergebnissen aus High Gleason Prostatakarzinomgewebe auf signifikant unterschiedliche Expressionsstärken mittels des Kruskal-Wallis Rangsummentests überprüft (**Tabelle 11**). Dabei zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Low und High Gleason Gewebe.

Parameter	Mittelwert Low Gleason (Median)	Mittelwert High Gleason (Median)	P-Wert
mTOR Tumor	8,867 (9,25)	9,298 (10)	0,4861
mTOR Tumorrand	8,573 (8)	8,879 (10)	0,4214
p-mTOR Tumor	7,596 (8)	7,160 (8)	0,6084
p-mTOR Tumorrand	7,330 (8)	6,963 (8)	0,8074

mTOR Phosphorylierung Tumor	0,999 (1)	0,896 (0,666)	0,1798
mTOR Phosphorylierung Tumorrand	1,134 (0,833)	0,927 (0,896)	0,4094
4EB-Protein Tumor	8,076 (8)	7,732 (8)	0,6473
4EB-Protein Tumorrand	7,694 (8)	6,939 (8)	0,2401

**Tabelle 11:** Gegenüberstellung der Proteinexpression in Low Gleason und High Gleason Gewebe, gruppiert nach Entnahmeort. Ermittlung des p-Werts mittels Rangsummentest unter Verwendung der Chi-Quadrat-Approximation. Korrigiertes  $\alpha$  Level: 0.00625.

#### III.4.1.2 EXPRESSION IN ABHÄNGIGKEIT DES T-STADIUMS

Es wurden erneut die Färbeergebnisse eines Parameters und Entnahmeortes aus Karzinomgeweben mit niedrigerem T-Stadium (niedriger als T3a) mit den entsprechenden Färbeergebnissen aus Geweben mit höherem T-Stadium (T3a oder darüber) auf signifikant unterschiedliche Expressionsstärken mittels des Kruskal-Wallis Rangsummentests überprüft (**Tabelle 12**). Es zeigten sich in keiner Lokalisation signifikante Differenzen für mTOR. Auffallend präsentierte sich jedoch die Expression der anderen Marker, insbesondere im Tumorrand, in welchem stets eine vermeintlich signifikant schwächere Färbung im Gewebe aus Prostata mit niedrigerem T-Stadium beobachtet werden konnte. Unter Beachtung eines Bonferroni-korrigierten  $\alpha$  Level von 0.00625 mussten diese scheinbar signifikanten Unterschiede jedoch zurückgestellt werden. Nach Zusammenfassung und Mittelwertbildung der Färbeergebnisse aus den Entnahmeorten „Tumorzentrum“ und „Tumorrand“ zur Gewebegruppe „Tumor“ zeigte sich ohne Korrektur nach Bonferroni, dass im untersuchten Gewebe von Prostata mit T-Stadium  $\geq$  T3a signifikant weniger phosphoryliertes mTOR als in Karzinomgewebe aus Prostata mit niedrigerem T-Stadium nachgewiesen werden konnte ( $p = 0,0151$ ).



Parameter	T-Stadium $\leq$ T2c, Mittelwert (Median)	T-Stadium $\geq$ T3a Mittelwert (Median)	P-Wert
mTOR Tumorzentrum	9,309 (10)	8,679 (8)	0,3327
mTOR Tumorrand	8,928 (8)	8,384 (8,5)	0,6241
mTOR Tumor	9,123 (9,6)	8,480 (8,5)	0,2480
p-mTOR Tumorzentrum	7,947 (8)	6,272 (6)	<b>0,0410</b>
p-mTOR Tumorrand	7,852 (8)	5,824 (6)	<b>0,0145</b>
p-mTOR Tumor	7,868 (8)	6,077 (6,1)	<b>0,0151*</b>
p-mTOR / mTOR, Tumorzentrum	0,968 (0,833)	0,904 (0,6)	0,0777
p-mTOR / mTOR, Tumorrand	1,096 (1)	0,896 (0,7)	<b>0,0387</b>
p-mTOR / mTOR, Tumor	0,966 (0,8)	0,834 (0,7)	0,1097
4E-BP1, Tumorzentrum	8,018 (8)	7,681 (8)	0,7513
4E-BP1, Tumorrand	7,819 (8)	6,339 (6)	<b>0,0281</b>
4E-BP1, Tumor	7,95 (8)	6,89 (7)	0,0844

**Tabelle 12:** Gegenüberstellung der Proteinexpression in Gruppe 1 (T-Stadium < T3a) und Gruppe 2 (T-Stadium  $\geq$  T3a) nach Entnahmeort unterschieden. Korrigiertes  $\alpha$  Level für die Vergleiche in „Tumorzentrum“ und „Tumorrand“: 0.00625.

### III.5 EXPRESSION DER MARKER HINSICHTLICH IHRER BEDEUTUNG FÜR PROGNOTISCHE AUSSAGEN ZUM KRANKHEITSVERLAUF

Durch Parallelisierungen mit dem Krankheitsverlauf sollten prognostisch relevante Eigenschaften der Marker determiniert werden. Aufgrund der Ergebnisse aus III.3. (unterschiedliche Expressionen in Lokalisationen A-D) wurden schwerpunktmäßig die Gewebeproben der Tumorzentren (Entnahmeorte A) sowie die Proben aus den Invasionsfronten (Entnahmeorte B) getrennt analysiert. Die Analysen fanden jeweils gesondert für beide Probengruppen statt. Als Zielereignis ist stets das Eintreten eines biochemischen Rezidivs betrachtet worden.

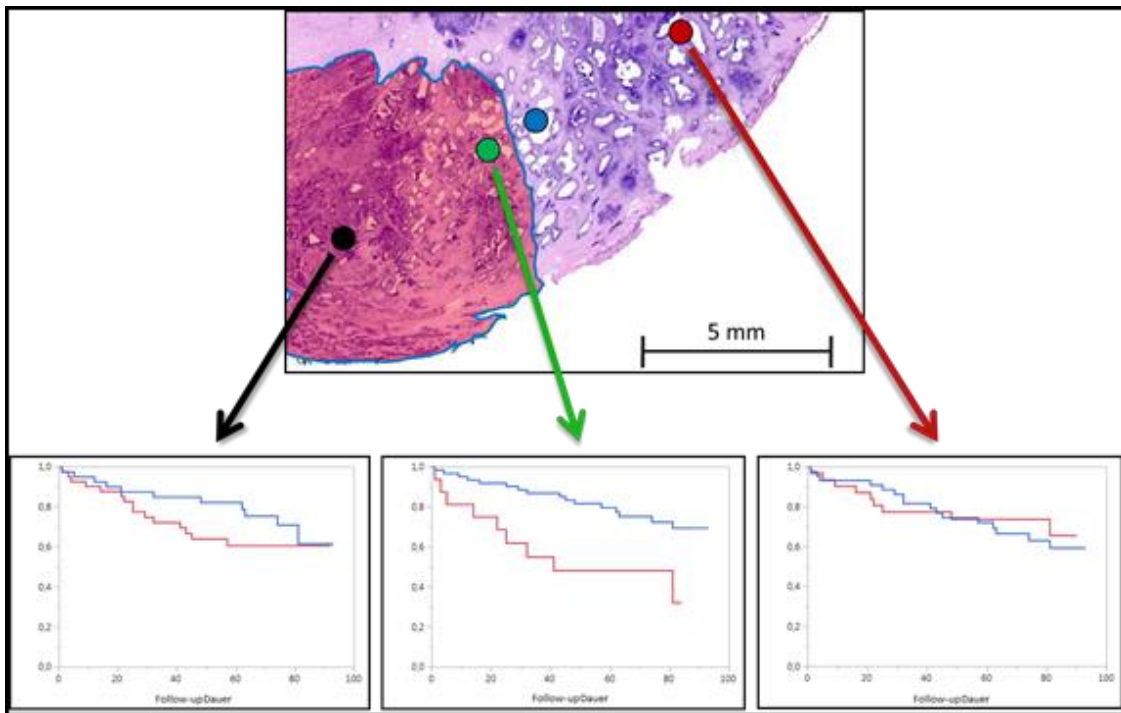
Gemäß Methodenteil wurden die Expressionen am Medianwert dichotomisiert und dann in „unter Median“ = „schwache Expression“ und „Median oder mehr“ = „Starke Expression“ unterteilt. Zur Prüfung der Unabhängigkeit wurden mittels Cox Regression die bekannten Einflussgrößen Gleason Score, R-Status und T-Stadium als Vergleichsparameter herangezogen.

#### III.5.1.1 DIE BEDEUTUNG VON mTOR FÜR DEN KRANKHEITSVERLAUF

Bei der getrennten Betrachtung der Lokalisationen A, B und D zeigte sich lediglich für B (Tumorrand) bei Patienten mit schwacher Expression von mTOR ein signifikant früheres Eintreten eines biochemischen Rezidivs ( $p=0.0034^*$ ). (**Tabelle 13** und **Abbildung 20**).

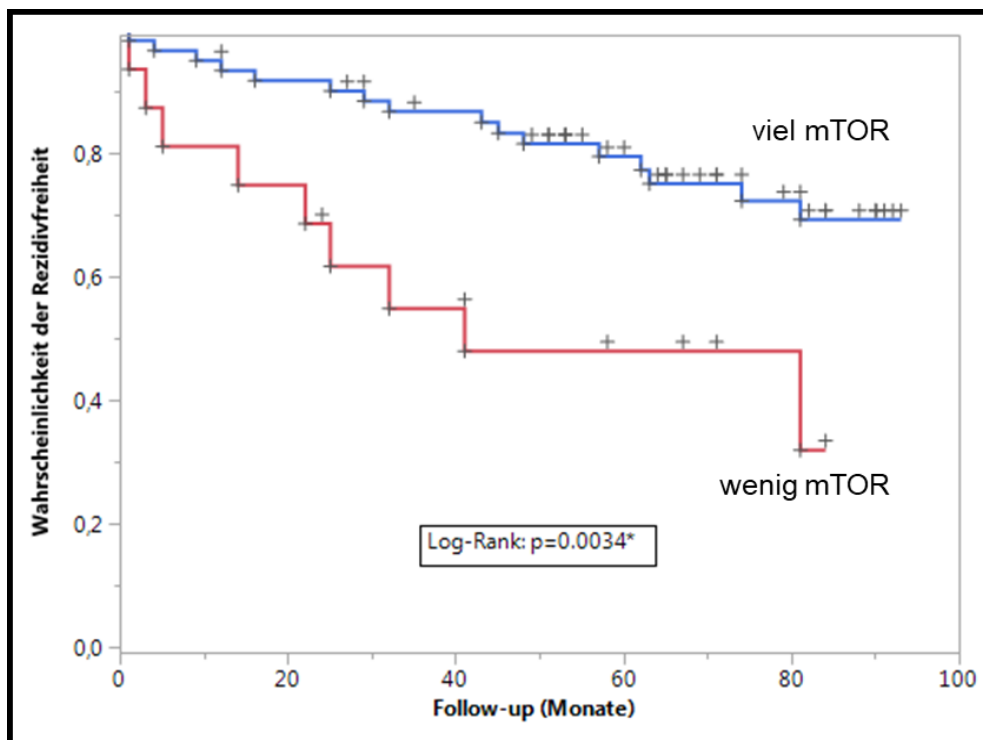
Entnahmeort	Tumorzentrum	Tumorrand	Benigner Rand	Tumorferrn
Log-Rank p-Wert	0.3504	<b>0.0034*</b>	0.7975	0.8161

**Tabelle 13:** Log-Rank Testung zwischen den Überlebenskurven für hohe bzw. niedrige Expression von mTOR im jeweiligen Entnahmeort.



**Abbildung18:** Darstellung des Zusammenhangs zwischen Expression von mTOR (rot entspricht Expression unter Median, blau entspricht Expression über und gleich dem Median) im jeweiligen Probenentnahmeort (Tumorzentrum, Tumorrand, tumorfern) und dem Eintreten eines biochemischen Rezidivs nach Prostatektomie. Kaplan-Meier-Kurven: Wahrscheinlichkeit kein Rezidiv zu erleiden (y-Achse) gegen Follow-up Dauer (x-Achse) in Monaten.

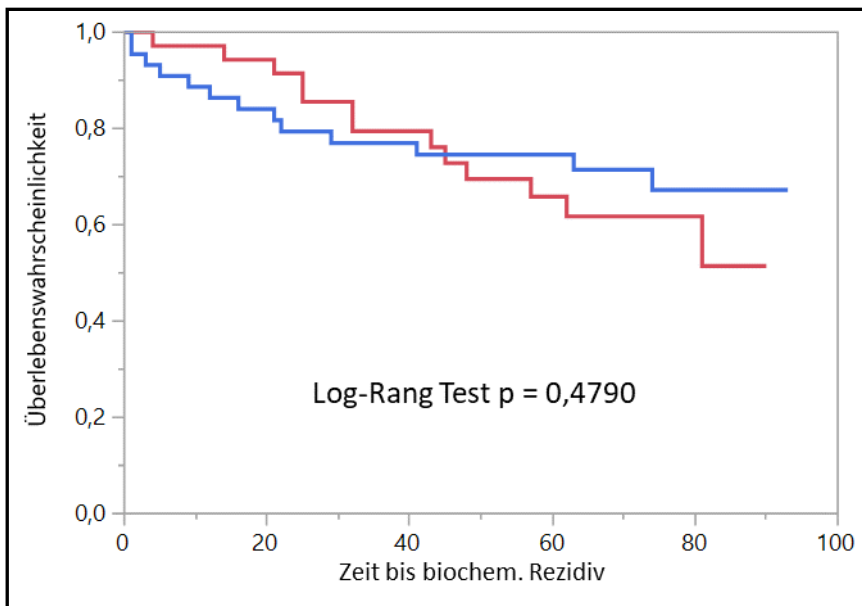
Abbildung 19 zeigt den detaillierten Zusammenhang von mTOR Expression und Zeit bis zum Eintreten eines biochemischen Rezidivs.



**Abbildung19:** Darstellung des Zusammenhangs zwischen schwacher (rot) und starker (blau) Expression von mTOR in Lokalisation B (Tumorrand) und der Zeit bis zum Eintreten eines biochemischen Rezidivs nach Prostatektomie. Kaplan-Meier-Kurve. Zensuren und Events = +.

Nach Zusammenfassen der Lokalisationen A und B zur Gruppe „Tumorgewebe“ und C und D zur Gruppe „Benigne Gewebe“ zeigte sich ein signifikant früheres Eintreten eines biochemischen Rezidivs bei submedianer Expression von mTOR in den Tumorproben unter Verwendung des Wilcoxon-Testverfahrens ( $p = 0.0279$ ), nicht jedoch nach Log-Rang Testung ( $p = 0.0929$ ). Bei derselben Betrachtung in der Gruppe „Benigne Gewebe“ konnte statistisch nichts nachgewiesen werden (Wilcoxon:  $p = 0.2581$ ; Log-Rang:  $p = 0.3969$ ).

Die Darstellung und auch die Berechnung eines potenziellen Zusammenhangs zwischen p-mTOR und dem Eintreten eines biochemischen Rezidivs zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied ( $p=0.4790$ , **Tabelle 14** und **Abbildung 20** exemplarisch für Lokalisation A). Aufgrund eines Medianwertes von 0,0 im benignen Randgewebe des Tumors konnte hier keine Analyse vollzogen werden. Eine zusätzliche Dichotomisierung nach gerundetem Mittelwert (2,0) zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen beiden Patientengruppen (Log-Rang Test  $p=0,6056$ ).



**Abbildung 20:** Darstellung des Zusammenhangs zwischen schwacher (rot) und starker (blau) Expression von p-mTOR in Lokalisation A (Tumorzentrum) und der Zeit bis zum Eintreten eines biochemischen Rezidivs nach Prostatektomie. Kaplan-Meier-Kurve.

Entnahmeort	Tumorzentrum	Tumorrand	Benigner Rand	Tumorferrn
Log-Rank p-Wert	0.4790	0.2329	-	0.7184

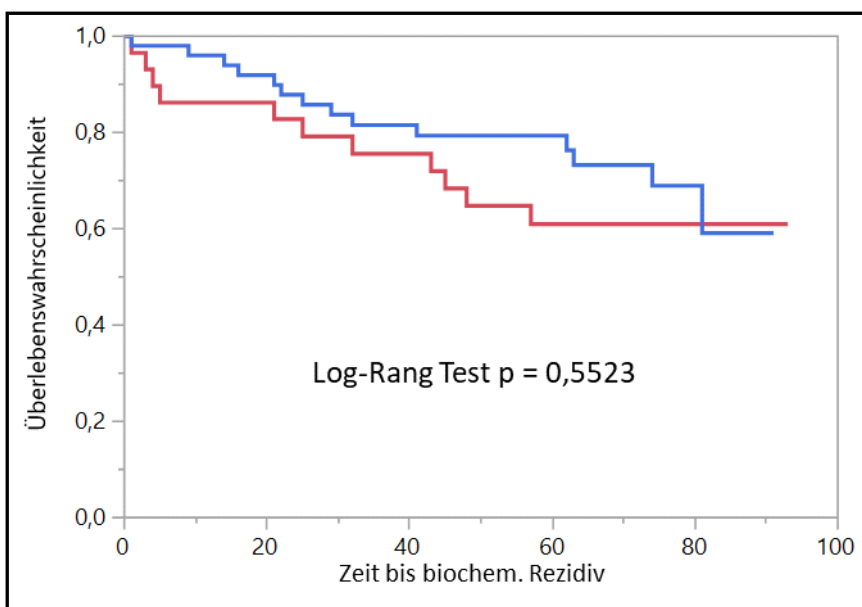
**Tabelle 14:** Log-Rank Testung zwischen den Überlebenskurven für hohe bzw. niedrige Expression von p-mTOR im jeweiligen Entnahmeort. Im benignen Rand lag der Medianwert der Expression bei 0, weshalb nicht zwischen Über- bzw.

Unterepression unterschieden wurde. Keine Auswertung für benignen Rand möglich.

Nach Zusammenfassen der Lokalisationen A und B zur Gruppe „Tumorgewebe“ und C und D zur Gruppe „Benigne Gewebe“ zeigte sich weder in der ersten (Log-Rang:  $p = 0.1026$ ), noch der zweiten Gruppe (Log-Rang:  $p = 0.2477$ ) ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen einer p-mTOR Expression über bzw. unter Medianwert und der Wahrscheinlichkeit, ein biochemisches Rezidiv zu erfahren.

### III.5.1.3 DIE BEDEUTUNG VON 4E-BP1 FÜR DEN KRANKHEITS-VERLAUF

Auch für 4E-BP1 zeigt sich für Patienten mit schwacher Expression in deren Tumorzentren eine Tendenz zum früheren Eintreten eines biochemischen Rezidivs. Obwohl das grafische Ergebnis der Kaplan-Meier Darstellung einen Unterschied vermuten lässt, ist mit  $p=0.5523$  dieser Sachverhalt aber nicht statistisch signifikant nach Definition (**Tabelle 15** und **Abbildung 21** exemplarisch für Lokalisation A).



**Abbildung 21:** Darstellung des Zusammenhangs zwischen schwacher (rot) und starker (blau) Expression von 4E-BP1 in Lokalisation A (Tumorzentrum) und der

Zeit bis zum Eintreten eines biochemischen Rezidivs nach Prostatektomie.  
Kaplan-Meier-Kurve.

Entnahmeort	Tumorzentrum	Tumorrand	Benigner Rand	Tumorferrn
Log-Rank p-Wert	0.5523	0.6494	0.4463	0.6228

**Tabelle 15:** Log-Rank Testung zwischen den Überlebenskurven für hohe bzw. niedrige Expression von 4E-BP1 im jeweiligen Entnahmeort.

Nach Zusammenfassen der Lokalisationen A und B zur Gruppe „Tumorgewebe“ und C und D zur Gruppe „Benigne Gewebe“ zeigte sich in keiner der beiden Gruppen ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen einer Expression von 4E-BP1 unter bzw. über Medianwert und der Wahrscheinlichkeit, ein biochemisches Rezidiv zu erfahren (Log-Rang Testung, Gruppe „Tumorgewebe“:  $p = 0.9863$ ; Gruppe „Benigne Gewebe“:  $p = 0.4943$ ).

#### III.5.1.4 DIE BEDEUTUNG DES P-MTOR/MTOR QUOTIENTEN FÜR DEN KRANKHEITSVERLAUF

Für einen Quotienten von p-mTOR zu mTOR über bzw. unter Medianwert zeigt sich kein signifikanter Unterschied in den Überlebenskurven der beiden Gruppen (**Tabelle 16**).

Entnahmeort	Tumorzentrum	Tumorrand	Benigner Rand	Tumorferrn
Log-Rank p-Wert	0,9729	0,9898	0,7365	0,5811

**Tabelle 16:** Log-Rank Testung zwischen den Überlebenskurven für einen hohen bzw. niedrigen Quotienten zwischen p-mTOR und mTOR im jeweiligen Entnahmeort.

Ebenso zeigte sich in den zusammengefassten Gruppen „Tumorgewebe“ (A+B) und „Benigne Gewebe“ (C+D) kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen einem p-mTOR/mTOR Quotienten über bzw. unter Medianwert und dem Risiko, ein biochemisches Rezidiv zu erleiden (Log-Rang Testung; Gruppe „Tumorgewebe“:  $p = 0.8108$ ; Gruppe „Benigne Gewebe“:  $p = 0.7087$ ).

#### III.5.1.5           EFFEKTSCHÄTZUNG DER STETIGEN PROTEINEXPRESSION AUF DIE REZIDIVFREIE ZEIT MITTELS REGRESSIONSANALYSE

Zur Abschätzung des Einflusses der nicht-dichotomisierten Expression der drei Proteine und des p-mTOR/mTOR-Quotienten auf die Zeit bis zum Auftreten eines biochemischen Rezidivs wurden alle Parameter zuerst mittels univariater Cox-Regression auf eine Einflussnahme getestet. Anschließend wurden diese Einflüsse mittels multivariater Cox-Regressions-Modelle neben bekannten Einflussgrößen geprüft.

#### III.5.1.6           UNIVARIATE COX-REGRESSIONSANALYSE FÜR DIE ORTE A UND B

Zur Effektschätzung der stetig erfassten Proteinexpressionen auf die rezidivfreie Zeit wurden univariate Cox-Regressionsmodelle für die drei erfassten Marker und den Quotienten p-mTOR/mTOR erstellt. Hierbei zeigten sich die in Tabelle 16 zusammengefassten Risiken in den Entnahmeorten A und B sowie der zusammengefassten Gruppe „Tumorgewebe“ aus den Mittelwerten von A+B. So ergab sich aus dem vorliegenden Datensatz ein signifikant geringeres Risiko eines biochemischen Rezidivs bei hoher Expression von mTOR im allgemeinen Tumorgewebe sowie im separat betrachteten Tumorrand, wohingegen die Expression von mTOR im Tumorzentrum selbst keinen Einfluss auf das Rezidivrisiko zu haben schien. Für die restlichen Parameter ergaben sich keine signifikant unterschiedlichen Risiken (**Tabelle 17**).



Parameter	Hazard Ratio	95% CI	p-Wert
mTOR, Tumorzentrum	0,91	0,80-1,05	0,1848
mTOR, Tumorrand	0,87	0,77-0,98	<b>0,0217*</b>
mTOR, Tumorzentrum und -rand	0,83	0,72-0,98	<b>0,0257*</b>
p-mTOR, Tumorzentrum	0,96	0,87-1,08	0,5121
p-mTOR, Tumorrand	0,92	0,82-1,02	0,1209
p-mTOR, Tumorzentrum und -rand	0,93	0,82-1,04	0,2104
p-mTOR / mTOR, Tumorzentrum	1,14	0,61-1,76	0,6389
p-mTOR / mTOR, Tumorrand	1,22	0,83-1,53	0,2428
p-mTOR / mTOR, Tumorzentrum und -rand	1,41	0,58-3,00	0,4328
4E-BP1, Tumorzentrum	0,95	0,83-1,09	0,4555
4E-BP1, Tumorrand	1,02	0,90-1,17	0,7305

4E-BP1, Tumorzentrum und -rand	0,98	0,84-1,15	0,7908
--------------------------------------	------	-----------	--------

**Tabelle 17:** Effekt der Proteinexpressionen in Tumorzentrum (A), Tumorrand (B) und der zusammengefassten Gewebegruppe „Tumorgewebe“ (Mittelwerte aus A+B) auf die Wahrscheinlichkeit, ein biochemisches Rezidiv zu erleiden. Signifikante Ergebnisse mit \* markiert.

### III.5.1.7 MULTIVARIATE COX-REGRESSIONSANALYSE

Zur Abschätzung des unabhängigen Einflusses der Proteinexpression auf die Rezidivfreiheit wurde für mTOR eine multivariate Cox-Regressionsanalyse durchgeführt. Als Einflussvariablen wurden dabei lediglich die Felder „Resektionsstatus“ (R0/R1), „Gleason Summe“ und „Tumorstaging“ als bekannte Prädiktoren in die Analyse eingeschlossen, um eine Überanpassung des Modells nach der „one in ten“ Regel zu vermeiden (Harrell et al., 1984, 1996, Steyerberg et al., 2000).

Dabei erfolgte die Betrachtung des Einflusses der Expression von mTOR in den Loci Tumorzentrum (A) und Tumorrand (B) auf die rezidivfreie Zeit in jeweils separaten Modellen zusammen mit den oben genannten Einflussfaktoren.

### III.5.1.8 PROPORTIONAL-HAZARDS MODELLE FÜR mTOR

In zwei separaten Cox-Modellen wurde der Einfluss der mTOR Expression in Tumorzentrum (Modell MTu\_mTOR, **Tabelle 18**) und Tumorrand (Modell MTuR\_mTOR, **Tabelle 19**) auf das Auftreten eines biochemischen Rezidivs ermittelt. Dabei dienten die zuvor genannten Variablen „Resektionsstatus“, „Gleason Summe“ und „Tumorstaging“ als bekannte Prädiktoren.

Es zeigte sich, dass in beiden Modellen das T-Stadium des Tumors als starker prognostischer Faktor für das Auftreten eines biochemischen Rezidivs anzunehmen ist. Weiterhin zeigte Modell MTuR den Resektionsstatus als signifikant, für mTOR ergab sich zumindest  $p=0.0806$ .

p Gesamtmodell MTu_mTOR:		<0,0001*	
Parameter	Hazard Ratio	95% CI	p-Wert
T-Stadium	2,22	1,38-3,66	<b>0,0009*</b>
Resektionsstatus R1 vs. R0	2,40	0,97-5,52	0,0566
Gleason Summe	1,18	0,86-1,61	0,3098
mTOR, Tumorzentrum	0,91	0,79-1,06	0,2111

**Tabelle 18:** Effektzusammenfassung der Modelleinflüsse samt mTOR Expression im Tumorzentrum (A) auf die zeitabhängige Wahrscheinlichkeit, ein biochemisches Rezidiv zu erleiden. Signifikante Ergebnisse mit \* markiert.

p Gesamtmodell MTuR_mTOR:		<0,0001*	
Parameter	Hazard Ratio	95% CI	p-Wert
T-Stadium	1,89	1,17-3,08	<b>0,0090*</b>
Resektionsstatus R1 vs. R0	2,81	1,11-6,74	<b>0,0297*</b>
Gleason Summe	1,32	0,92-1,87	0,1366
mTOR, Tumorrand	0,89	0,79-1,01	0,0806

**Tabelle 19:** Effektzusammenfassung der Modelleinflüsse samt mTOR Expression im Tumorrand (B) auf die zeitabhängige Wahrscheinlichkeit, ein biochemisches Rezidiv zu erleiden. Signifikante Ergebnisse mit \* markiert.

Nach Zusammenfassung und Mittelwertbildung der Färbeintensitäten beider Entnahmeorte A und B zur Gruppe „Tumorgewebe“ und anschließender Modell-Konstruktion verblieb die mTOR-Expression im Tumorgewebe weiterhin als statistisch signifikanter Einflussfaktor auf die rezidivfreie Zeit (Modell MTuA+B\_mTOR, **Tabelle 20**).

p Gesamtmodell MTuA+B_mTOR:		<0,0001*	
Parameter	Hazard Ratio	95% CI	p-Wert
T-Stadium	2,11	1,28-3,54	<b>0,0033*</b>
Resektionsstatus R1 vs. R0	2,68	1,07-6,41	<b>0,0381*</b>
Gleason Summe	1,26	0,89-1,75	0,1890
mTOR, Tumorgewebe	0,82	0,68-1,00	<b>0,0457*</b>

**Tabelle 20:** Effektzusammenfassung der Modelleinflüsse samt mTOR Expression im Tumorgewebe (Mittelwerte aus A+B) auf die zeitabhängige Wahrscheinlichkeit, ein biochemisches Rezidiv zu erleiden. Signifikante Ergebnisse mit \* markiert.

#### III.5.1.8.1.1 PROPORTIONAL-HAZARDS MODELLE FÜR P-MTOR

Weiterhin wurde in zwei separaten Cox-Modellen unabhängige Einfluss der p-mTOR Expression in Tumorzentrum (Modell MTu\_p-mTOR, **Tabelle 20**) und Tumorrand (Modell MTuR\_p-mTOR, **Tabelle 21**) auf das Auftreten eines biochemischen Rezidivs ermittelt. Dabei dienten die in III.5.5.1. genannten Einflussvariablen als bekannte Prädiktoren.

Erneut trat in beiden Modellen das T-Stadium des Tumors als starker prognostischer Faktor für das Auftreten eines biochemischen Rezidivs hervor. Ebenso zeigte nur das Modell MTuR\_p-mTOR den Resektionsstatus als signifikant an. In keinem Modell stellte die Expression von p-mTOR einen signifikanten Einfluss auf das BCR dar.

p Gesamtmodell MTu_p-mTOR:		0,0026*	
Parameter	Hazard Ratio	95% CI	p-Wert
T-Stadium	2,19	1,36-3,57	<b>0,0011*</b>
Resektionsstatus R1 vs. R0	2,42	0,99-5,56	0,0524
Gleason Summe	1,23	0,89-1,67	0,2011
p-mTOR, Tumorzentrum	1,04	0,92-1,17	0,5270

**Tabelle 21:** Effektzusammenfassung der Modelleinflüsse samt p-mTOR Expression im Tumorzentrum (A) auf die zeitabhängige Wahrscheinlichkeit, ein biochemisches Rezidiv zu erleiden. Signifikante Ergebnisse mit \* markiert.

p Gesamtmodell MTuR_p-mTOR:		<0,0001*	
Parameter	Hazard Ratio	95% CI	p-Wert
T-Stadium	2,19	1,34-3,69	<b>0,0015*</b>
Resektionsstatus R1 vs. R0	2,62	1,06-6,10	<b>0,0380*</b>
Gleason Summe	1,24	0,89-1,69	0,2070
p-mTOR, Tumorrand	1,02	0,91-1,16	0,7017

**Tabelle 22:** Effektzusammenfassung der Modelleinflüsse samt p-mTOR Expression im Tumorrand (B) auf die zeitabhängige Wahrscheinlichkeit, ein biochemisches Rezidiv zu erleiden. Signifikante Ergebnisse mit \* markiert.

Nach Zusammenfassung und Mittelwertbildung der Färbeintensitäten beider Entnahmeorte A und B zur Gruppe „Tumorgewebe“ und anschließender Modell-Konstruktion verblieb die mTOR-Expression im Tumorgewebe weiterhin als

statistisch signifikanter Einflussfaktor auf die rezidivfreie Zeit (Modell MTuA+B\_p-mTOR, **Tabelle 23**).

p Gesamtmodell MTuA+B_p-mTOR:		<0,0001*	
Parameter	Hazard Ratio	95% CI	p-Wert
T-Stadium	2,25	1,37-3,81	<b>0,0011*</b>
Resektionsstatus R1 vs. R0	2,53	1,02-5,88	<b>0,0453*</b>
Gleason Summe	1,24	0,90-1,7	0,1895
p-mTOR, Tumorgewebe	1,04	0,91-1,20	0,5938

**Tabelle 23:** Effektzusammenfassung der Modelleinflüsse samt p-mTOR Expression im Tumorgewebe (Mittelwerte aus A+B) auf die zeitabhängige Wahrscheinlichkeit, ein biochemisches Rezidiv zu erleiden. Signifikante Ergebnisse mit \* markiert.

#### III.5.1.8.1.2 PROPORTIONAL-HAZARDS MODELLE FÜR 4E-BP1

Erneut wurde in zwei separaten Cox-Modellen der vom Resektionsstatus, Gleason Summe und T-Stadium unabhängige Einfluss der 4E-BP1 Expression in Tumorzentrum (Modell MTu\_4E-BP1, **Tabelle 24**) und Tumorrand (Modell MTuR\_4E-BP1, **Tabelle 25**) auf das Auftreten eines biochemischen Rezidivs ermittelt.

In beiden Modellen traten das T-Stadium ( $p=0,0019^*$ ,  $p=0,0007^*$ ) und der Resektionsstatus ( $p=0,0442^*$ ,  $p=0,0332^*$ ) als signifikante Einflüsse hervor. Zudem hat in MTuR\_4E-BP1 die Expression des 4E-BP1 im Tumorrand einen geringen aber signifikanten ( $p=0,0380^*$ ) positiven Einfluss auf das Auftreten eines BCR. So ist eine gesteigerte Expression des Proteins im Tumorrand statistisch mit einem geringfügig höheren Risiko verbunden, früher ein biochemisches Rezidiv zu erleiden.

p Gesamtmodell MTu_4E-BP1:		<0,0001*	
Parameter	Hazard Ratio	95% CI	p-Wert
T-Stadium	2,06	1,31-3,26	<b>0,0019*</b>
Resektionsstatus R1 vs. R0	2,60	1,03-6,27	<b>0,0442*</b>
Gleason Summe	1,23	0,88-1,70	0,2206
4E-BP1, Tumorzentrum	1,00	0,87-1,16	0,9660

**Tabelle 24:** Effektzusammenfassung der Modelleinflüsse samt 4E-BP1 Expression im Tumorzentrum (A) auf die zeitabhängige Wahrscheinlichkeit, ein biochemisches Rezidiv zu erleiden. Signifikante Ergebnisse mit \* markiert.

p Gesamtmodell MTuR_4E-BP1:		<0,0001*	
Parameter	Hazard Ratio	95% CI	p-Wert
T-Stadium	2,32	1,43-3,83	<b>0,0007*</b>
Resektionsstatus R1 vs. R0	2,78	1,09-6,78	<b>0,0332*</b>
Gleason Summe	1,27	0,89-1,77	0,1842
4E-BP1, Tumorrand	1,17	1,01-1,36	<b>0,0380*</b>

**Tabelle 25:** Effektzusammenfassung der Modelleinflüsse samt 4E-BP1 Expression im Tumorrand (B) auf die zeitabhängige Wahrscheinlichkeit, ein biochemisches Rezidiv zu erleiden. Signifikante Ergebnisse mit \* markiert.

Nach Zusammenfassung und Mittelwertbildung der Färbeintensitäten beider Entnahmeorte A und B zur Gruppe „Tumorgewebe“ und anschließender Modell-

Konstruktion konnte für die 4E-BP1-Expression im Tumorgewebe kein statistisch signifikanter Einfluss auf die rezidivfreie Zeit mehr nachgewiesen werden (Modell MTuA+B\_4E-BP1, **Tabelle 26**).

p Gesamtmodell MTuA+B_4E-BP1:		<0,0001*	
Parameter	Hazard Ratio	95% CI	p-Wert
T-Stadium	2,12	1,32-3,43	<b>0,0018*</b>
Resektionsstatus R1 vs. R0	3,21	1,24-8,01	<b>0,0172*</b>
Gleason Summe	1,26	0,88-1,78	0,2081
4E-BP1, Tumorgewebe	1,13	0,95-1,37	0,1774

**Tabelle 26:** Effektzusammenfassung der Modelleinflüsse samt 4E-BP1 Expression im Tumorgewebe (Mittelwerte aus A+B) auf das zeitabhängige Risiko, ein biochemisches Rezidiv zu erleiden. Signifikante Ergebnisse mit \* markiert.



## IV DISKUSSION

### IV.1 WESEN DER ARBEIT UND SYNOPSIS DER ERGEBNISSE

Die vorliegende Arbeit hatte es sich zum Ziel gesetzt, die Expression der in den mTOR-Signalweg involvierten Proteine mTOR, p-mTOR und 4E-BP1 vor dem Hintergrund einer prognostischen Fragestellung zu untersuchen. Von Interesse war hierbei nicht nur, inwiefern die Marker-Expressionen im malignen Gewebe eine Aussagekraft bezüglich des zukünftigen Fortschreitens der Grunderkrankung liefern, sondern insbesondere auch, inwiefern die Expression der Parameter in benignem Gewebe für eine solche Aussage hinzugezogen werden kann und ob sich eine Heterogenität hinsichtlich der Markerexpressionen in den verschiedenen Entnahmeorten der Tumoren zeigt.

Während vereinzelte Studien zur prognostischen Wertigkeit aller drei Proteine in Tumorgeweben bereits existieren, wurde die prognostische Aussagekraft von gesundem und an Tumoren angrenzendem Gewebe weitestgehend außer Acht gelassen. Ebenso wurde im Zusammenhang mit den untersuchten Parametern die Bedeutung der bekannten Heterogenität des PCA bei der Probenentnahme aus dem Primärtumor bisher weitestgehend außer Acht gelassen. Diese Sachverhalte versucht die vorliegende Arbeit zu untersuchen und zu berücksichtigen.

Da gesundes Prostatagewebe zumeist schon bei der ersten Prostatabiopsie gewonnen wird, wäre hier bereits eine erweiterte Prognostik und eventuelle Patientenklassifizierung möglich, sofern sich eine prognostische Wertigkeit dieser Gewebe zeigt. Ebenso muss die andauernde Problematik des kastrationsresistenten Prostatakarzinoms in den Fokus gerückt werden. Ein besseres Eindämmen der Erkrankung im frühen Stadium ohne Begünstigung des Entstehens eines KRPC sollte weiterhin Ziel der Forschung sein, weshalb die vorliegende Arbeit auch abseits des prognostischen Wertes die Möglichkeiten untersucht, Angriffspunkte für einen Eingriff in das biochemische Tumorgeschehen zu finden.

## IV.2 MARKEREXPRESSION IM BEZUG ZUR MALIGNITÄT DES GEWEBES

Bei der vergleichenden Betrachtung der Färbeergebnisse von malignem mit benignem Prostatagewebe zeigte sich für die untersuchten Parameter mTOR, p-mTOR und 4E-BP1 im Tumorgewebe stets eine statistisch signifikant stärkere Färbecharakteristik als im benignen Gewebe (Vergleiche **Tabelle 8**). Gleiches stellte sich für den Aktivierungsstatus von mTOR, berechnet als der Quotient p-mTOR / mTOR, dar.

### IV.2.1 mTOR EXPRESSION IM BEZUG ZUR MALIGNITÄT DES GEWEBES

Für die in der vorliegenden Arbeit beobachtete, in malignem Gewebe signifikant höhere Expression des gesamten mTOR, konnten bereits Kremer et al. eine stärkere Präsenz des Proteins im Tumorgewebe beobachten (Kremer et al., 2006). Sowohl Schanz also auch Geiges konnten diese Beobachtung mittels IHC bestätigen (Schanz, 2015, Geiges, 2019). Kremer et al. untersuchten dabei jedoch insbesondere den Zusammenhang einer mTOR-Aktivierung mit dem Tumorsuppressor PTEN. Sie kamen zu dem Fazit, dass ein Verlust von PTEN, welcher in Tumoren unterschiedlichster Gewebe, darunter dem PCA, vermehrt beobachtet werden kann, zu einer Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweges und somit auch zu einer Aktivierung von mTOR führen kann (Whang et al., 1998, Hay and Sonenberg, 2004). (Kremer et al., 2006) Wird die biochemische Bedeutung von mTOR als Inhibitor des 4E-BP1 betrachtet, so erscheint eine Überexpression von mTOR in hochproliferativem Tumorgewebe durchaus als naheliegend: eine vermehrte Expression von mTOR würde eine vermehrte Hemmung von 4E-BP1 und somit eine verminderte Hemmung von eIF4E ermöglichen, was wiederum eine gesteigerte Gentranslation in Tumorzellen bedeuten könnte. Tatsächlich konnte eine solche vermehrte Hemmung bereits in Form einer verstärkten Expression der durch Phosphorylierung inaktivierten Form des 4E-BP1 in

diversen humanen malignen Tumoren festgestellt werden, welche sich zudem nach Meta-Analysen signifikant auf das rezidivfreie Überleben und auf das Gesamtüberleben auswirkt (Zhang et al., 2017). Im caninen PCA konnten Rivera-Calderon et al. zudem signifikante positive Korrelation zwischen der eIF4E und p-mTOR sowie zwischen der eIF4E und p-4E-BP1 Expression feststellen (Rivera-Calderon et al., 2019). Hierauf soll jedoch im Abschnitt zu 4E-BP1 gesondert eingegangen werden. Wie bereits in I.3.4 erläutert, wird zudem eine direkte Beteiligung von mTOR bei der Tumorentstehung vermutet, indem die zwei mTOR Komplexe mTORC1 und mTORC2 das AKT- und SGK1-Signalling vermitteln und regulieren. Diesen beiden Proteinen konnten bereits überlebenssichernde, proliferationsfördernde und auch direkt tumorfördernde Eigenschaften nachgewiesen werden. Da sich jedoch eine Beeinflussbarkeit auf die Ausprägung dieser Eigenschaften durch mTOR-Hemmung zeigte, könnte man umgekehrt mutmaßen, dass eine vermehrte Expression von mTOR ein solches tumorförderndes Signalling von AKT und SGK1 auch vermehrt ermöglicht. (Manning and Cantley, 2007, Liu et al., 2018) Vor diesem Hintergrund muss ebenso die Auswirkung einer mTOR-Hemmung auf die Autophagozytose in Erinnerung gerufen werden: als scheinbar tumorsuppressiver Mechanismus konnte die Autophagozytose bereits durch eine mTOR-Hemmung induziert werden, wohingegen eine anhaltend vermehrte Aktivierung von mTOR die Autophagozytose zu bremsen scheint (Yue et al., 2003, Yu et al., 2010b, Zoncu et al., 2011). Es ließe sich also zusätzlich mutmaßen, dass eine gesteigerte mTOR-Expression nicht nur ein vermehrtes tumorförderndes Signalling von AKT und SGK1 unterstützt, sondern zusätzlich eine vermehrte Aktivierung seiner selbst zulässt, was sich wiederum in einer Autophagozytose-hemmenden und somit ebenfalls tumorfördernden Wirkung äußern könnte.

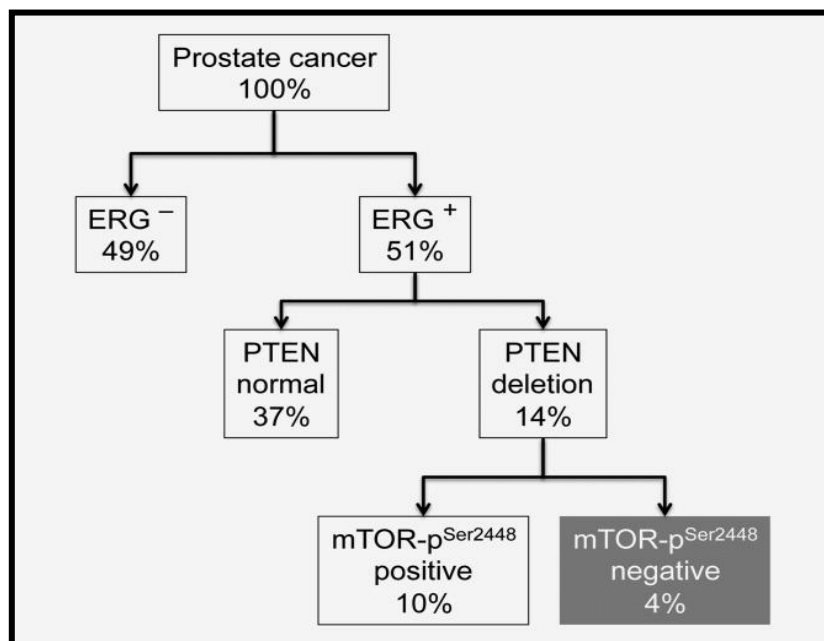
#### IV.2.2 P-MTOR EXPRESSION IM BEZUG ZUR MALIGNITÄT DES GEWEBES

Bei der Untersuchung der p-mTOR Expression zeigte sich ebenfalls ein Expressionsniveau im malignen Gewebe, welches signifikant über dem des

benignen Gewebes lag. Sutherland et al. fanden ebenso das p-mTOR-Expressionsniveau in PCA-Geweben verglichen zu nicht-neoplastischem Prostataepithel signifikant erhöht, was sich mit Beobachtungen von Dai et al. deckt, wonach PCA-Zellen p-mTOR stärker exprimieren als Prostataepithel von Patienten mit benigner Prostatahyperplasie (BPH) ohne Malignität (Sutherland et al., 2014, Dai et al., 2009). Dieses Ergebnis deckt sich auch insofern mit den Ergebnissen von Kremer et al., als dass diese eine höhere Expression von zytoplasmatischem p-mTOR in Tumorgeweben nahelegten, wohingegen die membranständige Färbung des p-mTOR im malignen Gewebe schwächer als im Tumorgewebe ausfiel, womit das Auswerteschema der IHC als entscheidend für die Vergleichbarkeit solcher Arbeiten betrachtet werden muss (Kremer et al., 2006). Lilis et al. merkten dazu an, dass explizit die zytoplasmatische Färbeintensität von p-mTOR in PCAs mit histopathologisch bestätigten lokoregionären Lymphknotenmetastasen im Vergleich zu Prostatakarzinomen ohne Lymphknotenmetastasierung erhöht ist und dass die p-mTOR Expression mit der Lymphangiogenese korreliert (Lilis et al., 2018). Auch Schanz konnte eine Überexpression von p-mTOR im Zentrum des untersuchten PCA verglichen mit maximal tumorfernen Gewebeproben zeigen (Schanz, 2015). Im Gegensatz dazu konnten jedoch Müller et al., Evren et al. und auch Geiges eine signifikant niedrigere Expression von p-mTOR in Tumorgeweben als in benignen Gewebeproben feststellen (Muller et al., 2013, Evren et al., 2010). (Geiges, 2019)

Aus diesen widersprüchlichen Resultaten lassen sich mehrere Thesen generieren. Es ist zum einen annehmbar, dass noch unbekannte Subgruppen von p-mTOR-hochregulierten und -herunterregulierten Tumoren existieren. So konnten Müller et al. einen Zusammenhang zwischen dem Verlust von p-mTOR und der Tumormetastasierung nur in Tumoren mit vorliegender ERG-Fusion nachweisen. Weitere Analysen zeigten, dass der Verlust der p-mTOR Expression von prognostischer Relevanz ist und eine Subgruppe von Karzinomen zu definieren vermag, die weiterhin durch eine PTEN Deletion, ERG-Fusion sowie ein besonders schlechtes Outcome in Form einer kürzeren rezidivfreien Zeit gekennzeichnet ist (Muller et al., 2013). Die Studie zeigte einen signifikanten Zusammenhang zwischen fortgeschrittenen Tumoren und dem Verlust von p-

mTOR auf, was bei weiterer Subgruppeneinteilung jedoch nur für die Tumoren mit ERG-Fusion weiterhin bestand hatte. Ebenso konnte gezeigt werden, dass die verringerte Expression von p-mTOR nur in der Subgruppe der Tumoren mit ERG-Fusion mit einer vermehrten Tumorzellproliferation einherging, was in der Gruppe ohne ERG-Fusion nicht der Fall war (Abbildung 22). Letzteres blieb bei gruppenübergreifender Analyse jedoch verschleiert. Es scheint daher nicht ausschließbar, dass in einer Subgruppe der PCAs eine Überexpression von p-mTOR mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium einhergeht und diese Subgruppe in den oben erwähnten Studien vorherrschend war, in denen ein solcher Zusammenhang gezeigt werden konnte.



**Abbildung 22:** Subgruppeneinteilung nach Müller et al. Von den untersuchten Tumoren mit vorliegender ERG-Fusion wiesen 14% eine Deletion von PTEN auf, von denen wiederum die p-mTOR negativen Tumoren mit einem signifikant schlechteren Outcome der jeweiligen Patienten bezüglich eines Rezidivs einhergingen. (Muller et al., 2013)

Es ist weiterhin denkbar, dass eine intratumorale Heterogenität bezüglich der Expression vorliegen könnte, welche in allen oben erwähnten Studienkollektiven vorherrschte und die stark unterschiedlichen Resultate bezüglich der

Expressionsniveaus zumindest teilweise erklären könnte. Evren et al. konnten eine solche Heterogenität der p-mTOR Expression in PCA-Gewebe bereits nachweisen (Evren et al., 2010). Dennoch soll in IV.3 explizit hierauf eingegangen werden, da bei der vorliegenden Arbeit bewusst Gewebeproben aus wohl definierten Entnahmeorten unterschiedlicher Charakteristik entnommen wurden. Zudem muss insbesondere auf das benigne Gewebe eingegangen werden, welches als Referenz in allen oben erwähnten Studien diente: zum einen wurde hier Gewebe aus Prostata mit BPH herangezogen, zum anderen dienten Biopsien aus histologisch benignen Arealen von RPX-Präparaten als Referenz, wobei weder der Entfernung zum nächst gelegenen Tumoreal, noch einer eventuell vorliegenden Expressionsheterogenität bezüglich der untersuchten Parameter in benignem Gewebe Beachtung geschenkt wurde.

#### IV.2.3 P-MTOR / MTOR QUOTIENT IM BEZUG ZUR MALIGNITÄT DES GEWEBES

Der Anteil von phosphoryliertem mTOR am gesamten mTOR zeigte sich in Tumorgewebe höher als in benignem Gewebe. Dies steht im Kontrast zu den Ergebnissen von Geiges, wonach dieser Quotient in Tumorgewebe signifikant niedriger als der in Normalgewebe ist (Geiges, 2019). Dies lässt sich jedoch vermutlich schlicht aus der dort ebenfalls umgedrehten Sachlage erklären, dass bei Geiges die p-mTOR Expression im Tumorgewebe signifikant niedriger als in benignem Gewebe ausfiel, da Schanz ebenso einen höheren Quotienten in malignem Gewebe feststellen konnte (Schanz, 2015). Geiges argumentiert, dass sich dieser Unterschied aus der Entfernung der Entnahmeorte des benignen Gewebes vom Primärtumor erklären könnte, da sich die beiden Arbeiten in diesem Punkt unterschieden. Da die vorliegende Arbeit die vier verschiedenen Entnahmeorte „Tumorzentrum“, „maligner Tumorrand“, „benigner Tumorrand“ und „fern vom Tumor“ separat untersucht hat, wird hierauf in IV.3 genauer eingegangen. Es kann jedoch festgehalten werden, dass eine vermehrte und anhaltende Aktivierung von mTOR mit einer Verminderung der Autophagozytose in Zusammenhang gebracht werden konnte (Yu et al., 2010b, Zoncu et al., 2011).

#### IV.2.4 4E-BP1 EXPRESSION IM BEZUG ZUR MALIGNITÄT DES GEWEBES

Die Beobachtung einer stärkeren 4E-BP1 Expression in Tumorgewebe der Prostata deckt sich mit der Literatur. So konnten Kremer et al. ebenfalls mittels IHC und TMA-Technik dieses Ergebnis festhalten (Kremer et al., 2006). Jendrossek et al. und Dai et al. fanden ebenso mittels IHC eine stärkere Expression von 4E-BP1 in Tumorgewebe vor (Jendrossek et al., 2008, Dai et al., 2009). Sowohl Schanz, als auch Geiges konnten diese Beobachtungen bestätigen (Schanz, 2015, Geiges, 2019). Graff et al. konnten dies für 4E-BP1 und ebenso für eIF4E nachweisen (Graff et al., 2009). Die bisher dazu diskutierte These in der Literatur lautet, dass die Überexpression von 4E-BP1 im PCA eine Art Antwort auf die ebenfalls festgestellte Überexpression des eIF4E darstellt, um das molekulare Gleichgewicht im Signalweg aufrecht zu erhalten und einer vermehrten Translationsinitiation durch nicht hemmbares eIF4E entgegen zu wirken (Graff et al., 2009, Qin et al., 2016). Inwiefern diese Überexpression jedoch auch durch einen positiven feedback loop entstehen könnte, ist nicht Gegenstand der aktuellen Diskussion. Denkbar wäre jedoch, dass die Translation in Tumorzellen allgemein hochreguliert wird, wodurch es in Folge zu einer unspezifischen stärkeren Expression von eIF4E und Antagonisten wie 4E-BP1 kommt, welche letztlich wieder ein Gleichgewicht halten. Eine solche Hochregulation des mTOR-Signalweges, welcher auch die Proteinbiosynthese beeinflusst, scheint initial bei Prostatatumoren zu stehen: wie bereits in I.3.2 bis I.3.4 diskutiert, scheint eine Dysregulation dieses Signalwegs insbesondere zu Beginn der Tumorentstehung eine Rolle zu spielen (Nardella et al., 2009). Dies zeigte sich beispielsweise auch im Prostatakarzinom, in welchem die Aktivierung des mTORC1 Komplexes die Karzinogenese durch Autophagozytose-Hemmung zu begünstigen scheint (Qu et al., 2003). Es scheint denkbar, dass eine solche initial karzinomfördernde Entgleisung ebenfalls eine positive Feedbackschleife zu initiieren vermag, welche die bereits beobachteten Anstiege von eIF4E und 4E-BP1 über den Tumorprogress hinweg zu erklären vermag, ohne dass diese einen wesentlichen Einfluss auf den weiteren Krankheitsverlauf nehmen müssen.

Gegen letztere These spricht jedoch, dass eine vermehrte Aktivierung von eIF4E mit einem Fortschreiten des Prostatakarzinoms und einem verschlechterten Gesamtüberleben in Verbindung gebracht werden konnte (Graff et al., 2009, Furic et al., 2010). Allerdings ist es vor dem Hintergrund biochemisch differenter Subgruppen des Prostatakarzinoms ebenso denkbar, dass beide Thesen in jeweils unterschiedlichen Subgruppen zum Tragen kommen können. Schließlich konnte ebenso nachgewiesen werden, dass ein Gen-Silencing der 4E Binding Proteine 1 und 2 in einer stärkeren Tumoranfälligkeit resultiert (Kim et al., 2009). Betrachtet man also 4E-BP1 als „Wächterprotein“ der Translation, erscheint eine Hochregulation in Tumorgewebe durchaus als Zielführend im Sinne einer Tumorchemmung. Im Mammakarzinom konnte bereits nachgewiesen werden, dass ein Aufheben der hemmenden Wirkung des 4E-BP1 und die damit verbundene Aktivierung des eIF4F essentiell für die Entstehung eines malignen Tumors zu sein scheint (Avdulov et al., 2004).

#### IV.2.5 ZUSAMMENFASSUNG DER EXPRESSIONSCHARAKTERISTIKEN IM BEZUG ZUR MALIGNITÄT DES GEWEBES

Die vorliegenden Daten decken sich mit den Ergebnissen anderer Studien. Die mit der Progression des PCA zumeist vermehrte Expression der untersuchten Parameter des PI3K/AKT/mTOR-Signalweges legt vor diesen Resultaten die Annahme nahe, dass unter den biochemisch differenteren Varianten des PCA auch solche existieren, welche das zelluläre Überleben unter anderem über Eingriffe in den PI3K/AKT/mTOR-Signalweg sichern, beispielsweise durch eine vermehrte Expression und Aktivierung von mTOR und dadurch bedingt vermehrt möglicher Hemmung von 4E-BP1. Zumindest zeigt sich in den vorliegenden Daten eine signifikante positive Korrelation zwischen den mTOR- und 4E-BP1-Expressionen in beiden Gewebegruppen, wobei im gesunden Gewebe statistisch von einem stärkeren Zusammenhang ausgegangen werden kann (vergleiche **Tabelle 9**). Aus diesen Ergebnissen kann auch gemutmaßt werden, dass in einer Subgruppe der untersuchten Tumorproben nur ein sehr schwacher oder gar kein



Zusammenhang zwischen den Expressionen bestand, was für ein mTOR-unabhängiges Signalling in diesen Tumoren sprechen würde.

Dass maligne Zellen scheinbar eine signifikant höhere Aktivierung von mTOR aufweisen, scheint in Anbetracht der diskutierten Rolle in der Autophagozytose-Hemmung schlüssig. Vor diesem Hintergrund erscheint es umso erstaunlicher, dass die bisherigen Versuche einer medikamentösen mTOR-Inhibition nur wenig Erfolg zeigten, wie bereits in Kapitel 1.3.5 „Das mTOR System beim Prostatakarzinom“ diskutiert wurde. Dies könnte zum einen als Indiz dafür gesehen werden, dass es PCAs zu geben scheint, die nicht mehr auf ein intaktes mTOR-Signalling angewiesen sind. Zum anderen könnte man deshalb ebenso erneut mutmaßen, dass die Entgleisung des mTOR-Signalweges als Ereignis zu werten ist, welches am Beginn der Tumorgenese steht und der mTOR-Signalweg in späteren Stadien keine signifikante Rolle mehr spielt. Eine Hemmung in einem bereits fortgeschrittenen Tumorgeschehen zeigte damit keine oder nur sehr geringe Erfolge (Stelloo et al., 2016). Dies wird letztlich durch die Funktion der Autophagozytose als tumorsuppressiver Mechanismus unterstrichen, wobei diese bereits durch eine mTOR-Hemmung induziert werden konnte.

### IV.3 INTRATUMORALE HETEROGENITÄT UND BEZUG ZUR INVASIONSFRONT

Zwischen der Färbeintensität in Geweben aus dem Tumorzentrum und aus dem malignen Tumorrand konnte kein statistisch signifikanter Unterschied für mTOR, p-mTOR oder 4E-BP1 festgestellt werden. Wohl aber zeigte sich, dass die Expression von mTOR und p-mTOR in an Tumoren angrenzendem benignem Gewebe statistisch signifikant niedriger ausfällt, als in benignem Gewebe, welches weiter von Tumoren entfernt liegt ( $p = 0.0047$ ;  $p < 0.0001$ ). Bei der Betrachtung des Aktivierungsstatus, dargestellt als der Quotient der Färbeintensität von p-mTOR zu mTOR, wird diese Beobachtung hervorgehoben. Es ließ sich im Vergleich zu malignem Gewebe eine signifikant niedrigere Aktivierung von mTOR in benignen, an Tumorgewebe angrenzenden Drüsen

feststellen ( $p < 0.0001$ ). Gleichzeitig liegt die Aktivierung in diesem Locus jedoch auch signifikant unter dem Niveau, welches in benignem Gewebe fern vom Tumor ermittelt wurde ( $p = 0.0007$ ), während zwischen letzterer Gewebegruppe und Geweben aus beiden Tumor-Loci statistisch kein Unterschied der mTOR-Aktivierung nachgewiesen werden konnte. Stelloo et al. berichteten 2016 bereits von einer vermehrten Aktivierung des mTOR durch Phosphorylierung im PCA, wobei sich jedoch heraus stellte, dass eine geringere Aktivierung im Tumorgewebe mit einem statistisch signifikant früheren Eintreten eines biochemischen Rezidivs einher ging (Stelloo et al., 2016). Stelloo et al. argumentieren in ihrer Arbeit, dass dieses scheinbar widersprüchliche Ergebnis dafürsprechen könnte, dass die Phosphorylierung von mTOR im PCA eine Rolle in der Tumorentstehung spielen könnte, sich aber nicht mehr auf den weiteren Verlauf der Grunderkrankung auswirkt, was bereits für das nicht-kleinzellige Lungenkarzinom und das intrahepatische Gallengangkarzinom angenommen würde. Es kann bereits an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, dass sich die Beobachtung von Stelloo et al. eines schlechteren Outcomes bezüglich eines biochemischen Rezidivs bei geringer mTOR Aktivierung teilweise reproduzieren ließ (siehe Kapitel IV.4 „Markerexpressionen und deren prognostische Wertigkeit“).

Vor diesem Hintergrund scheint es bezeichnend, dass in der vorliegenden Arbeit die Aktivierung von mTOR im benignen aber an Tumoren angrenzenden Gewebe signifikant niedriger ausfällt, als in den restlichen untersuchten Probenentnahmeorten: im an Tumoren angrenzende benignen Gewebe war im Mittel nur etwa die Hälfte des detektierten mTOR phosphoryliert, in den anderen Entnahmeorten war das Verhältnis eher ausgeglichen. Wie bereits in Kapitel IV.2 erläutert, stellen aktivierte mTORC1 Komplexe Inhibitoren der Autophagozytose und des 4E-BP1 dar. Die Tatsache, dass scheinbar an Tumoren angrenzendes, jedoch histologisch benignes Prostatagewebe eine verringerte Aktivierung von mTOR aufweist, ließe den Schluss zu, dass in diesem angrenzenden Epithel sowohl das 4E-BP1 als auch die Autophagozytose weniger stark gehemmt werden, als es in gesundem Gewebe zu erwarten wäre. Als Folgen könnten eine allgemein verringerte Translation sowie eine vermehrte Autophagozytose in

diesen angrenzenden Drüsenzellen angenommen werden, weshalb dieses Gewebe theoretisch bevorzugt untergehen könnte, jedoch auch stärker tumorsuppressive Eigenschaften aufweist. Eine solche These ließe sich durch Evaluation der Phosphorylierung von 4E-BP1 im benignen Tumorrand näher beleuchten. Als limitierend muss hier die Wahl der Antikörper bei der Durchführung einer IHC angesehen werden: es ist weitestgehend unbekannt, ob mTOR alle oder nur einige der bekannten Phosphorylierungsstellen von 4E-BP1 phosphorylieren kann (Qin et al., 2016). Wang et al. untersuchten diesen Sachverhalt bereits in Kopf-Hals-Karzinomen und kamen zu dem Schluss, dass ihre Ergebnisse die These einer vermehrten Hemmung von 4E-BP1 durch mTOR im Tumorgewebe, aber auch eine Wiederherstellung der tumorsuppressiven Funktion des 4E-BP1 durch mTOR-Hemmung unterstützen (Wang et al., 2019). Ließen sich diese Beobachtungen auf das PCA übertragen, so könnten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit für eine vermehrte mTOR-vermittelte tumorsuppressive Aktivität im an Tumoren angrenzenden benignen Prostataepithel sprechen.

Die Untersuchung des an Tumoren angrenzenden Gewebes führte erneut die Problematik der Heterogenität des PCA vor Augen: es zeigt sich, dass gerade mTOR und p-mTOR im benignen Gewebe nah am Tumorsaum besonders schwach exprimiert werden. Dies könnte eine Entnahme an dieser Stelle besonders kritisch machen, sofern zusätzlich noch Gewebeproben fern vom Tumor entnommen, jedoch als Gewebe gleicher Herkunft angesehen werden, was womöglich auch die teils widersprüchliche Studienlage erklären könnte, welche in Kapitel IV.2.2 bereits diskutiert wurden. Im Fall des 4E-BP1 zeigt sich die Studienlage eindeutiger, Konsens ist eine gesteigerte Expression in malignem Gewebe bzw. eine geringere Expression in histologisch benignem Gewebe. Tatsächlich unterscheidet sich in den vorliegenden Daten die Färbeintensität der benignen Gewebeproben nahe und fern vom Tumorrand nicht signifikant voneinander. Eine solche Expressionsdifferenz in an Tumoren angrenzenden Geweben konnte bereits durch mehrere Arbeitsgruppen für das Prostatakarzinom und andere Tumoren gezeigt werden und wird in der vorliegenden Arbeit für p-mTOR, mTOR sowie deren Quotienten dargestellt

(Merseburger et al., 2006, Heni et al., 2012). (Schanz, 2015) Die vorliegenden Daten erhärten damit einmal mehr den Verdacht, dass das Tumorgeschehen im PCA nicht allein auf die histologisch malignen Areale beschränkt ist. Eine solche Erkenntnis kann bedeutende Folgen für die Erforschung, Diagnostik und Behandlung des PCA haben. So ist es denkbar, dass ein biochemisches Tumorgeschehen in histologisch benignen Zellen eine neue Möglichkeit in der Auswertung von scheinbar negativen Stanzbiopsien darstellt. Ebenso erscheint es plausibel, dass eine präventive medikamentöse Intervention nach erfolgter Prostatektomie das Eintreten eines biochemischen Rezidivs beeinflussen könnte, sofern erkannt werden kann, dass benachbarte Gewebe bereits biochemische Veränderungen aufweisen, welche mit einem höheren Rezidivrisiko verbunden werden. Für solch gravierende Veränderungen in der bisherigen Diagnostik und Therapie sind jedoch weitere Forschungsarbeiten vonnöten, weshalb die intraprostatistische biochemische Heterogenität in solchen Arbeiten Berücksichtigung finden sollte. Hierauf wird in Kapitel IV.5 noch einmal gesondert eingegangen.

Die Heterogenität bezüglich der Proteinexpression innerhalb histologisch identischer Gewebegruppen stellt weiterhin eine große Problematik bei der Erforschung des Prostatakarzinoms dar, da eine Ursachenforschung und eine zielgerichtete Behandlung durch das scheinbare Vorliegen hochgradig diverser Tumorentitäten erschwert wird. Durch neue Methoden der computergestützten Auswertung scheint jedoch erwartbar zu sein, dass eine Quantifizierung der Heterogenität von Tumorzellen in Zukunft automatisiert und mit hohem Durchlauf möglich ist, was letztlich einen entscheidenden Schritt bei der Einteilung von Patienten in unterschiedliche Risikogruppen oder Behandlungszweige darstellen könnte (Guo et al., 2018). Dies umfasst ebenso die genetische intratumorale Heterogenität, welche durch klassisches Sequencing nicht mitsamt der räumlichen Information erfasst und mittels Fluoreszenz in-situ Hybridisierung (FISH) und IHC nur qualitativ, subjektiv und nicht reproduzierbar beurteilt werden konnte (Zhong et al., 2016).

#### IV.4 MARKEREXPRESSIONEN UND DEREN PROGNOTISCHE WERTIGKEIT

Bei der Untersuchung des Einflusses der einzelnen Markerexpressionen im Tumorgewebe auf den Krankheitsverlauf nach erfolgter RPX zeigte sich, dass ein Einfluss der mTOR Expression auf das Auftreten eines biochemischen Rezidivs vermutet werden kann: eine niedrige Expression von mTOR im Tumorgewebe geht statistisch mit einer kürzeren Zeit bis zum Auftreten eines BCR einher. In der anschließend durchgeführten univariaten Regressionsanalyse wurde dies bestätigt, mit einer Hazard Ratio von 0,83 zeigte eine zunehmende mTOR Expression im Tumorgewebe einen positiven Einfluss auf die rezidivfreie Zeit. Die multivariate Post-Hoc Analyse zeigte, dass dieser Einfluss weiterhin neben dem T-Stadium und dem Resektionsstatus nach RPX bestand hatte, während für die Gleason Summe kein Einfluss auf die Zeit bis zum Eintreten eines biochemischen Rezidivs nachgewiesen werden konnte.

Barata et al. konnten bei der Untersuchung von Markern des mTOR Signalweges in Mittel- und Hochrisiko-PCAs ebenfalls einen Zusammenhang zwischen mangelnder mTOR-Expression und dem Auftreten eines BCR feststellen (Barata et al., 2019). Sie fanden daneben interessanterweise jedoch auch eine statistische Assoziation zwischen der mTOR Expression und einem fortgeschrittenen pathologischen Stadium (T-Stadium  $\geq 3$ ), ein Ergebnis, welches in der vorliegenden Arbeit nicht reproduziert werden konnte. Einen Erklärungsversuch zum Einfluss auf die rezidivfreie Zeit wagen Barata et al. jedoch nicht und verweisen stattdessen ebenfalls auf Stelloo et al. 2016. Wie bereits in IV.3 berichtet, fanden Stelloo et al. bei denjenigen Patienten mit schwach phosphoryliertem mTOR im Tumorgewebe ein signifikant schlechteres Outcome bezüglich der Zeit bis zum Auftreten eines BCR vor (Stelloo et al., 2016). Dabei argumentierte die Arbeitsgruppe, dass eine Phosphorylierung von mTOR an der Phosphorylierungsstelle Ser-2448 als indikativ für eine Aktivierung des mTOR-Signalweges gilt. Da einer gehemmten mTOR-Aktivität bisher eher eine tumorsuppressive Wirkung in anderen menschlichen Tumoren und auch

generell in der humanen Zellbiologie zugeschrieben werden konnte, argumentierten Stelloo et al. weiter, dass diese Ergebnisse für die initiale Rolle von mTOR bei der Tumorentstehung sprechen und dass der mTOR-Signalweg für den weiteren Progress des PCA an Bedeutung verliert. Die nun vorliegenden Daten konnten jedoch keinen statistischen Zusammenhang zwischen der Menge an p-mTOR im Tumorgewebe und dem Auftreten eines BCR nachweisen, wobei auf die signifikant größere Patientenzahl und die längere Nachbeobachtungszeit bei Stelloo et al. hingewiesen werden muss. Jedoch zeigte sich in der vorliegenden Arbeit in Tumorgewebe von Prostata mit hohem T-Stadium ( $\geq T3a$ ) statistisch signifikant weniger phosphoryliertes mTOR als in Tumorgewebe aus Prostata mit niedrigerem T-Stadium (vergleiche Kapitel „Expression in Abhängigkeit des T-Stadiums“). Auch scheint es bedeutsam, dass für die gesamte Expression von mTOR, also sowohl phosphoryliertem als auch nicht phosphoryliertem mTOR, die Resultate der Arbeitsgruppe bezüglich des BCR-Risikos beobachtet werden konnten. Eine naheliegende Vermutung hierzu wäre, dass eine starke Expression von mTOR erst eine vermehrt detektierbare Phosphorylierung des selbigen zulässt. Da Stelloo et al. keine IHC zur Färbung des gesamten mTOR durchführten, können die Resultate der vorliegenden Arbeit nicht direkt verglichen werden, wobei jedoch darauf hingewiesen werden muss, dass die Patientenkollektive beider Arbeiten trotz unterschiedlicher Probenzahlen sehr ähnliche Verteilungen bezüglich T-Stadium, Gleason Summe, positiven Resektionsrändern und dem Auftreten eines BCR aufweisen. Die leichte Unterschiedlichkeit der Ergebnisse trotz großer Ähnlichkeit der Kollektive ließe die Vermutung zu, dass ein bisher unbekannter Faktor existiert, in welchem sich die untersuchten Patienten unterscheiden. So zeigte sich bei Stelloo et al. eine interessante Unterscheidung: in Tumorgeweben ohne nachgewiesene ERG-Fusionierung konnte der zuvor erwähnte statistische Zusammenhang zwischen p-mTOR und der Zeit bis zum Auftreten eines BCR nicht mehr nachgewiesen werden, auch wenn angemerkt wird, dass die Probenanzahl für diese Gruppe relativ gering war und sich ein vermeintlicher Trend zeigte. Da in der vorliegenden Arbeit das Auftreten einer ERG-Fusion nicht untersucht wurde, können die Arbeiten in diesem Punkt leider nicht verglichen werden. Eine im Zusammenhang

mit der vorliegenden Arbeit durchgeführte Metaanalyse von vier Studien mit insgesamt 736 Patienten zeigte jedoch auch den von Stelloo et al. beobachteten statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen einem niedrigeren Risiko eines BCR und intensiver Färbung von p-mTOR mittels IHC (Russo et al., 2019)

Diese Ergebnisse stehen im Kontrast zu den Resultaten, welche Untersuchungen des Einflusses der mTOR-Phosphorylierung in anderen humanen Tumoren lieferten. So zeigte sich, wie bereits erwähnt, beispielsweise im oesophagealen Plattenepithelkarzinom und in Frühstadien des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms ein signifikant verringertes Gesamtüberleben bei denjenigen Patienten, bei denen eine starke Expression von mTOR und eine verstärkte Phosphorylierung von mTOR vorgefunden wurde (Wu et al., 2018, Dhillon et al., 2010, Gately et al., 2012). Im Magenkarzinom zeigte sich ebenso ein Zusammenhang zwischen erhöhter mTOR-Phosphorylierung und einem schlechteren Gesamtüberleben, was sich genauso auch bei Gliom-Patienten zeigte (Cao et al., 2017, Liu et al., 2017). Zudem konnte die erhöhte Phosphorylierung von mTOR im Magenkarzinom mit einer insgesamt schlechteren Prognose für die betroffenen Patienten in Verbindung gebracht werden (Cao et al., 2017).

Die vorliegenden Daten und die Studienlage legen die Vermutung nahe, dass dem mTOR Signalweg im PCA möglicherweise eine andere Rolle als in anderen bisher untersuchten Malignomen zukommt: während in letzteren Fällen eine mTOR-Inhibition Behandlungserfolge zeigte, präsentiert sich für das PCA eine unklare Studienlage, die eher zu einer erfolglosen Hemmung von mTOR ohne Auswirkung auf das PCA tendiert. Dies lässt die Vermutung zu, dass der mTOR Signalweg maßgeblich in der Tumorentstehung, nicht aber im Fortbestehen des PCA eine Rolle spielt. Eine mTOR Hemmung könne also in initialen Stadien erfolgsversprechend sein. Weshalb jedoch eine Überexpression und Überaktivierung von mTOR bzw. des mTOR-Signalweges mit einem besseren Outcome bezüglich eines BCR in Verbindung gebracht werden kann und weshalb gleichzeitig in fortgeschrittenen Tumorstadien weniger mTOR phosphoryliert wird, muss in zukünftigen Studien näher betrachtet werden. Eine alternative

These könnte auch lauten, dass fortgeschrittene Prostatakarzinome die über mTOR vermittelte Signalgebung ausschalten oder zumindest dämpfen, indem Schlüsselproteine in ihrer Expression gehemmt oder verstärkt werden, weshalb eine medikamentöse Hemmung des nicht mehr voll funktionsfähigen Signalweges keine oder nur geringe Auswirkungen erzielt. Die vorliegenden Daten suggerieren zumindest, dass in fortgeschrittenen PCAs mit hohem BCR-Risiko das Protein mTOR in geringerem Maße nachgewiesen werden kann und dass die relative Aktivierung von mTOR in fortgeschrittenen PCAs geringer ausfällt, was zumindest als schwaches Indiz für eine Außerkraftsetzung bzw. Dysregulation des Signalweges durch unterexprimierte Schlüsselproteine betrachtet werden könnte, wie sie in fortgeschrittenen PCAs vermehrt vorgefunden wird (Edlind and Hsieh, 2014).

#### IV.5 PROGNOTISCHE WERTIGKEIT DER EXPRESSIONEN VOR DEM HINTERGRUND DER TUMORHETEROGENITÄT

Wie bereits in Kapitel IV.3 diskutiert, konnten für das PCA bereits mehrfach intratumorale Heterogenitäten bezüglich molekularer Ausstattungen festgestellt werden. Die vorliegenden Daten legen eine solche Heterogenität für die untersuchten Marker mTOR, p-mTOR, deren Quotient sowie für 4E-BP1 im Bezug zum Entnahmeort innerhalb des Tumors nicht nahe. Wohl aber zeigten sich Expressions-Heterogenitäten im benignen Gewebe in Abhängigkeit der Distanz des Probenentnahmeortes zum Primärtumor: mTOR und p-mTOR wurden im an Tumorgewebe angrenzenden gesunden Gewebe in signifikant niedrigerem Umfang als in benignem Gewebe fern von Tumoren nachgewiesen, der Quotient p-mTOR / mTOR lag hier ebenfalls signifikant unter dem Niveau, welches fern von Tumoren ermittelt wurde. Vor dem Hintergrund des in IV.4 diskutierten scheinbaren Zusammenhangs zwischen einer schlechteren Prognose bezüglich eines BCR und einer Unterexpression von mTOR bzw. p-mTOR im Primärtumor schien es daher von besonderem Interesse, den Einfluss der verschiedenen Markerexpressionen innerhalb der vier unterschiedlichen Entnahmeorte auf die Zeit bis zum Eintreten eines BCR zu ermitteln. Aufgrund



der Neuartigkeit dieser Untersuchungen am PCA ließen sich keinerlei direkt vergleichbare Arbeiten, weder zu den präsentierten Markern, noch zu anderen Proteinen im PCA auffinden, was ein Einordnen der Resultate in den wissenschaftlichen Kontext erschwerte.

Bei der vergleichenden Analyse von Geweben aus zentralen bzw. peripheren Entnahmeorten innerhalb der Tumoren stellte sich heraus, dass der in IV.4 besprochene Zusammenhang zwischen einer submedianen mTOR Expression und der kürzeren Zeit bis zum Eintreten eines BCR lediglich in den Gewebeproben aus peripheren Entnahmeorten statistisch nachgewiesen werden konnte. Gleiches zeigte sich in der anschließenden univariaten Cox-Regressionsanalyse, während in der multivariaten Analyse lediglich ein Trend vermutet werden konnte. Es muss bei letzteren Analysen jedoch explizit auf den relativ geringen Probenumfang durch die Unterscheidung der zwei Tumorgewebegruppen hingewiesen werden, welche ein aussagekräftiges Regressionsmodell erschweren (Harrell et al., 1996, Steyerberg et al., 2000). Dennoch legen die vorliegenden Daten einen Zusammenhang der mTOR Expression und der Dauer bis zum Eintreten eines BCR nur im Tumorrand nahe. Somit konnte in der vorliegenden Arbeit nun zum ersten Mal gezeigt werden, dass die Resultate von Stelloo et al. und Barata et al. möglicherweise auch vom Entnahmeort der Gewebeproben innerhalb des Tumors abhängig sind (Stelloo et al., 2016, Barata et al., 2019).

Der modellhafte Einfluss der 4E-BP1 Expression im Tumorrand auf das BCR, wie er sich in Kapitel III.5.5.2 präsentiert, sollte vorerst mit Vorsicht betrachtet werden, da er weder durch eine univariate Analyse, noch durch das Kaplan-Meier Verfahren bestätigt werden konnte. Unter diesen Umständen muss von einer Überanpassung des Regressionsmodells ausgegangen werden. Vor dem Hintergrund der bereits erforschten prognostischen Wertigkeit der 4E-BP1 Phosphorylierung in anderen malignen Humantumoren gilt die weitere Beleuchtung des Einflusses dieses Proteins dennoch als interessant für die Forschung am PCA (Zhang et al., 2017, D'Abronzio and Ghosh, 2018).

Aufgrund der ermittelten Heterogenitäten im benignen Gewebe wurde insbesondere auch der Einfluss der Markerexpressionen im gesunden Gewebe auf die Zeit bis zum Eintreten eines BCR statistisch ermittelt, obwohl dies argumentativ befremdlich scheint. Hierbei zeigte sich allerdings für mTOR eine interessante Beobachtung: bei Zusammenfassung der Proben aus benignem Drüsengewebe nah und fern von Tumoren zeigte sich in der Statistik der gleiche Zusammenhang wie in der zusammengefassten Probengruppe aus zentral und peripher zum Tumor entnommenen malignen Gewebeproben. So erwies sich neben einem positiven Resektionsstatus auch eine geringe mTOR Expression im histologisch benignen Gewebe als statistisch signifikante positive Einflussgröße auf die Zeit bis zum Eintreten eines BCR. Bei der separierten Betrachtung von benignem Gewebe nah und fern von histologisch malignem Prostatagewebe konnte dieser Zusammenhang im statistischen Modell in keiner der beiden Gewebegruppen nachgewiesen werden. Dies kann, wie bereits erwähnt, auf die geringe Anzahl der Proben und der Ereignisse im Beobachtungszeitraum zurückzuführen sein. Dennoch kann der scheinbar identische Einfluss der Proteinexpression von mTOR in benignem wie auch malignem Gewebe auf die rezidivfreie Zeit nicht ignoriert werden.

Eine zugrundeliegende These beschreibt, dass die Unterexpression von mTOR im an Tumoren angrenzenden Gewebe als Abwehrmechanismus verstanden werden könnte, wie es bereits in Kapitel IV.3 erläutert wurde. Zudem erscheint die Hypothese plausibel, dass der Verlust von mTOR eher eine Folge des fortschreitenden Tumors ist und nicht als ursächlich für die kürzere Zeit bis zum Auftreten eines BCR betrachtet werden kann. Jedoch zeigte sich in den vorliegenden Daten kein statistischer Zusammenhang zwischen den ermittelten mTOR Expressionen in den verschiedenen Gewebegruppen und dem T-Stadium des jeweiligen PCA, wie es Barata et al. nachweisen konnten (Barata et al., 2019). Wohl aber zeigte sich, dass Tumoren im fortgeschrittenen Wachstumsstadium (T-Stadium  $\geq 3a$ ) signifikant weniger p-mTOR aufwiesen. Zeitgleich ist es bemerkenswert, dass sich ein statistischer Zusammenhang zwischen niedriger mTOR-Expression und einer signifikant verkürzten rezidivfreien Zeit sowohl in malignem, als auch in benignem Gewebe zeigte. Dies

lässt die Vermutung zu, dass die generelle Ausstattung des Prostatagewebes mit mTOR einen Einfluss auf die Wehrhaftigkeit des Gewebes gegen BCRs haben könnte. Jedoch zeigte sich in der durchgeführten Statistik kein Zusammenhang zwischen der Expression von mTOR in malignem und benignem Gewebe. Eine These dazu könnte lauten, dass der Zusammenhang zwischen niedriger mTOR Expression und verkürzter rezidivfreier Zeit in malignem Gewebe eine andere Ursache als in benignem Gewebe hat. Wie zuvor bereits diskutiert, kann mTOR als wichtiger Regulator von 4E-BP1 gesehen werden, welches wiederum als wichtiger Regulator der Translation betrachtet werden kann. Aufgrund dieser regulativen Eigenschaft von mTOR ließe sich mutmaßen, dass eine niedrige Expression in einer weniger starken Beeinflussbarkeit von 4E-BP1 durch mTOR mündet, womit ein wichtiger Kontrollmechanismus der Translation sowohl in benignem, wie auch in malignem Gewebe eingeschränkt wäre. In histologisch benignem Gewebe könnte dies insofern die Anfälligkeit für ein BCR beeinflussen, als dass ein Signalweg zur Regulation von Wachstum und Autophagozytose einen vermeintlich geringeren Einfluss ausüben kann. In PCA Gewebe, welches bekanntlich 4E-BP1 in höherem Maße als benignes Gewebe exprimiert, könnte dies auf ein Ungleichgewicht von Inhibitor und Substrat hindeuten (Wang et al., 2016). Tatsächlich deuten die Daten der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass die mTOR Expression in gesundem Prostatagewebe stärker mit der 4E-BP1 Expression korreliert, als dies in malignem Prostataepithel der Fall ist. Entspräche diese Beobachtung der Wirklichkeit, so könnte davon ausgegangen werden, dass die Unterexpression von mTOR in Prostatagewebe beliebiger Dignität insbesondere dann einen Einfluss auf den nachgeschalteten Translationsmechanismus hat, sofern 4E-BP1 im Gegenzug bereits überexprimiert wird. In benignem Gewebe ist letzteres scheinbar nicht der Fall, weshalb nicht von einem Ungleichgewicht der Proteine ausgegangen werden kann. Daher ist der Zusammenhang zwischen einer niedrigen mTOR Expression in benignem Gewebe und einem schlechteren Outcome bezüglich eines BCR auf diesem Wege nicht offensichtlich erklärbar, es könnte jedoch wie oben gemutmaßt werden, dass eine verringerte Expression von mTOR eine allgemein verringerte Einflussnahme des mTOR-Signalweges zur Folge hat, was sich als

Vorteilhaft für das Entstehen eines Rezidivs erweisen könnte. Letzteres scheint insbesondere vor dem Hintergrund der vermuteten und bereits diskutierten primären Rolle des mTOR-Signalweges in der Entstehungsphase des PCA schlüssig.

Es kann damit festgehalten werden, dass der im malignen Gewebe gezeigte Zusammenhang zwischen einer geringen mTOR Expression und einem schlechteren Outcome bezüglich des BCR am Tumorrand deutlich nachgewiesen werden konnte, während sich im Tumorzentrum dafür lediglich Tendenzen zeigten. Weiterhin konnte dieser im malignen Gewebe ermittelte Einfluss auch in den benignen Gewebeproben ausgemacht werden. Jedoch zeigte sich bei Unterscheidung zwischen Gewebeproben, die nah oder fern vom Tumor entnommen wurden, trotz der Heterogenität der Expression von mTOR im benignen Gewebe kein signifikanter Unterschied in der prognostischen Wertigkeit der mTOR Expression bezüglich eines BCR. Vor der bereits bestehenden These, dass der mTOR Signalweg im PCA insbesondere in der Tumorentstehung von größerer Bedeutung ist und für den Progress an Signifikanz verliert, lässt sich aus den vorliegenden Daten mutmaßen, dass der Verlust von mTOR nicht die direkte Ursache für das schlechtere BCR Outcome ist, sondern viel mehr eine Folge des fortschreitenden PCA darstellt. Für eine solche definitive Aussage präsentiert sich die bisherige Studien- und Datenlage jedoch noch als zu gering.

## IV.6 LIMITATIONEN DER ARBEIT

Für die vorliegende Arbeit sind einzelne methodische Limitationen zu nennen. Als für die statistische Auswertung limitierender Faktor fällt hier das für eine Follow-Up Analyse relativ kleine Kollektiv und die damit einhergehende Problematik negativer Ergebnisse der Analyse (hier mittels Kaplan-Meier Kurven und Log-Rank Test sowie Cox-Regression) ins Gewicht. Hier ist nur dann einen Trend in den Daten zu erkennen, sofern der Einfluss des untersuchten Faktors auf das Outcome relativ stark ist (Cox, 1972, Harrell et al., 1996).

Weiterhin beschreibt das vorliegende Kollektiv nicht die Gesamtheit der PCA-Stadien, die Verteilung der einzelnen Stadien entspricht dem klinischen Auftreten. So kommt es beispielsweise dazu, dass das Kollektiv lediglich je vier Patienten mit einem GS von 8 bzw. über 8 und keinen Patienten mit T4 Stadium aufweist.

Methodisch ist die Arbeit zum einen durch ihren retrospektiven Charakter beschränkt. Kausalzusammenhänge können daher nicht bzw. nur stark eingeschränkt erkannt werden, eine unbekannte Einflussgröße kann nur schwer ausgeschlossen werden und die Fehleranfälligkeit von Daten steigt durch die Art der Erhebung (telefonischer Patientenkontakt). Zum anderen wurde lediglich eine einzelne Methodik zur Gewinnung der molekularen Gewebeeigenschaften angewendet, die Immunhistochemie am TMA. Diese Technik gilt zwar als etabliert, stützt sich jedoch auf das Vorhandensein vieler redundanter Proben (Rubin et al., 2002). Zudem kommt es in der Praxis vermehrt vor, dass Probenmaterial nicht stark genug auf dem Objektträger anhaftet, so dass einzelne Proben während des Färbeprozesses abschwimmen und verloren gehen oder das auf den Objektträger aufgezugene Gewebe enthält kein färbbares Drüsenepithel, was die Gesamtprobenzahl mindert und die Probenredundanz nicht in allen Fällen sichert. Weiterhin ist die Auswertung der Färbung eine subjektive, relative Einschätzung. Daher wurden die Proben der vorliegenden Arbeit nicht nur vom Autor, sondern zusätzlich von einer erfahrenen Zytologin verblindet durchgeführt.

Es ist zu diskutieren, inwiefern histologisch benignes Prostatagewebe aus einer tumortragenden Prostata als Normalgewebe bezeichnet werden kann. Da es sich jedoch als überaus schwierig gestaltet, für eine statistische Analyse ausreichend Prostatagewebe aus tumorfreien Prostataen zu gewinnen, wird in der Forschung häufig auf Prostatagewebe aus Prostataen mit diagnostizierter BPH zurückgegriffen. Da in dieser Arbeit jedoch explizit die Expressionen in den unterschiedlichen Entnahmeorten desselben Patienten untersucht werden sollten, bildet die Wahl des benignen Referenzgewebes sogar eine Grundlage für die Bewertung der Gewebeorte.

## IV.7 SCHLUSSFOLGERUNG

Die Expressionen von Proteinmarkern, hier beispielhaft für mTOR-assoziierte Parameter dargestellt, innerhalb eines Tumor-befallenen Organs hängen nicht nur von der Histologie des Gewebes (Tumorgewebe – angrenzendes Normalgewebe) ab, sondern die untersuchten Marker können auch eine intratumorale bzw. intrabenigne Heterogenität, bedingt durch die Distanz zum Tumorzentrum, aufweisen. Die vorliegenden Daten legen eine solche Heterogenität für die Proteine des mTOR Signalwegs nahe und können vielleicht für mTOR einen Grund liefern, weshalb die Studienlage bezüglich einer Über- bzw. Unterexpression in PCA-Gewebe nicht eindeutig ist, da sich im benignen Referenzgewebe Expressionsunterschiede in Abhängigkeit von der Entfernung zwischen Probenentnahmeort und Tumorgewebe zeigten. Bei zukünftigen Arbeiten, welche die Expressionen von Proteinmarkern wie beispielsweise mTOR und p-mTOR in Gewebestanzungen untersuchen, sollte daher generell darauf geachtet werden, ob die Gewebestanzungen zentral oder peripher aus dem Tumor bzw. dem benignen Gewebe entnommen werden und dies auch in den entsprechenden Methodenteilen explizit erwähnt werden, um eine korrekte Vergleichbarkeit der Resultate zu ermöglichen. Die Ergebnisse lassen bereits erste Vermutungen zur molekularen Sequenz von Proteinereignissen bei der Tumorgenese und räumlichen Ausbreitung des Prostatakarzinoms zu und öffnen den Raum für umfangreiche weitere Untersuchungen.

## V ZUSAMMENFASSUNG

Die Bedeutung des mechanistic target of rapamycin (mTOR) Signalwegs beim Prostatakarzinom ist weiterhin unter wissenschaftlicher Untersuchung. Hauptsächlich im therapeutischen Bereich und als Biomarker könnte der Signalweg Anwendungsmöglichkeiten bieten. Tumorheterogenitäten erlangen erst seit kurzem das Augenmerk wissenschaftlicher Betrachtung und es sind bereits auch erste Daten über intra- und intertumorale Heterogenitäten beim Prostatakarzinom berichtet. Ziel der Studie war, den Einfluss von Heterogenitäten innerhalb der tumortragenden Prostata auf die Aussagekraft von mTOR Biomarkern -insbesondere für die prognostische Wertigkeit für den Krankheitsverlauf nach radikaler Prostatektomie- zu untersuchen.

Aus Prostatageweben von 115 Patienten, die mittels radikaler Prostatektomie behandelt wurden, wurde ein Tissue Microarray erstellt. Dabei wurden aus jeweils vier räumlichen Lokalisationen in Bezug zur Invasionsfront Gewebe herangezogen: A) aus dem Tumorzentrum des Haupttumors, B) aus Tumorgewebe unmittelbar an der Invasionsfront, C) aus histologischem Normalgewebe unmittelbar an der Invasionsfront und D) weit von den Tumorealen entferntes Normalgewebe der Prostata. Die Expressionen des mTOR, von phosphoryliertem mTOR (p-mTOR) und des eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1 (4E-BP1) wurden immunhistochemisch mittels immune reactive score 0-12 dargestellt und nach Median-Dichotomisierung in schwach (< Median) und stark mit dem individuellen Krankheitsverlauf nach Prostatektomie in Korrelation gebracht. Dabei wurde jeweils die Lokalisation des Gewebes A-D in Abhängigkeit der Invasionsfront in Betracht gezogen und auch der Aktivierungsstatus p-mTOR/mTOR (%mTOR) betrachtet.

Die mittleren Expressionen in den Entnahmeorte A, B, C und D waren im Falle mTOR 9.1, 8.8, 5.0 und 6.8 ( $p < 0.01$ ), für p-mTOR 7.4, 7.2, 2.0 und 4.6 ( $p < 0.01$ ) und für 4E-BP1 8.0, 7.4, 2.6 und 3.1 ( $p < 0.01$ ). Damit exprimieren die Tumoreale höher und direkt angrenzendes Normalgewebe am Geringsten. In Lokalisation A



zeigte sich p-mTOR in pT $\geq$ 3 Tumoren geringer im Vergleich zu pT $<$ 3 (6.3 vs. 8.0, p $<$ 0.05), während in Lokalisation B sowohl p-mTOR (5.8 vs. 7.9, p $<$ 0.02) als auch 4E-BP1 (6.3 vs. 7.8, p $<$ 0.03) und %mTOR (0.9 vs. 1.1, p $<$ 0.04) geringer exprimierten. Bei der Analyse der Krankheitsverläufe ergab sich ein signifikanter Einfluss von mTOR auf die Zeit zum Rezidiv ausschließlich für die Lokalisation B (p=0.0034, Log-Rank Test), während Lokalisation A diesen Zusammenhang nicht zeigte. Die univariate Regressionsanalyse bestätigte diesen Zusammenhang für mTOR in Lokalisation B (HR: 0.87, 95%-CI: 0.77-0.98, p $<$ 0.03). Der in einer multivariaten Analyse mit T-Stadium, R-Status und Gleason Summe gezeigte Einfluss von mTOR im Tumorgewebe allgemein (HR: 0.82, 95%-CI: 0.68-1.00, p $<$ 0.05) scheint dabei hauptsächlich auf den Anteil der Tumorrand-Ergebnisse zurück führbar zu sein.

Alle drei Biomarker zeigen hier erhöhte Expressionen in den Prostatakarzinom-Geweben mit deutlichen lokalen Gradienten in Bezug zur Invasionsfront. Die direkt angrenzende Normalgewebereiche scheinen tumorbiologische Reaktionen zu zeigen. Wie in aktueller Literatur vermutet, zeigt sich das mTOR System in höheren Stadien weniger aktiviert und kennzeichnet sich damit erneut als frühes Ereignis der Tumorprogression. Die prognostische Wertigkeit zumindest von mTOR zeigt sich lediglich in den Entnahmeorten an der direkten Invasionsfront deutlich während Tumorzentren keine prognostisch aussagekräftige Expression zeigten. In der vorliegenden Arbeit konnte nun zum ersten Mal gezeigt werden, dass die Resultate aus Biomarker Analysen möglicherweise auch vom Entnahmeort der Gewebeproben innerhalb des Tumors abhängig sind. Damit ist die Invasionsfront als maßgeblicher Ort der Tumorbiologie des Prostatakarzinoms charakterisiert. Diese Ergebnisse können weitere Untersuchungen und Interpretationen von Biomarkern zumindest des Prostatakarzinoms beeinflussen und weisen auf die wichtige Rolle der lokalen Heterogenität bei der Bewertung von Biomarkern hin. Die Untersuchung weitere und größerer Kollektive wird noch mehr Kenntnisse über diese Sachverhalte liefern.

## VI PUBLIKATION DER ERGEBNISSE

Daten der vorliegenden Arbeit wurden bereits auf Wissenschaftlichen Kongressen präsentiert:

52. Jahrestagung der Südwestdeutschen Gesellschaft für Urologie e.V., 07.04.2011 - 09.04.2011, Tübingen

1. Aufderklamm S, Hennenlotter J, Schilling D, Gakis GA, Vogel U, Kühs U, Gerber V, Knapp J, Stenzl A, Schwentner C, **Beim Prostatakarzinom ist die Aktivierung des mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Systems durch Überexpression des Proteins charakterisiert – nicht durch Hyperphosphorylierung**
2. Aufderklamm S, Hennenlotter J, Schilling D, Vogel U, Gakis GA, Kühs U, Gerber V, Knapp J, Stenzl A, Schwentner C, **Bedeutung von 4E-binding Protein in der Prostatakarzinomdiagnostik und seine Relevanz als prognostischer Marker**

und in wissenschaftlichen Zeitschriften publiziert:

Giorgio Ivan Russo, Jörg Hennenlotter, Ursula Kühs, Ulrich Vogel, Thomas Manfred Wurm, Valentina Gerber, Tim Neumann, Giuseppe Morgia, Arnulf Stenzl, Tilman Todenhöfer, MP29-03 MTOR EXPRESSION IN PROSTATE CANCER AND IMPLICATIONS AS PROGNOSTIC ROLE WITH META-ANALYSIS OF THE LITERATURE." The Journal of Urology, 199(4S), p. e366

Giorgio Ivan Russo, Jörg Hennenlotter, Ursula Kühs, Ulrich Vogel, Thomas Manfred Wurm, Valentina Gerber, Tim Neumann, Giuseppe Morgia, Arnulf Stenzl, Tilman Todenhöfer. **Intratumoral Heterogeneity Determines the Expression of mTOR-pathway Proteins in Prostate Cancer.** Disease Markers. (Russo et al., 2019)

## VII LITERATURVERZEICHNIS

- AALTOMAA, S., LIPPONEN, P., ESKELINEN, M., ALA-OPAS, M. & KOSMA, V. M. 1999. Prognostic value and expression of p21(waf1/cip1) protein in prostate cancer. *Prostate*, 39, 8-15.
- AALTOMAA, S., LIPPONEN, P., VESALAINEN, S., ALA-OPAS, M., ESKELINEN, M. & SYRJANEN, K. 1997. Value of Ki-67 immunolabelling as a prognostic factor in prostate cancer. *Eur Urol*, 32, 410-5.
- ADLER, H. L., MCCURDY, M. A., KATTAN, M. W., TIMME, T. L., SCARDINO, P. T. & THOMPSON, T. C. 1999. Elevated levels of circulating interleukin-6 and transforming growth factor-beta1 in patients with metastatic prostatic carcinoma. *J Urol*, 161, 182-7.
- ALAIN, T., MORITA, M., FONSECA, B. D., YANAGIYA, A., SIDDIQUI, N., BHAT, M., ZAMMIT, D., MARCUS, V., METRAKOS, P., VOYER, L. A., GANDIN, V., LIU, Y., TOPISIROVIC, I. & SONENBERG, N. 2012. eIF4E/4E-BP ratio predicts the efficacy of mTOR targeted therapies. *Cancer Res*, 72, 6468-76.
- ALBERTSEN, P. C., HANLEY, J. A. & FINE, J. 2005. 20-Year Outcomes Following Conservative Management of Clinically Localized Prostate Cancer. *JAMA*, 293, 2095-2101.
- AMARAL, C. L., FREITAS, L. B., TAMURA, R. E., TAVARES, M. R., PAVAN, I. C., BAJGELMAN, M. C. & SIMABUCO, F. M. 2016. S6Ks isoforms contribute to viability, migration, docetaxel resistance and tumor formation of prostate cancer cells. *BMC Cancer*, 16, 602.
- ARMENGOL, G., ROJO, F., CASTELLVI, J., IGLESIAS, C., CUATRECASAS, M., PONS, B., BASELGA, J. & RAMON Y CAJAL, S. 2007. 4E-binding protein 1: a key molecular "funnel factor" in human cancer with clinical implications. *Cancer Res*, 67, 7551-5.
- ARMSTRONG, A. J., NETTO, G. J., RUDEK, M. A., HALABI, S., WOOD, D. P., CREEL, P. A., MUNDY, K., DAVIS, S. L., WANG, T., ALBADINE, R., SCHULTZ, L., PARTIN, A. W., JIMENO, A., FEDOR, H., FEBBO, P. G., GEORGE, D. J., GURGANUS, R., DE MARZO, A. M. & CARDUCCI, M. A. 2010. A pharmacodynamic study of rapamycin in men with intermediate- to high-risk localized prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 16, 3057-66.
- AVDULOV, S., LI, S., MICHALEK, V., BURRICHTER, D., PETERSON, M., PERLMAN, D. M., MANIVEL, J. C., SONENBERG, N., YEE, D., BITTERMAN, P. B. & POLUNOVSKY, V. A. 2004. Activation of translation complex eIF4F is essential for the genesis and maintenance of the malignant phenotype in human mammary epithelial cells. *Cancer Cell*, 5, 553-63.
- AYALA, G., THOMPSON, T., YANG, G., FROLOV, A., LI, R., SCARDINO, P., OHORI, M., WHEELER, T. & HARPER, W. 2004. High levels of phosphorylated form of Akt-1 in prostate cancer and non-neoplastic prostate tissues are strong predictors of biochemical recurrence. *Clin Cancer Res*, 10, 6572-8.
- BANEZ, L. L., SUN, L., VAN LEENDERS, G. J., WHEELER, T. M., BANGMA, C. H., FREEDLAND, S. J., ITTMANN, M. M., LARK, A. L., MADDEN, J. F.,

- HARTMAN, A., WEISS, G. & CASTANOS-VELEZ, E. 2010. Multicenter clinical validation of PITX2 methylation as a prostate specific antigen recurrence predictor in patients with post-radical prostatectomy prostate cancer. *J Urol*, 184, 149-56.
- BARATA, P. C., MAGI-GALLUZZI, C., GUPTA, R., DREICER, R., KLEIN, E. A. & GARCIA, J. A. 2019. Association of mTOR Pathway Markers and Clinical Outcomes in Patients with Intermediate-/High-risk Prostate Cancer: Long-Term Analysis. *Clin Genitourin Cancer*, 17, 366-372.
- BARBIERI, C. E., BANGMA, C. H., BJARTELL, A., CATTO, J. W. F., CULIG, Z., GRÖNBERG, H., LUO, J., VISAKORPI, T. & RUBIN, M. A. 2013. The mutational landscape of prostate cancer. *European urology*, 64, 567-576.
- BASELGA, J., CAMPONE, M., PICCART, M., BURRIS, H. A., RUGO, H. S., SAHMOUD, T., NOGUCHI, S., GNANT, M., PRITCHARD, K. I., LEBRUN, F., BECK, J. T., ITO, Y., YARDLEY, D., DELEU, I., PEREZ, A., BACHELOT, T., VITTORI, L., XU, Z., MUKHOPADHYAY, P., LEBWOHL, D. & HORTOBAGYI, G. N. 2011. Everolimus in Postmenopausal Hormone-Receptor-Positive Advanced Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*, 366, 520-529.
- BAUER, J. J., SESTERHENN, I. A., MOSTOFI, F. K., MCLEOD, D. G., SRIVASTAVA, S. & MOUL, J. W. 1996. Elevated levels of apoptosis regulator proteins p53 and bcl-2 are independent prognostic biomarkers in surgically treated clinically localized prostate cancer. *J Urol*, 156, 1511-6.
- BEDKE, J., GOUTTEFANGEAS, C. & STENZL, A. 2012. Prostatakarzinom. *Der Urologe*, 51, 44-49.
- BERTZ, J., DAHM, S., HABERLAND, J., KRAYWINKEL, K., KURTH, B.-M. & WOLF, U. 2010. Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland - Entwicklung der Prävalenzen zwischen 1990 und 2010
- . *Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes*. Berlin: Robert Koch-Institut.
- BETTENCOURT, M. C., BAUER, J. J., SESTERHENN, I. A., MOSTOFI, F. K., MCLEOD, D. G. & MOUL, J. W. 1996. Ki-67 expression is a prognostic marker of prostate cancer recurrence after radical prostatectomy. *J Urol*, 156, 1064-8.
- BILL-AXELSON, A., HOLMBERG, L., FILEN, F., RUUTU, M., GARMO, H., BUSCH, C., NORDLING, S., HAGGMAN, M., ANDERSSON, S. O., BRATELL, S., SPANGBERG, A., PALMGREN, J., ADAMI, H. O., JOHANSSON, J. E. & SCANDINAVIAN PROSTATE CANCER GROUP STUDY, N. 2008. Radical prostatectomy versus watchful waiting in localized prostate cancer: the Scandinavian prostate cancer group-4 randomized trial. *J Natl Cancer Inst*, 100, 1144-54.
- BILL-AXELSON, A., HOLMBERG, L., RUUTU, M., GARMO, H., STARK, J. R., BUSCH, C., NORDLING, S., HÄGGMAN, M., ANDERSSON, S.-O., BRATELL, S., SPÅNGBERG, A., PALMGREN, J., STEINECK, G., ADAMI, H.-O. & JOHANSSON, J.-E. 2011. Radical Prostatectomy versus Watchful Waiting in Early Prostate Cancer. 364, 1708-1717.
- BISHOFF, J. T., FREEDLAND, S. J., GERBER, L., TENNSTEDT, P., REID, J., WELBOURN, W., GRAEFEN, M., SANGALE, Z., TIKISHVILI, E., PARK,

- J., YOUNUS, A., GUTIN, A., LANCHBURY, J. S., SAUTER, G., BRAWER, M., STONE, S. & SCHLOMM, T. 2014. Prognostic Utility of the Cell Cycle Progression Score Generated from Biopsy in Men Treated with Prostatectomy. *The Journal of Urology*, 192, 409-414.
- BOCCON-GIBOD, L., DJAVAN, W. B., HAMMERER, P., HOELTL, W., KATTAN, M. W., PRAYER-GALETTI, T., TEILLAC, P. & TUNN, U. W. 2004. Management of prostate-specific antigen relapse in prostate cancer: a European Consensus. *Int J Clin Pract*, 58, 382-90.
- BONO, J. S. D., LOGOTHETIS, C. J., MOLINA, A., FIZAZI, K., NORTH, S., CHU, L., CHI, K. N., JONES, R. J., GOODMAN, O. B. & SAAD, F. 2011. Abiraterone and increased survival in metastatic prostate cancer. *New England Journal of Medicine*, 364, 1995-2005.
- BOS, J. L. 1989. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res*, 49, 4682-9.
- BOUSSEMART, L., MALKA-MAHIEU, H., GIRAULT, I., ALLARD, D., HEMMINGSSON, O., TOMASIC, G., THOMAS, M., BASMADJIAN, C., RIBEIRO, N., THUAUD, F., MATEUS, C., ROUTIER, E., KAMSU-KOM, N., AGOUSSI, S., EGGERMONT, A. M., DESAUBRY, L., ROBERT, C. & VAGNER, S. 2014. eIF4F is a nexus of resistance to anti-BRAF and anti-MEK cancer therapies. *Nature*, 513, 105-9.
- BOUTROS, P. C., FRASER, M., HARDING, N. J., DE BORJA, R., TRUDEL, D., LALONDE, E., MENG, A., HENNINGS-YEOMANS, P. H., MCPHERSON, A., SABELNYKOVA, V. Y., ZIA, A., FOX, N. S., LIVINGSTONE, J., SHIAH, Y. J., WANG, J., BECK, T. A., HAVE, C. L., CHONG, T., SAM, M., JOHNS, J., TIMMS, L., BUCHNER, N., WONG, A., WATSON, J. D., SIMMONS, T. T., P'NG, C., ZAFARANA, G., NGUYEN, F., LUO, X., CHU, K. C., PROKOPEC, S. D., SYKES, J., DAL PRA, A., BERLIN, A., BROWN, A., CHAN-SENG-YUE, M. A., YOUSIF, F., DENROCHE, R. E., CHONG, L. C., CHEN, G. M., JUNG, E., FUNG, C., STARMANS, M. H., CHEN, H., GOVIND, S. K., HAWLEY, J., D'COSTA, A., PINTILIE, M., WAGGOTT, D., HACH, F., LAMBIN, P., MUTHUSWAMY, L. B., COOPER, C., EELES, R., NEAL, D., TETU, B., SAHINALP, C., STEIN, L. D., FLESHNER, N., SHAH, S. P., COLLINS, C. C., HUDSON, T. J., MCPHERSON, J. D., VAN DER KWAST, T. & BRISTOW, R. G. 2015. Spatial genomic heterogeneity within localized, multifocal prostate cancer. *Nat Genet*, 47, 736-45.
- BRAMHECHA, Y. M., ROUZBEH, S., GUERARD, K. P., SCARLATA, E., BRIMO, F., CHEVALIER, S., HAMEL, L., APRIKIAN, A. G. & LAPOINTE, J. 2019. The combination of PTEN deletion and 16p13.3 gain in prostate cancer provides additional prognostic information in patients treated with radical prostatectomy. *Mod Pathol*, 32, 128-138.
- BRAY, F., FERLAY, J., SOERJOMATARAM, I., SIEGEL, R. L., TORRE, L. A. & JEMAL, A. 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 68, 394-424.
- BROWN, E. J., ALBERS, M. W., SHIN, T. B., ICHIKAWA, K., KEITH, C. T., LANE, W. S. & SCHREIBER, S. L. 1994. A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature*, 369, 756-8.

- BROWN, E. J., BEAL, P. A., KEITH, C. T., CHEN, J., SHIN, T. B. & SCHREIBER, S. L. 1995. Control of p70 s6 kinase by kinase activity of FRAP in vivo. *Nature*, 377, 441-6.
- BRUGAROLAS, J., LEI, K., HURLEY, R. L., MANNING, B. D., REILING, J. H., HAFEN, E., WITTERS, L. A., ELLISEN, L. W. & KAELIN, W. G., JR. 2004. Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. *Genes Dev*, 18, 2893-904.
- BRUNN, G. J., HUDSON, C. C., SEKULIC, A., WILLIAMS, J. M., HOSOI, H., HOUGHTON, P. J., LAWRENCE, J. C., JR. & ABRAHAM, R. T. 1997. Phosphorylation of the translational repressor PHAS-I by the mammalian target of rapamycin. *Science*, 277, 99-101.
- BUBENDORF, L., SAUTER, G., MOCH, H., SCHMID, H. P., GASSER, T. C., JORDAN, P. & MIHATSCH, M. J. 1996. Ki67 labelling index: an independent predictor of progression in prostate cancer treated by radical prostatectomy. *J Pathol*, 178, 437-41.
- BUHMEIDA, A., PYRHONEN, S., LAATO, M. & COLLAN, Y. 2006. Prognostic factors in prostate cancer. *Diagn Pathol*, 1, 4.
- CAI, W., YE, Q. & SHE, Q.-B. 2014. Loss of 4E-BP1 function induces EMT and promotes cancer cell migration and invasion via cap-dependent translational activation of snail. *Oncotarget*, 5, 6015-6027.
- CAO, G. D., CHEN, K., CHEN, B. & XIONG, M. M. 2017. Positive prognostic value of HER2-HER3 co-expression and p-mTOR in gastric cancer patients. *BMC Cancer*, 17, 841.
- CHE, M., DESILVIO, M., POLLACK, A., GRIGNON, D. J., VENKATESAN, V. M., HANKS, G. E., SANDLER, H. M. & RTOG 2007. Prognostic value of abnormal p53 expression in locally advanced prostate cancer treated with androgen deprivation and radiotherapy: a study based on RTOG 9202. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 69, 1117-23.
- CHEN, N. & ZHOU, Q. 2016. The evolving Gleason grading system. *Chin J Cancer Res*, 28, 58-64.
- CHOO, A. Y., YOON, S. O., KIM, S. G., ROUX, P. P. & BLENIS, J. 2008. Rapamycin differentially inhibits S6Ks and 4E-BP1 to mediate cell-type-specific repression of mRNA translation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 17414-9.
- CONCATO, J., JAIN, D., UCHIO, E., RISCH, H., LI, W. W. & WELLS, C. K. 2009. Molecular markers and death from prostate cancer. *Ann Intern Med*, 150, 595-603.
- CONSTANTINOU, C., ELIA, A. & CLEMENS, M. J. 2008. Activation of p53 stimulates proteasome-dependent truncation of eIF4E-binding protein 1 (4E-BP1). *Biol Cell*, 100, 279-89.
- COX, D. R. 1972. Regression Models and Life-Tables. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, 34, 187-220.
- CRAWFORD, E. D., SCHOLZ, M. C., KAR, A. J., FEGAN, J. E., HAREGEWOIN, A., KALDATE, R. R. & BRAWER, M. K. 2014. Cell cycle progression score and treatment decisions in prostate cancer: results from an ongoing registry. *Current Medical Research and Opinion*, 30, 1025-1031.
- CRINO, P. B., NATHANSON, K. L. & HENSKE, E. P. 2006. The tuberous sclerosis complex. *N Engl J Med*, 355, 1345-56.

- CULLEN, J., ROSNER, I. L., BRAND, T. C., ZHANG, N., TSIATIS, A. C., MONCUR, J., ALI, A., CHEN, Y., KNEZEVIC, D., MADDALA, T., LAWRENCE, H. J., FEBBO, P. G., SRIVASTAVA, S., SESTERHENN, I. A. & MCLEOD, D. G. 2015. A Biopsy-based 17-gene Genomic Prostate Score Predicts Recurrence After Radical Prostatectomy and Adverse Surgical Pathology in a Racially Diverse Population of Men with Clinically Low- and Intermediate-risk Prostate Cancer. *European Urology*, 68, 123-131.
- CUZICK, J., STONE, S., FISHER, G., YANG, Z. H., NORTH, B. V., BERNEY, D. M., BELTRAN, L., GREENBERG, D., MØLLER, H., REID, J. E., GUTIN, A., LANCHBURY, J. S., BRAWER, M. & SCARDINO, P. 2015. Validation of an RNA cell cycle progression score for predicting death from prostate cancer in a conservatively managed needle biopsy cohort. *British Journal Of Cancer*, 113, 382.
- CUZICK, J., SWANSON, G. P., FISHER, G., BROTHMAN, A. R., BERNEY, D. M., REID, J. E., MESHER, D., SPEIGHTS, V. O., STANKIEWICZ, E., FOSTER, C. S., MØLLER, H., SCARDINO, P., WARREN, J. D., PARK, J., YOUNUS, A., FLAKE, D. D., WAGNER, S., GUTIN, A., LANCHBURY, J. S. & STONE, S. 2011. Prognostic value of an RNA expression signature derived from cell cycle proliferation genes in patients with prostate cancer: a retrospective study. *The Lancet Oncology*, 12, 245-255.
- D'ABRONZO, L. S. & GHOSH, P. M. 2018. eIF4E Phosphorylation in Prostate Cancer. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 20, 563-573.
- D'AMICO, A. V., WHITTINGTON, R., MALKOWICZ, S. B., SCHULTZ, D., BLANK, K., BRODERICK, G. A., TOMASZEWSKI, J. E., RENSHAW, A. A., KAPLAN, I., BEARD, C. J. & WEIN, A. 1998. Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer. *JAMA*, 280, 969-74.
- DAI, B., KONG, Y. Y., YE, D. W., MA, C. G., ZHOU, X. & YAO, X. D. 2009. Activation of the mammalian target of rapamycin signalling pathway in prostate cancer and its association with patient clinicopathological characteristics. *BJU Int*, 104, 1009-16.
- DATTA, S. R., DUDEK, H., TAO, X., MASTERS, S., FU, H., GOTOH, Y. & GREENBERG, M. E. 1997. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*, 91, 231-41.
- DE BONO, J. S., OUDARD, S., OZGUROGLU, M., HANSEN, S., MACHIELS, J. P., KOCAK, I., GRAVIS, G., BODROGI, I., MACKENZIE, M. J., SHEN, L., ROESSNER, M., GUPTA, S. & SARTOR, A. O. 2010. Prednisone plus cabazitaxel or mitoxantrone for metastatic castration-resistant prostate cancer progressing after docetaxel treatment: a randomised open-label trial. *Lancet*, 376, 1147-54.
- DELACROIX, S. E. & WARD, J. F. 2010. Prostate cancer multifocality: impact on cancer biology and treatment recommendations. *Panminerva Med*, 52, 209-16.
- DEMICHELIS, F., FALL, K., PERNER, S., ANDREN, O., SCHMIDT, F., SETLUR, S. R., HOSHIDA, Y., MOSQUERA, J. M., PAWITAN, Y., LEE, C., ADAMI, H. O., MUCCI, L. A., KANTOFF, P. W., ANDERSSON, S. O.,

- CHINNAIYAN, A. M., JOHANSSON, J. E. & RUBIN, M. A. 2007. TMPRSS2:ERG gene fusion associated with lethal prostate cancer in a watchful waiting cohort. *Oncogene*, 26, 4596-9.
- DENIS, L., MORTON, M. S. & GRIFFITHS, K. 1999. Diet and its preventive role in prostatic disease. *Eur Urol*, 35, 377-87.
- DEUTSCHE KREBSGESELLSCHAFT, DEUTSCHE KREBSHILFE & AWMF 2019. Leitlinienprogramm Onkologie: Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms, Kurzversion 5.1, 2019 *In: DEUTSCHE KREBSGESELLSCHAFT, D. K., AWMF (ed.)*.
- DEYOUNG, M. P., HORAK, P., SOFER, A., SGROI, D. & ELLISEN, L. W. 2008. Hypoxia regulates TSC1/2-mTOR signaling and tumor suppression through REDD1-mediated 14-3-3 shuttling. *Genes & development*, 22, 239-251.
- DHILLON, T., MAURI, F. A., BELLEZZA, G., CAGINI, L., BARBARESCHI, M., NORTH, B. V. & SECKL, M. J. 2010. Overexpression of the mammalian target of rapamycin: a novel biomarker for poor survival in resected early stage non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*, 5, 314-9.
- DU, Y., LONG, Q., SHI, Y., LIU, X., LI, X., ZENG, J., GONG, Y., LI, L., WANG, X. & HE, D. 2015. Insulin-like growth factor binding protein-3 mediates interleukin-24-induced apoptosis through inhibition of the mTOR pathway in prostate cancer. *Oncol Rep*, 34, 2273-81.
- DU, Y. F., LONG, Q. Z., SHI, Y., LIU, X. G., LI, X. D., ZENG, J., GONG, Y. G., WANG, X. Y. & HE, D. L. 2014. Downregulation of mTOR by lentivirus inhibits prostate cancer cell growth. *Int J Clin Exp Pathol*, 7, 923-31.
- DUCKER, G. S., ATREYA, C. E., SIMKO, J. P., HOM, Y. K., MATLI, M. R., BENES, C. H., HANN, B., NAKAKURA, E. K., BERGSLAND, E. K., DONNER, D. B., SETTLEMAN, J., SHOKAT, K. M. & WARREN, R. S. 2014. Incomplete inhibition of phosphorylation of 4E-BP1 as a mechanism of primary resistance to ATP-competitive mTOR inhibitors. *Oncogene*, 33, 1590-600.
- DUNSMUIR, W. D., GILLETT, C. E., MEYER, L. C., YOUNG, M. P., CORBISHLEY, C., EELES, R. A. & KIRBY, R. S. 2000. Molecular markers for predicting prostate cancer stage and survival. 86, 869-878.
- EDLIND, M. P. & HSIEH, A. C. 2014. PI3K-AKT-mTOR signaling in prostate cancer progression and androgen deprivation therapy resistance. *Asian journal of andrology*, 16, 378-386.
- EFEYAN, A. & SABATINI, D. M. 2010. mTOR and cancer: many loops in one pathway. *Current opinion in cell biology*, 22, 169-176.
- EICHENAUER, T., HUSSEIN, M., HUBE-MAGG, C., KLUTH, M., BUSCHECK, F., HOFLMAYER, D., TSOURLAKIS, M. C., STEURER, S., CLAUDITZ, T. S., LUEBKE, A. M., BURANDT, E., WILCZAK, W., HINSCH, A., DUM, D., BEYER, B., STEUBER, T., HULAND, H., GRAEFEN, M., SIMON, R., SAUTER, G., MELLING, N., SCHLOMM, T. & MINNER, S. 2019. A nuclear shift of GSK3beta protein is an independent prognostic factor in prostate cancer. *Oncotarget*, 10, 1729-1744.
- EPSTEIN, J. I., EGEVAD, L., AMIN, M. B., DELAHUNT, B., SRIGLEY, J. R., HUMPHREY, P. A. & GRADING, C. 2016a. The 2014 International Society



- of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma: Definition of Grading Patterns and Proposal for a New Grading System. *Am J Surg Pathol*, 40, 244-52.
- EPSTEIN, J. I., EGEVAD, L., AMIN, M. B., DELAHUNT, B., SRIGLEY, J. R. & HUMPHREY, P. A. J. T. A. J. O. S. P. 2016b. The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) consensus conference on Gleason grading of prostatic carcinoma. 40, 244-252.
- ETZIONI, R., PENSON, D. F., LEGLER, J. M., DI TOMMASO, D., BOER, R., GANN, P. H. & FEUER, E. J. 2002. Overdiagnosis Due to Prostate-Specific Antigen Screening: Lessons From U.S. Prostate Cancer Incidence Trends. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 94, 981-990.
- EVREN, S., DERMEN, A., LOCKWOOD, G., FLESHNER, N. & SWEET, J. 2010. Immunohistochemical examination of the mTORC1 pathway in high grade prostatic intraepithelial neoplasia (HGPIN) and prostatic adenocarcinomas (PCa): a tissue microarray study (TMA). *Prostate*, 70, 1429-36.
- FAN, Q.-W., KNIGHT, Z. A., GOLDENBERG, D. D., YU, W., MOSTOV, K. E., STOKOE, D., SHOKAT, K. M. & WEISS, W. A. 2006. A dual PI3 kinase/mTOR inhibitor reveals emergent efficacy in glioma. *Cancer Cell*, 9, 341-349.
- FEI, B. 2019. A New Technique for Targeted Prostate Cancer Biopsies. *Scientia*.
- FENG, Z., HU, W., DE STANCHINA, E., TERESKY, A. K., JIN, S., LOWE, S. & LEVINE, A. J. 2007. The regulation of AMPK beta1, TSC2, and PTEN expression by p53: stress, cell and tissue specificity, and the role of these gene products in modulating the IGF-1-AKT-mTOR pathways. *Cancer Res*, 67, 3043-53.
- FENG, Z., ZHANG, H., LEVINE, A. J. & JIN, S. 2005. The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 8204.
- FIZAZI, K., SCHER, H. I., MOLINA, A., LOGOTHETIS, C. J., CHI, K. N., JONES, R. J., STAFFURTH, J. N., NORTH, S., VOGELZANG, N. J., SAAD, F., MAINWARING, P., HARLAND, S., GOODMAN, O. B., JR., STERNBERG, C. N., LI, J. H., KHEOH, T., HAQQ, C. M. & DE BONO, J. S. 2012. Abiraterone acetate for treatment of metastatic castration-resistant prostate cancer: final overall survival analysis of the COU-AA-301 randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 study. *Lancet Oncol*, 13, 983-92.
- FREEDLAND, S. J., GERBER, L., REID, J., WELBOURN, W., TIKISHVILI, E., PARK, J., YOUNUS, A., GUTIN, A., SANGALE, Z., LANCHBURY, J. S., SALAMA, J. K. & STONE, S. 2013. Prognostic Utility of Cell Cycle Progression Score in Men With Prostate Cancer After Primary External Beam Radiation Therapy. *International Journal of Radiation Oncology\*Biophysics*, 86, 848-853.
- FURIC, L., RONG, L., LARSSON, O., KOUMAKPAYI, I. H., YOSHIDA, K., BRUESCHKE, A., PETROULAKIS, E., ROBICHAUD, N., POLLAK, M., GABOURY, L. A., PANDOLFI, P. P., SAAD, F. & SONENBERG, N. 2010. eIF4E phosphorylation promotes tumorigenesis and is associated with

- prostate cancer progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, 14134-14139.
- GARCIA-MARTINEZ, J. M. & ALESSI, D. R. 2008. mTOR complex 2 (mTORC2) controls hydrophobic motif phosphorylation and activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1). *Biochem J*, 416, 375-85.
- GATELY, K., AL-ALAO, B., DHILLON, T., MAURI, F., CUFFE, S., SECKL, M. & O'BYRNE, K. 2012. Overexpression of the mammalian target of rapamycin (mTOR) and angiogenesis are poor prognostic factors in early stage NSCLC: a verification study. *Lung Cancer*, 75, 217-22.
- GEIGES, A. C. 2019. *Evaluation von Alterationen innerhalb der mTOR-Regulation entlang der Progression zum metastasierten Prostatakarzinom – Immunhistochemische Untersuchungen mittels Tissue-Microarray-Technik*. Eberhard Karls Universität Tübingen.
- GERLINGER, M., ROWAN, A. J., HORSWELL, S., MATH, M., LARKIN, J., ENDESFELDER, D., GRONROOS, E., MARTINEZ, P., MATTHEWS, N., STEWART, A., TARPEY, P., VARELA, I., PHILLIMORE, B., BEGUM, S., MCDONALD, N. Q., BUTLER, A., JONES, D., RAINE, K., LATIMER, C., SANTOS, C. R., NOHADANI, M., EKLUND, A. C., SPENCER-DENE, B., CLARK, G., PICKERING, L., STAMP, G., GORE, M., SZALLASI, Z., DOWNWARD, J., FUTREAL, P. A. & SWANTON, C. 2012. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med*, 366, 883-892.
- GINGRAS, A. C., GYGI, S. P., RAUGHT, B., POLAKIEWICZ, R. D., ABRAHAM, R. T., HOEKSTRA, M. F., AEBERSOLD, R. & SONENBERG, N. 1999a. Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism. *Genes Dev*, 13, 1422-37.
- GINGRAS, A. C., KENNEDY, S. G., O'LEARY, M. A., SONENBERG, N. & HAY, N. 1998. 4E-BP1, a repressor of mRNA translation, is phosphorylated and inactivated by the Akt(PKB) signaling pathway. *Genes Dev*, 12, 502-13.
- GINGRAS, A. C., RAUGHT, B. & SONENBERG, N. 1999b. eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu Rev Biochem*, 68, 913-63.
- GLEASON, D. F. & MELLINGER, G. T. 1974. Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *J Urol*, 111, 58-64.
- GOSSELAAR, C., ROOBOL, M. J., ROEMELING, S. & SCHRODER, F. H. 2008a. The role of the digital rectal examination in subsequent screening visits in the European randomized study of screening for prostate cancer (ERSPC), Rotterdam. *Eur Urol*, 54, 581-8.
- GOSSELAAR, C., ROOBOL, M. J., ROEMELING, S., WOLTERS, T., VAN LEENDERS, G. J. & SCHRODER, F. H. 2008b. The value of an additional hypoechoic lesion-directed biopsy core for detecting prostate cancer. *BJU Int*, 101, 685-90.
- GRAEFEN, M., KARAKIEWICZ, P. I., CAGIANNOS, I., QUINN, D. I., HENSHALL, S. M., GRYGIEL, J. J., SUTHERLAND, R. L., STRICKER, P. D., KLEIN, E., KUPELIAN, P., SKINNER, D. G., LIESKOVSKY, G., BOCHNER, B., HULAND, H., HAMMERER, P. G., HAESE, A., ERBERSDOBLER, A., EASTHAM, J. A., DE KERNION, J., CANGIANO,

- T., SCHRODER, F. H., WILDHAGEN, M. F., VAN DER KWAST, T. H., SCARDINO, P. T. & KATTAN, M. W. 2002. International validation of a preoperative nomogram for prostate cancer recurrence after radical prostatectomy. *J Clin Oncol*, 20, 3206-12.
- GRAFF, J. R., KONICEK, B. W., LYNCH, R. L., DUMSTORF, C. A., DOWLESS, M. S., MCNULTY, A. M., PARSONS, S. H., BRAIL, L. H., COLLIGAN, B. M., KOOP, J. W., HURST, B. M., DEDDENS, J. A., NEUBAUER, B. L., STANCATO, L. F., CARTER, H. W., DOUGLASS, L. E. & CARTER, J. H. 2009. eIF4E activation is commonly elevated in advanced human prostate cancers and significantly related to reduced patient survival. *Cancer Res*, 69, 3866-73.
- GRAFF, J. R., KONICEK, B. W., MCNULTY, A. M., WANG, Z., HOUCK, K., ALLEN, S., PAUL, J. D., HBAIU, A., GOODE, R. G., SANDUSKY, G. E., VESSELLA, R. L. & NEUBAUER, B. L. 2000. Increased AKT activity contributes to prostate cancer progression by dramatically accelerating prostate tumor growth and diminishing p27Kip1 expression. *J Biol Chem*, 275, 24500-5.
- GRIGNON, D. J., CAPLAN, R., SARKAR, F. H., LAWTON, C. A., HAMMOND, E. H., PILEPICH, M. V., FORMAN, J. D., MESIC, J., FU, K. K., ABRAMS, R. A., PAJAK, T. F., SHIPLEY, W. U. & COX, J. D. 1997. p53 status and prognosis of locally advanced prostatic adenocarcinoma: a study based on RTOG 8610. *J Natl Cancer Inst*, 89, 158-65.
- GRÖNBERG, H. 2003. Prostate cancer epidemiology. *The Lancet*, 361, 859-864.
- GU, W., ZHANG, F. & LUPSKI, J. R. 2008. Mechanisms for human genomic rearrangements. *PathoGenetics*, 1, 4-4.
- GUO, T., LI, L., ZHONG, Q., RUPP, N. J., CHARMPI, K., WONG, C. E., WAGNER, U., RUESCHOFF, J. H., JOCHUM, W., FANKHAUSER, C. D., SABA, K., POYET, C., WILD, P. J., AEBERSOLD, R. & BEYER, A. 2018. Multi-region proteome analysis quantifies spatial heterogeneity of prostate tissue biomarkers. *Life science alliance*, 1, e201800042.
- GWINN, D. M., SHACKELFORD, D. B., EGAN, D. F., MIHAYLOVA, M. M., MERY, A., VASQUEZ, D. S., TURK, B. E. & SHAW, R. J. 2008. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell*, 30, 214-26.
- HAFFNER, M. C., MOSBRUGER, T., ESOP, D. M., FEDOR, H., HEAPHY, C. M., WALKER, D. A., ADEJOLA, N., GUREL, M., HICKS, J., MEEKER, A. K., HALUSHKA, M. K., SIMONS, J. W., ISAACS, W. B., DE MARZO, A. M., NELSON, W. G. & YEGNASUBRAMANIAN, S. 2013. Tracking the clonal origin of lethal prostate cancer. *J Clin Invest*, 123, 4918-22.
- HAIDER, M. A., BROWN, J., YAO, X., CHIN, J., PERLIS, N., SCHIEDA, N. & LOBLAW, A. 2021. Multiparametric Magnetic Resonance Imaging in the Diagnosis of Clinically Significant Prostate Cancer: an Updated Systematic Review. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, 33, e599-e612.
- HAKENBERG, O. W., WIRTH, M. P., HERMANN, T., ALKEN, P., KOVACS, G., MÜLLER, R. P., AHLEMANN, L. & SCHALKHÄUSER, K. 2003. Recommendations for the Treatment of Localized Prostate Cancer by Permanent Interstitial Brachytherapy. *Urologia Internationalis*, 70, 15-20.
- HALL, M. N. 2008. mTOR-what does it do? *Transplant Proc*, 40, S5-8.

- HALVORSEN, O. J., HAUKAAS, S. A. & AKSLEN, L. A. 2003. Combined loss of PTEN and p27 expression is associated with tumor cell proliferation by Ki-67 and increased risk of recurrent disease in localized prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 9, 1474-9.
- HAN, J., SONG, J., LI, X., ZHU, M., GUO, W., XING, W., ZHAO, R., HE, X., LIU, X., WANG, S., LI, Y., HUANG, H. & XU, X. 2015. Ligustrazine Suppresses the Growth of HRPC Cells through the Inhibition of Cap- Dependent Translation Via Both the mTOR and the MEK/ERK Pathways. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*, 15.
- HARDT, M., CHANTARAVISOOT, N. & TAMANOI, F. 2011. Activating mutations of TOR (target of rapamycin). *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*, 16, 141-151.
- HARRELL, F. E., JR., LEE, K. L., CALIFF, R. M., PRYOR, D. B. & ROSATI, R. A. 1984. Regression modelling strategies for improved prognostic prediction. *Stat Med*, 3, 143-52.
- HARRELL, F. E., JR., LEE, K. L. & MARK, D. B. 1996. Multivariable prognostic models: issues in developing models, evaluating assumptions and adequacy, and measuring and reducing errors. *Stat Med*, 15, 361-87.
- HAY, N. & SONENBERG, N. 2004. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev*, 18, 1926-45.
- HEBERT, J. R., HURLEY, T. G., OLENDZKI, B. C., TEAS, J., MA, Y. & HAMPL, J. S. 1998. Nutritional and socioeconomic factors in relation to prostate cancer mortality: a cross-national study. *J Natl Cancer Inst*, 90, 1637-47.
- HEIDENREICH, A., BASTIAN, P. J., BELLMUNT, J., BOLLA, M., JONIAU, S., VAN DER KWAST, T., MASON, M., MATVEEV, V., WIEGEL, T., ZATTONI, F., MOTTET, N. & EUROPEAN ASSOCIATION OF, U. 2014. EAU guidelines on prostate cancer. part 1: screening, diagnosis, and local treatment with curative intent-update 2013. *Eur Urol*, 65, 124-37.
- HEITMAN, J., MOVVA, N. R. & HALL, M. N. 1991. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science*, 253, 905-9.
- HENI, M., HENNENLOTTER, J., SCHARPF, M., LUTZ, S. Z., SCHWENTNER, C., TODENHOFER, T., SCHILLING, D., KUHS, U., GERBER, V., MACHICAO, F., STAIGER, H., HARING, H. U. & STENZL, A. 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, e50953.
- HOLZ, M. K., BALLIF, B. A., GYGI, S. P. & BLENIS, J. 2005. mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered phosphorylation events. *Cell*, 123, 569-80.
- HSU, H. S., LIN, M. H., JANG, Y. H., KUO, T. T., LIU, C. C. & CHENG, T. H. 2015. The 4E-BP1/eIF4E ratio is a determinant for rapamycin response in esophageal cancer cells. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 149, 378-85.
- HUANG, J., DIBBLE, C. C., MATSUZAKI, M. & MANNING, B. D. 2008. The TSC1-TSC2 Complex Is Required for Proper Activation of mTOR Complex 2. *Molecular and Cellular Biology*, 28, 4104.
- HUDES, G., CARDUCCI, M., TOMCZAK, P., DUTCHER, J., FIGLIN, R., KAPOOR, A., STAROSLAWSKA, E., SOSMAN, J., MCDERMOTT, D., BODROGI, I., KOVACEVIC, Z., LESOVOY, V., SCHMIDT-WOLF, I. G.,

- BARBARASH, O., GOKMEN, E., O'TOOLE, T., LUSTGARTEN, S., MOORE, L. & MOTZER, R. J. 2007. Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma. *N Engl J Med*, 356, 2271-81.
- HUGGINS, C. & HODGES, C. V. 1941. Studies on Prostatic Cancer. I. The Effect of Castration, of Estrogen and of Androgen Injection on Serum Phosphatases in Metastatic Carcinoma of the Prostate. *Cancer Research*, 1, 293.
- HUMPHREY, P. A. 2004. Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate. *Mod Pathol*, 17, 292-306.
- INOKI, K., LI, Y., ZHU, T., WU, J. & GUAN, K. L. 2002. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol*, 4, 648-57.
- ITO, K., KUBOTA, Y., SUZUKI, K., SHIMIZU, N., FUKABORI, Y., KUROKAWA, K., IMAI, K. & YAMANAKA, H. 2000. Correlation of prostate-specific antigen before prostate cancer detection and clinicopathologic features: evaluation of mass screening populations. *Urology*, 55, 705-9.
- JENDROSSEK, V., HENKEL, M., HENNENLOTTER, J., VOGEL, U., GANSWINDT, U., MULLER, I., HANDRICK, R., ANASTASIADIS, A. G., KUCZYK, M., STENZL, A. & BELKA, C. 2008. Analysis of complex protein kinase B signalling pathways in human prostate cancer samples. *BJU Int*, 102, 371-82.
- JHANWAR-UNIYAL, M., GILLICK, J. L., NEIL, J., TOBIAS, M., THWING, Z. E. & MURALI, R. 2015. Distinct signaling mechanisms of mTORC1 and mTORC2 in glioblastoma multiforme: a tale of two complexes. *Adv Biol Regul*, 57, 64-74.
- JOHNS, L. E. & HOULSTON, R. S. 2003. A systematic review and meta-analysis of familial prostate cancer risk. *BJU Int*, 91, 789-94.
- JUNG, C. H., JUN, C. B., RO, S. H., KIM, Y. M., OTTO, N. M., CAO, J., KUNDU, M. & KIM, D. H. 2009. ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol Biol Cell*, 20, 1992-2003.
- KAATSCH, P., SPIX, C., HENTSCHEL, S., KATALINIC, A., LUTTMANN, S. & STEGMAIER, C. 2013. Krebs in Deutschland 2009/2010. *Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes*. 9 ed. Berlin: Robert Koch-Institut.
- KARAVITAKIS, M., WINKLER, M., ABEL, P., LIVNI, N., BECKLEY, I. & AHMED, H. U. 2011. Histological characteristics of the index lesion in whole-mount radical prostatectomy specimens: implications for focal therapy. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 14, 46-52.
- KATTAN, M. W., EASTHAM, J. A., STAPLETON, A. M., WHEELER, T. M. & SCARDINO, P. T. 1998. A preoperative nomogram for disease recurrence following radical prostatectomy for prostate cancer. *J Natl Cancer Inst*, 90, 766-71.
- KATTAN, M. W., WHEELER, T. M. & SCARDINO, P. T. 1999. Postoperative nomogram for disease recurrence after radical prostatectomy for prostate cancer. *J Clin Oncol*, 17, 1499-507.
- KIM, E., GORAKSHA-HICKS, P., LI, L., NEUFELD, T. P. & GUAN, K. L. 2008. Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response. *Nat Cell Biol*, 10, 935-45.

- KIM, Y. Y., VON WEYMARN, L., LARSSON, O., FAN, D., UNDERWOOD, J. M., PETERSON, M. S., HECHT, S. S., POLUNOVSKY, V. A. & BITTERMAN, P. B. 2009. Eukaryotic initiation factor 4E binding protein family of proteins: sentinels at a translational control checkpoint in lung tumor defense. *Cancer Res*, 69, 8455-62.
- KLEIN, E. A., COOPERBERG, M. R., MAGI-GALLUZZI, C., SIMKO, J. P., FALZARANO, S. M., MADDALA, T., CHAN, J. M., LI, J., COWAN, J. E., TSIATIS, A. C., CHERBAVAZ, D. B., PELHAM, R. J., TENGGARA-HUNTER, I., BAEHNER, F. L., KNEZEVIC, D., FEBBO, P. G., SHAK, S., KATTAN, M. W., LEE, M. & CARROLL, P. R. 2014. A 17-gene Assay to Predict Prostate Cancer Aggressiveness in the Context of Gleason Grade Heterogeneity, Tumor Multifocality, and Biopsy Undersampling. *European Urology*, 66, 550-560.
- KREISBERG, J. I., MALIK, S. N., PRIHODA, T. J., BEDOLLA, R. G., TROYER, D. A., KREISBERG, S. & GHOSH, P. M. 2004. Phosphorylation of Akt (Ser473) is an excellent predictor of poor clinical outcome in prostate cancer. *Cancer Res*, 64, 5232-6.
- KREMER, C. L., KLEIN, R. R., MENDELSON, J., BROWNE, W., SAMADZEDEH, L. K., VANPATTEN, K., HIGHSTROM, L., PESTANO, G. A. & NAGLE, R. B. 2006. Expression of mTOR signaling pathway markers in prostate cancer progression. *Prostate*, 66, 1203-12.
- KRETSCHMER, A., TOLKACH, Y., ELLINGER, J. & KRISTIANSEN, G. 2017. [Molecular biomarkers and prognostic factors for prostate cancer]. *Urologe A*, 56, 933-944.
- KRISTIANSEN, G. 2012. Diagnostic and prognostic molecular biomarkers for prostate cancer. *Histopathology*, 60, 125-41.
- KRUCZEK, K., RATTERMAN, M., TOLZIEN, K., SULO, S., LESTINGI, T. M. & NABHAN, C. 2013. A phase II study evaluating the toxicity and efficacy of single-agent temsirolimus in chemotherapy-naïve castration-resistant prostate cancer. *British journal of cancer*, 109, 1711-1716.
- KUCZYK, M. A., SERTH, J., BOKEMEYER, C., MACHTENS, S., MINSSSEN, A., BATHKE, W., HARTMANN, J. & JONAS, U. 1998. The prognostic value of p53 for long-term and recurrence-free survival following radical prostatectomy. *Eur J Cancer*, 34, 679-86.
- LAMMING, D. W., YE, L., KATAJISTO, P., GONCALVES, M. D., SAITOH, M., STEVENS, D. M., DAVIS, J. G., SALMON, A. B., RICHARDSON, A., AHIMA, R. S., GUERTIN, D. A., SABATINI, D. M. & BAUR, J. A. 2012. Rapamycin-induced insulin resistance is mediated by mTORC2 loss and uncoupled from longevity. *Science*, 335, 1638-43.
- LAPLANTE, M. & SABATINI, D. M. 2012. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*, 149, 274-93.
- LAPOINTE, J., LI, C., HIGGINS, J. P., VAN DE RIJN, M., BAIR, E., MONTGOMERY, K., FERRARI, M., EGEVAD, L., RAYFORD, W., BERGERHEIM, U., EKMAN, P., DEMARZO, A. M., TIBSHIRANI, R., BOTSTEIN, D., BROWN, P. O., BROOKS, J. D. & POLLACK, J. R. 2004. Gene expression profiling identifies clinically relevant subtypes of prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 811-6.

- LAWRENTSCHUK, N. & KLOTZ, L. 2010. Active surveillance for favorable-risk prostate cancer: a short review. *Korean J Urol*, 51, 665-70.
- LAZARIS-KARATZAS, A., MONTINE, K. S. & SONENBERG, N. 1990. Malignant transformation by a eukaryotic initiation factor subunit that binds to mRNA 5' cap. *Nature*, 345, 544-547.
- LEE, C. T., CAPODIECI, P., OSMAN, I., FAZZARI, M., FERRARA, J., SCHER, H. I. & CORDON-CARDO, C. 1999. Overexpression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 is associated with tumor recurrence in human prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 5, 977-83.
- LEE, J. J., LOH, K. & YAP, Y.-S. 2015. PI3K/Akt/mTOR inhibitors in breast cancer. *Cancer biology & medicine*, 12, 342-354.
- LI, R., DAI, H., WHEELER, T. M., SAYEEDUDDIN, M., SCARDINO, P. T., FROLOV, A. & AYALA, G. E. 2009. Prognostic value of Akt-1 in human prostate cancer: a computerized quantitative assessment with quantum dot technology. *Clin Cancer Res*, 15, 3568-73.
- LILIS, I., GIOPANOU, I., PAPADAKI, H. & GYFTOPOULOS, K. 2018. The expression of p-mTOR and COUP-TFII correlates with increased lymphangiogenesis and lymph node metastasis in prostate adenocarcinoma. *Urol Oncol*, 36, 311.e27-311.e35.
- LILJA, H. 1993. Structure, function, and regulation of the enzyme activity of prostate-specific antigen. *World J Urol*, 11, 188-91.
- LILJA, H. & ABRAHAMSSON, P. A. 1988. Three predominant proteins secreted by the human prostate gland. *Prostate*, 12, 29-38.
- LIU, M., LIN, Y., ZHANG, X.-C., TAN, Y.-H., YAO, Y.-L., TAN, J., ZHANG, X., CUI, Y.-H., LIU, X., WANG, Y. & BIAN, X.-W. 2017. Phosphorylated mTOR and YAP serve as prognostic markers and therapeutic targets in gliomas. *Laboratory Investigation*, 97, 1354-1363.
- LIU, W., WANG, X., WANG, Y., DAI, Y., XIE, Y., PING, Y., YIN, B., YU, P., LIU, Z., DUAN, X., LIAO, Z., CHEN, Y., LIU, C., LI, X. & TAO, Z. 2018. SGK1 inhibition-induced autophagy impairs prostate cancer metastasis by reversing EMT. *J Exp Clin Cancer Res*, 37, 73.
- LØVF, M., ZHAO, S., AXCRONA, U., JOHANNESSEN, B., BAKKEN, A. C., CARM, K. T., HOFF, A. M., MYKLEBOST, O., MEZA-ZEPEDA, L. A., LIE, A. K., AXCRONA, K., LOTHE, R. A. & SKOTHEIM, R. I. 2019. Multifocal Primary Prostate Cancer Exhibits High Degree of Genomic Heterogeneity. *European Urology*, 75, 498-505.
- LU, M., WANG, J., IVES, H. E. & PEARCE, D. 2011. mSIN1 protein mediates SGK1 protein interaction with mTORC2 protein complex and is required for selective activation of the epithelial sodium channel. *J Biol Chem*, 286, 30647-54.
- LU-YAO, G. L., ALBERTSEN, P. C., MOORE, D. F., SHIH, W., LIN, Y., DIPOLA, R. S., BARRY, M. J., ZIETMAN, A., O'LEARY, M., WALKER-CORKERY, E. & YAO, S. L. 2009. Outcomes of localized prostate cancer following conservative management. *JAMA*, 302, 1202-9.
- MACKEY, T. J., BORKOWSKI, A., AMIN, P., JACOBS, S. C. & KYPRIANOU, N. 1998. bcl-2/bax ratio as a predictive marker for therapeutic response to radiotherapy in patients with prostate cancer. *Urology*, 52, 1085-90.

- MAGEE, P. J. & ROWLAND, I. R. 2004. Phyto-oestrogens, their mechanism of action: current evidence for a role in breast and prostate cancer. *Br J Nutr*, 91, 513-31.
- MAJUMDER, P. K., YEH, J. J., GEORGE, D. J., FEBBO, P. G., KUM, J., XUE, Q., BIKOFF, R., MA, H., KANTOFF, P. W., GOLUB, T. R., LODA, M. & SELLERS, W. R. 2003. Prostate intraepithelial neoplasia induced by prostate restricted Akt activation: the MPAKT model. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 7841-6.
- MAKAROV, D. V., TROCK, B. J., HUMPHREYS, E. B., MANGOLD, L. A., WALSH, P. C., EPSTEIN, J. I. & PARTIN, A. W. 2007. Updated nomogram to predict pathologic stage of prostate cancer given prostate-specific antigen level, clinical stage, and biopsy Gleason score (Partin tables) based on cases from 2000 to 2005. *Urology*, 69, 1095-101.
- MANNING, B. D. & CANTLEY, L. C. 2003. Rheb fills a GAP between TSC and TOR. *Trends Biochem Sci*, 28, 573-6.
- MANNING, B. D. & CANTLEY, L. C. 2007. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*, 129, 1261-1274.
- MARINO, G., SALVADOR-MONTOLIU, N., FUEYO, A., KNECHT, E., MIZUSHIMA, N. & LOPEZ-OTIN, C. 2007. Tissue-specific autophagy alterations and increased tumorigenesis in mice deficient in Atg4C/autophagin-3. *J Biol Chem*, 282, 18573-83.
- MARTIN, M. E., PEREZ, M. I., REDONDO, C., ALVAREZ, M. I., SALINAS, M. & FANDO, J. L. 2000. 4E binding protein 1 expression is inversely correlated to the progression of gastrointestinal cancers. *Int J Biochem Cell Biol*, 32, 633-42.
- MARTIN, N. E., MUCCI, L. A., LODA, M. & DEPINHO, R. A. 2011. Prognostic determinants in prostate cancer. *Cancer J*, 17, 429-37.
- MCCUBREY, J. A., STEELMAN, L. S., KEMPF, C. R., CHAPPELL, W. H., ABRAMS, S. L., STIVALA, F., MALAPONTE, G., NICOLETTI, F., LIBRA, M. & BASECKE, J. 2011. Therapeutic resistance resulting from mutations in Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR signaling pathways. *Journal of Cellular Physiology*, 226, 2762-2781.
- MCGREGOR, M., HANLEY, J. A., BOIVIN, J. F. & MCLEAN, R. G. 1998. Screening for prostate cancer: estimating the magnitude of over-detection. *CMAJ*, 159, 1368-72.
- MCMENAMIN, M. E., SOUNG, P., PERERA, S., KAPLAN, I., LODA, M. & SELLERS, W. R. 1999. Loss of PTEN expression in paraffin-embedded primary prostate cancer correlates with high Gleason score and advanced stage. *Cancer Res*, 59, 4291-6.
- MEIKLE, A. W., SMITH, J. A. & WEST, D. W. 1985. Familial factors affecting prostatic cancer risk and plasma sex-steroid levels. *Prostate*, 6, 121-8.
- MERSEBURGER, A. S., HENNENLOTTER, J., SIMON, P., MULLER, C. C., KUHS, U., KNUCHEL-CLARKE, R., MOUL, J. W., STENZL, A. & KUCZYK, M. A. 2006. Activation of the PKB/Akt pathway in histological benign prostatic tissue adjacent to the primary malignant lesions. *Oncol Rep*, 16, 79-83.
- MICHEL, M., THÜROFF, J., JANETSCHKE, G. & WIRTH, M. 2016. Die Urologie in 2 Bänden. : Springer.



- MICHELS, J., JOHNSON, P. W. & PACKHAM, G. 2005. Mcl-1. *Int J Biochem Cell Biol*, 37, 267-71.
- MILELLA, M., FALCONE, I., CONCIATORI, F., CESTA INCANI, U., DEL CURATOLO, A., INZERILLI, N., NUZZO, C. M., VACCARO, V., VARI, S., COGNETTI, F. & CIUFFREDA, L. 2015. PTEN: Multiple Functions in Human Malignant Tumors. *Front Oncol*, 5, 24.
- MITCHELL, T. & NEAL, D. E. 2015. The genomic evolution of human prostate cancer. *British Journal Of Cancer*, 113, 193.
- MIYOSHI, Y., ISHIGURO, H., UEMURA, H., FUJINAMI, K., MIYAMOTO, H., MIYOSHI, Y., KITAMURA, H. & KUBOTA, Y. 2003. Expression of AR associated protein 55 (ARA55) and androgen receptor in prostate cancer. *Prostate*, 56, 280-6.
- MOTTET, N., BELLMUNT, J., BOLLA, M., BRIERS, E., CUMBERBATCH, M. G., DE SANTIS, M., FOSSATI, N., GROSS, T., HENRY, A. M., JONIAU, S., LAM, T. B., MASON, M. D., MATVEEV, V. B., MOLDOVAN, P. C., VAN DEN BERGH, R. C. N., VAN DEN BROECK, T., VAN DER POEL, H. G., VAN DER KWAST, T. H., ROUVIÈRE, O., SCHOOTS, I. G., WIEGEL, T. & CORNFORD, P. 2017. EAU-ESTRO-SIOG Guidelines on Prostate Cancer. Part 1: Screening, Diagnosis, and Local Treatment with Curative Intent. *European Urology*, 71, 618-629.
- MULLER, J., EHLERS, A., BURKHARDT, L., SIRMA, H., STEUBER, T., GRAEFEN, M., SAUTER, G., MINNER, S., SIMON, R., SCHLOMM, T. & MICHL, U. 2013. Loss of pSer2448-mTOR expression is linked to adverse prognosis and tumor progression in ERG-fusion-positive cancers. *Int J Cancer*, 132, 1333-40.
- MULLER, P. A. J. & VOUSDEN, K. H. 2013. p53 mutations in cancer. *Nature Cell Biology*, 15, 2.
- MUNDHENK, J., HENNENLOTTER, J., ALLOUSSI, S., SELBHERR, D., MARTZOG, J. C., TODENHOFER, T., KRUCK, S., SCHWENTNER, C., STENZL, A. & SCHILLING, D. 2013. Influence of body mass index, surgical approach and lymphadenectomy on the development of symptomatic lymphoceles after radical prostatectomy. *Urol Int*, 90, 270-6.
- NAKABAYASHI, M., WERNER, L., COURTNEY, K. D., BUCKLE, G., OH, W. K., BUBLEY, G. J., HAYES, J. H., WECKSTEIN, D., ELFIKY, A., SIMS, D. M., KANTOFF, P. W. & TAPLIN, M. E. 2012. Phase II trial of RAD001 and bicalutamide for castration-resistant prostate cancer. *BJU Int*, 110, 1729-35.
- NARDELLA, C., CARRACEDO, A., ALIMONTI, A., HOBBS, R. M., CLOHESSY, J. G., CHEN, Z., EGIA, A., FORNARI, A., FIORENTINO, M., LODA, M., KOZMA, S. C., THOMAS, G., CORDON-CARDO, C. & PANDOLFI, P. P. 2009. Differential requirement of mTOR in postmitotic tissues and tumorigenesis. *Sci Signal*, 2, ra2.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. 2004. *EIF4EBP1* [Internet] [Online]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1978> [Accessed 14.09.2019 2019].
- NGUYEN, P. L., MA, J., CHAVARRO, J. E., FREEDMAN, M. L., LIS, R., FEDELE, G., FIORE, C., QIU, W., FIORENTINO, M., FINN, S., PENNEY,

- K. L., EISENSTEIN, A., SCHUMACHER, F. R., MUCCI, L. A., STAMPFER, M. J., GIOVANNUCCI, E. & LODA, M. 2010. Fatty acid synthase polymorphisms, tumor expression, body mass index, prostate cancer risk, and survival. *J Clin Oncol*, 28, 3958-64.
- NOONE, A., HOWLADER, N., KRAPCHO, M., MILLER, D., BREST, A., YU, M., RUHL, J., TATALOVICH, Z., MARIOTTO, A., LEWIS, D., CHEN, H., FEUER, E. & CRONIN, K. 2018. *SEER Cancer Statistics Review (CSR) 1975-2015* [Online]. Bethesda, MD: National Cancer Institute. Bethesda. Available: [https://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2015/](https://seer.cancer.gov/csr/1975_2015/) [Accessed 25.03.2019 2019].
- ORNISH, D., WEIDNER, G., FAIR, W. R., MARLIN, R., PETTENGILL, E. B., RAISIN, C. J., DUNN-EMKE, S., CRUTCHFIELD, L., JACOBS, F. N., BARNARD, R. J., ARONSON, W. J., MCCORMAC, P., MCKNIGHT, D. J., FEIN, J. D., DNISTRAN, A. M., WEINSTEIN, J., NGO, T. H., MENDELL, N. R. & CARROLL, P. R. 2005. Intensive lifestyle changes may affect the progression of prostate cancer. *J Urol*, 174, 1065-9; discussion 1069-70.
- PARKER, C. 2004. Active surveillance of early prostate cancer: rationale, initial results and future developments. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 7, 184-7.
- PARTIN, A. W., KATTAN, M. W., SUBONG, E. N., WALSH, P. C., WOJNO, K. J., OESTERLING, J. E., SCARDINO, P. T. & PEARSON, J. D. 1997. Combination of prostate-specific antigen, clinical stage, and Gleason score to predict pathological stage of localized prostate cancer. A multi-institutional update. *JAMA*, 277, 1445-51.
- PEARCE, LAURA R., SOMMER, EEVA M., SAKAMOTO, K., WULLSCHLEGER, S. & ALESSI, DARIO R. 2011. Protor-1 is required for efficient mTORC2-mediated activation of SGK1 in the kidney. *Biochemical Journal*, 436, 169.
- PENTYALA, S., WHYARD, T., PENTYALA, S., MULLER, J., PFAIL, J., PARMAR, S., HELGUERO, C. G. & KHAN, S. 2016. Prostate cancer markers: An update. *Biomed Rep*, 4, 263-268.
- POLLACK, A., DESILVIO, M., KHOR, L. Y., LI, R., AL-SALEEM, T. I., HAMMOND, M. E., VENKATESAN, V., LAWTON, C. A., ROACH, M., 3RD, SHIPLEY, W. U., HANKS, G. E. & SANDLER, H. M. 2004. Ki-67 staining is a strong predictor of distant metastasis and mortality for men with prostate cancer treated with radiotherapy plus androgen deprivation: Radiation Therapy Oncology Group Trial 92-02. *J Clin Oncol*, 22, 2133-40.
- POURMAND, G., ZIAEE, A. A., ABEDI, A. R., MEHRSAI, A., ALAVI, H. A., AHMADI, A. & SAADATI, H. R. 2007. Role of PTEN gene in progression of prostate cancer. *Urology Journal*, 4, 95-100.
- PREISSER, F., NAZZANI, S., MAZZONE, E., MARCHIONI, M., BANDINI, M., TIAN, Z., HAESE, A., SAAD, F., ZORN, K., MONTORSI, F., SHARIAT, S. F., GRAEFEN, M., TILKI, D. & KARAKIEWICZ, P. I. 2019. Comparison of Open Versus Robotically Assisted Cytoreductive Radical Prostatectomy for Metastatic Prostate Cancer. *Clin Genitourin Cancer*.
- PRIEN, P. & CHRISTMANN, D. 2018. *Klassifikation des Krankheitsstadiums* [Online]. dkg-web GmbH. Available: <https://www.krebsgesellschaft.de/onko-internetportal/basis->

- [informationen-krebs/krebsarten/prostatakrebs/klassifikation-des-krankheitsstadiums.html](#) [Accessed 06.08.2019 2019].
- QIN, X., JIANG, B. & ZHANG, Y. 2016. 4E-BP1, a multifactor regulated multifunctional protein. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 15, 781-786.
- QU, X., YU, J., BHAGAT, G., FURUYA, N., HIBSHOOSH, H., TROXEL, A., ROSEN, J., ESKELINEN, E. L., MIZUSHIMA, N., OHSUMI, Y., CATTORETTI, G. & LEVINE, B. 2003. Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J Clin Invest*, 112, 1809-20.
- REID, A. H., ATTARD, G., AMBROISINE, L., FISHER, G., KOVACS, G., BREWER, D., CLARK, J., FLOHR, P., EDWARDS, S. & BERNEY, D. M. 2010. Molecular characterisation of ERG, ETV1 and PTEN gene loci identifies patients at low and high risk of death from prostate cancer. *British Journal of Cancer*, 102, 678-684.
- RHONDA, L. B. & ANDREW, J. A. 2013. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in castration-resistant prostate cancer. *Endocrine-Related Cancer*, 20, R83-R99.
- RICHIE, J. P., CATALONA, W. J., AHMANN, F. R., HUDSON, M. A., SCARDINO, P. T., FLANIGAN, R. C., DEKERNION, J. B., RATLIFF, T. L., KAVOUSSI, L. R., DALKIN, B. L., WATERS, W. B., MACFARLANE, M. T. & SOUTHWICK, P. C. 1993. Effect of patient age on early detection of prostate cancer with serum prostate-specific antigen and digital rectal examination. *Urology*, 42, 365-74.
- RICHMOND, P. J., KARAYIANNAKIS, A. J., NAGAFUCHI, A., KAISARY, A. V. & PIGNATELLI, M. 1997. Aberrant E-cadherin and alpha-catenin expression in prostate cancer: correlation with patient survival. *Cancer Res*, 57, 3189-93.
- RINI, B. I. & SMALL, E. J. 2002. Hormone-refractory Prostate Cancer. *Curr Treat Options Oncol*, 3, 437-46.
- RIVERA-CALDERON, L. G., FONSECA-ALVES, C. E., KOBAYASHI, P. E., CARVALHO, M., VASCONCELOS, R. O. & LAUFER-AMORIM, R. 2019. p-mTOR, p-4EBP-1 and eIF4E expression in canine prostatic carcinoma. *Res Vet Sci*, 122, 86-92.
- ROBERT KOCH-INSTITUT 2007. Prostataerkrankungen. In: KOCH-INSTITUT, R. (ed.) *Gesundheitsberichterstattung des Bundes*. Berlin.
- ROBICHAUD, N., DEL RINCON, S. V., HUOR, B., ALAIN, T., PETRUCCELLI, L. A., HEARNDEN, J., GONCALVES, C., GROTEGUT, S., SPRUCK, C. H., FURIC, L., LARSSON, O., MULLER, W. J., MILLER, W. H. & SONENBERG, N. 2015. Phosphorylation of eIF4E promotes EMT and metastasis via translational control of SNAIL and MMP-3. *Oncogene*, 34, 2032-42.
- ROSS, A. E., FENG, F. Y., GHADESSI, M., ERHO, N., CRISAN, A., BUERKI, C., SUNDI, D., MITRA, A. P., VERGARA, I. A., THOMPSON, D. J. S., TRICHE, T. J., DAVICIONI, E., BERGSTRALH, E. J., JENKINS, R. B., KARNES, R. J. & SCHAEFFER, E. M. 2013. A genomic classifier predicting metastatic disease progression in men with biochemical recurrence after prostatectomy. *Prostate Cancer And Prostatic Diseases*, 17, 64.

- RUBIN, M. A., DUNN, R., STRAWDERMAN, M. & PIENTA, K. J. 2002. Tissue microarray sampling strategy for prostate cancer biomarker analysis. *Am J Surg Pathol*, 26, 312-9.
- RUIJTER, E. T., VAN DE KAA, C. A., SCHALKEN, J. A., DEBRUYNE, F. M. & RUITER, D. J. 1996. Histological grade heterogeneity in multifocal prostate cancer. Biological and clinical implications. *J Pathol*, 180, 295-9.
- RUSSO, G. I., HENNENLOTTER, J., VOGEL, U., KÜHS, U., WURM, T. M., GERBER, V., NEUMANN, T., CIMINO, S., STENZL, A. & TODENHÖFER, T. 2019. Intratumoral Heterogeneity Determines the Expression of mTOR-pathway Proteins in Prostate Cancer. *Disease Markers*, 2019, 8.
- RYAN, C. J., SMITH, M. R., DE BONO, J. S., MOLINA, A., LOGOTHETIS, C. J., DE SOUZA, P., FIZAZI, K., MAINWARING, P., PIULATS, J. M., NG, S., CARLES, J., MULDER, P. F., BASCH, E., SMALL, E. J., SAAD, F., SCHRIJVERS, D., VAN POPPEL, H., MUKHERJEE, S. D., SUTTMANN, H., GERRITSEN, W. R., FLAIG, T. W., GEORGE, D. J., YU, E. Y., EFSTATHIOU, E., PANTUCK, A., WINQUIST, E., HIGANO, C. S., TAPLIN, M. E., PARK, Y., KHEOH, T., GRIFFIN, T., SCHER, H. I. & RATHKOPF, D. E. 2013. Abiraterone in metastatic prostate cancer without previous chemotherapy. *N Engl J Med*, 368, 138-48.
- SADI, M. V. & BARRACK, E. R. 1993. Image analysis of androgen receptor immunostaining in metastatic prostate cancer. Heterogeneity as a predictor of response to hormonal therapy. *Cancer*, 71, 2574-80.
- SAMUELS, Y. & WALDMAN, T. 2010. Oncogenic mutations of PIK3CA in human cancers. *Curr Top Microbiol Immunol*, 347, 21-41.
- SANDA, M. G., CHEN, R. C., CRISPINO, T., FREEDLAND, S., NELSON, M., RESTON, J., RODRIGUES, G., SANDLER, H. M., TAPLIN, M. E. & CADEDDU, J. A. J. R. 2017. Clinically localized prostate cancer: AUA/ASTRO/SUO guideline. 6, 27.
- SARBASSOV, D. D., GUERTIN, D. A., ALI, S. M. & SABATINI, D. M. 2005. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*, 307, 1098-101.
- SAXTON, R. A. & SABATINI, D. M. 2017. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*, 168, 960-976.
- SCHALM, S. S., FINGAR, D. C., SABATINI, D. M. & BLENIS, J. 2003. TOS motif-mediated raptor binding regulates 4E-BP1 multisite phosphorylation and function. *Curr Biol*, 13, 797-806.
- SCHANZ, M. B. 2015. *Immunohistochemische Untersuchungen zur lokoregionären Verteilung von mTOR, p-mTOR und 4E-binding protein im Prostatareaum tumortragender Prostaten mittels der Tissue Microarray-Technik - Bedeutung für die Tumorbilogie, Diagnostik und Therapie des Prostatakarzinoms*. Eberhard Karls Universität Tübingen.
- SCHATZ, P., DIETRICH, D., KOENIG, T., BURGER, M., LUKAS, A., FUHRMANN, I., KRISTIANSEN, G., STOEHR, R., SCHUSTER, M., LESCHE, R., WEISS, G., CORMAN, J. & HARTMANN, A. 2010. Development of a diagnostic microarray assay to assess the risk of recurrence of prostate cancer based on PITX2 DNA methylation. *J Mol Diagn*, 12, 345-53.

- SCHER, H. I., FIZAZI, K., SAAD, F., TAPLIN, M.-E., STERNBERG, C. N., MILLER, K., DE WIT, R., MULDER, P., CHI, K. N., SHORE, N. D., ARMSTRONG, A. J., FLAIG, T. W., FLÉCHON, A., MAINWARING, P., FLEMING, M., HAINSWORTH, J. D., HIRMAND, M., SELBY, B., SEELY, L. & DE BONO, J. S. 2012. Increased Survival with Enzalutamide in Prostate Cancer after Chemotherapy. 367, 1187-1197.
- SCHERR, D. S., VAUGHAN, E. D., JR., WEI, J., CHUNG, M., FELSEN, D., ALLBRIGHT, R. & KNUDSEN, B. S. 1999. BCL-2 and p53 expression in clinically localized prostate cancer predicts response to external beam radiotherapy. *J Urol*, 162, 12-6; discussion 16-7.
- SCHLOMM, T., KIRSTEIN, P., IWERS, L., DANIEL, B., STEUBER, T., WALZ, J., CHUN, F. H., HAESE, A., KOLLERMANN, J., GRAEFEN, M., HULAND, H., SAUTER, G., SIMON, R. & ERBERSDOBLER, A. 2007. Clinical significance of epidermal growth factor receptor protein overexpression and gene copy number gains in prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 13, 6579-84.
- SCHRODER, F. H., CARTER, H. B., WOLTERS, T., VAN DEN BERGH, R. C., GOSSELAAR, C., BANGMA, C. H. & ROOBOL, M. J. 2008. Early detection of prostate cancer in 2007. Part 1: PSA and PSA kinetics. *Eur Urol*, 53, 468-77.
- SCHRODER, F. H., HUGOSSON, J., ROOBOL, M. J., TAMMELA, T. L., ZAPPA, M., NELEN, V., KWIATKOWSKI, M., LUJAN, M., MAATTANEN, L., LILJA, H., DENIS, L. J., RECKER, F., PAEZ, A., BANGMA, C. H., CARLSSON, S., PULITI, D., VILLERS, A., REBILLARD, X., HAKAMA, M., STENMAN, U. H., KUJALA, P., TAARI, K., AUS, G., HUBER, A., VAN DER KWAST, T. H., VAN SCHAIK, R. H., DE KONING, H. J., MOSS, S. M., AUVINEN, A. & INVESTIGATORS, E. 2014. Screening and prostate cancer mortality: results of the European Randomised Study of Screening for Prostate Cancer (ERSPC) at 13 years of follow-up. *Lancet*, 384, 2027-35.
- SCHRÖDER, F. H., HUGOSSON, J., ROOBOL, M. J., TAMMELA, T. L. J., CIATTO, S., NELEN, V., KWIATKOWSKI, M., LUJAN, M., LILJA, H., ZAPPA, M., DENIS, L. J., RECKER, F., BERENQUER, A., MÄÄTTÄNEN, L., BANGMA, C. H., AUS, G., VILLERS, A., REBILLARD, X., VAN DER KWAST, T., BLIJENBERG, B. G., MOSS, S. M., DE KONING, H. J. & AUVINEN, A. 2009. Screening and Prostate-Cancer Mortality in a Randomized European Study. 360, 1320-1328.
- SCHRODER, F. H. & ROOBOL, M. J. 2009. Defining the optimal prostate-specific antigen threshold for the diagnosis of prostate cancer. *Curr Opin Urol*, 19, 227-31.
- SCHULMAN, C. C., IRANI, J., MOROTE, J., SCHALKEN, J. A., MONTORSI, F., CHLOSTA, P. L. & HEIDENREICH, A. 2010. Androgen-Deprivation Therapy in Prostate Cancer: A European Expert Panel Review. *European Urology Supplements*, 9, 675-691.
- SEGAWA, N., MORI, I., UTSUNOMIYA, H., NAKAMURA, M., NAKAMURA, Y., SHAN, L., KAKUDO, K. & KATSUOKA, Y. 2001. Prognostic significance of neuroendocrine differentiation, proliferation activity and androgen receptor expression in prostate cancer. *Pathol Int*, 51, 452-9.

- SETTEMBRE, C., ZONCU, R., MEDINA, D. L., VETRINI, F., ERDIN, S., ERDIN, S., HUYNH, T., FERRON, M., KARSENTY, G., VELLARD, M. C., FACCHINETTI, V., SABATINI, D. M. & BALLABIO, A. 2012. A lysosome-to-nucleus signalling mechanism senses and regulates the lysosome via mTOR and TFEB. *The EMBO Journal*, 31, 1095-1108.
- SHARIAT, S. F., ANDREWS, B., KATTAN, M. W., KIM, J., WHEELER, T. M. & SLAWIN, K. M. 2001a. Plasma levels of interleukin-6 and its soluble receptor are associated with prostate cancer progression and metastasis. *Urology*, 58, 1008-15.
- SHARIAT, S. F., SHALEV, M., MENESSES-DIAZ, A., KIM, I. Y., KATTAN, M. W., WHEELER, T. M. & SLAWIN, K. M. 2001b. Preoperative plasma levels of transforming growth factor beta(1) (TGF-beta(1)) strongly predict progression in patients undergoing radical prostatectomy. *J Clin Oncol*, 19, 2856-64.
- SHAW, R. J. & CANTLEY, L. C. 2006. Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature*, 441, 424-30.
- SHE, Q.-B. 2015. 4E-BP1 as an oncotarget. *Aging*, 7, 517-518.
- SHOAG, J. & BARBIERI, C. E. 2016. Clinical variability and molecular heterogeneity in prostate cancer. *Asian journal of andrology*, 18, 543-548.
- SHORE, N., CONCEPCION, R., SALTZSTEIN, D., LUCIA, M. S., VAN BREDA, A., WELBOURN, W., LEWINE, N., GUSTAVSEN, G., POTHIER, K. & BRAWER, M. K. 2014. Clinical utility of a biopsy-based cell cycle gene expression assay in localized prostate cancer. *Current Medical Research and Opinion*, 30, 547-553.
- SHURBAJI, M. S., KALBFLEISCH, J. H. & THURMOND, T. S. 1995. Immunohistochemical detection of p53 protein as a prognostic indicator in prostate cancer. *Hum Pathol*, 26, 106-9.
- SIDDIQUI, N. & SONENBERG, N. 2015. Signalling to eIF4E in cancer. *Biochemical Society transactions*, 43, 763-772.
- SIEGEL, R., NAISHADHAM, D. & JEMAL, A. 2012. Cancer statistics, 2012. 62, 10-29.
- STACKHOUSE, G. B., SESTERHENN, I. A., BAUER, J. J., MOSTOFI, F. K., CONNELLY, R. R., SRIVASTAVA, S. K. & MOUL, J. W. 1999. p53 and bcl-2 immunohistochemistry in pretreatment prostate needle biopsies to predict recurrence of prostate cancer after radical prostatectomy. *J Urol*, 162, 2040-5.
- STAMATIOU, K. N., DILERNIA, G. C., ILIAS, G. K., DASKALOPOULOS, G. K., KOUTELEKOS, I. K., MARIANOU, S. N. & SOFRAS, F. A. 2009. The phenomenon of multifocality does not affect the biologic behavior of histologic prostate carcinoma. *Med Sci Monit*, 15, Br61-63.
- STAMEY, T. A., MCNEAL, J. M., WISE, A. M. & CLAYTON, J. L. J. E. U. 2001. Secondary cancers in the prostate do not determine PSA biochemical failure in untreated men undergoing radical retropubic prostatectomy. 39, 22-23.
- STATZ, C., PATTERSON, S. & M. MOCKUS, S. 2016. mTOR Inhibitors in Castration-Resistant Prostate Cancer: A Systematic Review. *Targeted Oncology*, 12.

- STELLOO, S., SANDERS, J., NEVEDOMSKAYA, E., DE JONG, J., PETERS, D., VAN LEENDERS, G. J., JENSTER, G., BERGMAN, A. M. & ZWART, W. 2016. mTOR pathway activation is a favorable prognostic factor in human prostate adenocarcinoma. *Oncotarget*, 7, 32916-24.
- STENZL, A., A., P., S., B., A., B., M., C., A., D. & ET AL 2009. Prostatakarzinom - Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. *Therapieempfehlungen des Südwestdeutschen Tumorzentrumss – Comprehensive Cancer Center Tübingen*. Tübingen: Südwestdeutsches Tumorzentrum, Comprehensive Cancer Center Tübingen, Universitätsklinikum Tübingen
- STEYERBERG, E. W., EIJKEMANS, M. J., HARRELL, F. E., JR. & HABBEMA, J. D. 2000. Prognostic modelling with logistic regression analysis: a comparison of selection and estimation methods in small data sets. *Stat Med*, 19, 1059-79.
- STUDER, U. E. 2004. Serie Prostatakarzinom: Bedeutung der Lymphadenektomie beim Prostatakarzinom. 101, 2182-.
- SUN, S. Y., ROSENBERG, L. M., WANG, X., ZHOU, Z., YUE, P., FU, H. & KHURI, F. R. 2005. Activation of Akt and eIF4E survival pathways by rapamycin-mediated mammalian target of rapamycin inhibition. *Cancer Res*, 65, 7052-8.
- SUTHERLAND, S. I., PE BENITO, R., HENSHALL, S. M., HORVATH, L. G. & KENCH, J. G. 2014. Expression of phosphorylated-mTOR during the development of prostate cancer. *Prostate*, 74, 1231-9.
- SWINDLE, P., EASTHAM, J. A., OHORI, M., KATTAN, M. W., WHEELER, T., MARU, N., SLAWIN, K. & SCARDINO, P. T. 2005. Do margins matter? The prognostic significance of positive surgical margins in radical prostatectomy specimens. *J Urol*, 174, 903-7.
- TANG, K. D. & LING, M. T. 2014. Targeting drug-resistant prostate cancer with dual PI3K/mTOR inhibition. *Curr Med Chem*, 21, 3048-56.
- TANNOCK, I. F., DE WIT, R., BERRY, W. R., HORTI, J., PLUZANSKA, A., CHI, K. N., OUDARD, S., THEODORE, C., JAMES, N. D., TURESSON, I., ROSENTHAL, M. A. & EISENBERGER, M. A. 2004. Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. *N Engl J Med*, 351, 1502-12.
- TAPLIN, M. E., BUBLEY, G. J., SHUSTER, T. D., FRANTZ, M. E., SPOONER, A. E., OGATA, G. K., KEER, H. N. & BALK, S. P. 1995. Mutation of the androgen-receptor gene in metastatic androgen-independent prostate cancer. *N Engl J Med*, 332, 1393-8.
- TAYLOR, B. S., SCHULTZ, N., HIERONYMUS, H., GOPALAN, A., XIAO, Y., CARVER, B. S., ARORA, V. K., KAUSHIK, P., CERAMI, E. & REVA, B. 2010. Integrative genomic profiling of human prostate cancer. *Cancer Cell*, 18, 11-22.
- TEE, A. R. & PROUD, C. G. 2000. DNA-damaging agents cause inactivation of translational regulators linked to mTOR signalling. *Oncogene*, 19, 3021-31.
- TEE, A. R. & PROUD, C. G. 2002. Caspase cleavage of initiation factor 4E-binding protein 1 yields a dominant inhibitor of cap-dependent translation and reveals a novel regulatory motif. *Mol Cell Biol*, 22, 1674-83.

- TELEMAN, A. A., CHEN, Y.-W. & COHEN, S. M. 2005. 4E-BP functions as a metabolic brake used under stress conditions but not during normal growth. *Genes & development*, 19, 1844-1848.
- TEMPLETON, A. J., DUTOIT, V., CATHOMAS, R., ROTHERMUNDT, C., BÄRTSCHI, D., DRÖGE, C., GAUTSCHI, O., BORNER, M., FECHTER, E., STENNER, F., WINTERHALDER, R., MÜLLER, B., SCHIESS, R., WILD, P. J., RÜSCHOFF, J. H., THALMANN, G., DIETRICH, P.-Y., AEBERSOLD, R., KLINGBIEL, D. & GILLESSEN, S. 2013. Phase 2 Trial of Single-agent Everolimus in Chemotherapy-naive Patients with Castration-resistant Prostate Cancer (SAKK 08/08). *European Urology*, 64, 150-158.
- THOMAS, C. & SCHRADER, A. J. 2023. [New S3 guideline prostate cancer 2021 (version 6.2)-What has changed in advanced prostate cancer?]. *Urologie*, 62, 171-175.
- TOLKACH, Y. & KRISTIENSEN, G. 2018. The Heterogeneity of Prostate Cancer: A Practical Approach. *Pathobiology*, 85, 108-116.
- TOMLINS, S. A., RHODES, D. R., PERNER, S., DHANASEKARAN, S. M., MEHRA, R., SUN, X. W., VARAMBALLY, S., CAO, X., TCHINDA, J., KUEFER, R., LEE, C., MONTIE, J. E., SHAH, R. B., PIENTA, K. J., RUBIN, M. A. & CHINNAIYAN, A. M. 2005. Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science*, 310, 644-8.
- TOSOIAN, J. J. & ANTONARAKIS, E. S. 2017. Molecular heterogeneity of localized prostate cancer: more different than alike. *Translational cancer research*, 6, S47-S50.
- TOSOIAN, J. J. & EPSTEIN, J. I. 2017. Prognostic value of prostate biopsy grade: forever a product of sampling. *BJU Int*, 119, 5-7.
- TSIHLIAS, J., KAPUSTA, L. R., DEBOER, G., MORAVA-PROTZNER, I., ZBIERANOWSKI, I., BHATTACHARYA, N., CATZAVELOS, G. C., KLOTZ, L. H. & SLINGERLAND, J. M. 1998. Loss of cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 is a novel prognostic factor in localized human prostate adenocarcinoma. *Cancer Res*, 58, 542-8.
- UMBAS, R., ISAACS, W. B., BRINGUIER, P. P., SCHAAFSMA, H. E., KARTHAUS, H. F., OOSTERHOF, G. O., DEBRUYNE, F. M. & SCHALKEN, J. A. 1994. Decreased E-cadherin expression is associated with poor prognosis in patients with prostate cancer. *Cancer Res*, 54, 3929-33.
- VAN DEN BERGH, R. C., VAN VUGT, H. A., KORFAGE, I. J., STEYERBERG, E. W., ROOBOL, M. J., SCHRODER, F. H. & ESSINK-BOT, M. L. 2010. Disease insight and treatment perception of men on active surveillance for early prostate cancer. *BJU Int*, 105, 322-8.
- VAN DEN OUDEN, D., KRANSE, R., HOP, W. C., VAN DER KWAST, T. H. & SCHRODER, F. H. 1998. Microvascular invasion in prostate cancer: prognostic significance in patients treated by radical prostatectomy for clinically localized carcinoma. *Urol Int*, 60, 17-24.
- VINARSKAJA, A., SCHULZ, W. A., INGENWERTH, M., HADER, C. & ARSOV, C. 2013. Association of PITX2 mRNA down-regulation in prostate cancer



- with promoter hypermethylation and poor prognosis. *Urol Oncol*, 31, 622-7.
- VIS, A. N., NOORDZIJ, M. A., FITOZ, K., WILDHAGEN, M. F., SCHRODER, F. H. & VAN DER KWAST, T. H. 2000. Prognostic value of cell cycle proteins p27(kip1) and MIB-1, and the cell adhesion protein CD44s in surgically treated patients with prostate cancer. *J Urol*, 164, 2156-61.
- VIS, A. N., VAN RHIJN, B. W., NOORDZIJ, M. A., SCHRODER, F. H. & VAN DER KWAST, T. H. 2002. Value of tissue markers p27(kip1), MIB-1, and CD44s for the pre-operative prediction of tumour features in screen-detected prostate cancer. *J Pathol*, 197, 148-54.
- WANG, J., CAI, Y., REN, C. & ITTMANN, M. 2006. Expression of variant TMPRSS2/ERG fusion messenger RNAs is associated with aggressive prostate cancer. *Cancer Res*, 66, 8347-51.
- WANG, R., GANESAN, S. & ZHENG, X. F. S. 2016. Yin and yang of 4E-BP1 in cancer. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 15, 1401-1402.
- WANG, Z., FENG, X., MOLINOLO, A. A., MARTIN, D., VITALE-CROSS, L., NOHATA, N., ANDO, M., WAHBA, A., AMORNPHIMOLTHAM, P., WU, X., GILARDI, M., ALLEVATO, M., WU, V., STEFFEN, D. J., TOFILON, P., SONENBERG, N., CALIFANO, J., CHEN, Q., LIPPMAN, S. M. & GUTKIND, J. S. 2019. 4E-BP1 Is a Tumor Suppressor Protein Reactivated by mTOR Inhibition in Head and Neck Cancer. *Cancer Research*, 79, 1438.
- WANG, Z., WANG, Y., ZHANG, J., HU, Q., ZHI, F., ZHANG, S., MAO, D., ZHANG, Y. & LIANG, H. 2017. Significance of the TMPRSS2:ERG gene fusion in prostate cancer. *Mol Med Rep*, 16, 5450-5458.
- WEI, J. T. 2010. Limitations of a contemporary prostate biopsy: the blind march forward. *Urol Oncol*, 28, 546-9.
- WEISS, G., COTTRELL, S., DISTLER, J., SCHATZ, P., KRISTIENSEN, G., ITTMANN, M., HAEFLIGER, C., LESCHE, R., HARTMANN, A., CORMAN, J. & WHEELER, T. 2009. DNA methylation of the PITX2 gene promoter region is a strong independent prognostic marker of biochemical recurrence in patients with prostate cancer after radical prostatectomy. *J Urol*, 181, 1678-85.
- WENDEL, H.-G., SILVA, R. L. A., MALINA, A., MILLS, J. R., ZHU, H., UEDA, T., WATANABE-FUKUNAGA, R., FUKUNAGA, R., TERUYA-FELDSTEIN, J., PELLETIER, J. & LOWE, S. W. 2007. Dissecting eIF4E action in tumorigenesis. *Genes & development*, 21, 3232-3237.
- WHANG, Y. E., WU, X., SUZUKI, H., REITER, R. E., TRAN, C., VESSELLA, R. L., SAID, J. W., ISAACS, W. B. & SAWYERS, C. L. 1998. Inactivation of the tumor suppressor PTEN/MMAC1 in advanced human prostate cancer through loss of expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 5246-5250.
- WIKSTROM, P., STATTIN, P., FRANCK-LISSBRANT, I., DAMBER, J. E. & BERGH, A. 1998. Transforming growth factor beta1 is associated with angiogenesis, metastasis, and poor clinical outcome in prostate cancer. *Prostate*, 37, 19-29.
- WITTEKIND, C. 2016. *TNM: Klassifikation maligner Tumoren*, John Wiley & Sons.

- WU, N., DU, Z., ZHU, Y., SONG, Y., PANG, L. & CHEN, Z. 2018. The Expression and Prognostic Impact of the PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway in Advanced Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Technol Cancer Res Treat*, 17, 1533033818758772.
- WULLSCHLEGER, S., LOEWITH, R. & HALL, M. N. 2006. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*, 124, 471-84.
- YANG, R. M., NAITOH, J., MURPHY, M., WANG, H. J., PHILLIPSON, J., DEKERNION, J. B., LODA, M. & REITER, R. E. 1998. Low p27 expression predicts poor disease-free survival in patients with prostate cancer. *J Urol*, 159, 941-5.
- YI, K. H. & LAURING, J. 2016. Recurrent AKT mutations in human cancers: functional consequences and effects on drug sensitivity. *Oncotarget*, 7, 4241-51.
- YU, C.-C., WU, P.-J., HSU, J.-L., HO, Y.-F., HSU, L.-C., CHANG, Y.-J., CHANG, H.-S., CHEN, I.-S. & GUH, J.-H. 2013. Ardisianone, a natural benzoquinone, efficiently induces apoptosis in human hormone-refractory prostate cancers through mitochondrial damage stress and survivin downregulation. 73, 133-145.
- YU, H., NICAR, M. R., SHI, R., BERKEL, H. J., NAM, R., TRACHTENBERG, J. & DIAMANDIS, E. P. 2001. Levels of insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF binding proteins 2 and 3 in serial postoperative serum samples and risk of prostate cancer recurrence. *Urology*, 57, 471-5.
- YU, J., YU, J., MANI, R. S., CAO, Q., BRENNER, C. J., CAO, X., WANG, X., WU, L., LI, J., HU, M., GONG, Y., CHENG, H., LAXMAN, B., VELLAICHAMY, A., SHANKAR, S., LI, Y., DHANASEKARAN, S. M., MOREY, R., BARRETTE, T., LONIGRO, R. J., TOMLINS, S. A., VARAMBALLY, S., QIN, Z. S. & CHINNAIYAN, A. M. 2010a. An integrated network of androgen receptor, polycomb, and TMPRSS2-ERG gene fusions in prostate cancer progression. *Cancer Cell*, 17, 443-54.
- YU, L., MCPHEE, C. K., ZHENG, L., MARDONES, G. A., RONG, Y., PENG, J., MI, N., ZHAO, Y., LIU, Z., WAN, F., HAILEY, D. W., OORSCHOT, V., KLUMPERMAN, J., BAEHRECKE, E. H. & LENARDO, M. J. 2010b. Termination of autophagy and reformation of lysosomes regulated by mTOR. *Nature*, 465, 942-6.
- YU, Y., YOON, S.-O., POULOGIANNIS, G., YANG, Q., MAX MA, X., VILLÉN, J., KUBICA, N., R HOFFMAN, G., CANTLEY, L., P GYGI, S. & BLENIS, J. 2011. Phosphoproteomic Analysis Identifies Grb10 as an mTORC1 Substrate That Negatively Regulates Insulin Signaling. *Science (New York, N.Y.)*, 332, 1322-6.
- YUE, Z., JIN, S., YANG, C., LEVINE, A. J. & HEINTZ, N. 2003. Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 15077-82.
- YUN, J. E., LEE, N. R., KWAK, C., RHA, K. H., SEO, S. I., HONG, S. H., LEE, Y. G., PARK, D. A., KIM, C. S. & LEE, S. H. 2019. Clinical outcomes and costs of robotic surgery in prostate cancer: a multiinstitutional study in Korea. *Prostate Int*, 7, 19-24.

- ZAREBA, P., FLAVIN, R., ISIKBAY, M., RIDER, J. R., GERKE, T. A., FINN, S., PETTERSSON, A., GIUNCHI, F., UNGER, R. H., TINIANOW, A. M., ANDERSSON, S. O., ANDREN, O., FALL, K., FIORENTINO, M., MUCCI, L. A. & TRANSDISCIPLINARY PROSTATE CANCER, P. 2017. Perineural Invasion and Risk of Lethal Prostate Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 26, 719-726.
- ZERBINO, D. R., ACHUTHAN, P., AKANNI, W., AMODE, M R., BARRELL, D., BHAI, J., BILLIS, K., CUMMINS, C., GALL, A., GIRÓN, C. G., GIL, L., GORDON, L., HAGGERTY, L., HASKELL, E., HOURLIER, T., IZUOGU, O. G., JANACEK, S. H., JUETTEMANN, T., TO, J. K., LAIRD, M. R., LAVIDAS, I., LIU, Z., LOVELAND, J. E., MAUREL, T., MCLAREN, W., MOORE, B., MUDGE, J., MURPHY, D. N., NEWMAN, V., NUHN, M., OGEH, D., ONG, C. K., PARKER, A., PATRICIO, M., RIAT, H. S., SCHUILENBURG, H., SHEPPARD, D., SPARROW, H., TAYLOR, K., THORMANN, A., VULLO, A., WALTS, B., ZADISSA, A., FRANKISH, A., HUNT, S. E., KOSTADIMA, M., LANGRIDGE, N., MARTIN, F. J., MUFFATO, M., PERRY, E., RUFFIER, M., STAINES, D. M., TREVANION, S. J., AKEN, B. L., CUNNINGHAM, F., YATES, A. & FLICEK, P. 2017. Ensembl 2018. *Nucleic Acids Research*, 46, D754-D761.
- ZHANG, L., WU, B., ZHA, Z., ZHAO, H., YUAN, J., JIANG, Y. & YANG, W. 2018. Surgical margin status and its impact on prostate cancer prognosis after radical prostatectomy: a meta-analysis. *World J Urol*, 36, 1803-1815.
- ZHANG, T., GUO, J., LI, H. & WANG, J. 2017. Meta-analysis of the prognostic value of p-4EBP1 in human malignancies. *Oncotarget*, 9, 2761-2769.
- ZHANG, Y. J., DUAN, Y. & ZHENG, X. F. 2011. Targeting the mTOR kinase domain: the second generation of mTOR inhibitors. *Drug Discov Today*, 16, 325-31.
- ZHONG, Q., RÜSCHOFF, J. H., GUO, T., GABRANI, M., SCHÜFFLER, P. J., RECHSTEINER, M., LIU, Y., FUCHS, T. J., RUPP, N. J., FANKHAUSER, C., BUHMANN, J. M., PERNER, S., POYET, C., BLATTNER, M., SOLDINI, D., MOCH, H., RUBIN, M. A., NOSKE, A., RÜSCHOFF, J., HAFFNER, M. C., JOCHUM, W. & WILD, P. J. 2016. Image-based computational quantification and visualization of genetic alterations and tumour heterogeneity. *Scientific Reports*, 6, 24146.
- ZINZALLA, V., STRACKA, D., OPPLIGER, W. & HALL, M. N. 2011. Activation of mTORC2 by association with the ribosome. *Cell*, 144, 757-68.
- ZONCU, R., EFEYAN, A. & SABATINI, D. M. 2011. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 12, 21-35.

## VIII ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL

Hiermit erkläre ich, Thomas Manfred Wurm, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel genutzt

habe. Alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen habe ich als solche gekennzeichnet.

Die Idee zur Konzeption dieser Studie wurde im Bereich Uro-Onkologie der Universitätsklinik für Urologie Tübingen entwickelt. Daran beteiligt waren Prof. Dr. med. Dr. h.c. Arnulf Stenzl, Prof. Dr. med. Steffen Rausch und Dipl.-Biol. Jörg

Hennenlotter.

Es wurde hierbei auf einen bestehenden TMA-Block des Instituts für Pathologie des UKT zurückgegriffen. Die Erstellung des Kollektivs und der Basisdatenbank,

sowie Anfertigung des TMAs wurden teilweise vom Institut für Pathologie (TMA) und dem Uro-Onkologischen Labor der Klinik für Urologie (Kollektiv)

durchgeführt. Bei der Anfertigung der immunhistochemischen Färbungen war Frau Ursula Kühs als MTA im Uro-Onkologischen Labor der Klinik maßgeblich beteiligt. Frau Valentina Gerber vom Labor Urologie hat die mikroskopische Auswertung der Präparate maßgeblich begleitet. Die Validierungsserie der Mikroskopie wurde durch mich durchgeführt, divergierende Ergebnisse mit Frau Gerber diskutiert. Die Auswertung und Interpretation aller Daten geschahen durch mich.

Herr Dipl.-Biol. Jörg Hennenlotter und Herr Prof. Dr. med. Steffen Rausch aus der der Universitätsklinik für Urologie Tübingen haben diese Arbeit aktiv betreut, gaben Hilfestellung bei der statistischen Auswertung, sowie Inspirationen und Korrekturvorschläge bei der schriftlichen Ausarbeitung der Dissertationsschrift.<sup>157</sup>

Die studienassoziierte histopathologische Befundung der Präparate erfolgte durch OA PD Dr. med. Ulrich Vogel (Institut für Pathologie, UKT).

Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden mit Herrn Dr. med. Moritz Schanz, ehemaliger Doktorand der Klinik für Urologie zu einem vergleichbaren Thema, diskutiert. Weiterhin waren am Prozess der Wissensschaffung der vorliegenden Arbeit auch Diskussionen mit meinem Mitdoktoranden Hannes von Sivers beteiligt.

Hilfe bei der statistischen Auswertung der Daten erhielt ich von Dott. Giorgio I. Russo.

B.inform. Tim Neumann war mir bei der Texterstellung, der Formatierung und der grafischen Darstellung des Inhalts behilflich.

Weil im Schönbuch den 09.02.2024

Thomas M. Wurm

## **Danksagung**

Zuerst möchte ich dem ärztlichen Direktor der Urologischen Klinik bis September 2023, Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. Arnulf Stenzl herzlich für die Überlassung des Themas, seine Bereitschaft bei Fragen stets persönlich als Ansprechpartner zur Verfügung zu stehen und die Begleitung der vorliegenden Arbeit als Betreuer danken.

Herr Prof. Dr. med. Igor Tsaur, dem ärztlichen Direktor der Klinik danke ich für die weitere Überlassung des Arbeitsplatzes und der logistischen Möglichkeiten, meine Arbeit fertigzustellen.

Herrn Prof. Dr. med. Steffen Rausch möchte ich für seine Unterstützung bei der Formulierung der Inhalte, der Bereitstellung des wissenschaftlichen Rahmens und das Korrekturlesen herzlichst danken.

Einen ganz besonderen und herausragenden Dank möchte ich auch Herrn Dipl.-Biol. Jörg Hennenlotter aussprechen. Seine Unterstützung ermöglichte die Anfertigung dieser Dissertation neben meiner beruflichen Tätigkeit.

Auch möchte ich Herrn PD Dr. med. Ulrich Vogel aus dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Tübingen für das zur Verfügung stellen der Schnittpräparate und Beratung bei pathologischen Fragen ganz herzlichst danken.

Außerdem möchte ich dem ganzen Team des urologischen Labors für die Unterstützung und Hilfsbereitschaft danken. Hier sei besonders Frau Ursula Kühs hervorgehoben, die mit ihrer unendlichen Geduld und liebenswürdigen Art nicht nur bei methodischen Fragen einem stets zur Seite stand. Auch Frau Valentina Gerber gilt mein Dank für die Einführung in die Technik der mikroskopischen Auswertung.

Zu Letzt und im Besonderen möchte ich meiner Frau, Dr. med. Katja H. Ohmenhäuser und meiner Tochter, Charlotte Maeva Wurm herzlichst danken, da sie mich durch Beharrlichkeit, Verständnis und Aufmunterung auf diesen Weg brachten und begleiteten. Ebenfalls gebührt meinen Eltern größter Dank und ich

zolle Ihnen größten Respekt, dass sie mir durch persönlichen Verzicht das Studium der Humanmedizin ermöglichten.

