

# **Unbalancierte chromosomale Aberrationen beim Plattenepithelkarzinom des Penis**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der  
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Udo T. Becker  
geboren am 13.09.1969 in Rodewisch/Vogtl.

## Gutachter

1. Prof. Dr. med. Arndt Hartmann, Pathologisches Institut am Universitätsklinikum Erlangen
2. PD Dr. med. Kerstin Junker, Klinik für Urologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena
3. Prof. Dr. Iver Petersen, Institut für Pathologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena

Tag der öffentlichen Verteidigung: 6. Juli 2010

## Abkürzungsverzeichnis

A.	-	Arteria
AIDS	-	Acquired Immune Deficiency Syndrome
AJCC	-	American Joint Committee on Cancer
5-ALA	-	5-Aminolävulinsäure
Aqua dest.	-	destilliertes Wasser [ <i>lat.</i> ; aqua destillata]
bp	-	Basenpaare [ <i>engl.</i> ; base pairs]
BSA	-	Rinderserumalbumin [ <i>engl.</i> ; bovine serum albumin]
CCD	-	ladungsgekoppeltes Bauteil [ <i>engl.</i> ; charge-coupled device]
CDK	-	Cyclin-abhängige Kinase [ <i>engl.</i> ; cyclin-dependent kinase]
CGH	-	komparative genomische Hybridisierung = vergleichende genomische Hybridisierung [ <i>engl.</i> ; comparative genomic hybridization]
CIN	-	zervikale intraepitheliale Neoplasie [ <i>engl.</i> ; cervical intraepithelial neoplasia]
CIS	-	Carcinoma in situ
CT	-	Computertomographie
DAPI	-	4',6'-Diamidino-2-Phenyl-indol
DNA	-	Desoxyribonukleinsäure [ <i>engl.</i> ; deoxyribonucleic acid]
dNTP	-	degeneriertes Nukleotid-Triphosphat [ <i>engl.</i> ; degenerate nucleotide-triphosphate]
DOP-PCR	-	Polymerasekettenreaktion unter Einsatz partiell degenerierter Oligonukleotide als Primer [ <i>engl.</i> ; degenerate oligonucleotide-primed polymerase chain reaction]
dUTP	-	degeneriertes Uridyl-Triphosphat [ <i>engl.</i> ; degenerate uridyl-triphosphate]
EAU	-	Europäische Gesellschaft für Urologie [ <i>engl.</i> ; European Association of Urology]
EGF-R	-	Epidermaler-Wachstumsfaktor-Rezeptor, [ <i>engl.</i> ; epidermal-growth-factor-receptor]
EST	-	Essigsäuretest
<sup>18</sup> F- FDG	-	<sup>18</sup> Fluor-Fluor-Desoxyglukose
FGF1/2	-	saure bzw. alkalische Fibroblasten-Wachstumsfaktoren [ <i>engl.</i> ; acidic and basic fibroblast-growth-factors]
FISH	-	Fluoreszenz In Situ Hybridisierung [ <i>engl.</i> ; fluorescence in situ hybridization]
FITC	-	Fluoresceinisothiocyanat
FSU Jena	-	Friedrich-Schiller-Universität Jena
Gy	-	Gray (SI-Einheit der Energiedosis als Quotient aus durch Ionisation übertragener Energie und der Masse des Volumens, in dem diese Energie abgegeben wird)

---

GKR	-	Gemeinsames Krebsregister
HE	-	Hämatoxylin-Eosin
HPV	-	Humane Papillomaviren
ICD-O	-	Internationale Klassifikation von Krankheiten für Onkologie [ <i>engl.</i> ; International Classification of Diseases for Oncology]
Inc.	-	eingetragene (Aktien)Gesellschaft [ <i>engl./am.</i> ; incorporated]
ISCN	-	Internationales System für die Nomenklatur human-zytogenetischer Befunde [ <i>engl.</i> ; International System for Human Cytogenetic Nomenclature]
ISIS®	-	In Situ Imaging System®-Computerprogramm
5-JÜR	-	5-Jahres-Überlebensrate
kb	-	Kilobasen [ <i>engl.</i> ; kilobase]
LASER	-	Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation
Lig.	-	Ligamentum [ <i>lat.</i> ; Band]
LK	-	Lymphknoten
LNMRI	-	Lymphotrope Nanopartikel verstärkte Magnetresonanztomographie [ <i>engl.</i> ; lymphotropic nanoparticle enhanced magnetic resonance imaging]
LOH	-	Verlust der Heterozygotie [ <i>engl.</i> ; loss of heterozygosity]
Mbp	-	Megabasenpaare [ <i>engl.</i> ; mega base pairs]
Mb.	-	Morbus
MDM2	-	[ <i>engl.</i> ; Murine Double Minute chromosome clone number 2] – Onkogen – Transkriptionsfaktor, p53-Inhibitor
MRT	-	Magnetresonanztomographie
Nll.	-	nodi lymphatici
Nd:YAG-Laser	-	Neodym-dotierter Yttrium-Aluminium-Granat-Laser
OP	-	Operation
p53	-	p53- Tumorsuppressorgen
PCNA	-	Proliferationsantigen des Zellkerns [ <i>engl.</i> ; proliferating cell nuclear antigen]
PCR	-	Polymerasekettenreaktion [ <i>engl.</i> ; polymerase chain reaction]
PET	-	Positronenemissionstomographie
PDGF	-	Plättchen-Wachstumsfaktor [ <i>engl.</i> ; platelet-derived growth factor]
PI3K	-	Phosphatidylinositol-3-kinase [ <i>engl.</i> ; phosphatidylinositol 3-kinase]
PIN	-	penile intraepitheliale Neoplasie [ <i>engl.</i> ; penile intraepithelial neoplasia]
postop.	-	postoperativ (nach einer Operation)
pRb	-	Retinoblastom-Protein (=Retinoblastom-Tumorsuppressorgen-Produkt)
PUVA	-	Psoralen plus UV A (= photoaktivierte Chemotherapie)
Rb	-	Retinoblastom-Gen
SCC	-	Plattenepithelkarzinom [ <i>engl.</i> ; Squamous Cell Carcinoma]

SCCAg	- Plattenepithelkarzinom-assoziiertes Antigen [ <i>engl.</i> ; Squamous Cell Carcinoma Antigen]
SSC	- Natriumchlorid-Natriumcitrat-Pufferlösung = Standard-Salz-Citrat-Puffer [ <i>engl.</i> ; standard saline citrate buffer]
SWOG	- South West Oncology Group
TGF $\alpha$	- Transformierender-Wachstumsfaktor $\alpha$ [ <i>engl.</i> ; transforming growth factor $\alpha$ ]
TRITC	- Antidigoxigenin-Tetraethylrhodamin-Isothiocyanat
UICC	- Union Internationale Contre le Cancer
UV	- ultraviolett
V.	- Vena
VEGF	- Gefäßendothel-Wachstumsfaktor [ <i>engl.</i> ; vascular endothelial growth factor]

Inhaltsverzeichnis	Seite
<b>1. Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2. Einleitung</b>	<b>3</b>
2.1. Das Peniskarzinom .....	4
2.1.1. Historie .....	4
2.1.2. Epidemiologie .....	4
2.1.3. Ätiologie und Risikofaktoren .....	5
2.1.4. Pathogenese des Peniskarzinoms .....	7
2.1.5. Präkanzerosen .....	8
2.1.6. Histologische Klassifikation des Peniskarzinoms .....	10
2.1.7. TNM-Klassifikation und Stadien der Erkrankung .....	12
2.1.8. Symptomatik .....	13
2.1.9. Diagnostik und Staging .....	14
2.1.10. Therapie .....	16
2.1.10.1. Therapie des Primärtumors .....	16
2.1.10.2. Therapie von Lymphknotenmetastasen .....	17
2.1.10.3. Therapie von Fernmetastasen .....	18
2.1.10.4. Strahlentherapie und Chemotherapie .....	18
2.1.11. Tumornachsorge .....	20
2.1.12. Prognose .....	21
2.2. Das lymphogen metastasierte Peniskarzinom .....	22
2.3. Genetische Aspekte .....	24
2.3.1. Allgemeine Grundlagen der Karzinogenese .....	24
2.3.2. Genetische Veränderungen bei Peniskarzinomen .....	29
<b>3. Ziele der Arbeit und Fragestellung</b>	<b>32</b>
<b>4. Material und Methoden</b>	<b>33</b>
4.1. Patientenkollektiv .....	33
4.2. Material .....	34
4.3. Methoden .....	34
4.3.1. DNA-Isolation .....	35
4.3.2. DOP-PCR (Degenerate Oligonucleotide-Primed Polymerase Chain Reaction) ...	36
4.3.3. Markierung der DNA (Labelling) .....	38

4.3.4.	Vergleichende Genomische Hybridisierung (CGH) .....	40
4.3.5.	Detektion .....	42
4.3.6.	Bildaufnahme .....	43
4.3.7.	Auswertung .....	44
4.3.8.	Statistische Methoden .....	47
<b>5.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>48</b>
5.1.	Histologie und Patientenkollektiv .....	48
5.2.	Genetische Veränderungen bei Plattenepithelkarzinomen des Penis .....	50
5.3.	Tumoren mit unauffälligem CGH-Ergebnis .....	52
5.4.	Tumoren mit chromosomalen Aberrationen .....	55
5.4.1.	Chromosomenaberrationen der Peniskarzinome ohne Lymphknotenmetastasen .....	55
5.4.2.	Häufigkeitsverteilung der Aberrationen bei Tumoren ohne Lymphknotenmetastasen .....	59
5.4.3.	Chromosomenaberrationen der Peniskarzinome mit Lymphknotenmetastasen .....	65
5.4.4.	Häufigkeitsverteilung der Aberrationen bei Tumoren mit Lymphknotenmetastasen .....	68
5.5.	Vergleich der Ergebnisse beider Patientengruppen – ohne/mit Lymphknotenmetastasen .....	73
5.6.	Spezifische chromosomale Veränderungen beim Plattenepithelkarzinom des Penis .....	76
5.7.	Korrelation zwischen Überlebenszeit und chromosomalen Veränderungen beim Peniskarzinom .....	77
<b>6.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>80</b>
6.1.	Patientenkollektiv, T-Stadium und Tumor-Grading .....	80
6.2.	Methodische Aspekte – CGH .....	81
6.3.	Tumoren mit unauffälligem CGH-Ergebnis .....	83
6.4.	Plattenepithelkarzinome des Penis mit genetischen Veränderungen .....	85
6.4.1.	Aberrationen der Peniskarzinome ohne Lymphknotenmetastasen .....	85
6.4.2.	Aberrationen der Peniskarzinome mit Lymphknotenmetastasen .....	90
6.5.	Vergleich der Ergebnisse beider Patientengruppen – ohne/mit Lymphknotenmetastasen - und spezifische chromosomale Veränderungen beim Plattenepithelkarzinom des Penis .....	92
6.6.	Korrelation zwischen Überlebenszeit und chromosomalen Veränderungen beim Peniskarzinom .....	98

<b>7.</b>	<b>Schlussfolgerungen</b>	<b>99</b>
<b>8.</b>	<b>Literatur- und Quellenverzeichnis</b>	<b>101</b>
<b>9.</b>	<b>Anhang</b>	<b>124</b>
	Lebenslauf .....	A
	Danksagung .....	B
	Ehrenwörtliche Erklärung .....	C



## 1. Zusammenfassung

Das Peniskarzinom gehört in Europa und den entwickelten Industrienationen der Welt mit einer Prävalenz von knapp 1% zu den seltenen Malignomen. Daher sind verfügbare Daten über molekulargenetische Veränderungen dieser Neoplasie in der Literatur bisher selten.

Die Überlebensraten bei dieser Tumorerkrankung sind im lokalisierten Stadium hoch, sinken jedoch mit der Entwicklung von Lymphknotenmetastasen erheblich ab. Eine lymphogene Metastasierung korreliert zwar mit der Größe und dem Grading des Tumors, lässt sich jedoch weder aus klinischen Daten noch mittels moderner Bildgebung oder Feinnadelbiopsie mit letzter Sicherheit nachweisen. Gleichzeitig bestimmt aber eine lymphogene Metastasierung die Aggressivität einer Erfolg versprechenden Therapie. Bei einer erforderlichen Lymphknotendisektion ist diese mit einer hohen Morbidität - und für den Patienten mit einer erheblichen physischen und psychischen Belastung verbunden. Daher ist es von immenser Wichtigkeit, bereits aus dem Primärtumor Prognosefaktoren ermitteln zu können, die sein Potential zu lymphogener Metastasierung erkennen lassen, um Patienten frühzeitig für eine Lymphadenektomie bzw. eine adäquate Nachsorge zu selektieren.

Zielsetzung der vorliegenden Studie war es, spezifische chromosomale Veränderungen für das Plattenepithelkarzinom des Penis aufzuzeigen. In Korrelation zum klinischen Verlauf wurde untersucht, ob es einen Zusammenhang zwischen den genetischen Veränderungen des Tumors und seinem Potential zu Progression und lymphogener Metastasierung gibt, um letztlich Rückschlüsse für eine individuell angepasste Therapie ziehen zu können.

Es wurden insgesamt 33 in Formalin fixierte und in Paraffin eingebettete Gewebeproben von Peniskarzinomen der Jahre 1990 bis 2004 aus der Urologischen Klinik der Semmelweis Universität Budapest - Ungarn (n=13), der Klinik für Urologie Hradec Králové - Tschechische Republik (n=11) und der Klinik für Urologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena - Deutschland (n=9) evaluiert. Die Analyse der isolierten Tumor-DNA erfolgte mit Hilfe der vergleichenden genomischen Hybridisierung (comparative genomic hybridization - CGH). Mit dieser standardisierten Methode ist es möglich, ein genomweites Screening bezüglich unbalancierter chromosomaler und subchromosomaler Aberrationen im Sinne von Zugewinnen oder Verlusten genetischen Materials durchzuführen.

Die Ergebnisse stimmen mehrheitlich mit den bisher sparsamen Angaben der Literatur überein und decken darüber hinaus bisher unbekannte genetische Alterationen des Plattenepithelkarzinoms am Penis auf.

6 Fälle der 33 untersuchten Tumoren mit einer guten- bis mittelgradigen Differenzierung und ohne lymphogene Metastasierung zeigten trotz histopathologisch eindeutiger Diagnose keine genetischen Veränderungen. Neben dem Verdacht auf zu kleine, für die CGH nicht erfassbare Aberrationen ließ sich hier auch eine Kontamination der untersuchten Tumorproben mit normalem Gewebe nicht vollständig ausschließen.

In 27 Fällen konnten 2 bis 13 genomische Alterationen pro Fall nachgewiesen werden. Es ließen sich im Mittel 6,5 Aberrationen pro Fall zeigen. In Abhängigkeit vom Tumorstadium war diese Zahl für alle T-Kategorien ohne signifikanten Unterschied. In Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad nahm die Zahl der Aberrationen mit zunehmendem Tumor-Grading ab. Bei Tumoren ohne Metastasen fanden sich 3,6 Verluste genetischen Materials pro Tumor und eben so viele Zugewinne, während es in Fällen mit lymphogener Metastasierung respektive 2,4 bzw. 3,2 Aberrationen waren. Damit stehen 7,1 chromosomale Veränderungen der N0-Tumoren einer als Trend zu wertenden geringeren Zahl von 5,5 Veränderungen der N+-Tumoren gegenüber.

Als spezifische chromosomale Aberrationen wurden alle diejenigen Veränderungen bewertet, die 20% der Fälle in der jeweiligen Gruppe der N0-/N+-Tumoren überstiegen. Für die Tumoren ohne Metastasen betraf das Verluste genetischen Materials in den chromosomalen Regionen 3p (50%); 8p (43,8%); 18q (31,3%) sowie Zugewinne von 8q (50%); 7p (43,8%); 3q (31,3%); 2q (25%); 9p (25%) und 5p (25%), was für die Komplexität der molekulargenetischen Pathogenese spricht. Außerdem konnte in einem Fall eine Amplifikation 12q13-14 (6,3%) beobachtet werden. Karzinome mit Lymphknotenmetastasen präsentierten Verluste in den Regionen 8p (35,4%) und 10q (27,3%) sowie Zugewinne von 8q (45,5%) und 9 (36,4%). Die in beiden Gruppen aufgetretenen Veränderungen -8p; +8q und +9p scheinen ein Indiz für eine Tumorprogression zu sein während der Verlust der Region 10q und der Zugewinn des gesamten Chromosoms 9 in der ermittelten Häufigkeit ausschließlich in den N+-Tumoren deutliche Hinweise auf eine lymphogene Metastasierung darstellen.

Tendenziell überlebten Patienten ohne Lymphknotenmetastasen mit durchschnittlich 7,1 Aberrationen pro Tumor gut 12 Monate länger als Patienten mit lymphogener Metastasierung deren Tumor im Mittel nur 5,5 Aberrationen aufwies.

Schlussfolgernd ist festzuhalten, dass spezifische unbalancierte chromosomale Aberrationen mit Bedeutung für die Genese des Plattenepithelkarzinoms am Penis durch die CGH nachweisbar sind.

Ferner zeichnet sich ein Trend ab, dem zur Folge Tumoren mit einem höheren Grading und Tumoren mit Lymphknotenmetastasen eine durchschnittlich geringere Zahl chromosomaler Aberrationen aufweisen, als gut differenzierte Tumoren und Tumoren ohne lymphogene Metastasierung.

Aufbauend auf diesen Ergebnissen sollte das Ziel weiterer Studien die Identifikation von Genen bzw. Genprodukten sein, die auf den veränderten Chromosomenabschnitten lokalisiert sind, um für das Peniskarzinom zu einer verlässlichen Risikoabschätzung zum Diagnosezeitpunkt zu gelangen und damit im individuellen Fall die therapeutische Strategie frühzeitig festlegen zu können.

## 2. Einleitung

Bei einem Peniskarzinom handelt es sich in mehr als 95% um ein Plattenepithelkarzinom, welches im Folgenden den Gegenstand der Untersuchungen darstellt.

Das Plattenepithelkarzinom des Penis ist als lokalisierte oberflächliche Tumorerkrankung mit einer guten Prognose von 70-90% 5-Jahres-Überlebensrate (5-JÜR) gekennzeichnet. In diesem Stadium genügt oft eine minimal invasive Therapie in Form einer LASER-Behandlung oder einer Zirkumzision, um den Tumor kurativ zu beseitigen. Die 5-JÜR sinkt um 50%, wenn bereits eine mikroskopische Lymphknotenmetastasierung vorliegt und liegt unter 10% wenn Lymphknoten bilateral inguinal bzw. iliacal involviert sind. Die in diesem Stadium erforderliche Amputation des Penis zusammen mit einer Lymphadenektomie sind für die Erkrankten drastische lebensverändernde Maßnahmen.

Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom des Penis zeigen bereits zwischen 30-60% vergrößerte inguinale Lymphknoten. Bei etwa der Hälfte dieser Patienten ist dies auf eine metastatische Aussaat zurückzuführen. Die andere Hälfte spiegelt eine entzündliche Reaktion wieder. Aber auch 10-15% der Peniskarzinom-Patienten ohne die entsprechenden klinischen Symptome entwickeln lymphogene Metastasen. Aktuelle bildgebende Verfahren sind jedoch nicht in der Lage, eine Metastasierung mit ausreichender Sicherheit darzustellen und invasive diagnostische Methoden, wie die Ultraschall-gesteuerte Feinnadelpunktion und die dynamische Sentinel-Lymphknotenbiopsie/-exstirpation, welche für niedrige Tumorstadien noch nicht evaluiert ist, können letztlich eine Metastasierung nicht zuverlässig ausschließen. Dem zur Folge bestehen derzeit Kontroversen über das Vorgehen im klinisch unauffälligen Nodalstadium der Leisten. Die höchste Zuverlässigkeit in der Bestimmung des Nodalstatus besitzt die beidseitige inguinale- u. ggf. iliacale Lymphadenektomie. Sie ist gleichzeitig der einzige kurative Therapieansatz im lymphogen metastasierten Stadium des Peniskarzinoms. Allerdings ist sie mit einer hohen Morbidität assoziiert, welche Wundinfektionen, Hautnekrosen, Lymphozelen, Thrombosen und Lymphödeme beinhaltet (Wechsel et al. 1998). Darüber hinaus bedeutet sie für viele Patienten eine Übertherapie.

Somit wird die Prognose des Peniskarzinoms in absteigender Reihenfolge durch das Ausmaß der lymphogenen Metastasierung und deren adäquater Therapie, von der Ausdehnung des Primärtumors und von dessen histologischen Grad bestimmt.

Bezüglich der Therapie möglicher Lymphknotenmetastasen konkurriert das abwartende Verhalten, welches das Risiko einer zu späten Behandlung in sich trägt, mit dem radikal chirurgischen Vorgehen, gegen welches sich Bedenken vor allem wegen der genannten Komplikationen des Eingriffes richten. Die Lösung dieser aufgezeigten Problematik ist von entscheidender Bedeutung sowohl für die Wahl des Behandlungsweges wie für das individuelle Outcome der Patienten und dementsprechend von dringlicher klinischer Notwendigkeit.

Bezüglich der lymphogenen Metastasierung ist derzeit eine prognostische Einschätzung des Tumorverhaltens nicht möglich, da der Mechanismus der Tumorprogression bzw. dessen Metastasierungspotential bisher ungeklärt ist. Hiervon wiederum hängt jedoch wesentlich die Wahl der individuellen Therapie ab. Somit kommt einer Bewertung des Tumorverhaltens aus Parametern des

Primärtumors eine entscheidende Rolle zu. Eine Möglichkeit hierfür bietet die molekulargenetische Aufarbeitung von Tumorgewebe und dessen Beurteilung unter dem genannten Aspekt.

## 2.1. Das Peniskarzinom

### 2.1.1. Historie

Die Zirkumzision gehört zu den ältesten Formen der urologischen Chirurgie. Entstanden vor einem religiösen Hintergrund und als Ritus der frühen Menschheit ist es interessant, dass ein Peniskarzinom nur äußerst selten bei Männern auftritt, die in ihrer frühen Kindheit zirkumzidiert wurden. Das Peniskarzinom selbst fand erstmals im 7. Jahrhundert Erwähnung. 1761 war es Morgagni, der erstmalig eine Penisteilamputation mit Ligatur der Gefäße durchführte. Er beschrieb auch die Anwendung von „Feuer“ zur Vernichtung des Tumors. Eine proximale Ligatur oberhalb des Tumors wurde jedoch als zu schmerzhaft abgelehnt. Initial führte man eine Art „Guillotine-Amputation“ durch. Dieses Vorgehen wurde in der 2. Hälfte des 19. Jahrhunderts zugunsten von Lappenplastiken zur Deckung des Defektes verlassen. Wie von S.D. Gross 1882 vorgeschlagen, leitete man die Harnröhre durch ein Loch in einem solchen Lappen aus. 1878 führte Carbade die erste in der Literatur beschriebene radikale Penisexzision mit Ausleitung der Harnröhre als perineales Urethrostoma im Sinne einer Boutonnière durch. In Abhängigkeit vom Tumorstadium existieren heute organerhaltende Strategien.

Unbehandelt führte das Peniskarzinom in früheren Zeiten über die Autoamputation des Penis zumeist in weniger als 5 Jahren zum Tod (Lynch und Pettaway 2003).

Das Peniskarzinom ist darüber hinaus auch gegenüber neueren Substanzen nur bedingt chemosensibel und Remissionen sind meist partieller Natur und von kurzer Dauer. Ebenso stellt eine Radiatio aufgrund ihrer begrenzten Wirksamkeit nur bedingt eine Behandlungsalternative dar (Pryor und Ralph 2001).

### 2.1.2. Epidemiologie

Das Plattenepithelkarzinom des Penis ist in westlichen Ländern eine seltene Erkrankung. In Europa beträgt seine Inzidenz zwischen 0,1 und 0,9 auf 100.000 Männer und in den USA zwischen 0,7 und 0,9 auf 100.000 Männer (Algaba et al. 2002). Damit ist das Karzinom des Penis nur für ca. 0,4-0,65% aller Krebsneuerkrankungen in diesen Ländern verantwortlich (Schneede et al. 2003). Von insgesamt ca. 394.680 im Jahr 2000 in der Bundesrepublik Deutschland neu an einem Karzinom erkrankten Patienten waren 200.018 Männer (Robert-Koch-Institut 2006). Ca. 600 dieser männlichen Karzinompatienten wiesen eine maligne Erkrankung des Penis auf. In den 5 ostdeutschen Bundesländern waren das im genannten Zeitraum 83 Patienten und im Freistaat Thüringen wurde im Jahr 2000 bei 11 Männern ein Peniskarzinom diagnostiziert. Die Altersverteilung stellte sich mit 4 Neuerkrankungen im Alter von 0 bis 44 Jahre, 17

Neuerkrankungen von 45-59 Jahre, 36 Neuerkrankungen im Alter zwischen 60 und 74 Jahren und 26 Neuerkrankungen ab dem 75. Lebensjahr für das gesamte Erfassungsgebiet des Gemeinsamen Krebsregisters (GKR) - somit für alle 5 ostdeutschen Länder - und mit 2 - 0 - 5 - 4 respektive für Thüringen dar. Hieraus wird ein Altersgipfel im 7. Lebensjahrzehnt ersichtlich und es ergibt sich für die 5 ostdeutschen Bundesländer allgemein sowie für Thüringen im Speziellen ein Risiko im Laufe des Lebens an einem Peniskarzinom zu erkranken (mit Berücksichtigung konkurrierender Todesursachen) von 0,08% (Robert-Koch-Institut 1/2004).

Die Mortalitätsrate des Peniskarzinoms lag im Jahr 2000 bei 0,5 auf 100.000 Männer für die gesamte Bundesrepublik Deutschland und bei 0,9 auf 100.000 Männer für Thüringen (Robert-Koch-Institut 1/2004, Robert-Koch-Institut 2006).

Im Gegensatz dazu ist das penile Plattenepithelkarzinom in den Entwicklungsländern Südamerikas, Asiens und Afrikas ein substantielles Gesundheitsproblem. Mit einer deutlichen Prävalenz wurde das Peniskarzinom hier in bestimmten Altersgruppen zu einem der häufigsten Karzinome (Schoeneich et al. 1999). Sein Anteil an allen malignen Erkrankungen bei Männern macht in einigen asiatischen -, südamerikanischen - und afrikanischen Ländern bis zu 10% aus. Zum Beispiel bewegt sich die altersstandardisierte Erkrankungsrate in städtischen Gebieten Indiens zwischen 0,7 und 2,3 pro 100.000 Männer und liegt bei 3,0 auf 100.000 in ländlichen Gegenden, was mehr als 6% aller Malignome bei Männern bedeutet. Ebenso ist in Brasilien die altersstandardisierte Inzidenz 8,3 auf 100.000 Männer und stellt in Uganda den am häufigsten diagnostizierten Krebs mit der höchsten Kumulativrate (1% bei allen 75-Jährigen) dar (Misra et al. 2004).

Während eine rassische Beziehung zur Epidemiologie des Peniskarzinoms nicht nachzuweisen ist, besteht jedoch eine enge Korrelation mit unterschiedlicher Genitalhygiene und verschiedenen kulturellen und religiösen Anschauungen bestimmter Bevölkerungsgruppen. Bei zirkumzidierten Männern kommt das Karzinom so gut wie nicht vor. Die neonatale Zirkumzision war in einer Fall-Kontroll-Studie mit einem 3-fach reduzierten Erkrankungsrisiko assoziiert (Dillner et al. 2000). Entsprechend der hohen Zirkumzisionsrate wurde die niedrigste Inzidenz des Peniskarzinoms von 0,1 pro 100.000 Männer/Jahr aus Israel berichtet (Schoeneich et al. 1999). Wird jedoch die Zirkumzision erst im Schulkindalter durchgeführt, ist das Risiko der Entstehung eines Peniskarzinoms bereits erhöht. Bei einer Zirkumzision im Erwachsenenalter besteht eine Risikominderung nicht mehr (Wilbert 1997, Stein und Thüroff 2002 ).

### **2.1.3. Ätiologie und Risikofaktoren**

Als krankheitsauslösende Ursache für die Entstehung eines Plattenepithelkarzinoms am Penis werden im Wesentlichen 2 Faktoren diskutiert:

- Infektionen mit humanen Papillomaviren (HPV) bestimmter Genotypen und
- chronische/rezidivierende Entzündungen des Penis (Schneede et al. 2003).

HPV-Infektionen sind die häufigsten sexuell übertragbaren Viruserkrankungen. Sie gewinnen aktuell weltweit zunehmend an Bedeutung (Büttner et al. 2002). Bereits durch mehrere Studien konnte der Zusammenhang

zwischen anogenitaler HPV-Infektion und sowohl benignen als auch malignen Penisläsionen nachgewiesen werden (Daling et al. 2005, Salazar et al. 2005, Schneede et al. 2003, Rubin et al. 2001). Mehr als 100 HPV-Subtypen sind bis heute isoliert worden und über 30 davon können zu Infektionen im Genitoanbereich führen (Büttner et al. 2002, Schneede 2001). Darunter finden sich so genannte Low-risk-Typen (vornehmlich HPV 6, 11 und 42), die meist mit klinisch symptomatischen, benignen Condylomata acuminata vergesellschaftet sind. Diese werden nur selten in Karzinomen des äußeren Genitale nachgewiesen. Gleichzeitig lassen sich so genannte onkogene High-risk-Typen isolieren. Dazu zählen insbesondere HPV 16, 18, 31, 33 und 35. Infektionen mit derartigen High-risk-Typen sind oft mit genitalen intraepithelialen Neoplasien assoziiert, während sie in gutartigen Warzen extrem selten anzutreffen sind. So gilt ein nahezu 100%iger Zusammenhang zwischen der Infektion mit onkogenen HPV-Genotypen und der malignen Transformation des Zervixepithels mit nachfolgender Entwicklung eines Karzinoms der Zervix uteri bei Frauen als gesichert (Rubin et al. 2001, Schneede et al. 2003). Ebenso finden sich bei HPV-infizierten Männern, deren Partnerinnen an einer zervikalen intraepithelialen Neoplasie (CIN) leiden, in gut 30% Veränderungen, die histologisch einer penilen intraepithelialen Neoplasie (PIN) III entsprechen, während gleichzeitig nur 5% dieser Patienten benigne Kondylome zeigen. Anders betrachtet zeigen die männlichen Partner von Frauen mit Kondylomen oder minimalen histologischen Veränderungen, die sich somit offensichtlich durch sexuellen Kontakt mit Low-risk-HPV-Typen infiziert haben, zu gut 40% kondylomatöse histologische Veränderungen und dagegen in nur 1% der Fälle eine PIN (Barrasso et al. 1987). Allerdings kann bei Patienten mit sichtbaren Genitalwarzen parallel eine Infektion mit unterschiedlichen HPV-Typen vorliegen. Insgesamt ist festzuhalten, dass bei Männern mit einem invasiven Plattenepithelkarzinom in 30-55% HPV-DNA nachgewiesen werden kann (Schneede 2001). Dabei beträgt die Rate für den HPV-Subtyp 16 80-90%, während der HPV-Subtyp 18 mit ca. 10% deutlich seltener vertreten ist (Cupp et al. 1995). Weiterhin ist bekannt, dass eine Infektion mit HPV epitheliotrop und aufgrund der Anpassung von Virusexpression und -replikation an Plattenepithelien auch weitgehend organspezifisch erfolgt (Modrow 1997). Das heißt, es kann das Epithel der Haut, der Mundschleimhaut und des Larynx, der gesamten Anogenitalregion sowie der Schleimhaut von Urethra, Vagina und Zervix betroffen sein. Eine Übertragung durch Schmierinfektion z.B. mittels kontaminierter Gegenstände oder Auto- bzw. Heteroinokulation z.B. über Fingerkontakt ist möglich. Jedoch können Hand- und Fußwarzen nicht auf das Genitale und vice versa übertragen werden (Ferency et al. 1989, Schneede 2001, Strauss et al. 2002).

Trotz bis heute noch ausstehender gesicherter Daten über die Pathogenese des Peniskarzinoms belegen epidemiologische Untersuchungen den ätiologischen Zusammenhang mit chronischen Entzündungen des Penis. Insbesondere mangelnde Genitalhygiene mit gleichzeitig bestehender Phimose und daraus resultierender rezidivierender Balanitiden sind als sichere Risikofaktoren anzusehen (Pizzocaro et al. 1997). Die dadurch zu erklärende Smegmaretention wurde in den 50er Jahren ebenfalls als Ursache für ein peniles Plattenepithelkarzinom angeschuldigt. Jedoch ließ sich diese Hypothese in experimentellen Studien nicht erhärten (Albers und Schoeneich 2003). Allerdings ermöglicht die Präsenz einer phimotischen Vorhaut die Ablagerung einer Vielzahl karzinogener Substanzen wie z.B. Tabaknebenprodukte im Smegma innerhalb

dieser so entstandenen präputialen Kavität (Cupp et al. 1995). Wenngleich auch bei zirkumzidierten Patienten in Einzelfällen ein Peniskarzinom beobachtet wurde, zeigen doch die übrigen Peniskarzinompatienten in 45-85% gleichzeitig eine Phimose. Dementsprechend kommt der Zirkumzision im Kleinkindalter der bereits beschriebene hohe Stellenwert in der Prophylaxe zu (Griffiths 1999, Moses et al. 1998).

Als ein weiterer unabhängiger Risikofaktor ist der Konsum von Tabakerzeugnissen insbesondere das Rauchen von Zigaretten, aber auch das Kauen und Schnupfen von Tabak zu nennen. Hier konnte in einzelnen Studien eine Dosis-Wirkung-Beziehung nachgewiesen werden (Dillner et al. 2000, Hellberg et al. 1987, Harish und Ravi 1995).

Außerdem konnte durch Stern et al. bei Männern, die an einer Psoriasis erkrankt waren, der karzinogene Einfluss einer photoaktivierten Chemotherapie auf das äußere Genitale gezeigt werden. Die Autoren berichteten über ein bis zu 286-fach erhöhtes Risiko für ein invasives Plattenepithelkarzinom des Penis im Vergleich zur Gesamtbevölkerung bei oraler Applikation von 8-Methoxypsoralen und high-level Ultraviolett-A-Phototherapie (PUVA). Ebenso fand man ein erhöhtes Risiko für Patienten, die einer high-level Ultraviolett-B-Bestrahlung ausgesetzt waren (Stern 1990).

Die starke Dosisabhängigkeit dieses gesteigerten Risikos legt einen Schutz der Genitalien bei jeglicher UV-(A- oder B-)Bestrahlung nahe – ganz gleich ob diese aus therapeutischen - oder kosmetischen Gründen oder einfach zu Erholungszwecken durchgeführt wird.

Ein Zusammenhang des Peniskarzinoms mit anderen sexuell übertragbaren Krankheit wie z.B. Syphilis, Gonorrhoe, Ulcus molle oder Lymphogranuloma inguinale lässt sich nicht nachweisen. Das gleichzeitige Auftreten mit einem Peniskarzinom ist als koinzident anzusehen (Lynch und Pettaway 2003, Hellberg et al. 1987).

#### **2.1.4. Pathogenese des Peniskarzinoms**

Der genaue Mechanismus der Entwicklung und Progression eines Peniskarzinoms ist bis dato ungeklärt. Da, wie bereits beschrieben, in nur 30-55% der Fälle HPV-DNA nachgewiesen werden kann, ist zu postulieren, dass noch andere Faktoren an der Karzinogenese des penilen Plattenepithelkarzinoms beteiligt sind.

Die Assoziation von schlechter Genitalhygiene und der Existenz des Präputiums zusammen mit Phimose und Balanoposthitis mit einem Karzinom des Penis wurde weiter oben bereits beschrieben. Das legt zum einen die Wirkung eines Karzinogens im „geschlossenen präputialen Raum“ nahe, bzw. zeigt zum anderen einen signifikanten Einfluss chronischer Irritation und Entzündung auf die Entwicklung eines Peniskarzinoms (Lynch und Pettaway 2003).

Bekannt ist allerdings der Zusammenhang zwischen einer Infektion mit den HPV-Subtypen 16 und 18 und der malignen Transformation der präputialen Keratinozyten, welche dadurch zur Immortalität und zum unlimitierten Wachstum befähigt werden. Die dabei stattfindende Alteration der p53- und Rb-Genexpression durch HPV verursacht eine Empfindlichkeit der zellulären DNA gegenüber dem karzinogenen Effekt bestimmter Mutagene – so z.B. Karzinogene, die mit dem Zigarettenrauchen assoziiert sind (Rubin et al. 2001, Schneede 2002). Dieser spezifische Prozess findet demzufolge auf molekulargenetischer Ebene statt und wird später erklärt.

### 2.1.5. Präkanzerosen

Einige histologisch benigne penile Veränderungen haben ein malignes Potential bzw. sind assoziiert mit der Entwicklung eines Plattenepithelkarzinoms (Lynch und Pettaway 2003). So werden folgende Erkrankungen der penilen Haut und Schleimhaut als prä maligne Formationen des Peniskarzinoms angesehen (Wilbert 1997):

Das Cornu cutaneum stellt eine ausgesprochen verruköse Variante der aktinischen Keratose dar, welches ein Plattenepithelkarzinom verbergen kann und ist bei rechtzeitiger Entfernung von einer guten Prognose gekennzeichnet (Steigleder 1992).

Die Balanitis xerotica obliterans gilt als männliche genitale Form des Lichen sclerosus et atrophicus. Kleine rote Papeln konfluieren, werden dann porzellanweiß und zeigen die betroffene Haut atroph. Eine topische Steroid-Applikation führt meist zur vollständigen Abheilung. Dennoch ist eine regelmäßige Nachsorge ggf. mit Biopsien suspekter Areale indiziert, da in bis zu 5,8% maligne Veränderungen assoziiert sind (Buechner 2002, Weber et al. 1987, Pride et al. 1993, Nasca et al. 1999 ).

Eine Leukoplakie ist per definitionem eine weißliche Verfärbung der Schleimhaut durch Hyperkeratose und Verdickung des Epithels. Hinter diesem Symptom können sich verschiedene Krankheitsbilder u.a. Präkanzerosen bzw. ein Carcinoma in situ verbergen. Einige Autoren bezeichnen nur präkanzeröse Veränderungen mit diesem Begriff. Zur diagnostischen Klärung ist ggf. eine Probeexzision (PE) erforderlich. Eine Entscheidung bleibt jedoch schwierig, da histologische Veränderungen oft nur angedeutet sind (Steigleder 1992).

Condylomata acuminata (synonym: spitze Kondylome, Feigwarzen) als Infektionen mit HPV 6, 11 und 42, sog. Low-risk-Subtypen, wurden bereits im Abschnitt 2.1.3. beschrieben. Da jedoch auch Plattenepithelkarzinome Feigwarzen imitieren können, ist eine konsequente Behandlung einschließlich einer histologischen Diagnosesicherung sowie die Bestimmung der beteiligten HPV-Subtypen dringend zu empfehlen. Von den heute bereits bekannten pathogenetischen Veränderungen auf dem Weg zur malignen



Transformation bei einer Infektion mit den HPV-Subtypen 16, 18 (31, 33 und 35) wird weiter unten im Abschnitt 2.3.2. noch die Rede sein.

Ein Buschke-Löwenstein-Tumor (synonym: verruköses Karzinom, Riesencondylom, Condylomata gigantea) wächst in der Regel ausgehend vom inneren Präputialblatt langsam, blumenkohlartig und erreicht zum Teil groteske Ausmaße. Er zeichnet sich durch ein lokal invasives Wachstum bis hin zur Erosion der Urethra und Fistelbildung aus, ohne jedoch zu metastasieren. Durch HPV 16 und 18 ausgelöste PIN-Läsionen stellen Vorstufen des Plattenepithelkarzinoms dar. HPV 6 und 11 assoziierte Riesencondylome verdrängen und zerstören angrenzende Strukturen durch Kompression (Pizzocaro et al. 1997). Im Unterschied dazu dringen Condylomata acuminata nicht in Nachbar gewebe ein (Lynch und Pettaway 2003). Da in Riesencondylomen neben benignen Veränderungen gleichzeitig Nester verruköser Plattenepithelkarzinome (die nicht HPV-assoziiert sind) vorkommen können, sollte der Tumor so „penissparsam“ wie möglich exzidiert und histologisch verifiziert werden. Topische Agenzien haben sich zur Therapie wahrscheinlich aufgrund der dicken Hornschicht nicht bewährt (Buechner 2002, Doehn und Feyerabend 2001, Mortensen 1987).

Eine Bowenoide Papulose betrifft meist Patienten im Lebensalter hoher sexueller Aktivität zwischen 16 und 35 Jahren. Flache multipel disseminiert stehende oder auch singuläre samtartige Papeln in variabler Größe finden sich an der Penisschafthaut, der Glans oder auch am Präputium. Sie zeigen histologisch die gleichen Atypien wie der Morbus Bowen (Griffiths 1999), nehmen jedoch normalerweise einen benignen Verlauf. Bei Infektion mit HPV 16 wurde in einzelnen Fällen eine Progression zum Plattenepithelkarzinom beschrieben. Wegen fließender histologischer Grenzen zum Morbus Bowen und Erythroplasie Queyrat wird die Bowenoide Papulose als Präkanzerose eingestuft (Buechner 2002, Schneede et al. 2003, Steigleder 1992).

Die Erythroplasie Queyrat und der Morbus Bowen gelten als intraepitheliale Neoplasien und damit als das Carcinoma in situ des Penis (Jeschke 2001). Während der Mb. Bowen an der Penisschafthaut als scharf begrenzter, braunrot, schuppender und selten erhabener Herd auftritt, zeigt sich die Erythroplasie Queyrat an der Glans penis, am inneren, feuchten Präputialblatt sowie im Bereich des Sulcus coronarius in Form solitärer, flacher, rot glänzender, schmerzloser und oft ulzerierender Plaques mit ebenfalls scharfer Begrenzung. Eine Transformation in ein Plattenepithelkarzinom wird von Micali et al. für die Erythroplasie Queyrat mit 10-33% der Fälle angegeben (Micali et al. 1996). Ohne Behandlung liegt diese Rate für den Mb. Bowen bei ca. 5%. In beiden Läsionen sind zunehmende Ulzeration und papilläre Veränderungen Zeichen einer malignen Entartung. Ebenso lässt sich sowohl in den Läsionen des Mb. Bowen als auch der Erythroplasie Queyrat DNA onkogener HPV in bis zu 80-90% der Fälle nachweisen. HPV 16 überwiegt auch hier gegenüber HPV 18 mit bis zu 80% (Schneede et al. 2003, Buechner 2002, Siow und Cheng 2005, Cupp et al. 1995).

## 2.1.6. Histologische Klassifikation des Peniskarzinoms

Mehr als 95% aller malignen epithelialen Penistumoren sind Plattenepithelkarzinome. Allerdings erscheinen sie morphologisch heterogen. Entsprechend den EAU-Guidelines werden folgende Formen unterschieden: klassische -, basaloide -, verruköse -, sarkomatoide - und adenosquamöse Form (Algaba et al. 2002). Die histologische Klassifikation von Penistumoren der WHO beschreibt im Rahmen der International Classification of Diseases for Oncology (ICD-O) basaloide -, kondylomatöse -, verruköse -, papilläre -, sarkomatoide -, adenosquamöse - und gemischte Karzinome als Formen des penilen Plattenepithelkarzinoms (vgl. Tab. 2.1.6.-1) (Eble et al. 2004). Darüber hinaus kann eine Einteilung nach seiner Wuchsform in superfiziell-spreitendes -, vertikal wachsendes -, verruköses - und multizentrisches Karzinom vorgenommen werden (Lynch und Pettaway 2003, Cubilla et al. 2001, Jeschke 2001, Cubilla et al. 1998, Lohmann und Solomon 2001).

Das klassische Plattenepithelkarzinom zeigt folgende histopathologische Charakteristika: Bei einem hochdifferenzierten Karzinom (G1) ist die Fähigkeit zur Epithelreifung und damit zur Verhornung noch erhalten, verliert sich aber mit zunehmendem Grad der Entdifferenzierung (G2...G3...G4). Das auf die Hautoberfläche begrenzte Zellwachstum haben bereits G1-Tumoren verloren, was die Verhornung ins Innere der Tumorzellnester verlagert. So können die verhornten Zellen nicht abgeschilfert werden und es entsteht das mikroskopische Bild von zwiebelschalenartig geschichteten Hornkugeln. Mit zunehmendem Atypiegrad nehmen ein diffuses Wachstumsmuster und polymorphe, mitosereiche sowie unscharf begrenzte Tumorzellen zu. Interzelluläre Stromabildung zeichnet die spindelzelligen Varianten aus, was teilweise zu einem sarkomartigen Bild führt (Riede et al. 1989).

### Histopathologisches Grading (G)

Gx	Differenzierungsgrad kann nicht bestimmt werden
G1	gut differenziert
G2	mäßig differenziert
G3-4	schlecht differenziert/undifferenziert

Der Vollständigkeit halber seien hier auch die primären, nicht plattenepithelialen Neoplasien am Penis erwähnt. Sie stellen zusammen weniger als 5% der malignen Penisveränderungen dar. Dabei finden sich in der Reihenfolge ihrer Häufigkeit absteigend Sarkome (z.B. Angio-, Fibro-, Leiomyosarkome und das Kaposi-Sarkom), gefolgt vom malignen Melanom, der extramammären Form des Mb. Paget, Basalzellkarzinomen und Lymphomen. Das Kaposi-Sarkom trat früher nur vereinzelt bei älteren Männern auf, hat aber seit der Verbreitung von AIDS deutlich an Häufigkeit zugenommen. Klinisch findet man ein scharf begrenztes rotes Knötchen isoliert an der Glans penis. Für 3% der Patienten stellt dies die erste Manifestation eines Kaposi-Sarkoms dar. Weitere maligne epitheliale Tumorvarianten sind gemäß der ICD-O Merkelzellkarzinome, kleinzellige Karzinome vom neuroendokrinen Typ, Talgdrüsenkarzinome und klarzellige Karzinome (Pow-Sang et al. 2002, Schneede et al. 2003, Albers und Schoeneich 2003, Rassner 1992, Eble et al. 2004).

Tabelle 2.1.6.-1: WHO histologische Klassifikation von Penistumoren mit ICD-O-Code

<b>Maligne epitheliale Tumoren am Penis</b>	
Plattenepithelkarzinom	8070/3
basaloides Karzinom	8083/3
kondylomatöses Karzinom	8051/3
verruköses Karzinom	8051/3
papilläres Karzinom	8050/3
sarkomatoides Karzinom	8074/3
gemischtes Karzinom	
adenosquamöses Karzinom	8560/3
Merkelzellkarzinom	8247/3
kleinzelliges Karzinom vom neuroendokrinen Typ	8041/3
Talgdrüsenkarzinom	8410/3
klarzelliges Karzinom	8310/3
Basalzellkarzinom	8090/3
<b>Precursorläsionen/Präkanzerosen</b>	
Intraepitheliale Neoplasie Grad III	8077/2
Morbus Bowen	8081/2
Erythroplasie Queyrat	8080/2
Mb. Paget	8542/3
<b>Melanozytäre Tumoren</b>	
Melanozytennävus	8720/0
malignes Melanom	8720/3
<b>Mesenchymale Tumoren</b>	
<b>Tumoren des hämatopoetischen Systems</b>	
<b>Sekundäre Neoplasien</b>	

Die nach dem Schrägstrich stehenden Ziffern stehen für:

0 - benigne Tumoren

1 - Borderlinetumoren oder unsicheres Tumorverhalten

2 - Carcinoma in situ und intraepitheliale Neoplasie Grad III

3 - maligne Tumoren

aus (Eble et al. 2004)

Sekundäre Neoplasien bzw. Metastasen müssen bei Patienten mit bereits bekanntem Malignom und neu aufgetretenem Priapismus oder einer untypischen Läsion am Penis in Betracht gezogen werden. Metastasen sind häufig multipel tastbare schmerzlose knotige Veränderungen, die klinisch als syphilitische Affektion imponieren können. Der Primärtumor ist in Prostata, Blase, Rektum, Colon sigmoideum und Niere zu suchen. Die Tumorzellaussaat erfolgt meist hämatogen retrograd venös, aber auch infiltratives Wachstum von Tumoren benachbarter Organe wird beschrieben (Belville und Cohen 1992, Bertolotto et al. 2005, Chan et al. 1998, Pow-Sang et al. 2002).

### 2.1.7. TNM-Klassifikation und Stadien der Erkrankung

Die JACKSON-Klassifikation als ein rein klinisches System orientiert sich zur Stadieneinteilung an Charakteristika der primären Tumorerkrankung, lässt jedoch die Tiefeninvasion des Tumors in ihrer Beurteilung außen vor. Derzeit wird sie noch im angloamerikanischen Raum angewandt (Wilbert 1997), verliert jedoch zugunsten der TNM-Klassifikation immer mehr an Bedeutung.

#### JACKSON-Klassifikation (1966)

Stadium I (A)	Tumor beschränkt auf Glans und/oder Vorhaut
Stadium II (B)	Tumorausdehnung auf Penisschaft
Stadium III (C)	Tumor mit operablen Leistenmetastasen
Stadium IV (D)	Tumor infiltriert Nachbarorgane; inoperable Leistenmetastasen oder Fernmetastasen

Das TNM-System der Union Internationale Contre le Cancer (UICC) (Sobin und Wittekind 2002) hingegen beschreibt die Tiefeninvasion des Primärtumors in der T-Kategorie, den Befall regionärer Lymphknoten in der N-Kategorie und gibt in der M-Kategorie das Vorliegen von Fern- bzw. Organmetastasen an. Die ursprüngliche Version der UICC-TNM-Klassifikation von 1978 beschrieb die Tiefenausdehnung des Tumors noch recht vage und enthielt keine Möglichkeit, den Status der Beckenlymphknoten zu erfassen, hatte aber lt. Horenblas et al. (Horenblas und van Tinteren 1994) den Vorteil, ein klinisches Staging vor einer definitiven Therapie vornehmen zu können. Die aktuelle Version von 1997, nach Verbindung des UICC & AJCC-Stagings (American Joint Committee on Cancer) sowie zwischenzeitlich erfolgter Novellierung (1987), enthält die T-N-M-Kategorien auf histologischer Basis und der damit verbundenen genauen Angabe der infiltrierten anatomischen Struktur einschließlich der betroffenen Lymphknoten. Außerdem wurde, aufbauend auf diesem exakteren TNM-System, eine Stadiengruppierung vorgenommen, welche aufgrund der inklusiven Beschreibung prognostisch relevanter Lymphknotenmetastasen praktische Bedeutung für die chirurgische Entscheidungsfindung besitzt. Allerdings ist dafür wiederum ein invasives Vorgehen zur genauen Erfassung des Lymphknotenstatus erforderlich.

#### UICC/AJCC-TNM-Klassifikation und Staging (1997)

##### Primärtumor (T)

Tx	Primärtumor kann nicht bestimmt werden
T0	keine Evidenz für einen Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
Ta	nicht invasives, verruköses Carcinom
T1	Tumor infiltriert das subepitheliale Bindegewebe
T2	Tumor infiltriert das Corpus spongiosum oder Corpus cavernosum
T3	Tumor infiltriert die Urethra oder Prostata
T4	Tumor infiltriert angrenzende Strukturen und Nachbarorgane

## Regionale Lymphknoten (N)

Nx	die Ausdehnung der Tumorinvasion kann nicht bestimmt werden
N0	keine Evidenz für regionale Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase in einem einzelnen, oberflächlichen, inguinalen Lymphknoten
N2	Metastasen in multiplen oder bilateralen, oberflächlichen, inguinalen Lymphknoten
N3	Metastasen in tiefen, inguinalen oder pelvinen Lymphknoten, uni- oder bilateral

## Fernmetastasen (M)

Mx	das Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht bestimmt werden
M0	keine Evidenz für Fernmetastasen
M1	Nachweis von Fernmetastasen

## Stadieneinteilung auf der Basis der TNM-Klassifikation (Staging)

Stadium 0	Tis	N0	M0
	Ta	N0	M0
Stadium I	T1	N0	M0
Stadium II	T1	N1	M0
	T2	N0, N1	M0
Stadium III	T1, T2	N2	M0
	T3	N0, N1, N2	M0
Stadium IV	T4	jedes N	M0
	jedes T	N3	M0
	jedes T	jedes N	M1

## 2.1.8. Symptomatik

Das klinische Erscheinungsbild eines Peniskarzinoms variiert von einem indurierten Areal oder Erythem über ein nicht heilendes Ulcus bis hin zu warzenartig-exophytischen Wuchsformen. Meistens sind die ersten Symptome eines Peniskarzinoms Jucken oder Brennen unter der Vorhaut sowie Ulzeration von Glans oder Präputium. Klinisch auffällige papillomatöse - oder verruköse Plattenepithelkarzinome bzw. Riesencondylome sind in der Regel gut von benignen Veränderungen zu unterscheiden. Flache Läsionen hingegen sind oft nur durch ihre histologische Aufarbeitung zu diagnostizieren. Eine Phimose kann den Tumor verbergen und so die Diagnose verzögern, bis fötider, purulenter und gelegentlich auch blutiger Ausfluss hervortritt.

In absteigender Reihenfolge sind die Prädispositionsstellen eines Peniskarzinoms die Glans penis (48%), das Präputium (21%), Glans, Präputium und Schaft (14%), Glans und Präputium (9%), Sulcus coronarius (6%), und Penischaft (<2%) (Burgers et al. 1992).

Da Schmerzen im Verhältnis zur lokalen Ausdehnung der Krankheit nur sehr gering ausgeprägt sind, suchen Patienten oft erst spät medizinische Hilfe auf. Im Extremfall sind inguinale Lymphknotenschwellungen im Sinne von Metastasen der Grund für eine erste Arztkonsultation, während der Primärtumor unter einer Phimose verborgen ist. Konstitutionelle Symptome wie Schwäche, Gewichtsverlust, rasche Ermüdbarkeit und allgemeines Unwohlsein treten sekundär oft erst aufgrund der chronischen Entzündung auf.

Zum Diagnosezeitpunkt finden sich in ca. 58% (die Angaben in der Literatur reichen von 20% bis 96%) (Akduman et al. 2001, Catalona 1988, Misra et al. 2004, Naumann et al. 2005a, Ornellas et al. 1994, Solsona et al. 2004, Tanis et al. 2002) inguinal palpable Lymphknoten. 45% davon sind Metastasen des Karzinoms. In den übrigen Fällen sind inflammatorische Prozesse im Primärtumor die Ursache. Klinisch ist das eine vom anderen nicht zu unterscheiden. Ferner ist davon auszugehen, dass bis zu 20% der Patienten ohne palpable Lymphknoten zum Zeitpunkt der Primärtumorentfernung in den Nll. inguinales superficilales bereits Metastasen gebildet haben. Inguinale Lymphknotenmetastasen können immense Dimensionen bis hin zur Exulzeration annehmen sowie femorale Gefäße arrodieren, was exzessive Hämorrhagien nach sich zieht.

Da Fernmetastasen extrem selten sind, finden sich auch entsprechende Symptome nur in diesen seltenen Fällen (Burgers et al. 1992, Misra et al. 2004, Singh et al. 1995).

### 2.1.9. Diagnostik und Staging

Die klinische Untersuchung ist bei Patienten mit Peniskrebs der Schlüssel zur Diagnose. Die Beschreibung des Primärtumors sollte die Größe, Lokalisation, Anzahl der Läsionen, Morphologie, Infiltrationstiefe, Fixation im Umgebungsgewebe und die Beteiligung der Schwellkörper enthalten. Auch die Basis des Penis und das Skrotum müssen zum Tumorausschluß genau inspiziert werden.

Zur Diagnostik von HPV assoziierten Effloreszenzen, einschließlich PIN oder CIS, kann ein Essigsäuretest (EST), dessen Sensitivität bei 95% liegt, hilfreich sein. Nach 10-minütiger Einwirkzeit 5%iger Essigsäure zeigt sich unter Vergrößerung eine weißliche Demarkierung. Barasso et al. fanden prä maligne Veränderungen in 42,5% nur aufgrund des EST (Barasso et al. 1987). Allerdings müssen auch bis zu 30% falsch positive Ergebnisse einkalkuliert werden, da sich rein entzündliche Areale im EST ebenfalls weißlich demarkieren (Schneede et al. 2003).

Ebenso kann die Fluoreszenzdiagnostik zur Identifizierung von prä malignen- und malignen Veränderungen sowohl äußerlich als auch in der Urethra eingesetzt werden. Die in Lidocain-Gel gelöste 1%ige 5-Aminolävulinsäure (5-ALA) wird dafür 1 Stunde vor dem Eingriff in die Harnröhre instilliert bzw. lichtgeschützt auf den Penis aufgetragen. Unter Blaulicht zeigen sich dann die Läsionen rot fluoreszierend und scharf begrenzt (Schneede et al. 2001). Dadurch verbessert sich die Diagnostik und lt. Schneede et al. auch die Kontrolle einer organerhaltenden Laserkoagulation (Schneede et al. 2001 March).

Insgesamt sind alle penilen Läsionen als tumorsuspekt anzusehen, wenn sie nach 3-4 Wochen sorgfältiger Behandlung keine Besserungstendenz zeigen und/oder unter einer nicht retrahierbaren Vorhaut verborgen sind. Dies indiziert eine bioptische Abklärung, wie sie von einigen Autoren (Misra et al. 2004) generell vor

Therapiebeginn gefordert wird. Eine Biopsie kann z.B. als Schnellschnittdiagnostik mit der Tumorexzision kombiniert werden (Schoeneich et al. 1999). Für eine sichere Aussage zu Dignität, Tiefeninvasion und infiltrierten Nachbarstrukturen muss dabei genügend Gewebe auch von der Tumorperipherie mit gesundem Umgebungsgewebe entnommen werden. Eine Phimose erfordert selbstverständlich zur Offenlegung des Tumors eine Zirkumzision. Der Vorteil einer Biopsie liegt neben der histopathologischen Beurteilung in der möglichen HPV-Subtypisierung und somit in der Einschätzung des onkogenen Potentials (z.B. HPV 16/-18), wenn Koilozyten als Ausdruck einer HPV-Infektion mikroskopisch erkennbar sind. Der Verdacht auf ein malignes Melanom erfordert jedoch die sofortige komplette Tumorresektion ohne diagnostische Biopsie (Schneede et al. 2003).

Der metastatische Befall von Lymphknoten ist von maßgeblicher prognostischer Bedeutung (vgl. Anfang Abschnitt 2), deshalb sollten beide Regionen inguinales sorgfältig palpiert werden. Allerdings birgt die Unterscheidung zwischen entzündlich reaktiven Veränderungen und metastatischer inguinaler Lymphknotenbeteiligung starke Unsicherheiten (vgl. Abschnitt 2.1.8).

Zwar haben die bildgebenden Verfahren wie Lymphangiographie und CT bis hin zum <sup>18</sup>F-FDG PET/CT und LNMRI (Lymphotrope Nanopartikel verstärkte Magnetresonanztomographie) in den letzten Jahren enorme Fortschritte gezeigt, bleiben aber bis dato eine vollständig sichere Differenzierung schuldig (Scher et al. 2005, Schoeneich et al. 1999, Tabatabaei et al. 2005). Aus diesem Grund werden invasive Staging-Verfahren wie die Aspirationsbiopsie oder -zytologie, die Sentinel-Lymphknotenbiopsie und die modifizierte Lymphadenektomie, die eine höhere Sicherheit bieten, zur Anwendung gebracht (Cabanas 1977, Schoeneich et al. 1999).

Bezüglich ihrer diagnostischen Aussagekraft sind nur sog. Exzisionsbiopsien mit einem schmalen Saum gesunden Gewebes (2-10 mm) verwertbar, da negative Befunde nur an solchen Biopsien eine Malignität ausschließen. Dementsprechend plädieren einige Autoren für die Exzisionsbiopsie des Sentinel-Lymphknotens oberflächlich und medial des Zusammenflusses der V. epigastrica superficialis und der V. saphena magna. Ist dieser Leistenlymphknoten bioptisch negativ, das heißt karzinomfrei, so spricht das für Metastasenfreiheit. Allerdings wurden auch mehrere Fälle lymphogen disseminierter Peniskarzinome trotz initial negativer Sentinel-node-biopsy publiziert (McDougal et al. 1986, Perinetti et al. 1980, Wespes et al. 1986). Die Ursache hierfür ist möglicherweise darin zu suchen, dass die genannte erste Lymphknotenstation übersprungen werden kann (Kramer und Jonas 1997). Pettaway et al. fanden in 5 von 20 Patienten nach initial ausgedehnter Sentinel-Lymphknoten-Biopsie mit negativem Ergebnis nach median 10 Monaten (3-21 Monate) eine inguinale Metastasierung. Aufgrund dieser 25% falsch-negativen Befunde könne diese Methode zum Staging nicht länger empfohlen werden (Pettaway et al. 1995).

Zur Vervollständigung des Stagings gehört auch die Suche nach Fernmetastasen mittels obligater Röntgenthorax-Aufnahme in 2 Ebenen und Oberbauchsonographie einschließlich Retroperitoneum sowie fakultativ Abdomen-CT und Skelettszintigramm (Schoeneich et al. 1999).

Das Squamous cell carcinoma antigen (SCCAg), ein Tumormarker des Plattenepithelkarzinoms der Zervix, wird auch für die Verlaufskontrolle des Plattenepithelkarzinoms am Penis als nützlich beschrieben (Wishnow et al. 1990, Kommu et al. 2005). Untersuchungen von Laniado et al. ermittelten eine Sensitivität von 57%

und eine Spezifität von 100% für Lymphknotenmetastasen (Laniado et al. 2003). Noch vor dem klinischen Nachweis bzw. vor einer positiven Bildgebung konnte ein exponentieller Anstieg der SCCAg-Konzentration bei Patienten, die nach Primärbehandlung Lymphknotenmetastasen entwickelten, gezeigt werden. Vermutlich konnte sich aufgrund der aus kleinen Stichproben stammenden Ergebnisse das SCCAg bisher noch nicht als Tumormarker für das Plattenepithelkarzinom des Penis durchsetzen.

Erwähnt sei noch eine Hyperkalziämie, die als Besonderheit bei etwa 20% der Patienten mit einem Peniskarzinom (Misra et al. 2004) in Abhängigkeit von der Tumormasse, insbesondere bei Lymphknotenmetastasierung und ohne den Nachweis ossärer Metastasen auftritt. Sie wird auf die paraneoplastische Bildung von parathormonähnlichen Substanzen zurückgeführt (Wilbert 1997).

Ebenso interessant ist, die Entwicklung von Zweitumoren bei 5-17% der Peniskarzinompatienten (Hubbell et al. 1988).

## **2.1.10. Therapie**

### **2.1.10.1. Therapie des Primärtumors**

Für das Peniskarzinom gilt die R0-Resektion als die sicherste Behandlungsmethode. Dafür ist eine strenge Orientierung am Tumorstadium erforderlich und somit eine organerhaltende Operation unter kurativem Anspruch nur bei oberflächlichen Tumorstadien (Ta, Tis, T1) möglich. Die Ergebnisse einer Nd:YAG-Laser-Therapie sind bis zu gut differenzierten T1-Tumoren mit denen der partiellen Amputation vergleichbar (Frimberger et al. 2002). Außerdem sprechen gute kosmetische und funktionelle Ergebnisse eindeutig für die Laser-Behandlung. Ein CO<sub>2</sub>-Laser bietet zudem die Möglichkeit einer Histologiegewinnung. Für die Therapie schlecht differenzierter T1-Tumoren und höherer Tumorstadien bleibt zur lokalen Tumorkontrolle jedoch weiterhin die partielle oder vollständige Penektomie mit einem empfohlenen Sicherheitsabstand von 1-2 cm (Albers und Schoeneich 2003, Brkovic et al. 1997), da Lokalrezidive meist auf eine inkomplette Operation bzw. unzureichende Patientenselektion zurückzuführen sind.

Eine spezielle Technik lokaler Chirurgie wird von Mohs et al. empfohlen. Parallel zur „scheibchenweisen“ Tumorabtragung erfolgt jeweils eine histologische Beurteilung am Gefrierschnitt bis kein Tumor mehr nachweisbar ist. Durch diese mikroskopisch unterstützte Grenzfindung der Operation kann bei vollständiger Tumorentfernung ein Maximum an Gewebeschonung und peniler Funktionalität erreicht werden. Die Rezidivrate wird mit 32% und der lokale Tumorprogress mit 8% angegeben (Mohs et al. 1985).

Neuere Studien zeigen, dass für die Tumorkontrolle eines lokalisierten Peniskarzinoms auch geringere Sicherheitsabstände von >5mm bis <10mm) genügen (Minhas et al. 2005, Pietrzak et al. 2004).

Für höhere Tumorstadien ( $\geq T_2$ ) gilt, neben dem Sicherheitsabstand bei partieller Penektomie eine Mindestlänge des Penisstumpfes von 3 cm für eine gerichtete Miktionsfähigkeit einzuhalten. Ist das nicht zu gewährleisten bzw. handelt es sich um ein T2-Karzinom im proximalen Penisschaftbereich oder um einen Tumor  $>T_2$ , wird die primäre Penektomie empfohlen. Zur Harnableitung muss dann eine Boutonnière



angelegt werden, sodass die Miktion im Sitzen erfolgen kann. Eventuell ist ein Längengewinn mittels Durchtrennung des Ligamentum suspensorium penis und präpubischer Mobilisation zu erreichen (Schoeneich et al. 1999).

### 2.1.10.2. Therapie von Lymphknotenmetastasen

Die aktuellen Therapieempfehlungen unterscheiden palpable - von nichtpalpablen inguinalen Lymphknoten. Im Falle nichtpalpabler und in der Bildgebung negativer Lymphknoten sowie einem Tumorstadium  $\leq T1$  und G1 entwickeln sich nur sehr selten Lymphknotenmetastasen und die Fünfjahresüberlebensrate (5-JÜR) liegt bei fast 100%. Dementsprechend lehnt die Amsterdamer Arbeitsgruppe um Horenblas bei diesen Patienten eine Lymphadenektomie ab (Horenblas et al. 1993, Kroon et al. 2005). Alternativ dazu erfolgt präoperativ eine radioaktive Markierung nichtpalpabler Lymphknoten durch peritumorale Injektion von  $^{99m}T$ Technetium-Nanokolloid, um intraoperativ nach Detektion mit einem Gammascanner eine Sentinel-Lymphadenektomie durchzuführen. Dieses Vorgehen besitzt im Vergleich zur konventionellen ilioinguinalen Lymphadenektomie eine deutlich geringere Komplikationsdichte bei gleichzeitig guter (82%), jedoch nicht 100%iger Sensitivität (Horenblas 2001a, Horenblas et al. 2000, Kroon et al. 2005, Wawroschek et al. 2005, Wawroschek et al. 2000). Bei metastatisch verändertem Sentinel-Lymphknoten schließt sich eine sog. modifizierte bilaterale inguinale Lymphadenektomie an. Die von Catalona beschriebene Modifikation bedeutet eine Beschränkung des Dissektionsgebietes medial der A. femoralis und kranial der Fossa ovalis unter Schonung der V. saphena magna, zur Reduktion der operationsbedingten Morbidität (Catalona 1988). Eine pelvine Lymphadenektomie schließt sich nur bei positivem Schnellschnitt an, jedoch erfordern gekreuzte Lymphabflusswege aus dem Penis immer ein bilaterales Vorgehen. Bei tumornegativem Sentinel-Lymphknoten, steht die Indikation zur Lymphadenektomie nur bei einer Tumorausdehnung  $>T1$  und/oder ab einer G2-Differenzierung. Allerdings berichten verschiedene Autoren (Horenblas et al. 2000, Valdes Olmos et al. 2001, Wawroschek et al. 2005) über Lymphknotenmetastasen trotz primär negativem radioaktiv markiertem Sentinel-Lymphknoten. Als Erklärung wurde eine Blockade des Lymphabflusses herangezogen. Die Ursache dafür können z.B. entzündliche Veränderungen sein. Das wiederum erklärt die eingeschränkte Aussagefähigkeit der Methode bei makroskopisch suspekten Lymphknoten (Wawroschek et al. 2005, Wawroschek et al. 2000).

Ohne Radionuklidmarkierung ist die bilaterale Lymphadenektomie bei nichtpalpablen inguinalen Lymphknoten ab dem Stadium T1G2 indiziert.

Palpable Lymphknoten werden wegen einer möglicherweise entzündlichen Genese (in ca. der Hälfte der Fälle) nach Operation des Primärtumors zunächst stadienabhängig für 4-6 Wochen antibiotisch behandelt. Befand sich der Primärtumor im Stadium  $\leq T1$ ,  $<G2$  und sind vergrößerte Lymphknoten nach der Antibiose nicht mehr nachweisbar, muss keine Lymphadenektomie erfolgen. In allen höheren Tumorstadien dagegen sollte die bilaterale modifizierte Lymphadenektomie ohne vorherige Antibiose durchgeführt werden. Ebenso sehen die meisten Autoren die Indikation zur Lymphadenektomie bei histologischem Nachweis einer Lymphknotenmetastasierung oder bei Lymphknotenvergrößerung während des Follow-up sowie zur

Palliation, da die Therapie frühzeitig erkannter Lymphknotenmetastasen eine Verbesserung der Prognose bedeutet (Albers und Schoeneich 2003, Borchers und Jakse 2005, Burgers et al. 1992). Sind also in den inguinalen Lymphknoten Metastasen nachweisbar, so müssen darüber hinaus auch die entlang der großen Gefäße iliakal - bzw. pelvin gelegenen Lymphknoten im Sinne einer ilioinguinalen Lymphknotendisektion entfernt werden. Gegen dieses Vorgehen richten sich jedoch Vorbehalte wegen der zu erwartenden gravierenden Komplikationen wie langanhaltende Lymphorrhoe, Hautnekrosen, Narbenkontrakturen, Beinödem, Einschränkungen der Beinbeweglichkeit und Gefäßläsionen (Ravi 1993b, Ravi 1993a, Schubert und Nitzsche 1988). Trotz Einsatz spezieller Operationstechniken wie z.B. myocutane Lappenplastiken und Ligatur aller Lymphgefäße ist die operationsbedingte Morbidität sehr hoch und liegt selbst für die modifizierte Lymphadenektomie noch bei ca. 30%. Außerdem konnte ein positiver Effekt solcher Eingriffe auf das Überleben dieser Patienten bisher nur für Mikrometastasen in den pelvinen Lymphknoten nachgewiesen werden (Albers und Schoeneich 2003, Borchers und Jakse 2005, Ornellas et al. 1994).

### **2.1.10.3. Therapie von Fernmetastasen**

Fernmetastasen in Lunge, Leber, Knochen und Gehirn sind ausgesprochen selten und werden selbst in größeren Studien maximal in 1-10% der Fälle beschrieben. Sie treten erst spät im Krankheitsverlauf auf und kommen ohne Befall lokaler Lymphknoten praktisch nicht vor (Lynch und Pettaway 2003). Als Ausdruck des generalisierten Tumorleidens kennzeichnen Fernmetastasen eine infauste Prognose. Damit sind in diesem Stadium allein palliative Maßnahmen angezeigt. Sowohl chemo- als auch radiotherapeutische Ansätze sind in der Literatur beschrieben. Beide Varianten sind abhängig vom Alter, dem Allgemeinzustand und dem individuellen Therapiewunsch. Für symptomatische Fernmetastasen bei ansonsten gutem Allgemeinzustand ist z.B. eine Chemotherapie trotz relativ geringer Effektivität denkbar (Schneede et al. 2003). Ebenso können bei inkurablen Patienten sowohl der Primärtumor als auch Lymphknoten- und Fernmetastasen mit in der Regel gutem palliativem Effekt bestrahlt werden (Gerbaulet und Lambin 1992, Ravi et al. 1994),

### **2.1.10.4. Strahlentherapie und Chemotherapie**

Einzelne Studien beschreiben die Strahlentherapie als alleinige organerhaltende Behandlungsmethode für oberflächliche Peniskarzinome. Zur Anwendung kommt meist eine Iridium-192-Brachytherapie mit einer Gesamtstrahlendosis von 60 Gy (Crook et al. 2005). Jedoch muss im Vergleich zur Operation vermehrt mit Lokalrezidiven und Komplikationen wie z.B. Meatusstenosen (bis 30%), Urethrastrikturen und -fisteln (20-35%), Teleangiektasien (90%) und Nekrosen (bis 15%) gerechnet werden (Crook et al. 2002, Delannes et al. 1992, Gerbaulet und Lambin 1992, Mazon et al. 1984). Außerdem sind Strahlennebenwirkungen wie Ulcus oder Nekrose kaum von einem Tumorrezidiv zu unterscheiden, was die Nachsorge erheblich erschwert und zu wiederholten Biopsien führt (Sanchez-Ortiz und Pettaway 2003). Vor einer Strahlentherapie muss in

jedem Fall eine Zirkumzision erfolgen, um keine radiogene Phimose zu riskieren und um die volle Herddosis am Tumor zu gewährleisten (Pizzocaro et al. 1997). In Anbetracht dessen sollte die primäre Strahlentherapie nur Patienten angeboten werden, die eine Operation des Primärtumors ablehnen.

Auch die von einigen Autoren empfohlene elektive Bestrahlung regionärer Lymphabflusswege und die adjuvante bzw. neoadjuvante Radiatio inguinaler Lymphknotenmetastasen zur Senkung der Lokalrezidivrate ist mit einer erhöhten Morbidität sowie Wundheilungsstörungen im Rahmen der Lymphadenektomie verbunden (Horenblas et al. 1993, Kulkarni und Kamat 1994, Mahlmann et al. 2001).

Für inoperable Patienten mit inguinalen Lymphknotenmetastasen stellt die primäre perkutane Radiatio noch eine Option dar (Horenblas et al. 1993). Ravi et al. beschreiben ein verringertes Risiko intraoperativer Tumorzellverschleppung und inguinaler Rezidive nach präoperativer Bestrahlung sehr großer (>4 cm) und/oder an der Haut fixierter Lymphknoten (Ravi et al. 1994). Eine Indikation zur postoperativen Bestrahlung der Lymphabflüsse sind mehr als 2 befallene Lymphknoten bzw. ein Kapseldurchbruch oder die Rezidivsituation. Allerdings fehlen bis dato gesicherte Ergebnisse bzgl. eines Überlebensvorteils dieser adjuvant bestrahlten Risikopatienten. Erfolge bei Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich lassen jedoch auch für das Peniskarzinom hoffen (Mahlmann et al. 2001). Letztlich bleibt noch die Strahlentherapie für die Palliation zu erwähnen (vgl. Abschnitt 2.1.10.3.).

Die Daten zur Chemotherapie des Peniskarzinoms sind aufgrund seiner Seltenheit und der damit fehlenden prospektiv randomisierten Studien an größeren Patientenkollektiven limitiert. Zudem lassen sich vorhandene Studien wegen ihrer unterschiedlichen Patientenselektion, geringen Fallzahlen, variablen Dosierungen und unterschiedlichen Therapiepläne nur schwer vergleichen (Naumann et al. 2005a). Die Ansprechraten auf Monotherapien mit Cisplatin, Methotrexat oder Bleomycin sind dabei nicht überzeugend und oft nur partiell sowie von kurzer Dauer. Bessere Ergebnisse wurden erstmals 1990 von Hussein et al. über die Kombination von Cisplatin mit 5-Fluorouracil bei lokal fortgeschrittenen Tumoren berichtet (Hussein et al. 1990). Ebenso beschreiben Pizzocaro et al. im neoadjuvanten Therapieansatz mit Vincristin, Methotrexat und Bleomycin eine Verkleinerung von inguinal fixierten Lymphknoten bis zur Resektabilität in 50% und die Verlängerung des krankheitsfreien Überlebens in 15-30% (Pizzocaro et al. 1997). Unter Leitung der Southwest Oncology Group (SWOG) wurden in einer der größten Studien 40 evaluierbare Patienten mit lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem Peniskarzinom neoadjuvant mit der Kombination: Methotrexat, Bleomycin und Cisplatin behandelt. In deren Ergebnis berichten Haas et al. über einen 32,5%igen Respons im Sinne von 5 kompletten und 8 partiellen Remissionen. Aufgrund erheblicher Toxizität kam es jedoch auch zu 5 therapiebedingten Todesfällen (Haas et al. 1999). Darüber hinaus müssen diese vorwiegend partiellen Remissionen chirurgisch und/oder strahlentherapeutisch konsolidiert werden, da nur so das Langzeitüberleben verbessert werden kann (Lynch und Pettaway 2003, Sanchez-Ortiz und Pettaway 2004). Bessere Überlebensraten suggeriert die adjuvante Chemotherapie (Pizzocaro et al. 1997). Sie wird bei 2 oder mehr positiven Lymphknoten oder extranodalem Tumornachweis empfohlen (Horenblas und van Tinteren 1994). Bisherige Phase-II-Studien legen einen Benefit für die betroffenen Patienten nahe. Die Indikation wird bei ansonsten fehlenden Therapiealternativen für die systemische Behandlung des fortgeschrittenen

Peniskarzinoms unter palliativer Zielstellung gesehen (Lümmen et al. 1997). In diesem Zusammenhang gilt es auch in Zukunft neue multimodale Behandlungskonzepte wie z.B. die kombinierte Radiochemotherapie weiterzuentwickeln, da einzelne Fallberichte einen Behandlungserfolg erwarten lassen (Doehn und Feyerabend 2001, Gonzalez et al. 1997, Pedrick et al. 1993, Skeel et al. 2003). Ebenso sind neue zytostatische Substanzen auf ihre Wirksamkeit bei der Behandlung des Peniskarzinoms zu überprüfen, wobei man sich an Plattenepithelkarzinomen anderer Organe orientieren kann (Preis et al. 2006). Erfolg versprechende Ergebnisse wurden zuletzt für Taxane-basierte Kombinationen gezeigt (Pizzocaro et al. 2008).

### 2.1.11. Tumornachsorge

Für die meisten Stadien des Peniskarzinoms gibt es einen detaillierten Nachsorgeplan für die ersten 5 Jahre nach Primärtherapie - dem kritischen Zeitraum für ein Tumorrezidiv. Neben engmaschigen urologischen Untersuchungen ist die regelmäßige Selbstuntersuchung der Patienten erforderlich, um mögliche Rezidive oder Lymphknotenveränderungen in einem frühen Stadium zu erkennen. Denn nur die Therapie frühzeitig erkannter Lokalrezidive und kleiner Lymphknotenmetastasen verbessert die Prognose (vgl. 2.1.10.2.).

Gemäß den Leitlinien der EAU richten sich die Nachsorgeintervalle nach der initialen Therapie der Primärläsion und der regionalen Lymphknoten. Es konnte bereits verschiedentlich gezeigt werden, dass das primäre Tumorstadium sowie die Tumorlokalisation und die erfolgte Therapie mit dem Risiko, ein Rezidiv zu entwickeln, korrelieren (McDougal et al. 1986, Sanchez-Ortiz und Pettaway 2003). So sollte nach organerhaltender Therapie in den ersten zwei Jahren nach Diagnose 2-monatlich, im dritten Jahr alle 3 Monate und im vierten sowie fünften Jahr alle 6 Monate eine klinische Untersuchung empfohlen.

Dahingegen können die Intervalle in der Folge einer partiellen oder totalen Penektomie aufgrund der zu erwartenden geringen Rate von Lokalrezidiven verdoppelt werden.

Zur Überwachung des inguinalen Lymphknotenstatus empfiehlt die EAU Nachsorgeintervalle wie nach organerhaltender Therapie, welche wiederum verdoppelt werden können, sobald eine inguinale Lymphadenektomie einen histopathologischen N0-Status nachweist. Tabelle 2.1.11.-1. gibt einen Nachsorgeplan unter Berücksichtigung der EAU-Leitlinien und der Empfehlungen von Paul et al. wieder.

Patienten nach alleiniger Radiatio des Primärbefundes bedürfen bei erhöhter Inzidenz an potentiellen Spätrezidiven einer engmaschigen und langfristigen Tumornachsorge (Schoeneich et al. 1999).

Tabelle 2.1.11.-1: Nachsorgeplan für Patienten mit einem Peniskarzinom in Anlehnung an die Guidelines on penile cancer der EAU 2004 und Empfehlungen von Paul et al. 2005 (Paul et al. 2005, Solsona et al. 2004)

Krankheitsausbreitung	bisherige Therapie	Nachsorgeintervall			Untersuchung	
		1.-2. Jahr	3. Jahr	4.-5. Jahr	obligat	fakultativ
Primärtumor	konservativ/ peniserhaltend	alle 2 Monate	alle 3 Monate	alle 6 Monate	körperliche Untersuchung/ Selbstuntersuchung/ Lebensqualität	
	Penisteilamputation Penektomie	alle 4 Monate	alle 6 Monate	alle 12 Monate	körperliche Untersuchung/ Selbstuntersuchung/ Lebensqualität	
Lymphknotenstationen	konservativ (wait-and-see)	alle 2 Monate	alle 3 Monate	alle 6 Monate	körperliche Untersuchung/ Selbstuntersuchung/ Lebensqualität	Biopsie/ Zytologie
	Lymphadenektomie (pN0)	alle 4 Monate	alle 6 Monate	nicht notwendig	körperliche Untersuchung/ Selbstuntersuchung/ Lebensqualität	
	Lymphadenektomie (pN+)	alle 2-3 Monate	alle 4-6 Monate	alle 6-12 Monate	körperliche Untersuchung/ Selbstuntersuchung/ Lebensqualität/ Abdomen & Becken-CT/ Röntgen-Thorax	Ganzkörper- Skelett- szintigraphie
		Individueller Therapieplan/ Standard der behandelnden Klinik				
Fernmetastasen	symptomatischer Patient	symptomorientiert			Lebensqualität/CT/MRT/Knochenscan	

Aufgrund mehrerer Variablen, die bei histopathologischem N+-Status hinzukommen (wie z.B. Anzahl und Lokalisation der Lymphknotenmetastasen, iliakale Lymphadenektomie, Art und Protokoll einer adjuvanten Therapie und bestehende Fernmetastasen), wird von der EAU kein Nachsorgeprogramm empfohlen. Die Nachsorge kann in diesen Fällen nicht mehr zur Verbesserung der Prognose beitragen, vielmehr müssen individualisierte Therapiepläne zum Einsatz kommen. Hier ist neben der Erfahrung der behandelnden Klinik auch der Wunsch des Patienten maßgeblich. Im Vordergrund stehen für diese zumeist palliative Situation die Verhinderung von Komplikationen und damit der Erhalt von Lebensqualität bei nur noch kurzer Lebenserwartung (Naumann et al. 2005a, Paul et al. 2005, Solsona et al. 2004, Wechsel et al. 1998).

### 2.1.12. Prognose

Peniskarzinompatienten konsultieren den Arzt in der Regel später als Patienten mit anderen malignen Tumoren. Daher verzögert sich der Therapiebeginn bei 15-50% der Patienten oft um mehr als ein Jahr. So wird kostbare Behandlungszeit verschwendet und die prinzipiell guten Heilungschancen der frühen Stadien können nicht mehr erreicht werden. Ursachen dafür sind Angst, Scham, Ignoranz oder vernachlässigte persönliche Körperpflege der Patienten (Misra et al. 2004).

Wegen der Seltenheit des Peniskarzinoms und seiner bis dato noch wenig bekannten Pathogenese wurden viele Untersuchungen mit dem Ziel durchgeführt, unabhängige Prognosefaktoren zu definieren bzw. den Vorhersagewert bestimmter pathologischer Faktoren zu ermitteln, um daraus therapeutische Strategien

abzuleiten. Das Ausmaß des Primärtumors (T), sein Differenzierungsgrad (G) und die Invasion in Blutgefäße bzw. Lymphbahnen wurden als Prädiktoren der Tumorprogression identifiziert (Emerson et al. 2001). Interessanterweise scheinen HPV-Infektionen trotz ihrer epidemiologischen Bedeutung keinen negativen Einfluss auf die Prognose des invasiven Peniskarzinoms zu haben (Bezerra et al. 2001, Lont et al. 2006). Die 3- bzw. 5-Jahres-Mortalitätsrate liegt bei unbehandelten Plattenepithelkarzinomen am Penis bei 93,7% respektive 97,4% (Culkin und Beer 2003). Die meisten Patienten sterben ohne Therapie gewöhnlich binnen 2 Jahren, zumal Spontanremissionen bisher niemals berichtet wurden (Misra et al. 2004). Es besteht Einigkeit darüber, dass die Prognose des Peniskarzinoms im Wesentlichen vom Ausmaß der Lymphknotenmetastasierung und deren adäquater Therapie abhängt. Während die 5-JÜR von Patienten mit histopathologischem N0-Status in einer Metaanalyse konstant über 87% liegt, verschlechtert sich die Gesamtprognose durch lymphogene Metastasen erheblich (Horenblas 2001b, Leewansangtong et al. 2001). So liegt die 5-JÜR im Stadium II nur noch bei 55% und sinkt auf 30% im Stadium III (vgl. 2.1.7.) (Horenblas und van Tinteren 1994). Das Mortalitätsrisiko steigt mit der Anzahl befallener Lymphknoten, ihrer Größe (>2cm) und ihrer Fixation im Umgebungsgewebe sowie mit ihrem bilateralen Auftreten. Bei maximal 2 befallenen Lymphknoten, liegt die 5-JÜR nach Lymphadenektomie noch zwischen 82% und 88%, verglichen mit 7-50%, wenn mehr als zwei Lymphknotenmetastasen vorliegen (Fraley et al. 1989). Im Falle pelviner lymphogener Metastasen verschlechtert sich die 5-JÜR auf unter 5% (Ravi 1993c, Srinivas et al. 1987). Die Wahrscheinlichkeit von Metastasen in den Beckenlymphknoten wird auf 23% bzw. 56% bei maximal 2-3 respektive mehr als 3 metastatisch-positiven Leistenlymphknoten beziffert (Horenblas 2001b, Solsona et al. 1992). Schließlich sinkt die 5-JÜR mit dem Auftreten von Fernmetastasen unter 5% (Wechsel et al. 1998).

## **2.2. Das lymphogen metastasierte Peniskarzinom**

Eine Absiedlung von Tumorzellen verläuft primär subkutan entlang des ausgeprägten lymphatischen Netzes am Penis in die oberflächlichen Lymphknoten beider Leistenregionen. Mit fortschreitender Krankheit erfolgt die weitere Metastasierung über die tiefen inguinalen Lymphknoten beidseits in die pelvinen Lymphstationen, ehe es auch über eine hämatogene Aussaat zur Entwicklung von Fernmetastasen kommt, was, wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben (vgl. 2.1.12.), mit einer erheblichen Verschlechterung der Gesamtprognose vergesellschaftet ist.

Im Folgenden sollen die penilen Lymphabflusswege zur Orientierung für mögliche Metastasierungsorte gesondert Erwähnung finden: Lymphgefäße des Präputiums verbinden sich in Form eines Netzwerkes mit Lymphbahnen der Penisschafthaut und drainieren primär in die oberflächlichen inguinalen Lymphknoten (8-25 Nodi lymphatici) insbesondere der supero-medialen Zone (Nll. inguinales superficiales). Hier ist der sog. Sentinel-Lymphknoten zu suchen. Er liegt unter der subkutanen Faszie und extern zur Fascia lata. Lymphe aus der Glans penis vereinigt sich mit Lymphflüssigkeit der Schwellkörper in einer Art Ringgeflecht an der Peniswurzel. Die Drainage erfolgt sowohl via oberflächliche inguinale Lymphknoten in tiefer gelegene - als

auch direkt in tiefe inguinale Lymphknoten oder sogar in die Gruppe der an den externen Iliacalfäßen gelegenen Lymphknoten. Die tiefen inguinalen Lymphknoten liegen unter der Fascia lata am Hiatus saphenus nahe der Mündungsstelle der V. saphena magna in die V. femoralis. Diese 3-5 Lymphknoten sind die Verbindung zu den pelvinen second-line Lymphknoten (iliacal extern-, iliacal intern- und obturatorisch). Der größte - der sog. Rosenmüller'sche oder Cloquet'sche Lymphknoten - liegt medial der V. femoralis in der Lacuna vasorum caudal des Lig. inguinale. Die simultane Entfernung der first- und second-line Lymphknoten wird als ilioinguinale Lymphknotendisektion bezeichnet (Pow-Sang et al. 2002).

Lymphographiestudien am Penis haben gezeigt, dass die Lymphdrainage aus dem Penis konstant von den oberflächlichen zu tiefen inguinalen Lymphknoten erfolgt. Eine „Skip“-Drainage im Sinne des Überspringens einer Station ließ sich lt. Cabanas nicht nachweisen (Cabanas 1977). Burgers zur Folge sind sog. „Skip“-Metastasen (pelvine Lymphknotenmetastasen ohne Nachweis inguinaler Lymphknotenfiliae) oder Fernmetastasen extrem selten und müssen als Ergebnis hämatogener Aussaat verstanden werden (Burgers et al. 1992).

Außerdem existieren multiple Querverbindungen zwischen rechts und links auf allen Etagen. Daher verläuft die penile Lymphdrainage gleichzeitig über die inguinalen Lymphknotengruppen beider Seiten, was bei einer Lymphadenektomie (vgl. 2.1.10.2) auch im Rahmen nur unilateral suspekter Lymphknoten berücksichtigt werden muss (Lynch und Pettaway 2003, Naumann et al. 2005a, Pow-Sang et al. 2002).

Eine Hyperkalziämie, wie sie unter 2.1.9. erwähnt wurde, scheint abhängig von der Gesamttumormasse und ist zumeist mit einer inguinalen Lymphknotenmetastasierung assoziiert. Entsprechend lässt sich der erhöhte Serumkalziumspiegel mit Entfernung des Primärtumors und vor allem einer Lymphadenektomie gut kupieren. In ausgeprägten Fällen einer Hyperkalziämie muss ggf. eine medikamentöse Therapie zur Kalziumdiurese bzw. mit antiresorptiven Bisphosphonaten eingeleitet werden (Lynch und Pettaway 2003).

Insgesamt herrscht große Einigkeit über die Korrelation zunehmender Entdifferenzierung des Tumors mit der Entwicklung von Lymphknotenmetastasen. Allerdings werden die meisten Tumoren bereits mit einem niedrigen Grading entdeckt. Daher wären auch Parameter aus den Primärtumoren, die bei Patienten mit invasiven niedriggradigen Peniskarzinomen eine bessere Prognoseabschätzung zulassen, für das weitere Patienten-Management und speziell für die Entscheidung der Frage nach einer frühen Lymphadenektomie von Bedeutung. (Fraleley et al. 1989, Horenblas et al. 1993, Lynch und Pettaway 2003)

Die Ergebnisse verschiedener Studien legen nahe, dass ein Langzeitüberleben (5-JÜR mindestens 80%) nach inguinaler Lymphadenektomie mit kurativer Intention nur möglich ist, wenn folgende Kriterien erfüllt sind: 1. minimale Lymphknotenbeteiligung (maximal 2 Lymphknoten), 2. unilaterale Lymphknotenmetastasen, 3. kein Nachweis extranodaler Tumorausbreitung, 4. keine pelvinen Lymphknotenmetastasen. Dementsprechend ist es vorteilhaft, Lymphknotenmetastasen so früh wie möglich zu diagnostizieren und zu behandeln, noch ehe eines der genannten Kriterien überschritten ist (Lynch und Pettaway 2003). Somit ließe sich durch chirurgische Resektion inguinaler Lymphknotenmetastasen o.g. Heilungsrate erzielen, was wiederum der urologischen Erfahrung mit Hodentumoren entspricht.

## 2.3. Genetische Aspekte

### 2.3.1. Allgemeine Grundlagen der Karzinogenese

Die Karzinogenese ist von dynamischen Veränderungen des Genoms gekennzeichnet. Die Grundlage hierfür bilden Mutationen, die durch Veränderungen in nur einem Allel aus Protoonkogenen Onkogene mit einem dominanten Funktionszugewinn hervorbringen können und zum anderen durch Mutationen beider Allele von Tumorsuppressorgenen einen rezessiven Funktionsverlust dieser bedingen (Kassen und Hofmöckel 2000). Diese Veränderungen führen zur Transformation normaler Zellen in maligne Tumorzellen. Solche maligne transformierten Zellen weisen molekulare -, biochemische - und zelluläre Merkmale auf, wie sie vermutlich in gleicher Weise bei allen malignen Tumoren zu finden sind. Da die Regulationsmechanismen aller menschlichen Zellen für Proliferation, Differenzierung und Zelltod identisch sind, dürfte es sich nach Ansicht von Hanahan und Weinberg (Hanahan und Weinberg 2000) um eine begrenzte Zahl erworbener funktioneller Fähigkeiten handeln, die normale menschliche Zellen in hochmaligne Derivate verwandeln. Dieser Prozess der Tumorgenese verläuft in mehreren komplexen Schritten, wobei jeder dieser Schritte eine genetische Alteration widerspiegelt, die einen Wachstumsvorteil für die Tumorzelle darstellt (Grizzi et al. 2006). In ihrem Zusammenspiel führen sie zur Störungen der Homöostase zwischen Zellteilung und Zelltod. Man unterscheidet 6 essentielle Alterationen von Tumorzellen, die kollektiv zu malignem Wachstum führen:

- a - eigenständige Generierung von Wachstumssignalen
- b - Unempfindlichkeit gegenüber wachstumshemmenden Signalen
- c - Umgehung des programmierten Zelltodes (Apoptose)
- d - grenzenloses Potential zur Replikation
- e - anhaltende Angiogenese
- f - Invasion in Nachbargewebe und Metastasenbildung

Im Einzelnen lassen sich diese Veränderungen der Zellphysiologie als Störungen der Verteidigungsmechanismen gegenüber malignen Tumoren wie folgt beschreiben:

a) Viele Onkogene ahmen die Funktion normaler Wachstumssignale nach und reduzieren damit gleichzeitig die Abhängigkeit der Tumorzelle von einer Stimulation durch das sie umgebende Gewebe. Dahinter stehen verschiedene molekulare Strategien. Zum einen erfolgt eine so genannte autokrine Stimulation über z.B. die Produktion von PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) und TGF $\alpha$  (Transforming Growth Factor  $\alpha$ ), wie sie bei Glioblastomen und Sarkomen vorkommt (Fedi et al. 1997). Des Weiteren kommt es zu einer Überexpression von Wachstumsfaktor-Rezeptoren mit Tyrosinkinaseaktivität in deren zytoplasmatischer Domain, die die Krebszelle überempfindlich gegenüber bereits geringsten Konzentrationen von Wachstumsfaktoren machen, die normalerweise noch keine Proliferation triggern würden (z.B. EGF-R/erbB [Epidermal Growth Factor der ErbB Familie] in Magen-, Hirn- und Brusttumoren). Abgesehen davon beschrieben DiFiore et al. bereits 1987, dass auch eine extreme Überexpression von Wachstumsfaktor-



Rezeptoren eine Liganden-unabhängige Signalgebung hervorrufen kann (Di Fiore et al. 1987). Und schließlich führt eine erfolgreiche Bindung spezifischer Teile der extrazellulären Matrix an sog. Integrinrezeptoren (= extrazelluläre Matrixrezeptoren) im Sinne einer Signaltransduktion u.a. zu einer Motilitätszunahme der Zelle, zur Resistenz gegenüber Apoptose oder zum Eintritt in den aktiven Zellzyklus (Giancotti und Ruoslahti 1999, Lukashev und Werb 1998).

Ebenso wie die oben genannten Autonomie-Mechanismen der Tumorzellen sind vermutlich auch heterotype Signale zwischen den verschiedenen Zelltypen innerhalb eines Tumors für die Tumorzellproliferation von Bedeutung (Skobe und Fusenig 1998). So beschreiben verschiedene Autoren (Cordon-Cardo und Prives 1999, Coussens et al. 1999, Hudson et al. 1999), dass auch die paraneoplastischen Entzündungszellen das Tumorstadium eher begünstigen als eliminieren können.

b) Anti-Wachstums-Signale blockieren die Zellproliferation im Wesentlichen auf zwei unterschiedliche Weisen. Zum einen können Zellen aus dem aktiven proliferativen Zyklus in ein Ruhestadium ( $G_0$ ) versetzt werden und zum anderen können Zellen ihr proliferatives Potential gänzlich aufgeben und einen postmitotischen Status einnehmen, was gewöhnlich mit dem Erreichen einer speziellen Differenzierung einhergeht. Beides kann sowohl durch gelöste Inhibitoren als auch im Bereich der extrazellulären Matrix oder an der Oberfläche von Nachbarzellen fixierte Inhibitoren ausgelöst werden. Auf der molekularen Ebene erfolgt dies bei vielen antiproliferativen Signalen durch das Retinoblastom-Protein (pRb) und seine Verwandten p107 und p130. Hypophosphoryliert blockiert pRb normalerweise die Zellproliferation durch Alteration der E2F-Transkriptionsfaktoren-Familie und verhindert damit die Progression von der G1- in die S-Phase während des Zellzyklus (Weinberg 1995).

Eine Störung im pRb-Pathway setzt E2Fs frei, führt zur Unempfindlichkeit der Zelle gegenüber Anti-Wachstumsfaktoren und ermöglicht so eine Proliferation. Dies kann bei den unterschiedlichen Tumoren des Menschen auf verschiedene Arten erfolgen (Bell und Ryan 2004). Zum Beispiel kann eine Herunterregulation des TGF- $\beta$ -Rezeptors bzw. eine Mutation desselben zu einer verstärkten Phosphorylierung von pRb führen und wiederum E2Fs freisetzen. Auf direkterem Weg ist TGF- $\beta$  für die Synthese des p15<sup>INK4B</sup> - und p21-Proteins verantwortlich, welche die Cyclin:CDK-Komplexe (cyclin:cyclin-dependent-kinase-Komplexe), die ebenfalls für die Phosphorylierung von pRb verantwortlich sind, blockieren (Datto et al. 1997, Hannon und Beach 1994). Durch Deletion z.B. des p15<sup>INK4B</sup> codierenden Genlokus (Chin et al. 1998) bzw. Mutation des Gens für seine INK4A/B- interaktive Domain kann es wiederum zu einer pRb-Inaktivierung durch Hyperphosphorylierung kommen (Zuo et al. 1996). Schließlich kann auch das funktionsfähige pRb durch Mutation seines Gens verloren gehen. Dyson et al (Dyson et al. 1989) beschrieben für virusinduzierte Tumoren (z.B. Zervixkarzinom bei HPV-16-Infektion) alternativ einen pRb-Funktionsverlust aufgrund einer Sequestrierung durch virale Onkoproteine wie E7.

Wie bereits oben beschrieben ist für die Zellproliferation nicht nur die Blockade wachstumshemmender Signale sondern auch die Vermeidung eines irreversibel postmitotischen Status von Bedeutung. Letzteres wird in vielen Tumoren mittels Überexpression des c-Myc-Onkoproteins erreicht, welches über so genannte

Myc-Max-Komplexe mit einem anderen Faktor (Max) die Zelldifferenzierung beeinträchtigt und so das Zellwachstum begünstigt (Walker et al. 2005).

c) Die Fähigkeit, dem programmierten Zelltod - der Apoptose - zu entkommen, zählt ebenfalls zu den Merkmalen maligner Zellen vermutlich aller Krebsarten. Die Apoptose selbst, zu der nahezu alle Körperzellen in der Lage sind, besteht aus 2 Komponenten, welche als Sensoren und Effektoren bezeichnet werden können. Sensoren registrieren die extra- und intrazellulären Bedingungen, die sich auf das Weiterleben oder Sterben der Zelle auswirken (z.B. aktivierte Onkogene, Hypoxie etc.). Diese Signale steuern wiederum die Effektoren des apoptotischen Zelltodes. Viele dieser Signale konvergieren schließlich in den Mitochondrien, welche Cytochrom C, einen potenten Katalysator der Apoptose, freisetzen (Green und Reed 1998). Dies geschieht über die Stimulation der Mitochondrien durch das pro-apoptotische Protein Bax aus der Bcl-2-Familie. Die Expression von Bax selbst wird hochreguliert, hervorgerufen durch das p53-Tumor-Supressor-Protein, als Reaktion auf DNA-Defekte. Die grundlegenden Apoptose-Effektoren sind eine Reihe intrazellulärer Proteasen, die als Caspasen bezeichnet werden und kaskadenartig durch selektiven Abbau subzellulärer Strukturen bis hin zum Genom die Apoptose ablaufen lassen (Thornberry und Lazebnik 1998). Es gibt verschiedene Belege dafür, dass die Apoptose eine wesentliche Barriere für die Krebsentstehung darstellt. Zum Beispiel werden Zellen, die aktivierte Onkogene tragen, kontinuierlich aussortiert und eliminiert. So konnte im Mausmodell bereits 1994 durch Symonds et al. gezeigt werden, dass bei funktionell inaktiviertem pRb-Tumor-Supressor-Protein (woraus langsam wachsende mikroskopische Tumoren resultieren) eine hohe Apoptoserate herrscht und erst eine zusätzliche Inaktivierung des p53-Tumor-Supressor-Proteins zu raschem Tumorwachstum mit nur noch geringer Anzahl apoptotischer Zellen führt (Symonds et al. 1994). Eine Apoptoseresistenz kann von Tumorzellen auf verschiedene Weisen erlangt werden. Am häufigsten finden sich Mutationen, die das TP-53 (oder p53)-Tumor-Supressor-Gen betreffen. Dies führt zur Inaktivierung seines Genproduktes, dem p53-Protein, und stellt somit den Verlust einer Schlüsselkomponente im Sensor für DNA-Defekte, welcher die apoptotische Effektor-Kaskade induzieren kann, dar. Dieser Ausfall eines proapoptotischen Regulators kann in mehr als 50% der menschlichen malignen Tumorarten beobachtet werden (Harris 1996). Darüber hinaus bedeutet das gleichzeitig eine Beeinträchtigung der apoptotischen Funktionen anderer Signale wie z.B. Hypoxie und Onkogen-Hyperexpression, da diese via p53 zusammenlaufen (Levine 1997).

Da allerdings die meisten Regulations- und Effektor-Komponenten der Zelle in redundanter Form vorliegen, könnten bei Verlust proapoptotischer Komponenten trotzdem andere in gleicher Weise funktionierende Komponenten fortbestehen. Neue Technologien werden möglicherweise in der Lage sein, diese für spezifische Tumorzellen darzustellen und neue Medikamente könnten zu einem Austausch zwischen parallelen, noch intakten Signalwegen der Apoptose führen. Das hätte eine Restauration des apoptotischen Verteidigungsmechanismus zur Folge und würde mit einem substanziellen therapeutischen Erfolg einhergehen (Hanahan und Weinberg 2000).

d) Unabhängig von interzellulären Signalen besitzen alle Zellen ein autonomes Programm, das ihre Replikationsrate limitiert. Dieser Prozess wird als Alterung bezeichnet. Um einen Zellklon makroskopischen Ausmaßes bzw. lebensbedrohlicher Größe entstehen zu lassen, muss dieser Prozess ausgeschaltet werden. Die Zellalterung kann umgangen werden, indem die Tumorsuppressor-Proteine pRb und p53 in ihrer Funktion gestört werden. Dies ermöglicht den Zellen eine kontinuierliche Multiplikation für mehrere Generationen, bis sie ein zweites als Zell-Krise bezeichnetes Stadium erreichen. In dieser Krise kommt es zum massiven Zelltod und zur Unordnung des genetischen Materials. Als Kennzeichen von letzterem finden sich chromosomale End-zu-End-Verbindungen und es kommt in ca. einem von  $10^7$  Fällen zur Entstehung einer Variante, die die Fähigkeit zur grenzenlosen Vermehrung besitzt und somit das Merkmal der Unsterblichkeit trägt (Wright et al. 1989).

Erklärt wird dies mit einer gewissen Länge von Telomeren oberhalb einer kritischen Schwelle, welche die unlimitierte Multiplikation der nachkommenden Zellen erlaubt. Telomere bestehen normalerweise aus mehreren Tausend Wiederholungen von kurzen, 6 Basenpaare umfassenden Chromosomenabschnitten. Während eines Zellzyklus verliert jedes Chromosom ca. 50-100 Basenpaare dieser telomerischen DNA an seinem Ende. Diese progressive Verkürzung wird auf die Unfähigkeit der DNA-Polymerase zurückgeführt, während der S-Phase komplett die Enden der chromosomalen DNA zu replizieren. Eventuell verlieren dadurch die Telomere ihre Fähigkeit, die Enden der chromosomalen DNA zu schützen. Diese ungeschützten DNA-Enden sind so einer oben beschriebenen chromosomalen End-zu-End-Fusion während der Zellkrise, die mit einer genetischen Unordnung einhergeht, ausgesetzt. Nahezu unvermeidlich resultiert daraus der Tod der betroffenen Zelle (Counter et al. 1992). Somit ist es nicht verwunderlich, dass praktisch alle malignen Zellen ihre Telomere erhalten (Shay und Bacchetti 1997). In 85-95% geschieht das durch Hochregulation der Expression der Telomerase – ein Enzym, welches Hexanukleotide an die Telomerenden der DNA anhängt (Bryan und Cech 1999). In den restlichen Fällen werden die Telomere durch Rekombination, die auf interchromosomalem Austausch der sequenziellen Information beruht, beibehalten (Bryan et al. 1995). Beide Mechanismen scheinen in normalen menschlichen Zellen stark supprimiert zu sein, um deren unlimitiertes Replikationspotential zu unterdrücken.

e) Aufgrund der Abhängigkeit aller Zellen vom Nährstoffangebot erscheint es plausibel, dass insbesondere rasch proliferierende Zellen innerhalb eines Gewebes eine intrinsische Fähigkeit besitzen sollten, das Wachstum von Blutgefäßen anzuregen. Den Zellen in anormal proliferierenden Läsionen fehlt initial diese angiogenetische Fähigkeit. Sie bescheiden sich auf ihr expansives Potential. Aber um an Größe weiter zunehmen zu können, müssen die Neoplasien bereits im Initialstadium eine angiogenetische Fähigkeit entwickeln (Bouck et al. 1996, Folkman 1997, Hanahan und Folkman 1996). Die Angiogenese wird durch entgegengesetzte positive und negative Signale, welche begünstigend oder blockierend wirken, gesteuert.

Zu den Angiogenese-inhibierenden Signalen gehören beispielsweise VEGF (vascular endothelial growth factor) und FGF1/2 (acidic and basic fibroblast growth factors). Beide binden an transmembranäre Tyrosinkinase-Rezeptoren auf der Oberfläche von Endothelzellen (Fedi et al. 1997, Veikkola und Alitalo 1999). Zu den Prototypen der Angiogeneseinhibition gehört Thrombospondin-1. Das bindet an CD36, einem

transmembranären Rezeptor auf Endothelzellen, welcher an intrazelluläre Src-like-Tyrosinkinase gekoppelt ist (Bull et al. 1994). Aktuell sind mehr als 2 Dutzend die Angiogenese inhibierende Faktoren und die gleiche Zahl endogener Inhibitorproteine bekannt. Die Fähigkeit zur Angiogenese scheint während der frühen - bzw. mittleren Phase der Tumorentwicklung durch einen Schritt im Sinne einer angiogenetischen Umschaltung aus einer vaskulären Ruhephase erworben zu werden.

Da sich letztlich ein makroskopischer Tumor nur im Aufbau auf die Neovaskularisation entwickeln kann, ist sie Voraussetzung für eine rasche klonale Expansion (Hanahan und Folkman 1996). Es kommt hierfür zur Balanceverschiebung zwischen Angiogeneseinduktoren und -inhibitoren z.B. durch erhöhte Expression von VEGF und FGF bzw. Herunterregulation von Thrombospondin-1 oder  $\beta$ -Interferon als endogene Inhibitoren (Singh et al. 1995, Volpert et al. 1997). Thrombospondin-1 wird beispielsweise durch das p53-Tumorsuppressor-Protein reguliert, so dass ein Verlust von dessen Funktion verminderte Thrombospondin-1-Konzentrationen nach sich zieht, was wiederum einen verminderten inhibitorischen Effekt bedeutet (Dameron et al. 1994). Gleichzeitig kommt es bei Aktivierung des ras-Onkogens oder Verlust des VHL-Tumorsuppressor-Gens in verschiedenen Zellen zur Hochregulation der VEGF-Expression (Maxwell et al. 1999, Rak et al. 1995).

Und schließlich können auch Proteasen in die Bioverfügbarkeit angiogenetisch aktiver Substanzen eingreifen und damit deren Wirksamkeit kontrollieren (Whitelock et al. 1996).

Im Umkehrschluss zeigen alle diese Mechanismen die komplexe homöostatische Regulation der Angiogenese in normalem Gewebe und die im Normalfall herrschende vaskuläre Integrität.

f) Früher oder später entstehen in Primärtumoren Zellen, die in der Lage sind, auszuwandern, in benachbarte Gewebe einzudringen und an anderen Körperstellen neue Tumorkolonien zu bilden. Diese so entstandenen Metastasen sind in 90% der Fälle für den Tod bei Krebserkrankungen verantwortlich (Sporn 1996). Sie bestehen aus einem Konglomerat von Tumorzellen und normalen Zellen des „Wirtsgewebes“, welche zur Unterstützung der Tumorzellen „gezwungen“ werden. Dabei spielen unter anderem Veränderungen der physikalischen Kopplung der Zellen zu ihrer Mikroumgebung und die Aktivierung extrazellulärer Proteasen eine Rolle. Außerdem sind bei der Anheftung der metastatischen Zellen im Umgebungsgewebe verschiedene Proteine involviert. In diesem Zusammenhang sind Immunglobuline, calciumabhängige Cadherine und Integrine zu nennen, die alle eine regulatorische Signalfunktion besitzen (Aplin et al. 1998). Eines der wohl am besten erforschten Interaktionsmoleküle ist das E-Cadherin. Die Kopplung zwischen aneinander grenzenden Zellen durch E-Cadherin-Brücken führt u.a. zur Transmission von Antiwachstums-signalen. In den meisten epithelialen Tumoren ist diese Funktion des E-Cadherins durch Mutation, Transkriptionsunterdrückung oder Proteolyse der extrazellulären Cadherin-Domäne verloren gegangen (Christofori und Semb 1999). Dieser Funktionsverlust ist ein entscheidender Schritt beim Erreichen der Fähigkeit zur Invasion und Metastasierung eines Tumors.

Ebenso bedeutend erscheinen extrazelluläre Proteasen (Chambers und Matrisian 1997, Coussens und Werb 1996). Deren Gene werden hochreguliert, Protease-Suppressor-Gene herunterreguliert und inaktive Formen in aktive Enzyme überführt. Typischerweise sind Matrix-degradierende Proteasen mit der Zelloberfläche

durch Synthese mit einer transmembranären Domain bzw. mit Integrinen assoziiert oder binden an spezifische Protease-Rezeptoren. Es ist leicht vorstellbar, dass an Zelloberflächen gebundene aktive Proteasen die Invasion von Tumorzellen in benachbartes Stroma, quer durch Gefäßwände und durch normale Epithelschichten hindurch, begünstigen. Darüber hinaus leisten spezielle Proteasen auch einen Beitrag zu weiter oben genannten Tumoreigenschaften wie der Angiogenese und der Generierung von Wachstumssignalen, was letztlich wiederum direkt oder indirekt zur Invasion/Metastasierung beiträgt (Bergers und Coussens 2000, Stetler-Stevenson 1999, Werb 1997). Aber auch von Stroma- oder Entzündungszellen gebildete Proteasen werden von Tumorzellen genutzt (Johnsen et al. 1998 Oct, Werb 1997).

Betrachtet man alle 6 aufgeführten Charakteristika von Tumorzellen auf ihrem Weg zur Tumorprogression, ergibt sich allerdings eine Diskrepanz zwischen ihrer Entstehung durch genetische Instabilität und der Effektivität eines solchen Prozesses. Denn einzelne Mutationen bestimmter Gene sind aufgrund komplexer und kontinuierlich arbeitender DNA-Überwachungs- und Reparaturmechanismen zu ineffektiv und zu selten. Deshalb wurde von Loeb (Loeb 1991) für Tumorzellen eine erhöhte Mutationsfähigkeit postuliert. Dies wiederum funktioniert nur über eine Störung der DNA-Sicherungssysteme (Lengauer et al. 1998). Das bekannteste dieser Systeme ist das p53-Tumor-Suppressor-Protein. In Abhängigkeit von der DNA-Beschädigung führt es zum Pausieren des Zellzyklus, um Reparaturen durchführen zu können oder zur Apoptose bei ausgeprägtem Schaden. Man weiß heute, dass der p53-abhängige Signalweg in nahezu allen humanen malignen Tumoren defekt ist (Levine 1997). Darüber hinaus gibt es eine steigende Zahl anderer „Reparaturgene“, die in verschiedenen Tumoren ihre Funktionen verloren haben (Lengauer et al. 1998). Interessanterweise kann auch die Apoptose zur genetischen Instabilität beitragen, indem Tumor-DNA im Rahmen der Phagozytose in Nachbarzellen gelangt und dort, in das Genom integriert, aktiv werden kann (Holmgren et al. 1999).

Die genetische Instabilität ermöglicht es somit prämaligen Zellen, die oben genannten 6 Alterationen für die Tumorprogression zu erreichen. In welcher Geschwindigkeit oder Reihenfolge dies geschieht und welches die auslösenden Faktoren waren, variiert zwischen Tumoren gleichen Typs und erst recht im Vergleich zwischen Tumoren unterschiedlichen Typs erheblich voneinander.

### **2.3.2. Genetische Veränderungen bei Peniskarzinomen**

Über molekulargenetische Veränderungen, die charakteristisch für das Plattenepithelkarzinom am Penis sind bzw. zu seiner Entstehung und Progression beitragen, ist bis heute relativ wenig bekannt. Die Ergebnisse verschiedener Studien (Bosch et al. 1995, Siow und Cheng 2005, Rubin et al. 2001) weisen darauf hin, dass Ätiologie und pathogenetische Entwicklungsmuster des Peniskarzinoms eher einem Vulvakarzinom als einem Zervixkarzinom der Frau ähnlich sind. Ein Indiz dafür ist die Inzidenz von HPV-Infektionen in diesem Zusammenhang. So ist HPV-DNA bei Plattenepithelkarzinomen des Penis in ca. 42% der Fälle nachweisbar.

Dies ist eine deutlich geringere Zahl als bei Zervixkarzinomen (nahezu 100%) (Alani und Munger 1998 Jan), entspricht allerdings in etwa der Rate eines Vulvakarzinoms (50%) (Bloss et al. 1991). Das legt eine HPV-Genotypisierung im Rahmen der Gebärmutterhals-Krebsvorsorge bei Frauen nahe. Wegen der geringeren HPV-Prävalenz in penilen Karzinomen sowie der weitaus geringeren Inzidenz des Peniskarzinoms scheint jedoch ein HPV-Screening der männlichen Bevölkerung dagegen zur Zeit nicht sinnvoll (Schneede et al. 2003).

Rubin et.al. (Rubin et al. 2001) beobachteten in Abhängigkeit der histologischen Tumorsubtypen des Peniskarzinoms auch differente HPV-Infektionsraten. Basaloide und warzenartige Karzinome sind nahezu immer HPV-positiv, während dies nur einen Teil der verhornenden und verrukösen Tumore betrifft (hauptsächlich HPV 16 = 60%). Beim Zervixkarzinom sind fast alle Subtypen (SCC, Adenokarzinom, adenosquamöses Karzinom) mit HPV assoziiert. Als Kontrast dazu scheinen Peniskarzinome so wie Plattenepithelkarzinome der Vulva multiplen pathogenetischen Wegen zu folgen.

Andererseits ist, wie bereits in 2.1.4. und 2.1.5. beschrieben, der Zusammenhang zwischen einer Infektion, insbesondere mit den HPV-Subtypen 16 bzw. 18, und der malignen Transformation präputialer Keratinozyten bekannt (Barbosa und Schlegel 1989, Werness et al. 1990). Dies erfolgt durch Alteration der Genprodukte des Tumorsuppressor-Gens p53 und des Retinoblastom-Gens (Rb). Deren normale Funktionen bestehen in der Beeinflussung des Zellzyklus mit Induktion der Apoptose bzw. Blockierung der Zellproliferation respektive (vergleiche Abschnitt 2.3.1.), um eine Transformation der Zellen durch äußere Einflüsse zu verhindern. Doch gerade die von p53 und Rb codierten zellulären Tumorsuppressorprodukten werden durch HPV 16 und HPV 18 alteriert. Dafür binden die viralen Onkoproteine E6 und E7 an diese gleichsam schützenden Genprodukte p53-Protein und pRb, was eine Inaktivierung dieser zur Folge hat (Dyson et al. 1989, Hawley-Nelson et al. 1989). Dadurch erlangen die virus-infizierten Keratinozyten Immortalität und werden zum unlimitierten Wachstum befähigt. Letztlich verursachen die HPV-Onkoproteine damit eine genetische Instabilität (Schneede 2002), welche darüber hinaus eine Empfindlichkeit der zellulären DNA auch gegenüber dem karzinogenen Effekt anderer Mutagene verursacht und eine wichtige Voraussetzung für die Zelltransformation und maligne Entartung der Zellen im Rahmen der Karzinogenese darstellt (Mölling 1991)

Eine prinzipiell andere Herangehensweise zum Auffinden genetischer Veränderungen bei Karzinomen stellt die Untersuchung des gesamten Genoms bzgl. Veränderungen auf chromosomaler Ebene dar. Zu diesem Zweck unterzogen Alves et al. 26 Fälle peniler Plattenepithelkarzinome einer CGH. Dabei konnten Zugewinne von DNA-Abschnitten auf den Chromosomen 18q24, 16p11-12, 20q11-13, 22q, 19q13 und 5p15 festgestellt werden und es fanden sich auf der anderen Seite Verluste auf den Chromosomen 13q21-22, 4q21-32 und auf dem X-Chromosom (Alves et al. 2001).

Die Greifswalder Arbeitsgruppe um Protzel führte auf der Suche nach molekulargenetischen Veränderungen mit einem gewissen Vorhersagewert beim Peniskarzinom eine Studie zu Allelverlusten von Mikrosatellitenmarkern durch. Allelimbalancen fanden sich für mindestens einen Mikrosatellitenmarker bei

allen untersuchten Karzinomen. Ebenso zeigten Metastasen in der Regel die gleichen Imbalancen wie deren Primärtumoren und darüber hinausgehende Aberrationen. Eine signifikante Korrelation zwischen dem Auftreten von Metastasen und Allelimbalancen konnte für die Marker D11S528 und D12S101 gezeigt werden. Nahezu alle Metastasen offenbarten Allelimbalancen der Marker der Chromosomen 6q und 18q. Gleichzeitig konnte eine Korrelation zu den Tumorsubtypen und dem T-Stadium ausgeschlossen werden (Protzel et al. 2006).

Berdjis fand zusammen mit der Dresdener Arbeitsgruppe eine signifikante Assoziation zwischen dem Ki67- Labelling-Index und dem Tumorgrading sowie eine Tendenz zu höherem Labelling-Index bei höherem Tumorstadium, Lymphknotenmetastasierung und klinischer Krankheitsprogression (Berdjis et al. 2005). Bei Ki67 handelt es sich um ein non-Histon-Protein der Kern-Matrix, welches in allen Zellzyklusphasen außer der G0-Phase exprimiert wird. Bisherige Studien konnten z.B. für Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich eine Korrelation zwischen deren Proliferationsrate, determiniert durch Ki67 und der Tumor-Entdifferenzierung, der Lymphknotenbeteiligung und dem Krankheitsprogress zeigen (Liu et al. 2003). Martins et al. untersuchten die proliferative Aktivität von Peniskarzinomen mit Hilfe der Immunfärbung für PCNA (proliferating cell nuclear antigen) und fanden in der univariaten Analyse eine signifikante Korrelation mit Lymphknotenmetastasen. Schließlich konnte in der eben genannten - und in einer weiteren Studie (Lopes et al. 2002, Martins et al. 2002) eine Korrelation zwischen Krankheitsprogression sowie Mortalität und der immunhistochemisch nachweisbaren Überexpression des Tumorsuppressorgenproduktes p53 beim Peniskarzinom nachgewiesen werden.

Auf die Bedeutung des Squamous cell carcinoma antigen (SCCAg) als Tumormarker bei Plattenepithelkarzinomen allgemein und beim Plattenepithelkarzinom des Penis im Speziellen wurde bereits hingewiesen (vgl. 2.1.9.). Es handelt sich dabei um ein tumorassoziiertes Glycoprotein, das zur Familie der Serin-Protease-Inhibitoren (Serpine) gehört. Das SCCAg-Gen wurde auf dem Chromosom 18q21.3 lokalisiert und die Exonsequenz davon zeigte weitgehende Übereinstimmung mit inhibierenden Serpinen. Das SCCAg inhibiert humanes Chymotrypsin, Cathepsin L, Calpain 1 und Papain. Sein Anteil am malignen Verhalten von Plattenepithelkarzinomen erstreckt sich wahrscheinlich auf interzelluläre Adhäsionsereignisse wie die Metastasierung und lokale Invasion von Umgebungsgewebe (Kommu et al. 2005).

### 3. Ziele der Arbeit und Fragestellung

Das Plattenepithelkarzinom des Penis - ein in Mitteleuropa seltener Tumor - hat als lokalisierte Erkrankung eine gute Prognose. Im Frühstadium ist eine minimal invasive Therapie bereits kurativ. Mit dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen sinkt jedoch die Überlebensrate drastisch. Eine zu diesem Zeitpunkt durchzuführende Penis(teil)amputation sowie die regionäre Lymphadenektomie mit ihren Komplikationen stellen gravierende Eingriffe mit einem erheblichen Verlust an Lebensqualität für die Betroffenen dar.

Weder die modernen bildgebenden Verfahren noch invasive diagnostische Methoden sind derzeit in der Lage, klinisch unauffällige Lymphknotenmetastasen mit letzter Sicherheit zu identifizieren.

So konkurriert in den Therapieempfehlungen möglicher Lymphknotenmetastasen das abwartende Verhalten, welches das Risiko einer zu späten Behandlung in sich trägt, mit dem radikal chirurgischen Vorgehen, gegen welches sich Bedenken vor allem wegen der bekannten Komplikationen des Eingriffes (vgl. 2.1.10.2.) richten. Eine Entscheidungshilfe in dieser Situation ist somit von immenser Bedeutung für die Auswahl der adäquaten Therapie von Peniskarzinom-Patienten und daher für die Klinik dringend notwendig.

Bis dato ist wenig über die Pathogenese des Peniskarzinoms bzw. sein Metastasierungspotential bekannt. Bisherige Untersuchungen bemühten sich, anhand histopathologischer Veränderungen Prognosefaktoren zu definieren, aus welchen sich in statistischen Grenzen therapeutische Strategien ableiten ließen (vgl. 2.1.12.).

Nur wenige Studien beschäftigen sich mit den genetischen Veränderungen dieses Tumors bzw. dem Zusammenhang zwischen molekulargenetischen Parametern und seinem biologischen Verhalten.

Falls lokalisierte Peniskarzinome im Vergleich zu metastasierten Tumoren andere genetische Veränderungen und somit Unterschiede in Verlauf und Prognose aufweisen, würden sich daraus entscheidende Konsequenzen hinsichtlich des individuellen Therapieregimes und der Nachsorge ergeben. Daher war das Ziel der vorliegenden Arbeit, zu untersuchen, ob spezifische genetische Veränderungen nachgewiesen werden können, welche die Vorhersage bzgl. des Risikos einer lymphogenen Metastasierung erlauben.

Im Rahmen der Untersuchungen sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Gibt es spezifische genetische Veränderungen, die für ein Plattenepithelkarzinom des Penis charakteristisch sind?
2. Gibt es einen Zusammenhang zwischen der Zahl chromosomaler Veränderungen und dem Status der lymphogenen Metastasierung?
3. Unterscheiden sich metastasierte Tumoren von nicht metastasierten Tumoren aufgrund chromosomaler Veränderungen und markieren diese ein spezielles Metastasierungsrisiko?
4. Gibt es spezifische chromosomale Veränderungen, welche mit dem Differenzierungsgrad der Tumoren assoziiert sind?
5. Gibt es einen Zusammenhang zwischen chromosomalen Aberrationen und der Überlebenszeit von Patienten mit einem Peniskarzinom?
6. Kann aus der Summe der chromosomalen Veränderungen des Primärtumors ein Rückschluss auf sein weiteres Metastasierungsverhalten gezogen werden?



## 4. Material und Methoden

### 4.1. Patientenkollektiv

Aufgrund der Seltenheit des Peniskarzinoms wurde für die vorliegende Studie Material von Patienten der Klinik für Urologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Deutschland, der Klinik für Urologie der Semmelweis-Universität Budapest, Ungarn und der Klinik für Urologie Hradec Králové, Tschechische Republik, untersucht. So ließ sich eine statistisch auswertbare Stichprobe zusammenstellen.

Die DNA-Analyse mittels CGH erfolgte bei n=33 Patienten. Auf die genannten Kliniken verteilt bedeutet das: 9 Patienten aus der Jenaer Klinik, 13 Patienten aus Budapest und 11 Patienten aus Hradec Králové.

Das Durchschnittsalter der Patienten betrug 62,8 Jahre, der Median lag bei 62 Jahren. Die Altersverteilung reichte von 35 bis 81 Jahren. Tabelle 4.1.-1 fasst die genannten Daten zusammen.

Tabelle 4.1.-1: Altersverteilung des Patientenkollektivs

Patienten n = 33	
Minimum	35 Jahre
Maximum	81 Jahre
Mittelwert	62,8 Jahre
Median	62 Jahre
Standardabweichung	12,22

Der Erfassungszeitraum lag zwischen 3/1991 und 9/2004. Die klinischen Verlaufsdaten wurden in den genannten Kliniken mit Hilfe eines Fragebogens, dessen Kriterien die Tab. 4.1.-2 zeigt, retrospektiv erhoben.

Tabelle 4.1.-2: Fragebogen zur Erhebung der klinischen Verlaufsdaten von Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom des Penis

Pat.-ID Initialen	Geburts- datum	Histologie- Nummer	Erste Krankheitszeichen	Datum der Diagnose (Primär-OP)	Lymphknotenstatus präoperativ	Neoadjuvante Chemotherapie
Definitive Therapie des Primärtumors	Histologie	TNM- Klassifikation	Lymphknotenstatus 2-3 Monate postop.	Datum einer inguinalen/iliacalen Lymphadenektomie		
Histologie der Lymphknotendissektion	adjuvante Therapie	Tumorprogress (Lokalisation)	pTNM	Sterbedatum	Überlebenszeit	

## 4.2. Material

Die beschriebenen 33 Peniskarzinome wurden in den genannten Kliniken reseziert und in den jeweiligen Instituten für Pathologie erfolgte nach Fixierung in Formalin und Paraffineinbettung die Anfertigung histologischer Schnitte sowie die primäre histologische Untersuchung der Präparate. Für die weitere Bearbeitung im Rahmen dieser Arbeit standen diese histologischen Schnittpräparate zur Verfügung.

Die histologische Klassifizierung und die genaue Tumorlokalisierung auf den Objektträgern wurde in schwierigen Fällen mit freundlicher Unterstützung des Institutes für Pathologie der FSU Jena bestätigt.

## 4.3. Methoden

Der Nachweis amplifizierter oder deletierter Chromosomenabschnitte ist ein wichtiges Kriterium für die Lokalisation möglicher Protoonkogene respektive Tumorsuppressorgene. Sind derartige Aberrationen häufig nachweisbar, weisen sie auf chromosomale Regionen hin, deren Zugewinn oder Verlust maßgeblich an der Tumorentstehung und -progression beteiligt ist (Ueno et al. 2003). Die CGH bietet ein genomweites Screening bzgl. solcher unbalancierter chromosomaler und subchromosomaler Veränderungen (du Manoir et al. 1993, Kallioniemi et al. 1992, Kallioniemi et al. 1993 Feb). Sie stellt somit einen richtungsweisenden Ansatz für das Peniskarzinom, über dessen genetische Veränderungen bisher nur wenige Untersuchungen vorliegen, dar.

Ein Vorteil der Methode ist, neben frisch asserviertem Gewebe oder Gefrierschnitten auch archiviertes, Formalin-fixiertes und in Paraffin eingebettetes Material im Rahmen einer retrospektiven Untersuchung verwenden zu können (Hirose et al. 2001, Huang et al. 2000, Speicher et al. 1993). Die daraus erwachsende Bedeutung für die Untersuchung des Peniskarzinoms mit seiner geringen Inzidenz liegt auf der Hand.

Außerdem erlaubt die CGH eine genetische Tumorklassifizierung insbesondere für morphologisch schwer klassifizierbare Tumoren. Art und Zahl genetischer Veränderungen dienen als Maß der Tumorentstehung im Sinne eines genetischen Tumorgradings und ermöglichen Aussagen zur Prognose sowie die Zuordnung von Metastasen zu einem Primärtumor (Petersen et al. 1996). Ebenso lassen sich genetische Veränderungen einer Tumorentität bereits in deren jeweiligen Präneoplasien nachweisen (Heselmeyer et al. 1996).

In Kombination mit der DOP-PCR (degenerate oligonucleotide-primed polymerase chain reaction), welche die zu untersuchende DNA mittels partiell degenerierter Oligonukleotide amplifiziert, ist selbst die Analyse des Genoms einzelner Zellen möglich, ohne dass eine Zellkultivierung erforderlich wäre. Damit können Schwierigkeiten (z.B. Zellklonselektion oder qualitativ unzureichende Metaphasechromosomen), die z.B. bei der Karyotypisierung auftreten und mit der Zellkultivierung im Zusammenhang stehen, von vornherein umgangen werden (Gebhart 2004, Harada et al. 2000, Lichter et al. 1996). So ist die CGH Methode der Wahl bei Tumoren mit geringer Mitoserate, um chromosomale Abschnitte mit numerischer Alteration zu identifizieren. Daneben hat die CGH auch ein Einsatzgebiet in der Präimplantations- und Pränataldiagnostik auf der Suche nach numerischen Chromosomenaberrationen (Voullaire et al. 1999, Wells et al. 1999).

Die Grenzen der Methode liegen im ausschließlichen Nachweis unbalancierter chromosomaler Aberrationen, während strukturell balancierte Aberrationen bzw. chromosomale Rearrangements wie Translokationen, Inversionen, Bildung von Isochromosomen oder Ringchromosomen unentdeckt bleiben. Jedoch können auch unbalancierte Aberrationen einer Detektion entgehen, wenn die Tumoren aus sehr heterogenen Subklonen bestehen. Zum Nachweis genetischer Veränderungen müssen mindestens 60% der untersuchten Zellen diese Veränderungen aufweisen. Normalgewebe oder Lymphozyten beeinträchtigen die Untersuchungsergebnisse (Kallioniemi et al. 1996 Feb, Weiss et al. 1999). Außerdem ist das Auflösungsvermögen der Methode auf Aberrationen oberhalb einer Länge von 10 Mbp begrenzt. Kleinere Subklone werden normalerweise nicht entdeckt, ausgenommen der Schwellenwert wird auf Kosten der Spezifität abgesenkt.

Im Folgenden wird die CGH, die vorbereitenden Arbeitsschritte sowie ihr Auswertungssystem beschrieben.

#### 4.3.1. DNA-Isolierung

Bei sehr guter lichtmikroskopischer Darstellbarkeit nach HE-Färbung (Hämatoxylin-Eosin-Färbung) erfolgt zunächst die Bewertung des Anteils an Tumorzellen in den interessierenden Arealen der Paraffinschnitte. Dieser sollte bei mindestens 90% liegen, da eine Verunreinigung des Untersuchungsmaterials mit normalen Zellen zu einer reduzierten Aussagefähigkeit der CGH-Ergebnisse führt.

Nach Markierung der tumortragenden Gewebeareale, die das genannte Kriterium erfüllen, werden die Deckgläschen abgelöst. Mit Hilfe einer Lanzette wird das Gewebe von den Objektträgern abgetragen und anschließend asserviert. Das so gewonnene Material wird für die weitere Bearbeitung in Xylol (2 x 10 min) entparaffiniert und die einzelnen Proben in absteigender Alkoholreihe (jeweils 5 min in 95%, 80% und 70% Alkohol) bis zum Aqua dest. hydratisiert.

Zur DNA-Isolation aus dem gewonnenen Material wird ein kommerzieller Kit der Firma Quiagen® - Tissue Protocol (QIAamp DNA Mini Kit®) verwendet:

Die Proben (< 25 mg) werden in je 180 µl ATL-Puffer in Reaktionsgefäßen mit 20 µl Proteinase K versetzt und bei 56°C inkubiert, bis das Gewebe lysiert ist. Anschließend werden je 200 µl AL-Puffer zugesetzt, vermischt und bei 70°C für 10 min inkubiert. Nach Zugabe von je 210 µl Äthanol werden die Lösungen in QIAamp spin columns® (Filterröhrchen) gegeben und in 2-ml-Collection-Tubes (Sammelröhrchen) stehend bei 8000<sup>-1</sup> für 1 min zentrifugiert. Die Filterröhrchen werden in neue Sammelröhrchen gestellt und die alten Sammelröhrchen samt Filtrat verworfen. Es werden 500 µl AW1-Puffer zugegeben und erneut zentrifugiert. Anschließend erfolgt die Zugabe von 500 µl AW2-Puffer, eine Zentrifugierung bei 14.000<sup>-1</sup> für 3 min sowie nochmals die Entsorgung der Sammelröhrchen. Nun werden die Filterröhrchen in UV-Licht sterilisiert und in 1,5-ml-Reaktionsgefäße platziert. 100 µl AE-Puffer werden aufpipettiert, die Proben 5 min inkubiert und schließlich bei 8000<sup>-1</sup> für 2 min zentrifugiert. Dieser Schritt wird unter Belassung des Filtrates wiederholt.

Das so gewonnene Filtrat enthält die gereinigte Tumor-DNA, deren Konzentration zur Weiterbearbeitung mit dem Photospektrometer Gene Quant II® RNA/DNA Calculator von Pharmacia Biotech® gemessen wird.

Zur Gewinnung der benötigten Normal-DNA werden Lymphozyten gesunder männlicher Probanden unter gleichem Protokoll mit dem speziellen Kit der Firma Quiagen® (QIAamp DNA Blood Mini Kit®) verarbeitet.

#### 4.3.2. DOP-PCR (Degenerate Oligonucleotide-Primed Polymerase Chain Reaction)

Vielfach kann nur eine geringe Menge DNA aus den histologischen Schnitten gewonnen werden. Daher ist es erforderlich, die CGH durch ein Verfahren, mit dem die gesamte genomische DNA amplifiziert werden kann, zu ergänzen. Hierfür wird die sog. DOP-PCR angewandt. Diese Variante der Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde 1992 von Telenius et al. entwickelt (Telenius et al. 1992). Sie ist eine schnelle und effektive in-vitro-Technik zur speziesunabhängigen Vermehrung des gesamten Genoms.

Als Primer für diese PCR kommen Oligonukleotide mit partiell degenerierter Sequenz zum Einsatz. Sie bestehen aus 3 Teilen. Das 3'-Ende eines Primers trägt 6 Basen, die ihm eine hohe Spezifität verleihen und relativ häufig im Genom vorkommen. Im Mittelteil liegen 6 sog. degenerierte Nukleotide mit wechselnder Sequenz. Das 5'-Ende stellt mit einer Sequenz, die relativ selten im Genom vorkommt, einen spezifischen Angriffsort eines Restriktionsenzym dar. Das führt zu einem Priming an multiplen, über das gesamte Genom verteilten Stellen. So beginnt die DNA-Vermehrung an verschiedenen Startpunkten gleichzeitig.

Die DNA-Amplifikation wird in der DNA Engine PTC-200® (Peltier Thermal Cycler) mit beheiztem Deckel von der Firma MJ Research, Inc. ® durchgeführt.

Die Arbeitsschritte dafür lauteten wie folgt:

Zunächst wird die DNA so verdünnt, dass 0,1-1 µg DNA in 0,5-2 µl Lösung enthalten sind. Im ersten Schritt werden die DNA-Doppelstränge durch Erhitzen auf 96°C zu Einzelsträngen denaturiert. Nach Abkühlung erfolgt das Annealing - die Bindung von Primern an komplementäre Stellen der Einzelstränge. Bei niedriger Temperatur entsteht mittels hitzesensitiver Sequenase vom 3'-Ende des Primers aus durch Einbau der entsprechenden Nukleotide eine komplementäre Kopie des Originalstranges. Erneutes Erhitzen auf 95°C führt wiederum zur Denaturierung beider Stränge und nach Abkühlung erfolgt erneut die Anlagerung der Primer und Synthese jeweiliger Komplementärstränge. Diese DNA-Vervielfältigung wird über 8 Zyklen bei überschüssig vorliegender Sequenase-Thermo (eine modifizierte DNA-Polymerase) wiederholt (Abb. 4.3.2.-2). Es entstehen DNA-Fragmente mit einer Länge von 100 bis 2000 Basenpaaren (bp) und dem DOP-Primer am 5'-Ende und der dazu komplementären Kopie am 3'-Ende.

Aufgrund der Thermolabilität der Sequenase-Thermo muss das Enzym bei jedem Zyklus erneut zugegeben werden. Das zieht ein erhöhtes Kontaminationsrisiko mit „Fremd-DNA“ nach sich. Zur Vermeidung von Analysefehlern wird deshalb bei jeder DOP-PCR eine Negativkontrolle ohne DNA mitgeführt.

Die folgenden 32 Zyklen amplifizieren die entstandenen DNA-Segmente bei höherer Temperatur mit Hilfe des Enzyms Taq-Polymerase (einer thermostabilen DNA-Polymerase aus dem thermophilen gramnegativen Bakterium *Thermus aquaticus*) (Abb. 4.3.2.-2). Dafür binden die DOP-Primer mit ihren gesamten 3'-Abschnitten an ihre Kopien der Einzelstrangenden, um die weiteren Amplifikationen zu initiieren. Es werden nur noch spezifisch Einzelstränge amplifiziert mit dem Ergebnis 100 - 2000 bp langer DNA-Abschnitte.

Die Effektivität dieser Methode ist proportional zur Primerkonzentration und darüber hinaus hauptsächlich abhängig von der Konzentration der Taq-Polymerase. Bei optimalen Bedingungen können im günstigsten Fall bis zu 7 µg DNA pro 50 µl Reaktionsvolumen erzielt werden (Harada et al. 2000, Hirose et al. 2001, Kuukasjarvi et al. 1997, Speicher et al. 1993).

Die Zusammensetzung der für die DOP-PCR benötigten Lösungen ist in der Abbildung 4.3.2.-1 dargestellt.

Anzahl der Proben		2 x	3 x	4 x	5 x	6 x	12 x
Ausgangs- Endkonz.		15 µl	20 µl	25 µl	30 µl	35 µl	70 µl
H <sub>2</sub> O		10,125 µl	13,5 µl	16,875 µl	20,25 µl	23,625 µl	47,25 µl
Seq.-Puffer	5 x      0,6 x	1,8 µl	2,4 µl	3,0 µl	3,6 µl	4,2 µl	8,4 µl
dNTPs	2,5 mM    200 µM	1,2 µl	1,6 µl	2,0 µl	2,4 µl	2,8 µl	5,6 µl
Primer(DOP)	40 µM    5 µM	1,875 µl	2,5 µl	3,125 µl	3,75 µl	4,375 µl	8,75 µl

**Lösung A**  
Nach DNA-Isolation Transfer der Proben (0,1 – 1 µg in 0,5 – 2 µl Lösung) in 5 µl der Lösung A.

Anzahl der Proben		2 x	3 x	4 x	5 x	6 x	12 x
Ausgangs- Endkonz.		15 µl	20 µl	25 µl	30 µl	35 µl	70 µl
H <sub>2</sub> O		10,125 µl	13,5 µl	16,875 µl	20,25 µl	23,625 µl	47,25 µl
Seq.-Puffer	5 x      0,6 x	1,8 µl	2,4 µl	3,0 µl	3,6 µl	4,2 µl	8,4 µl
dNTPs	2,5 mM    200 µM	1,2 µl	1,6 µl	2,0 µl	2,4 µl	2,8 µl	5,6 µl
Primer(DOP)	40 µM    5 µM	1,875 µl	2,5 µl	3,125 µl	3,75 µl	4,375 µl	8,75 µl

**Lösung B** (Enzym-Mix für PCR bei niedrigen Temperaturen)  
Für jeden Ansatz/Reaktionsgefäß sind 0,24 µl (ca. 0,3-0,4 IU) in jedem der 8 Zyklen notwendig (=2 µl).

Anzahl der Proben		2 x	3 x	4 x	5 x	6 x	12 x
Ausgangs- Endkonz.		15 µl	20 µl	25 µl	30 µl	35 µl	70 µl
Sequenase-Dilutionspuffer		5,25 µl	7,0 µl	10,5 µl	12,25 µl	14,0 µl	22,0 µl
Sequenase-Thermo		0,75 µl	1,0 µl	1,5 µl	1,75 µl	2,0 µl	4,0 µl

**Lösung C** (PCR-Mix ohne Enzym für Zyklen mit hoher Temperatur)  
Für jeden Ansatz/Reaktionsgefäß sind 45 µl notwendig.

Anzahl der Proben		2 x	3 x	4 x	5 x	6 x	12 x
Ausgangs- Endkonz.		100 µl	150 µl	190 µl	230 µl	280 µl	560 µl
H <sub>2</sub> O		70,45 µl	102,67 µl	130,5 µl	157,43 µl	191,66 µl	383,32µl
Puffer	10 x      1 x	10,0 µl	15,0 µl	19,0 µl	23,0 µl	28,0 µl	56,0 µl
dNTPs	2,5 mM    220 µM	8,8 µl	13,2 µl	16,72 µl	20,24 µl	24,64 µl	49,28 µl
Primer(DOP)	40 µM    1,1 µM	2,75 µl	4,13 µl	5,23 µl	6,33 µl	7,7 µl	15,4 µl
MgCl <sub>2</sub>	25 mM    2,5 mM	10,0 µl	15,0 µl	19,0 µl	23,0 µl	28,0 µl	56,0 µl

**Lösung D** (Enzym-Mix für PCR-Zyklen mit hoher Temperatur)  
Für jeden Ansatz/Reaktionsgefäß sind 5 µl notwendig.

Anzahl der Proben		2 x	3 x	4 x	5 x	6 x	12 x
Ausgangs- Endkonz.		15 µl	20 µl	25 µl	30 µl	35 µl	70 µl
H <sub>2</sub> O		8,75 µl	12,25 µl	16,1 µl	19,6 µl	23,1 µl	46,2 µl
Taq-P-Puffer	10 x      1 x	1,25 µl	1,75 µl	2,3 µl	2,8 µl	3,3 µl	6,6 µl
MgCl <sub>2</sub>	25 mM    2,5 mM	1,25 µl	1,75 µl	2,3 µl	2,8 µl	3,3 µl	6,6 µl
Taq-Pol.	10U/µl    1U/µl	1,25 µl	1,75 µl	2,3 µl	2,8 µl	3,3 µl	6,6 µl

Abbildung 4.3.2.-1: Protokoll für DOP-PCR

In der Abbildung 4.3.2.-2 sind die Schritte der DOP-PCR als Programmablauf im Thermocycler aufgeführt.

<b>Ablauf</b>		
Zyklen mit niedriger - und hoher Temperatur sowie entsprechender Zeitdauer		
1)	96°C	5 min
2)	30°C	2 min 20 sec - hier in jedem Zyklus 0,24 µl Lösung B zugeben
3)	37°C	2 min
4)	95°C	1 min
5)	7 x Wiederholung ab Schritt 2 (= 8 Zyklen)	
6)	30°C	2 min 20 sec - hier 45 µl Lösung C zugeben
7)	95°C	1 min
8)	56°C	2 min 20 sec - hier 5 µl Lösung D zugeben
9)	72°C	2 min
10)	94°C	1 min
11)	56°C	1 min
12)	72°C	2 min
13)	31 x Wiederholung ab Schritt 10 (= 32 Zyklen)	
14)	72°C	10 min
15)	4°C	bis zur Entnahme der Proben

Abbildung 4.3.2.-2: Ablauf der DOP-PCR

### 4.3.3. Markierung der DNA (Labelling)

Um die Tumor-DNA nach der Hybridisierung auf Metaphasechromosomen von Normal-DNA unterscheiden zu können, erfolgt eine zweite PCR mit unterschiedlicher Markierung der jeweiligen Proben.

Für die Markierung stehen 2 Prinzipien zur Wahl:

- 1.) Eine direkte Markierung würde während der PCR Nukleotide, an die bereits Fluoreszenzfarbstoffe gebunden sind, direkt in die DNA einbauen.
- 2.) Im Rahmen einer indirekten Markierung werden Markermoleküle, wie Biotin und Digoxigenin, an die Oligonukleotide gekoppelt und diese in die DNA eingebaut. Erst in einer weiteren Reaktion nach der Hybridisierung werden Fluorochrom-tragende Moleküle an diese Markermoleküle gebunden (Larramendy et al. 1998, Wilkens et al. 2002).

Vorteile der indirekten Markierung sind eine stabilere Intensität der Fluoreszenzsignale und die Möglichkeit zur Verstärkung der Signale. Da nach Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen alle weiteren Arbeitsschritte unter Ausschluss von Licht erfolgen müssen, weil sich sonst die Fluoreszenzintensitäten abschwächen würden, besteht diese Gefahr bei späterer Markierung in deutlich geringerem Maß. Zusätzlich bietet die indirekte Markierung die Option, die Signale durch erneute Reaktion mit Fluorochrom-tragenden Molekülen zu verstärken. Das Verhältnis zwischen Normal- und Tumor-DNA wird aufgrund gleichmäßiger Verstärkung aller Fluoreszenzsignale nicht verfälscht. In der vorliegenden Arbeit kommt daher die indirekte Markierung

mit Biotin-16-dUTP für die Tumor-DNA und Digoxigenin-11-dUTP für die Normal-DNA zum Einsatz.

Für den Reaktionsansatz werden jeweils 2 µl PCR-Produkt mit 18 µl PCR-Mix versetzt. Die Zusammensetzungen der benötigten Markierungslösungen sind in Abbildung 4.3.3.-1 dargestellt und Abbildung 4.3.3.-2 zeigt das im Thermocycler ablaufende Label-Programm.

Für jede Probe 2 µl PCR-Produkt und 18 µl PCR-Mix zusammengeben

**Tumor-DNA**

Anzahl der Proben Ausgangs- Endkonz.		1x	2x	4x	6x	8x	10x	12x
H <sub>2</sub> O	10 x 1 x	10,08 µl	25,2 µl	45,36 µl	65,52 µl	85,68 µl	105,8µl	126,0 µl
AmpliTaqpuffer	10 x 1 x	2,0 µl	5,0 µl	9,0 µl	13,0 µl	17,0 µl	21,0 µl	25,0 µl
dNTPs label	1 mM 100 µM	2,0 µl	5,0 µl	9,0 µl	13,0 µl	17,0 µl	21,0 µl	25,0 µl
Biotin-dUTP	40 µM 2 µM	2,0 µl	5,0 µl	9,0 µl	13,0 µl	17,0 µl	21,0 µl	25,0 µl
DOP-Primer	25 mM 1 mM	1,0 µl	2,5 µl	4,5 µl	6,5 µl	8,5 µl	10,5 µl	12,5 µl
MgCl <sub>2</sub>	5U/µl	0,8 µl	2,0 µl	3,6 µl	5,2 µl	6,8 µl	8,4 µl	10,0 µl
AmpliTaq	0,03U/µl	0,12 µl	0,3 µl	0,54 µl	0,78 µl	1,02 µl	1,26 µl	1,5 µl

**Normal-DNA**

Anzahl der Proben Ausgangs- Endkonz.		1x	2x	4x	6x	8x	10x	12x
H <sub>2</sub> O	10 x 1 x	10,08 µl	25,2 µl	45,36 µl	65,52 µl	85,68 µl	105,8µl	126,0 µl
AmpliTaqpuffer	10 x 1 x	2,0 µl	5,0 µl	9,0 µl	13,0 µl	17,0 µl	21,0 µl	24,0 µl
dNTPs label	1 mM 20 µM	2,0 µl	5,0 µl	9,0 µl	13,0 µl	17,0 µl	21,0 µl	24,0 µl
Dig-dUTP	40 µM 2 µM	1,0 µl	2,5 µl	4,5 µl	6,5 µl	8,5 µl	10,5 µl	12,5 µl
DOP-Primer	25 mM 1 mM	1,0 µl	2,5 µl	4,5 µl	6,5 µl	8,5 µl	10,5 µl	12,5 µl
MgCl <sub>2</sub>	5U/µl	0,8 µl	2,0 µl	3,6 µl	5,2 µl	6,8 µl	8,4 µl	10,0 µl
AmpliTaq	0,03U/µl	0,12 µl	0,3 µl	0,54 µl	0,78 µl	1,02 µl	1,26 µl	1,5 µl

Abbildung 4.3.3.-1: Protokoll zum indirekten DNA-Labeling

**Ablauf**

Zyklen	Temperatur	Zeit
1)	95°C	3 min
2)	94°C	1 min
3)	56°C	1 min
4)	72°C	2 min
5)	19 x Wiederholung ab Schritt 2 (= 20 Zyklen)	
6)	72°C	5 min
7)	4°C	bis zur Entnahme der Proben

Abbildung 4.3.3.-2: Ablauf der PCR zum indirekten DNA-Labeling

Nach dieser 2. PCR werden die Proben von den nicht in die DNA-Sequenzen eingebauten Oligonukleotiden und Primern sowie kleinen DNA-Fragmenten gereinigt. Dazu werden SpinRad-Columns® (Filterröhrchen) der

Firma BioRad® zunächst mit  $3.000^{-1}$  für 2 min abzentrifugiert, danach die Säulchen in neue Sammelröhrchen platziert und anschließend die Proben aus der 2. PCR aufpipettiert. Nach Zentrifugierung bei  $3.000^{-1}$  für 4 min wird die DNA-Konzentration in der Pufferlösung photometrisch gemessen. Um dabei möglichst wenig DNA zu verbrauchen, wird diese für die Messung jeweils 10-fach verdünnt.

#### 4.3.4. Vergleichende Genomische Hybridisierung (CGH)

Die In-Situ-Hybridisierung wurde 1969 von Gall und Pardue an der Yale University (New Haven, Conn., U.S.A.) entwickelt (Gall und Pardue 1969, Pardue und Gall 1969). Primär wurden radioaktiv markierte Sonden zum Nachweis bestimmter Nukleinsäuresequenzen auf Metaphasechromosomen oder in Zellen und Geweben eingesetzt. Später wurden diese durch Sonden mit kovalent gebundenen Markierungsmolekülen abgelöst. Eine Variante ist die Fluoreszenz In Situ Hybridisierung (FISH), bei der fluoreszierende Farbstoffe verwendet werden. Voraussetzung ist jedoch die Kenntnis der Nukleotidsequenz, die mittels Hybridisierung/Bindung an die künstlich hergestellte Sonde nachgewiesen werden soll (Kallioniemi et al. 1996 Feb).

Eine Weiterentwicklung des Verfahrens stellt die Vergleichende Genomische Hybridisierung (CGH) dar. Mit dieser von Kallioniemi et al. 1992 entwickelten molekularzytogenetischen Methode kann ein Screening des gesamten Genoms hinsichtlich chromosomaler Imbalancen erfolgen, ohne dass deren Sequenzen bzw. Genorte vorher bekannt sein müssen (Kallioniemi et al. 1992). So vermag die CGH orientierende Vorarbeiten für sensiblere molekulargenetische Untersuchungen wie FISH oder DNA-Sequenzierung zu leisten.

Es können Zugewinne und Verluste ganzer Chromosomen oder von Chromosomenabschnitten bis zu einer minimalen Größe von ca. 10 Megabasenpaaren (Mbp) zuverlässig aufgedeckt werden (du Manoir et al. 1993, Jeuken et al. 2002, Kallioniemi et al. 1994 Aug, Petersen et al. 1996, Störkel et al. 1996).

Das Verfahren basiert auf der konkurrierenden Hybridisierung von unterschiedlich markierter Tumor- und Normal-DNA auf normale Metaphaseplatten. Dafür werden zunächst je 1 µg Biotin-markierter Tumor-DNA mit Digoxigenin-markierter Normal-DNA im Verhältnis 1:1 gemischt und mit unmarkierter Cot-1 DNA und Äthanol versetzt. Die Zugabe von Cot-1 DNA dient dabei der Blockade unspezifischer hochrepetitiver Sequenzen in Zentromerregionen, an p-Armen akrozentrischer Chromosomen und in einigen heterochromatischen Regionen (Jeuken et al. 2002, Weiss et al. 1999). Allerdings ist diese Blockade nicht vollständig und es existieren interindividuelle Polymorphismen dieser Regionen (z.B. auf den Chromosomen 19 und 22). Daher sind diese Regionen nur eingeschränkt interpretierbar bzw. sollten genauso wie Bereiche mit sehr geringer Fluoreszenzintensität (wie z.B. Telomere) ganz aus der Analyse ausgeschlossen werden (Kirchhoff et al. 1997).

Im weiteren Verlauf wird die DNA in den Proben bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gefällt, über mehrere Schritte zu einem Pellet getrocknet und mit Hybridisierungsmix, bestehend aus 7 µl deionisiertem Formamid und 7 µl Mastermix (4xSSC + 20% Dextransulfat) je Probe, wieder gelöst (vgl. Abb. 4.3.4.-1). Es folgt die Denaturierung bei  $70^{\circ}\text{C}$  für 5 min im Wasserbad. Dabei erfolgt die Aufspaltung der DNA-Doppelstränge in Einzelstränge.



Parallel dazu werden die mit Lymphozyten-Chromosomen präparierten Objektträger lichtmikroskopisch bzgl. ausreichender Anzahl und Qualität der vorhandenen Metaphasen untersucht. Die Objektträger werden anschließend ebenfalls bei 70°C in 70% Formamid für 2 min denaturiert und damit die DNA in Einzelstränge überführt. Dies ist Voraussetzung für eine Hybridisierung. Nach der Denaturierung werden die Objektträger in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und bei Raumtemperatur getrocknet.

Nach 30min Vorinkubation werden die Proben jeweils auf eine Hälfte eines Objektträgers aufgetragen, mit Deckgläschen (24x24) abgedeckt und die so hergestellten Chromosomenpräparate mittels Gummilösung (Fixogum®) luftdicht versiegelt. In einer feuchten Kammer folgt die Hybridisierung für 2-4 Tage bei 37°C. Die einzelnen Arbeitsschritte sind in Abbildung 4.3.4.-1 aufgeführt.

In dieser Phase erfolgt die Anlagerung der Tumor- und Normal-DNA an komplementäre Sequenzen auf der in Einzelsträngen vorliegenden DNA der Lymphozyten-Metaphasen. Liegen Tumor- und Normal-DNA einer bestimmten Chromosomenregion im Verhältnis 1:1 vor, kommt es hier auch zur Bindung von Tumor- und Normalfragmenten zu gleichen Teilen. Überwiegt hingegen das Verhältnis zugunsten der Tumor-DNA durch Zugewinn von chromosomalen Abschnitten im Tumor, bzw. verschiebt sich das Verhältnis in Richtung Normal-DNA wegen Verlusten chromosomaler Abschnitte im Tumor, so lagert sich jeweils im selben Verhältnis mehr Tumor-DNA als Normal-DNA respektive umgekehrt weniger Tumor-DNA als Normal-DNA an die entsprechenden Chromosomenregionen an. Dies führt später bei der Auswertung zu Über- bzw. Unterrepräsentation der unterschiedlich markierten Tumor-/Normal-DNA auf den Metaphase-Platten.

1. Je 1 µg Tumor-DNA und 1 µg Normal-DNA in ein Reaktionsgefäß geben, 50 µl Cot-1-DNA und 2 Volumenteile 100% Äthanol zugeben und gut mischen.
2. 30 min bei -70°C lagern.
3. Bei 14.000<sup>-1</sup> für 10 min zentrifugieren.
4. Überstand verwerfen.
5. 500 µl 70% Äthanol hinzugeben.
6. Bei 14.000<sup>-1</sup> für 10 min zentrifugieren.
7. Überstand verwerfen.
8. In Vakuumzentrifuge ca. 2-5 min trocknen (oder 15-20 min lufttrocknen)
9. Hybri-Mix aus gleichen Teilen Formamid (deionisiert) und Mastermix herstellen und gut mischen.
10. Proben mit je 14 µl Hybri-Mix bei 37°C für 30 min lösen und anschließend mischen.
11. Bei 70°C im Wasserbad für 5 min denaturieren.
12. Bei -20°C für 5 min lagern.
13. Bei 37°C für 30 min vorinkubieren.
14. Objektträger in 70% Formamid bei 70°C für 2 min denaturieren.
15. Objektträger in der Reihenfolge 70%, 85% und 100% Äthanol für je 2 min eintauchen.
16. Lufttrocknen.
17. Probe auf halben Objektträger geben, mit Deckgläschen abdecken und mit Fixogum verschließen.
18. In feuchter Kammer bei 37°C für 2-4 Tage hybridisieren.

Abbildung 4.3.4.-1: Arbeitsprotokoll für die CGH

### 4.3.5. Detektion

Nach mindestens 2-tägiger Hybridisierung werden die Deckgläschen entfernt und die Objektträger zunächst durch stringente Waschungen von überschüssiger bzw. nicht gebundener DNA befreit. Die Zusammensetzung der dafür verwendeten Lösungen ist in Abbildung 4.3.5.-1 zu finden.

50% Formamid:	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 250 ml Formamid</li> <li>- 50 ml 20xSSC (standard saline citrate buffer)</li> <li>- mit 1N HCl pH auf 7 einstellen</li> <li>- Lösung mit Aqua bidest bis 500 ml auffüllen</li> </ul>
2xSSC:	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 50 ml 20xSSC auf 500 ml mit Aqua bidest auffüllen</li> </ul>
4xSSC/Tween:	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 100 ml 20xSSC</li> <li>- 1 ml Tween® 20 (Poly(oxy-1,2-ethandiy)l)-monododekansäure-sorbitylester)</li> <li>- mit 1N HCl pH auf 7 einstellen</li> <li>- Lösung mit Aqua bidest bis 500 ml auffüllen</li> </ul>

Abbildung 4.3.5.-1: Waschlösungen für die Detektion

Die Waschungen werden in der Reihenfolge 1. mit 50% Formamid bei 42°C für 2 x 10 min, 2. mit 2xSSC bei 42°C für 10 min jeweils in einem Schüttelwasserbad und 3. mit 4xSSC/Tween bei Raumtemperatur für 2 min auf einer Schüttelplatte durchgeführt. Anschließend werden zum Ab-blocken unspezifischer Bindungen pro Objektträger 100 µl 5% BSA/4xSSC/Tween - eine gekühlte Lösung, für die 0,5 g BSA (Rinderserumalbumin) in 10 ml 4xSSC/Tween gelöst wird - aufgetragen, mit einer Folie abgedeckt und bei 37°C in der feuchten Kammer für 20 min inkubiert.

Um die begonnene indirekte Markierung (vgl. Kap. 4.3.3.) zu komplettieren, ist nun noch die Bindung Fluorochrom-tragender Moleküle an die in die jeweilige DNA eingebauten Marker-moleküle Biotin (Tumor-DNA) und Digoxigenin (Normal-DNA) erforderlich. Für die Tumor-DNA wird der an Avidin gekoppelte grüne Fluoreszenzfarbstoff FITC (Fluoresceinisothiocyanat) eingesetzt, wobei Avidin kovalent an Biotin bindet. Gleichzeitig erfolgt die Detektion der Normal-DNA mit dem rot fluoreszierenden Rhodamin, welches an Anti-Dioxigenin-Antikörper (als TRITC = Antidigoxigenin-Tetraethylrhodamin-Isothiocyanat) gekoppelt, Verwendung findet. Die Detektionslösung wird durch Mischung von 1 µl Avidin-FITC (in der Verdünnung 1:500) und 25 µl Anti-Dioxigenin-Rhodamin (in der Verdünnung 1:10) in 500 µl 5% BSA/4xSSC/Tween hergestellt. Nun erfolgt der eigentliche Detektionsschritt, indem auf jeden Objektträger 100 µl der Detektionslösung aufgebracht werden. Die sich anschließende Inkubation wird in Dunkelheit bei 37°C in der feuchten Kammer für 30 min durchgeführt. Mit den darauffolgenden 2 Waschsritten à 5 min bei Raumtemperatur in 4xSSC-Tween-Puffer wird überschüssiger Fluoreszenzfarbstoff entfernt. Anschließend wird DAPI/Antifade (4,6-Diamidino-2-Phenyl-indol) auf die Objektträger aufgetropft und so die blaue Gegenfärbung der Chromosomen erzeugt, wodurch sie anhand ihrer sichtbaren Bänderung identifiziert werden können. Abschließend wird jeder Objektträger mit einem Deckgläschen (24x60) versehen. Zur

Verzögerung des Ausbleichens der Fluoreszenz-markierten Chromosomenpräparationen werden die letzten Schritte unter Vermeidung direkter Belichtung durchgeführt und die Präparate in einer Mappe bei 4°C aufbewahrt. Eine Zusammenfassung der Arbeitsschritte gibt die Abbildung 4.3.5.-2 wieder.

Arbeitsschritte	
1.	Deckgläschen entfernen.
2.	Objektträger in 50% Formamid bei 42°C 2x für 10 min waschen (schütteln).
3.	Objektträger in 2xSSC bei 42°C für 10 min waschen (schütteln).
4.	Objektträger in 4xSSC/Tween bei Raumtemperatur für 2 min waschen (schütteln).
5.	100 µl 5% BSA/4xSSC/Tween auf Objektträger geben und mit Folie abdecken.
6.	Objektträger bei 37°C im Brutschrank in feuchter Kammer für 20 min inkubieren.
7.	1 µl Avidin-FITC (Verdünnung 1:500) und 25 µl Anti-Digoxigenin-Rhodamin (Verdünnung 1:10) in 500 µl 5% BSA/4xSSC/Tween geben und gut mischen.
8.	100 µl von dieser Lösung pro Objektträger auftragen, mit Folie abdecken und bei 37°C im Brutschrank in feuchter Kammer für 30 min inkubieren.
9.	In 4xSSC/Tween bei Raumtemperatur 2x für je 5 min waschen (schütteln, dunkel).
10.	Ca. 20 µl DAPI-Antifade und mit Deckgläschen (24x60) abdecken.

Abbildung 4.3.5.-2: Arbeitsschritte bei der Detektion

#### 4.3.6. Bildaufnahme

Für die Bildaufnahmen der Metaphasechromosomen wird ein spezielles Fluoreszenzmikroskop (Axioplan, Zeiss®) eingesetzt. Das Mikroskop ist mit einer 100 Watt Quecksilberdampflampe und selektiven Filtersätzen für FITC, TRITC und DAPI ausgestattet, die für die Bildaufnahme automatisch umgeschaltet werden. Diese Filterkombination erlaubt die selektive Darstellung aller im Experiment verwendeten Fluorochrome.

Auf den Objektträgern werden pro Fall mindestens 15 Metaphaseplatten unter folgenden Kriterien

- ausgesucht:
- gleichmäßige Färbung der gesamten Metaphaseplatte
  - Vollständigkeit des Chromosomensatzes
  - Unversehrtheit der einzelnen Chromosomen und
  - geringe Zahl chromosomaler Überlappungen.

Die Digitalisierung der Fluoreszenzbilder erfolgt mittels CCD (charge-coupled device)-Kamera (Fa. IMAC®). Diese ist mit einem Computer verbunden, in dem die Bilder gespeichert werden und auf dem das Software-Programm ISIS® (In Situ Imaging System) der Fa. MetaSystems® für die weitere Bearbeitung genutzt wird.

Kernstück der CCD-Kamera ist ein hochempfindlicher Bildsensor, der die Fluoreszenzen der mit FITC und TRITC markierten Tumor- bzw. Referenz-DNA sowie die mittels DAPI in Q-Bandendarstellung gefärbten Metaphasechromosomen als Grauwerte separat aufnimmt. Somit werden von jeder Metaphase 3 monochrome Bilder aufgenommen - ein Bild pro Fluoreszenzkanal mit spezifischem Informationsgehalt. Das DAPI-Bild dient der Chromosomenidentifizierung, das FITC-Bild repräsentiert die Tumor-DNA und das

TRITC-Bild stellt die Normal-DNA dar (Roth et al. 1996). Abbildung 4.3.6.-1 veranschaulicht eine Metaphaseplatte (hier Fall Nr. 25) mit der gleichzeitigen Darstellung aller Fluoreszenzfarben.

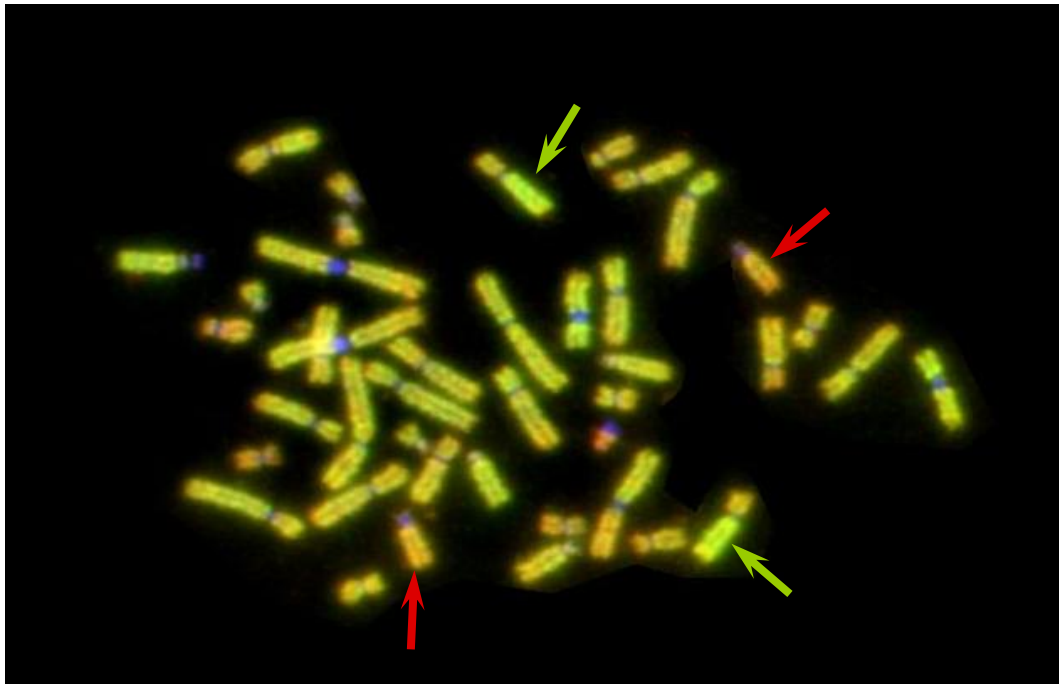


Abbildung 4.3.6.-1: Fluoreszenzbild einer Metaphaseplatte des Falles Nr. 25.

Einige Verschiebungen der Rot-Grün-Fluoreszenzratio sind an den betroffenen Chromosomen bereits unter dem Mikroskop erkennbar. Beispiele hierfür sind die mit Pfeilen markierten Chromosomen 8 und 15. Dabei zeigt Chromosom 15 (roter Pfeil) am langen (q-) Arm ein Überwiegen der roten Fluoreszenz. Das markiert einen Verlust an Tumor-DNA in diesem Bereich. Ein Überwiegen der grünen Fluoreszenz auf dem langen (q-) Arm des Chromosoms 8 (grüner Pfeil) signalisiert Zugewinne der Test-/Tumor-DNA in dieser Region.

#### 4.3.7. Auswertung

Die für jeden Fall aufgenommenen Fluoreszenzbilder werden am Computer mittels digitalem Bildanalyse-Programm ISIS® graphisch aufbereitet und ausgewertet. Es werden mindestens 15 nach o.g. Kriterien gespeicherte Metaphaseplatten je Fall herangezogen. So lassen sich Unterschiede der Hybridisierungsqualität zwischen den einzelnen Metaphasen ausgleichen sowie lokale Artefakte und zu starke Rauschsignale unterdrücken. Die einzelnen Chromosomen müssen zunächst voneinander getrennt und anhand ihres Bandenmusters in Karyogramme (vgl. Abb. 4.3.7.-1) sortiert werden, wofür die DAPI-Fluoreszenz mit Graustufendarstellung der Chromosomenbänderung genutzt wird. Ebenso werden die Zentromere definiert und die Chromosomengrenzen manuell festgelegt. Gleichzeitig erfolgt der Ausschluss artefiziell veränderter und sich gegenseitig überlappender Chromosomen von der weiteren Analyse.

Auch in Abb. 4.3.7.-1 (wie in Abb. 4.3.6.-1) ist eine Verschiebung der Fluoreszenzintensitätsverhältnisse zu Gunsten des roten Fluoreszenzsignals an den folgenden Chromosomen erkennbar: -3p, -8p, -10p, -15q, -17p, -18q, -Xp und -Y (rote Pfeile) als Ausdruck von Verlusten genetischen Materials in den entsprechenden Regionen der Tumor-DNA im Vergleich zur Normal-DNA bei gleichzeitigem Überwiegen des grünen Fluoreszenzsignals an den langen (q-) Armen des 8. - und 13. Chromosoms sowie am gesamten 9. Chromosom (grüne Pfeile) im Sinne eines Zugewinns von genetischem Material der Tumor-DNA dieser Bereiche.

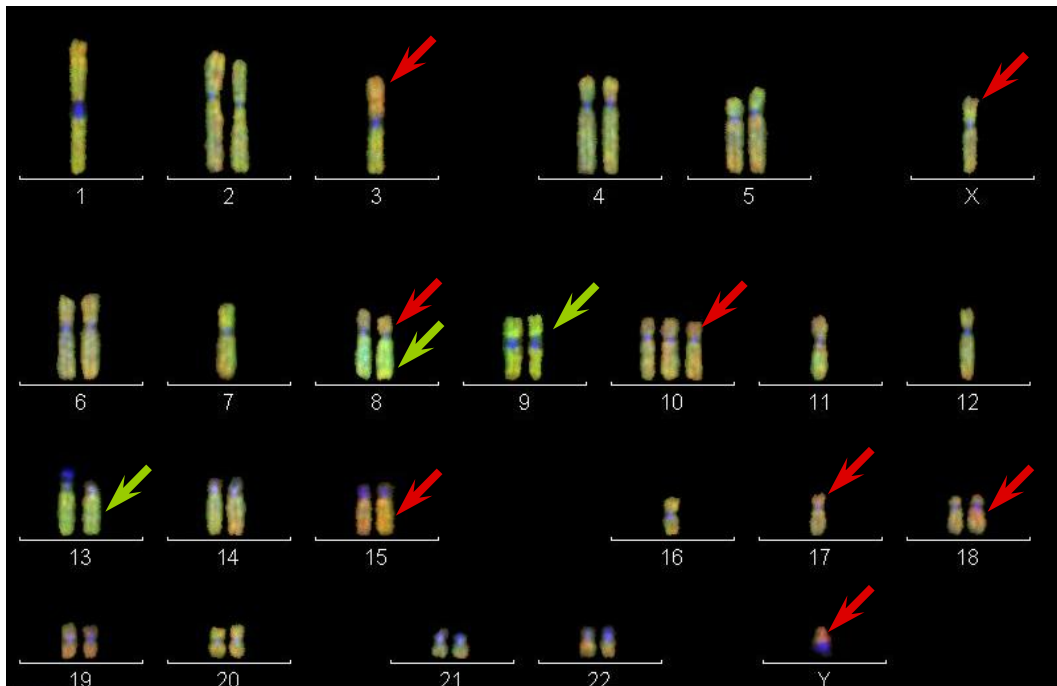


Abbildung 4.3.7.-1: Karyogramm einer Metaphase für das Peniskarzinom Nr. 25 mit gleichzeitiger Visualisierung aller Fluoreszenzfarben

Nun werden mit Hilfe des o.g. Computerprogramms (ISIS®) die Fluoreszenzintensitäten der Fluorochrome FITC (grün) und TRITC (rot) entlang der einzelnen Chromosomen, getrennt in kurzen (p-) und langen (q-) Arm, ermittelt. Die Fluoreszenzen Grün und Rot werden zueinander im Sinne einer Grün/Rot-Ratio - oder auch als Fluoreszenzratio bezeichnet - ins Verhältnis gesetzt. Daraus ergibt sich über die Länge des jeweiligen Chromosoms ein Profil der Fluoreszenzratio (= Verhältnisse der Fluoreszenzintensitäten). Anschließend wird für jeden Chromosomentyp der Mittelwert dieser Fluoreszenzprofile aus mehreren Metaphasen (jeweils mindestens 15) einschließlich der Standardabweichung ermittelt und als mittleres Fluoreszenzprofil über die Länge des jeweiligen Chromosoms dargestellt (vgl. Abb. 4.3.7.-2). Anhand der so entstandenen CGH-Profile lässt sich der Verlust bzw. Gewinn von genetischem Material visualisieren.

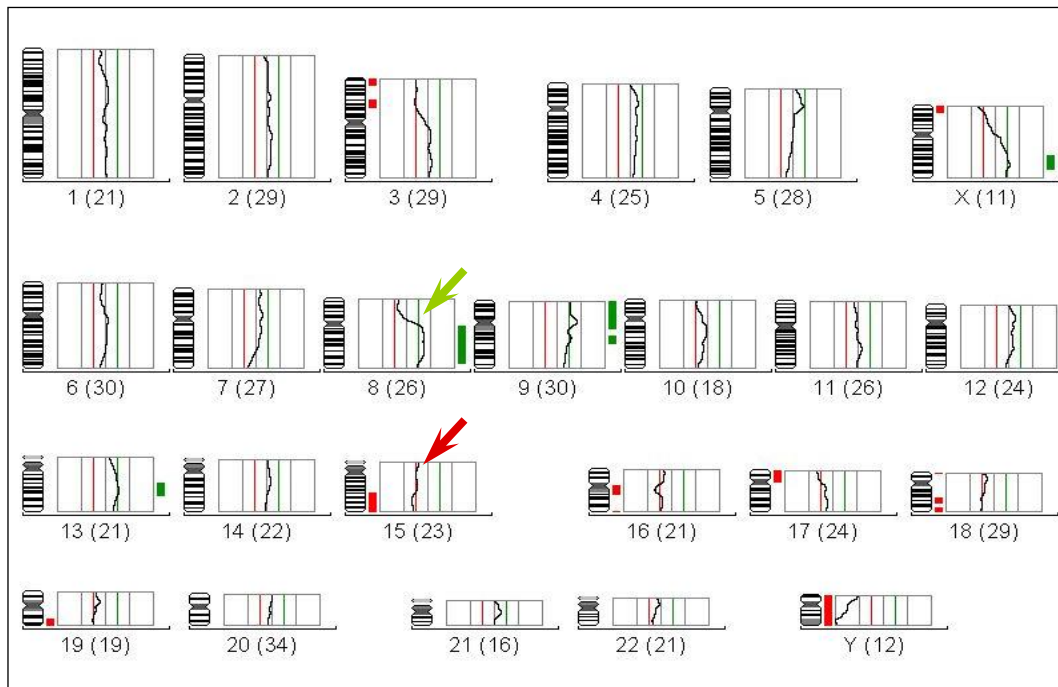


Abbildung 4.3.7.-2: Zugehörige (zu Abb. 4.3.6.-1 und Abb. 4.3.7.-1) mittlere Fluoreszenzprofile für das Peniskarzinom Nr. 25 (Abweichung u.a. in den Bereichen der Chromosomenarme -15q und +8q sind beispielhaft mit einem roten - respektive grünen Pfeil gekennzeichnet)

Fehlen genetische Aberrationen in der Tumor-DNA, beträgt das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten im entsprechenden Chromosomenabschnitt 1,0. Zugewinne oder Verluste in einem Chromosomenabschnitt ändern dieses Verhältnis normalerweise um jeweils 0,5 pro DNA-Kopie. Die Fluoreszenzratio von 0,5 stellt somit eine Monosomie und dem gegenüber 1,5 eine Trisomie dar. Allerdings werden diese Idealwerte nur dann erreicht, wenn alle Zellen in der Tumorprobe diese genetische Veränderung enthalten und gleichzeitig keine Zellen mit normaler DNA des betreffenden Abschnitts in der Analyse mit erfasst werden.

Da dies im untersuchten Material in der Regel nicht der Fall ist, werden zur Ermittlung von DNA-Über- und Unterrepräsentationen Schwellenwerte ( $>1,2$  respektive  $<0,8$ ) für die Verhältnisse der mittleren Fluoreszenzintensitäten festgesetzt. Das erlaubt den Nachweis von Aberrationen, wenn diese in knapp 50% der Zellen in der Tumorprobe vorliegen. Unter dieser Annahme (50%iger Normalanteil in der Tumor-DNA-Probe) kann die Fluoreszenzratio von 0,75 als Monosomie und 1,25 als Trisomie definiert werden. Dementsprechend würden sich Tetrasomien durch eine Ratio von 1,5 bzw. Pentasomien durch eine Ratio von 1,75 darstellen.

Bei Überschreitung des Schwellenwertes der Fluoreszenzratio ( $>1,2$  = grüne Grenzlinie) ist das als Zugewinn und bei Unterschreiten des Schwellenwertes ( $<0,8$  = rote Grenzlinie) als Verlust chromosomaler Abschnitte in der Tumor-DNA im Vergleich zur Normal-DNA zu werten.

Sind die Chromosomen aus mindestens 15 Metaphaseplatten des jeweiligen Falls analysiert, werden die Ergebnisse in Form des entsprechenden Chromosomen-Ideogramms grafisch dargestellt. Die Regionen der chromosomalen Imbalancen auf der Tumor-DNA werden mittels Balken hervorgehoben. Gemäß

internationaler Übereinkunft erfolgt dabei die Kennzeichnung von Unterrepräsentationen rot und von Überrepräsentationen grün (Abb. 4.3.7.-2).

Die aberranten chromosomalen Befunde werden nach dem internationalen System für die Nomenklatur zytogenetischer Befunde (ISCN 2005 = International System for Human Cytogenetic Nomenclature) beschrieben (du Manoir et al. 1993, Roth et al. 1996, Shaffer und Tommerup 2005).

#### **4.3.8. Statistische Methoden**

Für die statistische Analyse der Daten und Ergebnisse kommt das Computerprogramm SPSS 12.0 für Windows® zum Einsatz.

Die Untersuchung der Differenzen zwischen numerischen chromosomalen Aberrationen bis hin zu unauffälligen CGH-Befunden und klinischen Verlaufsdaten bzw. pathologischen Tumordaten wird hauptsächlich mittels exaktem Test nach Fisher oder mit dem Chi-Quadrat-Test durchgeführt.

Aufgrund fehlender Normalverteilung und ungleicher Varianzen erfolgt der Vergleich der Anzahl der Aberrationen je Tumor mit Hilfe des nichtparametrischen U-Tests nach Mann-Withney für unabhängige Stichproben. Als statistisch signifikanter Unterschied zwischen metastasiertem - und nicht metastasiertem Plattenepithelkarzinom am Penis wird diesbezüglich ein Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  festgelegt.

Ob eine Abhängigkeit zwischen der Anzahl genetischer Veränderungen und dem Tumorgrading besteht, wird mit Hilfe des Korrelationskoeffizienten nach Pearson berechnet.

## 5. Ergebnisse

Da im Focus dieser Arbeit ausschließlich Plattenepithelkarzinome des Penis stehen, wird im Folgenden nicht noch einmal gesondert auf die pathologische Anatomie der Tumoren eingegangen.

Allerdings sollen entsprechend der Zielstellung die Fälle ohne Lymphknotenmetastasen den Fällen mit einer lymphogenen Metastasierung gegenüber gestellt werden.

### 5.1. Histologie und Patientenkollektiv

Entsprechend den histopathologischen Kriterien wurden die Tumoren nach der UICC-TNM-Klassifikation (vgl. 1.1.7.) sowie hinsichtlich ihres Differenzierungsgrades beschrieben.

Unabhängig von einer Lymphknotenmetastasierung lag bei knapp einem Viertel aller Patienten zum Diagnosezeitpunkt ein pT2G2-Tumor vor. Betrachtet man nur die Ausdehnung des Primärtumors, so verteilen sich die einzelnen Tumorstadien wie folgt: In je 3,0% (je 1 Fall) fand sich ein Ta- bzw. T4-Stadium, in einem Drittel der Fälle (33,3%; n=11) ein T1-Stadium, am häufigsten mit 39,4% (n=13) ein T2-Stadium und in 21,2% (n=7) lag ein T3-Tumor vor.

Über die Hälfte aller Tumoren (51,5% + 3,0% = 54,5%) war mäßig differenziert (G2 und G2-3), während die übrigen Fälle zu je knapp einem Viertel (21,2% bzw. 24,2%) entweder eine gute Differenzierung aufwiesen (G1) oder aber undifferenzierte Tumoren (G3) waren.

Es fällt auf, dass über 45% der Patienten ohne Lymphknotenmetastasen einen Tumor im Stadium T1 aufwiesen, während bei Patienten mit Tumor-positiven Lymphknoten in 54,5% bzw. 36,4% ein T2- respektive T3-Stadium diagnostiziert wurde. Ebenso zeigt die Mehrzahl der N0-Patienten eine mäßige Differenzierung (G2/G2-3; 63,6%/4,6%) im Gegensatz zu über 45% undifferenzierter Tumoren mit Befall der regionalen Lymphknoten. Aufgrund der geringen Fallzahlen hat dies jedoch keine statistische Bedeutung. Die folgende Tabelle 5.1.-1 demonstriert die absoluten und prozentualen Häufigkeiten für die einzelnen histologischen Befunde und zusammengefasst nach T- und G-Kategorien im gesamten Patientenkollektiv sowie getrennt nach negativem bzw. positivem Tumorbefall der regionalen Lymphknoten.

Tabelle 5.1.-1: Häufigkeiten der histologischen Befunde (Fortsetzung dieser Tabelle auf Seite 49)

Histologie	Patienten gesamt		Patienten N0		Patienten N+	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
pTaG1	1	3,05	1	4,6	0	0
pT1G1	3	9,1	3	13,6	0	0
pT1G2	5	15,1	4	18,2	1	9,1
pT1G2-3	1	3,05	1	4,6	0	0
pT1G3	2	6,05	2	9	0	0
pT2G1	2	6,05	0	0	2	18,15
pT2G2	8	24,25	7	31,8	1	9,1
pT2G3	3	9,1	0	0	3	27,3



Histologie	Patienten gesamt		Patienten N0		Patienten N+	
	absolut	%	absolut	%	absolut	%
pT3G1	1	3,05	0	0	1	9,1
pT3G2	3	9,1	2	9	1	9,1
pT3G3	3	9,1	1	4,6	2	18,15
pT4G1	0	0	0	0	0	0
pT4G2	1	3,05	1	4,6	0	0
pT4G3	0	0	0	0	0	0
Ta	1	3,05	1	4,6	0	0
T1	11	33,3	10	45,4	1	9,1
T2	13	39,4	7	31,8	6	54,5
T3	7	21,2	3	13,6	4	36,4
T4	1	3,05	1	4,6	0	0
G1	7	21,2	4	18,2	3	27,3
G2	17	51,5	14	63,6	3	27,3
G2-3	1	3,05	1	4,6	0	0
G3	8	24,25	3	13,6	5	45,4
gesamt	33	100	22	100	11	100

Zur Veranschaulichung der Häufigkeitsverteilung der einzelnen Befunde dient die Abbildung 5.1.-1. Die Ergebnisse aller untersuchten Fälle sind unabhängig vom Vorliegen einer lymphogenen Metastasierung graphisch dargestellt.

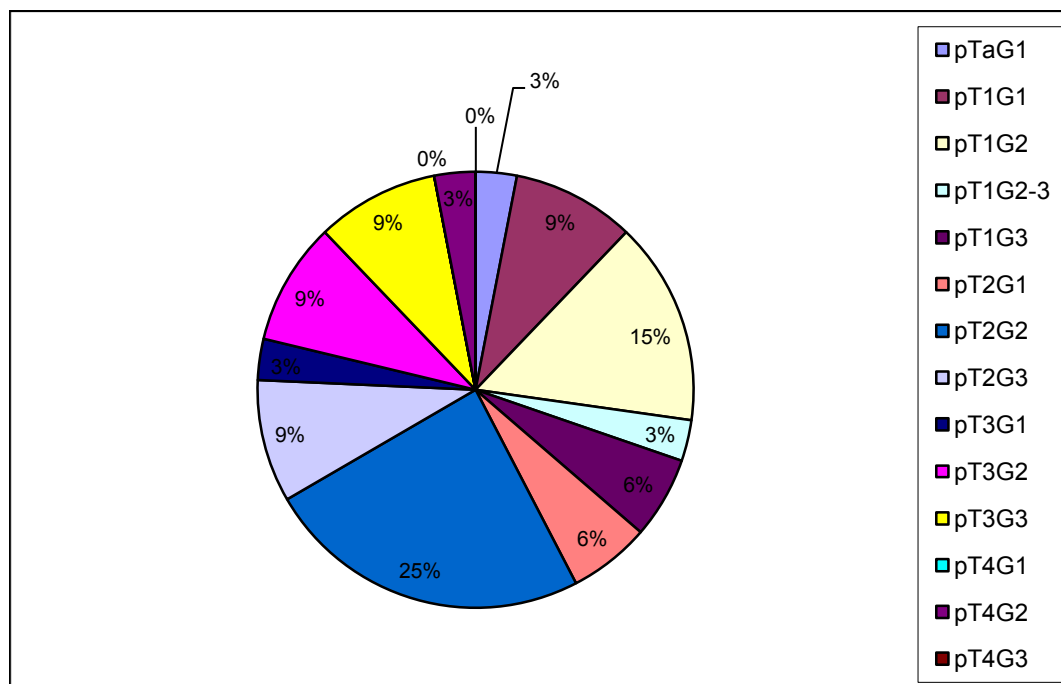


Abbildung 5.1.-1: Häufigkeitsverteilung der histopathologischen Befunde (Prozentangaben gerundet)

In den Abbildungen 5.1.-2 und 5.1.-3 sind die Anteile der T-Kategorien bzw. Differenzierungsgrade der einzelnen Befunde getrennt nach Lymphknoten-negativen - und Lymphknoten-positiven Fällen veranschaulicht.

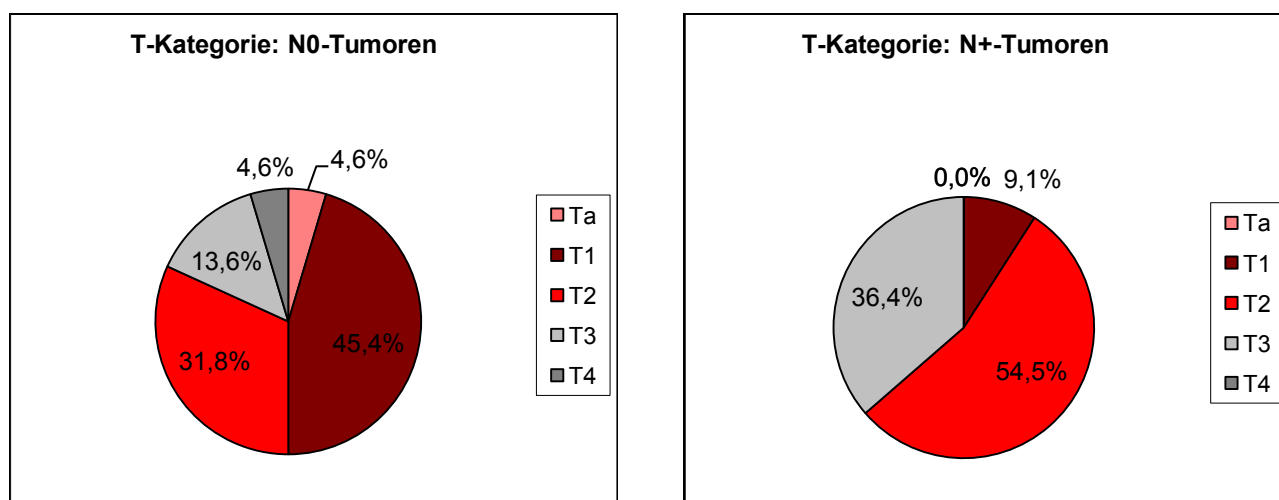


Abbildung 5.1.-2: Häufigkeitsverteilung der T-Stadien getrennt nach N0- und N+-Tumoren

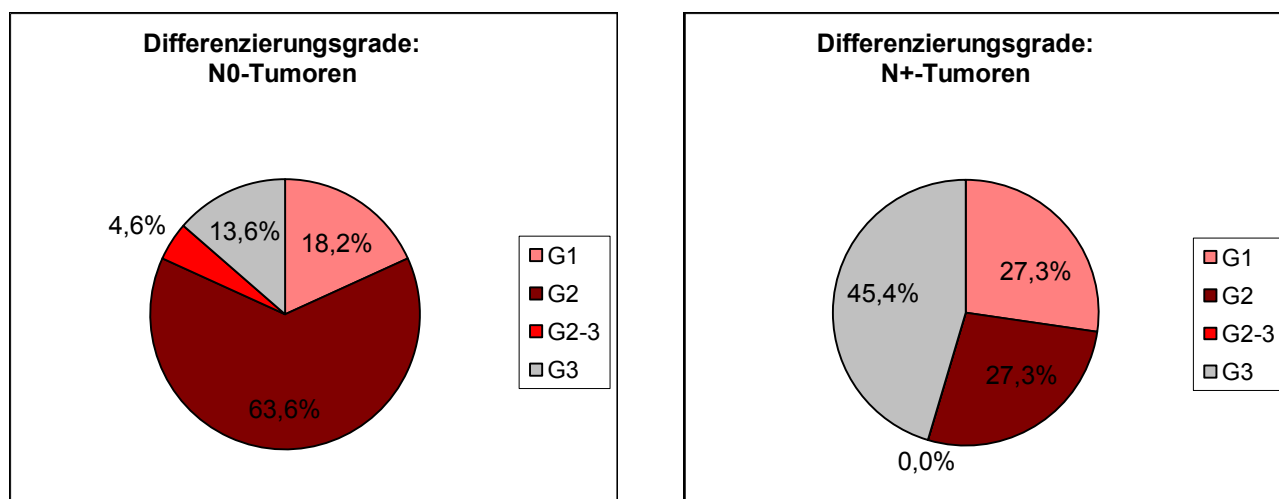


Abbildung 5.1.-3: Häufigkeitsverteilung der Differenzierungsgrade getrennt nach N0- und N+-Tumoren

## 5.2. Genetische Veränderungen bei Plattenepithelkarzinomen des Penis

Mit Hilfe der CGH wurde bei den insgesamt 33 zur Verfügung stehenden Peniskarzinomen ein Screening des Genoms bzgl. genetischer Veränderungen (chromosomale Zugewinne oder Verluste) durchgeführt.

In Tabelle 5.2.-1 sind alle CGH-Ergebnisse, einschließlich der Tumorphistologie und des Alters der Patienten zum Diagnosezeitpunkt sowie deren Überlebenszeit aufgelistet. Letztere wird mit der realen Zeit des Überlebens in Monaten angegeben, wenn die Patienten innerhalb von 5 Jahren tumorbedingt verstarben bzw. mit > 60 Monaten veranschlagt. Für 2 Fälle (Nr. 3 und Nr. 5) konnte keine reale Überlebenszeit eruiert werden, da beide Patienten nicht mehr zur Nachsorge erschienen und damit aus dem Follow-up herausfielen. Für die weitere Auswertung ist das jedoch von untergeordneter Bedeutung, da in beiden Fällen die CGH einen unauffälligen Befund demonstriert. Die Übersicht gibt alle Fälle unabhängig von einer Metastasierung (sowohl mit – als auch ohne regionale Lymphknotenmetastasen) wieder.

Tabelle 5.2.-1: Ergebnisse der Vergleichenden Genomischen Hybridisierung aller untersuchten Fälle

Nr.	Alter [Jahre]	Überleben [Monate]	Histologie	CGH-Ergebnisse
1	62	> 60	T1 G1	dim (6p), enh (6q)
2	79	> 60	T2 G2	dim (2q34qter, 6p, 8p, 14q22qter, 15q, 17q), enh (7, 8q, y)
3	77	> 16	T3 G2	unauffällig
4	74	16	T3 G2	dim (15q21qter), enh (3q, 4, 7)
5	74	> 27	T2 G2	unauffällig
6	78	25	T3 G3	dim (y)
7	73	> 60	T2 G2	dim (3p12p22, 7q32.2qter, 10p), enh (y)
8	51	> 60	T3 G2	dim (10q22qter, 15q21qter), enh (5, 8q, 9, 13q22qter)
9	46	> 60	T4 G2	unauffällig
10	76	12	T2 G3	dim (8p21pter), enh (y)
11	40	> 60	T2 G2	unauffällig
12	64	29	T1 G3	dim (8p), enh (1)
13	62	40	T1 G2	dim (14q23qter, 16, 17p), enh (2q, 8q, 9q22pter, x)
14	57	16	T1 G2	dim (8p), enh (8q, 9)
15	79	> 60 (61)	T2 G1	dim (7q24qter), enh (1, 3q, 6, 9)
16	71	48	T1 G1	enh (2, 3q24qter, 7, 8, 9p, 12)
17	45	61	T1 G3	dim (3p, 6, 8p, 11q), enh (1q, 2q32q34, 3q, 7p, 8q, 15) amp (12q14q21)
18	58	>60 (88)	T3 G3	dim (10q23qter), enh (6, 10p)
19	53	31	T1 G2	dim (3p, 5q, 9p, 12p), enh (3q, 5p, 18q)
20	63	50	T2 G2	dim (2q34qter, 4p, 7q34qter, 8p12pter, 18q21.2qter), enh (4q24qter, 5q15qter, 7q34pter, 9q21.3pter, 20p)
21	68	5	T2 G3	dim (10q24qter, 16, 17p),
22	78	26	T3 G3	dim (3p, 8p, 11p, 13q21qter, 17p, 18q, 20p, y)
23	81	4	T2 G3	dim (8p, 18q), enh (3q24qter, 8q, 11)
24	61	>60 (63)	T2 G2	dim (3p21p22), enh (7p, 8q, 9p)
25	58	9	T3 G1	dim (3p, 8p, 10p, 15q, 17p, 18q, xp, y), enh (8q, 9, 13q)
26	50	>60 (75)	T1 G2	dim (3p, 8p, 18q),
27	50	>37 (38)	T2 G2	dim (3p, 5q23qter, 13q14pter), enh (5p)
28	62	60	T1 G2-3	dim (3p, 5q14qter, 8p, 10p, 18q, y), enh (2q31, 3q25qter, 5p, 7p, 8q22qter)
29	35	>60 (108)	T2 G1	enh (8q, 12)
30	53	60	T1 G1	unauffällig
31	73	39	T1 G2	dim (3p, 9p21pter, 12q21qter, 17p13pter, 18q), enh (8q23qter)
32	57	60	Ta G1	unauffällig
33	66	>60 (99)	T2 G2	dim (10p, 16q), enh (1p, 3p, 8q)

Als Beispiel eines Karyogramms mit dazugehörigem, mittlerem Fluoreszenzprofil demonstrieren die Abbildungen 5.2.-1 und 5.2.-2 die Ergebnisse des Falles Nr. 17. Dabei sind die chromosomalen Veränderungen durch die in den betroffenen Chromosomenabschnitten überwiegenden Fluoreszenzsignale bereits im Karyogramm deutlich erkennbar. Ein überwiegend rotes Fluoreszenzsignal findet sich bei Deletionen (hier -3p, -6, -8p, -11q = rote Pfeile) und ein überwiegend grünes Fluoreszenzsignal steht für Zugewinne (hier +1q, +2q32q34, +3q, +7p, +8q, +15 = grüne Pfeile) bzw. Amplifikationen (hier +12q14q21) chromosomaler Abschnitte. Die auf dem Chromosomenarm 12q lokalisierte Pentasomie bzw. noch höher repetitive DNA-Sequenz stellt damit eine Amplifikation genetischen Materials im eigentlichen Sinne dar. Sie kennzeichnet hier die genetischen Veränderungen in einem T1G3-Tumor und ist im Übrigen die einzige derartige Amplifikation, die im Rahmen der gesamten Untersuchung gezeigt werden kann. In den zugehörigen Fluoreszenzprofilen sind die mittleren Fluoreszenzprofile als stärkere Linie gezeichnet, welche die genannten Aberrationen als Abweichungen von der Mittellinie bestätigen (vgl. Abschnitt 4.3.7. Auswertung).

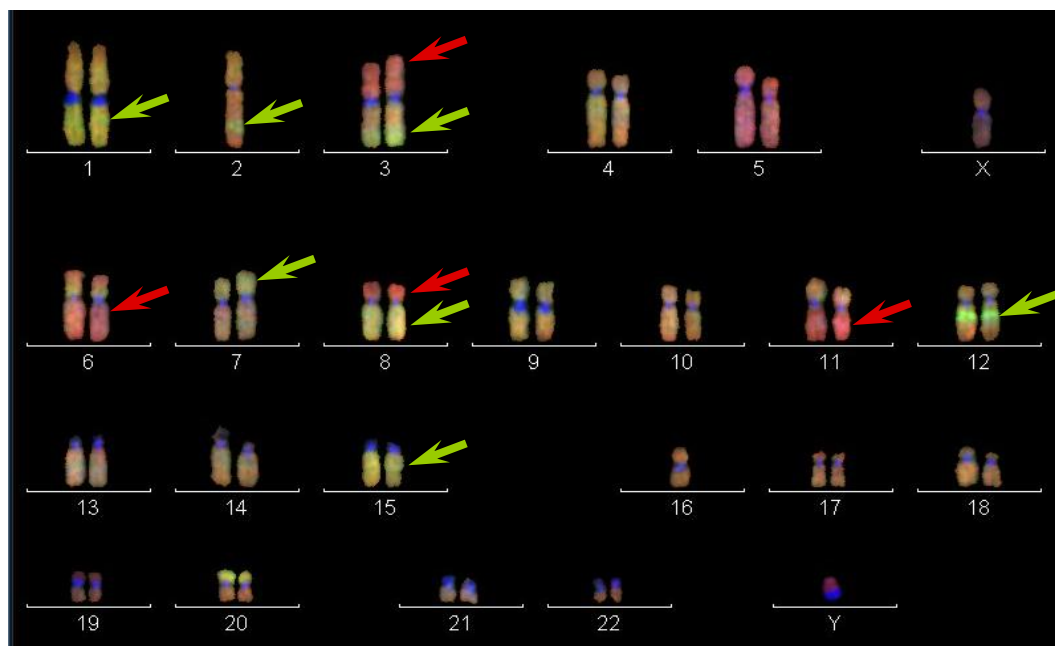


Abbildung 5.2.-1: Karyogramm des Tumors Nr. 17

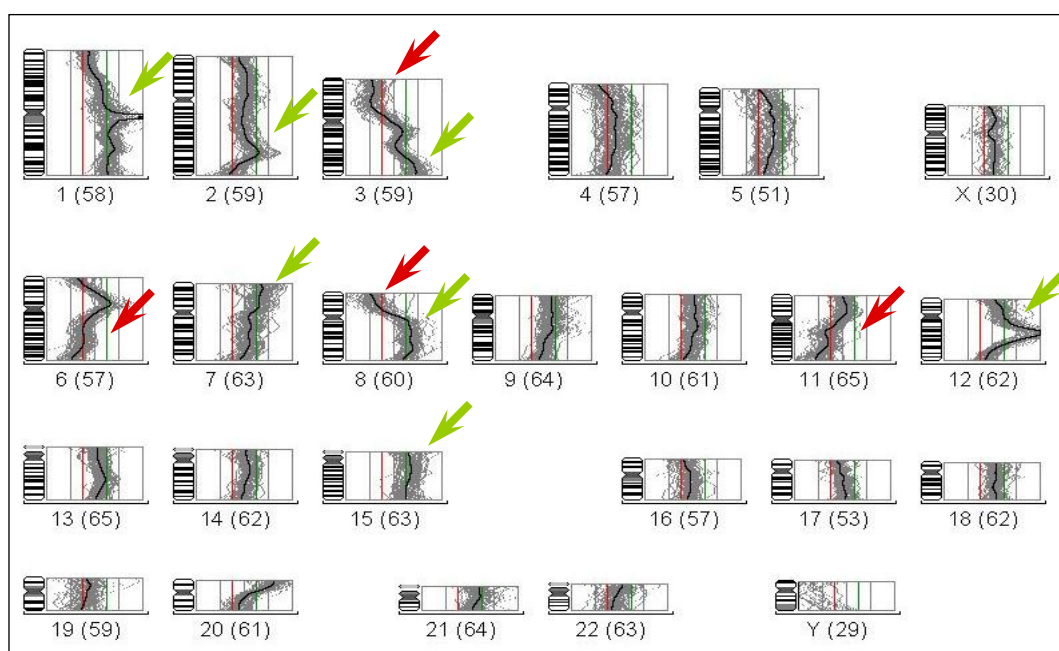


Abbildung 5.2.-2: Fluoreszenzprofile des Tumors Nr. 17 (Verluste chromosomaler Abschnitte kennzeichnen rote Pfeile, Zugewinne/Amplifikation chromosomaler Abschnitte kennzeichnen grüne Pfeile)

### 5.3. Tumoren mit unauffälligem CGH-Ergebnis

Bei 27 der 33 untersuchten Peniskarzinome konnten mit Hilfe der CGH genetische Veränderungen ermittelt werden. Dies entspricht einem Prozentsatz von 81,8%. Auffällig ist, dass bei allen 6 Fällen (18,2%) ohne chromosomale Veränderungen weder regionale Lymphknotenmetastasen noch Fernmetastasen nachgewiesen

werden konnten. Bezieht man die Berechnung unauffälliger CGH-Befunde ausschließlich auf die N0-Tumoren (n=22), ergibt sich ein Prozentsatz von 27,2% ohne nachweisbare Aberrationen. Die Abbildungen 5.3.-1 und 5.3.-2 geben ein Beispiel eines Tumors (Nr. 5) ohne Veränderungen in der CGH-Analyse. Dargestellt sind sowohl eine Metaphasenplatte (5.3.-1) als auch die dazugehörigen Fluoreszenzprofile (5.3.-2) mit hervorgehobenem mittlerem Fluoreszenzprofil. Es zeigen sich keine Abweichungen von der Mittellinie bzw. Überschreitungen der roten – oder grünen Grenzlinie respektive des Schwellenwertes der Fluoreszenzratio für Verluste – oder Zugewinne chromosomaler Abschnitte (vgl. Abschnitt 4.3.7.).

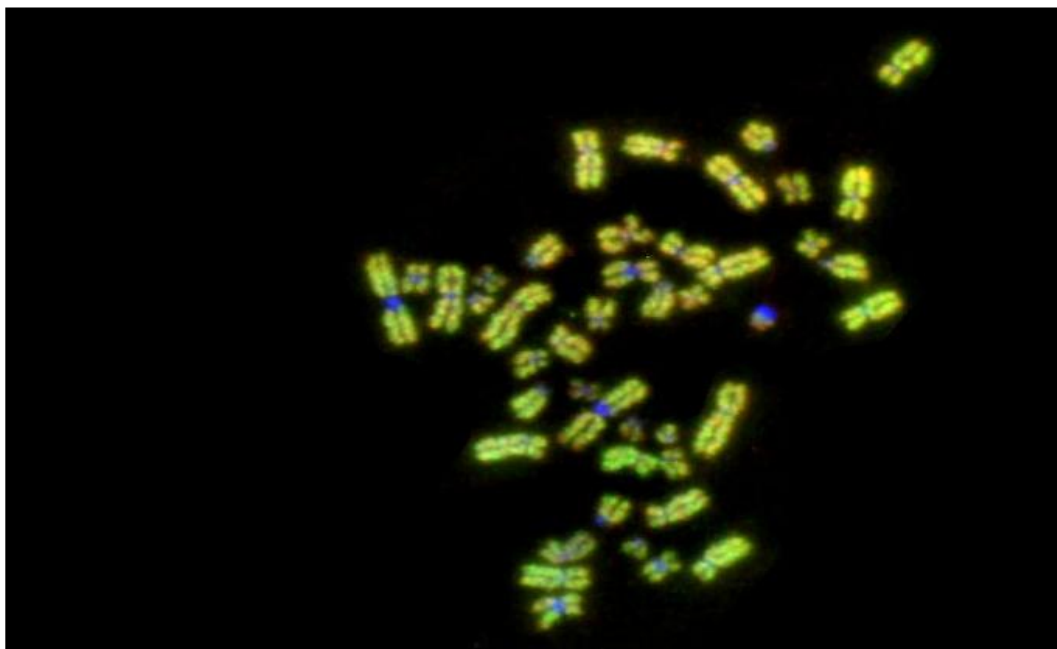


Abbildung 5.3.-1: Fluoreszenzbild einer Metaphasenplatte des Tumors Nr. 5 mit unauffälliger CGH-Analyse

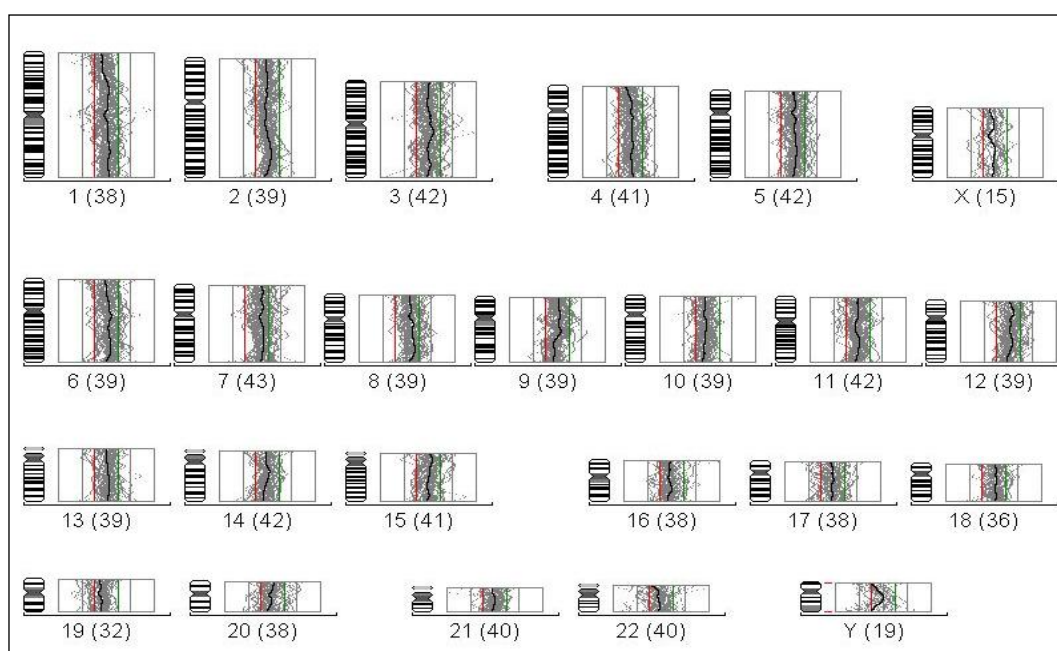


Abbildung 5.3.-2: Fluoreszenzprofile des Tumors Nr. 5 mit unauffälliger CGH-Analyse

Gleichzeitig wird deutlich, dass alle 11 Peniskarzinome (100%) mit nachgewiesener lymphogener Metastasierung auch ein positives CGH-Ergebnis im Sinne von Zugewinnen oder Verlusten genetischen Materials präsentieren.

Die Tabelle 5.3.-1 gibt eine Übersicht, wie sich die Fälle ohne chromosomale Aberrationen auf die einzelnen Tumorstadien insgesamt und getrennt nach T- und G-Kategorien der N0-Tumoren sowie deren prozentualer Anteil im Vergleich zur Gesamtanzahl aller N0-Patienten verteilen.

Tabelle 5.3.-1: Häufigkeitsverteilung unauffälliger CGH-Befunde bzgl. T- und G-Kategorie im Vergleich zu allen N0-Tumoren

Histologie	Patienten mit unauffälliger CGH (n=6)			Patienten (N0) gesamt (n=22)	
	absolut	%	% von N0-gesamt	absolut	%
pTaG1	1	16,6	100	1	4,6
pT1G1	1	16,6	33,3	3	13,6
pT1G2	0	0	0	4	18,2
pT1G2-3	0	0	0	1	4,6
pT1G3	0	0	0	2	9
pT2G1	0	0	0	0	0
pT2G2	2	33,3	28,6	7	31,8
pT2G3	0	0	0	0	0
pT3G1	0	0	0	0	0
pT3G2	1	16,6	50	2	9
pT3G3	0	0	0	1	4,6
pT4G1	0	0	0	0	0
pT4G2	1	16,6	100	1	4,6
pT4G3	0	0	0	0	0
Ta	1	16,6	100	1	4,6
T1	1	16,6	10	10	45,4
T2	2	33,3	28,6	7	31,8
T3	1	16,6	33,3	3	13,6
T4	1	16,6	100	1	4,6
G1	2	33,3	50	4	18,2
G2	4	66,6	28,6	14	63,6
G2-3	0	0	0	1	4,6
G3	0	0	0	3	13,6
gesamt	6	100	entfällt	22	100

Betrachtet man diese Verteilung ausschließlich in Bezug auf die Tumorstadien, so fällt auf, dass es Tumoren jeder Invasivitätsstufe gibt, bei denen keine genetischen Veränderungen mittels CGH nachweisbar sind.

Hingegen entsteht mit zunehmender Entdifferenzierung der Tumoren der Eindruck, dass die Zahl unauffälliger Befunde abnimmt. Während G1-Tumoren noch in 50% der Fälle keine chromosomalen Veränderungen in der CGH zeigen, war dies nur noch bei 28,6% der G2-Tumoren der Fall. In allen höhergradigen Tumoren waren immer genetische Aberrationen nachzuweisen. Aufgrund der geringen Anzahl bleibt dies jedoch ohne statistische Bedeutung. Zur Veranschaulichung zeigen die Abbildungen 5.3.-3 und 5.3.-4 die Tumoren mit unauffälliger CGH-Analyse als prozentuale Anteile der entsprechenden T- bzw. G-Kategorie aller Lymphknoten-negativen Tumoren in Form einer graphischen Darstellung.

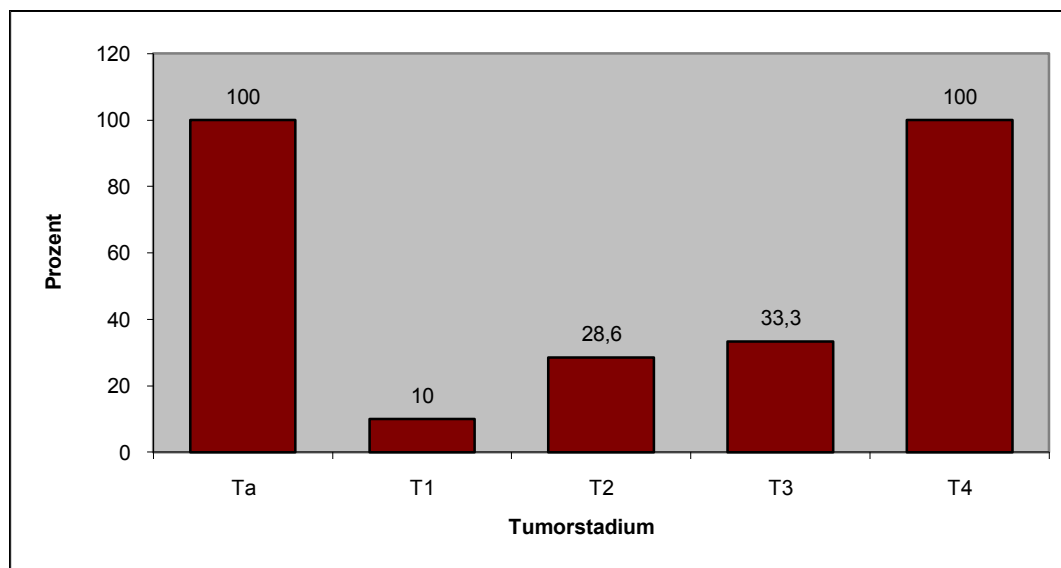


Abbildung 5.3.-3: Tumoren mit unauffälligem CGH-Befund als Prozentsatz aller N0-Tumoren bezogen auf das jeweilige T-Stadium

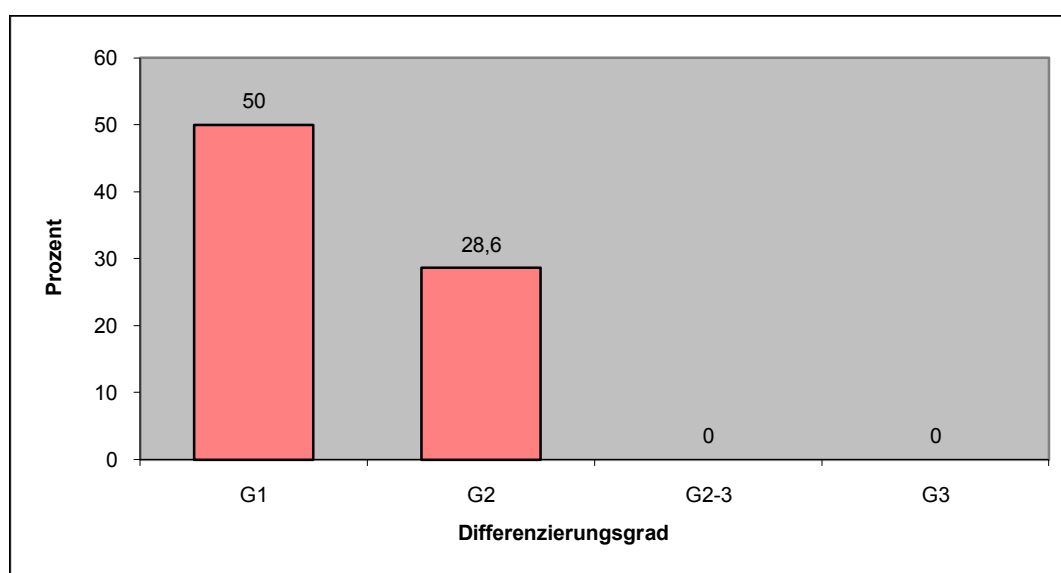


Abbildung 5.3.-4: Tumoren mit unauffälligem CGH-Befund als Prozentsatz aller N0-Tumoren bezogen auf das jeweilige Tumor-Grading

## 5.4. Tumoren mit chromosomalen Aberrationen

### 5.4.1. Chromosomenaberrationen der Peniskarzinome ohne Lymphknotenmetastasen

Bei Tumoren ohne Lymphknotenmetastasierung (n=16) zeigte die CGH insgesamt 114 Aberrationen verteilt auf 87 Chromosomen. Dabei konnten 57 Verluste von ebenso vielen Zugewinnen unterschieden werden. Im Durchschnitt bedeutet das 7,1 genetische Veränderungen auf 5,4 Chromosomen je Fall bzw. 3,6 Verluste

und 3,6 Zugewinne. Minimal waren 2 Alterationen auf einem Chromosom bei einem pT1G1-Tumor (Nr. 1) und maximal 13 Alterationen verteilt auf 9 Chromosomen bei einem pT1G3-Tumor (Nr. 17) zu beobachten. Tabelle 5.4.1.-1 dokumentiert alle Fälle mit nachgewiesenen chromosomalen Veränderungen ohne lymphogene Metastasierung mit dem Alter zum Diagnosezeitpunkt, der entsprechenden Histologie, getrennt nach Verlusten und Zugewinnen, deren Summation und die Anzahl der alterierten Chromosomen je Fall.

Tabelle 5.4.1.-1: Genetische Alterationen der Peniskarzinome ohne Lymphknotenmetastasen mit Nummer des untersuchten Tumors, Alter zum Zeitpunkt der Erstdiagnose, der Histologie und der Anzahl der von Veränderungen betroffenen Chromosomen

Nr.	Alter	T-Stadium	Differenzierung	Verluste - Chromosomen	$\Sigma$ Verluste	Zugewinne - Chromosomen	$\Sigma$ Zugewinne	$\Sigma$ V+Z	$\Sigma$ alterierte Chromosomen
1	62	T1	G1	dim (6p)	1	enh (6q)	1	2	1
2	79	T2	G2	dim (2q34qter, 6p, 8p, 14q22qter, 15q, 17q)	6	enh (7, 8q, Y)	5	11	8
4	74	T3	G2	dim (15q21qter)	1	enh (3q, 4, 7)	5	6	4
12	64	T1	G3	dim (8p)	1	enh (1)	2	3	2
13	62	T1	G2	dim (14q23qter, 16, 17p)	4	enh (2q, 8q, 9q22pter, X)	5	9	7
16	71	T1	G1		0	enh (2, 3q24qter, 7, 8, 9p, 12)	10	10	6
17	45	T1	G3	dim (3p, 6, 8p, 11q)	5	enh (1q, 2q32q34, 3q, 7p, 8q, 15) amp (12q14q21)	8	13	9
19	53	T1	G2	dim (3p, 5q, 9p, 12p)	4	enh (3q, 5p, 18q)	3	7	5
20	63	T2	G2	dim (2q34qter, 4p, 7q34qter, 8p12pter, 18q21.2qter)	5	enh (4q24qter, 5q15qter, 7q34pter, 9q21.3pter, 20p)	5	10	9
22	78	T3	G3	dim (3p, 8p, 11p, 13q21qter, 17p, 18q, 20p, Y)	9		0	9	8
24	61	T2	G2	dim (3p21p22)	1	enh (7p, 8q, 9p)	3	4	4
26	50	T1	G2	dim (3p, 8p, 18q)	3		0	3	3
27	50	T2	G2	dim (3p, 5q23qter, 13q14pter)	3	enh (5p)	1	4	3
28	62	T1	G2-3	dim (3p, 5q14qter, 8p, 10p, 18q, Y)	7	enh (2q31, 3q25qter, 5p, 7p, 8q22qter)	5	12	8
31	73	T1	G2	dim (3p, 9p21pter, 12q21qter, 17p13pter, 18q)	5	enh (8q23qter)	1	6	6
33	66	T2	G2	dim (10p, 16q)	2	enh (1p, 3p, 8q)	3	5	5

Vereinzelt handelt es sich bei den genetischen Alterationen um Verluste kompletter Chromosomen (z.B. Chromosom 16 im Fall Nr. 13; Chromosom 6 im Fall Nr. 17 und das Y-Chromosom in den Fällen Nr. 22 und 28) oder um Zugewinne kompletter Chromosomen (z.B. das Y-Chromosom im Fall Nr. 2; Chromosom 4 und 7 im Fall Nr. 4; Chromosom 1 im Fall Nr. 12; das X-Chromosom im Fall Nr. 13, die Chromosomen 7, 8 und 12 im Fall Nr. 16, Chromosom 2 ebenfalls im Fall Nr. 16 sowie Chromosom 15 im Fall Nr. 17).

Zur Illustration eines Falles ohne Lymphknotenmetastasen zeigen die Abbildungen 5.4.1.-1 bis 5.4.1.-3 eine Metaphasenplatte des Peniskarzinoms Nr. 12, das zugehörige Karyogramm in den Fluoreszenzfarben und die entsprechenden Summenfluoreszenzprofile mit jeweils kräftiger hervorgehobenem, mittlerem



Fluoreszenzprofil. Auch an diesem Beispiel sind bereits auf der Metaphasenplatte und im Karyogramm anhand der überwiegenden Fluoreszenzsignale (Verlust rot und Zugewinn grün) die Veränderungen sichtbar. Die Abweichungen wiederum der mittleren Fluoreszenzprofile von der Mittellinie lassen die Aberrationen -8p und +1 erkennen.

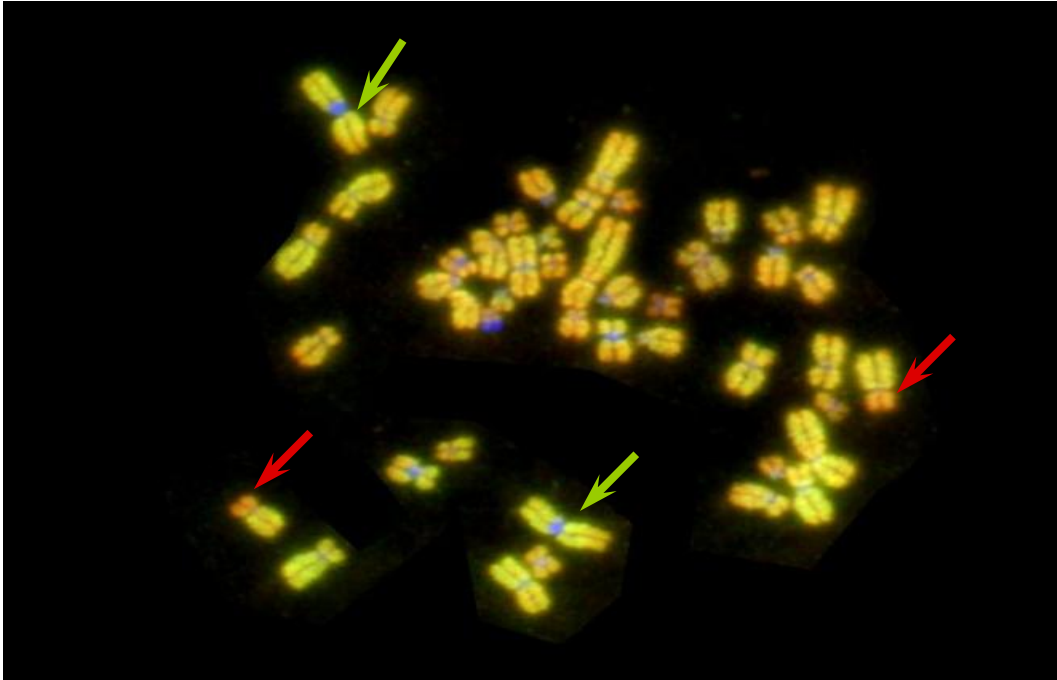


Abbildung 5.4.1.-1: Metaphasenplatte des Peniskarzinoms Nr. 12; Verlust - roter Pfeil, Zugewinn - grüner Pfeil

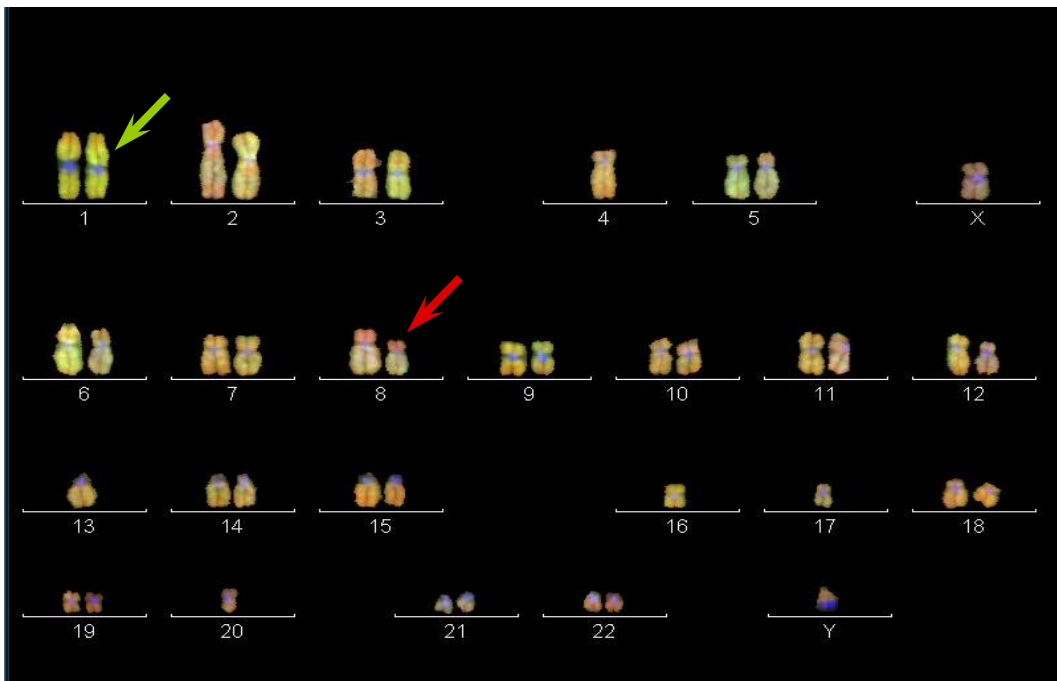


Abbildung 5.4.1.-2: Fluoreszenzkaryogramm des Peniskarzinoms Nr. 12; Verlust - roter Pfeil, Zugewinn - grüner Pfeil

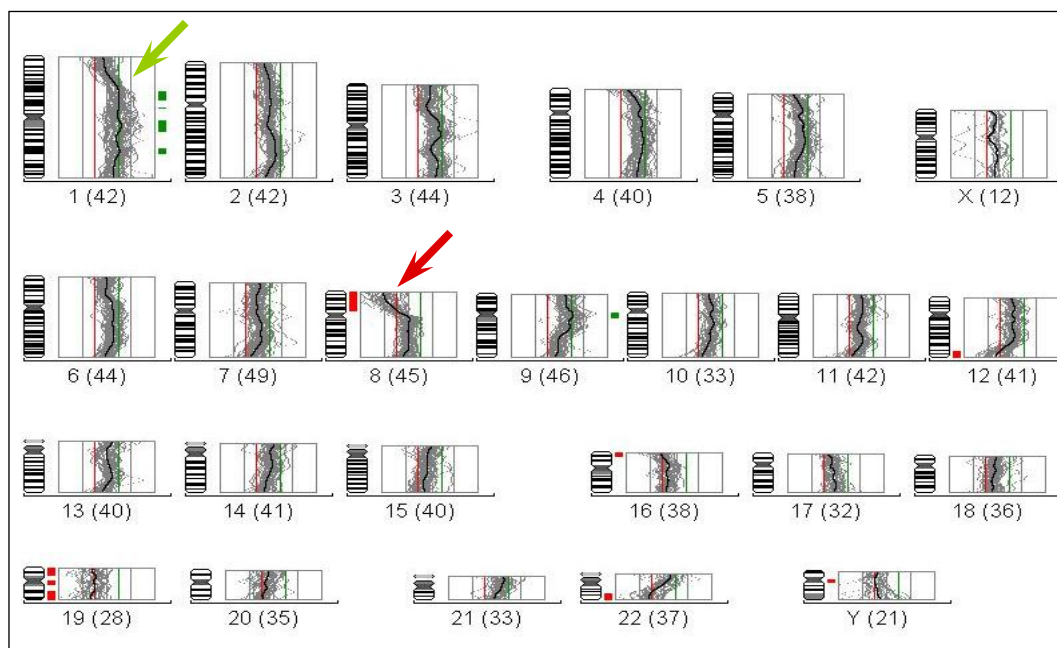


Abbildung 5.4.1-3: Fluoreszenzprofile des Peniskarzinoms Nr. 12;

In den einzelnen Tumorstadien, zeigen alle T-Kategorien im Durchschnitt etwa die gleiche Zahl genetischer Veränderungen pro Tumor mit 7,2 im Stadium T1 (n=9), 6,8 im Stadium T2 (n=5) und 7,5 bei allen T3-Tumoren (n=2). Bezogen auf den Differenzierungsgrad steigt die Zahl der Abberationen je Tumor mit zunehmender Entdifferenzierung an. Das ist in erster Linie sowohl relativ als auch absolut auf eine steigende Zahl von DNA-Verlusten gegenüber Zugewinnen zurückzuführen. So finden sich 6 bzw. 6,5 Veränderungen bei G1- (n=2) respektive G2-Tumoren (n=10), während es bei dem einzelnen mit G2-3 klassifizierten Tumor (n=1) 12 Aberrationen sind und G3-Tumoren (n=3) im Mittel 8,3 Aberrationen aufweisen. Fasst man die letzteren beiden Grade zusammen erreicht die durchschnittliche Anzahl der Aberrationen 9,25. Die beschriebenen Zusammenhänge sind in den Abbildungen 5.4.1-4 und 5.4.1-5 graphisch dargestellt.

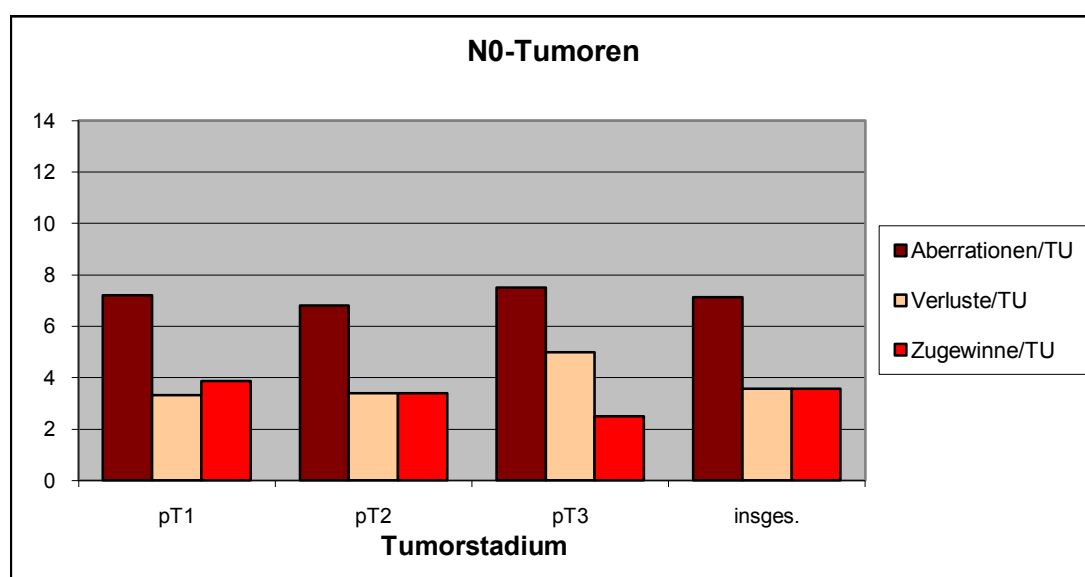


Abbildung 5.4.1-4: Durchschnitt chromosomaler Aberrationen je Tumor in den einzelnen bzw. allen Tumorstadien

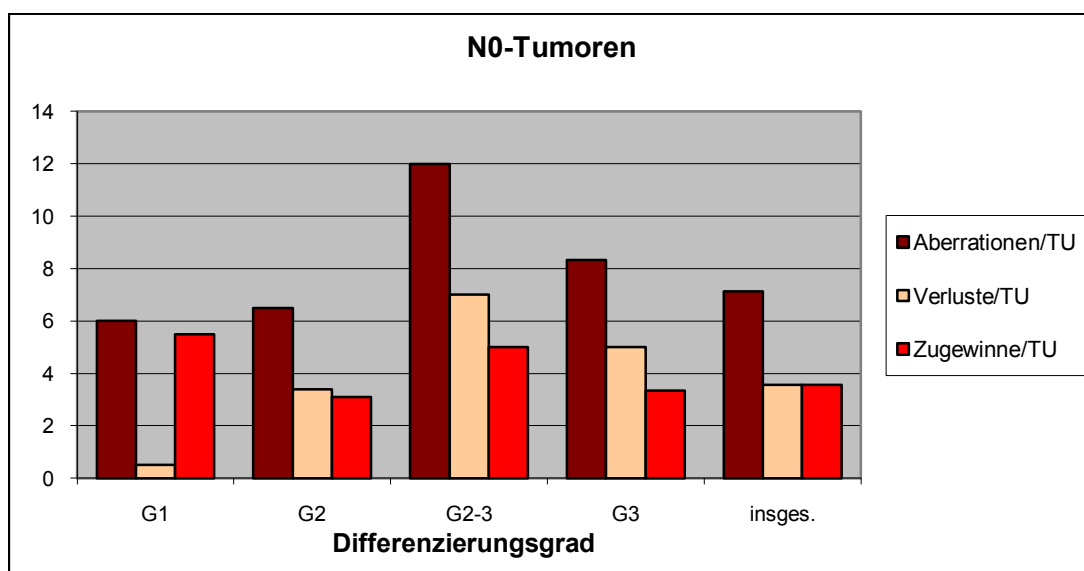


Abbildung 5.4.1-5: Durchschnitt chromosomaler Aberrationen je Tumor in den einzelnen bzw. allen Differenzierungsgraden

Ein Vergleich der genannten Mittelwerte mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Testes für unabhängige Stichproben ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen.

#### 5.4.2. Häufigkeitsverteilung der Aberrationen bei Tumoren ohne Lymphknotenmetastasen

In die folgende Auswertung fanden entsprechend o.g. Festlegung ausschließlich Fälle mit positiver CGH-Analyse Eingang. Es wurde das Vorkommen spezifischer chromosomaler Aberrationen insgesamt sowie deren Korrelation zu Tumorstadium und Differenzierungsgrad genauer untersucht. Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen ließen sich jedoch nicht statistisch sichern (exakter Test nach Fisher).

Zur Veranschaulichung der Ergebnisse wurde die graphische Darstellung in Balkendiagrammen gewählt, in denen Zugewinne als positive Ausschläge und Verluste genetischen Materials als negative Ausschläge wiedergegeben werden.

Aus der Abbildung 5.4.2.-1. wird ersichtlich, dass alle untersuchten Tumoren ohne Lymphknotenmetastasen insgesamt eine Vielzahl unterschiedlicher genetischer Veränderungen zeigen, die jedoch zumeist nur in einzelnen - oder wenigen der untersuchten Fälle (<20%) nachweisbar sind. Häufungen von Aberrationen in mehr als 20% der Fälle lassen sich auf den Chromosomenarmen 3p, 8p und 18q in Form von Verlusten lokalisieren, während auf 2q, 3q, 5p, 7p, 8q und 9p Zugewinne zu finden sind. Als charakteristisch sind Verluste der Chromosomenarme 3p in der Hälfte der Fälle, 8p in 43,8% und 18q in 31,3 % sowie Zugewinne von 8q ebenfalls in der Hälfte der Fälle, 7p mit 43,8%, 3q in 31,3% und 2q, 5p, 9p in jeweils 25% einzustufen.

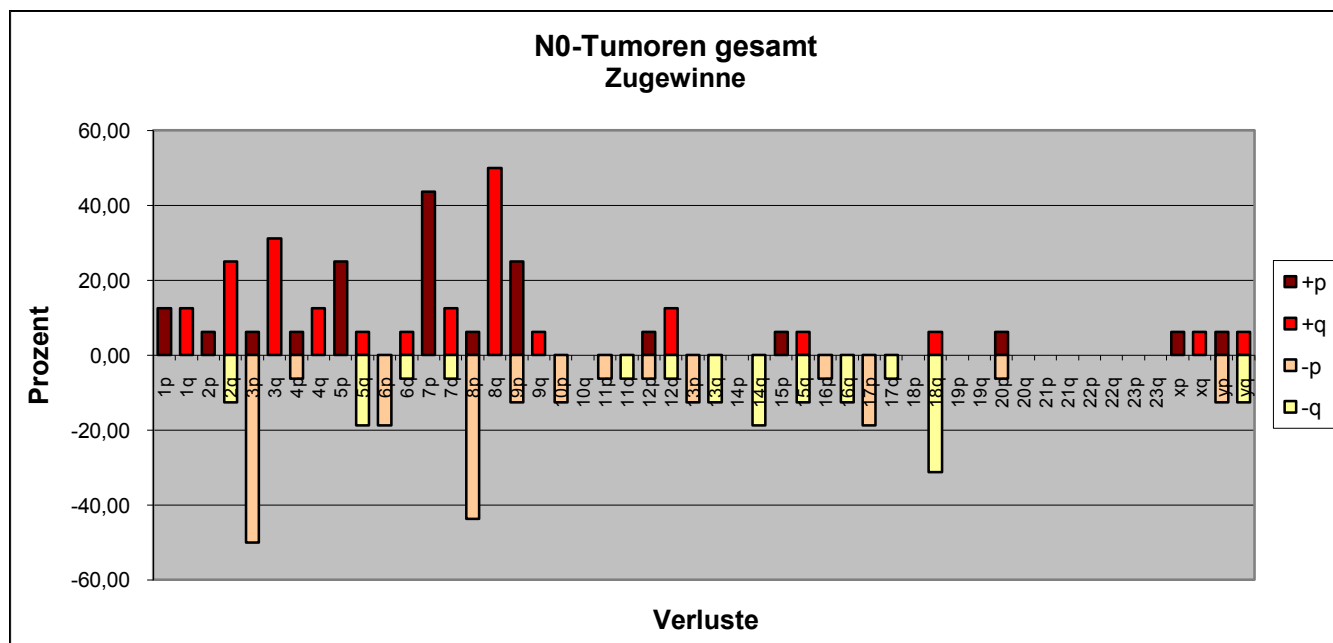


Abbildung 5.4.2.-1: Häufigkeit genetischer Aberrationen (Verluste/Zugewinne) auf den einzelnen Chromosomenarmen bei allen untersuchten Tumoren ohne Lymphknotenmetastasen (N0) mit auffälliger CGH-Analyse (n=16)

Ganze Chromosomen betreffende Veränderungen im Sinne von Verlusten finden sich in 2 Fällen für das Y-Chromosom und jeweils einmal für die Chromosomen 6 und 16. Ein Zugewinn eines gesamten Chromosoms zeigt sich in 3 Fällen für das Chromosom 7 und jeweils einmal die Chromosomen 1, 2, 4, 8, 12, 15, X und Y betreffend. Im Kapitel 5.4.1. sind sämtliche Verluste und Zugewinne tabellarisch aufgeführt (vgl. Tab. 5.4.1.-1.).

Die folgenden Abbildungen 5.4.2.-2. bis 5.4.2.-4 zeigen die Häufigkeitsverteilung der chromosomalen Aberrationen in den einzelnen Tumorstadien der N0-Tumoren.

Während die T1- und T2-Tumoren viele verschiedene Veränderungen in zumeist geringer Frequenz aufweisen, sind Tumoren im Stadium T3 von einer deutlich geringeren Zahl Aberrationen betroffen. Allerdings standen für die Untersuchung von T3-Tumoren nur 2 Fälle zur Verfügung, was deren statistische Relevanz deutlich einschränkt.

Die häufigsten Veränderungen bei den T1-Tumoren sind Verluste von 3p und Zugewinne von 8q mit je 55,6%. Ebenso sind als häufige Verluste 8p in 44,4%, 18q in 33,3%, 5q, 6p, 9p und 17p in je 22,2% sowie als häufige Zugewinne 2q und 3q in je 44,4%, 7p in 33,3%, 1q, 5p, 9p und 12q in je 22,2% zu nennen. Auffällig erscheinen die identische Zahl von Verlusten und Zugewinnen am p-Arm des Chromosoms 9 und die bereits weiter oben beschriebene Amplifikation auf 12q.

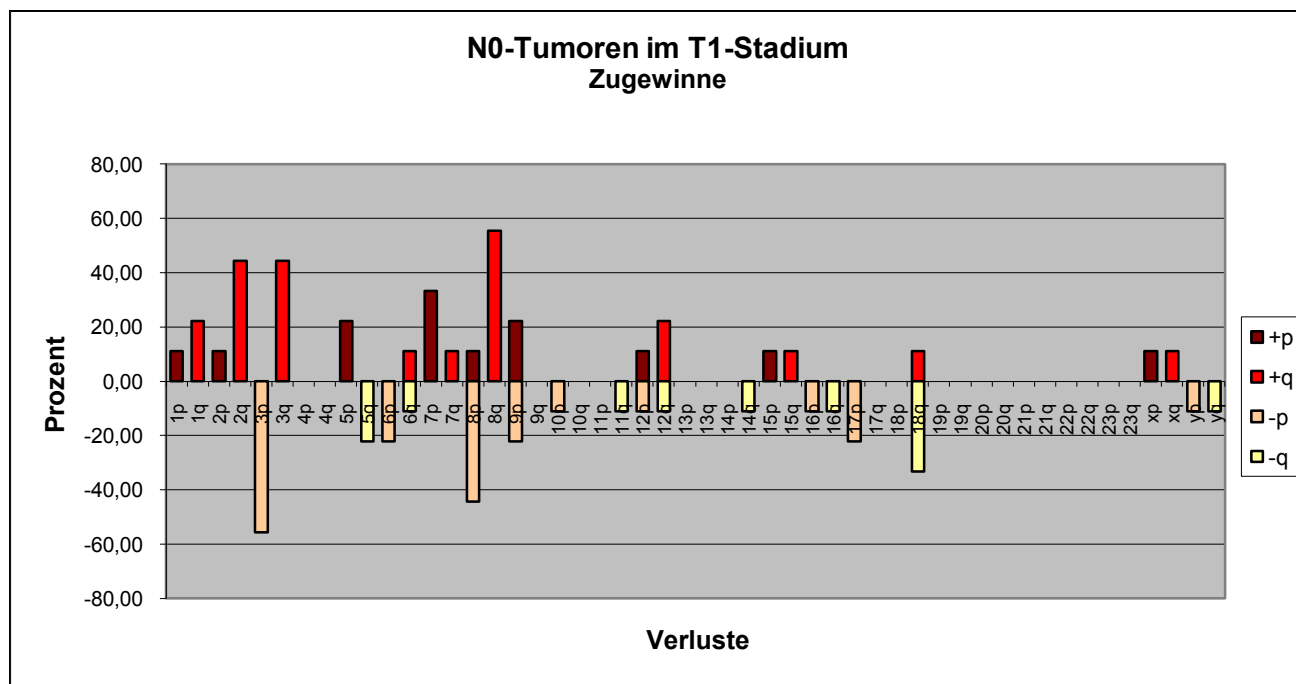


Abbildung 5.4.2.-2: Aberrationen bei N0-Tumoren im T1-Stadium (n=9)

Für T2-Tumoren sind Zugwinne zu 60% am Chromosomenarm 8q charakteristisch. Darüber hinaus sind in diesem Tumorstadium Verluste von 2q, 3p, 8p und Zugwinne an 7p/7q einschließlich einer Polysomie des Chromosoms 7 jeweils zu 40% häufig. Die Zugwinne auf 2q und 3q sind hier nicht mehr nachweisbar.

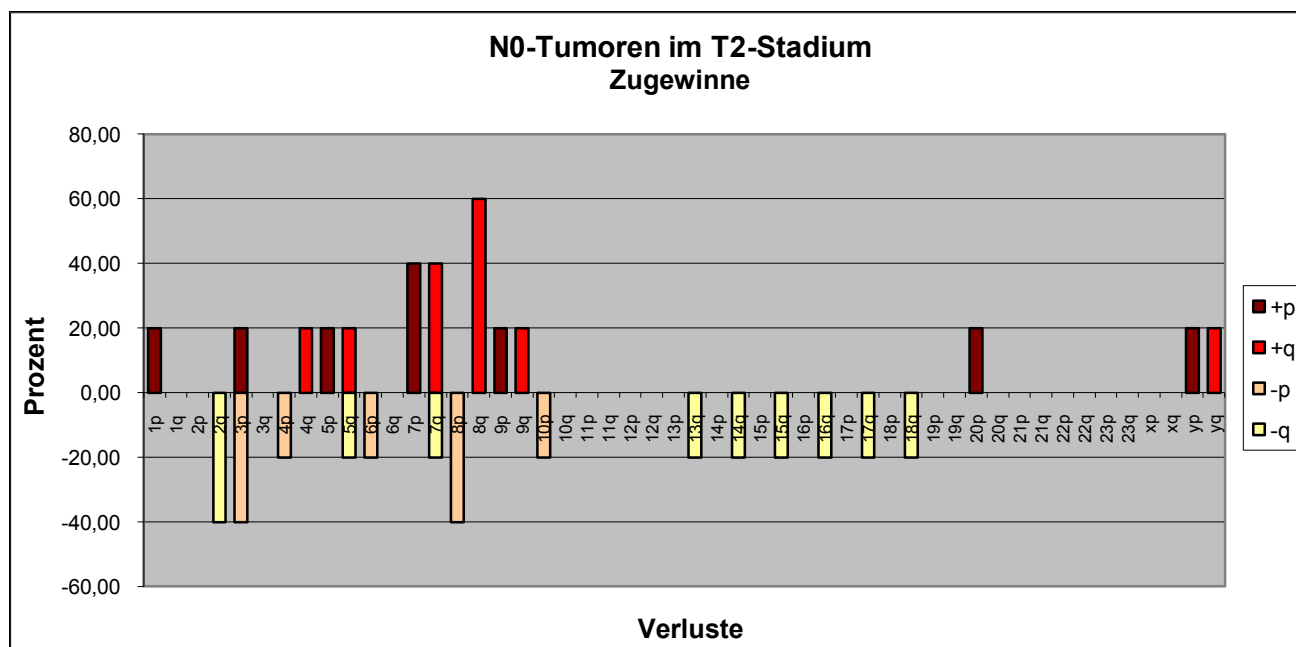


Abbildung 5.4.2.-3: Aberrationen bei N0-Tumoren im T2-Stadium (n=5)

Bei den T3-Tumoren finden sich Aberrationen immer nur in einem der beiden untersuchten Fälle, das heißt je zu 50%. Damit lässt sich eine statistische Häufung nicht belegen. Jedoch kann auch für die T3-Tumoren ein Verlust von 3p und 8p sowie ein Zugewinn von 3q bzw. ein Zugewinn der ganzen Chromosomen 4 und

7 gezeigt werden. Veränderungen am Chromosom 2 und am Chromosomenarm 8q lassen sich im Gegensatz zu niedrigeren Tumorstadien in keinem der beiden Fälle darstellen.

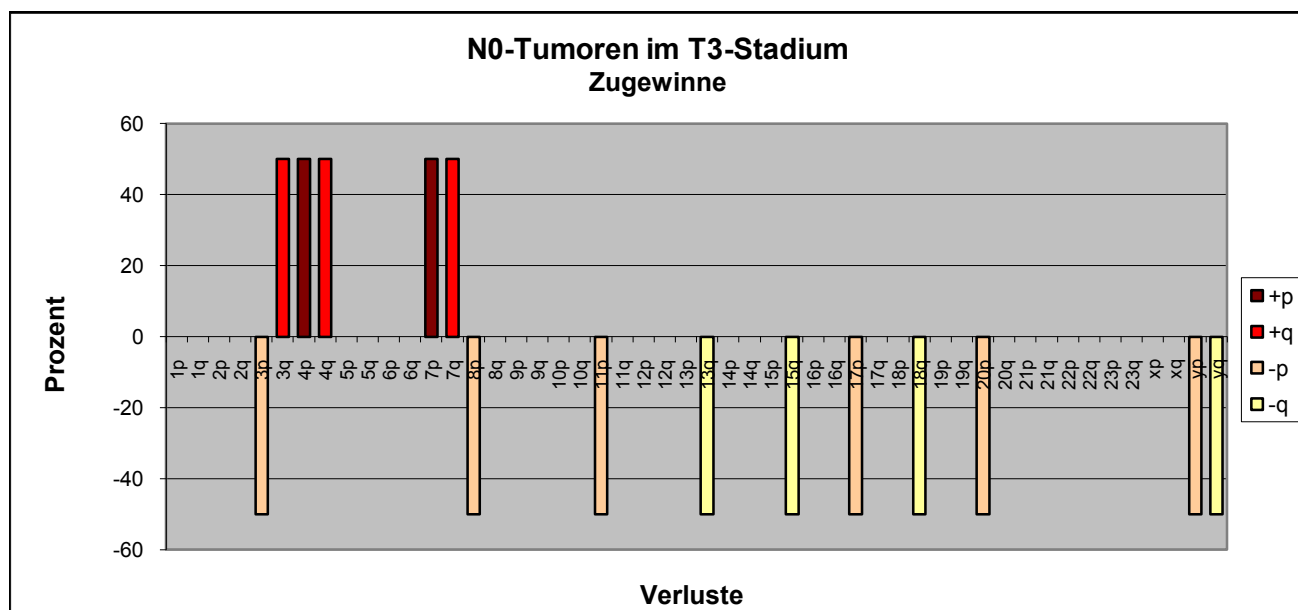


Abbildung 5.4.2.-4: Aberrationen bei N0-Tumoren im T3-Stadium (n=2)

Bei der Korrelation der Differenzierungsgrade mit den in der CGH-Analyse entdeckten genetischen Veränderungen lässt sich insgesamt mit zunehmender Entdifferenzierung eine Zunahme der Aberrationen pro Tumor feststellen. Gleichzeitig fällt bei höhergradigen Tumoren eine Zunahme der Verluste gegenüber Zugewinnen auf. Allerdings wird die Aussagefähigkeit durch geringe Fallzahlen in den einzelnen Gruppen teilweise deutlich reduziert. In den Abbildungen 5.4.2.-5 bis 5.4.2.-8 sind die chromosomalen Veränderungen in den einzelnen Differenzierungsgraden der N0-Tumoren graphisch dargestellt.

Da in der Gruppe der G1-Tumoren nur 2 Präparate zur Verfügung standen, ist eine Aussage zur Häufigkeitsverteilung von genetischen Veränderungen ebenso wie für Tumoren im T3-Stadium nicht möglich. Auch hier treten CGH-Veränderungen jeweils nur in einem der beiden untersuchten Fälle (in 50%) auf. Es kann lediglich festgestellt werden, dass die CGH Aberrationen an den Chromosomenarmen +2q, +3q, +8q und einen Zugewinn von Chromosom 7, wie sie auch bei anderen Gruppen gehäuft vorkommen, zeigt. Zugewinne von 2q und 8q finden sich bei den G1-Tumoren ebenfalls im Rahmen eines Zugewinns der gesamten Chromosomen 2 und 8. Zusätzlich treten ein Verlust von 6p und Zugewinne von 6q, 9p sowie des ganzen Chromosoms 12 auf.

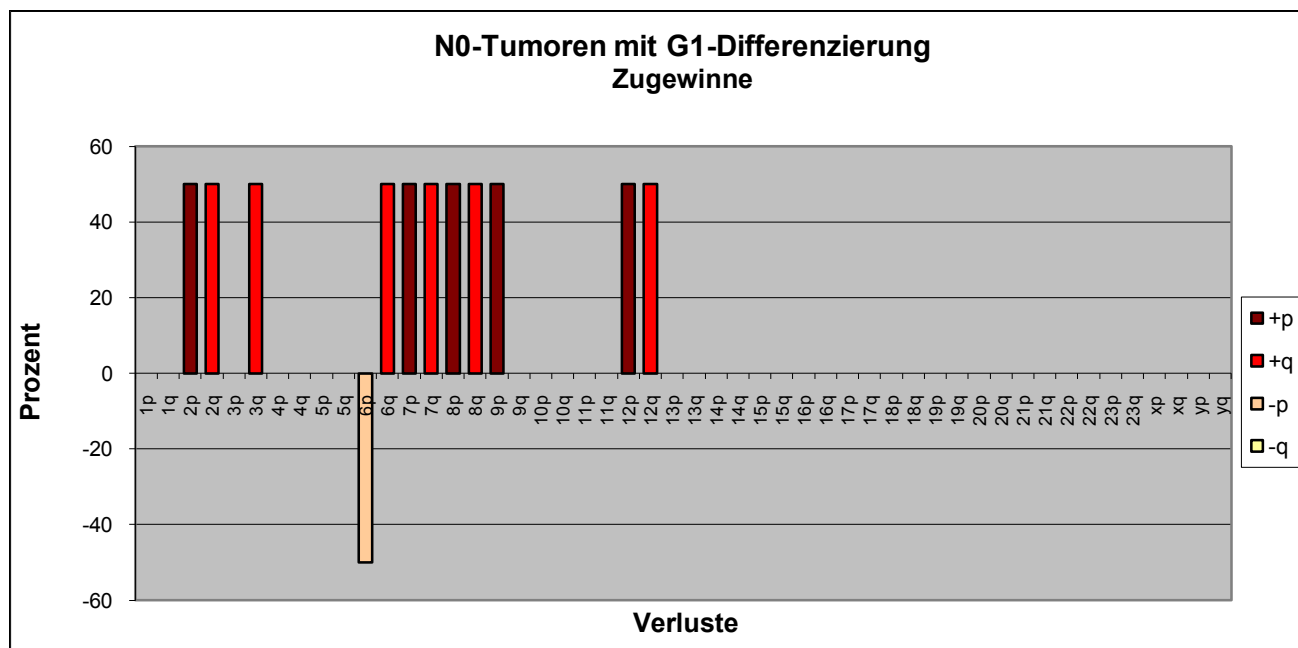


Abbildung 5.4.2.-5: Aberrationen bei N0-Tumoren mit G1-Differenzierung (n=2)

Tumoren mit G2-Differenzierung lassen wiederum eine Vielzahl verschiedener Veränderungen erkennen. Mit jeweils 50% am häufigsten zeigen sich Verluste des Chromosomenarms 3p und Zugewinne von 8q. Weitere häufige Aberrationen sind Zugewinne von 7p in 40% und Verluste von 8p und 18q in je 30% der Fälle. Darüber hinaus kommen Zugewinne der ganzen Chromosomen 4, 7, X und Y vor.

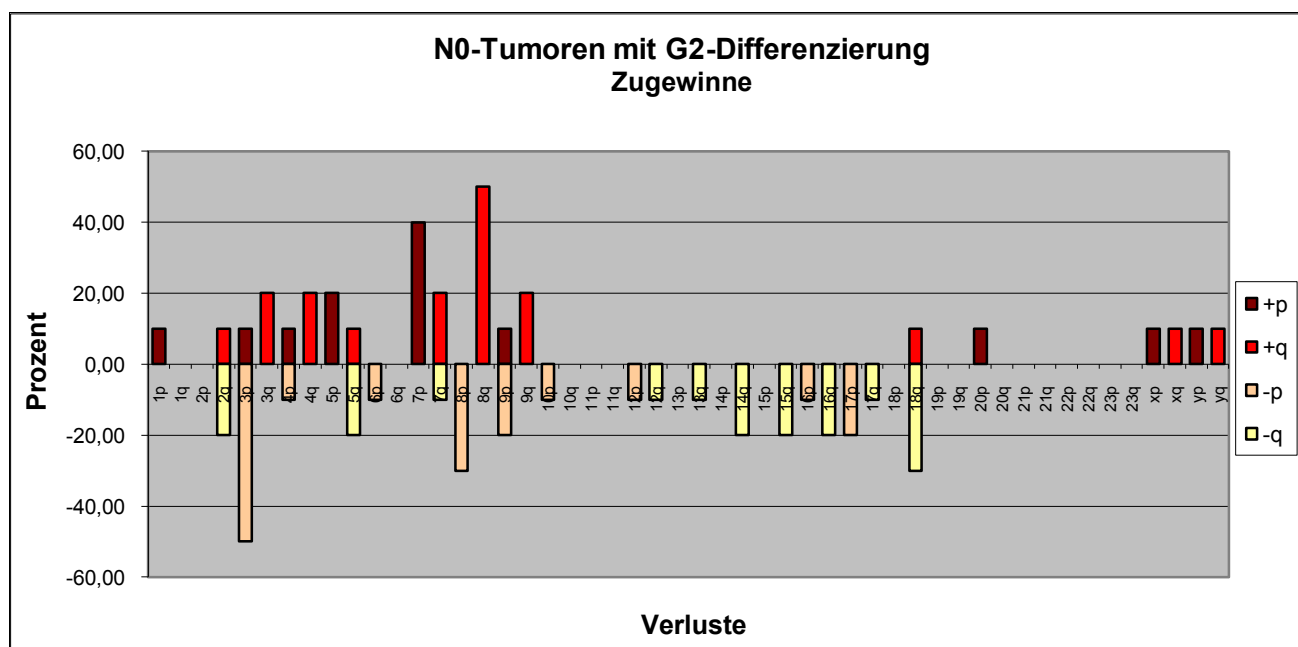


Abbildung 5.4.2.-6: Aberrationen bei N0-Tumoren mit G2-Differenzierung (n=10)

Der einzige analysierte G2-3-Tumor bestätigt die aus anderen Gruppen bekannten Verluste an 3p, 8p und 18q sowie Zugewinne von 2q, 3q, 7p und 8q, während hier nachweisbare Verluste von 5q, 10p und des Y-Chromosoms sowie ein Zugewinn von 5p ansonsten eher selten zu beobachten sind.

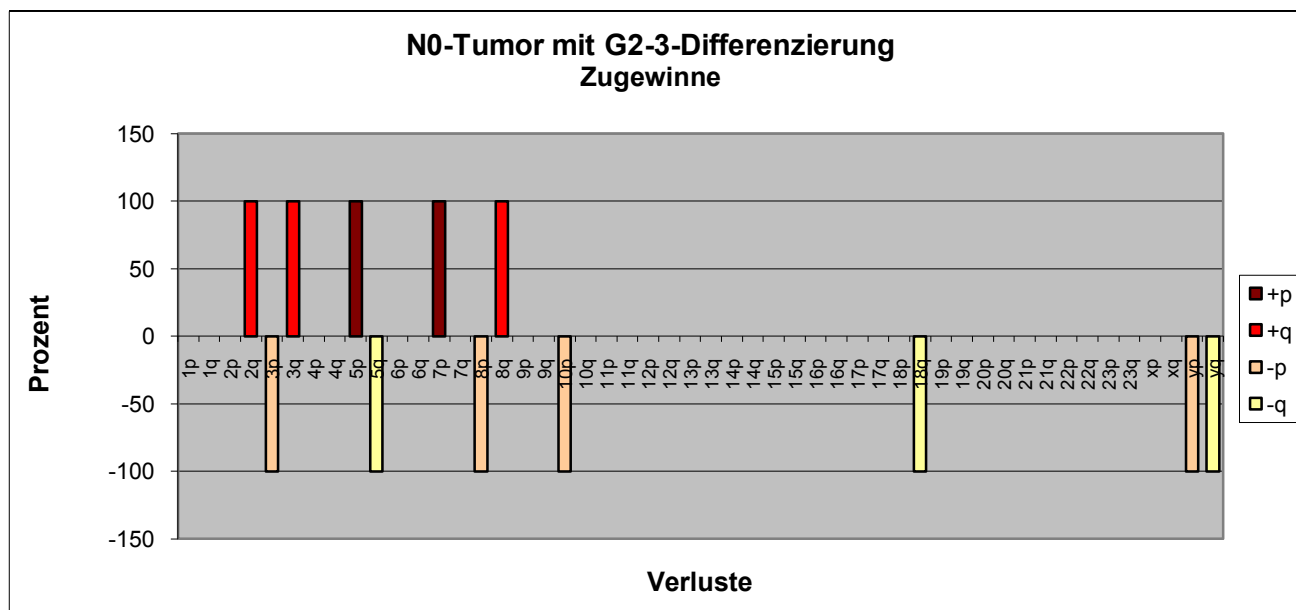


Abbildung 5.4.2.-7: Aberrationen bei N0-Tumoren mit G2-3-Differenzierung (n=1)

Auch bei den G3-Tumoren schränkt die geringe Fallzahl (n=3) die Aussagefähigkeit der Ergebnisse ein. Es finden sich hier neben einem 100%-igen Verlust von 8p, wie auch schon in anderen Gruppen Verluste von 3p, 17p und 18q, Zugewinne von 1q, 2q, 3q, 7p und 8q sowie der Verlust des Y-Chromosoms und zusätzlich Verluste auf dem Chromosomenarm 11q. Aufgrund der Gruppenzugehörigkeit soll auch die Amplifikation im engeren Sinne von 12q hier nochmals erwähnt werden.

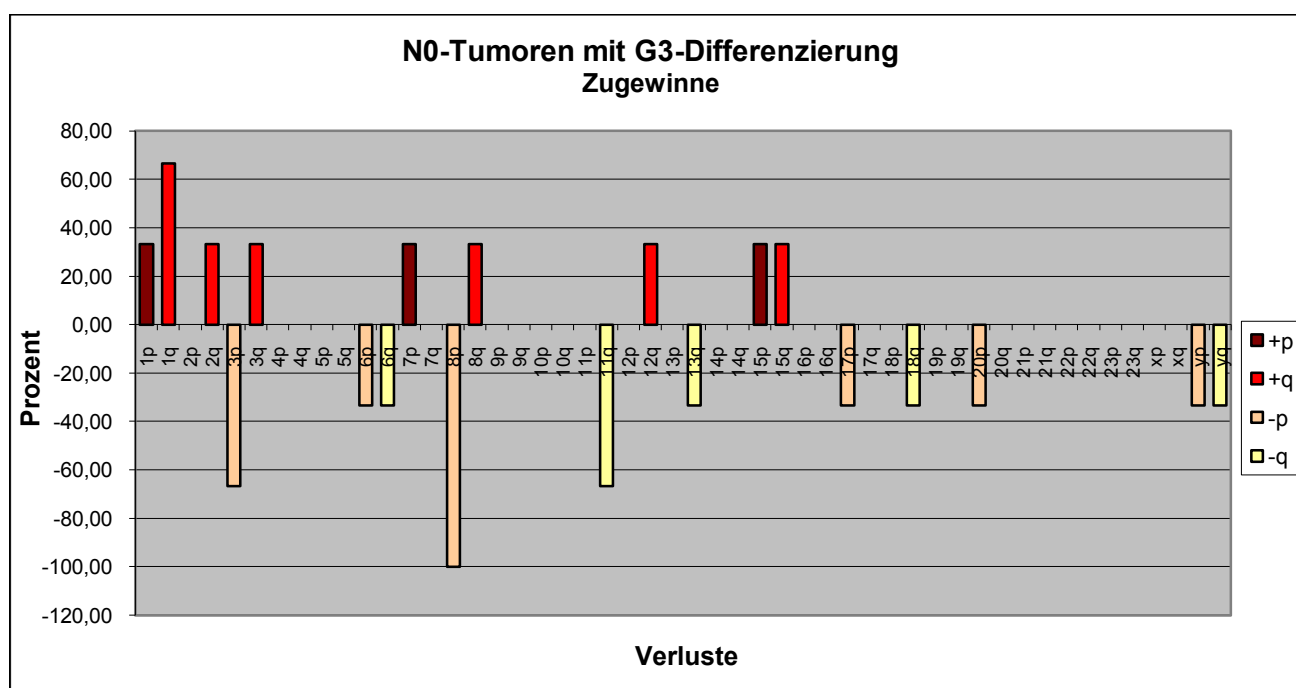


Abbildung 5.4.2.-8: Aberrationen bei N0-Tumoren mit G3-Differenzierung (n=3)



### 5.4.3. Chromosomenaberrationen der Peniskarzinome mit Lymphknotenmetastasen

In den untersuchten Fällen mit nachgewiesenen Lymphknotenmetastasen (n=11) konnten mit Hilfe der CGH insgesamt 61 Aberrationen verteilt auf 42 Chromosomen detektiert werden. Diese Gesamtzahl teilt sich in 26 Verluste und 35 Zugewinne chromosomaler Abschnitte auf. Im Mittel bedeutet das 5,5 genetische Veränderungen bzw. 2,4 Verluste und 3,2 Zugewinne auf durchschnittlich 3,8 Chromosomen je Fall. Es konnten im Minimum 2 Alterationen bei einem pT3G3-Tumor (Nr. 6) und maximal 13 Alterationen bei einem pT3G1-Tumor (Nr. 25) beobachtet werden.

Tabelle 5.4.3.-1 dokumentiert die chromosomalen Veränderungen aller Fälle mit nachgewiesener lymphogener Metastasierung mit dem Alter zum Diagnosezeitpunkt, der entsprechenden Histologie, getrennt nach Verlusten und Zugewinnen, deren Summation und die Anzahl der alterierten Chromosomen je Fall.

Tabelle 5.4.3.-1: Genetische Alterationen der Peniskarzinome mit Lymphknotenmetastasen einschließlich Nummer des untersuchten Tumors, Alter zum Zeitpunkt der Erstdiagnose, der Histologie und der Anzahl der von Veränderungen betroffenen Chromosomen.

Nr.	Alter	T-Stadium	Differenzierung	Verluste - Chromosomen	$\Sigma$ Verluste	Zugewinne - Chromosomen	$\Sigma$ Zugewinne	$\Sigma$ V+Z	$\Sigma$ alterierte Chromosomen
6	78	T3	G3	dim (Y)	2		0	2	1
7	73	T2	G2	dim (3p12p22, 7q32.2qter, 10p)	3	enh (Y)	2	5	4
8	51	T3	G2	dim (10q22qter, 15q21qter)	2	enh (5, 8q, 9, 13q22qter)	6	8	6
10	76	T2	G3	dim (8p21pter)	1	enh (Y)	2	3	2
14	57	T1	G2	dim (8p)	1	enh (8q, 9)	3	4	2
15	79	T2	G1	dim (7q24qter)	1	enh (1, 3q, 6, 9)	7	8	5
18	58	T3	G3	dim (10q23qter)	1	enh (6, 10p)	3	4	2
21	68	T2	G3	dim (10q24qter, 16,17p)	4		0	4	3
23	81	T2	G3	dim (8p, 18q)	2	enh (3q24qter, 5p, 8q, 11)	5	7	5
25	58	T3	G1	dim (3p, 8p, 10p, 15q, 17p, 18q, Xp, Y)	9	enh (8q, 9, 13q)	4	13	10
29	35	T2	G1		0	enh (8q, 12)	3	3	2

Von einem Verlust eines ganzen Chromosoms ist das Y-Chromosom in den Fällen Nr. 6 und 25 sowie das Chromosom 16 im Fall Nr. 21 betroffen. Zugewinne kompletter Chromosomen zeigen am häufigsten Chromosom 9 in den Fällen Nr. 8, 14, 15, und 25; wiederum das Y-Chromosom in den Fällen Nr. 7 und 10 sowie Chromosom 5 im Fall Nr. 8; Chromosom 1 und 6 im Fall Nr. 15; Chromosom 6 ebenfalls im Fall Nr. 18; Chromosom 11 im Fall Nr. 23 und Chromosom 12 im Fall Nr. 29.

Die Abbildungen 5.4.3.-1 bis 5.4.3.-3 zeigen anhand des Peniskarzinoms Nr. 21 einen Fall, bei dem die CGH-Analyse ausschließlich Verluste chromosomaler Abschnitte ergab. Die Verluste auf den Chromosomen/-armen 10q, 16 und 17p sind entsprechend dem überwiegend roten Fluoreszenzsignal und der Auslenkung des mittleren Fluoreszenzprofils nach links über die Grenzlinie des Schwellenwertes für genetische Verluste mit roten Pfeilen markiert.

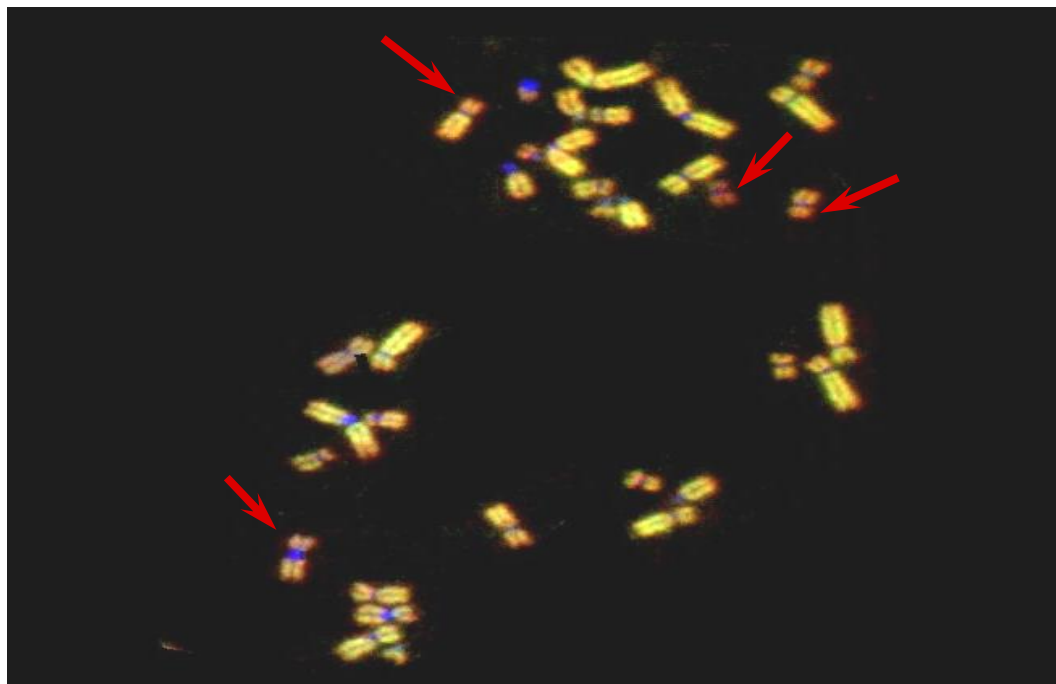


Abbildung 5.4.3.-1: Metaphasenplatte des Peniskarzinoms Nr. 21; Verluste – rote Pfeile

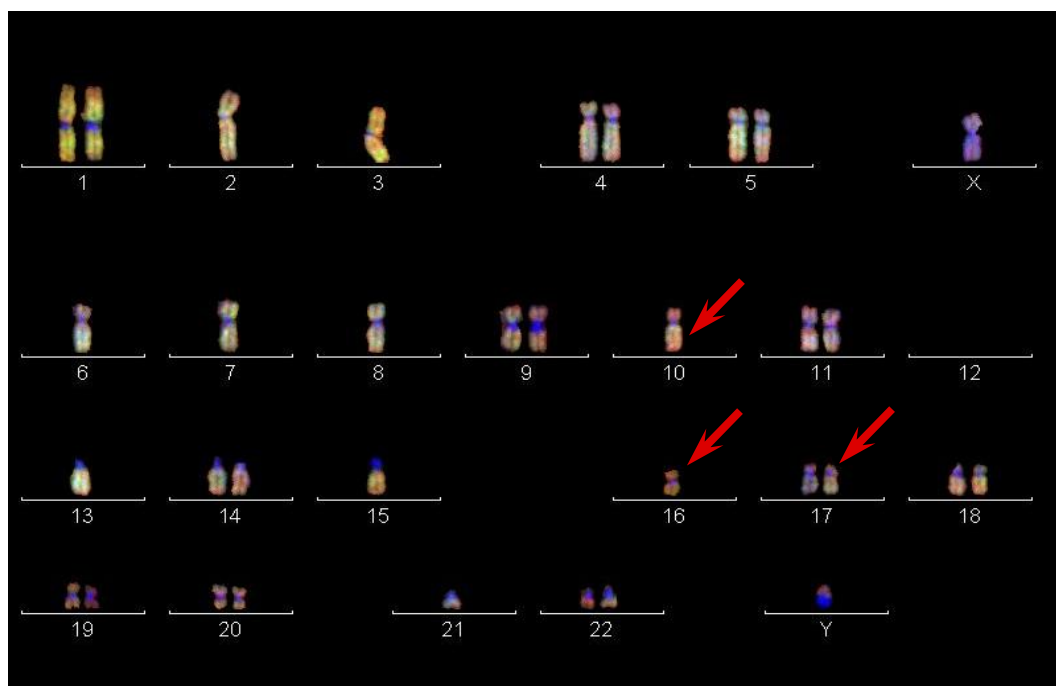


Abbildung 5.4.3.-2: Fluoreszenzkaryogramm des Peniskarzinoms Nr. 21; Verluste – rote Pfeile

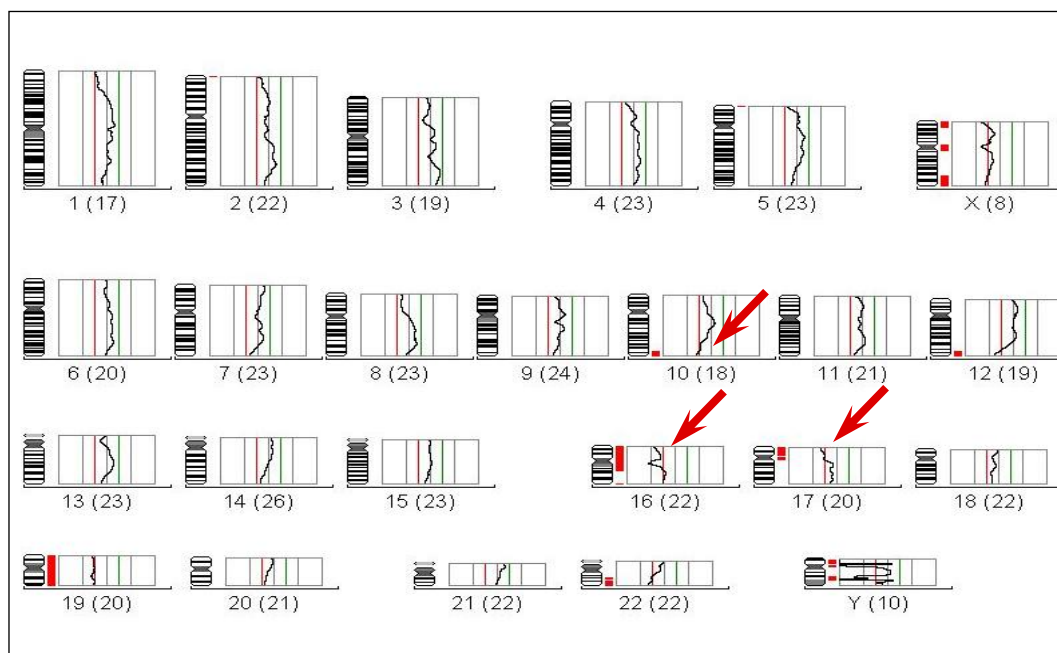


Abbildung 5.4.3-3: Mittlere Fluoreszenzprofile des Peniskarzinoms Nr. 21

In den einzelnen Tumorstadien findet sich im Mittel mit zunehmender T-Kategorie eine steigende Anzahl genetischer Veränderungen je Tumor. So zeigt der einzige T1-Tumor ( $n=1$ ) mit lymphogener Metastasierung 4 chromosomale Aberrationen, Tumoren im Stadium T2 ( $n=6$ ) durchschnittlich 5 - und T3-Tumoren ( $n=4$ ) 6,8 genetische Veränderungen. Betrachtet man die Zahl der Aberrationen je Tumor bezogen auf das Grading, sinkt mit zunehmender Entdifferenzierung im Schnitt die Zahl der genetischen Veränderungen im einzelnen Tumor. Während G1-Tumoren ( $n=3$ ) durchschnittlich 8 chromosomale Aberrationen erkennen lassen, finden sich bei G2-Tumoren ( $n=3$ ) noch 5,7 - und in G3-Karzinomen ( $n=5$ ) noch 4 genetische Veränderungen pro Fall. Die Abbildungen 5.4.3-4 und 5.4.3-5 veranschaulichen diese Verhältnisse.

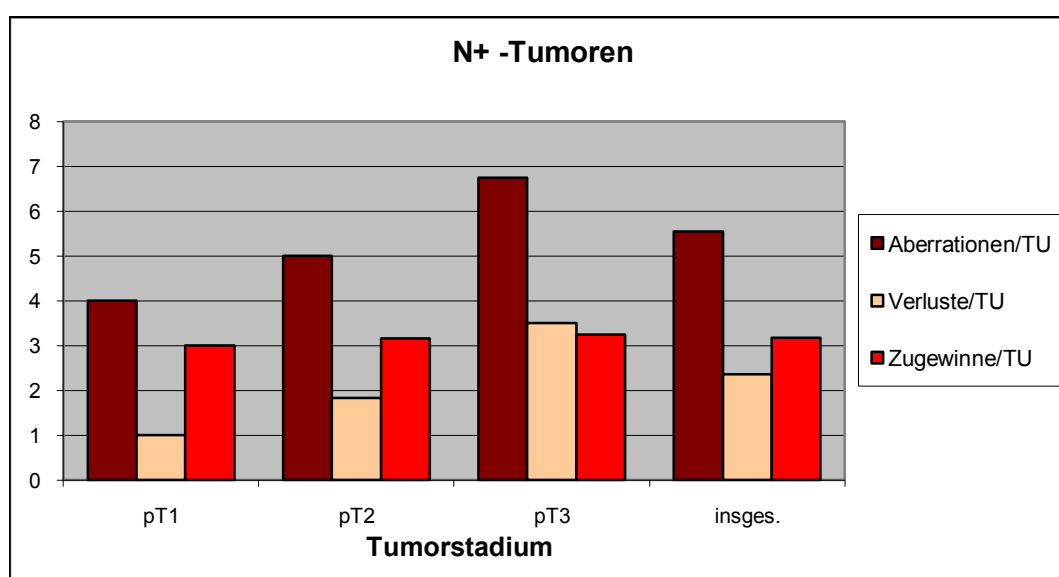


Abbildung 5.4.3-4: Durchschnittliche Zahl chromosomaler Aberrationen je Tumor in den einzelnen bzw. allen Tumorstadien; bei nachgewiesener Lymphknotenmetastasierung

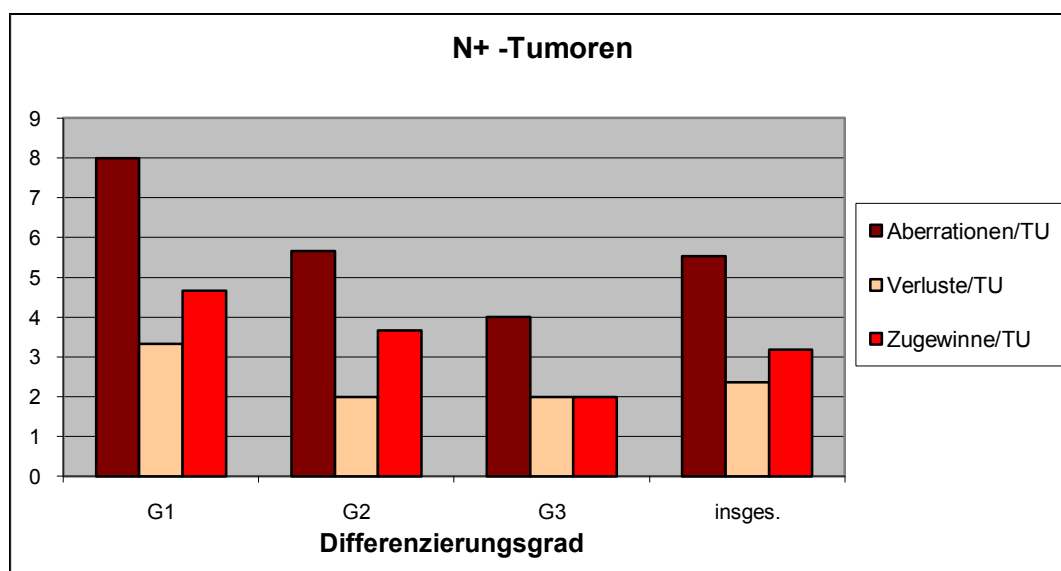


Abbildung 5.4.3.-5: Durchschnittliche Zahl chromosomaler Aberrationen je Tumor in den einzelnen bzw. allen Differenzierungsgraden; bei nachgewiesener Lymphknotenmetastasierung

Vergleicht man die genannten Mittelwerte mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Testes für unabhängige Stichproben, so ergibt sich eine schwache statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen G1- und G3-Tumoren.

Gleichzeitig zeigt das Verhältnis zwischen Zugewinnen und Verlusten eine relative Zunahme der Gewinne gegenüber Verlusten von einer G1-Differenzierung zur G2-Differenzierung und ist in der Gruppe der G3-Tumoren gleich.

#### 5.4.4. Häufigkeitsverteilung der Aberrationen bei Tumoren mit Lymphknotenmetastasen

Die folgenden Graphiken zeigen die Häufigkeitsverteilungen der spezifischen genetischen Veränderungen bei Tumoren mit nachgewiesener Lymphknotenmetastasierung in Korrelation zu Tumorstadium und Differenzierungsgrad. Jedoch ließen sich auch hier wie bei den N0-Tumoren die Unterschiede zwischen den Aberrationshäufigkeiten der einzelnen Gruppen statistisch nicht sichern (exakter Test nach Fisher).

Abbildung 5.4.4.-1 lässt erkennen, dass die untersuchten Tumoren mit Lymphknotenmetastasen Aberrationen an deutlich weniger Chromosomen aufweisen als in der Gruppe der Tumoren ohne Lymphknotenmetastasen. Mehrfach von genetischen Veränderungen betroffen sind die Chromosomen 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 13, 15, 17, 18 und das Y-Chromosom. Zugewinne am Chromosomenarm 8q treten mit 45,5% am häufigsten auf, gefolgt von Verlusten auf 8p in 35,4% und 10q in 27,3%. Der Verlust des kompletten Y-Chromosoms findet sich in 2 Fällen (18,2%) und ein Verlust von Chromosom 16 in einem Fall (9,1%). Von den deutlich häufiger nachweisbaren Zugewinnen ganzer Chromosomen (n=12) entfallen allein 4 auf das Chromosom 9 (35,4%), je 2 auf das Chromosom 6 bzw. das Y-Chromosom (je in 18,2%) und in jeweils einem Fall sind die Chromosomen 1, 5, 11 und 12 betroffen (je 9,1%).

Eine tabellarische Aufstellung aller Verluste und Zugewinne der N+-Tumoren findet sich im Kapitel 5.4.3. (vgl. Tab. 5.4.3.-1).

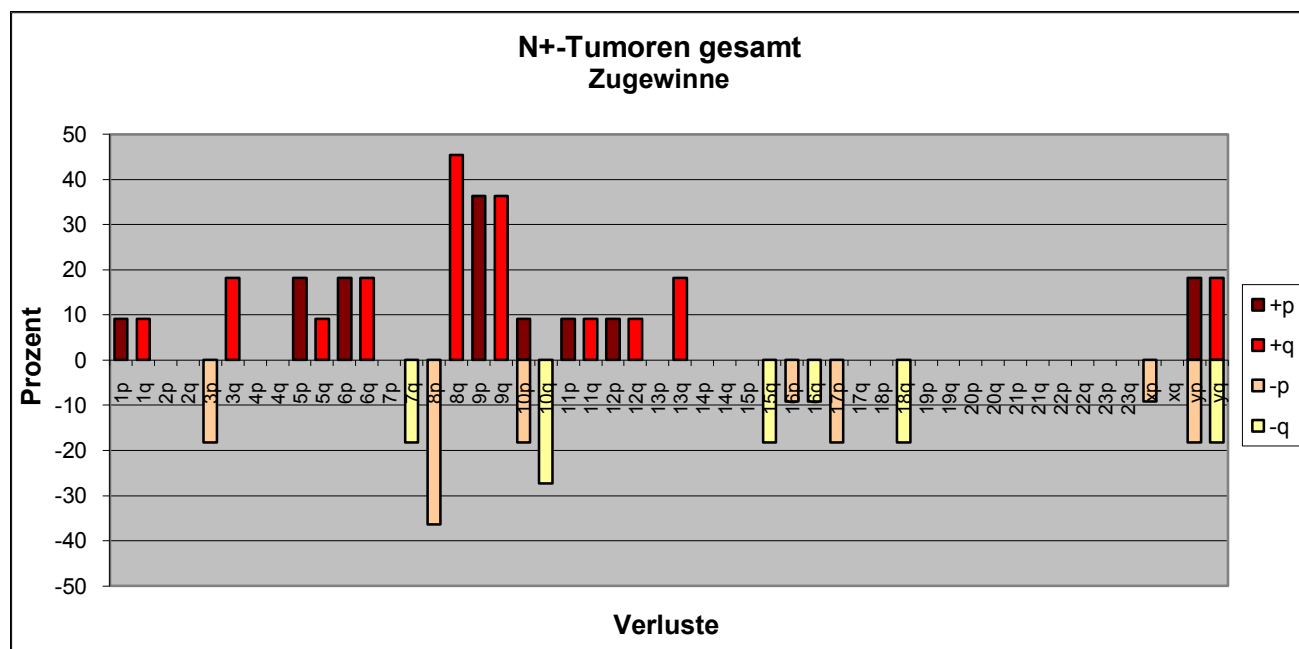


Abbildung 5.4.4.-1: Häufigkeit genetischer Aberrationen (Verluste/Zugewinne) auf den einzelnen Chromosomenarmen bei allen untersuchten Tumoren mit Lymphknotenmetastasen (N+) mit auffälliger CGH-Analyse (n=11)

Aus den Abbildungen 5.4.4.-2 bis 5.4.4.-4 ist das Auftreten chromosomaler Veränderungen in den einzelnen Tumorstadien der Lymphknoten-positiven Peniskarzinome ersichtlich.

Da für die Gruppe der T1-Tumoren nur ein Präparat untersucht werden konnte, lässt sich hier keine Aussage über die Häufigkeit genetischer Veränderungen treffen. Es kann lediglich festgestellt werden, dass der Verlust von 8p sowie der Zugewinn von 8q und ein kompletter Zugewinn des Chromosoms 9 den Ergebnissen der CGH-Analysen entsprechen, wie sie auch für andere Gruppen nachweisbar sind.

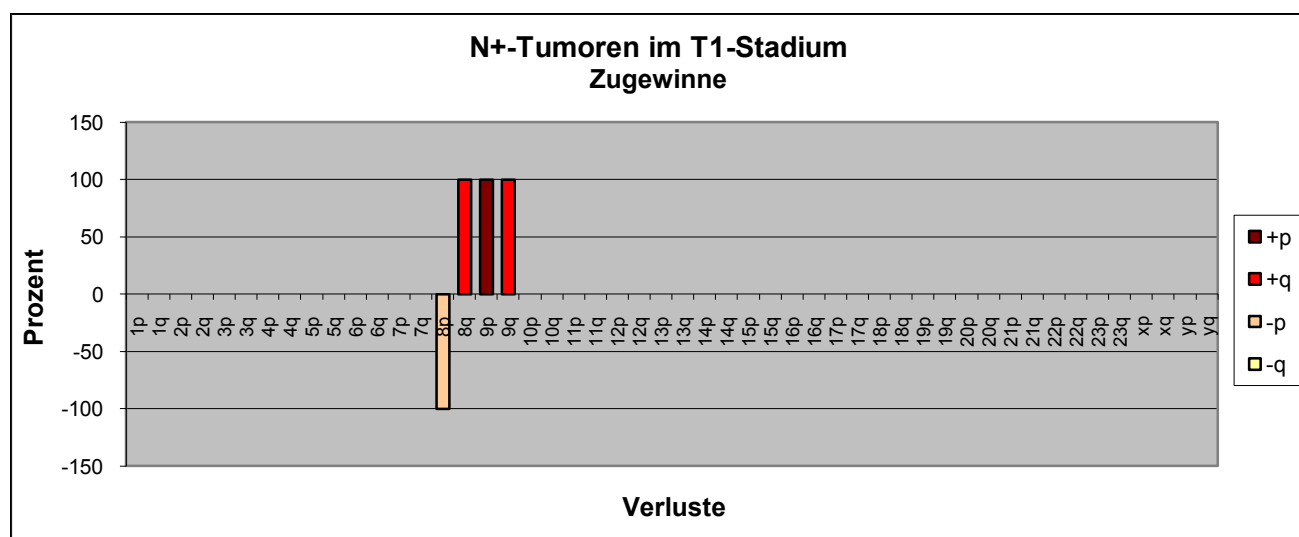


Abbildung 5.4.4.-2: Aberrationen bei N+-Tumoren im T1-Stadium (n=1)

Bei Tumoren im Stadium T2 lassen sich mit 33,3% am häufigsten Verluste an den Chromosomen- Armen 7q und 8p zeigen, während in gleicher Frequenz Zugewinne von 3q und 8q zu finden sind. Darüber hinaus kommen ebenfalls in 33,3% Zugewinne des gesamten Y-Chromosoms vor. Die übrigen Zugewinne eines ganzen Chromosoms und der Verlust eines Chromosoms betreffen die Chromosomen 1, 6, 9, 11, 12 und respektive 16 in jeweils nur einem Fall dieser Gruppe.

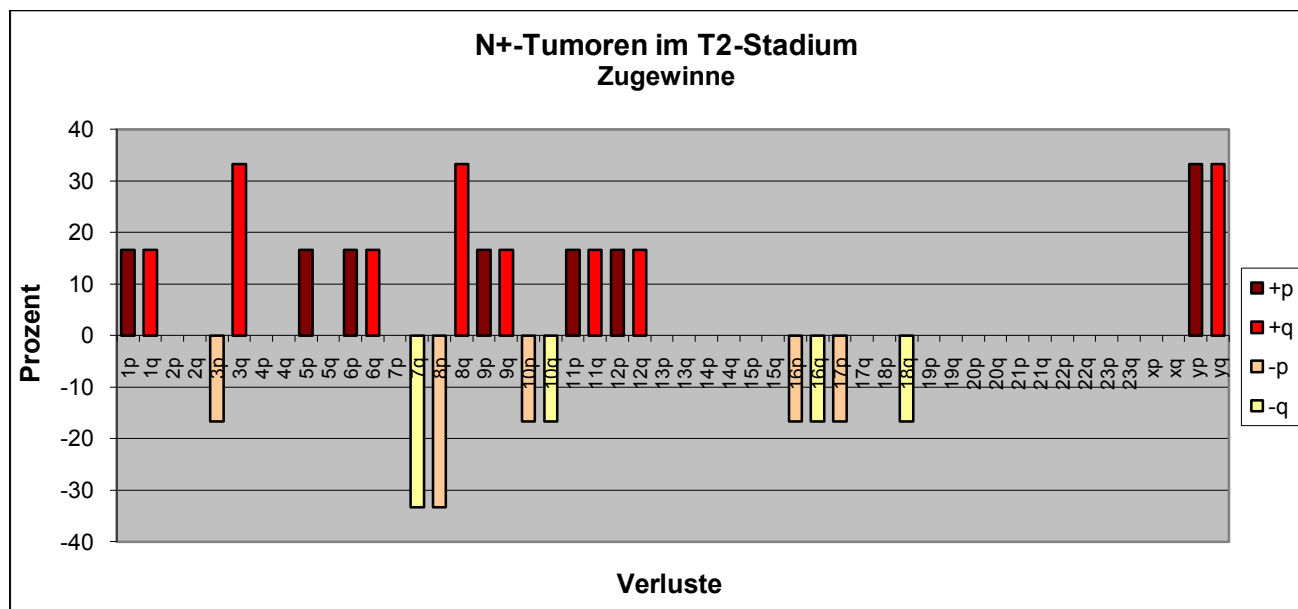


Abbildung 5.4.4.-3: Aberrationen bei N+-Tumoren im T2-Stadium (n=6)

Die häufigsten Veränderungen der T3-Tumoren sind in 50% Verluste auf 10q und 15q ebenso wie Zugewinne auf 8q und 13q. Auch der komplette Verlust des Y-Chromosoms und der Zugewinn von Chromosom 9 lassen sich in der Hälfte der Fälle zeigen. Zudem kommen vereinzelt Verluste der Chromosomenarme 3p und 8p vor, wie sie gehäuft auch in anderen Gruppen zu beobachten sind.

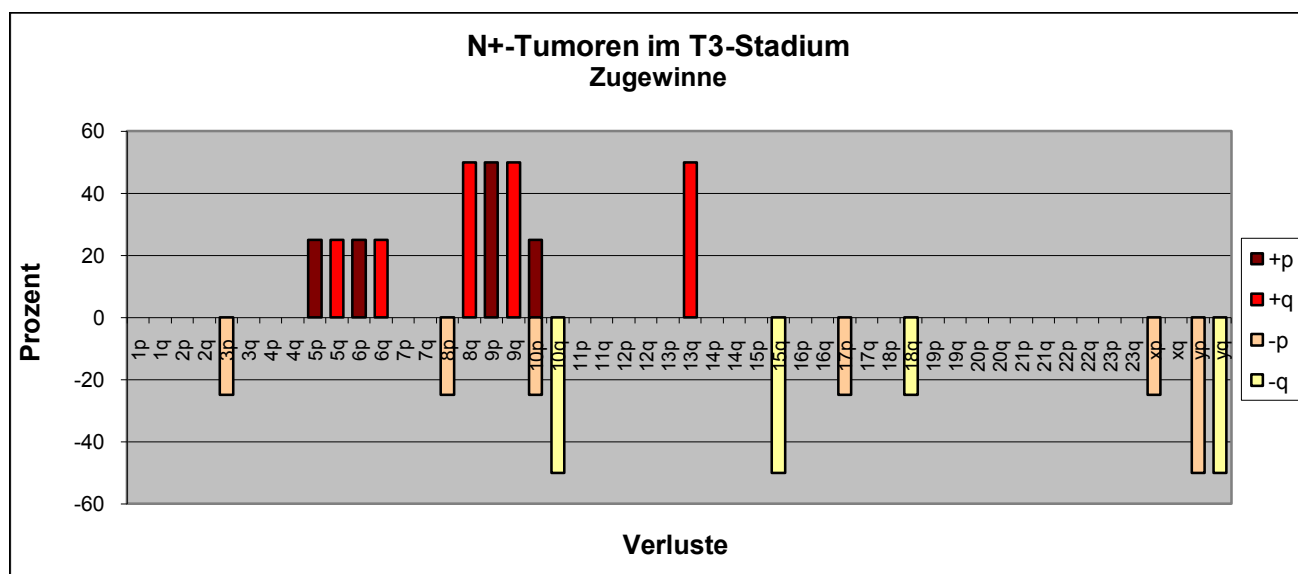


Abbildung 5.4.4.-4: Aberrationen bei N+-Tumoren im T3-Stadium (n=4)

Bei der Betrachtung der genetischen Veränderungen in Abhängigkeit von der Differenzierung der untersuchten Peniskarzinome mit lymphogener Metastasierung fällt im Gegensatz zu N0-Tumoren eine relative Abnahme der Aberrationen pro Tumor mit zunehmender Entdifferenzierung auf. Zugewinne und Verluste chromosomaler Abschnitte halten sich dabei nahezu die Waage.

Durch geringe Fallzahlen der einzelnen Gruppen wird die Aussagefähigkeit jedoch wiederum reduziert.

Aus den graphischen Darstellungen in den Abbildungen 5.4.4.-5 bis 5.4.4.-7 gehen die chromosomalen Veränderungen in den einzelnen Differenzierungsgraden der N+-Tumoren hervor.

In der Gruppe der G1-Tumoren präsentieren sich die Chromosomen 9 mit einem kompletten Zugewinn und 8 mit Zugewinnen am q-Arm am häufigsten alteriert (66,6% der Fälle).

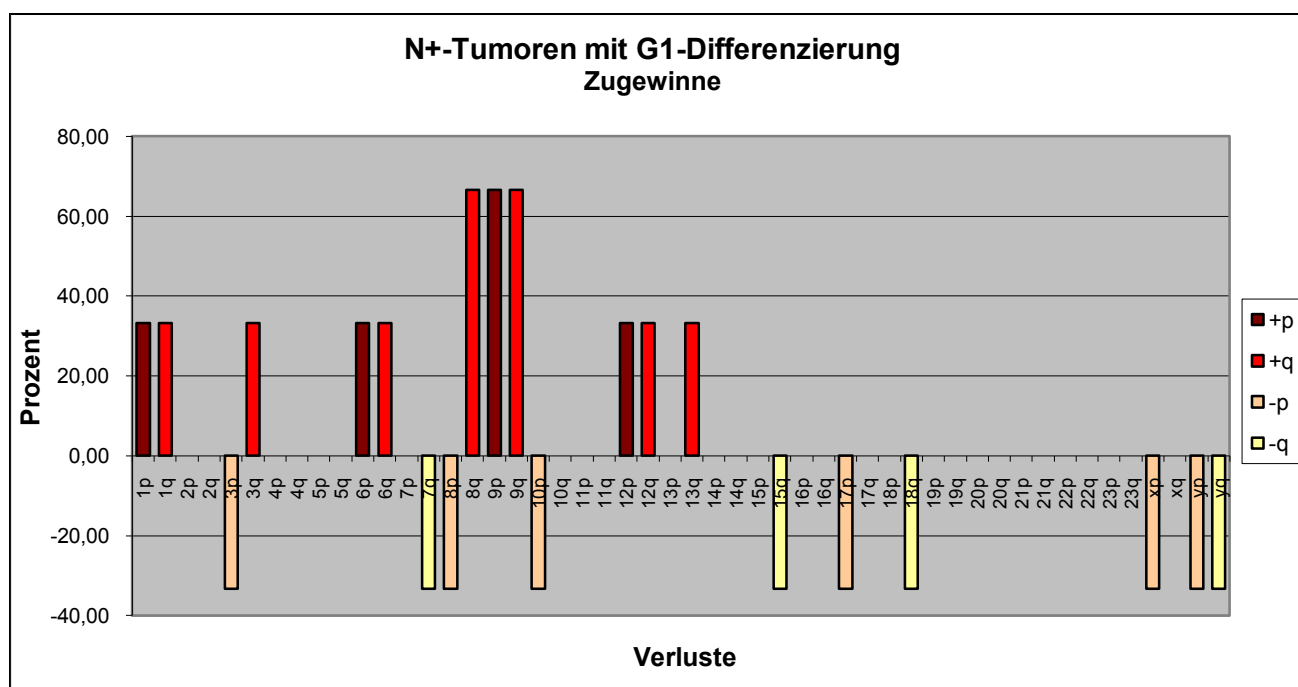


Abbildung 5.4.4.-5: Aberrationen bei N+-Tumoren mit G1-Differenzierung (n=3)

Gleiches gilt auch für die Gruppe der Tumoren mit G2-Differenzierung, die ebenfalls nur aus 3 Fällen besteht und dabei in 2 dieser Fälle (66,6%) einen Zugewinn von 8q sowie des gesamten Chromosoms 9 zeigt. Die übrigen Aberrationen lassen sich jeweils nur in einem der untersuchten Fälle mit dieser Tumordifferenzierung nachweisen. Unter anderen sind hier Verluste von 8p und 10q zu nennen.

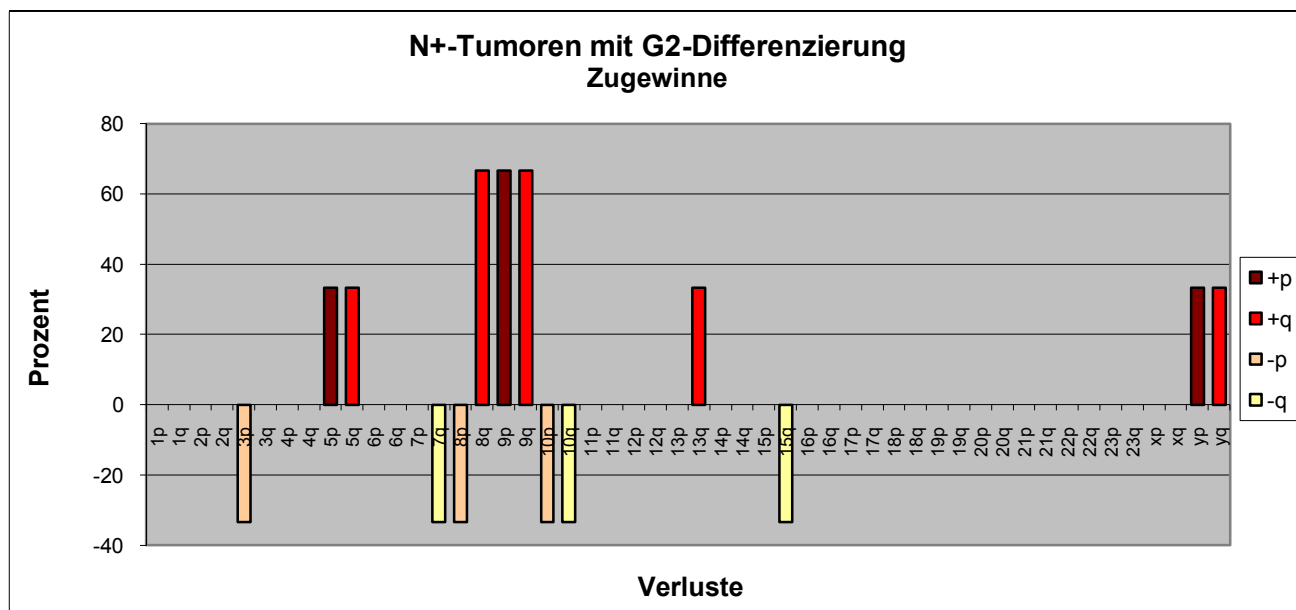


Abbildung 5.4.4.-6: Aberrationen bei N+-Tumoren mit G2-Differenzierung (n=3)

Die letzteren Veränderungen -8p und -10q stellen mit je 40% auch die häufigsten Aberrationen in der Gruppe der G3-differenzierten Tumoren dar. Ähnlich wie in den anderen Gruppen der N+-Tumoren konnte ein Zugewinn von 8q, allerdings nur in einem Fall, detektiert werden. Neben dem Y-Chromosom-Verlust in einem Fall findet sich gleichzeitig ein vollständiger Zugewinn des Y-Chromosoms in einem zweiten Fall dieser Gruppe. Alle übrigen chromosomalen Veränderungen erscheinen aufgrund ihres singulären Vorkommens von untergeordneter Bedeutung zu sein. Eine Beteiligung des Chromosoms 9 konnte hier entgegen den CGH-Ergebnissen aller anderen lymphogen metastasierten Peniskarzinome nicht nachgewiesen werden.

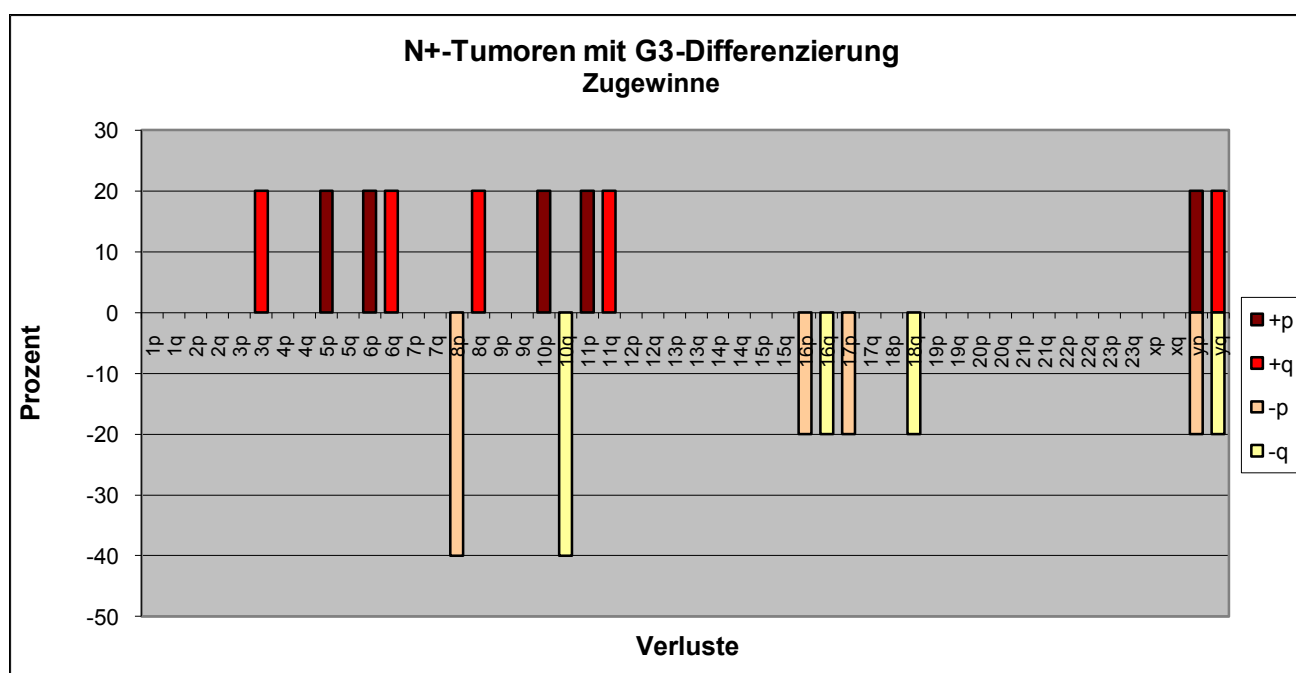


Abbildung 5.4.4.-7: Aberrationen bei N+-Tumoren mit G3-Differenzierung (n=5)



### 5.5. Vergleich der Ergebnisse beider Patientengruppen – ohne/mit Lymphknotenmetastasen

Ein Vergleich der Gesamthäufigkeiten der genetischen Veränderungen zwischen Tumoren ohne – und solchen mit Lymphknotenmetastasen führt zu der Erkenntnis, dass die durchschnittliche Zahl chromosomaler Aberrationen je Tumor in der Gruppe der N0-Tumoren (7,1) deutlich höher liegt als in der Gruppe der N+-Tumoren (5,5). Dieser Unterschied ließ sich jedoch nicht statistisch sichern (Mann-Whitney-U-Test bei unabhängigen Stichproben)

Während bei den Tumoren ohne Lymphknotenmetastasen Gleichverteilung zwischen Verlusten und Zugewinnen (3,6 Veränderungen je Tumor) genetischen Materials besteht, überwiegen in den Tumoren mit Lymphknotenmetastasen die Zugewinne gegenüber den Verlusten. Hier stehen pro Tumor 2,4 Verluste 3,2 Zugewinne gegenüber. Das entspricht einem Verhältnis von 3:4 respektive. Die Abbildung 5.5.-1 verdeutlicht diese Verhältnisse in Form einer Graphik.

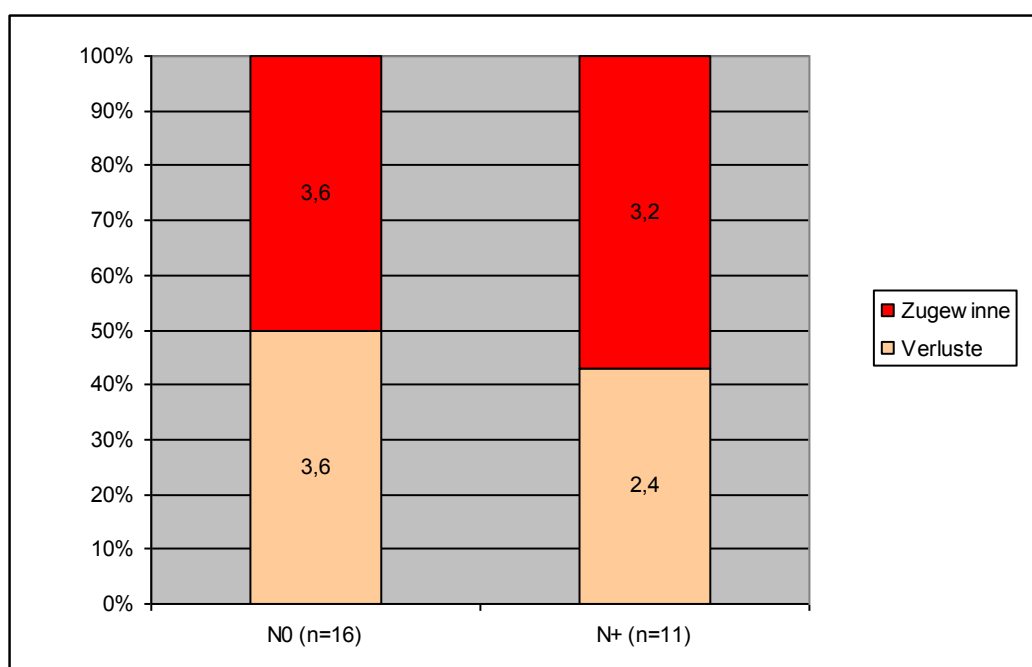


Abbildung 5.5.-1: Verhältnis von Verlusten und Zugewinnen genetischen Materials in Bezug auf die lymphogene Metastasierung eines Peniskarzinoms

Betrachtet man die einzelnen Tumorstadien und Differenzierungsgrade, zeigt sich folgendes Bild: Während in der Gruppe der N0-Tumoren in allen 3 Tumorstadien jeweils eine nahezu konstante Zahl von Aberrationen pro Tumor zu finden ist, besteht in der Gruppe der N+-Tumoren eine positive Proportionalität zwischen steigendem Tumorstadium und der Anzahl genetischer Veränderungen pro Tumor (vgl. Abb. 5.4.1.-4 und 5.4.3.-4). Gleiches gilt für die Anzahl der pro Tumor veränderten Chromosomen. Die Unterschiede sind jedoch zu klein, um eine statistische Signifikanz abzuleiten.

Bezüglich der Tumordifferenzierung steigen bei den Tumoren ohne Lymphknotenmetastasen (N0-) die Aberrationen je Tumor mit zunehmender Entdifferenzierung an. Aus dieser Betrachtung wurde der einzelne

Tumor mit G2-3-Differenzierung, für den die CGH-Analyse allein 12 genetische Veränderungen zeigt, ausgeschlossen. Im Gegensatz dazu findet sich in der Gruppe der Lymphknotenmetastase-positiven Peniskarzinome eine umgekehrte Proportionalität zwischen höhergradiger Differenzierung und der Zahl genetischer Veränderungen (vgl. Abb. 5.4.1.-5 und 5.4.3.-5). Auch dies gilt wieder für die Anzahl der pro Tumor veränderten Chromosomen in gleicher Weise. Für die N0-Tumoren hat dies erneut keine statistische Relevanz. Allerdings scheint für die N+-Tumoren der Unterschied in der Anzahl der Aberrationen bei G1-Tumoren gegenüber G3-Tumoren signifikant zu sein (Mann-Whitney-U-Test bei unabhängigen Stichproben).

Tabelle 5.5.-1 fasst die beschriebenen Korrelationen in Zahlen zusammen.

Tabelle 5.5.-1: Zahl genetischer Alterationen und der veränderten Chromosomen insgesamt und je Tumor in Korrelation zu den Tumorstadien und einzelnen Differenzierungsgraden getrennt nach Tumoren ohne – (N0) und mit – (N+) Lymphknotenmetastasen

N0-Tumoren	T-/G-Kategorie	Anzahl	$\sum$ Chromosomen	$\sum$ Aberrationen	Chromosomen/Tumor	Aberrationen/Tumor
	T1	9	47	65	5,22	7,22
T2	5	29	34	5,8	6,8	
T3	2	12	15	6	7,5	
G1	2	7	12	3,5	6	
G2	10	54	65	5,4	6,5	
(G2-3)	(1)	(8)	(12)	(8)	(12)	
G3	3	19	25	6,33	8,33	
$\sum$	16	88	114	5,5	7,125	
N+-Tumoren	T-/G-Kategorie	Anzahl	$\sum$ Chromosomen	$\sum$ Aberrationen	Chromosomen/Tumor	Aberrationen/Tumor
	T1	1	2	4	2	4
T2	6	21	30	3,5	5	
T3	4	19	27	4,75	6,75	
G1	3	17	24	5,66	8	
G2	3	12	17	4	5,66	
G3	5	13	20	2,6	4	
$\sum$	11	42	61	3,81	5,54	

Lässt man die Metastasierung außer Acht und korreliert die Tumorstadien insgesamt mit der Zahl genetischer Alterationen, so findet sich kein Unterschied zwischen den einzelnen T-Kategorien. Sie bewegen sich im Mittel um 6,5 - bzw. 3,1 Verluste und 3,4 Zugewinne pro Tumor. Die Graphik 5.5.-2 verdeutlicht die Verhältnisse.

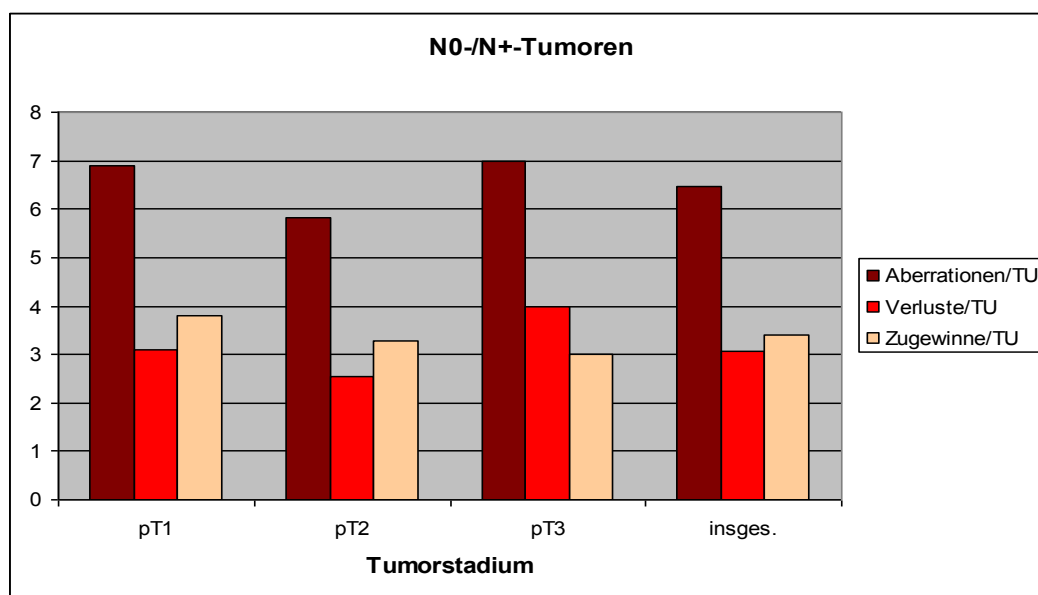


Abbildung 5.5.-2: Durchschnittliche Zahl chromosomaler Aberrationen je Tumor in den einzelnen bzw. allen Tumorstadien; unabhängig von einer Metastasierung

Wendet man die gleiche Betrachtungsweise für die Tumordifferenzierung an, so sinkt die durchschnittliche Zahl der chromosomalen Aberrationen pro Tumor mit zunehmender Entdifferenzierung der Tumoren von 7,2 über 6,3 auf 5,6. Das widerspiegelt die Situation der N+-Tumoren, ist aber statistisch allenfalls als Trend zu bewerten, unabhängig davon, ob man dabei den einzelnen G2-3-Tumor mit einfließen lässt oder nicht. Einer Veranschaulichung dient die Abbildung 5.5.-3.

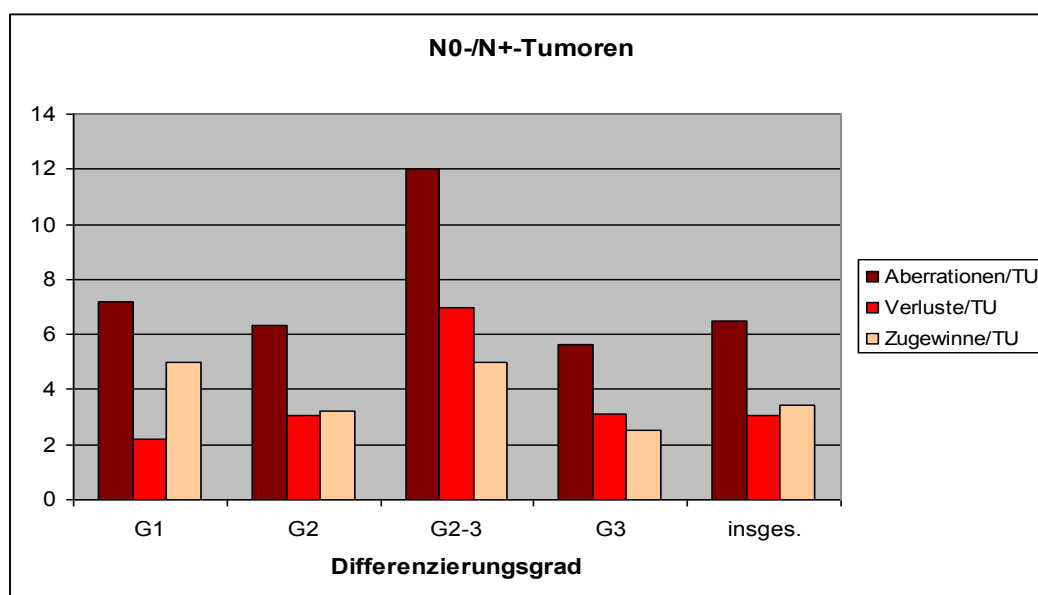


Abbildung 5.5.-3: Durchschnittliche Zahl chromosomaler Aberrationen je Tumor in den einzelnen bzw. allen Differenzierungsgraden; unabhängig von einer Metastasierung

## 5.6. Spezifische chromosomale Veränderungen beim Plattenepithelkarzinom des Penis

Die beschriebenen Ergebnisse zeigen einige spezifische chromosomale Veränderungen für Plattenepithelkarzinome am Penis.

In der folgenden Graphik 5.6.-1 ist die Häufigkeitsverteilung dieser spezifischen genetischen Veränderungen beider Gruppen (ohne-/mit Lymphknotenmetastasen) für alle Tumoren getrennt nach Zugewinnen und Verlusten dargestellt. Die meisten Aberrationen treten etwas häufiger in der Gruppe der Patienten ohne Lymphknotenmetastasen auf. Es lassen sich jedoch auch Veränderungen auf einzelnen Chromosomen finden, die jeweils nur in einem der beiden Patientenkollektive nachweisbar sind.

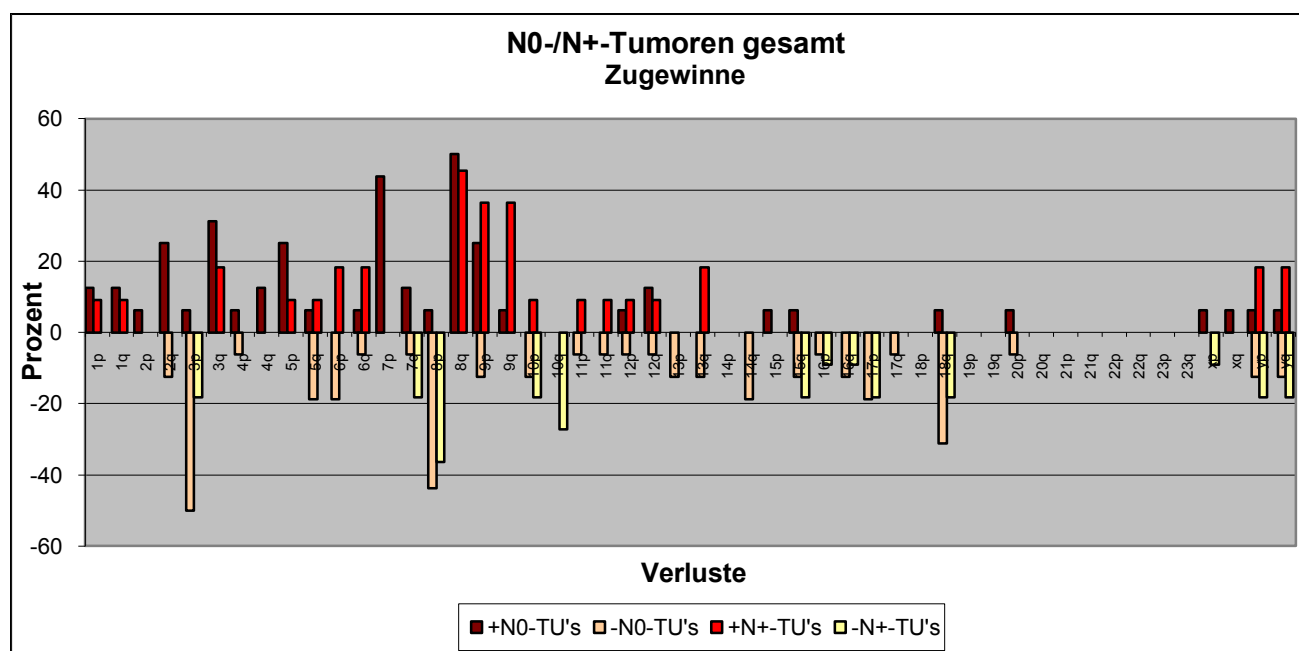


Abbildung 5.6.-1: Chromosomale Aberrationen bei N0- (n=16) und N+-Tumoren (n=11)

Am häufigsten finden sich für beide Gruppen gleichzeitig die folgenden Aberrationen in absteigender Frequenz: Zugewinne auf 8q (50,0% bzw. 45,5%) gefolgt von Verlusten auf 3p (50,0% bzw. 18,2%), Verluste auf 8p (43,8% bzw. 36,4%), Zugewinne auf 3q (31,3% bzw. 18,2%), Verluste auf 18q (31,3% bzw. 18,2%), Zugewinne auf 9p (25,0% bzw. 36,4%) und Zugewinne auf 9q (6,3% bzw. 36,4%). Ausgenommen die Veränderungen auf dem Chromosom 9 sind dabei die Alterationen der N0-Tumoren stets häufiger nachzuweisen. Die in Klammern stehenden Prozentzahlen kennzeichnen jeweils an erster Stelle die Lymphknoten-negativen vor den Lymphknoten-positiven Tumoren.

Die größten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen konzentrieren sich auf 7p, hier sind in 45,8% ausschließlich N0-Tumoren von Zugewinnen betroffen. Auch 2q zeigt ausschließlich Zugewinne in 25% und Verluste in 12,5% bei den N0-Tumoren, während Veränderungen im Sinne von Verlusten in 27,3% auf 10q nur bei N+-Tumoren sichtbar werden. Ebenfalls auffällig sind die Unterschiede der Verluste am p-Arm von Chromosom 3 und der Zugewinne am q-Arm von Chromosom 9 in der o.g. Häufung für jede Gruppe. Bzgl. des Chromosoms 9 handelt es sich in der N+-Gruppe dabei ausschließlich um Zugewinne des gesamten

Chromosoms, während in der Serie der N0-Tumoren immer nur einzelne Chromosomenarme betroffen sind. Insgesamt zeigen 9 der 11 Fälle mit lymphogener Metastasierung derartige, ein ganzes Chromosom betreffende, Zugewinne und nur 6 von 16 Fällen ohne Lymphknotenmetastasen den Zugewinn ganzer Chromosomen. Verluste kompletter Chromosomen finden sich für beide Gruppen in nahezu gleicher Häufung in 4 Fällen der N0-Patienten und in 3 Fällen im N+-Kollektiv (vgl. Abschnitt 5.4.1. und 5.4.3.).

Letztlich kommt die überwiegende Zahl der chromosomalen Alterationen insgesamt nur selten (in weniger als 33% der Fälle) in den einzelnen Kategorien vor. Die jeweils in häufiger als einem Drittel der Fälle nachzuweisenden Aberrationen gibt Tabelle 5.6.-1 wieder.

Tabelle 5.6.-1: Verteilung der häufigsten chromosomalen Aberrationen (>33,3%) auf die einzelnen Tumorstadien und Differenzierungsgrade getrennt nach Tumoren ohne - /mit Lymphknotenmetastasen

T-Stadium	chromosomale Aberration		Tumor-grading	chromosomale Aberration	
	N0-Tumoren	N+-Tumoren		N0-Tumoren	N+-Tumoren
T1	+2q, -3p, +3q, -8p, +8q, +9p	-8p, +8q, +9p, +9q	G1	+2p, +2q, +3q, -6p, +6q, +7p, +7q, +8p, +8q, +9p, +12p, +12q	+8q, +9p, +9q
T2	-2q, -3p, +7p, +7q, -8p, +8q	+3q, -7q, -8p, +8q, +Y	G2	-3p, +7p, +8q	+8q, +9p, +9q
			G2-3	+2q, -3p, +3q, +5p, +5q, +7p, -8p, +8q, -10p, -18q, -Y	
T3	-3p, +3q, +4p, +4q, +7p, +7q, -8p, -11p, -13q, -15q, -17p, -18q, -20p, - Y	+8q, +9p, +9q, -10q, +13q, -15q, -Y	G3	+1q, -3p, -8p, -11q	-8p, -10q

Detailliert wurden die genetischen Aberrationen bereits in den Abschnitten 5.4.2. und 5.4.4. dargestellt.

Bei den Lymphknotenmetastasen-positiven Tumoren kann im Vergleich zu den Peniskarzinomen ohne Lymphknotenmetastasen zusätzlich zu allen häufig auftretenden genetischen Veränderungen (in >20% der Fälle insgesamt) auch ein Verlust auf dem Chromosomenarm 10q und ein Zugewinn auf 9q beobachtet werden, während sich andere Alterationen im metastasierten Stadium nicht mehr oder nur noch sehr vereinzelt nachweisen lassen. Letzteres betrifft in erster Linie die Chromosomen 1, 2, 4, 5, 7p, 14, 17 und 20.

## 5.7. Korrelation zwischen Überlebenszeit und chromosomalen Veränderungen beim Peniskarzinom

Für die Auswertung der Überlebenszeiten wird die Lebensdauer der Patienten vom Zeitpunkt der Diagnose bis zum tumorbedingten Ableben zugrunde gelegt. Dabei geht die reale Zeit in vollendeten Lebensmonaten inklusive eines angefangenen Monats in die Berechnung ein, wenn die Patienten innerhalb von 5 Jahren tumorbedingt verstarben bzw. wird mit > 60 Monaten veranschlagt, wenn sie länger überlebten.

Nicht tumorbedingte Todesfälle innerhalb der ersten 5 Jahre nach Diagnose traten im Rahmen des untersuchten Kollektivs nicht auf. Die Tabelle 5.7.-1 gibt eine Übersicht der Überlebenszeiten aller Patienten

mit - und ohne Lymphknotenmetastasen mit den dazugehörigen genetischen Veränderungen, aufgeteilt in Verluste und Zugewinne, einschließlich der Anzahl veränderter Chromosomen.

Tabelle 5.7.-1: Überlebenszeiten aller untersuchten Fälle mit den entsprechenden Histologien und genetischen Veränderungen, exclusive der Fälle ohne genetische Veränderungen (hell unterlegt – Fälle ohne Lymphknotenmetastasen; dunkel unterlegt – Fälle mit Lymphknotenmetastasen)

Nr.	Überleben [Monate]	Histologie	$\Sigma$ Verluste	$\Sigma$ Verlust-Chromosomen	$\Sigma$ Zugewinne	$\Sigma$ Zugewinn-Chromosomen	$\Sigma$ V+Z	Anzahl veränderter Chromosomen
1	> 60	T1 G1 N0	1	1	1	1	2	1
2	> 60	T2 G2 N0	6	6	5	3	11	8
4	16	T3 G2 N0	1	1	5	3	6	4
6	25	T3 G3 N+	2	1	0	0	2	1
7	> 60	T2 G2 N+	3	3	2	1	5	4
8	> 60	T3 G2 N+	2	2	6	4	8	6
10	12	T2 G3 N+	1	1	2	1	3	2
12	29	T1 G3 N0	1	1	2	1	3	2
13	40	T1 G2 N0	4	3	5	4	9	7
14	16	T1 G2 N+	1	1	3	2	4	2
15	>60 (61)	T2 G1 N+	1	1	7	4	8	5
16	48	T1 G1 N0	0	0	10	6	10	6
17	>60 (61)	T1 G3 N0	5	4	8	7	13	9
18	>60 (88)	T3 G3 N+	1	1	3	2	4	2
19	31	T1 G2 N0	4	4	3	3	7	5
20	50	T2 G2 N0	5	5	5	5	10	8
21	5	T2 G3 N+	4	3	0	0	4	3
22	26	T3 G3 N0	9	8	0	0	9	8
23	4	T2 G3 N+	2	2	5	4	7	5
24	>60 (63)	T2 G2 N0	1	1	3	3	4	4
25	9	T3 G1 N+	9	8	4	3	13	10
26	>60 (75)	T1 G2 N0	3	3	0	0	3	3
27	>37 (38)	T2 G2 N0	3	3	1	1	4	3
28	60	T1 G2-3 N0	7	6	5	5	12	8
29	>60 (108)	T2 G1 N+	0	0	3	2	3	2
31	39	T1 G2 N0	5	5	1	1	6	6
33	>60 (99)	T2 G2 N0	2	2	3	3	5	5

Betrachtet man nun die Überlebenszeiten im Hinblick auf die chromosomalen Aberrationen, so scheinen tendenziell Fälle mit einer höheren Zahl von genetischen Veränderungen auch von einer längeren Lebenszeit gekennzeichnet zu sein. Patienten mit bis zu 7 Aberrationen überleben im Durchschnitt 37,4 Monate, während Patienten mit 8 – und mehr Aberrationen im Mittel noch 47,3 Monate überleben. Dieser Unterschied ist nicht statistisch signifikant (exakter Test nach Fisher). Beurteilt man die Verhältnisse von der anderen Seite, so finden sich bei Überlebenszeiten ab 26 Monaten und mehr im Schnitt mindestens 6,8 chromosomale Aberrationen pro Fall und im Gegensatz dazu bei Tumoren mit einer Überlebenszeit bis maximal 25 Monate lediglich 5,6 Aberrationen pro Tumor. Auch für diesen Unterschied lässt sich keine statistische Signifikanz zeigen.

Bezogen auf den Unterschied zwischen Peniskarzinomen mit - und ohne Lymphknotenmetastasen lässt sich die beschriebene Tendenz ebenfalls bestätigen. N0-Tumoren zeigen bei durchschnittlich 7,1 Aberrationen je Tumor eine mittlere Überlebenszeit von 46,1 Monaten und im Vergleich dazu leben Peniskarzinompatienten mit lymphogener Metastasierung bei 5,5 Aberrationen pro Fall nach Erstdiagnose nur noch 33,7 Monate.

Eine exakte Trennlinie für die Anzahl genetischer Veränderungen, die eine deutlich veränderte Lebenserwartung kennzeichnet, lässt sich nicht angeben. Vielmehr ist ein fließender Übergang im Sinne des o. g. Trends zu beobachten.

Abbildung 5.7.-1 veranschaulicht die Beziehung zwischen Überlebenszeit und Anzahl der chromosomalen Alterationen in Form eines Punktediagramms.

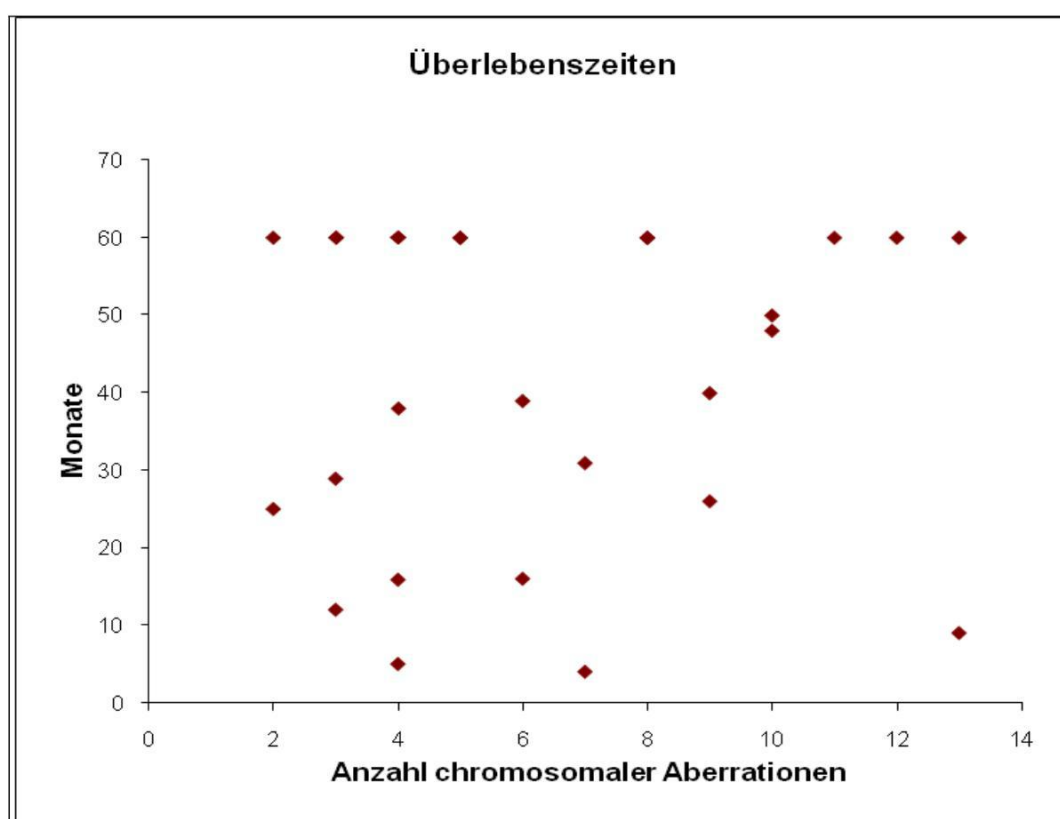


Abbildung 5.7.-1: Überlebenszeiten (in Monaten) von Patienten mit einem Peniskarzinom in Abhängigkeit von der Anzahl chromosomaler Aberrationen

## 6. Diskussion

Zielsetzung der Studie war es, für das Plattenepithelkarzinom des Penis spezifische chromosomale Veränderungen aufzuzeigen. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob es einen Zusammenhang zwischen den genetischen Veränderungen und deren Potential zu lymphogener Metastasierung gibt. Bei positivem Untersuchungsergebnis sollte weiterhin festgestellt werden, ob sich bereits aus dem Primärtumor Rückschlüsse auf das Metastasierungsverhalten des Peniskarzinoms im individuellen Fall ziehen lassen.

Soweit aus einer Literaturrecherche hervorgeht, ist die vorliegende Arbeit die weltweit zweite experimentelle Bearbeitung des Peniskarzinoms mittels Comparativer Genomischer Hybridisierung (Alves et al. 2001) und die einzige Arbeit, die zur Beantwortung der o.g. Fragestellung die CGH mit klinischen Daten korreliert.

Durch die erzielten Ergebnisse lassen sich einige der bisher bekannten Daten aus genetischen Untersuchungen bestätigen. Andererseits konnten neue genetische Alterationen ermittelt werden, die für die Tumorprogression und die lymphogene Metastasierung von diagnostischer Bedeutung sind und dem entsprechend einen Nutzen für die individuelle Therapieplanung erwarten lassen.

### 6.1. Patientenkollektiv, T-Stadium und Tumor-Grading

Da es sich, wie bereits weiter oben beschrieben, beim Peniskarzinom in Mitteleuropa um eine seltene Erkrankung des Mannes im höheren Lebensalter handelt, ist es problematisch, repräsentative Untersuchungen durchzuführen. Die Erstellung einer repräsentativen Serie von Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom des Penis aus einer einzelnen Klinik ist praktisch nicht möglich. Um dennoch eine auswertbare Stichprobe zusammenzustellen, wurden im Rahmen eines europäischen Verbundes zwischen der Klinik für Urologie der Semmelweis-Universität Budapest, Ungarn, der Klinik für Urologie Hradec Králové, Tschechische Republik, und der Klinik für Urologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Deutschland, die histologischen Präparate aus Penistumorresektionen sowie die dazugehörigen klinischen Verlaufsdaten aus den genannten Kliniken aufgearbeitet. Es konnten somit 13 Peniskarzinome aus Budapest, 11 aus Hradec Králové und 9 Fälle aus der Jenaer Klinik evaluiert werden.

Diese insgesamt 33 (n) Fälle übersteigen zwar die in vielen anderen Studien über das Peniskarzinom genannten Fallzahlen (2-30) (Akduman et al. 2001, Alves et al. 2001, Cabanas 1977, Catalona 1988, Crook et al. 2002, Cubilla et al. 1998, D'Ancona et al. 2004, Ficarra et al. 2002, Hakenberg et al. 2006, Hoffman et al. 1999, Laniado et al. 2003, Lümmer et al. 1997, Milathianakis et al. 2005, Mohs et al. 1985, Naumann et al. 2005b, Otto et al. 2003, Parra 1996, Pettaway et al. 1995, Protzel et al. 2006, Scher et al. 2005, Schneede et al. 2001 March, Singh et al. 1995, Suzuki et al. 1994, Tabatabaei et al. 2005, Wawroschek et al. 2000, Wespes et al. 1986, Wishnow et al. 1990), limitieren aber dennoch zwangsläufig die Aussagekraft der statistischen Berechnungen.



Die Altersverteilung des untersuchten Patientenkollektivs entspricht den Angaben der Literatur (Pow-Sang et al. 2002, Schneede et al. 2003, Wilbert 1997) für das Peniskarzinom in Europa. Die Patienten waren zum Diagnosezeitpunkt im Median 62 Jahre alt. Die Spanne reichte dabei von 35 bis 81 Jahre (vgl. Tabelle 4.2.-1).

Ebenso deckt sich die Zusammensetzung des Untersuchungskollektivs bzgl. der Häufigkeiten einzelner Tumorstadien (vgl. Tabelle 4.1.-1) in etwa mit vergleichbaren Patientengruppen in der Literatur (Horenblas und van Tinteren 1994, Ornellas et al. 1994, Schubert und Nitzsche 1988). Jeweils ein Tumor im Stadium Ta bzw. T4 (je n=1) repräsentiert 3,1% am gesamten Studienkollektiv, während T1-Tumoren (n=11) zu 33,3%, T2-Tumoren (n=13) zu 39,4% und T3-Tumoren (n=7) zu 21,2% vertreten sind. Die außerordentlich geringen Zahlen von nichtinvasiven Tumoren (Ta) und von Tumoren, die bereits Nachbarstrukturen infiltrieren (T4), lassen sich zum einen mit einer oft verspäteten Diagnosestellung erklären (Misra et al. 2004, Schneede et al. 2003) und zum anderen dadurch begründen, dass in Mitteleuropa vor Erreichen eines T4-Stadiums nahezu alle Fälle einer entsprechenden Therapie zugeführt werden.

Bezogen auf den Malignitätsgrad zeigen die Untersuchungsergebnisse in 21,2% gut differenzierte Tumoren (G1), in mehr als der Hälfte der Fälle (51,5% ) mäßig differenzierte Tumoren (G2) und in 24,2% + 3,0% = 27,2% undifferenzierte Neoplasien (G3 und G2-3 respektive). Dies differiert von den Angaben in der Literatur (Horenblas und van Tinteren 1994, Solsona et al. 1992), welche ein Überwiegen der G1-Differenzierung beschreiben. Dieser Unterschied ist am ehesten auf die geringe Fallzahl in der vorliegenden Studie zurückzuführen und damit ein zufälliger Effekt.

## 6.2. Methodische Aspekte - CGH

Für die Transformation normaler Zellen in maligne Tumorzellen und damit für die Karzinogenese sind bestimmte Veränderungen erforderlich, die in komplexer Weise zu einer Störung der Homöostase aus Zellproliferation und Zelltod führen. Der so entstandene Wachstumsvorteil neoplastischer Zellen in soliden Tumoren gegenüber den normalen ortsständigen und organtypischen Zellen ist auf dynamische Alterationen des Genoms zurückzuführen. Dadurch können Protoonkogene zu aktivierten Onkogenen mutieren oder Tumorsuppressorgene ihre Funktion verlieren.

In Anbetracht der Tatsache, dass zum Untersuchungszeitpunkt nicht mit einer genügenden Anzahl aktuell diagnostizierter Peniskarzinome zu rechnen war, und entsprechend dem unter 6.1. genannten Problem bzgl. der Zusammenstellung einer repräsentativen Studie, können asservierte Paraffinblöcke mit Formalin fixierten Geweben genutzt werden. Dieses Material ist für eine weitere zytogenetische Bearbeitung, für die eine Zellkultivierung erfolgen muss, unbrauchbar. Mit Hilfe der CGH, die von zwei verschiedenen Arbeitsgruppen unabhängig voneinander entwickelt wurde (du Manoir et al. 1993, Kallioniemi et al. 1992), ist es jedoch möglich, durch retrospektive Aufarbeitung von derartig archiviertem Material Aussagen zum

chromosomalen Status des betreffenden Tumorgewebes zu gewinnen. In nur einem Versuchsansatz lässt sich ein unbekanntes Genom hinsichtlich chromosomaler Aberrationen überprüfen, ohne dass im Vorfeld die möglichen involvierten Chromosomen oder chromosomalen Regionen bekannt sein müssen (Kallioniemi et al. 1993 Feb, Speicher et al. 1993). Damit bietet die Methode einen Überblick über alle unbalancierten genetischen Veränderungen der Test-DNA auf chromosomaler und subchromosomaler Ebene. Die detektierten DNA-Zugewinne oder DNA-Verluste widerspiegeln die etwaige Amplifikation eines Onkogens oder den Verlust eines Tumorsuppressorgens respektive (Störkel et al. 1996).

Da bisher nur sehr wenig über die genetischen Veränderungen im Peniskarzinom bekannt ist, erscheint eine solche Screening-Methode zur Lokalisation von derartigen Mutationen als orientierende Untersuchung gut geeignet.

Darauf aufbauende Untersuchungen könnten dann in Kenntnis der Lokalisation bestimmter Gene im Genom z.B. gezielt das Vorhandensein oder Fehlen der entsprechenden Genprodukte nachweisen.

Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche CGH ist die Gewinnung von Doppelstrang-DNA aus dem Tumorgewebe in ausreichender Qualität und Quantität (vgl. Kapitel 4.3.1 und 4.3.2).

Das Plattenepithelkarzinom des Penis zeichnet sich bereits bei noch niedriger Malignität (G1) dadurch aus, dass das Zellwachstum nicht mehr an der Oberfläche sondern zunehmend in der Tiefe stattfindet. So sind Tumorzellnester in normales Epithelgewebe eingebettet. Hinzu kommt eine deutliche Stromabildung zwischen den Tumorzellen, insbesondere bei der spindelzelligen Variante des Peniskarzinoms (Riede et al. 1989). Diese beiden Faktoren ermöglichen eine Kontamination des untersuchten Tumorgewebes mit Normalgewebe. Reduziert sich dadurch der Anteil von Tumorzellen, welche die gleichen chromosomalen Veränderungen aufweisen, im Untersuchungsmaterial auf unter 60%, liefert die CGH keine zuverlässigen Ergebnisse bzgl. der genetischen Aberrationen im Tumor. Hier liegt trotz sorgfältiger Evaluation des Untersuchungsmaterials eine potentielle Fehlerquelle (vgl. 4.3. und 4.3.1.).

Neben einem allgemeinen maximalen Auflösungsvermögen der CGH von 10 Mbp ist für die Detektion der genetischen Veränderungen von Bedeutung, ob es sich um Zugewinne oder Verluste chromosomaler Abschnitte handelt. DNA-Gewinne lassen sich im Vergleich zu DNA-Verlusten normalerweise besser nachweisen. Da eine DNA-Sequenz mehrfach amplifiziert sein kann, die Zahl der möglichen Deletionen/Verluste jedoch begrenzt ist, kann die Auflösung bei entsprechend hoher Anzahl von Kopien eines Amplikons bis ca. 100 kb betragen (Kallioniemi et al. 1994 Aug). Punktmutationen beispielsweise sind dementsprechend nicht nachweisbar.

Darüber hinaus sind balancierte Aberrationen, bei denen die Anzahl der vorliegenden Kopien einer Tumor-DNA-Sequenz im Vergleich zur Normal-DNA nicht differiert, mittels CGH nicht nachweisbar. Dies betrifft Translokationen ebenso wie Inversionen oder die Bildung von Ringchromosomen (Petersen et al. 1996).

Da die CGH nur Änderungen der Anzahl eines DNA-Abschnitts im Vergleich zur durchschnittlichen Zahl des gleichen Abschnitts der Normal-DNA erfasst, können Ploidie-Änderungen (zahlenmäßige Veränderungen

eines haploiden Chromosomensatzes) nicht nachgewiesen werden. So erzeugen z.B. Triploidien bzw. Tetraploidien keine Verschiebung im Fluoreszenz-Ratioprofil der einzelnen Chromosomen. Es ist allenfalls möglich, einen Hinweis auf eine Hyperploidie aus der relativen Ratio von grüner und roter Fluoreszenz zu erhalten, die wiederum erst über nachfolgende Untersuchungen (wie z.B. FISH mit locusspezifischen Sonden oder Mikrosatellitentypisierung) mit Sicherheit bestätigt werden kann.

In allen Zentromeren und Telomeren sind bekanntermaßen hochrepetitive DNA-Sequenzen vorhanden. Deren Länge variiert interindividuell erheblich, wodurch die Hybridisierung trotz Blockade mit unmarkierter Cot-1 DNA nicht immer gleichmäßig ausfällt. Ebenso weisen insbesondere die Chromosomen 19 und 22 Polymorphismen auf und sind daher nur eingeschränkt interpretierbar (Kirchhoff et al. 1997). Der analytische Vergleich der Test-DNA mit der Referenz-DNA im Rahmen der CGH kann somit deutlich gestört sein (Weiss et al. 1999). Um diese Fehlerquelle auszuschließen, werden die Zentromerregionen und die kurzen (p-) Arme der akrozentrischen Chromosomen von der Auswertung nach erfolgter CGH ausgeschlossen. Damit wird versucht, der Tatsache gerecht zu werden, dass Unterschiede in den polymorphen Heterochromatinbereichen für die klinische Beurteilung keine Relevanz haben. Andererseits ist die Bewertung der entsprechenden Profilabweichungen (vgl. 4.3.7.) vom Betrachter abhängig und unterliegt einer gewissen Subjektivität. Dies stellt wiederum selbst eine potentielle Fehlerquelle dar, die in der Ergebnisanalyse nicht vollständig zu vermeiden ist.

Moore II et al. versuchten dieses Problem mit Einführung einer objektiven Auswertungsmethode zu lösen. Sie entwickelten ein Verfahren, dem die t-Statistik zugrunde liegt. Neben der normalen Hybridisierung von Test-DNA mit Referenz-DNA wurde zusätzlich eine Hybridisierung mit einer zweiten Referenz-DNA und der ersten Referenz-DNA durchgeführt. Die Ergebnisse der Test-DNA:Referenz-DNA-Hybridisierung wurden mit den Ergebnissen der Referenz-DNA:Referenz-DNA-Hybridisierung verglichen. So ließen sich Regionen herausfinden, die tatsächliche Unterschiede aufwiesen, während andere Regionen bei dieser Art der Auswertung ausgeschlossen werden konnten (Moore et al. 1997).

Die Tumorgröße der Peniskarzinome ist in der Regel so gering, dass es nicht möglich ist, genetisches Material aus verschiedenen Tumorarealen zu isolieren, um Analysen bzgl. einer eventuellen genetischen Heterogenität der einzelnen Tumoren durchzuführen.

### **6.3. Tumoren mit unauffälligem CGH-Ergebnis**

6 (bzw. 18,2%) der insgesamt 33 untersuchten Peniskarzinome zeigen keine mittels CGH darstellbaren chromosomalen Veränderungen (vgl. Tab. 5.2.-1). Bei genauerer Betrachtung fällt auf, dass sich alle 6 Fälle dadurch auszeichnen, weder primär noch während des gesamten Follow-up Lymphknotenmetastasen oder Fernmetastasen gebildet zu haben. Für 4 Patienten gilt dabei ein Nachsorgeintervall von zumindest 60 Monaten. Die übrigen beiden Patienten fielen nach 16- bzw. 27 Monaten aus dem Follow-up heraus.

Somit erscheint an dieser Stelle der Rückschluss gerechtfertigt, dass die Metastasierung bei einem Plattenepithelkarzinom des Penis in jedem Fall durch chromosomale Imbalancen gekennzeichnet ist und diese Aberrationen offensichtlich groß genug (>10 Mbp) sind, um mittels CGH nachgewiesen werden zu können. Im Gegensatz dazu blieben in der einzigen in der Literatur existenten Vergleichsstudie, welche ebenfalls die Comparative Genomische Hybridisierung zum Nachweis genetischer Alterationen in Peniskarzinomen nutzt, 3 Fälle mit nachgewiesenen Lymphknotenmetastasen ohne positiven CGH-Befund (Alves et al. 2001). Allerdings wurde dort nicht beschrieben, ob Tumorareale zur DNA-Extraktion gezielt disseziert wurden, ebenso wenig wie in der Studie selbst angegeben eine Kontamination mit normalem Gewebe ausgeschlossen werden konnte. Auf diese Faktoren, die eine Limitierung für die CGH darstellen, wurde bereits weiter oben eingegangen (vgl. 4.3., 4.3.1, und 6.2.).

Anders betrachtet, muss außerdem eine generelle Zunahme von genetischen Mutationen aufgrund z.B. fehlerhafter DNA-Synthese und der Summation von Umwelteinflüssen mit zunehmendem Lebensalter berücksichtigt werden (Deman und Van Larebeke 2001, Krtolica und Campisi 2002). Das könnte ebenso die Bedeutung der Aussage einschränken. Jedoch differiert die mittlere Anzahl der Aberrationen je Tumor in den einzelnen Altersklassen nicht so stark, als dass sich daraus ein statistisch signifikanter Unterschied ableiten ließe (vgl. Tab. 5.4.1.-1 und Tab. 5.4.3.-1)

Betrachtet man die Verteilung der unauffälligen CGH-Befunde auf die einzelnen Tumorstadien, so wird deutlich, dass dies einzelne Tumoren in jeder T-Kategorie betrifft (vgl. Tab. 5.3.-1 und Abb. 5.3.-1). Das widerspricht der Annahme, dass eine größere Invasivität des Tumors immer auch mit einer Akkumulation chromosomaler Veränderungen, die eine vermehrte genetische Instabilität signalisieren würde, einhergeht. Andererseits sinkt der Anteil der Tumoren ohne in der CGH nachweisbare Veränderungen mit zunehmender Entdifferenzierung. Für G1-Tumoren trifft das in der Hälfte der Fälle zu, bei der Gruppe der G2-Tumoren zeigen nur noch 28,6% der Fälle eine unauffällige CGH-Analyse und in allen Tumoren mit höherem Malignitätsgrad lassen sich in der vorliegenden Studie immer genetische Aberrationen nachweisen (vgl. Tab.5.3.-1 und Abb. 5.3.-2). Damit zeichnet sich eine Korrelation zwischen dem Nachweis chromosomaler Veränderungen und der zunehmenden malignen Entartung der Tumoren ab, wenngleich diese Unterschiede nicht statistisch signifikant sind und bei Detailbetrachtung mehr qualitativen als quantitativen Charakter tragen.

Für ein unauffälliges CGH-Ergebnis bei histologisch eindeutig als maligne klassifizierten Tumoren kommen jedoch verschiedene Gründe in Frage. Da in den beschriebenen 6 Fällen ohne detektierbare chromosomale Aberrationen Tumoren aller T-Stadien und auch nahezu aller Malignitätsgrade vertreten sind, können auch methodische Schwierigkeiten nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden.

Wie weiter oben beschrieben, muss eine Veränderung in mindestens 60% der Tumorzellen vorliegen, um mit der CGH nachgewiesen werden zu können. Gleichzeitig können auch unbalancierte chromosomale Aberrationen durch die CGH unentdeckt bleiben, wenn im Tumor eine ausgeprägte klonale Heterogenität

besteht oder aufgrund der beschriebenen Sensitivitätsgrenzen der CGH insbesondere Verluste kleiner DNA-Sequenzen nicht erfassbar sind (Bentz et al. 1998).

Die beschriebenen 6 Fälle mit unauffälligem CGH-Befund sind für die weitere Auswertung der Ergebnisse ohne Bedeutung, da sich daraus bis auf den genannten Umstand keine weitere Charakterisierung der Peniskarzinome im Sinne der Zielstellung ableiten lässt. Diese Tumoren finden, wie bereits oben festgelegt, keine weitere Berücksichtigung.

#### **6.4. Plattenepithelkarzinome des Penis mit genetischen Veränderungen**

Im Rahmen der eigenen Untersuchungen können mit Hilfe der CGH bei 27 der 33 evaluierten Peniskarzinome ohne Beachtung des Status einer lymphogenen Metastasierung insgesamt 175 Aberrationen getrennt nach p- und q-Arm auf 129 alterierten Chromosomen aufgezeigt werden. 83 dieser Aberrationen stellen dabei Verluste chromosomaler Abschnitte dar und 92 Fälle weisen Zugewinne aus. Im Mittel entspricht das je Tumor 6,5 Veränderungen bzw. 3,1 Verluste und 3,4 Zugewinne (vgl. Tab. 5.2.-1). Alves et al. konnten bei insgesamt 26 untersuchten Präparaten von Peniskarzinomen in 23 Fällen mittels CGH eine deutlich höhere Zahl genetischer Alterationen nachweisen. Im Vergleich zur vorliegenden Arbeit fanden sich nach Auswertung der Ergebnistabelle dieser Literaturstudie insgesamt 370 Aberrationen verteilt auf p- und q-Armen von 264 alterierten Chromosomen, was einer mittleren Zahl von 16,1 Veränderungen auf durchschnittlich 11,5 Chromosomen je Tumor entspricht (Alves et al. 2001). Allerdings ist eine Vergleichbarkeit zur vorliegenden Untersuchung nur bedingt gegeben, da sich die Patientenkollektive in verschiedenen Parametern wie z.B. Altersverteilung, Follow-up und nicht zuletzt auch der epidemiologische Hintergrund (Präparate von Peniskarzinomen aus Brasilien – vgl. Abschnitt 2.1.2.) deutlich unterscheiden. Da es darüber hinaus an derartigen Studien in der Literatur mangelt, können hier auch nur bedingt direkte Vergleiche zu den Ergebnissen anderer Forschungsgruppen im Hinblick auf den jeweils untersuchten Punkt gezogen werden.

##### **6.4.1. Aberrationen der Peniskarzinome ohne Lymphknotenmetastasen**

Charakteristisch für die eigenen Untersuchungen ist bei Tumoren ohne lymphogene Metastasierung ein breites Spektrum verschiedener genetischer Veränderungen, welche sich jedoch oft nur auf einen der untersuchten Fälle beschränken und selten im Sinne einer tumortypischen Veränderung in mehreren Fällen gleichzeitig auftreten. Nichtsdestotrotz lassen sich Aberrationshäufungen darstellen, die in mehr als 20% der untersuchten Fälle vorkommen (vgl. 5.4.2.; Abb. 5.4.2.-1). Diese am häufigsten aufgetretenen Veränderungen sollen im Folgenden einer etwas genaueren Betrachtung im Spiegel der Literatur unterzogen werden.

Verluste genetischen Materials lassen sich in der Hälfte der Fälle (50%) auf dem Chromosomenarm 3p darstellen. Es handelt sich dabei fast ausschließlich um Verluste des gesamten p-Armes (vgl. Tab. 5.4.1.-1). Als Kandidaten-Tumorsuppressor-Gen auf 3p21 kommt RASSF1A in Betracht. Dessen Hypermethylierung und damit einhergehender Funktionsverlust wurde von Hogg et al. für Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches nachgewiesen (Hogg et al. 2002). Auf dem kurzen Arm des Chromosoms 3 (3p25p26) ist ebenso das von Hippel-Lindau Tumorsuppressor-Gen lokalisiert (Latif et al. 1993). Sein Funktionsverlust ist bekanntermaßen mit dem Auftreten des sporadischen Nierenzellkarzinoms assoziiert und die Funktion seines Genproduktes (pVHL) ist als Tumorsuppressor nachgewiesen (Maxwell et al. 1999). Inwieweit sich die Tumorgenese des Plattenepithelkarzinoms des Penis auf den Verlust dieser beiden Tumorsuppressor-Gene zurückführen lässt, oder ob eventuell weitere in dem Bereich befindliche Tumorsuppressor-Gene eine Rolle spielen, kann aus Sicht der vorliegenden Ergebnissen allenfalls spekuliert werden, da eine Eingrenzung auf bestimmte Regionen nicht möglich ist.

In 43,8% der NO-Tumoren finden sich Verluste chromosomaler Abschnitte von 8p (vgl. Tab. 5.4.1.-1). Gribble et al. verweisen in diesem Zusammenhang auf das Auftreten eines Isochromosoms i(8q) bei verschiedenen Tumoren, unter anderen beim Prostatakarzinom. Sie folgern aus dem gleichzeitigen Verlust von 8p mit dem Gewinn von 8q, dass diese Veränderungen gemeinschaftlich auf die Tumorprogression wirken und sowohl bei soliden Tumoren als auch bei hämatologischen Neoplasien auftreten (Gribble et al. 1999). Vor diesem Hintergrund bestätigen die eigenen Ergebnisse mit einem Zugewinn von 8q in 50% der Tumoren ohne LK-Metastasen die Aussagen der Literatur. Ebenso entsprechen sie damit der Beobachtungen von Mertens et al., dass Plattenepithelkarzinome zytogenetisch zur Ausbildung von Isochromosomen z.B. i(8q) neigen (Mertens et al. 1994).

Bereits 1995 und 1996 wurde in Arbeiten von Macoska et al. und Sunwoo et al. die Region 8p22 bzw. der gesamte Bereich 8p23, 8p22-23 und 8p21 respektive als Lokalisation von mindestens 3 Tumor-Suppressor-Genen beschrieben (Macoska et al. 1995, Sunwoo et al. 1996).

In der Folge konnten Ye et al. für Plattenepithelkarzinom-Zelllinien des Kopf-Hals-Bereiches einen loss-of-heterozygosity (LOH) für den Abschnitt 8p22p21.3 zeigen (Ye et al. 2007). Mit dieser Aberration ist in vielen verschiedenen Tumoren der Verlust des Mitochondrialen Tumor Suppressor Gens 1 (MTUS1), welches an dieser Stelle lokalisiert ist, verbunden (Seibold et al. 2003). Ähnlich wie für Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich könnte somit hier ein relevantes Gen auch für die Entstehung des Plattenepithelkarzinoms am Penis liegen. Zusätzlich demonstrierten Sun et al. das humane  $\beta$ -defensin-1-Gen (hBD-1), welches auf dem Chromosom 8p23 liegt, als potentielles Tumorsuppressor-Gen insbesondere für urologische Tumoren wie Nierenzell- und Prostatakarzinome (Sun et al. 2006).

Ähnlich wie für diverse andere Tumoren lässt sich auch in der vorliegenden Studie eine Häufung genetischer Alterationen auf 18q feststellen (vgl. Tab. 5.4.1.-1). Das entspricht zumindest teilweise den Ergebnissen der Greifswalder Arbeitsgruppe (Protzel et al. 2006).

Mit Verlusten am langen q-Arm des Chromosoms 18 in 31,3% der Fälle reiht sich das Peniskarzinom in die Tumoren ein, für die diese Aberration bereits gut untersucht ist, wie z.B. kolorektale Karzinome (Woodford-Richens et al. 2001), Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches (Pearlstein et al. 1998), das Pankreaskarzinom (Mahlamäki et al. 1997) und das Mammakarzinom (Dellas et al. 2002). Auf 18q sind verschiedene Tumorsuppressor-Gene lokalisiert, deren Verlust eine Tumorprogression begünstigt. Am bekanntesten sind hierbei das SMAD4/DPC4-, das DCC- und das MADR2-Gen. MADR2 und SMAD4/DPC4 sind wichtige Mediatoren im TGF- $\beta$ -Signalweg. SMAD4/DPC4 kodiert ein Signalprotein, welches an der Regulation des TGF- $\beta$ -Pathway beteiligt ist. Die Tumorsuppression von TGF- $\beta$  wiederum beruht auf der Arretierung des Zellzyklus in der G<sub>1</sub>-Phase. Dadurch kommt es zur effektiven Hemmung der Zellproliferation. Außerdem hemmt TGF- $\beta$  die Telomeraseaktivität. Der Ausfall der SMAD4/DPC4-Funktion führt zum Zusammenbruch des Signalweges und zum Ausbleiben der Transkription eben jener Gene, die den Zellzyklus kontrollieren können. Dadurch entziehen sich die Zellen der TGF- $\beta$  vermittelten Apoptose/Wachstumskontrolle und werden gegenüber TGF- $\beta$  resistent (vgl. 2.3.1. b und d) (Dellas et al. 2002, Woodford-Richens et al. 2001). Insgesamt sind vermutlich kombinierte Verluste der genannten Tumorsuppressorgene auf 18q für die unterschiedlich rasche Progression von verschiedenen Tumoren, so auch für das Peniskarzinom, verantwortlich.

Forschungsergebnisse von Kommu et al. konnten auf dem 18q21.3 Lokus das Gen für das SCCAg zeigen, welches in deren Studie als Biomarker den klinischen Verlauf eines Peniskarzinoms reflektiert (vgl. 2.3.2. - (Kommu et al. 2005).

Im Vergleich zu den Verlusten chromosomaler Abschnitte sind in der vorliegenden Studie deutlich häufiger Zugewinne zu beobachten (vgl. Tab. 5.4.1.-1 und Abb. 5.4.2.-1 bis 5.4.2.-8). Das legt eine Aktivierung von Protoonkogenen bei der Entwicklung eines Peniskarzinoms nahe.

Der häufigste Zugewinn ist in 50% der Fälle auf dem q-Arm des Chromosoms 8 zu beobachten. Folgt man der These von Gribble et al., so handelt es sich hier um die Bildung eines Isochromosoms bei gleichzeitigem 8p-Verlust, was bereits eingangs dieses Kapitels Erwähnung fand (Gribble et al. 1999). Für die onkogenetische Bedeutung einer Überexpression von Genen auf 8q spricht die Lokalisation des c-myc-Gens auf 8q24. Von Sauter et al. wurde das am Beispiel des Harnblasenkarzinoms demonstriert (Sauter et al. 1995). Der zugrunde liegende Mechanismus wurde experimentell von Walker et al. gezeigt. Mit der Bindung des c-Myc-Onkoproteins an Max durch Heterodimerisation entsteht ein Myc-Max-Komplex, der den Eintritt der Zelle in den Zellzyklus stimuliert, deren Differenzierung beeinträchtigt und so das Tumorwachstum begünstigt (vgl. 2.3.1.) (Walker et al. 2005). Ebenso belegt eine Reihe anderer Studien z.B. für das Prostatakarzinom (Steiner et al. 2002) und das Mammakarzinom, dass ein Zugewinn von 8q mit einem aggressiven Wachstum sowie einer schlechteren Prognose eines malignen Tumors assoziiert ist. Darüber hinaus könnte es auch ein Hinweis darauf sein, dass 8q24 noch andere Gene codiert, die, wenn sie amplifiziert werden, ebenfalls zu einem Wachstumsvorteil der betroffenen Zellen führen (Ried et al. 1995).

In Übereinstimmung mit der Literatur sind neben dem Zugewinn des gesamten Chromosoms 7 in 3 Fällen insbesondere auch Zugewinne von 7p in 43,8% der untersuchten Peniskarzinome zu finden. Bereits 1984 wurde von Shimizu, N. et al. der kurze Arm vom Chromosom 7 als Lokalisation für das Gen des Epidermalen-Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGF-R) identifiziert (Shimizu et al. 1984). Dessen vermehrte Expression wurde zunächst u.a. beim Pankreaskarzinom beobachtet (Korc et al. 1986). Neuere Studien belegen, dass eine Überexpression von EGF-R Plattenepithelkarzinomen der Haut ein erhöhtes Potential zur Metastasierung verleiht, wenngleich einzelne EGF-R negative Fälle belegen, dass die Karzinogenese in der Haut auch ohne eine erhöhte Konzentration des Rezeptors erfolgen kann (Shimizu et al. 2001). Gebhart et al. konnten letztlich am Beispiel des oralen Plattenepithelkarzinoms den Zugewinn von 7p12, der Lokalisation des EGF-R-Gens, ausschließlich als Teil eines kontextspezifischen Musters genomischer Imbalancen zeigen (Gebhart et al. 2004), was für die Komplexität der Tumorentstehung und -progression spricht und übertragen auf das Plattenepithelkarzinom am Penis ebenfalls postuliert werden muss (vgl. 2.3.1.a).

Ebenso bestätigt die erhöhte Anzahl von Kopien des q-Arms von Chromosom 3 in 31,3% die Ergebnisse anderer Studien. So fanden z.B. Redon et al. in niedriggradigen Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches ohne Lymphknoten- oder Fernmetastasen einen partiellen oder vollständigen Zugewinn von 3q bei gleichzeitigem oder alternativ dazu bestehendem Verlust von 3p und einen Zugewinn von 8q. Auch für das Chromosom 3 wird ähnlich wie für das Chromosom 8 die intermediäre Bildung eines Isochromosoms diskutiert (Mertens et al. 1994, Redon et al. 2001). Das deckt sich mit den hier für das Peniskarzinom beschriebenen chromosomalen Veränderungen. Ein in der französischen Studie ebenfalls nachgewiesener Zugewinn von 11q13 lässt sich am Plattenepithelkarzinom des Penis jedoch nicht darstellen.

Sowohl in den Untersuchungen von Redon et al. als auch von Woenckhaus et al. an Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches konnte ein Zugewinn von 3q26 gezeigt werden. Dabei handelt es sich um den Gen-Lokus von PIK3CA, welches die katalytische Untereinheit p110 $\alpha$  der Phosphatidylinositol-3-Kinase codiert und in diversen malignen Erkrankungen, wie z.B. dem Ovarialkarzinom und dem Mammakarzinom neben den beschriebenen Plattenepithelkarzinomen aktiviert ist (Campbell et al. 2004). Die Ergebnisse der Arbeitsgruppen von Redon et al. und von Woenckhaus et al. sprechen dafür, dass es sich bei den Zugewinnen von 3q26 um frühe genomische Aberrationen in der Karzinogenese von Kopf-Hals-Tumoren handelt (Redon et al. 2001, Woenckhaus et al. 2002). Das könnte aufgrund der vergleichbaren genetischen Veränderungen in gleicher Weise auch für Peniskarzinome gelten.

Bei dem auf dem Chromosom 2q ermittelten Zugewinn von genetischem Material in 25% der untersuchten Peniskarzinome ergibt sich der Verdacht auf die Lokalisation von Protoonkogenen an dieser Stelle mit einem gewissen Einfluss auf die Tumorentstehung und -progression. Die Angaben in der Literatur bzgl. chromosomaler Alterationen von 2q sind sparsam und uneinheitlich. Während die meisten Studien eine Deletion oder LOH für 2q beschreiben (Poetsch et al. 2007), finden sich nur vereinzelt Hinweise auf



genetische Aberrationen im Sinne von Zugewinnen des langen Arms am Chromosom 2. Letztere betreffen zudem nicht das Peniskarzinom, sondern nahezu ausnahmslos das Hepatoblastom (Weber et al. 2000).

Die Untersuchungen an den Peniskarzinomen ohne lymphogene Metastasierung weisen außerdem einen Zugewinn von 5p in 25% der Tumoren auf. In gleicher Weise fanden auch Alves et al. in ihrer Serie von brasilianischen Peniskarzinomen eine erhöhte Zahl von Kopien chromosomaler Abschnitte, die den kurzen Arm vom Chromosom 5 betreffen. Dabei waren N0-Tumoren in 33,3% vertreten (Alves et al. 2001).

Für andere Tumoren erweist sich die Datenlage noch weitaus deutlicher. Muralidhar et al. berichteten kürzlich für das Plattenepithelkarzinom der Cervix uteri von einem Zugewinn des Chromosomenabschnitts 5p in mehr als 50% der fortgeschrittenen Tumoren, der mit einem deutlichen Wachstumsvorteil und erhöhter Invasivität einhergeht. Als Folge davon beschrieben sie eine Hochregulation des Transkripts für den microRNA Prozessor Droscha. Eine Überexpression von Droscha, assoziiert mit microRNA, reguliert grundlegende Prozesse bei der Progression von Neoplasien. Gleiches gelte auch für die Karzinogenese in anderen Geweben (Muralidhar et al. 2007).

Für die in 25% detektierten Zugewinne von 9p lassen sich in der Literatur kaum Vergleiche finden. Vielmehr sind insbesondere Plattenepithelkarzinome eher mit dem Verlust bzw. LOH des kurzen Armes von Chromosom 9 assoziiert. Kamb et al. beschrieben bereits 1994 als Grund dafür den Verlust des an dieser Stelle lokalisierten Multiplen Tumor Suppressor 1-Gens (MTS1), welches auf 9p21 den Inhibitor p16 der cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) codiert (Kamb et al. 1994 Apr). Von Mahlamäki et al. wurde das z.B. für das Pankreaskarzinom gezeigt (Mahlamäki et al. 1997) und nach den Ergebnissen von Poetsch et al. trifft das so auch für das Peniskarzinom zu (Poetsch et al. 2007).

Neuere Studien berichten jedoch auch von einem Zugewinn auf 9p in einer Zelllinie als Charakteristikum für ein primär mediastinales B-Zell-Lymphom (Bentz et al. 2001) bzw. an anderer Stelle über die Assoziation mit einer familiären Form des Brustkrebses. Bei letzterem Tumor konnten Savelyeva et al. zeigen, dass zumindest ein Teil der Träger einer Keimbahn-Mutation des BRCA2-Gens auf 13q12-13 gleichzeitig eine genomische Instabilität in Form einer Amplifikation, Duplikation und Inversion von 9p23-24 aufweisen (Savelyeva et al. 2001). Das stützt die These, dass am terminalen Ende von 9p wenigstens ein Protoonkogen lokalisiert sein muss, dessen Aktivierung einen Tumorprogressionsfaktor darstellt.

Eine regelrechte Amplifikation zeigen die eigenen Ergebnisse lediglich für den Tumor Nr. 17 auf dem Chromosom: 12q14q21. Dabei handelt es sich um einen pT1 G3 N0-Tumor.

Auch Alves et al. konnten in Ihrer Studie zum Peniskarzinom eine Amplifikation der Region 12q13-14 demonstrieren (am Beispiel eines T4 N3 Mx-Tumors) (Alves et al. 2001). Das auf Chromosom 12q14.3q15 lokalisierte MDM2-Gen (Murine Double Minute- chromosome clone number 2) inaktiviert, wenn es überexprimiert wird, das TP53-Tumorsuppressorgen bzw. degradiert p53. So kann, wie durch bereits beschriebene andere Mechanismen, ebenfalls die TP53-regulierte Zellzykluskontrolle überwunden werden

und durch die Hemmung der Apoptose ein unkontrolliertes Wachstum des betroffenen Zellklons ausgelöst werden (vgl. 2.3.1.c).

Im Rahmen der vorliegenden Studie kommen Verluste oder Zugewinne kompletter Chromosomen in der Gruppe der N0-Tumoren ausgesprochen selten vor. Nachzuweisen sind zweimal der Verlust des Y-Chromosoms und je einmal ein Verlust des Chromosoms 6 und 16. In 3 Fällen zeigt sich ein Zugewinn des gesamten Chromosoms 7 und je einmal ein Zugewinn von Chromosom 1, 2, 4, 8, 12, 15, X und Y. Im direkten Vergleich zur Literatur bzw. zu der Untersuchung von Alves et al., in der ebenfalls die CGH zum Screening des Peniskarzinoms hinsichtlich chromosomaler Aberrationen eingesetzt wurde (Alves et al. 2001), stimmen die Ergebnisse bzgl. Aneuploidie ganzer Chromosomen mit den eigenen Befunden nahezu überein. Allerdings entfallen in der Literaturstudie etwa die Hälfte dieser gesamtchromosomalen Zugewinne allein auf die Chromosomen 19 und 22, welche aus besagten Gründen (Polymorphismen) nur eine eingeschränkte Interpretierbarkeit zulassen (vgl. 6.2.).

#### **6.4.2. Aberrationen der Peniskarzinome mit Lymphknotenmetastasen**

Angeführt werden die Verluste dieser Gruppe in 35,4% von Veränderungen auf 8p bei einem gleichzeitigen Zugewinn des langen Armes (q) von Chromosom 8 in 45,5% als der zahlenmäßig häufigsten Aberration in der Gruppe der N+-Tumoren (vgl. Tab. 5.4.3.-1 und Abb. 5.4.4.-1). Diese Kombination konnte, wie bereits für die N0-Tumoren beschrieben (vgl. 6.4.1.), auch in anderen Studien wiederholt beobachtet werden (Jin et al. 2001 Oct). Erinnerung sei nochmals an die Bildung eines Isochromosoms i(8q) mit Verlust von 8p bei gleichzeitigem Zugewinn von 8q (Gribble et al. 1999). In einer Metaanalyse von Mertens et al. stand i(8q) an zweiter Stelle in einer Rangliste der 9 häufigsten Isochromosomen. Bei unterschiedlicher Frequenz der Isochromosomen in den einzelnen Tumorentitäten war i(8q) nicht nur in Plattenepithelkarzinomen, sondern auch bei chronisch lymphoproliferativen Erkrankungen, bei Adenokarzinomen, in Transitionalzellkarzinomen und beim malignen Melanom vertreten (Mertens et al. 1994). Offenkundig erfolgt durch eine derartige Alteration des genetischen Materials eine entscheidende Weichenstellung nicht nur in puncto Tumorentstehung, sondern auch hin zur Tumorprogression.

Darüber hinaus haben, wie oben beschrieben, zahlreiche Arbeiten gezeigt, dass die Region 8p der Sitz mehrerer Tumorsuppressor-Gene ist und auf 8q Onkogene lokalisiert sind (vgl. 6.4.1. und 2.3.1.). So gehen die hier ermittelten Daten mit den Ergebnissen der Literatur konform.

Ähnlich wie für 8p werden auch im Bereich von 10q mehrere Tumorsuppressorgene vermutet, deren Imbalancen zur Tumorprogression bzw. Bildung von Metastasen beitragen können. So beschrieben es Petersen et al. am Beispiel des Plattenepithelkarzinoms der Lunge. Allerdings konnten sie keine Mutationen des Kandidaten-Gens für PTEN/MMAC1, wie sie bei verschiedenen Tumoren bekannt sind, nachweisen (Petersen et al. 1998). Andere Autoren dagegen zeigten die Bedeutung von PTEN als Tumorsuppressor auf

dem Lokus 10q23, der seine Aktivität über die Dephosphorylierung von Phosphatidylinositol(3,4,5)-triphosphat, einem wichtigen intrazellulären Second messenger, entfaltet. Dadurch wird die Aktivität der Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) gehemmt (vgl. 6.4.1.) und es werden die zellulären Prozesse: Zellzyklus, Translation und Apoptose reguliert (Simpson und Parsons 2001). Cheung et al. beschrieben den Expressionsverlust von PTEN als frühes Ereignis bei der Entwicklung eines Zervixkarzinoms mit prognostischer Bedeutung (Cheung et al. 2004). Die eigenen Ergebnisse (-10q in 27,3%) stützen beide Auffassungen. Da bei den lymphogen metastasierten Peniskarzinomen, insbesondere in den Tumoren höheren Stadiums (vgl. Abb. 5.4.4.-4), sowohl Verluste von 10q22qter als auch von 10q23qter und 10q24qter zu finden sind (vgl. 5.4.3.), kann es sich offensichtlich nicht nur um die Deletion des Tumorsuppressorgens PTEN handeln, sondern es müssen gleichzeitig auch andere in dieser Region lokalisierte Tumorsuppressorgene von einem Ausfall betroffen sein. Gleichzeitig kennzeichnet der Nachweis dieser Aberration in vorzugsweise höheren Tumorstadien sehr wahrscheinlich eine ungünstige Prognose für den betroffenen Patienten.

Im Rahmen der eigenen Untersuchung ist es außerdem möglich, für die Gruppe der lymphogen metastasierten Tumoren mit dem Zugewinn des gesamten Chromosoms 9 eine genetische Alteration zu zeigen (vgl. Tab. 5.4.3.-1 und Abb. 5.4.4.-1), die hier mit einer Häufigkeit von 35,4% auftritt und von der in der Literatur bisher meist nicht berichtet wurde. Im Gegensatz dazu wurde vielfach der Verlust insbesondere des kurzen p-Arms von Chromosom 9 in verschiedenen Tumoren (z.B. in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches - (Gonzalez et al. 1997), in Pankreaskarzinomen - (Mahlamäki et al. 1997) und in anderen Tumoren - (Kamb et al. 1994 Apr)) nachgewiesen. Das führt zum Ausfall des Tumorsuppressorgens p16<sup>INK4A</sup> auf 9p21, welches dem p15<sup>INK4B</sup> verwandt, so die Bildung des Cyclin D1/CDK-Komplexes nicht verhindern kann und via Phosphorylierung von pRB die Zelle in die G1-Phase des Zellzyklus eintreten lässt (vgl. 2.3.1.b). Darüber hinaus berichteten einige Autoren von einem LOH in der Region 9p sowohl für das Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich (Ye et al. 2007) als auch für das Peniskarzinom selbst (Poetsch et al. 2007).

Sehr vereinzelt finden sich Literaturstellen, die, wie bereits weiter oben unter 6.4.1. erwähnt, einen Zugewinn von genetischem Material auf dem Chromosom 9p widerspiegeln (Bentz et al. 2001).

Mertens et al. beschrieben in ihrer Metaanalyse von 20.007 Neoplasien mit klonalen Chromosomenaberrationen u.a. die Bildung eines Isochromosoms i(9q) speziell bei lymphoproliferativen Erkrankungen (Mertens et al. 1994). Ebenso wäre eine Translokation, wie sie vom Philadelphia-Chromosom [t(9;22)(q34;q11)] bekannt ist, als ein das Tumorstadium begünstigendes Moment denkbar.

Regelrechte Zugewinne chromosomaler Abschnitte von 9q und 9p konnten Hermsen et al. im Rahmen einer Studie an oralen Plattenepithelkarzinomen mit Hilfe der CGH aufdecken (Hermsen et al. 1997). Das unterstreicht die eigenen Ergebnisse und legt trotz der entgegengesetzt lautenden Studien den Verdacht nahe, dass sich hier bisher noch nicht entdeckte Protoonkogene befinden könnten, die zumindest bei einem Teil der Karzinome mit dem Potential zu Lymphknotenmetastasen in die Tumorgenese eingreifen.

Auch für die N<sup>+</sup>-Tumoren ergibt sich eine nur geringe Zahl von Aneuploidien einzelner Chromosomen (vgl. Tab. 5.4.3.-1). Es treten Verluste des Y-Chromosoms in 2 Fällen und ein Verlust des Chromosoms 16 in einem Fall auf. Zugewinne betreffen das Chromosom 9 in 4 Fällen, das Chromosom 6 und das Y-Chromosom je zweimal und die Chromosomen 1, 5, 11 und 12 jeweils einmal. Bei einem Vergleich mit der Studie von Alves et al. übersteigt dort die Gesamtzahl der komplett veränderten Chromosomen die der eigenen Untersuchungsergebnisse, auch wenn man die Chromosomen 19 und 22 (wegen o. g. Polymorphismen) aus der Rechnung ausschließt. Jedoch fehlen dort Aberrationen am Y-Chromosom und an den Chromosomen 5, 6 und 9 gänzlich, während es sich bei den Veränderungen am Chromosom 11 je zweimal um einen Verlust und ebenso oft um einen Zugewinn handelt und das Chromosom 16 als Zugewinn statt als Verlust vorliegt. Darüber hinaus bieten die N<sup>+</sup>-Tumoren der brasilianischen Peniskarzinome einmal -4 und je einmal +7, +10 und +17 (Alves et al. 2001). Bezüglich der Bedeutung der Polysomie von Chromosom 9 wurde bereits im vorausgegangenen Absatz auf den Gegensatz zu anderen Untersuchungen hingewiesen. Was die Aberrationen am Y-Chromosom angeht, so trifft das beschriebene gleichzeitige Auftreten von Zugewinn und Verlust des ganzen Chromosoms innerhalb einer Tumorentität in gleicher Weise für das Magenkarzinom zu (Kitayama et al. 2003 Sep), während in den allermeisten übrigen Studien, insbesondere für Plattenepithelkarzinome der Haut und des Kopf-Hals-Bereiches, ausschließlich von einem Verlust des Y-Chromosoms berichtet wurde (Jin et al. 1999 Dec, Kujawski et al. 2004). Die übrigen Verluste - bzw. Zugewinne ganzer Chromosomen sind aufgrund ihrer Seltenheit nicht statistisch signifikant und es kann wegen der kleinen Stichprobe deren zufälliges Auftreten nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden.

#### **6.5. Vergleich der Ergebnisse beider Patientengruppen - ohne/mit Lymphknotenmetastasen - und spezifische chromosomale Veränderungen beim Plattenepithelkarzinom des Penis**

Aufgrund der Kleinheit der Stichprobe und den nicht als statistisch signifikant nachgewiesenen genetische Alterationen werden hier nur die chromosomalen Veränderungen, welche mehr als 20% der Fälle in den jeweiligen Gruppen repräsentieren, als spezifische Aberrationen angesehen (vgl. 5.6.). Eine Zusammenstellung dieser Veränderungen gibt Tabelle 6.5.-1 wieder (vgl. 5.4.2. und 5.4.4.).

Tabelle 6.5.-1: chromosomale Aberrationen, welche sowohl in der Gruppe der Lymphknoten-negativen Tumoren als auch in der Gruppe der Tumoren mit Lymphknotenmetastasen in jeweils mehr als 20% der untersuchten Fälle nachweisbar sind bzw. eine Amplifikation (amp 12q) darstellen

<b>Spezifische chromosomale Aberrationen (Häufigkeit in jeder Gruppe &gt;20%)</b>			
<b>Gruppe der N0-Tumoren</b>		<b>Gruppe der N+-Tumoren</b>	
<b>Verluste</b>	<b>Zugewinne</b>	<b>Verluste</b>	<b>Zugewinne</b>
-3p (50%)	+8q (50%)	-8p (35,4%)	+8q (45,5%)
-8p (43,8%)	+7p (43,8%)	-10q (27,3%)	+9 (36,4%)
-18q (31,3%)	+3q (31,3%)		
	+2q (25%)		
	+9p (25%)		
	+5p (25%)		
	amp 12q13-14 (6,3%)		

Der Verlust von 3p, u.a. Lokalisation des VHL-Tumor-Suppressorgens, entspricht genetischen Veränderungen vieler anderer Tumoren und dürfte auch beim Peniskarzinom im Rahmen der malignen Transformation, das heißt bei der Tumorentstehung insbesondere weniger aggressiver Karzinome, eine wesentliche Rolle spielen, zumal diese Veränderung zu 50% bei den Tumoren ohne Lymphknotenmetastasen zu beobachten ist, während Lymphknoten-positive Tumoren dieses Merkmal nur in 18,2% besitzen. Dieser Unterschied ist statistisch signifikant.

Wie bereits unter 6.4.1. beschrieben, kann jedoch anhand dieser Ergebnisse nicht mit Sicherheit bewiesen werden, dass der Funktionsverlust des VHL-Tumor-Suppressorgens tatsächlich einen Effekt bei Peniskarzinomen besitzt. Natürlich kommen auch andere Tumor-Suppressorgene auf 3p in Frage. Ebenso ist zu vermuten, dass aufgrund der deutlich geringeren Ausprägung dieser Aberration in metastasierten Fällen diese zwar einen Beitrag zur Tumorentstehung leistet, aber eher nicht die dafür entscheidende Alteration darstellt.

Die Bedeutung der Aberrationen auf dem Chromosom 8, inklusive des Verdachts auf die Bildung eines Isochromosoms, wurde in den vorangegangenen Abschnitten sowohl für die nicht lymphogen metastasierten als auch für die - metastasierten Tumoren ausführlich erörtert (vgl. 6.4.1., 6.4.2. und 2.3.1.).

Diese mittels CGH nachweisbaren genetischen Alterationen könnten im Rahmen des Verlustes von 8p die Tumor-Suppressorgene MTUSII und hBD-1 betreffen. Deren Funktionsverlust konnte für die unterschiedlichsten Tumoren gezeigt werden (Seibold et al. 2003, Sun et al. 2006).

Der Zugewinn +8q bei N0- und N+-Tumoren in 50% bzw. 45,5% respektive bestätigt ebenfalls die Ergebnisse anderer Studien, die eine Überexpression dieses Chromosomenabschnitts mit der Translation des c-Myc-Onkoproteins und der Bildung eines Myc-Max-Komplexes in Verbindung bringen (Sauter et al. 1995, Walker et al. 2005), was z.B. mit einem aggressiveren Tumorwachstum und einer schlechteren Prognose beim Prostatakarzinom assoziiert ist (Steiner et al. 2002).

Da beide chromosomalen Aberrationen in etwa gleicher Häufung in Tumoren ohne Lymphknotenmetastasen und in Tumoren mit Lymphknotenmetastasen nachzuweisen sind, also keine signifikante Differenz besteht, legt das die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um eine primäre Veränderung handelt. Alves et al. konnten bei knapp der Hälfte ihrer Peniskarzinome ebenfalls einen Zugewinn der chromosomalen Region 8q entdecken, während sie nur bei 2 von 23 Karzinomen mit nachgewiesenen genetischen Aberrationen einen Verlust von 8p fanden (Alves et al. 2001).

Diverse Untersuchungen beschrieben einen erhöhten Serum-Wert des SCC-Antigens bei Peniskarzinomen als prognostischen Parameter für die Abschätzung einer lymphogenen Metastasierung (Kommu et al. 2005, Laniado et al. 2003). Hierfür würde man mindestens eine Hochregulation des SCCAg-Gens oder eine Amplifikation des codierenden chromosomalen Abschnittes auf Chromosom 18q21.3 erwarten. Im Gegensatz dazu wird in der eigenen Studie ein Verlust des q-Arms von Chromosom 18 in 31,3% der N0-Tumoren und in 18,2% der N+-Tumoren deutlich. Auch an dieser Stelle unterscheiden sich die beiden Gruppen signifikant voneinander. Damit bestätigen die eigenen Ergebnisse ein weiteres Mal die Resultate der Untersuchung von Alves et al. (Alves et al. 2001) und befinden sich im Einklang mit einer Reihe anderer Studien, die für verschiedene Tumoren die gleiche Veränderung demonstrierten (Dellas et al. 2002, Mahlamäki et al. 1997, Pearlstein et al. 1998, Woodford-Richens et al. 2001). Dementsprechend muss der Verdacht geäußert werden, dass der Verlust der auf diesem Chromosomenarm lokalisierten Tumor-Suppressorgene wenigstens teilweise zur Tumorentstehung beiträgt, aber ihr Einfluss auf das Metastasierungspotential im Sinne eigenständiger Faktoren eher von untergeordneter Bedeutung ist.

In übertragenem Sinn dürften sich auch die Veränderungen +3q in 31,3% bzw. 18,2% der Peniskarzinome ohne - respektive mit Lymphknotenmetastasen auswirken, zumal auch in der Literatur in diesem Zusammenhang von einem frühen Ereignis der Karzinogenese (der Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich) berichtet wird (Woenckhaus et al. 2002). Somit hat auch diese Aberration ihren Anteil an der Tumorentstehung, aber höchstens einen marginalen Effekt auf die Fähigkeit der Tumoren, Metastasen zu bilden. Die unterschiedliche Häufung in N0- und N+-Tumoren ist in unserer Untersuchung statistisch signifikant.

Auch der Zugewinn des kurzen p-Armes des Chromosoms 5 mit einer Häufigkeitsverteilung von 25% auf N0- und 18,2% auf N+-Tumoren, deren Unterschied hier keine Signifikanz zeigt, scheint dem beschriebenen Schema zu folgen und entspricht darüber hinaus wiederum den Ergebnissen von Alves et al. Allerdings

überwogen dort die metastasierten Karzinome im Vergleich zu nicht-metastasierten - mit 5:3 bei insgesamt 8 von 23 CGH-positiven Fällen (Alves et al. 2001).

+7p und +2q sind offensichtlich Veränderungen, die ausschließlich die Tumorentstehung kennzeichnen. Sie kommen in den metastasierten penilen Neoplasien der eigenen Untersuchung nicht vor. Dabei ist der Zugewinn in der Region 7p mit 43,8% der nicht-metastasierten Tumoren eine relativ häufig zu beobachtende Veränderung und u.a. gleichzeitig Lokalisation des EGF-R-Gens auf 7p12. Eine neuere Studie an oralen Plattenepithelkarzinomen demonstriert den Zugewinn des kurzen Arms von Chromosom 7 ausschließlich in Kombination mit anderen chromosomalen Alterationen (Gebhart et al. 2004). Es darf spekuliert werden, dass diese dort gezeigte und offensichtlich für die Tumorentstehung entscheidende Komplexität genomischer Imbalancen auch für die Entstehung eines Plattenepithelkarzinoms am Penis eine primäre Mutation auf dem Weg zur malignen Transformation sein kann (vgl. 2.3.1. und 6.4.1.).

Auch in der Untersuchung genetischer Imbalancen an 26 penilen Plattenepithelkarzinomen von Alves et al. war die Region 7p in insgesamt 7 Fällen von einem Zugewinn betroffen. Allerdings waren diese Zugewinne nur auf 2 Tumoren ohne - und auf 5 Tumoren mit Lymphknotenmetastasen verteilt (Alves et al. 2001).

Für den Zugewinn +2q gibt es in der Literatur nur wenige Beispiele (vgl. 6.4.1.) und auch an der eigenen Studie lässt sich diese Aberration nur mit 25% der N0-Tumoren belegen.

Dem gegenüber finden sich Verluste von 10q (in 27,3%) ausschließlich in lymphogen metastasierten Befunden mit höherem Tumorstadium. Das spricht einerseits für den Funktionsverlust von Tumorsuppressorgenen, unter anderen z.B. PTEN, die auf dem q-Arm des Chromosoms 10 codiert sind als mögliches Kennzeichen für das Potential zur lymphogenen Metastasierung und andererseits für eine negative Prognose des entsprechenden Karzinoms (vgl. 6.4.2.). Nicht zuletzt würde es darüber hinaus die These unterstützen, dass sich zumindest die Tumoren, welche bereits Lymphknotenmetastasen gebildet haben, anhand ihrer genetischen Veränderungen von denjenigen ohne bisherige Metastasierung unterscheiden lassen. Aufgrund der geringen Penetranz dieses Merkmals und der geringen Fallzahl ist jedoch ein zufälliger Effekt nicht mit Sicherheit auszuschließen.

Für den Zugewinn auf 9p in 25% der N0-Tumoren ist vorstellbar, dass sich hier mindestens ein Protoonkogen befindet, welches bereits frühzeitig in der Tumorgenese eine Aktivierung zu einem Onkogen erfährt und an der Tumorentstehung beteiligt ist. Der im Vergleich zu N0-Befunden signifikante Zugewinn des gesamten Chromosoms 9 in 36,4% der N+-Tumoren als Ausdruck einer zunehmenden genetischen Instabilität und als zusätzliche Alteration im Vergleich zu nicht-metastasierten Tumoren bietet einen Hinweis darauf, dass es sich hier um eine genetische Alteration handeln könnte, die ähnlich wie der Verlust von chromosomalen Abschnitten auf 10q ursächlich für eine Metastasierung mitverantwortlich ist.

Außerdem sind genetische Veränderungen, die gleichzeitig in kleinen, niedrig malignen und nicht-metastasierten Tumoren ebenso wie in größeren Tumoren mit höherer Malignität und bereits stattgehabter Metastasierung nachweisbar sind, ein Ausdruck für den gemeinsamen Ursprung des Entwicklungsweges dieser Neoplasien. Das würde in etwa gleicher Weise sowohl für die Aberrationen auf dem Chromosom 9 wie auch auf die weiter oben beschriebenen Veränderungen am Chromosom 8 zutreffen. Beide genetischen Imbalancen finden auch ihren Niederschlag in der bereits mehrfach zitierten Studie von Alves et al., allerdings in unterschiedlicher Ausprägung (Alves et al. 2001). Inwieweit sich daraus prognostische Schlüsse ziehen lassen, ist schwierig zu beurteilen. Bei der geringen Fallzahl und der oft fehlenden statistischen Signifikanz könnten die beschriebenen Ergebnisse am ehesten einem Trend entsprechen.

Die Relevanz einer Amplifikation von 12q, u.a. die Lokalisation des MDM2-Gens, welches bei Überexpression das TP53-Tumorsuppressorgen inaktiviert, erscheint eindeutig (vgl. 2.3.1. und 6.4.1.) (Alves et al. 2001, Levine 1997), ist aber in der eigenen Studie sowie in den Studienergebnissen von Alves et al. aus dem Jahre 2001 jeweils nur einmal nachweisbar. Die Relevanz dieser äußerst seltenen Amplifikation hinsichtlich Prognose und Metastasierungspotential des Tumors bleiben unklar. Eventuell ist es ein Ausdruck der Heterogenität des Tumors.

Aberrationen, die komplette Chromosomen betreffen, sind Ausdruck einer höheren genetischen Instabilität. In beiden Studiengruppen (N0- und N+-Tumoren) kommen diese Ereignisse in weitgehender Übereinstimmung mit der Literatur (Alves et al. 2001) relativ selten vor (vgl. 6.4.1. und 6.4.2.) und besitzen für fast alle Chromosomen wiederum keine statistische Signifikanz. Abgesehen vom Zugewinn des Chromosoms 9 in der Gruppe der lymphogen metastasierten Tumoren in 36,4% liegen alle anderen Alterationen, die ein gesamtes Chromosom betreffen, singulär vor oder in ihrer Häufigkeit unter 20%. Exklusive des Chromosoms 9 bleibt somit unklar, inwieweit es sich bei den übrigen Chromosomen um tatsächliche Unterschiede im genetischen Muster oder nur um unspezifische Abweichungen handelt.

Abbildung 6.5.-1. veranschaulicht die Häufigkeitsverteilungen chromosomaler Verluste und Zugewinne als Vergleich zwischen lymphogen metastasierten – und nicht metastasierten Peniskarzinomen (vgl. Abb. 5.5.-1).



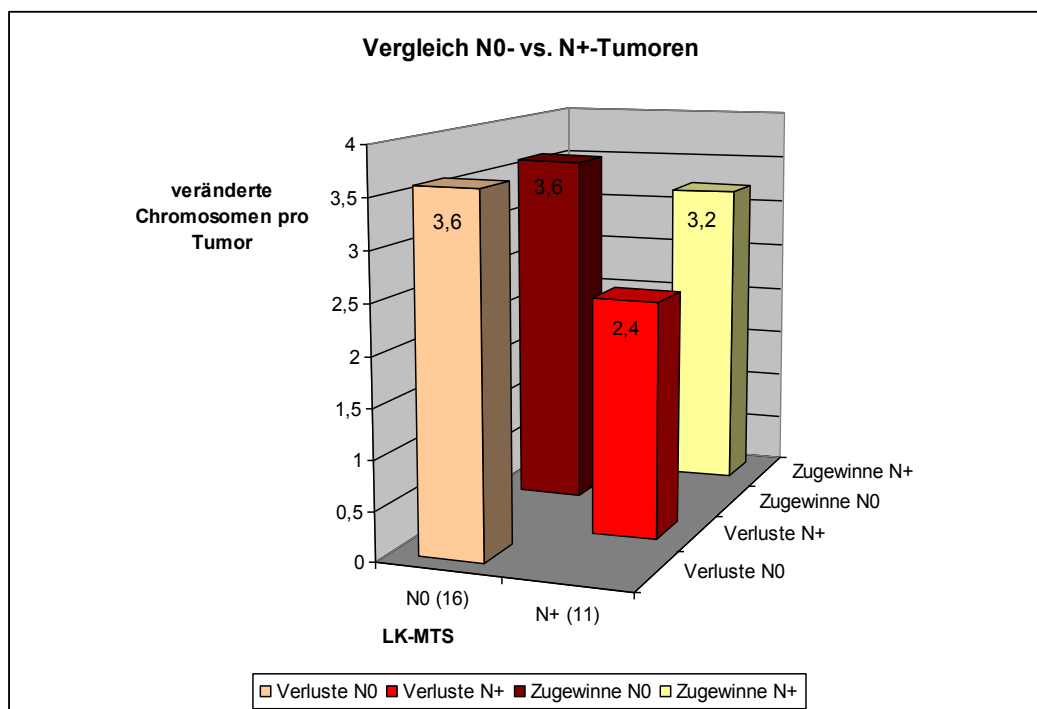


Abbildung 6.5.-1: Anzahl veränderter Chromosomen pro Tumor im Sinne von Verlusten- und Zugewinnen genetischen Materials getrennt nach Lymphknoten-positiven und Lymphknoten-negativen Befunden

An der graphischen Darstellung wird deutlich, dass die N0-Tumoren im Durchschnitt sowohl insgesamt als auch nach Verlusten und Zugewinnen getrennt, mehr Aberrationen aufweisen als lymphogen metastasierte Neoplasien (7,1 vs. 5,5). Entsprechend den Ausführungen unter 5.5. bleiben diese Unterschiede wiederum unterhalb der statistischen Signifikanz. Trotzdem lassen sich an diesem Ergebnis gewisse Trends erkennen. So zeigt die Gruppe der Tumoren ohne lymphogene Metastasierung pro Fall die gleiche Anzahl von Zugewinnen wie von Verlusten genetischen Materials (3,6). Es darf spekuliert werden, dass für die Tumorinitiation des penilen Plattenepithelkarzinoms sehr verschiedene Veränderungen in Frage kommen - sowohl der Verlust eines Tumorsuppressorgens als auch die Aktivierung eines Protoonkogens. Für eine Tumorprogression setzen sich hernach diejenigen Zellklone mit dem aggressivsten Wachstumspotential durch. Etwas anders stellt sich die Situation für die Gruppe der Patienten mit Lymphknotenmetastasen dar. Es finden sich hier mehr Zugewinne (3,2) als Verluste (2,4) chromosomaler Abschnitte pro Tumor (vgl. 5.5.). Das spricht für das Überwiegen von aktivierten Onkogenen im Gegensatz zum geringer ausgeprägten Verlust von Tumor-Suppressorgenen. Möglicherweise ist das als Ergebnis selektierter Zellklone anzusehen, die nicht nur einen unkontrollierten Proliferationsvorteil sondern auch die Fähigkeit zur Bildung von Lymphknotenmetastasen besitzen. Damit wäre eine Tumorentwicklung von lokal begrenzten Befunden hin zu lymphogen metastasierten Plattenepithelkarzinomen des Penis denkbar. Das wiederum eröffnet die Möglichkeit anhand des genetischen Musters eines Tumors sein Metastasierungspotential abschätzen zu können. Die im Rahmen der CGH auffälligen Regionen sollten dafür einer differenzierte Analyse auf molekularem Niveau unterzogen werden.

Letztlich muss festgehalten werden, dass offensichtlich nur das Zusammenspiel verschiedener Aberrationen die Malignität eines Plattenepithelkarzinoms am Penis und dessen Potential zu lymphogener Metastasierung ausmacht. Die sehr differenten genetischen Veränderungen lassen vermuten, dass die molekulargenetische Pathogenese des Peniskarzinoms sehr komplex ist und dass die maligne Transformation, Tumorentstehung und Tumorprogression nur durch Akkumulation multipler, genetischer Aberrationen stattfinden können.

#### **6.6. Korrelation zwischen Überlebenszeit und chromosomalen Veränderungen beim Peniskarzinom**

Die Ergebnisse der eigenen Untersuchung kennzeichnen zunächst unabhängig von der lymphogenen Metastasierung der Tumoren eine positive Korrelation von höherer Anzahl chromosomaler Veränderungen mit einer längeren Überlebenszeit. Wie im Abschnitt 5.7. mit Zahlen belegt ist, so zeichnet sich ein Trend ab, nach dem weniger genetische Aberrationen auch eine kürzere Überlebenszeit nach sich ziehen. In Analogie zur Anzahl veränderter Chromosomen bedeutet das, dass Patienten mit N0-Tumoren und einer durchschnittlichen Anzahl von 7,1 veränderten Chromosomen pro Tumor im Mittel 12,4 Monate länger überleben (46,1 Monate) als Patienten mit N+-Tumoren (33,7 Monate) und einer mittleren Anzahl von 5,5 veränderten Chromosomen pro Tumor (vgl. 5.7. und 6.5.). Aus der Graphik 5.7.-1 geht hervor, dass sich jedoch keine exakte Trennlinie zeigen lässt, oberhalb bzw. unterhalb derer eine eindeutige Differenzierung der Überlebenszeiten aufgrund der chromosomalen Aberrationen vorgenommen werden kann. Dieser Trend widerspiegelt die natürliche Erwartung, dass Patienten mit metastasiertem Karzinom früher tumorbedingt sterben als diejenigen ohne Metastasen, da metastasierte Neoplasien, als systemische Erkrankung, konsekutiv eher zum Tode führen als Tumoren ohne (lymphogene) Metastasierung. Außerdem geht diese Erkenntnis mit den Ergebnissen der Literatur vollständig konform. Alves et al. fanden im Rahmen ihrer CGH-Analysen von 26 brasilianischen Peniskarzinomen ebenfalls eine Tendenz zu prolongiertem Überleben bei einer höheren Zahl chromosomaler Veränderungen (Alves et al. 2001).

## 7. Schlussfolgerungen

Die vorliegenden Ergebnisse erhärten auf der einen Seite die bisher bekannten Daten aus molekularbiologischen Untersuchungen am Plattenepithelkarzinom des Penis von anderen Forschungsgruppen, andererseits decken sie neue genetische Alterationen auf, die offensichtlich bei der Tumorentstehung und -progression der häufigsten malignen Veränderung am Penis von Bedeutung sind. So ist es möglich, einen Beitrag zum Verständnis der genetischen Veränderungen dieser ob seiner Seltenheit bisher nur wenig evaluierten Tumorentität zu leisten. Man darf davon ausgehen, dass sich durch die beschriebenen Ergebnisse in Kombination mit weiteren Arbeiten diagnostisch und therapeutisch nutzbare molekulargenetische Marker ableiten lassen, die weiteren Aufschluss über die Entwicklung, den Krankheitsprogress und das Metastasierungsmuster des Peniskarzinoms geben.

In den meisten der untersuchten sporadischen Peniskarzinome lassen sich chromosomale Veränderungen im Sinne von DNA-Verlusten bzw. -Zugewinnen nachweisen. Die Einzelfälle ohne genetische Aberrationen zeigen gleichzeitig keine Lymphknoten- oder Fernmetastasen. Darüber hinaus handelt es sich dabei um Tumoren mit einer maximalen Zelldifferenzierung von G2, während alle höhergradigen - entdifferenzierten Tumoren immer Veränderungen in der CGH aufweisen. Somit ist der Nachweis chromosomaler Aberrationen als Progressionsmarker und Hinweis für eine Metastasierung des Peniskarzinoms zu bewerten. Einschränkend muss erwähnt werden, dass für die wenigen Fälle ohne nachweisbare Aberrationen eine Kontamination mit normalem Gewebe nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden kann.

Die durchgeführte Untersuchung demonstriert mit Hilfe der komparativen genomischen Hybridisierung eindeutig spezifische, unbalancierte, chromosomale Aberrationen für das Plattenepithelkarzinom des Penis. Dabei sind Verluste an den Chromosomen 3p; 8p und 18q sowie Zugewinne 2q; 3q; 5p; 7p; 8q und 9p für Tumoren ohne Lymphknotenmetastasen charakteristisch. Ebenso lässt sich im Fall eines N0-Tumors eine Amplifikation 12q13-14 zeigen. Im Vergleich dazu sind Tumoren mit einer lymphogenen Metastasierung in gleicher Weise wie N0-Tumoren von Verlusten 8p sowie von Zugewinnen 8q gekennzeichnet, während ein Verlust von 10q und der Zugewinn des gesamten Chromosoms 9 in dieser Häufigkeit ausschließlich in der Gruppe der N+-Tumoren zu beobachten ist.

Dem entsprechend ist von einer Tumorprogression auszugehen, wenn genetische Veränderungen am Chromosom -8p; +8q und +9p nachweisbar sind, welche offensichtlich bereits zu einem frühen Zeitpunkt der Tumorgenese noch ohne lymphogene Metastasierung auftreten und wenn diese Tumorzellklone im weiteren Verlauf persistieren. Andere Aberrationen fallen möglicherweise aufgrund des klonalen Selektionsdrucks im Sinne eines Wachstumsvorteils im Laufe der weiteren Tumorentwicklung nicht mehr ins Gewicht. Dagegen treten der Verlust von 10q und der Zugewinn des gesamten Chromosoms 9 bei N+-Tumoren in ihrer Häufigkeit deutlich hervor, was als Faktor für eine Lymphknotenmetastasierung gewertet werden muss.

Eine klare Unterscheidung zwischen Tumoren ohne – und mit lymphogener Metastasierung lässt sich allein anhand der Anzahl der genetischen Veränderungen nicht vornehmen. Jedoch zeigt ein Trend sowohl insgesamt als auch getrennt nach Verlusten und Zugewinnen eine höhere Zahl an Aberrationen für die N0-Tumoren. Gleichzeitig überwiegen bei den N+-Tumoren die Zugewinne gegenüber den Verlusten, während beide Formen der genetischen Alteration in gleicher Häufung in Peniskarzinomen ohne Lymphknotenmetastasen vorkommen. Das wiederum gibt der These eines sog. „Metastasierungsonkogens“ Raum, wenngleich die Progression des Peniskarzinoms insgesamt von hoher Komplexität geprägt ist.

Unabhängig von einer Metastasierung finden sich, verteilt auf die einzelnen T-Kategorien, durchschnittlich jeweils die gleiche Anzahl genetischer Aberrationen pro Tumor ohne statistischen Unterschied zwischen den einzelnen Tumorstadien, während sich in Abhängigkeit von der Tumordifferenzierung ein Trend abzeichnet, nach dem mit höherem Grading des Tumors die durchschnittliche Zahl der Aberrationen pro Tumor abnimmt.

Letzteres kann in noch deutlicherer Ausprägung insbesondere für die Tumoren mit lymphogener Metastasierung gezeigt werden.

Bezüglich des Patientenüberlebens nach Diagnosestellung lässt sich festhalten, dass Patienten mit einer höheren Anzahl chromosomaler Aberrationen länger überleben als Patienten mit weniger genetischen Veränderungen. Dieser Trend geht konform mit der geringeren Zahl von Aberrationen bei höherem Tumorgrading und bei Metastasierung.

Über die Tumorsuppressorgene oder Onkogene, welche auf den genannten chromosomalen Abschnitte lokalisiert sind, kann an dieser Stelle allenfalls spekuliert werden. Aus der Literatur sind zumeist mehrere für diese Regionen in Frage kommenden Gene bekannt. Die zur Untersuchung eingesetzte CGH ist aber entsprechend ihres Auflösungsvermögens eine Screening-Methode, mit der sich keine einzelnen Gene identifizieren lassen. Die vorliegenden Ergebnisse stellen jedoch einen Ausgangspunkt für weitere Arbeiten zur Identifizierung von Genen bzw. Genprodukten dar. Sollte sich in der Zukunft einmal neben der histopathologischen Aufarbeitung der Operationspräparate der Einsatz molekulargenetischer Tests durchsetzen, so könnten sich aus den beschriebenen Faktoren bereits erste Hinweise auf das Metastasierungsverhalten des entsprechenden penilen Plattenepithelkarzinoms ergeben.

## 8. Literatur- und Quellenverzeichnis

- Akduman B, Fleshner NE, Ehrlich L, Klotz L. 2001. Early experience in intermediate-risk penile cancer with sentinel node identification using the gamma probe. *Urology*, 58 (1):65-68.
- Alani RM, Munger K. 1998 Jan. Human papillomaviruses and associated malignancies. *J Clin Oncol* 16 (1):330-337.
- Albers P, Schoeneich G. 2003. Penistumoren. In: Jocham D, Miller K, Hrsg. *Praxis der Urologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 255-262
- Algaba F, Horenblas S, Pizzocaro-Luigi Piva G, Solsona E, Windahl T. 2002. EAU guidelines on penile cancer. *Eur Urol*, 42 (3):199-203.
- Alves G, Heller A, Fiedler W, Campos MM, Claussen U, Ornellas AA, Liehr T. 2001. Genetic Imbalances in 26 Cases of Penile Squamous Cell Carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer*, 31 (1):48-53.
- Aplin AE, Howe A, Alahari SK, Juliano RL. 1998. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol Rev*, 50 (2):197-263.
- Barbosa MS, Schlegel R. 1989. The E6 and E7 genes of HPV-18 are sufficient for inducing two-stage in vitro transformation of human keratinocytes. *Oncogene*, 4 (12):1529-1532.
- Barrasso R, De Brux J, Croissant O, Orth G. 1987. High prevalence of papillomavirus-associated penile intraepithelial neoplasia in sexual partners of women with cervical intraepithelial neoplasia. *N Engl J Med*, 317 (15):916-923.
- Bell LA, Ryan KM. 2004. Life and death decisions by E2F-1. *Cell Death Differ*, 11 (2):137-142.
- Belville WD, Cohen JA. 1992. Secondary penile malignancies: the spectrum of presentation. *J Surg Oncol*, 51 (2):134-137.
- Bentz M, Plesch A, Stilgenbauer S, Dohner H, Lichter P. 1998. Minimal sizes of deletions detected by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer*, 21 (2):172-175.

- Bentz M, Barth TF, Bruderlein S, Bock D, Schwerer MJ, Baudis M, Joos S, Viardot A, Feller AC, Muller-Hermelink HK, Lichter P, Dohner H, Moller P. 2001. Gain of chromosome arm 9p is characteristic of primary mediastinal B-cell lymphoma (MBL): comprehensive molecular cytogenetic analysis and presentation of a novel MBL cell line. *Genes Chromosomes Cancer*, 30 (4):393-401.
- Berdjjs N, Meye A, Nippgen J, Dittert D, Hakenberg O, Baretton GB, Wirth MP. 2005. Expression of Ki-67 in squamous cell carcinoma of the penis. *BJU Int*, 96 (1):146-148.
- Bergers G, Coussens LM. 2000. Extrinsic regulators of epithelial tumor progression: metalloproteinases. *Curr Opin Genet Dev*, 10 (1):120-127.
- Bertolotto M, Serafini G, Dogliotti L, Gandolfo N, Gandolfo NG, Belgrano M, Prefumo F. 2005. Primary and secondary malignancies of the penis: ultrasound features. *Abdom Imaging*, 30 (1):108-112.
- Bezerra ALR, Lopes A, Santiago GH, Ribeiro KCB, Latorre MRDO, Villa LL. 2001. Human papillomavirus as a prognostic factor in carcinoma of the penis: analysis of 82 patients treated with amputation and bilateral lymphadenectomy. *Cancer*, 91 (12):2315-2321.
- Bloss JD, Liao SY, Wilczynski SP, Macri C, Walker J, Peake M, Berman ML. 1991. Clinical and histologic features of vulvar carcinomas analyzed for human papillomavirus status: evidence that squamous cell carcinoma of the vulva has more than one etiology. *Hum Pathol*, 22 (7):711-718.
- Borchers H, Jakse G. 2005. Lymphadenektomie beim Peniskarzinom. Diagnostische und prognostische Bedeutung sowie therapeutischer Nutzen. *Urologe A*, 44 (6):657-661.
- Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, Schiffman MH, Moreno V, Kurman R, Shah KV. 1995. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst*, 87 (11):796-802.
- Bouck N, Stellmach V, Hsu SC. 1996. How tumors become angiogenic. In: Vande Woude GF, Klein G, Hrsg. *Adv Cancer Res*. San Diego, London: Academic Press.Inc: 69:135-174.
- Brkovic D, Kälble T, Dörsam J, Pomer S, Lötzerich C, Banafsche R, Riedasch G, Staehler G. 1997. Surgical treatment of invasive penile cancer--the Heidelberg experience from 1968 to 1994. *Eur Urol*, 31 (3):339-342.

- Bryan TM, Cech TR. 1999. Telomerase and the maintenance of chromosome ends. *Curr Opin Cell Biol*, 11 (3):318-324.
- Bryan TM, Englezou A, Gupta J, Bacchetti S, Reddel RR. 1995. Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. *EMBO J*, 14 (17):4240-4248.
- Buechner SA. 2002. Common skin disorders of the penis. *BJU Int*, 90 (5):498-506.
- Büttner H, Jocham D, Böhle A. 2002. Genitale Infektionen mit humanen Papillomaviren (HPV). *Aktuel Urol*, 33 (6):435-441.
- Bull HA, Brickell PM, Dowd PM. 1994. Src-related protein tyrosine kinases are physically associated with the surface antigen CD36 in human dermal microvascular endothelial cells. *FEBS Lett*, 351 (1):41-44.
- Burgers JK, Badalament RA, Drago JR. 1992. Penile cancer. Clinical presentation, diagnosis, and staging. *Urol Clin North Am*, 19 (2):247-256.
- Cabanas RM. 1997. An approach for treatment of penile carcinoma. *Cancer*, 39 (2):456-466.
- Campbell IG, Russell SE, Choong DY, Montgomery KG, Ciavarella ML, Hooi CS, Cristiano BE, Pearson RB, Phillips WA. 2004. Mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancer. *Cancer Res*, 64 (21):7678-7681.
- Catalona WJ. 1988. Modified inguinal lymphadenectomy for carcinoma of the penis with preservation of saphenous veins: technique and preliminary results. *J Urol*, 140 (2):306-310.
- Chambers AF, Matrisian LM. 1997. Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J Natl Cancer Inst*, 89 (17):1260-1270.
- Chan PT, Begin LR, Arnold D, Jacobson SA, Corcos J, Brock GB. 1998. Priapism secondary to penile metastasis: a report of two cases and a review of the literature. *J Surg Oncol*, 68 (1):51-59.
- Cheung TH, Lo KW, Yim SF, Chan LK, Heung MS, Chan CS, Cheung AY, Chung TK, Wong YF. 2004. Epigenetic and genetic alternation of PTEN in cervical neoplasm. *Gynecol Oncol*, 93 (3):621-627.
- Chin L, Pomerantz J, DePinho RA. 1998. The INK4a/ARF tumor suppressor: one gene--two products--two pathways. *Trends Biochem Sci*, 23 (8):291-296.

- Christofori G, Semb H. 1999. The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem Sci*, 24 (2):73-76.
- Cordon-Cardo C, Prives C. 1999. At the crossroads of inflammation and tumorigenesis. *J Exp Med*, 190 (10):1367-1370.
- Counter CM, Avilion AA, LeFeuvre CE, Stewart NG, Greider CW, Harley CB, Bacchetti S. 1992. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J*, 11 (5):1921-1929.
- Coussens LM, Werb Z. 1996. Matrix metalloproteinases and the development of cancer. *Chem Biol*, 3 (11):895-904.
- Coussens LM, Raymond WW, Bergers G, Laig-Webster M, Behrendtsen O, Werb Z, Caughey GH, Hanahan D. 1999. Inflammatory mast cells up-regulate angiogenesis during squamous epithelial carcinogenesis. *Genes Dev*, 13 (11):1382-1397.
- Crook J, Grimard L, Tsihlias J, Morash C, Panzarella T. 2002. Interstitial brachytherapy for penile cancer: an alternative to amputation. *J Urol*, 167 (2 Pt 1):506-511.
- Crook JM, Jezioranski J, Grimard L, Esche B, Pond G. 2005. Penile brachytherapy: results for 49 patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 62 (2):460-467.
- Cubilla AL, Reuter V, Velazquez E, Piris A, Saito S, Young RH. 2001. Histologic classification of penile carcinoma and its relation to outcome in 61 patients with primary resection. *Int J Surg Pathol*, 9 (2):111-120.
- Cubilla AL, Reuter VE, Gregoire L, Ayala G, Ocampos S, Lancaster WD, Fair W. 1998. Basaloid squamous cell carcinoma: a distinctive human papilloma virus-related penile neoplasm: a report of 20 cases. *Am J Surg Pathol*, 22 (6):755-761.
- Culkin DJ, Beer TM. 2003. Advanced penile carcinoma. *J Urol*, 170 (2 Pt 1):359-365.
- Cupp MR, Malek RS, Goellner JR, Smith TF, Espy MJ. 1995. The detection of human papillomavirus deoxyribonucleic acid in intraepithelial, in situ, verrucous and invasive carcinoma of the penis. *J Urol*, 154 (3):1024-1029.



- D'Ancona CAL, de Lucena RG, de Oliveira Querne FA, Martins MHT, Denardi F, Netto NR, jr. 2004. Long-Term Followup of Penile Carcinoma Treated with Penectomy and Bilateral Modified Inguinal Lymphadenectomy. *J Urol*, 172 (2):498-501.
- Daling JR, Madeleine MM, Johnson LG, Schwartz SM, Shera KA, Wurscher MA, Carter JJ, Porter PL, Galloway DA, McDougall JK, Krieger JN. 2005. Penile cancer: importance of circumcision, human papillomavirus and smoking in in situ and invasive disease. *Int J Cancer*, 116 (4):606-616.
- Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, Bouck N. 1994. Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science*, 265 (5178):1582-1584.
- Datto MB, Hu PP, Kowalik TF, Yingling J, Wang XF. 1997. The viral oncoprotein E1A blocks transforming growth factor beta-mediated induction of p21/WAF1/Cip1 and p15/INK4B. *Mol Cell Biol*, 17 (4):2030-2037.
- Delannes M, Malavaud B, Douchez J, Bonnet J, Daly NJ. 1992. Iridium-192 interstitial therapy for squamous cell carcinoma of the penis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 24 (3):479-483.
- Dellas A, Torhorst J, Schultheiss E, Mihatsch MJ, Moch H. 2002. DNA sequence losses on chromosomes 11p and 18q are associated with clinical outcome in lymph node-negative ductal breast cancer. *Clin Cancer Res*, 8 (5):1210-1216.
- Deman J, Van Larebeke N. 2001. Carcinogenesis: mutations and mutagens. *Tumour Biol*, 22 (3):191-202.
- Di Fiore PP, Pierce JH, Kraus MH, Segatto O, King CR, Aaronson SA. 1987. erbB-2 is a potent oncogene when overexpressed in NIH/3T3 cells. *Science*, 237 (4811):178-182.
- Dillner J, von Krogh G, Horenblas S, Meijer CJ. 2000. Etiology of squamous cell carcinoma of the penis. *Scand J Urol Nephrol*, 34 (Suppl 205):189-193.
- Doehn C, Feyerabend T. 2001. Radiochemotherapie des Peniskarzinoms. *Urologe A*, 40 (4):313-314.
- du Manoir S, Speicher MR, Joos S, Schrock E, Popp S, Dohner H, Kovacs G, Robert-Nicoud M, Lichter P, Cremer T. 1993. Detection of complete and partial chromosome gains and losses by comparative genomic in situ hybridization. *Hum Genet*, 90 (6):590-610.
- Dyson N, Howley PM, Munger K, Harlow E. 1989. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science*, 243 (4893):934-937.

- Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA, Hrsg. 2004. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. Lyon: IARC Press:279-298.
- Emerson RE, Ulbright TM, Eble JN, Geary WA, Eckert GJ, Cheng L. 2001. Predicting cancer progression in patients with penile squamous cell carcinoma: the importance of depth of invasion and vascular invasion. *Mod Pathol*, 14 (10):963-968.
- Fedi P, Tronick SR, Aaronson SA. 1997. Growth factors. In: Holland JF, Bast RC, Morton DL, Frei E, Kufe DW, Weichselbaum RR, Hrsg. *Cancer Medicine*. Baltimore: Williams and Wilkins:41-64.
- Ferenczy A, Bergeron C, Richart RM. 1989. Human papillomavirus DNA in fomites on objects used for the management of patients with genital human papillomavirus infections. *Obstet Gynecol*, 74 (6):950-954.
- Ficarra V, Martignoni G, Maffei N, Cerruto MA, Novara G, Cavalleri S, Artibani W. 2002. Predictive pathological factors of lymph nodes involvement in the squamous cell carcinoma of the penis. *Int Urol Nephrol*, 34 (2):245-250.
- Folkman J. 1997. Tumor angiogenesis. In: Holland JF, Bast, R.C., Morton, D.L., Frei, E., Kufe, D.W., Weichselbaum, R.R, Hrsg. *Cancer Medicine*. Baltimore: Williams & Wilkins, 181-204.
- Fraley EE, Zhang G, Manivel C, Niehans GA. 1989. The role of ilioinguinal lymphadenectomy and significance of histological differentiation in treatment of carcinoma of the penis. *J Urol*, 142 (6):1478-1482.
- Frimberger D, Hungerhuber E, Zaak D, Waidelich R, Hofstetter A, Schneede P. 2002. Penile carcinoma. Is Nd:YAG laser therapy radical enough? *J Urol*, 168 (6):2418-2421; discussion 2421.
- Gall JG, Pardue ML. 1969. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 63 (2):378-383.
- Gebhart E. 2004. Comparative genomic hybridization (CGH): ten years of substantial progress in human solid tumor molecular cytogenetics. *Cytogenet Genome Res*, 104 (1-4):352-358.
- Gebhart E, Ries J, Wiltfang J, Liehr T, Efferth T. 2004. Genomic gain of the epidermal growth factor receptor harboring band 7p12 is part of a complex pattern of genomic imbalances in oral squamous cell carcinomas. *Arch Med Res*, 35 (5):385-394.

- Gerbaulet A, Lambin P. 1992. Radiation therapy of cancer of the penis. Indications, advantages, and pitfalls. *Urol Clin North Am*, 19 (2):325-332.
- Giancotti FG, Ruoslahti E. 1999. Integrin signaling. *Science*, 285 (5430):1028-1032.
- Gonzalez MV, Pello MF, Lopez-Larrea C, Suarez C, Menendez MJ, Coto E. 1997. Deletion and methylation of the tumour suppressor gene p16/CDKN2 in primary head and neck squamous cell carcinoma. *J Clin Pathol*, 50 (6):509-512.
- Green DR, Reed JC. 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science*, 281 (5381):1309-1312.
- Gribble SM, Sinclair PB, Grace C, Green AR, Nacheva EP. 1999. Comparative analysis of G-banding, chromosome painting, locus-specific fluorescence in situ hybridization, and comparative genomic hybridization in chronic myeloid leukemia blast crisis. *Cancer Genet Cytogenet*, 111 (1):7-17.
- Griffiths TRL, Mellon JK. 1999. Humanpapillomavirus and urological tumours: I. Basic science and role in penile cancer. *BJU Int*, 84 (5):579-586.
- Grizzi F, Di Ieva A, Russo C, Frezza EE, Cobos E, Muzzio PC, Chiriva-Internati M. 2006. Cancer initiation and progression: an unsimplifiable complexity. *Theor Biol Med Model*, 3:37.
- Haas GP, Blumenstein BA, Gagliano RG, Russell CA, Rivkin SE, Culkin DJ, Wolf M, Crawford ED. 1999. Cisplatin, methotrexate and bleomycin for the treatment of carcinoma of the penis: a Southwest Oncology Group study. *J Urol*, 161 (6):1823-1825.
- Hakenberg OW, Nippgen JB, Froehner M, Zastrow S, Wirth MP. 2006. Cisplatin, methotrexate and bleomycin for treating advanced penile carcinoma. *BJU Int*, 98 (6):1225-1227.
- Hanahan D, Folkman J. 1996. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, 86 (3):353-364.
- Hanahan D, Weinberg RA. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100 (1):57-70.
- Hannon GJ, Beach D. 1994. p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature*, 371 (6494):257-261.

- Harada T, Shiraishi K, Kusano N, Umayahara K, Kondoh S, Okita K, Sasaki K. 2000. Evaluation of the reliability of chromosomal imbalances detected by combined use of universal DNA amplification and comparative genomic hybridization. *Jpn J Cancer Res*, 91 (11):1119-1125.
- Harish K, Ravi R. 1995. The role of tobacco in penile carcinoma. *Br J Urol*, 75 (3):375-377.
- Harris CC. 1996. p53 tumor suppressor gene: from the basic research laboratory to the clinic--an abridged historical perspective. *Carcinogenesis*, 17 (6):1187-1198.
- Hawley-Nelson P, Vousden KH, Hubbert NL, Lowy DR, Schiller JT. 1989. HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *EMBO J*, 8 (12):3905-3910.
- Hellberg D, Valentin J, Eklund T, Nilsson S. 1987. Penile cancer: is there an epidemiological role for smoking and sexual behaviour? *Br Med J (Clin Res Ed)*, 295 (6609):1306-1308.
- Hermesen MA, Joenje H, Arwert F, Braakhuis BJ, Baak JP, Westerveld A, Slater R. 1997. Assessment of chromosomal gains and losses in oral squamous cell carcinoma by comparative genomic hybridisation. *Oral Oncol*, 33 (6):414-418.
- Heselmeyer K, Schrock E, du Manoir S, Blegen H, Shah K, Steinbeck R, Auer G, Ried T. 1996. Gain of chromosome 3q defines the transition from severe dysplasia to invasive carcinoma of the uterine cervix. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93 (1):479-484.
- Hirose Y, Aldape K, Takahashi M, Berger MS, Feuerstein BG. 2001. Tissue microdissection and degenerate oligonucleotide primed-polymerase chain reaction (DOP-PCR) is an effective method to analyze genetic aberrations in invasive tumors. *J Mol Diagn*, 3 (2):62-67.
- Hoffman MA, Renshaw AA, Loughlin KR. 1999. Squamous cell carcinoma of the penis and microscopic pathologic margins: how much margin is needed for local cure? *Cancer*, 85 (7):1565-1568.
- Hogg RP, Honorio S, Martinez A, Agathangelou A, Dallol A, Fullwood P, Weichselbaum R, Kuo MJ, Maher ER, Latif F. 2002. Frequent 3p allele loss and epigenetic inactivation of the RASSF1A tumour suppressor gene from region 3p21.3 in head and neck squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer*, 38 (12):1585-1592.
- Holmgren L, Szeles A, Rajnavolgyi E, Folkman J, Klein G, Ernberg I, Falk KI. 1999. Horizontal transfer of DNA by the uptake of apoptotic bodies. *Blood*, 93 (11):3956-3963.

- Horenblas S. 2001a. Lymphadenectomy for squamous cell carcinoma of the penis. Part 1: diagnosis of lymph node metastasis. *BJU Int*, 88 (5):467-472.
- Horenblas S. 2001b. Lymphadenectomy for squamous cell carcinoma of the penis. Part 2: the role and technique of lymph node dissection. *BJU Int*, 88 (5):473-483.
- Horenblas S, van Tinteren H. 1994. Squamous cell carcinoma of the penis. IV. Prognostic factors of survival: analysis of tumor, nodes and metastasis classification system. *J Urol*, 151 (5):1239-1243.
- Horenblas S, van Tinteren H, Delemarre JF, Moonen LM, Lustig V, van Waardenburg EW. 1993. Squamous cell carcinoma of the penis. III. Treatment of regional lymph nodes. *J Urol*, 149 (3):492-497.
- Horenblas S, Jansen L, Meinhardt W, Hoefnagel CA, de Jong D, Nieweg OE. 2000. Detection of occult metastasis in squamous cell carcinoma of the penis using a dynamic sentinel node procedure. *J Urol*, 163 (1):100-104.
- Huang Q, Schantz SP, Rao PH, Mo J, McCormick SA, Chaganti RS. 2000. Improving degenerate oligonucleotide primed PCR-comparative genomic hybridization for analysis of DNA copy number changes in tumors. *Genes Chromosomes Cancer*, 28 (4):395-403.
- Hubbell CR, Rabin VR, Mora RG. 1988. Cancer of the skin in blacks. V. A review of 175 black patients with squamous cell carcinoma of the penis. *J Am Acad Dermatol*, 18 (2 Pt 1):292-298.
- Hudson JD, Shoaibi MA, Maestro R, Carnero A, Hannon GJ, Beach DH. 1999. A proinflammatory cytokine inhibits p53 tumor suppressor activity. *J Exp Med*, 190 (10):1367-1370.
- Hussein AM, Benedetto P, Sridhar KS. 1990. Chemotherapy with cisplatin and 5-fluorouracil for penile and urethral squamous cell carcinomas. *Cancer*, 65 (3):433-438.
- Jeschke K. 2001. Peniskarzinom. *J Urol Urogynäkol* 8(Sonderheft 3):29-31.
- Jeuken JW, Sprenger SHE, Wesseling P. 2002 Comparative Genomic Hybridization: Practical Guidelines. *Diagn Mol Patho*, 11 (4):193-203.
- Jin Y, Jin C, Wennerberg J, Höglund M, Mertens F. 2001 Oct. Cytogenetic and fluorescence in situ hybridization characterization of chromosome 8 rearrangements in head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Genet Cytogenet*, 130 (2):111-117.

- Jin Y, Martins, C. J, C., Salemark L, Jonsson N, Persson B, Roque L, Fonseca I, Wennerberg J. 1999 Dec. Nonrandom karyotypic features in squamous cell carcinomas of the skin. *Genes Chromosomes Cancer*, 26 (4):295-303.
- Johnsen M, Lund LR, Romer J, Almholt K, Dano K. 1998 Oct. Cancer invasion and tissue remodeling: common themes in proteolytic matrix degradation. *Curr Opin Cell Biol*, 10 (5):667-671.
- Kallioniemi A, Visakorpi T, Karhu R, Pinkel D, Kallioniemi OP. 1996 Feb. Gene Copy Number Analysis by Fluorescence in Situ Hybridization and Comparative Genomic Hybridization. *Methods*, 9 (1):113-121.
- Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D. 1992. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*, 258 (5083):818-821.
- Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D. 1993 Feb. Comparative genomic hybridization: a rapid new method for detecting and mapping DNA amplification in tumors. *Semin Cancer Biol*, 4 (1):41-46.
- Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Piper J, Isola J, Waldman FM, Gray JW, Pinkel D. 1994 Aug. Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chromosomes Cancer*, 10 (4):231-243.
- Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavtigian SV, Stockert E, Day R Sr, Johnson BE. 1994 Apr. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science*, 264 (5157):436-440.
- Kassen A, Hofmockel G. 2000. Molekulargenetische und zellbiologische Grundlagen der Entstehung von malignen Tumoren. *Urologe (A)*, 39 (3):214-221.
- Kirchhoff M, Gerdes T, Maahr J, Rose H, Lundsteen C. 1997. Automatic correction of the interfering effect of unsuppressed interspersed repetitive sequences in comparative genomic hybridization analysis. *Cytometry*, 28 (2):130-134.
- Kitayama Y, Igarashi H, Watanabe F, Maruyama Y, Kanamori M, Sugimura H. 2003 Sep. Nonrandom chromosomal numerical abnormality predicting prognosis of gastric cancer: a retrospective study of 51 cases using pathology archives. *Lab Invest*, 83 (9):1311-1320.

- Kommu S, Hadway P, Watkin N. 2005. Squamous cell carcinoma antigen as a biomarker for penile cancer. *BJU Int*, 95 (4):478-479.
- Korc M, Meltzer P, Trent J. 1986. Enhanced expression of epidermal growth factor receptor correlates with alterations of chromosome 7 in human pancreatic cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83 (14):5141-5144.
- Kramer W, Jonas D. 1997. Indikation zur Lymphknotenbiopsie bei urologischen Tumoren. *Urologe (B)*, 37 (5):449-450.
- Kroon BK, Horenblas S, Meinhardt W, van der Poel HG, Bex A, van Tinteren H, Valdes Olmos RA, Nieweg OE. 2005. Dynamic sentinel node biopsy in penile carcinoma: evaluation of 10 years experience. *Eur Urol*, 47 (5):601-606; discussion 606.
- Krtolica A, Campisi J. 2002. Cancer and aging: a model for the cancer promoting effects of the aging stroma. *Int J Biochem Cell Biol*, 34 (11):1401-1414.
- Kujawski M, Jarmuz M, Rydzanicz M, Szukala K, Wierzbicka M, Grenman R, Golusinski W, Szyfter K. 2004. Frequent chromosome Y loss in primary, second primary and metastatic squamous cell carcinomas of the head and neck region. *Cancer Lett*, 208 (1):95-101.
- Kulkarni JN, Kamat MR. 1994. Prophylactic bilateral groin node dissection versus prophylactic radiotherapy and surveillance in patients with N0 and N1-2A carcinoma of the penis. *Eur Urol*, 26 (2):123-128.
- Kuukasjarvi T, Tanner M, Pennanen S, Karhu R, Visakorpi T, Isola J. 1997. Optimizing DOP-PCR for universal amplification of small DNA samples in comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer*, 18 (2):94-101.
- Laniado ME, Lowdell C, Mitchell H, Christmas TJ. 2003. Squamous cell carcinoma antigen: a role in the early identification of nodal metastases in men with squamous cell carcinoma of the penis. *BJU Int*, 92 (3):248-250.
- Larramendy ML, El-Rifai W, Knuutila S. 1998. Comparison of fluorescein isothiocyanate- and Texas red-conjugated nucleotides for direct labeling in comparative genomic hybridization. *Cytometry*, 31 (3):174-179.
- Latif F, Tory K, Gnarr J, Yao M, Duh FM, Orcutt ML, Stackhouse T, Kuzmin I, Modi W, Geil L, et al. 1993. Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science*, 260 (5112):1317-1320.

- Leewansangtong S, Srinualnad S, Chaiyaprasithi B, Taweemonkongsap T, Soontrapa S. 2001. The risks of lymph node metastasis and the prognostic factors in carcinoma of the penis: analysis of 50 patients treated with bilateral ilioinguinal lymphadenectomy. *J Med Assoc Thai*, 84 (2):204-211.
- Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. 1998. Genetic instabilities in human cancers. *Nature*, 396 (6712):643-649.
- Levine AJ. 1997. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, 88 (3):323-331.
- Lichter P, Fischer K, Joos S, Fink T, Baudis M, Potkul RK, Ohl S, Solinas-Toldo S, Weber R, Stilgenbauer S, Bentz M, Dohner H. 1996. Efficacy of current molecular cytogenetic protocols for the diagnosis of chromosome aberrations in tumor specimens. *Cytokines Mol Ther*, 2 (3):163-169.
- Liu M, Lawson G, Delos M, Jamart J, Ide C, Coche E, Weynand B, Desuter G, Hamoir M, Remacle M, Marbaix E. 2003. Predictive value of the fraction of cancer cells immunolabeled for proliferating cell nuclear antigen or Ki67 in biopsies of head and neck carcinomas to identify lymph node metastasis: comparison with clinical and radiologic examinations. *Head Neck*, 25 (4):280-288.
- Loeb LA. 1991. Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer Res*, 51 (12):3075-3079.
- Lohmann CM, Solomon AR. 2001. Clinicopathologic variants of cutaneous squamous cell carcinoma. *Adv Anat Pathol*, 8 (1):27-36.
- Lont AP, Kroon BK, Horenblas S, Gallee MP, Berkhof J, Meijer CJ, Snijders PJ. 2006. Presence of high-risk human papillomavirus DNA in penile carcinoma predicts favorable outcome in survival. *Int J Cancer*, 119 (5):1078-1081.
- Lopes A, Bezerra AL, Pinto CA, Serrano SV, de Mell OC, Villa LL. 2002. p53 as a new prognostic factor for lymph node metastasis in penile carcinoma: analysis of 82 patients treated with amputation and bilateral lymphadenectomy. *J Urol*, 168 (1):81-86.
- Lukashev ME, Werb Z. 1998. ECM signalling: orchestrating cell behaviour and misbehaviour. *Trends Cell Biol*, 8 (11):437-441.
- Lümmen G, Sperling H, Pietsch M, Otto T, Rübber H. 1997. Behandlung und Verlauf von Patienten mit Plattenepithelkarzinom des Penis. *Urologe A*, 36 (2):157-161.



- Lynch DF, Jr., Pettaway CA. 2003. Tumors of the penis. In: Walsh PC, Retik, A.B., Vaughan, E.D., Wein, A.J., Hrsg. Campbell's Urology. Ed 8. Chapter 83. Oxford: Elsevier.LTD.
- Macoska JA, Trybus TM, Benson PD, Sakr WA, Grignon DJ, Wojno KD, Pietruk T, Powell IJ. 1995. Evidence for three tumor suppressor gene loci on chromosome 8p in human prostate cancer. *Cancer Res*, 55 (22):5390-5395.
- Mahlamäki EH, Hoglund M, Gorunova L, Karhu R, Dawiskiba S, Andren-Sandberg A, Kallioniemi OP, Johansson B. 1997. Comparative genomic hybridization reveals frequent gains of 20q, 8q, 11q, 12p, and 17q, and losses of 18q, 9p, and 15q in pancreatic cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, 20 (4):383-391.
- Mahlmann B, Doehn C, Feyerabend T. 2001. Strahlentherapie des Peniskarzinoms. *Urologe A*, 40 (4):308-312.
- Martins AC, Faria SM, Cologna AJ, Suaid HJ, Tucci S, Jr. 2002. Immunoexpression of p53 protein and proliferating cell nuclear antigen in penile carcinoma. *J Urol*, 167 (1):89-92.
- Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wykoff CC, Pugh CW, Maher ER, Ratcliffe PJ. 1999. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*, 399 (6733):271-275.
- Mazeron JJ, Langlois D, Lobo PA, Huart JA, Calitchi E, Lusinchi A, Raynal M, Le Bourgeois JP, Abbou CC, Pierquin B. 1984. Interstitial radiation therapy for carcinoma of the penis using iridium 192 wires: the Henri Mondor experience (1970-1979). *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 10 (10):1891-1895.
- McDougal WS, Kirchner FK, Jr., Edwards RH, Killion LT. 1986. Treatment of carcinoma of the penis: the case for primary lymphadenectomy. *J Urol*, 136 (1):38-41.
- Mertens F, Johansson B, Mitelman F. 1994. Isochromosomes in neoplasia. *Genes Chromosomes Cancer*, 10 (4):221-230.
- Micali G, Innocenzi D, Nasca MR, Musumeci ML, Ferrau F, Greco M. 1996. Squamous cell carcinoma of the penis. *J Am Acad Dermatol*, 35 (3 Pt 1):432-451.
- Milathianakis C, Bogdanos J, Karamanolakis D. 2005. Morbidity of prophylactic inguinal lymphadenectomy with saphenous vein preservation for squamous cell penile carcinoma. *Int J Urol*, 12 (8):776-778.

- Minhas S, Kayes O, Hegarty P, Kumar P, Freeman A, Ralph D. 2005. What surgical resection margins are required to achieve oncological control in men with primary penile cancer? *BJU Int*, 96 (7):1040-1043.
- Misra S, Chaturvedi A, Misra NC. 2004. Penile carcinoma: a challenge for the developing world. *Lancet Oncol*, 5 (4):240-247.
- Modrow S, Falke D. 1997. *Molekulare Virologie*. Heidelberg Berlin Oxford: Spektrum Akademischer Verlag.
- Mohs FE, Snow SN, Messing EM, Kuglitsch ME. 1985. Microscopically controlled surgery in the treatment of carcinoma of the penis. *J Urol*, 133 (6):961-966.
- Mölling K. 1991. Beziehung zwischen Viren und bösartigen Geschwülsten(2): Molekularbiologie der Onkogenese. In: Hahn D, Falke D, Klein P, Hrsg. *Medizinische Mikrobiologie*. Berlin Heidelberg New York: Springer Verlag:654-675.
- Moore DH, 2nd, Pallavicini M, Cher ML, Gray JW. 1997. A t-statistic for objective interpretation of comparative genomic hybridization (CGH) profiles. *Cytometry*, 28 (3):183-190.
- Mortensen PH. 1987. The Buschke-Lowenstein tumour or verrucous carcinoma of the penis. *Aust N Z J Surg*, 57 (1):37-40.
- Moses S, Bailey RC, Ronald AR. 1998. Male circumcision: assessment of health benefits and risks. *Sex Transm Infect*, 74 (5):368-373.
- Muralidhar B, Goldstein LD, Ng G, Winder DM, Palmer RD, Gooding EL, Barbosa-Morais NL, Mukherjee G, Thorne NP, Roberts I, Pett MR, Coleman N. 2007. Global microRNA profiles in cervical squamous cell carcinoma depend on Drosha expression levels. *J Pathol*, 212 (4):368-377.
- Nasca MR, Innocenzi D, Micali G. 1999. Penile cancer among patients with genital lichen sclerosus. *J Am Acad Dermatol*, 41 (6):911-914.
- Naumann CM, van der Horst C, Seif C, Jünemann K-P. 2005a. Diagnostik und Therapie des Peniskarzinoms. *Blickpunkt Der Mann*, 3 (3-4):29-36.
- Naumann CM, Filippow N, Seif C, van der Horst C, Roelver L, Braun PM, Juenemann KP, Portillo FJ. 2005b. Penile carcinoma (pT1 G2): surveillance or inguinal lymph node dissection? *Onkologie*, 28 (3):135-138.

- Ornellas AA, Seixas AL, Marota A, Wisnescky A, Campos F, de Moraes JR. 1994. Surgical treatment of invasive squamous cell carcinoma of the penis: retrospective analysis of 350 cases. *J Urol*, 151 (5):1244-1249.
- Otto T, Suhr J, Krega S, Rübber H. 2003. Die Therapie des fortgeschrittenen Peniskarzinoms. *Urologe A*, 42 (11):1466-1469.
- Pardue ML, Gall JG. 1969. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 64 (2):600-604.
- Parra O. 1996. Accurate staging of carcinoma of the penis in men with nonpalpable inguinal lymph nodes by modified inguinal lymphadenectomy. *J Urol*, 155 (2):560-563.
- Paul R, van Randenborgh H, Scholer S, May F, Hartung R. 2005. Peniskarzinom - Nachsorge mit Konsequenz. Wie viel ist notwendig? *Urologe A*, 44 (9):1031-1036.
- Pearlstein RP, Benninger MS, Carey TE, Zarbo RJ, Torres FX, Rybicki BA, Dyke DL. 1998. Loss of 18q predicts poor survival of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Genes Chromosomes Cancer*, 21 (4):333-339.
- Pedrick TJ, Wheeler W, Riemenschneider H. 1993. Combined modality therapy for locally advanced penile squamous cell carcinoma. *Am J Clin Oncol*, 16 (6):501-505.
- Perinetti E, Crane DB, Catalona WJ. 1980. Unreliability of sentinel lymph node biopsy for staging penile carcinoma. *J Urol*, 124 (5):734-735.
- Petersen I, Schwendel A, Bockmuhl U, Dietel M. 1996. Die komparative genomische Hybridisierung. Eine Screeningmethode in der genetischen Tumordiagnostik. *Pathologe*, 17 (5):333-341.
- Petersen S, Rudolf J, Bockmuhl U, Gellert K, Wolf G, Dietel M, Petersen I. 1998. Distinct regions of allelic imbalance on chromosome 10q22-q26 in squamous cell carcinomas of the lung. *Oncogene*, 17 (4):449-454.
- Pettaway CA, Pisters LL, Dinney CP, Jularbal F, Swanson DA, von Eschenbach AC, Ayala A. 1995. Sentinel lymph node dissection for penile carcinoma: the M. D. Anderson Cancer Center experience. *J Urol*, 154 (6):1999-2003.

- Pietrzak P, Corbishley C, Watkin N. 2004. Organ-sparing surgery for invasive penile cancer: early follow-up data. *BJU Int*, 94 (9):1253-1257.
- Pizzocaro G, Piva L, Bandieramonte G, Tana S. 1997. Up-to-date management of carcinoma of the penis. *Eur Urol*, 32 (1):5-15.
- Pizzocaro G, Nicolai N, Milani A. 2008. Taxanes in Combination with Cisplatin and Fluorouracil for Advanced Penile Cancer: Preliminary Results. *Eur Urol*, 55(3):546-551.
- Poetsch M, Schuart BJ, Schwesinger G, Kleist B, Protzel C. 2007. Screening of microsatellite markers in penile cancer reveals differences between metastatic and nonmetastatic carcinomas. *Mod Pathol*, 20 (10):1069-1077.
- Pow-Sang MR, Benavente V, Pow-Sang JE, Morante C, Meza L, Baker M, Pow-Sang JM. 2002. Cancer of the penis. *Cancer Control*, 9 (4):305-314.
- Preis E, Albers P, Jakse G. 2006. Die systemische Therapie des Peniskarzinoms. *Urologe A*, 45 (5):609-613.
- Pride HB, Miller OF, 3rd, Tyler WB. 1993. Penile squamous cell carcinoma arising from balanitis xerotica obliterans. *J Am Acad Dermatol*, 29 (3):469-473.
- Protzel C, Schuart BJ, Zimmermann U, Poetsch M, Schwesinger G, Klebingat K-J. 2006. Microsatellite analysis in penile carcinomas - identification of possible metastasis-related molecular genetic aberrations. *Urologe*, 45 (Suppl 1):89.
- Pryor JP, Ralph DJ. 2001. Benign and malignant disorders of the penis. In: Weiss RM, George NJR, O'Reilly PH, Hrsg. *Comprehensive Urology*. London: Mosby International Ltd:613-622.
- Rak J, Filmus J, Finkenzeller G, Grugel S, Marme D, Kerbel RS. 1995. Oncogenes as inducers of tumor angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev*, 14 (4):263-277.
- Rassner G. 1992. Erkrankungen der äußeren Geschlechtsorgane. In: Rassner G, Steinert U, Hrsg. *Dermatologie: Lehrbuch und Atlas*. 4.Aufl. München Wien Baltimore: Urban und Schwarzenberg:331-357.
- Ravi R. 1993a. Prophylactic lymphadenectomy vs observation vs inguinal biopsy in node-negative patients with invasive carcinoma of the penis. *Jpn J Clin Oncol*, 23 (1):53-58.

- Ravi R. 1993b. Morbidity following groin dissection for penile carcinoma. *Br J Urol*, 72 (6):941-945.
- Ravi R. 1993c. Correlation between the extent of nodal involvement and survival following groin dissection for carcinoma of the penis. *Br J Urol*, 72 (5 Pt 2):817-819.
- Ravi R, Chaturvedi HK, Sastry DV. 1994. Role of radiation therapy in the treatment of carcinoma of the penis. *Br J Urol*, 74 (5):646-651.
- Redon R, Muller D, Caulee K, Wanherdrick K, Abecassis J, du Manoir S. 2001. A simple specific pattern of chromosomal aberrations at early stages of head and neck squamous cell carcinomas: PIK3CA but not p63 gene as a likely target of 3q26-qter gains. *Cancer Res*, 61 (10):4122-4129.
- Ried T, Just KE, Holtgreve-Grez H, du Manoir S, Speicher MR, Schrock E, Latham C, Blegen H, Zetterberg A, Cremer T, et al. 1995. Comparative genomic hybridization of formalin-fixed, paraffin-embedded breast tumors reveals different patterns of chromosomal gains and losses in fibroadenomas and diploid and aneuploid carcinomas. *Cancer Res*, 55 (22):5415-5423.
- Riede UN, Wiestler O, Wehner H, Müller HJ, Klein PJ. 1989. Störungen des Zellwachstums - Autonomes Zellwachstum (Tumorpathologie). In: Riede UN, Schaefer HE, Wehner H, Hrsg. *Allgemeine und spezielle Pathologie*, 2.Aufl. Stuttgart-New York: Thieme:302-333.
- Robert-Koch-Institut. 1/2004. Krebsinzidenz 2000 (Jahresbericht), Berlin: Gemeinsames Krebsregister.
- Robert-Koch-Institut. 2006. Dachdokumentation Krebs.
- Roth K, Wolf G, Dietel M, Petersen I. 1996. Analyseprogramm zur quantitativen Erfassung chromosomaler Aberrationen mittels komparativer genomischer Hybridisierung (CGH). *Pathologe*, 17 (5):342-348.
- Rubin MA, Kleter B, Zhou M, Ayala G, Cubilla AL, Quint WG, Pirog EC. 2001. Detection and typing of human papillomavirus DNA in penile carcinoma: evidence for multiple independent pathways of penile carcinogenesis. *Am J Pathol*, 159 (4):1211-1218.
- Salazar EL, Mercado E, Calzada L. 2005. Human papillomavirus hpv-16 DNA as an epitheliotropic virus that induces hyperproliferation in squamous penile tissue. *Arch Androl*, 51 (4):327-334.
- Sanchez-Ortiz RF, Pettaway CA. 2003. Natural history, management, and surveillance of recurrent squamous cell penile carcinoma: a risk-based approach. *Urol Clin North Am*, 30 (4):853-867.

- Sanchez-Ortiz RF, Pettaway CA. 2004. The role of lymphadenectomy in penile cancer. *Urol Oncol*, 22 (3):236-244; discussion 244-235.
- Sauter G, Carroll P, Moch H, Kallioniemi A, Kerschmann R, Narayan P, Mihatsch MJ, Waldman FM. 1995. c-myc copy number gains in bladder cancer detected by fluorescence in situ hybridization. *Am J Pathol*, 146 (5):1131-1139.
- Savelyeva L, Claas A, Matzner I, Schlag P, Hofmann W, Scherneck S, Weber B, Schwab M. 2001. Constitutional genomic instability with inversions, duplications, and amplifications in 9p23-24 in BRCA2 mutation carriers. *Cancer Res*, 61 (13):5179-5185.
- Scher B, Seitz M, Reiser M, Hungerhuber E, Hahn K, Tiling R, Herzog P, Schneede P, Dresel S. 2005. 18F-FDG PET/CT for staging of penile cancer. *J Nucl Med*, 46 (9):1460-1465.
- Schneede P. 2001. Leitlinien zur Diagnostik und Therapie von Genitalerkrankungen durch Humane Papillomaviren (HPV) - Leitlinien der DGU. *Urologe (A)*, 40 (6):511-520.
- Schneede P. 2002. Genital human papillomavirus infections. *Curr Opin Urol*, 12 (1):57-61.
- Schneede P, Frimberger D, Zaak D, Hofstetter A. 2001 March. Fluorescence Diagnosis of Penile Carcinoma - a New Technique to Assist and Control Nd:YAG-Laser Therapy. *Med Laser Appl*, 16 (1):43-48.
- Schneede P, Munch P, Wagner S, Meyer T, Stockfleth E, Hofstetter A. 2001. Fluorescence urethroscopy following instillation of 5-aminolevulinic acid: a new procedure for detecting clinical and subclinical HPV lesions of the urethra. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 15 (2):121-125.
- Schneede P, Frimberger D, May F, Würschmidt F, Schneller F, Rothenberger K-H. 2003. Peniskarzinom. In: Liedl B, Tumorzentrum München, Hrsg. *Manual Urogenitale Tumoren*. 3.Aufl. München Wien New York:W Zuckschwerdt:127-140.
- Schoeneich G, Heimbach D, Müller SC. 1999. Peniskarzinom. *J Urol Urogynäkol*, 6 (1):16-27.
- Schubert J, Nitzsche H. 1988. Zur Invasivität der Lymphadenektomie beim Peniskarzinom. *Z Urol Nephrol*, 81 (4):239-246.
- Seibold S, Rudroff C, Weber M, Galle J, Wanner C, Marx M. 2003. Identification of a new tumor suppressor gene located at chromosome 8p21.3-22. *FASEB J*, 17 (9):1180-1182.

- Shaffer LG, Tommerup N, Hrsg. 2005. ISCN 2005 - An International System for Human Genetic Nomenclature (2005). Basel: S. Karger AG.
- Shay JW, Bacchetti S. 1997. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer*, 33 (5):787-791.
- Shimizu N, Kondo I, Gamou S, Behzadian MA, Shimizu Y. 1984. Genetic analysis of hyperproduction of epidermal growth factor receptors in human epidermoid carcinoma A431 cells. *Somat Cell Mol Genet*, 10 (1):45-53.
- Shimizu T, Izumi H, Oga A, Furumoto H, Murakami T, Ofuji R, Muto M, Sasaki K. 2001. Epidermal growth factor receptor overexpression and genetic aberrations in metastatic squamous-cell carcinoma of the skin. *Dermatology*, 202 (3):203-206.
- Simpson L, Parsons R. 2001. PTEN: life as a tumor suppressor. *Exp Cell Res*, 264 (1):29-41.
- Singh RK, Gutman M, Bucana CD, Sanchez R, Llansa N, Fidler IJ. 1995. Interferons alpha and beta down-regulate the expression of basic fibroblast growth factor in human carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92 (10):4562-4566.
- Siow WY, Cheng C. 2005. Penile cancer: current challenges. *Can J Urol*, 12 (Suppl 1):18-23.
- Skeel RT, Huang J, Manola J, Wilding G, Dreicer R, Walker P, Muggia F, Crawford ED, Dutcher JP, Loehrer PJ. 2003. A phase II study of 13-cis retinoic acid plus interferon alpha-2a in advanced stage penile carcinoma: an Eastern Cooperative Oncology Group study (E3893). *Cancer Invest*, 21 (1):41-46.
- Skobe M, Fusenig NE. 1998. Tumorigenic conversion of immortal human keratinocytes through stromal cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95 (3):1050-1055.
- Sobin LH, Wittekind C, Hrsg. 2002. Urological tumours: penis. In: *TNM Classification of Malignant Tumours*, 6th Edition. New York: Wiley-Liss:181-183.
- Solsona E, Algaba F, Horenblas S, Pizzocaro G, Windahl T. 2004. EAU Guidelines on Penile Cancer. *Eur Urol*, 46 (1):1-8.
- Solsona E, Iborra I, Ricos JV, Monros JL, Dumont R, Casanova J, Calabuig C. 1992. Corpus cavernosum invasion and tumor grade in the prediction of lymph node condition in penile carcinoma. *Eur Urol*, 22 (2):115-118.

- Speicher MR, du Manoir S, Schrock E, Holtgreve-Grez H, Schoell B, Lengauer C, Cremer T, Ried T. 1993. Molecular cytogenetic analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded solid tumors by comparative genomic hybridization after universal DNA-amplification. *Hum Mol Genet*, 2 (11):1907-1914.
- Sporn MB. 1996. The war on cancer. *Lancet*, 347 (9012):1377-1381.
- Srinivas V, Morse MJ, Herr HW, Sogani PC, Whitmore WF, Jr. 1987. Penile cancer: relation of extent of nodal metastasis to survival. *J Urol*, 137 (5):880-882.
- Steigleder GK. 1992. Viruserkrankungen der Haut - Viruswarzen & Sexuell übertragbare Erkrankungen (STD), venerologische Erkrankungen - Präkanzerosen - Präkanzerosen im engeren Sinne. In: *Dermatologie und Venerologie für Ärzte und Studenten*. 6.Aufl. Stuttgart New York: Thieme: 302-312 & 426-437.
- Stein R, Thüroff JW. 2002. Weiter- und Fortbildung, Phimose. *Urologe (B)*, 42 (6):537-541.
- Steiner T, Junker K, Burkhardt F, Braunsdorf A, Janitzky V, Schubert J. 2002. Gain in chromosome 8q correlates with early progression in hormonal treated prostate cancer. *Eur Urol*, 41 (2):167-171.
- Stern RS. 1990. Genital tumors among men with psoriasis exposed to psoralens and ultraviolet A radiation (PUVA) and ultraviolet B radiation. The Photochemotherapy Follow-up Study. *N Engl J Med*, 322 (16):1093-1097.
- Stetler-Stevenson WG. 1999. Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention. *J Clin Invest*, 103 (9):1237-1241.
- Störkel S, Simon R, Brinkschmidt C, Gronwald J, Bocker W. 1996. Komparative genomische Hybridisierung in der Pathologie. Eine neue molekularzytogenetische Methode. *Pathologe*, 17 (3):189-194.
- Strauss S, Sastry P, Sonnex C, Edwards S, Gray J. 2002. Contamination of environmental surfaces by genital human papillomaviruses. *Sex Transm Infect*, 78 (2):135-138.
- Sun CQ, Arnold R, Fernandez-Golarz C, Parrish AB, Almekinder T, He J, Ho SM, Svoboda P, Pohl J, Marshall FF, Petros JA. 2006. Human beta-defensin-1, a potential chromosome 8p tumor suppressor: control of transcription and induction of apoptosis in renal cell carcinoma. *Cancer Res*, 66 (17):8542-8549.



- Sunwoo JB, Holt MS, Radford DM, Deeker C, Scholnick SB. 1996. Evidence for multiple tumor suppressor genes on chromosome arm 8p in supraglottic laryngeal cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, 16 (3):164-169.
- Suzuki H, Sato N, Kodama T, Okano T, Isaka S, Shirasawa H, Simizu B, Shimazaki J. 1994. Detection of human papillomavirus DNA and state of p53 gene in Japanese penile cancer. *Jpn J Clin Oncol*, 24 (1):1-6.
- Symonds H, Krall L, Remington L, Saenz-Robles M, Lowe S, Jacks T, Van Dyke T. 1994. p53-dependent apoptosis suppresses tumor growth and progression in vivo. *Cell*, 78 (4):703-711.
- Tabatabaei S, Harisinghani M, McDougal WS. 2005. Regional lymph node staging using lymphotropic nanoparticle enhanced magnetic resonance imaging with ferumoxtran-10 in patients with penile cancer. *J Urol*, 174 (3):923-927.
- Tanis PJ, Lont AP, Meinhardt W, Olmos RA, Nieweg OE, Horenblas S. 2002. Dynamic sentinel node biopsy for penile cancer: reliability of a staging technique. *J Urol*, 168 (1):76-80.
- Telenius H, Carter NP, Bebb CE, Nordenskjold M, Ponder BA, Tunnacliffe A. 1992. Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics*, 13 (3):718-725.
- Thornberry NA, Lazebnik Y. 1998. Caspases: enemies within. *Science*, 281 (5381):1312-1316.
- Ueno T, Tangoku A, Yoshino S, Abe T, Hayashi H, Toshimitsu H, Hashimoto K, Satoh T, Oga A, Furuya T, Oka M, Sasaki K. 2003. Prediction of nodal metastasis by comparative genomic hybridization in biopsy specimens from patients with superficial esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, 9 (14):5137-5141.
- Valdes Olmos RA, Tanis PJ, Hoefnagel CA, Jansen L, Nieweg OE, Meinhardt W, Horenblas S. 2001. Penile lymphoscintigraphy for sentinel node identification. *Eur J Nucl Med*, 28 (5):581-585.
- Veikkola T, Alitalo K. 1999. VEGFs, receptors and angiogenesis. *Semin Cancer Biol*, 9 (3):211-220.
- Volpert OV, Dameron KM, Bouck N. 1997. Sequential development of an angiogenic phenotype by human fibroblasts progressing to tumorigenicity. *Oncogene*, 14 (12):1495-1502.

- Voullaire L, Wilton L, Slater H, Williamson R. 1999. Detection of aneuploidy in single cells using comparative genomic hybridization. *Prenat Diagn*, 19 (9):846-851.
- Walker W, Zhou ZQ, Ota S, Wynshaw-Boris A, Hurlin PJ. 2005. Mnt-Max to Myc-Max complex switching regulates cell cycle entry. *J Cell Biol*, 169 (3):405-413.
- Wawroschek F, Harzmann R, Weckermann D. 2005. Wertigkeit der Sentinel-Lymphknotenbiopsie bei urologischen Tumoren. *Urologe A*, 44 (6):630-634.
- Wawroschek F, Vogt H, Bachter D, Weckermann D, Hamm M, Harzmann R. 2000. First experience with gamma probe guided sentinel lymph node surgery in penile cancer. *Urol Res*, 28 (4):246-249.
- Weber P, Rabinovitz H, Garland L. 1987. Verrucous carcinoma in penile lichen sclerosus et atrophicus. *J Dermatol Surg Oncol*, 13 (5):529-532.
- Weber RG, Pietsch T, von Schweinitz D, Lichter P. 2000. Characterization of genomic alterations in hepatoblastomas. A role for gains on chromosomes 8q and 20 as predictors of poor outcome. *Am J Pathol*, 157 (2):571-578.
- Wechsel HW, Bamberg M, Bichler K-H, Bokemeyer C, Paulsen F, Pfannenbergs C, Preßler H. 1998. Penis-Karzinom - Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. In: Interdisziplinäres Tumorzentrum Tübingen am Klinikum der Eberhard-Karls-Universität, Hrsg. Serie „Therapieleitlinien“ des ITZ Tübingen, 2.Aufl. Tübingen: Gulde-Druck GmbH: I-V & I-10
- Weinberg RA. 1995. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*, 81 (3):323-330.
- Weiss MM, Hermsen MA, Meijer GA, van Grieken NC, Baak JP, Kuipers EJ, van Diest PJ. 1999. Comparative genomic hybridisation. *Mol Pathol*, 52 (5):243-251.
- Wells D, Sherlock JK, Handyside AH, Delhanty JD. 1999. Detailed chromosomal and molecular genetic analysis of single cells by whole genome amplification and comparative genomic hybridisation. *Nucleic Acids Res*, 27 (4):1214-1218.
- Werb Z. 1997. ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. *Cell*, 91 (4):439-442.
- Werness BA, Levine AJ, Howley PM. 1990. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science*, 248 (4951):76-79.

- Wespes E, Simon J, Schulman CC. 1986. Cabanas approach: is sentinel node biopsy reliable for staging penile carcinoma? *Urology*, 28 (4):278-279.
- Whitelock JM, Murdoch AD, Iozzo RV, Underwood PA. 1996. The degradation of human endothelial cell-derived perlecan and release of bound basic fibroblast growth factor by stromelysin, collagenase, plasmin, and heparanases. *J Biol Chem*, 271 (17):10079-10086.
- Wilbert D. 1997. Das Peniskarzinom. *Urologe (B)*, 37 (5):514-522.
- Wilkens L, Tchinda J, Burkhardt D, Kreipe HH. 2002. Significant hybridization differences in comparative genomic hybridization due to nucleotides used for DNA labelling and to DNA chosen for cohybridization. *Pathobiology*, 70 (4):204-208.
- Wishnow KI, Johnson DE, Fritsche H. 1990. Squamous cell carcinoma antigen (TA-4) in penile carcinoma. *Urology*, 36 (4):315-317.
- Woenckhaus J, Steger K, Werner E, Fenic I, Gamerdinger U, Dreyer T, Stahl U. 2002. Genomic gain of PIK3CA and increased expression of p110alpha are associated with progression of dysplasia into invasive squamous cell carcinoma. *J Pathol*, 198 (3):335-342.
- Woodford-Richens KL, Rowan AJ, Gorman P, Halford S, Bicknell DC, Wasan HS, Roylance RR, Bodmer WF, Tomlinson IP. 2001. SMAD4 mutations in colorectal cancer probably occur before chromosomal instability, but after divergence of the microsatellite instability pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98 (17):9719-9723.
- Wright WE, Pereira-Smith OM, Shay JW. 1989. Reversible cellular senescence: implications for immortalization of normal human diploid fibroblasts. *Mol Cell Biol*, 9 (7):3088-3092.
- Ye H, Pungpravat N, Huang BL, Muzio LL, Mariggio MA, Chen Z, Wong DT, Zhou X. 2007. Genomic assessments of the frequent loss of heterozygosity region on 8p21.3-p22 in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet*, 176 (2):100-106.
- Zuo L, Weger J, Yang Q, Goldstein AM, Tucker MA, Walker GJ, Hayward N, Dracopoli NC. 1996. Germline mutations in the p16INK4a binding domain of CDK4 in familial melanoma. *Nat Genet*, 12 (1):97-99.

## Danksagung

Ich danke Herrn Prof. em. Dr. med. Dr. h.c. J. Schubert, Direktor der Klinik für Urologie und Kinderurologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena von 1988 - 2009, für die Überlassung des Themas.

Da ein Teil der untersuchten Peniskarzinome aus den Tumorbanken der Klinik für Urologie der Semmelweis-Universität Budapest/Ungarn und der Klinik für Urologie Hradec Králové/Tschechische Republik stammt, danke ich den Mitarbeitern dieser Kliniken ganz besonders für das Überlassen des Materials.

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. med. Kerstin Junker, Leiterin des Forschungslabors der Klinik für Urologie für die begleitende Betreuung bei der Anfertigung dieser Arbeit und ihre kompetenten Hinweise sowie ihre kritischen Anmerkungen.

Bedanken möchte ich mich auch bei den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Forschungslabors der Klinik für Urologie der FSU Jena für ihre Hilfsbereitschaft und freundliche Unterstützung bei der experimentellen Arbeit.

Ebenso danke ich Herrn Dr. med. Winfried Hindermann für die gemeinsame mikroskopische Durchsicht der Präparate und die Bestätigung der tumortragenden Areale sowie Herrn Dipl. phys. Gerhard Dunkel für die Hilfe im Rahmen der eingesetzten Computerprogramme.

Darüber hinaus gilt mein herzlicher Dank Herrn PD Dr. rer. nat. Wolfgang Berg, Herrn PD Dr. med. Thomas Steiner und Herrn Dr. med. Mathias Dreihaupt, für ihre freundschaftliche Kritik bei der Durchsicht der Arbeit.

Schließlich möchte ich meiner lieben Frau Dr. med. Agnes Becker, meiner Tochter Clara, meinem Sohn Carl und meiner engeren Familie danken, ohne deren Geduld, Fürsorge, Inspiration und emotionale Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

## Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: PD Dr. med. K. Junker, Frau Bianka Ilse, Frau Jana Jeschke, Frau Heike Wahner, Frau Margit Saupe (Klinik für Urologie der FSU Jena), Herr Dr. med. Winfried Hindermann (Institut für Pathologie der FSU Jena),

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Heilbad Heiligenstadt, den 30.06.2009

---

Udo T. Becker