

**UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

Institut für Pathologie

Prof. Dr. med. Guido Sauter

**STRONG EXPRESSION OF THE NEURONAL TRANSCRIPTION  
FACTOR FOXP2  
IS LINKED TO AN INCREASED RISK OF EARLY PSA RECURRENCE  
IN ERG  
FUSION NEGATIVE CANCERS**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Laura Stumm  
aus Erfurt

Hamburg 2013

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 07.11.2013**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Guido Sauter**

**Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: PD Dr. Georg Salomon**

**Prüfungsausschuss, dritter Gutachter: PD Dr. Ronald Simon**

*Für Jochen Petri und Karl-Hugo Stumm*

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>I. Artikel.....</b>	1
<b>II. Darstellung der Publikation.....</b>	7
1. Einleitung.....	7
2. Methoden.....	7
2.1 Patienten.....	7
2.2 Immunohistochemie.....	8
2.3 Statistik.....	9
3. Ergebnisse.....	9
3.1 Technische Aspekte.....	9
3.2 FOXP2-Expression im normalen Prostataepithel und im Prostatakarzinom.....	9
3.3 FOXP2-Expression und Tumorzellproliferation (Ki67 LI).....	10
3.4 TMPRSS2-ERG Fusion-Status und ERG-Protein-Expression.....	10
3.5 Prognostische Relevanz der FOXP2-Expression.....	11
4. Diskussion.....	11
5. Zusammenfassung.....	14
6. Abbildungen und Tabellen.....	15
7. Abkürzungsverzeichnis.....	25
8. Literaturverzeichnis.....	26
<b>III. Erklärung des Eigenanteils.....</b>	30
<b>IV. Danksagung.....</b>	31
<b>V. Eidesstattliche Versicherung .....</b>	32

# Strong expression of the neuronal transcription factor FOXP2 is linked to an increased risk of early PSA recurrence in ERG fusion-negative cancers

Laura Stumm,<sup>1</sup> Lia Burkhardt,<sup>1</sup> Stefan Steurer,<sup>1</sup> Ronald Simon,<sup>1</sup> Meike Adam,<sup>2</sup> Andreas Becker,<sup>2</sup> Guido Sauter,<sup>1</sup> Sarah Minner,<sup>1</sup> Thorsten Schlomm,<sup>2,3</sup> Hüseyin Sirma,<sup>1</sup> Uwe Michl<sup>2</sup>

► Additional material is published online only. To view please visit the journal online (<http://dx.doi.org/10.1136/jclinpath-2012-201335>).

<sup>1</sup>Institute of Pathology, University Medical Center, Hamburg-Eppendorf, Germany

<sup>2</sup>Martini Clinic, Prostate Cancer Center, University Medical Center, Hamburg-Eppendorf, Germany

<sup>3</sup>Department of Urology, Section for Translational Prostate Cancer Research, University Medical Center, Hamburg-Eppendorf, Germany

**Correspondence to**  
Uwe Michl, Martini-Clinic, Prostate Cancer Center, University Medical Center, 20246, Hamburg-Eppendorf, Germany;  
michl@uke.de

Received 6 November 2012  
Revised 31 December 2012  
Accepted 4 February 2013

## ABSTRACT

**Background and aims** Transcription factors of the forkhead box P (FOXP1-4) family have been implicated in various human cancer types before. The relevance and role of neuronal transcription factor FOXP2 in prostate cancer is unknown.

**Methods** A tissue microarray containing samples from more than 11 000 prostate cancers from radical prostatectomy specimens with clinical follow-up data was analysed for FOXP2 expression by immunohistochemistry. FOXP2 data were also compared with pre-existing ERG fusion (by fluorescence *in situ* hybridisation and immunohistochemistry) and cell proliferation (Ki67 labelling index) data.

**Results** There was a moderate to strong FOXP2 protein expression in basal and secretory cells of normal prostatic glands. As compared with normal cells, FOXP2 expression was lost or reduced in 25% of cancers. Strong FOXP2 expression was linked to advanced tumour stage, high Gleason score, presence of lymph node metastases and early tumour recurrence ( $p<0.0001$ ; each) in ERG fusion-negative, but not in ERG fusion-positive cancers. High FOXP2 expression was linked to high Ki67 labelling index ( $p<0.0001$ ) in all cancers irrespective of ERG fusion status.

**Conclusions** These data demonstrate that similar high FOXP2 protein levels as in normal prostate epithelium exert a 'paradoxical' oncogenic role in 'non fusion-type' prostate cancer. It may be speculated that interaction of FOXP2 with members of pathways that are specifically activated in 'non fusion-type' cancers may be responsible for this phenomenon.

## INTRODUCTION

Transcription factors of the forkhead box P (FOXP1-4) family have been implicated in various human cancer types before.<sup>1</sup> For example, FOXP1 is a tumour suppressor in breast cancer<sup>2</sup> and has been suggested to play a role in prostate cancer also.<sup>3</sup> FOXP3 is strongly expressed in tumour invading regulatory T cells and in lymphomas.<sup>4</sup> FOXP4 expression is downregulated in kidney cancer<sup>5</sup> and inactivated by translocation in several breast cancer cell lines.<sup>6</sup> In a recent study, FOXP2 has also been implicated with cancer. Campbell *et al*<sup>7</sup> found FOXP2 overexpression as a strong discriminator between normal lymphocytes and multiple myeloma. Apart from this, FOXP2 is known to have a role in neuronal differentiation. Specifically, FOXP2 was shown as a factor

influencing speech development.<sup>8</sup> Apart from this one study in lymphoma, the role of FOXP2 expression in cancer has not been evaluated.

To determine, whether FOXP2 expression might have a role in prostate cancer, we made use of a prostate cancer tissue microarray (TMA) containing samples from more than 11 000 patients with follow-up information and an attached molecular database. The data show that FOXP2 expression is often either lost/reduced or increased in prostate cancer and that FOXP2 expression is significantly linked to tumour aggressiveness, especially in non-fusion type prostate cancer.

## METHODS

### Patients

A TMA was made from 11 152 prostatectomy specimens from patients undergoing surgery between 1992 and 2011 at the Department of Urology, and the Martini Clinics at the University Medical Center Hamburg-Eppendorf. The TMA manufacturing process was described earlier in detail.<sup>9</sup> In short, one 0.6 mm core was taken from a representative tissue block from each patient. The tissues were distributed among 24 TMA blocks, each containing 129–522 cores. Clinical follow-up data were available for 9695 of the 11 152 arrayed tumours. Median follow-up was 36.8 months ranging from 1 month to 219 months. None of the patients received neoadjuvant endocrine therapy. Additional (salvage) therapy was only initiated after biochemical relapse, the clinical endpoint of this study. Prostate specific antigen values were measured following surgery and recurrence was defined as a postoperative prostate specific antigen (PSA) of 0.2 ng/ml and increasing thereafter. The detailed composition of the TMA and the attached histopathological and clinical data is outlined in table 1. Presence or absence of cancer tissue was validated by immunohistochemical AMACR and 34BE12 analysis.<sup>10</sup> More than 50 tissue spots containing normal prostate glands were also included on the TMA. The molecular database attached to this TMA contained results on ERG expression in 9628 tumours and ERG breakapart fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) analysis in 6106 tumours (extended from<sup>11</sup>), as well as Ki67 labelling index (LI) in 7019 cancers (extended from<sup>10</sup>).

### Immunohistochemistry

Freshly cut TMA sections were analysed in 1 day and in one experiment. The antibody anti-FOXP2

**To cite:** Stumm L, Burkhardt L, Steurer S, *et al*. *J Clin Pathol* Published Online First; [please include Day Month Year] doi:10.1136/jclinpath-2012-201335

**Table 1** Composition of the prognosis tissue microarray (TMA) containing 10 152 prostate cancer specimens

	Number of patients (%)	
	Study cohort on TMA (n=11152)	Biochemical relapse among categories (n=1824)
Follow-up (months)		
Mean	53.4	–
Median	36.8	–
Age (years)		
<50	318	49
50–60	2.768	460
60–70	6.548	1.081
>70	1.439	232
Pretreatment PSA (ng/ml)		
<4	1.407	142
4–10	6.735	827
10–20	2.159	521
>20	720	309
Tumour stage		
pT2	7.370	570
pT3a	2.409	587
pT3b	1.262	618
pT4	63	49
Gleason grade		
<3+3	2.859	193
3+4	1.565	573
4+3	6.183	849
>4+4	482	208
Lymph node metastasis		
pN0	6.117	1.126
pN+	561	291
Surgical margin		
Negative	8.984	1.146
Positive	1.970	642

Numbers do not always add up to 11 152 in the different categories because of cases with missing data.

(rabbit polyclonal, Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA; 1/60 dilution; cat#HPA000382) was used for detection of FOXP2 expression. Slides were deparaffinised and exposed to heat-induced antigen retrieval for 5 min in an autoclave at 121°C in pH 9 buffer. Bound primary antibody was visualised using the DAKO EnVision Kit (Dako). Staining was predominantly nuclear and its intensity was estimated in a 4-step scale as negative, weak, moderate and strong staining.

## Statistics

For statistical analysis, the JMP V9.0 software (SAS Institute Inc, North Carolina, USA) was used. Contingency tables were calculated to study the association between FOXP2 expression and clinicopathological variables, and the  $\chi^2$  (likelihood) test was used to find significant relationships. Kaplan-Meier curves were generated for PSA recurrence-free survival. The logrank test was applied to test the significance of differences between stratified survival functions. Cox proportional hazards regression analysis was performed to test the statistical independence and significance between pathological, molecular and clinical variables.

## RESULTS

### Technical aspects

TMA blocks with a total of 2088 tissue spots were excluded from the analysis due to insufficient immunohistochemistry (IHC) quality. FOXP2 analysis was successful in 8289 of the remaining 9064 arrayed cancers (91%). IHC was not interpretable in 775 (9%) tumours because lack of unequivocal tumour cells in the tissue spots or missing tissue spots on the TMA section.

### FOXP2 expression in normal prostate epithelium and in prostate cancer

Intensity of FOXP2 immunostaining was moderate to strong in normal prostate epithelium and exclusively seen in the nucleus. Nuclei of basal and secretory cells were labelled, whereas no staining was seen in stromal cells. FOXP2 expression intensity was often reduced in prostate cancer as compared with normal epithelium (figure 1). FOXP2 immunostaining was found in 7779 of the 8289 analysable tumours (94%), including 1572 (19%) tumours with weak, 2846 (34%) with moderate and 3361 (41%) tumours with strong staining (table 2). Representative images are shown in figure 1. Strong FOXP2 positivity was significantly linked to advanced tumour stage, high Gleason grade and presence of lymph node metastases ( $p<0.0001$ ; each). A subset analysis in 4206 ERG fusion-negative and 3096 ERG fusion-positive cancers with FOXP2 IHC data revealed that all associations of FOXP2 with unfavourable tumour phenotype were particularly strong in ERG-negative cancers ( $p<0.0001$ ; each), but were completely lost in ERG-positive tumours. All associations of FOXP2 in all tumours and in ERG-positive and ERG-negative subgroups are summarised in table 2 and online supplementary tables S1–2.

### Tumour cell proliferation (Ki67LI)

Strong FOXP2 staining was significantly linked to increased cell proliferation as measured by Ki67LI in all cancers (figure 2A;  $p<0.0001$ ). This association was independent of the ERG fusion status (figure 2B,C;  $p<0.0001$ ; each). This association was also independent from the Gleason grade, since it held also true if tumours of identical grade were separately analysed (figure 3). Overall, these data suggest a role of FOXP2 for tumour growth in general and a direct involvement in proliferation in particular.

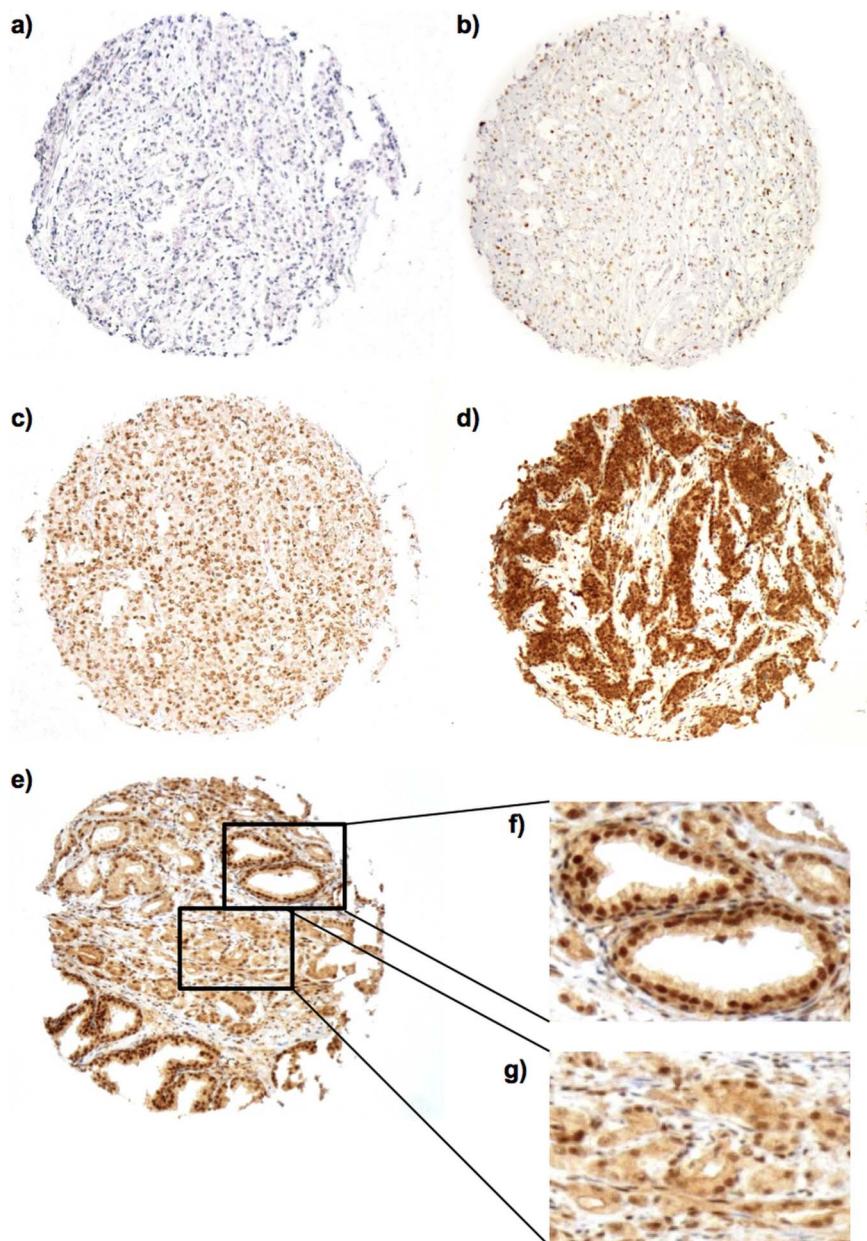
### TMPRSS2-ERG fusion status and ERG protein expression

The relationship of FOXP2 expression and ‘fusion-type’ prostate cancer was analysed by two independent methods. There were subsets of 4613 cancers with available TMPRSS2-ERG fusion data obtained by FISH and there were 7302 cancers with FOXP2 and ERG IHC data. Strong FOXP2 immunostaining was more frequent in ERG IHC-positive cancers (1826/3096; 59%) as compared with ERG IHC-negative cancers (1177/4206 (28%),  $p<0.0001$ , figure 4A). Genomic ERG rearrangement data obtained by FISH using an ERG breakapart probe<sup>11</sup> yielded similar results. Strong FOXP2 staining was markedly more frequent in tumours with ERG rearrangement (1315/2077 (63%)) as compared with tumours without ERG rearrangement (831/2536 (33%),  $p<0.0001$ , figure 4B).

### Prognostic relevance of FOXP2 expression

Follow-up data were available from 7050 cancers with FOXP2 IHC data. Strong (3+) FOXP2 staining was significantly linked to early biochemical recurrence in all cancers ( $p<0.0001$ , figure 5A). This association became even more evident in 3543

**Figure 1** Representative pictures of FOXP2 immunostaining in prostate cancer and prostate normal tissue. (A) Negative, (B) weak, (C) moderate, (D) strong staining in cancers, (D) cancer (magnified in G) and adjacent normal prostate epithelium (magnified in F) in the same tissue spot (E).



ERG-negative cancers ( $p<0.0001$ , figure 5B), but was completely lost in the subset of 2625 ERG fusion-positive tumours ( $p=0.3887$ , figure 5C). A multivariate analysis revealed that this association failed to become independent ( $p=0.1033$ ) from established prognostic risk factors including pT stage, Gleason grade and nodal stage ( $p<0.0001$ ; each) if all cancers were jointly analysed (table 3).

## DISCUSSION

The results of our study demonstrate that high FOXP2 expression is strongly linked to adverse features of the disease in ERG fusion-negative prostate cancers. In particular, FOXP2 overexpression was linked to advanced tumour stage, high Gleason grade, and presence of lymph node metastases and early tumour recurrence.

In this study, FOXP2 was constitutively expressed at high level in the nuclei of basal and secretory cells of normal prostate glands. FOXP1-4 family members act as transcriptional repressors and regulate differentiation of neuronal and immune cells.<sup>12–14</sup> Thus, our findings are consistent with a general role

of FOXP2 for prostate epithelial differentiation and functioning, including the proliferative basal cells and the differentiated, quiescent secretory cells. The absence of FOXP2 protein in stromal cells of the prostate fits well with results of a previous study reporting relatively low FOXP2 mRNA levels in the prostate.<sup>7</sup> The stromal component can be substantial in prostate tissue and may have led to a massive dilution of mRNAs derived from prostate epithelium. Other studies reported FOXP2 mRNA expression from most other normal tissues also, with highest levels in ovary, colon, brain, liver and intestine,<sup>7</sup> as well as developing tissues from lung, heart and gut.<sup>15</sup> Several studies have linked FOXP2 expression to fetal and adult neuronal tissues,<sup>14</sup> where it has been implicated in neuronal differentiation and speech development.<sup>8</sup>

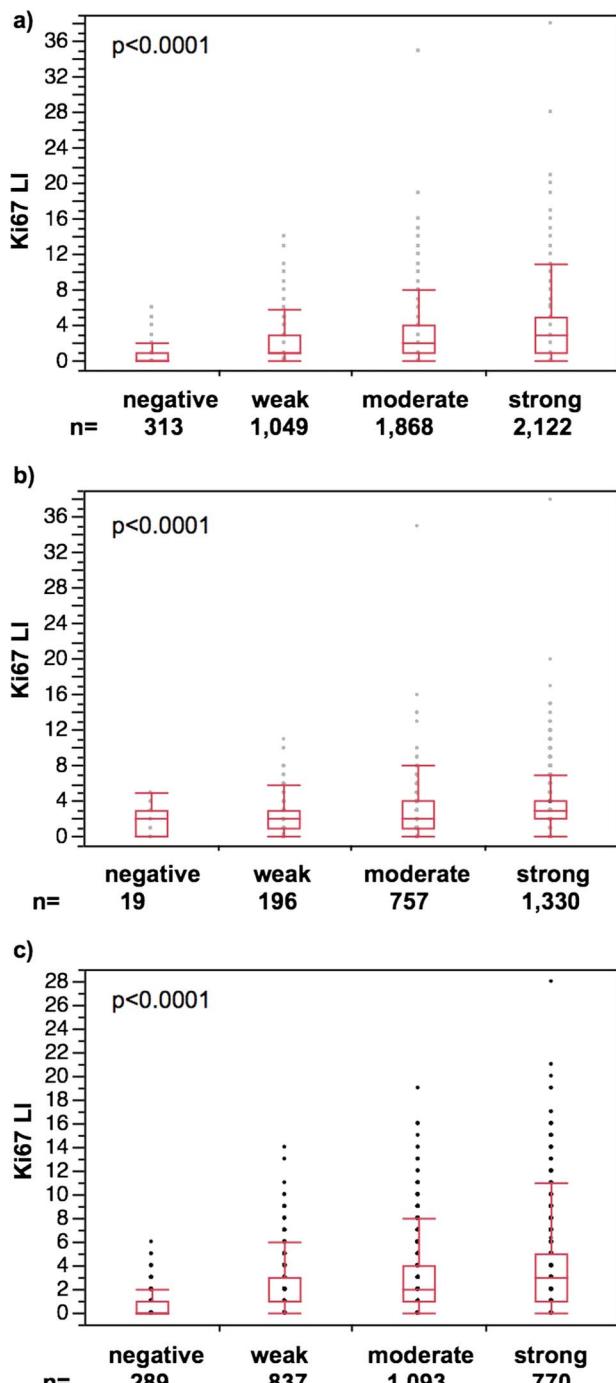
The strong association between lost or reduced FOXP2 expression and favourable tumour phenotype and good prognosis was counterintuitive. It is much more common that the loss of molecular features of the normal prostate epithelium parallels tumour cell dedifferentiation and is rather associated with poor outcome. This for example applies for ALCAM, PTEN,

**Table 2** Association between the FOXP2 immunostaining (IHC) result and prostate cancer phenotype

Parameter	n Evaluable	FOXP2 IHC result				p Value
		Negative (%)	Weak (%)	Moderate (%)	Strong (%)	
All cancers	8,289	6	19	34	41	
Tumour stage						<0.0001
pT2	5,546	7	21	34	38	
pT3a	1,796	5	16	33	46	
pT3b	904	3	14	40	43	
pT4	22	0	5	45	50	
Gleason grade						<0.0001
<3+3	1,817	8	23	35	34	
3+4	4,827	6	19	33	42	
4+3	1,220	4	16	36	45	
>4+4	394	3	13	40	44	
Lymph node metastasis						<0.0001
N0	4,363	6	18	34	43	
N+	429	4	10	40	46	
Surgical margin						0.2967
Negative	6,652	6	19	34	41	
Positive	1,479	6	17	38	46	

E-cadherin or CDKN2A (p16) in prostate cancer.<sup>16–19</sup> One possible explanation for the unusual scenario, that a normal cell protein all of a sudden becomes oncogenic is that a switch of the cell metabolism has occurred in which the ‘normal cell protein’ obtains a completely different role or function. That FOXP2 has the potential to interfere with pathways that are related to cancer is well known. For example, FOXP2 regulates the expression of a variety of genes involved in tumour-relevant pathways such as WNT, NF-κB and IGF-1.<sup>20–21</sup> Moreover, FOXP2 interacts with, and regulates the activity of C-terminal binding protein 1 (CTBP1).<sup>22</sup> Overexpression of CTBP1 promotes cell cycle progression and inhibits apoptosis by repressing the expression of known tumour suppressor and apoptosis genes such as PTEN, p16 and BAX.<sup>23</sup> Moreover, that FOXP2 was found overexpressed in lymphoma cells as compared with their normal counterparts is further suggesting that FOXP2 can exert an oncogenic function *in vivo*.<sup>7</sup>

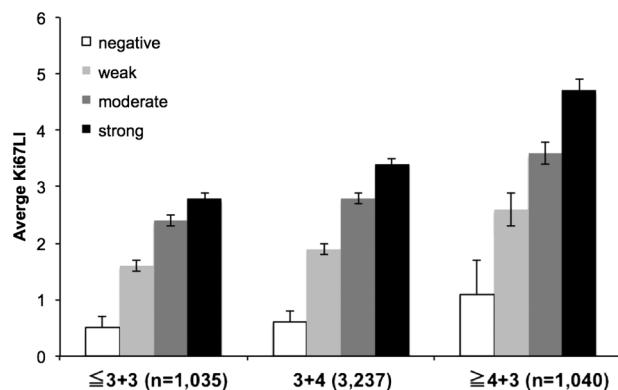
Our subset analyses in ERG-positive and ERG-negative prostate cancers appear to potentially explain the paradoxical associations of retained high FOXP2 levels with unfavourable tumour features. The most common chromosomal rearrangement known in prostate cancer fuses the androgen responsive TMPRSS2 gene to the ETS family transcription factor ERG gene.<sup>24</sup> This alteration occurs in about 50% of prostate cancers and causes high level ERG protein expression and a variety of molecular downstream changes in affected cancers.<sup>24–27</sup> The TMPRSS2:ERG fusion is the prototype of a number of similar rearrangements resulting in oncogenic activation of ETS genes<sup>28–31</sup> in prostate cancer, which have led to a molecular subclassification of fusion-negative and fusion-positive prostate cancers. Our data revealed a significant difference in frequency and prognostic impact of FOXP2 expression in fusion-type and non fusion-type prostate cancer. We found that a retained, moderate to strong FOXP2 expression was significantly linked to ERG fusion-positive cancers. Importantly, this association held true for immunohistochemical analysis of ERG expression and for FISH-based detection of ERG breakage, excluding a



**Figure 2** Association between FOXP2 immunostaining intensity and cell proliferation as measured by the Ki67 labelling index (Ki67 LI) in (A) all cancers (n=5352), (B) ERG positive cancers (n=2302), and (C) ERG negative cancers (n=2989).

potential IHC-related artificial relationship. Strikingly, almost all adverse features connected to FOXP2 overexpression were limited to the subset of ERG-negative cancers.

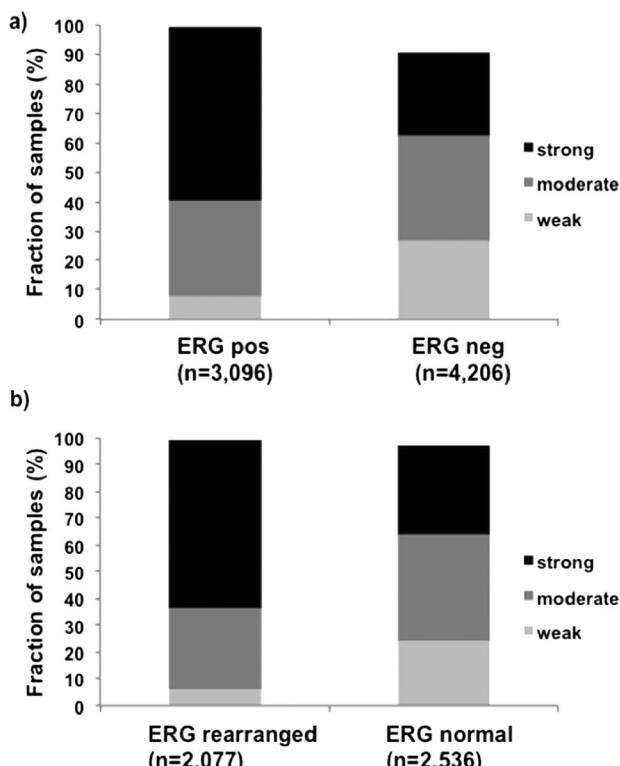
This finding argues for biologically distinct consequences of FOXP2 in ERG fusion-negative and ERG fusion-positive cancers. A different role of FOXP2 in ‘fusion-type’ and ‘non fusion-type’ prostate cancer is conceivable. Alternatively, the tumour promoting effect of FOXP2 may be counteracted by ERG. ERG is normally not expressed in the prostate epithelium. Activation of ERG expression by TMPRSS2:ERG gene fusion



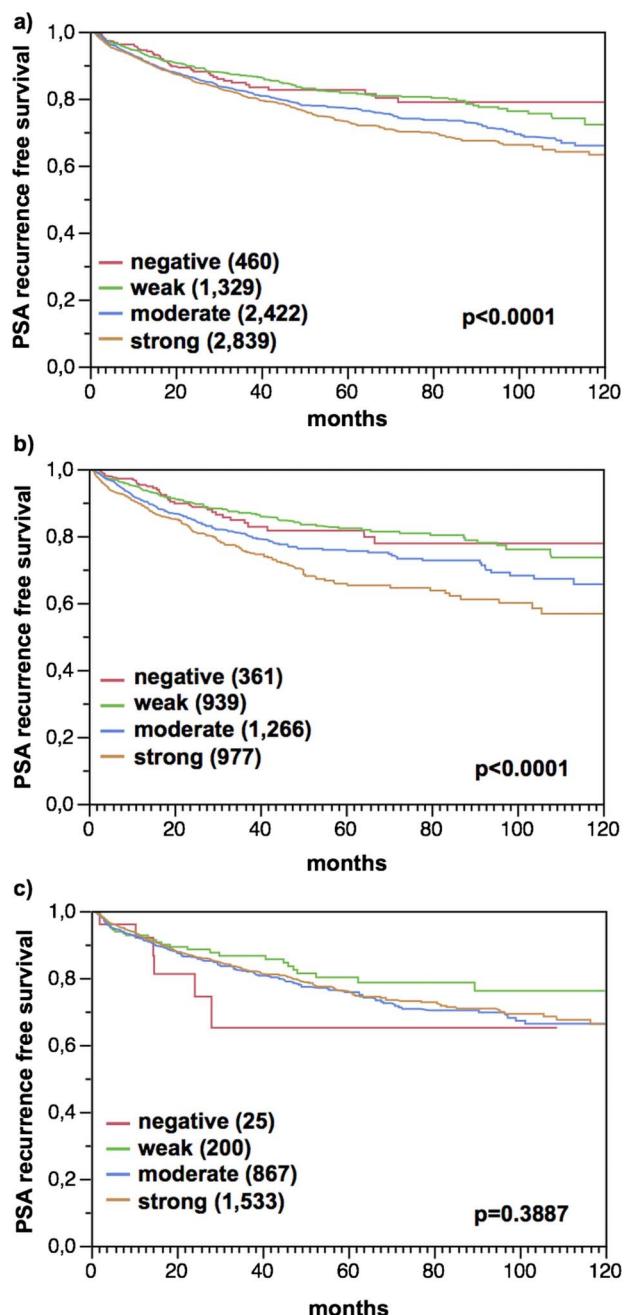
**Figure 3** Significant associations between FOXP2 immunostaining and Ki67 labelling index (Ki67LI) in tumour subsets of identical Gleason grade.

results in aberrant activation of different signalling cascades in ERG fusion-positive as compared with ERG fusion-negative prostate cancers.<sup>27 32–34</sup> One of the best known consequences of ERG expression is activation of WNT signalling<sup>26 27 35</sup> It is tempting to speculate that FOXP2 and ERG, or their target genes, interfere with pathways governing tumour aggressiveness, possibly including the WNT pathway, which is subsequently reflected by the different clinical course in ERG-positive and ERG-negative cancers. The genes or mechanisms mediating this effect remain to be identified.

Indirect evidence for substantial differences on the cell biological effect of FOXP2 depending of the gene sets activated in cancer cells is derived from the significant link of high FOXP2 expression and multiple myeloma pathogenesis.<sup>7</sup>



**Figure 4** Association between positive FOXP2 immunostaining and ERG fusion status probed by (A) IHC and (B) FISH analysis.  $p<0.0001$ ; each.



**Figure 5** Association between FOXP2 immunostaining intensity and biochemical recurrence in (A) all cancers (n=7050), (B) ERG-negative cancers (n=3543) and (C) ERG-positive cancers (n=2625).

In summary our study suggests an important role of FOXP2 for prostate cancer development and progression, and suggests biologically different effects in ERG fusion-positive and ERG fusion-negative cancers. In non fusion-type prostate cancer, high FOXP2 expression stratifies a subset of prostate cancers with a particularly poor prognosis.

**Acknowledgements** We thank Christina Koop, Julia Schumann, Sünje Seekamp and Inge Brandt for excellent technical assistance.

**Contributors** LS and LB conceived the study, carried out experiments and analysed data. SS, GS, SM performed the pathological review. GS, RS, HS, SM, TS and UM participated in the design of the study, statistical analysis of the data and drafting of the manuscript. All authors were involved in interpreting data, writing the paper and approving the final version of the manuscript. UM is responsible for the overall content as guarantor.

**Table 3** COX regression multivariate analysis for the prediction of biochemical recurrence

Parameter	Factor	HR	95% CI	p Value
pT Stage	pT3a vs pT2	2.3	1.9 to 2.8	<0.0001
	pT3b vs pT3a	1.8	1.5 to 2.1	
	pT4 vs pT3b	1.1	0.5 to 2.0	
Gleason	3+4 vs <3+3	1.7	1.2 to 2.5	<0.0001
	4+3 vs 3+4	2.2	1.8 to 2.5	
	>4+4 vs 4+3	1.0	0.8 to 1.2	
pN stage	N+ vs N0	1.7	1.4 to 2.1	<0.0001
FOXP2	Weak vs negative	0.8	0.6 to 1.2	0.1033
	Moderate vs weak	1.2	0.9 to 1.4	
	Strong vs moderate	1.1	0.9 to 1.3	

**Take-home message**

- The forkhead box transcription factor FOXP2 is abundantly expressed in a broad variety of human tissues. Physiologically, FOXP2 regulates transcriptional programs required for neuronal differentiation, but several studies have also suggested a role in cancer biology.
- Employing immunohistochemistry, we found largely comparable levels of FOXP2 expression in normal and cancerous prostate. Paradoxically, FOXP2 expression was linked to aggressive tumor features, including advanced stage, high Gleason grade, increased proliferation and early biochemical recurrence.
- The adverse effect of FOXP2 expression was limited to prostate cancers lacking TMPRSS2:ERG fusion, suggesting that these cancers may activate pathways that interact with FOXP2 in promoting tumor progression.

**Funding** This work was supported by the German Research Foundation (DFG SI 572/4-1) and Federal Ministry of Education and Research (BMBF) (FKZ 01GS08189).

**Competing interests** None.

**Provenance and peer review** Not commissioned; externally peer reviewed.

**REFERENCES**

- Katoh M. Human FOX gene family (Review). *Int J Oncol* 2004;25:1495–500.
- Fox SB, Brown P, Han C, et al. Expression of the forkhead transcription factor FOXP1 is associated with estrogen receptor alpha and improved survival in primary human breast carcinomas. *Clin Cancer Res* 2004;10:3521–7.
- Taylor BS, Schultz N, Hieronymus H, et al. Integrative genomic profiling of human prostate cancer. *Cancer Cell* 2010;18:11–22.
- Bignone PA, Banham AH. FOXP3+ regulatory T cells as biomarkers in human malignancies. *Expert Opin Biol Ther* 2008;8:1897–920.
- Teufel A, Wong EA, Mukhopadhyay M, et al. FoxP4, a novel forkhead transcription factor. *Biochim Biophys Acta* 2003;1627:147–52.
- Howarth KD, Blood KA, Ng BL, et al. Array painting reveals a high frequency of balanced translocations in breast cancer cell lines that break in cancer-relevant genes. *Oncogene* 2008;27:3345–59.
- Campbell AJ, Lyne L, Brown PJ, et al. Aberrant expression of the neuronal transcription factor FOXP2 in neoplastic plasma cells. *Br J Haematol* 2010;149:221–30.
- Kang C, Drayna D. Genetics of speech and language disorders. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2011;12:145–64.
- Minner S, Wittmer C, Graefen M, et al. High level PSMA expression is associated with early PSA recurrence in surgically treated prostate cancer. *Prostate* 2010;71:281–8.
- Minner S, Jessen B, Stiedenroth L, et al. Low level HER2 overexpression is associated with rapid tumor cell proliferation and poor prognosis in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2010;16:1553–60.
- Minner S, Endien M, Sirma H, et al. ERG status is unrelated to PSA recurrence in radically operated prostate cancer in the absence of antihormonal therapy. *Clin Cancer Res* 2011;17:5878–88.
- Mercer F, Unutnaz D. The biology of FoxP3: a key player in immune suppression during infections, autoimmune diseases and cancer. *Adv Exp Med Biol* 2009;665:47–59.
- Lalmansingh AS, Karmakar S, Jin Y, et al. Multiple modes of chromatin remodeling by Forkhead box proteins. *Biochim Biophys Acta* 2012;1819(7):707–15.
- Takahashi H, Takahashi K, Liu FC. FOXP genes, neural development, speech and language disorders. *Adv Exp Med Biol* 2009;665:117–29.
- Schroeder DI, Myers RM. Multiple transcription start sites for FOXP2 with varying cellular specificities. *Gene* 2008;413:42–8.
- Minner S, Kraetzig F, Tachezy M, et al. Low activated leukocyte cell adhesion molecule expression is associated with advanced tumor stage and early prostate-specific antigen relapse in prostate cancer. *Hum Pathol* 2011;42:1946–52.
- Lotan T, Gurel B, Sutcliffe S, et al. PTEN protein loss by immunostaining: analytic validation and prognostic indicator for a high risk surgical cohort of prostate cancer patients. *Clin Cancer Res* 2011;17:6563–73.
- Gravdal K, Halvorsen OJ, Haukaas SA, et al. A switch from E-cadherin to N-cadherin expression indicates epithelial to mesenchymal transition and is of strong and independent importance for the progress of prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2007;13:7003–11.
- Chakravarti A, DeSilvio M, Zhang M, et al. Prognostic value of p16 in locally advanced prostate cancer: a study based on Radiation Therapy Oncology Group Protocol 9202. *J Clin Oncol* 2007;25:3082–9.
- Yasui H, Hideshima T, Richardson PG, et al. Novel therapeutic strategies targeting growth factor signalling cascades in multiple myeloma. *Br J Haematol* 2006;132:385–97.
- Podar K, Chauhan D, Anderson KC. Bone marrow microenvironment and the identification of new targets for myeloma therapy. *Leukemia* 2009;23:10–24.
- Li S, Weidenfeld J, Morrissey EE. Transcriptional and DNA binding activity of the FoXP1/2/4 family is modulated by heterotypic and homotypic protein interactions. *Mol Cell Biol* 2004;24:809–22.
- Chinnadurai G. The transcriptional corepressor CtBP: a foe of multiple tumor suppressors. *Cancer Res* 2009;69:731–4.
- Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, et al. Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science* 2005;310:644–8.
- Tomlins SA, Laxman B, Varambally S, et al. Role of the TMPRSS2-ERG gene fusion in prostate cancer. *Neoplasia* 2008;10:177–88.
- Gupta S, Iljin K, Sara H, et al. FZD4 as a mediator of ERG oncogene-induced WNT signaling and epithelial-to-mesenchymal transition in human prostate cancer cells. *Cancer Res* 2010;70:6735–45.
- Brase JC, Johannes M, Mannsperger H, et al. TMPRSS2-ERG -specific transcriptional modulation is associated with prostate cancer biomarkers and TGF-beta signaling. *BMC Cancer* 2011;11:507.
- Hermans KG, Boormans JL, Gasi D, et al. Overexpression of prostate-specific TMPRSS2(exon 0)-ERG fusion transcripts corresponds with favorable prognosis of prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2009;15:6398–403.
- Hermans KG, van der Korput HA, van Marion R, et al. Truncated ETV1, fused to novel tissue-specific genes, and full-length ETV1 in prostate cancer. *Cancer Res* 2008;68:7541–9.
- Han B, Mehra R, Dhanasekaran SM, et al. A fluorescence in situ hybridization screen for E26 transformation-specific aberrations: identification of DDX5-ETV4 fusion protein in prostate cancer. *Cancer Res* 2008;68:7629–37.
- Maher CA, Kumar-Sinha C, Cao X, et al. Transcriptome sequencing to detect gene fusions in cancer. *Nature* 2009;458:97–101.
- Markert EK, Mizuno H, Vazquez A, et al. Molecular classification of prostate cancer using curated expression signatures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:21276–81.
- Chen Y, Sawyers CL. Coordinate transcriptional regulation by ERG and androgen receptor in fusion-positive prostate cancers. *Cancer Cell* 2010;17:415–16.
- Yu J, Mani RS, Cao Q, et al. An integrated network of androgen receptor, polycomb, and TMPRSS2-ERG gene fusions in prostate cancer progression. *Cancer Cell* 2010;17:443–54.
- Mochmann LH, Bock J, Ortiz-Tanchez J, et al. Genome-wide screen reveals WNT11, a non-canonical WNT gene, as a direct target of ETS transcription factor ERG. *Oncogene* 2011;30:2044–56.

## **II. Darstellung der Publikation**

### **1. Einleitung**

Transkriptionsfaktoren der Forkhead Box P (FOXP1-4) Familie wurden bislang mit verschiedenen Tumortypen in Verbindung gebracht (Kato 2004). FOXP1 fungiert zum Beispiel als Tumorsuppressor beim Brustkrebs (Fox et al. 2004), ebenso wird ihm eine Funktion im Prostatakarzinom (Taylor et al. 2010) zugeschrieben. FOXP3 wird stark in tumorinvasiven, regulatorischen T-Zellen und in Lymphomen exprimiert (Bignone und Banham 2008). Die Expression von FOXP4 ist in Nierenkarzinomen herabreguliert (Teufel et al. 2003) und durch Translokation in diversen Brustkrebszelllinien inaktiviert (Howarth et al. 2008). FOXP2 wurde bereits mit Neoplasien in Verbindung gebracht, so kann man durch eine FOXP2-Überexpression zwischen normalen Lymphozyten und multiplen Myelomzellen unterscheiden (Campbell et al. 2010). Die weitere mögliche Bedeutung der Expression von FOXP2 in anderen Formen von malignen Tumoren ist bislang unbekannt. Im Rahmen der neuronalen Differenzierung spielt FOXP2 eine Rolle in der Sprachentwicklung (Kang und Drayna 2011). Wir haben an einem Prostatakarzinom-Tissue Micro Array (TMA) mit Tumorproben von mehr als 11000 Patienten untersucht, inwiefern FOXP2 beim Prostatakarzinom eine Rolle spielt. Bei den Ergebnissen wurden auch vorliegende klinische und molekulare Daten berücksichtigt. Es zeigte sich, dass im Prostatakarzinom meist ein Verlust/eine Reduktion oder aber eine Steigerung der FOXP2 Expression vorliegt und dass diese Steigerung signifikant mit der Aggressivität des Tumors zusammenhängt. Dies trifft vor allem auf den „non-fusion-type“ des Prostatakarzinoms zu.

### **2. Methoden**

#### **2.1 Patienten**

Ein Tissue Micro Array wurde aus 11152 Prostatektomie-Proben hergestellt. Diese stammen von Patienten, die zwischen den Jahren 1992-2011 in der Martini Klinik am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf operiert wurden. Eine genaue Beschreibung des TMA-Herstellungsprozesses wurde in einer vorangegangenen

Studie gegeben (Minner et al. 2010). Pro Patient wurde eine 0.6 mm Stanze aus einem tumorhaltigen, repräsentativen Paraffin-Gewebeblock entnommen. Die Gewebe wurden auf 24 TMA Blöcken verteilt, wobei jeder Block 129-522 Proben enthielt. Für 9695 der 11152 Tumorproben waren klinische Verlaufsdaten verfügbar, der mediane Beobachtungszeitraum lag bei 36.8 Monaten und die Spannbreite umfasste 1-219 Monate. Keiner der Patienten erhielt eine neo-adjuvante endokrine Therapie. Eine zusätzliche (salvage) Therapie wurde nur bei biochemischem Rezidiv (BCR) initiiert, was auch als klinischer Endpunkt dieser Studie definiert wurde. Die PSA- (Prostata spezifisches Antigen) Werte wurden postoperativ gemessen und ein Wert ab 0.2 ng/ml wird als das Wiederauftreten des Tumors (Recurrence) definiert. Die detaillierte Darstellung des TMA mit den zugehörigen klinischen und histopathologischen Daten wird in Tabelle 1 präsentiert. Das Vorhandensein von Tumorgewebe wurde mittels der immunhistochemischen Färbungen AMACR und 34BE12 validiert (Minner et al. 2010). Über 50 Gewebespots mit Prostata-Normalgewebe sind im TMA eingeschlossen. Die dem TMA beigelegte molekulare Datenbank enthält Ergebnisse der ERG-Expression in 9628 Tumoren und der ERG-break-apart-FISH-Analysen in 6106 Tumoren (aus (Minner et al. 2011) entnommen), sowie den Ki67-labeling-Index (LI) in 7019 Tumoren (aus (Minner et al. 2010) entnommen).

## 2.2 Immunohistochemie

Frisch geschnittene TMA-Abschnitte wurden an einem Tag und innerhalb eines Experimentes analysiert. Der Antikörper anti-FOXP2 (rabbit polyclonal, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO; 1/69 dilution; cat#HPA000382) wurde zum Nachweis der FOXP2-Expression verwendet. Die Schnitte wurden entparaffiniert und zum Zweck des „antigen retrieval“ für 5 Minuten im Autoklaven bei 121°C in pH 9 Puffer behandelt. Der gebundene Primärantikörper wurde mittels DAKO EnVision Kit (Dako) sichtbar gemacht. Die Färbung zeigte sich zumeist nuklear und ihre Intensität wurde mittels einer 4-Stufen Skala als *negativ, schwach, mäßig* und *stark* gefärbt bewertet.

## **2.3 Statistik**

Für die statistische Analyse wurde die JMP 9.0 Software (SAS Institute Inc., NC, USA) verwendet.

Kontingenz-Tafeln wurden erstellt um die Assoziation zwischen der FOXP2-Expression und den klinisch-pathologischen Variablen zu berechnen. Der Chi-Quadrat Test (Likelihood) wurde zur Detektion signifikanter Verbindungen verwendet. Kaplan-Meier Kurven wurden für das „PSA recurrence free survival“ erstellt. Der Log-Rank Test wurde angewendet um die Signifikanz der Unterschiede zwischen den Überlebensfunktionen (stratified survival functions) zu prüfen. Überlebenszeitanalysen (COX proportional hazards regression Analysen) wurden durchgeführt, um die statistische Unabhängigkeit zwischen den pathologischen, molekularen und klinischen Variablen zu testen.

## **3. Ergebnisse**

### **3.1 Technische Aspekte**

Die FOXP2-Analyse gelang erfolgreich in 8289 (91%) von verbleibenden 9064 Tumorproben, die restlichen 2088 Gewebespots mussten wegen unzureichender immunhistochemischer Qualität ausgeschlossen werden.

Die Immunhistochemie (IHC) konnte in 775 (9%) Tumoren wegen des Fehlens eindeutiger Tumorzellen in den Gewebespots oder gänzlich fehlender Gewebespots auf dem TMA-Abschnitt nicht interpretiert werden.

### **3.2 FOXP2-Expression im normalen Prostataepithel und im Prostatakarzinom**

Die Intensität der FOXP2 Färbung war im normalen Prostatagewebe mäßig bis stark ausgeprägt und ausschließlich auf den Kern beschränkt. Die Kerne der basalen und sekretorischen Zellen waren markiert, in stromalen Zellen wurde keine Färbung gesehen. Die FOXP2-Expressionsintensität war im Prostatakarzinom, verglichen mit normalem Epithel, meist reduziert (Figur 1). Die FOXP2-Immunfärbung wurde in 7779 der 8289 analysierbaren Tumore (94%) gefunden, darunter fanden sich 1572 (19%) Tumore mit schwacher, 2846 (34%) mit mäßiger, und 3361 (41%) Tumore mit

starker Färbung (Tabelle 2). Repräsentative Ausschnitte werden in Figur 1 gezeigt. Eine starke FOXP2-Positivität war mit fortgeschrittenem Tumorstadium, hohem Gleasongrad und der Präsenz von Lymphknotenmetastasen ( $p<0.0001$ ) verbunden. Eine nachgeschaltete Unteranalyse von 4206 ERG Fusion-negativen und 3096 ERG Fusion-positiven Tumoren mit FOXP2 IHC Daten ergab, dass FOXP2 in ERG-negativen Tumoren mit ungünstigem Tumorphänotyp zusammenhängt ( $p<0.0001$ ), sich diese Assoziation aber nicht in den ERG-positiven Tumoren zeigten. Tabelle 2 und sowie die ergänzenden Tabellen S1-2 zeigen die Zusammenhänge von FOXP2 mit jeglichen Tumoren und deren Untergruppen.

### **3.3 FOXP2-Expression und Tumorzellproliferation (Ki67 LI)**

Eine starke FOXP2-Färbung war signifikant mit einer erhöhten Zellproliferationsrate verbunden, welche in allen Tumoren mittels Ki67 LI gemessen wurde (Figur 2a;  $p<0.0001$ ). Diese Verbindung zeigte sich vom ERG-Fusionsstatus unabhängig (Figur 2b und 2c;  $p<0.0001$ ; jedes). Sie zeigte sich ebenso unabhängig vom Gleasongrad, was sich auch bestätigte als Tumore selben Grades getrennt analysiert wurden (Figur 3). Insgesamt weisen diese Daten auf eine generelle Rolle von FOXP2 beim Tumorwachstum und insbesondere auf eine direkte Involvierung in der Proliferation hin.

### **3.4 TMPRSS2-ERG Fusion-Status und ERG-Protein-Expression**

Die Untersuchung der Beziehung der FOXP2-Expression mit dem „fusion-type“ Prostatakarzinom erfolgte mittels zweier unabhängiger Methoden. Für diese Analyse wurde eine Untergruppe von 7302 Tumoren mit immunhistochemischen Daten zur FOXP2 Expression und des ERG Status verwendet. Außerdem waren 4613 Tumore mit TMPRSS-ERG Fusion-Daten, erhoben durch FISH, verfügbar.

Eine starke FOXP2-Immunfärbung fand sich häufiger in immunhistochemisch positiven ERG- (1826/3096; 59%) verglichen mit negativen ERG-Tumoren (1177/4206 (28%),  $p<0.0001$ , Figur 4a).

Diese Ergebnisse stimmen mit den Daten überein, die mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) unter Verwendung einer ERG-break-apart-probe (Minner et al. 2011) erhoben wurden.

### **3.5 Prognostische Relevanz der FOXP2-Expression**

Für 7050 Tumore mit immunhistochemisch erhobenen FOXP2-Daten waren auch klinische Verlaufsdaten verfügbar. Eine starke (3+) FOXP2-Färbung war signifikant mit einem frühen biochemischen Rezidiv in allen Tumoren verbunden ( $p<0.0001$ , Figur 5a). Diese Verbindung zeigte sich bei getrennter Analyse deutlich in den 3543 ERG-negativen Tumoren ( $p<0.0001$ , Figur 5b), jedoch nicht in der Untergruppe der 2625 ERG-Fusion-positiven Tumore ( $p=0.3887$ , Figur 5c). Die multivariate Analyse zeigte eine Abhängigkeit dieser Verbindung von den etablierten prognostischen Risikofaktoren wie pT-Stadium, Gleasongrad und Lymphknotenstatus ( $p<0.0001$ ; jedes), wenn alle Tumore gemeinsam analysiert werden (Tabelle 3).

### **4. Diskussion**

Die Ergebnisse unserer Studie demonstrieren, dass eine hohe Expression von FOXP2 stark mit nachteiligen Merkmalen der Erkrankung in ERG-Fusion negativen Prostatakarzinomen verbunden ist. Dabei ist die Überexpression von FOXP2 assoziiert mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium, der Präsenz von Lymphknotenmetastasen und früher Tumorwiederkehr. In dieser Studie wurde FOXP2 in hohem Maße in den Kernen von basalen und sekretorischen Zellen des normalen Prostatagewebes exprimiert. Es ist bekannt, dass die Mitglieder der Forkhead-box-P-Familie als transkriptionale Repressoren fungieren und die Differenzierung von neuronalen Zellen und Immunzellen (Lalmansingh et al. 2012, Mercer und Unutmaz 2009, Takahashi et a. 2009). Unsere Ergebnisse zeigen sich konsistent mit der generellen Rolle von FOXP2 in Bezug auf die Differenzierung und die Funktion des Prostataepithels, einschließlich der proliferativen Basalzellen und der differenzierten, ruhenden sekretorischen Zellen. Die Abwesenheit des FOXP2-Proteins in stromalen Zellen der Prostata ergänzt die Ergebnisse einer früheren Studie, in der ein relativ geringes FOXP2-mRNA-Vorkommen in der Prostata beschrieben wurde (Campbell et al. 2010). Die Stromakomponente kann im Prostatakarzinom sehr ausgeprägt sein und hat so möglicherweise zu einer massiven Verdünnung der mRNA des Prostataepithels geführt. Andere Studien berichten von der FOXP2-mRNA-Expression in nahezu allen anderen

Normalgeweben mit dem höchsten Vorkommen in Ovar, Kolon, Gehirn, Leber, im Intestinum (Campbell et al. 2010), als auch in sich entwickelnden Geweben von Lunge, Herz und Darm (Schroeder und Myers 2008). Darüber hinaus haben verschiedene Studien eine Verbindung der FOXP2-Expression zu fetalnen und adulten neuronalen Geweben (Takahashi et al. 2009) hergestellt, wonach FOXP2 eine Rolle bei der neuronalen Differenzierung und der Sprachentwicklung spielt (Kang und Drayna 2011). Ungewöhnlich ist der gefundene Zusammenhang zwischen dem Verlust der FOXP2-Expression mit einem günstigen Tumorphänotyp bzw. guter Prognose. Gewöhnlich geht der Verlust von molekularen Merkmalen des Prostataormalgewebes einher mit einer Entdifferenzierung von Zellen und ist assoziiert mit einem schlechten Outcome. Dies gilt zum Beispiel für ALCAM, PTEN, E-cadherin, oder CDKN2A (p16) im Prostatakarzinom (Chakravarti et al. 2007, Gravdal et al. 2007, Lotan et al. 2011, Minner et al. 2011). Eine mögliche Erklärung für dieses ungewöhnliche Szenario ist, dass normale Zellproteine plötzlich onkogene Eigenschaften entwickeln, wobei eine Veränderung des Zellmetabolismus stattfindet und somit „normale Zellproteine“ eine völlig andere Funktion erhalten. Es ist bekannt, dass FOXP2 das Potential hat, mit verschiedenen Signalwegen der Karzinogenese zu interferieren. FOXP2 reguliert beispielsweise die Expression einer Reihe von Genen, die in die Signalwege von Tumoren involviert sind, wie WNT, NF-kappa B und IGF-1 (Podar et al. 2009, Yasui 2006). FOXP2 interagiert und reguliert die Aktivität des C-terminal bindenden Proteins (CTBP1) (Li et al. 2004). Die Überexpression von CTBP1 fördert die Progression des Zellzyklus und inhibiert die Apoptose durch Hemmung der Expression von bekannten Tumorsuppressoren und Apoptosegenen wie PTEN, p16 and BAX (Chinnadurai 2009). Im Gegensatz zu entsprechenden normalen Zellen wird FOXP2 in Lymphomzellen überexprimiert, was weiterhin vermuten lässt, dass FOXP2 eine onkogene Funktion in vivo ausüben kann (Campbell et al. 2010). Unsere Untergruppenanalyse von ERG-positiven und ERG-negativen Prostatakarzinomen könnte beitragen, den paradoxen Zusammenhang von anhaltend hohen FOXP2-Spiegeln mit ungünstigen Tumormerkmalen zu erklären. Bei einem der meistvorkommenden chromosomalen Rearrangements des Prostatakarzinoms fusionieren das androgenresponsive TMPRSS2-Gen mit dem zur ETS-Familie gehörenden Transkriptionsfaktor ERG-Gen (Tomlins et al. 2005). Diese Änderung kommt bei etwa 50% der Prostatakarzinome vor und bedingt eine hohe ERG-Proteinexpression und eine Vielfalt an nachfolgenden Veränderungen in diesen

Tumoren (Bräse et al. 2011, Gupta et al. 2010, Tomlins et al. 2005, Tomlins et al. 2008). Die TMPRSS2:ERG Fusion ist der Prototyp einer Zahl von ähnlichen Rearrangements, die zur onkogenen Aktivierung der ETS-Gene im Prostatakarzinom führen (Han et al. 2008, Hermans et al. 2008, Hermans et al. 2009, Maher et al. 2009). Dies führte zu einer molekularen Subklassifikation in Fusion-negative und Fusion-positive Prostatakarzinome. Unsere Daten zeigen einen signifikanten Unterschied in der Frequenz und der prognostischen Bedeutung der FOXP2-Expression im „fusion-type“ und „non-fusion-type“ Prostatakarzinom.

Wir fanden heraus, dass eine anhaltend mäßige bis starke FOXP2 Expression signifikant mit ERG-Fusion-positiven Tumoren verbunden ist. Dieser Zusammenhang wurde mittels zweier unabhängiger Methoden untersucht und zeigte sich sowohl für die immunhistochemische Analyse der ERG-Expression, als auch für die FISH-basierte Detektion des „ERG-breakage“. Alle mit einer FOXP2-Überexpression verbundenen ungünstigen Merkmale beschränkten sich auf die ERG-negativen Tumore. Diese Ergebnisse sprechen für biologisch eindeutige Konsequenzen von FOXP2 in ERG-fusion-negativen und -positiven Tumoren. Eine unterschiedliche Rolle von FOXP2 im „fusion-typ“ und „non-fusion-typ“ des Prostatakarzinoms ist denkbar. Andernfalls wird dem tumorfördernden Effekt von FOXP2 möglicherweise durch ERG entgegengewirkt. ERG wird normalerweise nicht im Prostataepithel exprimiert. Durch die Aktivierung der ERG-Expression durch die TMPRSS2:ERG Genfusion kommt es zu einer abweichenden Aktivierung einer anderen Signalkaskade in den ERG-fusion positiven Prostatakarzinomen (Chen und Sawyers 2010, Markert et al. 2011, Yu et al. 2010). Eine der am Besten verstandenen Konsequenzen der ERG-Expression ist die Aktivierung der WNT-Signalwirkung (Bräse et al. 2011, Gupta et al. 2010, Mochman et al. 2011). Es ließe sich darüber spekulieren, dass FOXP2 und ERG, oder ihre Zielgene, mit Signalwegen interferieren, die die Tumoraggressivität steuern. Möglicherweise schließt dies ebenso den WNT-Signalweg ein, was anschließend auf den unterschiedlichen klinischen Verlauf von ERG-positiven und ERG-negativen Tumoren zurückgeführt werden kann. Die Gene oder Mechanismen, die diese Effekte vermitteln gilt es noch zu identifizieren. Indirekte Beweise für wesentliche Unterschiede des zellbiologischen Effektes von FOXP2 hängen von den in Tumorzellen aktivierten Gensets ab, abgeleitet von der signifikanten Verbindung der hohen FOXP2-Expression und der Pathogenese des multiplen Myeloms (Campbell et al. 2010).

Unsere Studie weist auf eine wichtige Rolle von FOXP2 im Rahmen der Prostatakarzinomentwicklung und -progression hin. Außerdem vermuten wir unterschiedliche biologische Effekte auf ERG-fusion-negative und –positive Tumore. Im „non fusion-type“ des Prostatakarzinoms bedeutet eine hohe FOXP2 Expression eine Untergruppe mit besonders schlechter Prognose.

## **5. Zusammenfassung**

Die Transkriptionsfaktoren der Forkhead box P (FOXP 1-4) Familie wurden bislang mit verschiedenen Tumoren in Verbindung gebracht. Die Rolle des neuronalen Transkriptionsfaktorsfaktors FOXP2 im Prostatakarzinom ist bislang unbekannt. Um dies zu untersuchen wurde ein Tissue Microarray, bestehend aus über 11 000 Prostatatumorproben, inklusive klinischer Daten der Patienten immunhistochemisch auf die Expression von FOXP2 untersucht. Zusätzlich wurde die Analyse mit bereits vorhandenen Daten über die ERG-Fusion (durch FISH und IHC) und die Zellproliferation (Ki67 LI) im Prostatakarzinom verglichen.

In den basalen und sekretorischen Zellen des normalen Prostatagewebes zeigte sich eine moderate bis starke FOXP2-Proteinexpression. Im Vergleich zu den normalen Zellen zeigte sich die FOXP2-Expression in 25% der Prostatakarzinome reduziert oder fehlte vollständig. Eine starke FOXP2-Expression war insbesondere in ERG-negativen Tumoren verbunden mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium, einem höheren Gleasongrad, der Präsenz von Lymphknotenmetastasen und einer früheren Tumorwiederkehr, im Gegensatz zur Untergruppe der ERG-positiven Tumore. Unabhängig vom ERG-Status war eine starke FOXP2 Expression verbunden mit einer höheren Zellproliferation. Unsere Ergebnisse weisen auf eine „paradoxe“ onkogene Rolle des FOXP2 im „non-fusion-type“ des Prostatakarzinoms hin. In dieser Gruppe sprechen hohe Vorkommen von FOXP2 für eine schlechte Prognose.

## **6. Abbildungen und Tabellen**

**Tabelle 1** Komposition des Prognose-TMA bestehend aus 10152 Prostatakarzionomproben.

	No. of patients (%)	
	Study cohort on TMA (n=11,152)	Biochemical relapse among categories
		(n=1,824)
<b>Follow-up (mo)</b>		
Mean	53.4	-
Median	36.8	-
Age (y)		
<50	318	49
50-60	2.768	460
60-70	6.548	1.081
>70	1.439	232
<b>Pretreatment PSA (ng/ml)</b>		
<4	1.407	142
4-10	6.735	827
10-20	2.159	521
>20	720	309
<b>Tumor stage</b>		
pT2	7.370	570
pT3a	2.409	587
pT3b	1.262	618
pT4	63	49
<b>Gleason grade</b>		
≤3+3	2.859	193
3+4	1.565	573
4+3	6.183	849
≥4+4	482	208
<b>Lymph node metastasis</b>		
pN0	6.117	1.126
pN+	561	291
<b>Surgical margin</b>		
negative	8.984	1.146
positive	1.970	642

NOTE: Numbers do not always add up to 11,152 in the different categories because of cases with missing data. Abbreviation: AJCC, American Joint Committee on Cancer.

**Tabelle 2** Assoziation zwischen den Ergebnissen der FOXP2-Immunfärbung (IHC) und dem Tumorphänotyp.

parameter	n evaluable	FOXP2 IHC result				p value
		negative (%)	weak (%)	moderate (%)	strong (%)	
All cancers	8.289	6	19	34	41	
<b>Tumor stage</b>						
pT2	5.546	7	21	34	38	
pT3a	1.796	5	16	33	46	<0.0001
pT3b	904	3	14	40	43	
pT4	22	0	5	45	50	
<b>Gleason grade</b>						
≤3+3	1.817	8	23	35	34	
3+4	4.827	6	19	33	42	<0.0001
4+3	1.220	4	16	36	45	
≥4+4	394	3	13	40	44	
<b>Lymph node metastasis</b>						
N0	4.363	6	18	34	43	
N+	429	4	10	40	46	
<b>Surgical margin</b>						
negative	6.652	6	19	34	41	0.2967
positive	1.479	6	17	38	46	

**Tabelle 3** Multivariate COX-Regressionsanalyse zur Vorhersage eines biochemischen Rezidivs (BCR). HR: hazard ratio; CI: confidence interval.

parameter	factor	HR	95% CI	p value
pT Stage	pT3a vs. pT2	2.3	1.9-2.8	
	pT3b vs. pT3a	1.8	1.5-2.1	<0,0001
	pT4 vs. pT3b	1.1	0.5-2.0	
Gleason	3+4 vs. ≤3+3	1.7	1.2-2.5	
	4+3 vs. 3+4	2.2	1.8-2.5	<0,0001
	≥4+4 vs. 4+3	1.0	0.8-1.2	
pN stage	N+ vs N0	1.7	1.4-2.1	<0,0001
FOXP2	weak vs. negative	0.8	0.6-1.2	
	moderate vs. weak	1.2	0.9-1.4	0,1033
	strong vs. moderate	1.1	0.9-1.3	

HR: hazard ratio; CI: confidence interval.

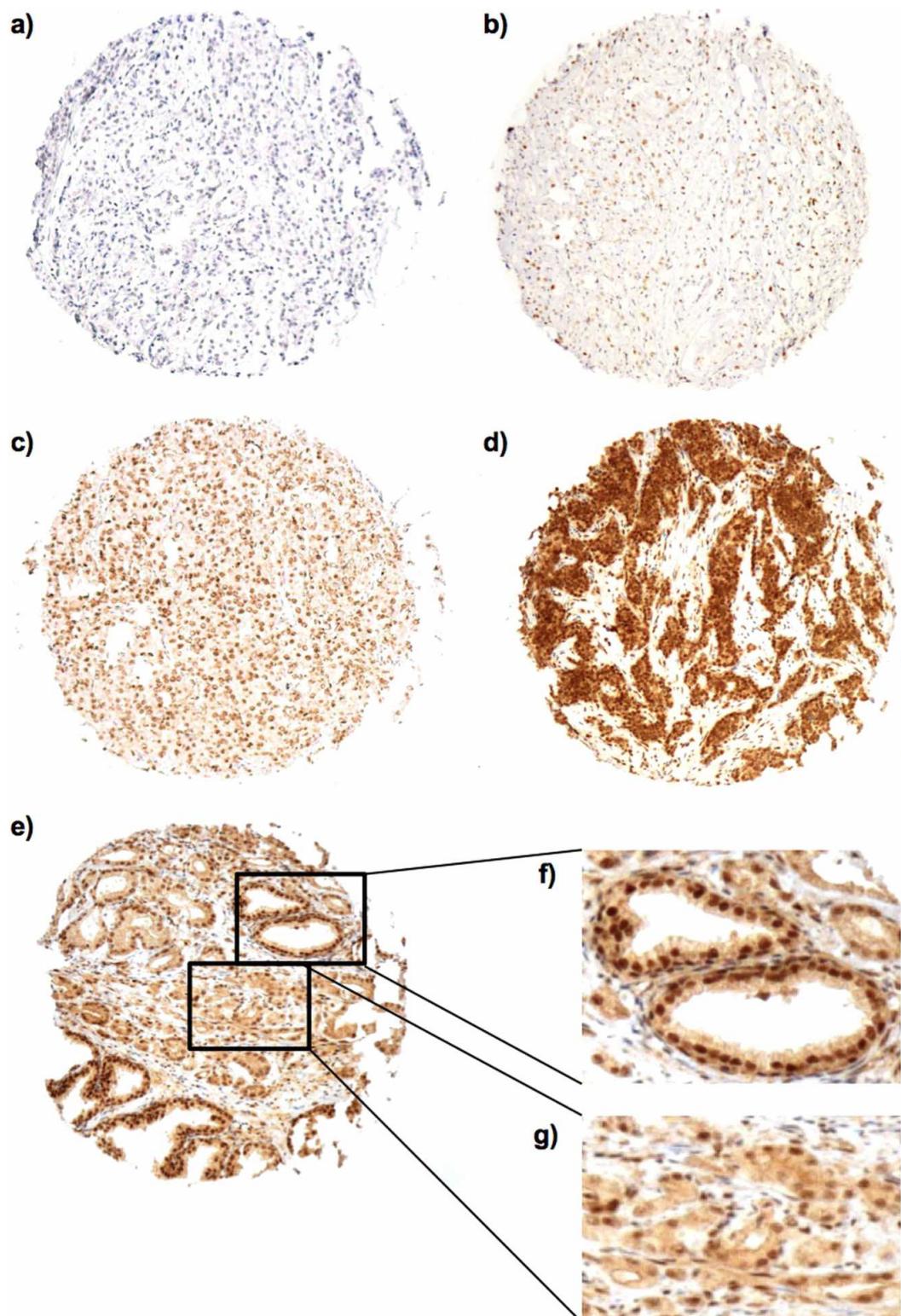
**Ergänzende Tabelle 1** Assoziation zwischen der FOXP2-Expression und dem Tumorphänotyp in der Untergruppe der 4206 ERG-Fusion-negativen Tumore.

parameter	n evaluable	FOXP2 IHC result				p value
		negative (%)	weak (%)	moderate (%)	strong (%)	
All cancers	4.206	10	27	36	28	
<b>Tumor stage</b>						
pT2	2.870	10	29	35	25	
pT3a	848	9	23	36	32	
pT3b	466	5	18	41	36	
pT4	13	0	8	62	31	<0.0001
<b>Gleason grade</b>						
≤3+3	826	12	32	35	20	
3+4	2.453	10	27	35	27	
4+3	672	6	21	39	35	
≥4+4	241	5	16	42	37	<0.0001
<b>Lymph node metastasis</b>						
N0	2.371	9	25	36	30	
N+	212	6	13	42	39	<0.0001
<b>Surgical margin</b>						
negative	3.375	10	27	36	28	
positive	748	10	25	39	27	0.8845

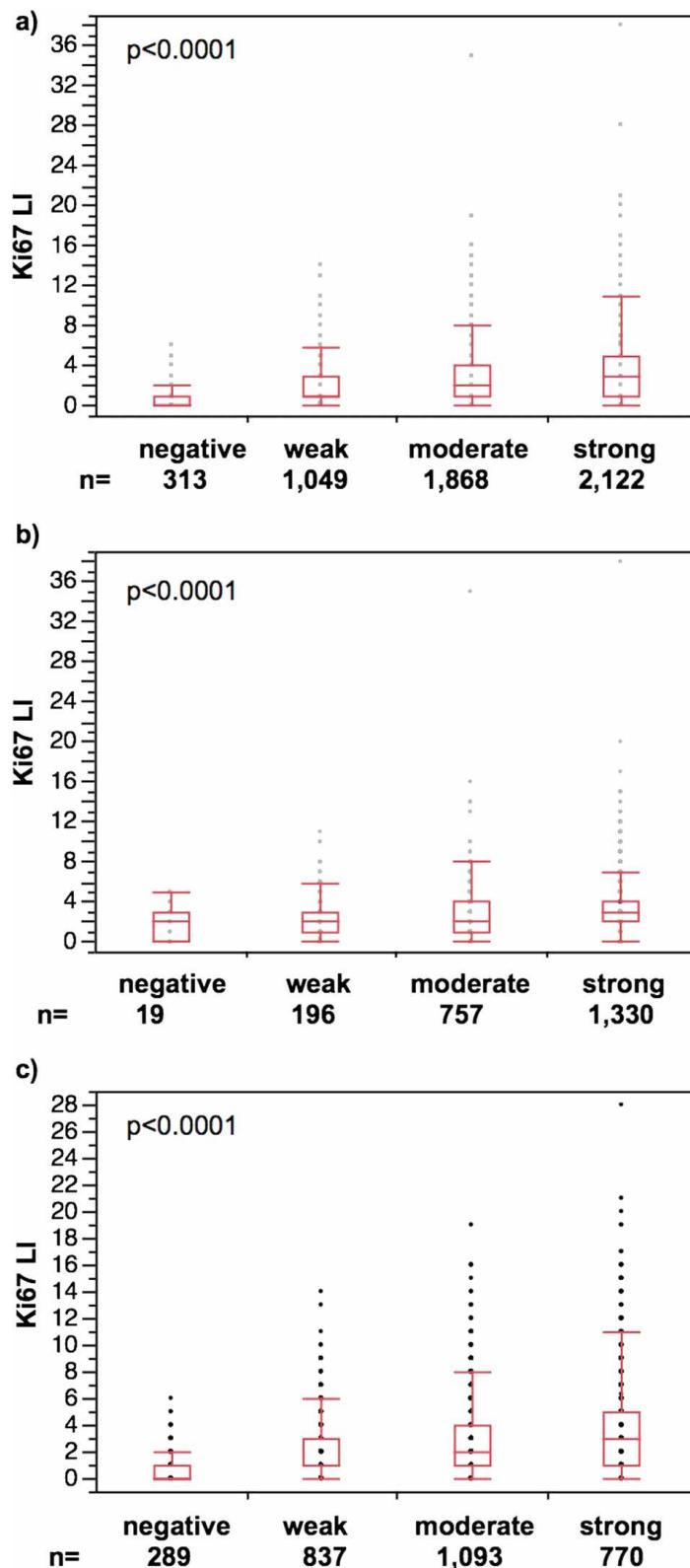
**Ergänzende Tabelle 2** Assoziation zwischen der FOXP2-Expression und dem Tumorphänotyp in der Untergruppe der 3096 ERG-Fusion-positiven Tumoren.

parameter	n evaluable	FOXP2 IHC result				p value
		negative (%)	weak (%)	moderate (%)	strong (%)	
All cancers	3.096	1	8	33	59	
<b>Tumor stage</b>						
pT2	1.920	1	8	33	58	
pT3a	794	1	7	30	62	0.2092
pT3b	368	0	8	38	55	
pT4	6	0	0	17	83	
<b>Gleason grade</b>						
≤3+3	609	1	10	34	55	
3+4	1.908	1	7	32	60	0.1400
4+3	457	1	8	32	59	
≥4+4	117	0	4	38	58	
<b>Lymph node metastasis</b>						
N0	1.615	1	7	31	61	0.1265
N+	186	0	6	37	56	
<b>Surgical margin</b>						
negative	2.449	1	7	33	59	0.1150
positive	591	1	8	31	61	

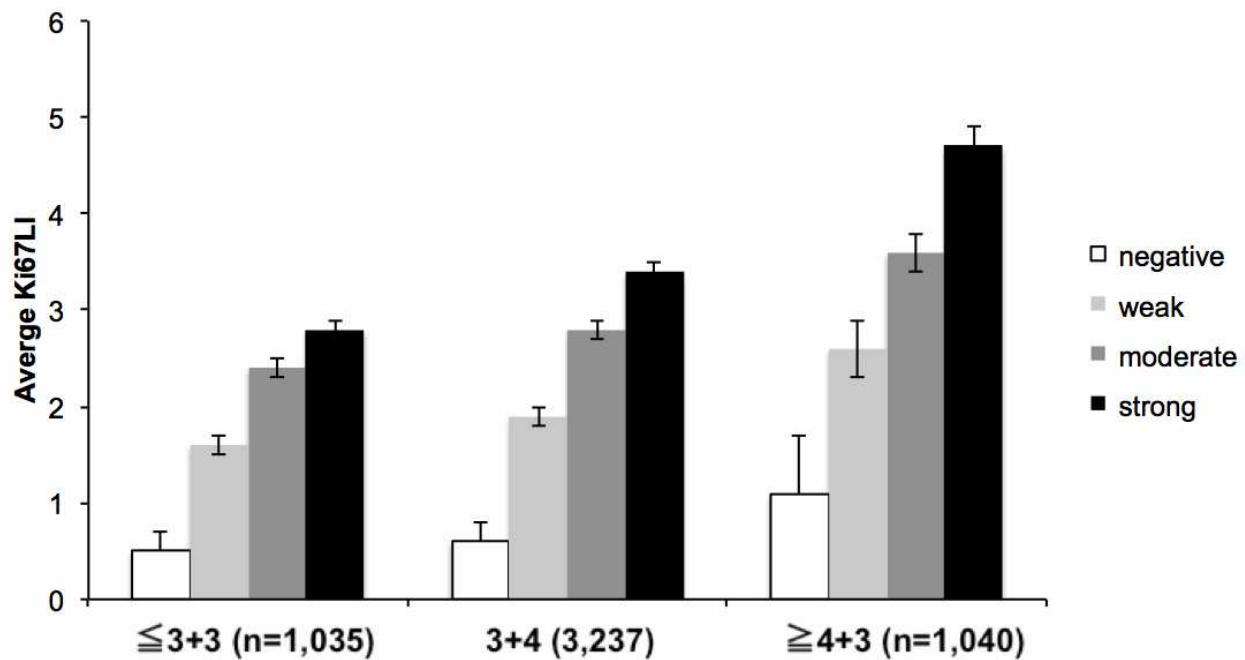
**Figur 1** Repräsentative Ausschnitte der FOXP2-Immunfärbung im Prostatakarzinom und Prostatanormalgewebe. a) negative, b) schwache, c) moderate, d) starke Färbung im Karzinom, e) Karzinom (vergrößert in g)) und angrenzendes normales Prostataepithel (vergrößert in f)) im selben Gewebespot.



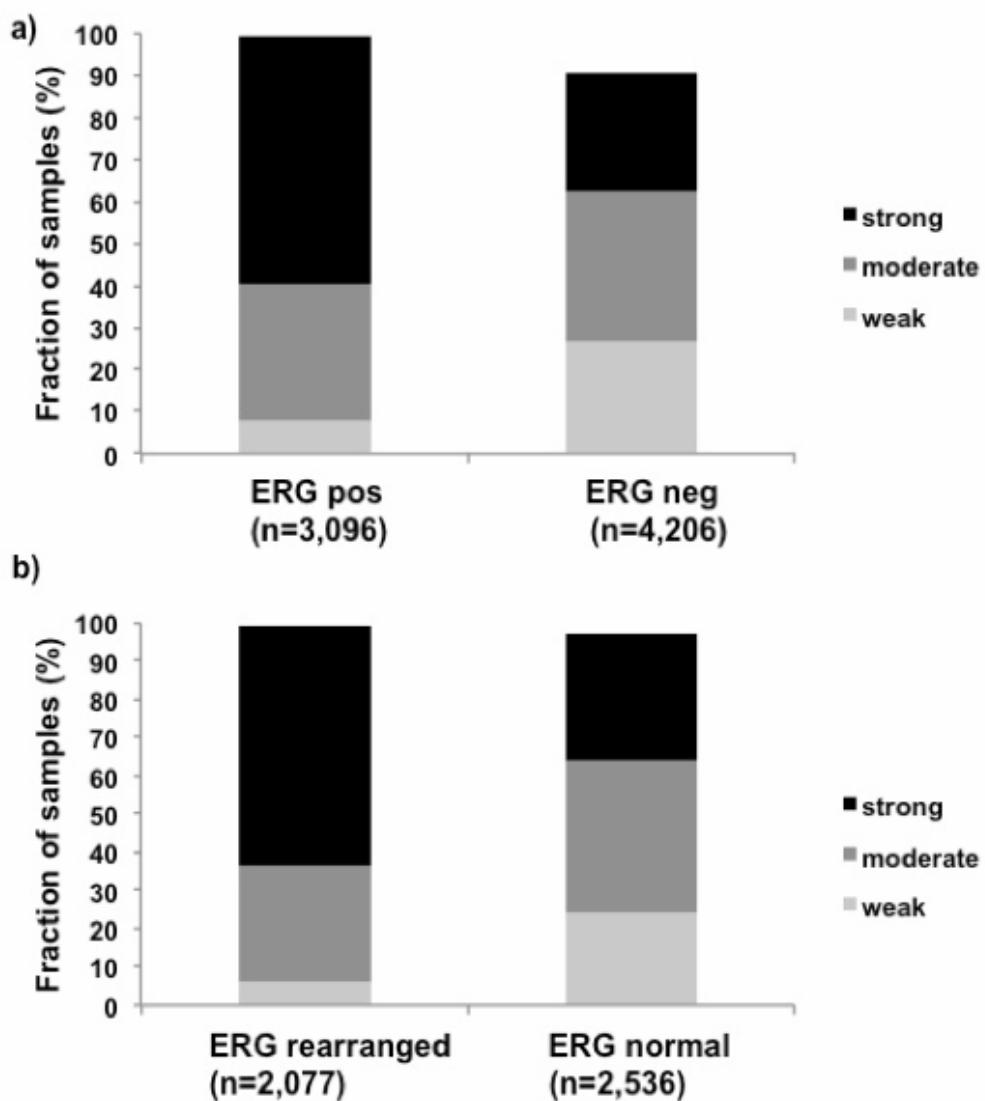
**Figur 2** Assoziation zwischen FOXP2-Immunfärbungsintensität und Zellproliferation gemessen mittels Ki67 labelling index (Ki67 LI) in a) allen Tumoren (n=5352), b) ERG-positiven Tumoren (n=2302), und c) ERG-negativen Tumoren (n=2989).



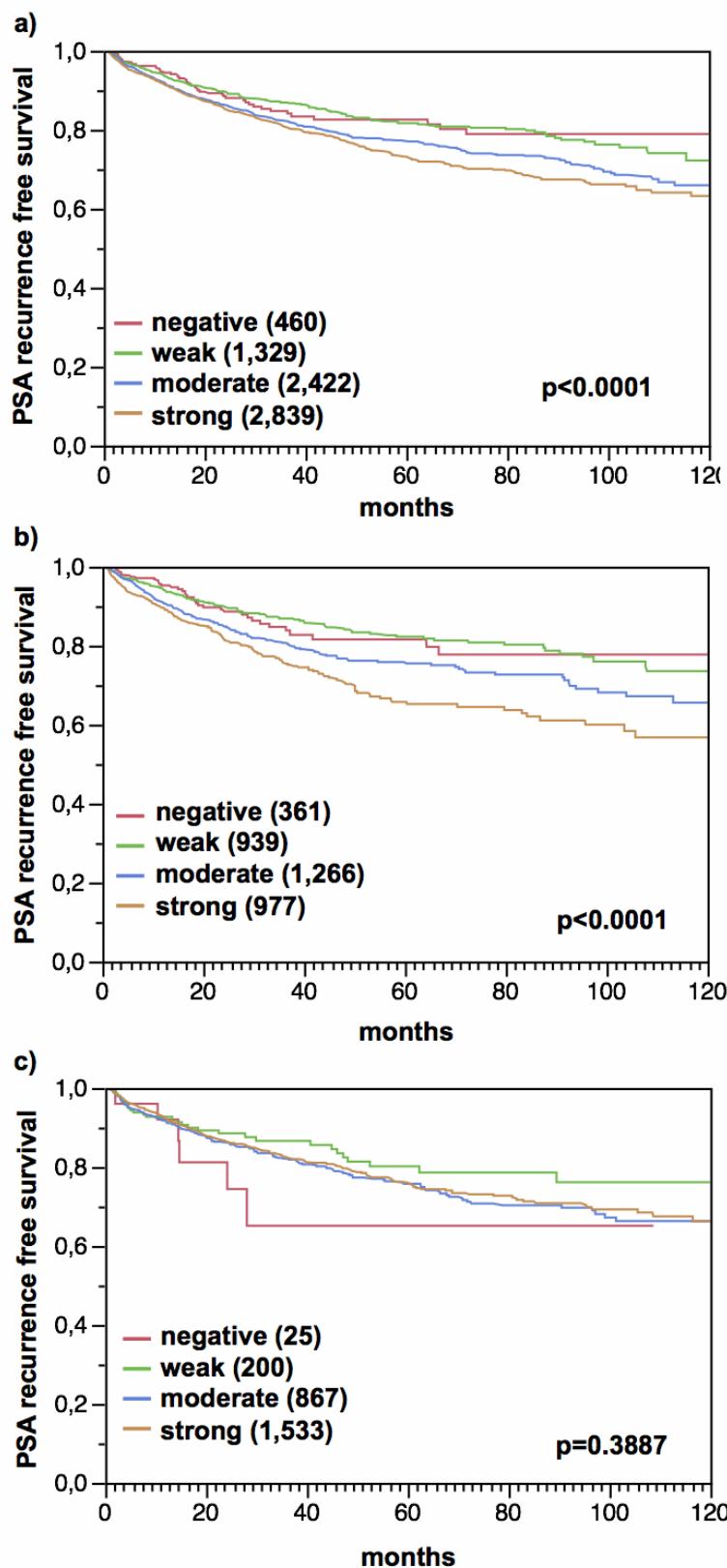
**Figur 3** Signifikante Assoziation zwischen der FOXP2-Immunfärbung und dem Ki67 labeling index (Ki67 LI) in Untergruppen von Tumoren mit identischem Gleasongrad.



**Figur 4** Assoziation zwischen positiver FOXP2-Immunfärbung und ERG-Fusionsstatus nachgewiesen durch a) IHC- und b) FISH- Analyse.  $p<0.0001$ ; jedes.



**Figur 5** Assoziation zwischen der FOXP2-Immunfärbungsintensität und des biochemischen Rezidivs (BCR) in a) allen Tumoren (n=7050), b) ERG-negativen Tumoren (n=3543) und c) ERG-positiven Tumoren (n=2625).



## **7. Abkürzungsverzeichnis**

BCR	Biochemical Relapse (= biochemisches Rezidiv)
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FOXP 1-4	Forkhead Box Protein 1-4
IHC	Immunhistochemie
PSA	Prostata spezifisches Antigen
TMA	Tissue Micro Array
TNM	<b>Tumor, Lymphknoten (=Node), Metastase</b>

## **8. Literaturverzeichnis**

**Bignone PA**, Banham AH. FOXP3+ regulatory T cells as biomarkers in human malignancies. *Expert Opin Biol Ther* 2008; 8: 1897-1920.

**Bräse JC**, Johannes M, Mannsperger H, et al. TMPRSS2-ERG -specific transcriptional modulation is associated with prostate cancer biomarkers and TGFbeta signaling. *BMC Cancer* 2011; 11: 507.

**Campbell AJ**, Lyne L, Brown PJ, et al. Aberrant expression of the neuronal transcription factor FOXP2 in neoplastic plasma cells. *Br J Haematol* 2010; 149: 221-230.

**Chakravarti A**, DeSilvio M, Zhang M, et al. Prognostic value of p16 in locally advanced prostate cancer: a study based on Radiation Therapy Oncology Group Protocol 9202. *J Clin Oncol* 2007; 25: 3082-3089.

**Chen Y**, Sawyers CL. Coordinate transcriptional regulation by ERG and androgen receptor in fusion-positive prostate cancers. *Cancer Cell* 2010; 17: 415-416.

**Chinnadurai G**. The transcriptional corepressor CtBP: a foe of multiple tumor suppressors. *Cancer Res* 2009; 69: 731-734.

**Fox SB**, Brown P, Han C, et al. Expression of the forkhead transcription factor FOXP1 is associated with estrogen receptor alpha and improved survival in primary human breast carcinomas. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 3521-3527.18.

**Gravdal K**, Halvorsen OJ, Haukaas SA, et al. A switch from E-cadherin to N-cadherin expression indicates epithelial to mesenchymal transition and is of strong and independent importance for the progress of prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 7003-7011.

**Gupta S**, Iljin K, Sara H, et al. FZD4 as a mediator of ERG oncogene-induced WNT signaling and epithelial-to-mesenchymal transition in human prostate cancer cells. *Cancer Res* 2010; 70: 6735-6745.

**Han B**, Mehra R, Dhanasekaran SM, et al. A fluorescence in situ hybridization screen for E26 transformation-specific aberrations: identification of DDX5-ETV4 fusion protein in prostate cancer. *Cancer Res* 2008; 68: 7629-7637.

**Hermans KG**, Boormans JL, Gasi D, et al. Overexpression of prostate-specific TMPRSS2(exon 0)-ERG fusion transcripts corresponds with favorable prognosis of prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 6398-6403.

**Hermans KG**, van der Korput HA, van Marion R, et al. Truncated ETV1, fused to novel tissue-specific genes, and full-length ETV1 in prostate cancer. *Cancer Res* 2008; 68: 7541-7549.

**Howarth KD**, Blood KA, Ng BL, et al. Array painting reveals a high frequency of balanced translocations in breast cancer cell lines that break in cancer-relevant genes. *Oncogene* 2008; 27: 3345-3359.

**Kang C**, Drayna D. Genetics of speech and language disorders. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2011; 12: 145-164.

**Katoh M**. Human FOX gene family (Review). *Int J Oncol* 2004; 25: 1495-1500.

**Lalmansingh AS**, Karmakar S, Jin Y, et al. Multiple modes of chromatin remodeling by Forkhead box proteins. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1819(7):707-15.

**Li S**, Weidenfeld J, Morrisey EE. Transcriptional and DNA binding activity of the Foxp1/2/4 family is modulated by heterotypic and homotypic protein interactions. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 809-822.

**Lotan T**, Gurel B, Sutcliffe S, et al. PTEN Protein Loss by Immunostaining: Analytic Validation and Prognostic Indicator for a High Risk Surgical Cohort of Prostate Cancer Patients. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 6563-6573.

**Maher CA**, Kumar-Sinha C, Cao X, et al. Transcriptome sequencing to detect gene fusions in cancer. *Nature* 2009; 458: 97-101.

**Markert EK**, Mizuno H, Vazquez A, et al. Molecular classification of prostate cancer using curated expression signatures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 21276-21281.

**Mercer F**, Unutmaz D. The biology of FoxP3: a key player in immune suppression during infections, autoimmune diseases and cancer. *Adv Exp Med Biol* 2009; 665: 47-59.

**Minner S**, Enodien M, Sirma H, et al. ERG Status Is Unrelated to PSA Recurrence in Radically Operated Prostate Cancer in the Absence of Antihormonal Therapy. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 5878-5888.

**Minner S**, Jessen B, Stiedenroth L, et al. Low level HER2 overexpression is associated with rapid tumor cell proliferation and poor prognosis in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 1553-1560.

**Minner S**, Wittmer C, Graefen M, et al. High level PSMA expression is associated with early psa recurrence in surgically treated prostate cancer. *Prostate* 2010; 71: 281-288.

**Minner S**, Kraetzig F, Tachezy M, et al. Low activated leukocyte cell adhesion molecule expression is associated with advanced tumor stage and early prostatespecific antigen relapse in prostate cancer. *Hum Pathol* 2011; 42: 1946-1952.

**Mochmann LH**, Bock J, Ortiz-Tanchez J, et al. Genome-wide screen reveals WNT11, a non-canonical WNT gene, as a direct target of ETS transcription factor

ERG. *Oncogene* 2011; 30: 2044-2056.

**Podar K**, Chauhan D, Anderson KC. Bone marrow microenvironment and the identification of new targets for myeloma therapy. *Leukemia* 2009; 23: 10-24.

**Schroeder DI**, Myers RM. Multiple transcription start sites for FOXP2 with varying cellular specificities. *Gene* 2008; 413: 42-48.

**Taylor BS**, Schultz N, Hieronymus H, et al. Integrative genomic profiling of human prostate cancer. *Cancer Cell* 2010; 18: 11-22.

**Takahashi H**, Takahashi K, Liu FC. FOXP genes, neural development, speech and language disorders. *Adv Exp Med Biol* 2009; 665: 117-129.

**Teufel A**, Wong EA, Mukhopadhyay M, et al. FoxP4, a novel forkhead transcription factor. *Biochimica et biophysica acta* 2003; 1627: 147-152.

**Tomlins SA**, Laxman B, Varambally S, et al. Role of the TMPRSS2-ERG gene fusion in prostate cancer. *Neoplasia* 2008; 10: 177-188.

**Tomlins SA**, Rhodes DR, Perner S, et al. Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science* 2005; 310: 644-648.

**Yasui H**, Hideshima T, Richardson PG, et al. Novel therapeutic strategies targeting growth factor signalling cascades in multiple myeloma. *Br J Haematol* 2006; 132: 385-397.

**Yu J**, Mani RS, Cao Q, et al. An integrated network of androgen receptor, polycomb and TMPRSS2-ERG gene fusions in prostate cancer progression. *Cancer Cell* 2010; 17: 443-454.

### **III. Erklärung des Eigenanteils**

Die Autorin L. Stumm und Ko-Autorin L. Burkhardt konzipierten die Studie und beteiligten sich an der Durchführung der Experimente. Außerdem analysierten sie die Daten. Die Auswertung der immunhistochemischen FOXP2-Daten erfolgte durch die Autorin unter fachärztlichem Review durch die Ko-Autoren S. Minner, S. Steurer und G. Sauter. Die Autorin war an Interpretation der Daten, der Verfassung des Papers und an der endgültigen Gestaltung beteiligt.

#### **IV. Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. med. G. Sauter für die Ermöglichung dieser Arbeit und die konstruktive Zusammenarbeit.

Außerdem möchte ich mich herzlich bei L. Burkhardt, PD Dr. rer. nat. R. Simon, PD Dr. rer. nat H. Sirma und meinem ehemaligen Oberarzt Dr. med. S. Steurer für ihre stets hilfreiche, freundliche Unterstützung und ihren professionellen Rat bedanken, ohne sie wäre diese Arbeit nicht gelungen.

Des Weiteren gilt mein Dank dem Team der Pathologie, besonders den Mitarbeitern des TMA-Labors für die exzellente technische Arbeit und den immer freundlichen und herzlichen Umgang.

Auch meiner Familie und Freunden danke ich herzlich für die stetige Motivation und dass sie immer für einen Rat oder ein offenes Ohr zur Verfügung standen.

## **V. Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: .....