

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Pathologie

Prof. Dr. med. Guido Sauter

Untersuchung zum RNA-binding motif protein 3 (RBM3) im Prostatakarzinom

Publikationspromotion

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

vorgelegt von:

Julia Friederike Elisabeth Wilking

Hamburg 2017

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 26.09.2017**

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

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

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: **Prof. Dr. S. Kindler**

Inhaltsverzeichnis

I.	Artikel	S.1
II.	Darstellung der Publikation	S.11
	1.0 Einleitung	S.11
	2.0 Material und Methoden	S.12
	2.1. Patienten	S.12
	2.2. Immunhistochemie	S.12
	3.0 Ergebnisse	S.13
	4.0 Diskussion	S.13
	5.0 Zusammenfassung	S.15
	6.0 Abstract	S.17
	7.0 Literaturverzeichnis	S.18
III.	Darstellung des Eigenanteils	S.20
IV.	Danksagung	S.21
V.	Lebenslauf	S.22
VI.	Eidesstattliche Erklärung	S.23



ELSEVIER

Available at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

journal homepage: www.ejancer.com

High RNA-binding motif protein 3 expression is an independent prognostic marker in operated prostate cancer and tightly linked to ERG activation and *PTEN* deletions

Katharina Grupp^{a,b,1}, Julia Wilking^{b,1}, Kristina Prien^b, Claudia Hube-Magg^b, Hüseyin Sirma^b, Ronald Simon^b, Stefan Steurer^b, Lars Budäus^c, Alexander Haese^c, Jakob Izbicki^a, Guido Sauter^b, Sarah Minner^b, Thorsten Schlomm^{c,d}, Maria Christina Tsourlakis^{b,*}

^a General, Visceral and Thoracic Surgery Department and Clinic, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

^b Institute of Pathology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

^c Martini-Clinic, Prostate Cancer Center, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

^d Department of Urology, Section for Translational Prostate Cancer Research, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

KEYWORDS

RBM3
ERG
PTEN
Prostate cancer
TMA

Abstract **Background:** The RNA-binding motif protein 3 (RBM3) has recently been suspected as a prognostic biomarker in several cancers.

Methods: RBM3 expression was analysed by immunohistochemistry on a tissue microarray containing 11,152 prostate cancers.

Results: RBM3 expression was more often detectable in malignant compared to benign prostate. RBM3 immunostaining was found in 64% of the interpretable prostate cancers and was considered strong in 25.6%. High RBM3 expression was linked to advanced tumour stage, high Gleason score, positive nodal involvement and positive surgical margin status ($p < 0.0001$ each). There was a remarkable accumulation of strong RBM3 expression in v-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog (ERG) positive prostate cancers and tumours harbouring *PTEN* deletions ($p < 0.0001$ each). Moreover, RBM3 staining was tightly related to early biochemical recurrence if all tumours or subgroups of ERG negative and ERG positive cancers were analysed ($p < 0.0001$ each). In multivariate analysis, including

* Corresponding author: Tel.: +49 40 7410 55393; fax: +49 40 7410 55997.

E-mail addresses: k.grupp@uke.de (K. Grupp), Julia.Wilking@med.uni-giessen.de (J. Wilking), k.prien@uke.de (K. Prien), c.hube@uke.de (C. Hube-Magg), h.sirma@uke.de (H. Sirma), r.simon@uke.de (R. Simon), s.steurer@uke.de (S. Steurer), budaeus@uke.de (L. Budäus), haese@uke.de (A. Haese), izbicki@uke.de (J. Izbicki), g.sauter@uke.de (G. Sauter), s.minner@uke.de (S. Minner), tschlomm@uke.de (T. Schlomm), mtsourlakis@uke.de (M.C. Tsourlakis).

¹ K. Grupp and J. Wilking contributed equally to this study.

RBM3 staining, Gleason grade, pT stage, prostate-specific antigen (PSA), surgical margin status, and nodal status, the prognostic impact of RBM3 staining retained statistically significance ($p = 0.0084$).

Conclusion: Our observations indicate that high RBM3 expression is an independent prognostic marker in prostate cancer. The tight link to ERG activation and *PTEN* deletions suggest interaction with key molecular pathways in prostate cancer.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Prostate cancer is the most common malignancy in men in Western societies [1]. The established pre-treatment prognostic parameters Gleason grade, tumour extent on biopsies, preoperative prostate-specific antigen (PSA) and clinical parameters are statistically powerful but still insufficient for optimal individual treatment decisions. There is a considerable hope, that the analysis of molecular features will better enable an individual prediction of tumour aggressiveness in the future.

The RNA-binding motif protein 3 (RBM3) is a glycine-rich protein transcriptionally induced by low temperature [2] and hypoxia [3]. RBM3 contains an RNA-recognition motif and is suspected to play a key role in the synthesis of proteins associated with carcinogenesis and proto-oncogene functions [4]. *In vitro* analysis also described RBM3 overexpression to be linked to decreased cell death [5,6] and increases cell proliferation [6] while down-regulation of RBM3 was associated with increased cell death [7] and decreased cell proliferation [6]. Immunohistochemical studies detected RBM3 protein expression in various malignancies [8–12], including studies suggesting high nuclear expression as a predictor for improved survival in melanoma [11] as well as colorectal [8], and breast cancer [10].

For prostate, higher RBM3 protein expression was described to occur in cancer than in normal prostate epithelium [12]. At the same time high RBM3 protein levels were suggested to be linked to prolonged time to disease progression in a study involving 88 patients [12]. To learn more on the potential clinical utility of RBM3 protein analysis and its relationship to key molecular alterations in prostate cancer, a tissue microarray containing samples from more than 10,000 patients with clinical follow-up and an attached molecular database was utilised. Our data demonstrate that high nuclear RBM3 protein expression is an independent predictor of poor prognosis and that RBM3 expression is strongly linked to ERG activated and *PTEN*-deleted prostate cancers.

2. Material and methods

2.1. Patients

Radical prostatectomy specimens were available from 11,152 patients, undergoing surgery between

1992 and 2011 at the Department of Urology, and the Martini Clinics at the University Medical Center Hamburg-Eppendorf. Follow-up data were available of 9695 patients with a median follow-up of 36.8 months (range: 1–228 months; Table 1). Prostate specific antigen values were measured following surgery and recurrence was defined as a postoperative PSA of 0.2 ng/ml and increasing at first of appearance. All prostate specimens were analysed according to a standard procedure, including complete embedding of the entire prostate

Table 1
Composition of the prognostic tissue microarray containing 11,152 prostate cancer specimens.

	No. of patients	
	Study cohort on TMA (n = 11,152)	Biochemical relapse among categories (n = 1824)
Follow-up (mo)		
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
Pretreatment prostate-specific antigen (PSA) (ng/ml)		
<4	1,407	142
4–10	6,735	827
10–20	2,159	521
>20	720	309
pT category (AJCC, 2002)		
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
pN category		
pN0	6,117	1,126
pN+	561	291
Surgical margin		
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: TMA: tissue microarray, AJCC: American Joint Committee on Cancer.

for histological analysis [13]. The Gleason grade had been diagnosed in the prostatectomy specimens. The TMA manufacturing process was described earlier in detail [14]. 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 144–522 tumour samples. Each TMA block also contained various control tissues including normal prostate tissue and other normal tissues. The molecular database attached to this TMA contained results on ERG expression in 9628, *ERG* break apart fluorescence *in situ* hybridization (FISH) analysis in 6106 (expanded from [15]), and deletion status of 5q21 in 3037 [16], 6q15 in 3528 (expanded from [17]), *PTEN* in 6130 [18], and 3p13 in 1290 (data not shown) tumours.

2.2. Immunohistochemistry

Freshly cut TMA sections were analysed on one day and in one experiment. Slides were deparaffinised and exposed to heat-induced antigen retrieval for 5 min in an autoclave at 121 °C in pH 7.8 Tris–ethylenediaminetetraacetic acid–Citrate buffer.

Primary antibody specific for RBM3 (polyclonal rabbit, HPA003624; Sigma–Aldrich; at 1/150 dilution) was applied at 37 °C for 60 min. Bound antibody was then visualised using the EnVision Kit (Dako, Glostrup, Denmark) according to the manufacturer's directions. RBM3 staining was analysed by one person (KG) experienced in immunohistochemistry. Only tissue samples with distinct loss of basal cells (proven prostate cancers) were used for RBM3 analysis. Lower expression-levels of cytoplasmatic RBM3 expression typically paralleled nuclear RBM3 expression and was not considered for analysis. Nuclear RBM3 staining was evaluated according to the following scoring system: The staining intensity (0, 1+, 2+, and 3+) and the fraction of positive tumour cells were recorded for each tissue spot. A final score was built from these two parameters: Negative scores had absence of RBM3 staining, weak scores had staining intensity of 1+ in ≤70% of tumour cells or staining intensity of 2+ in ≤30% of tumour cells; moderate scores had staining intensity of 1+ in ≥70% of tumour cells, staining intensity of 2+ in >30% but in ≤70% of tumour cells or staining intensity of 3+ in ≤30% of tumour cells; strong scores had staining intensity of 2+ in 70% of tumour cells or staining intensity of 3+ in >30% of tumour cells.

2.3. Statistics

Statistical calculations were performed with JMP 9 software (SAS Institute Inc., NC, United States of America (USA)). Contingency tables and the chi²-test were performed to search for associations between molecular parameters and tumour phenotype. Survival

curves were calculated according to Kaplan–Meier. The Log-Rank test was applied to detect significant survival differences between groups. COX proportional hazards regression analysis was performed to test the statistical independence and significance between pathological, molecular and clinical variables.

3. Results

3.1. Technical aspects

A total of 2827 of 11,152 arrayed tissue samples (25.3%) were non-informative due to the complete lack of tissue or absence of unequivocal cancer cells.

3.2. RBM3 immunohistochemistry

Nuclear RBM3 immunostaining was absent or weak in benign prostate glands and occasionally accompanied by even lower staining levels in the cytoplasm of the cells. A total of 5327 (64%) of our 8325 interpretable prostate cancers showed positive RBM3 immunostaining, which was considered weak in 23.9%, moderate in 14.5% and strong in 25.6% of cases. Representative images are given in Fig. 1. High RBM3 expression was significantly linked to advanced tumour stage, high Gleason grade, positive nodal involvement and positive surgical margin status ($p < 0.0001$ each).

3.3. RBM3 versus ERG status

To evaluate whether RBM3 immunostaining is linked to the ERG status, we used our pre-existing database including data on *TMPrSS2-ERG*-fusion status obtained by FISH in 5217 patients and by immunohistochemistry (IHC) in 8112 tumours for which RBM3 immunostaining was also available. Strong RBM3 expression was significantly more frequent in cancers with FISH detected *ERG*-fusion (954/2398; 39.8%) than in *ERG*-fusion negative tumours (346/2819; 12.3%; $p < 0.0001$; Fig. 2). Accordingly, RBM3 expression was more frequent in ERG IHC positive (1523/3573; 42.6%) than in ERG IHC negative prostate cancers

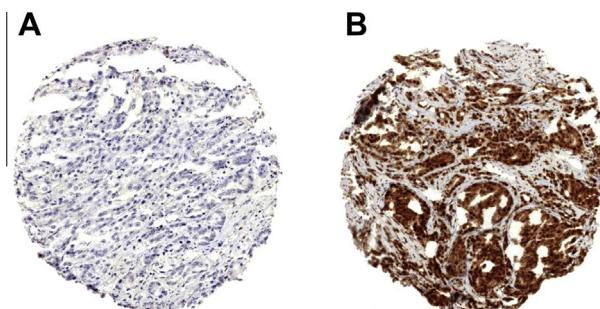


Fig. 1. Representative pictures of (A) negative and (B) strong RNA-binding motif protein 3 (RBM3) staining in prostate cancer.

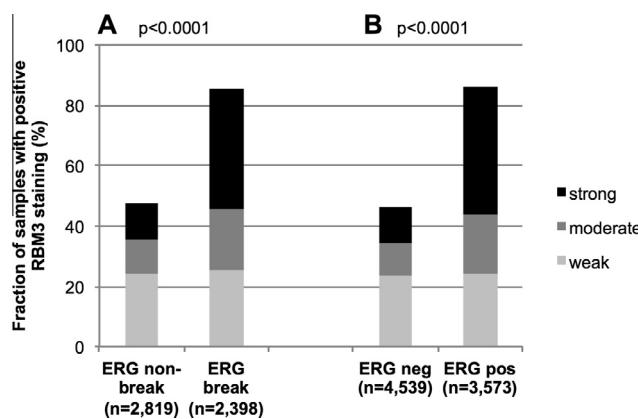


Fig. 2. Relationship of RNA-binding motif protein 3 (RBM3) expression with *ERG*-fusion status obtained (A) by fluorescence *in situ* hybridization analysis and (B) immunohistochemistry ($p < 0.0001$ each).

(552/4539; 12.2%; $p < 0.0001$; Fig. 2). Given these strong differences of RBM3 expression between *ERG* positive and negative cancers, associations with tumour phenotype and clinical cancer features were analysed separately for *ERG* positive and negative subgroups (Tables 2 or 3). In both *ERG* negative and positive prostate cancers, RBM3 expression was strongly linked to unfavourable phenotype.

3.4. Association with key genomic deletions in *ERG* positive and *ERG* negative prostate cancers

Earlier studies had provided evidence for distinct molecular subgroups of prostate cancers defined by *TMPRSS2-ERG* fusions and several genomic deletions. Others and we had described a strong link of *PTEN* and 3p13 deletions to *ERG* positivity and of 5q21 and 6q15

deletions to *ERG* negativity [16–21]. To study, whether RBM3 expression might be particularly linked to one of these genomic deletions, RBM3 data were compared with preexisting findings on *PTEN*, 3p13, 6q15 and 5q21 deletions. In the analysis of all tumours, RBM3 staining was significantly associated with deletions of *PTEN*, 6q15 and 5q21 ($p < 0.0001$ each; Fig. 3). Of note, this association was inverse for deletions of 6q15 and 5q21, where more RBM3 expression was found in non-deleted than in deleted cancers, but positive for *PTEN*, where more RBM3 expression was found in deleted than in non-deleted cancers. The positive associations can be explained by the strong association of both RBM3 expression and *PTEN* deletion with *ERG* positive cancers. In contrast, deletions of 5q21 and 6q15 are strongly linked to *ERG* negative cancers [16,17], resulting in an accumulation of RBM3 expressing tumours in the subset of cancers that lack deletions of 5q21 and 6q15, but which are enriched for *ERG* fusion. A subsequent subgroup analysis of *ERG* positive and negative cancers revealed, that the significant association of RBM3 expression with *PTEN* deletions retained significance in both subsets ($p < 0.0001$ each) while all other significant associations disappeared (Figs. 4 or 5). Further subset analysis including the RBM3 IHC, *ERG* fusion and *PTEN* deletion status revealed that high RBM3 expressing tumours with absence of *ERG* fusion and *PTEN* deletions were enriched of 5q21 and 6q15 deletions ($p < 0.0001$ each).

3.5. Clinical impact of RBM3 staining

Follow-up data were available for 7198 patients with informative RBM3 data. Strong RBM3 expression was linked to early PSA recurrence in all prostate cancers,

Table 2

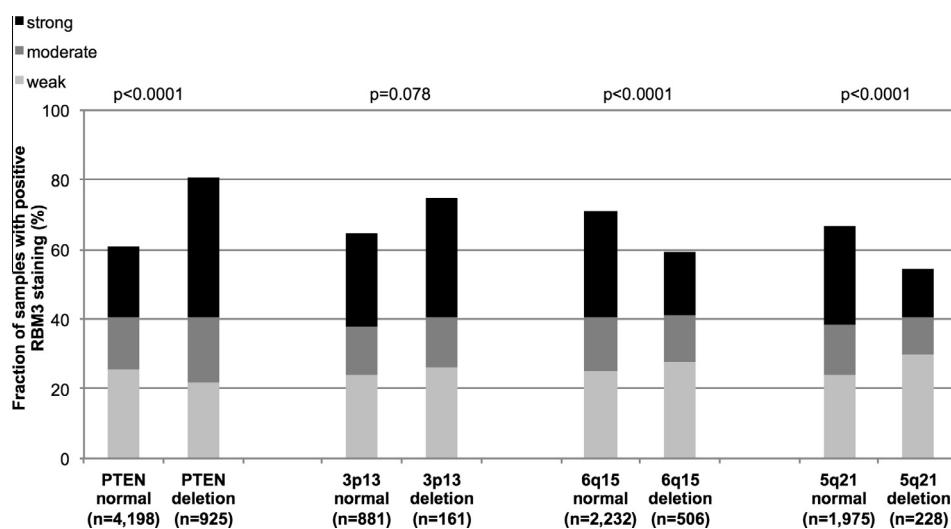
Associations between RNA-binding motif protein 3 (RBM3) expression results and *ERG* negative prostate cancer phenotype.

Parameter	n Available	RBM3 IHC result				<i>p</i> Value
		Negative (%)	Weak (%)	Moderate (%)	Strong (%)	
All cancers	4,539	53.76	23.29	10.80	12.16	
Tumour stage						
pT2	3,055	57.77	23.54	10.02	8.67	<0.0001
pT3a	908	49.89	22.03	12.56	15.53	
pT3b	535	38.32	24.11	12.34	25.23	
pT4	24	33.33	16.67	12.5	37.5	
Gleason grade						
≤3 + 3	1,024	62.89	22.27	8.11	6.74	<0.0001
3 + 4	2,548	54.36	23.78	11.07	10.79	
4 + 3	709	43.3	24.54	12.69	19.46	
≥4 + 4	237	39.66	18.57	13.92	27.85	
Lymph node metastasis						
N0	2,619	51.51	23.33	11.8	13.36	<0.0001
N+	233	35.19	21.03	15.45	28.33	
Surgical margin						
Negative	3,642	54.23	23.42	10.96	11.39	0.0116
Positive	815	51.04	22.7	10.55	15.71	

Table 3

Associations between RNA-binding motif protein 3 (RBM3) expression results and ERG positive prostate cancer phenotype.

Parameter	n Available	RBM3 IHC result				<i>p</i> Value
		Negative (%)	Weak (%)	Moderate (%)	Strong (%)	
All cancers	3,573	13.63	24.38	19.37	42.63	
Tumour stage						
pT2	2,167	14.54	27.13	20.67	37.66	<0.0001
pT3a	928	12.07	21.98	16.06	49.89	
pT3b	437	12.81	16.48	18.99	51.72	
pT4	22	13.64	4.55	27.27	54.55	
Gleason grade						
≤3 + 3	812	14.41	26.72	20.69	38.18	<0.0001
3 + 4	2,127	13.73	25.2	19.7	41.37	
4 + 3	496	11.9	18.15	16.73	53.23	
≥4 + 4	115	14.78	19.13	13.04	53.04	
Lymph node metastasis						
N0	1,996	12.42	23.2	19.24	45.14	0.0453
N+	199	12.06	15.58	18.59	53.77	
Surgical margin						
Negative	2,819	13.91	25.51	19.08	41.5	0.0073
Positive	687	12.95	20.09	19.36	47.6	

Fig. 3. RNA-binding motif protein 3 (RBM3) expression versus *PTEN*, 3p13, 6q15 and 5q21 deletions probed by fluorescence *in situ* hybridization analysis in all prostate cancers.

as well as in the subset of 3901 ERG negative and 3102 ERG positive tumours ($p < 0.0001$ each; Fig. 6A–C). Given the strong link of RBM3 expression with *PTEN* deletions, further analyses included the *PTEN* deletion. Analysing cancers irrespective of their ERG status, RBM3 expression was associated with early PSA recurrence in the subgroup of 3512 *PTEN* non-deleted cancers ($p < 0.0001$; Fig. 6D), while no significance was shown in the subset of 811 *PTEN*-deleted cancers ($p = 0.5318$; Fig. 6E). This insignificance may be due to the relatively low number of cases ($n = 811$) as compared to the subset analysis in *PTEN* non-deleted prostate cancers. Further analysis with respect of ERG

status revealed, that prognostic impact of RBM3 still remains statistically significance in the subset of 2050 *PTEN* non-deleted ERG negative cancers ($p < 0.0001$; Fig. 6F) as well as in 1442 *PTEN* non-deleted ERG positive cancers ($p = 0.0028$; Fig. 6G).

3.6. Multivariate analysis

Multivariate analysis including RBM3 expression, tumour stage, Gleason grade and preoperative PSA values revealed independent prognostic relevance for tumour stage, lymph node involvement, Gleason grade, preoperative PSA-level, lymph node involvement, and

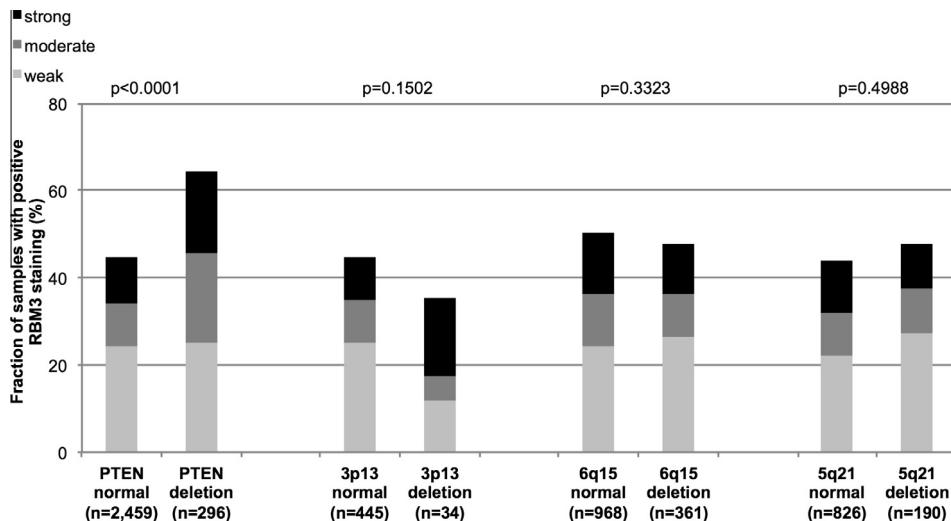


Fig. 4. RNA-binding motif protein 3 (RBM3) expression versus *PTEN*, 3p13, 6q15 and 5q21 deletions probed by fluorescence *in situ* hybridization analysis in ERG negative cancers.

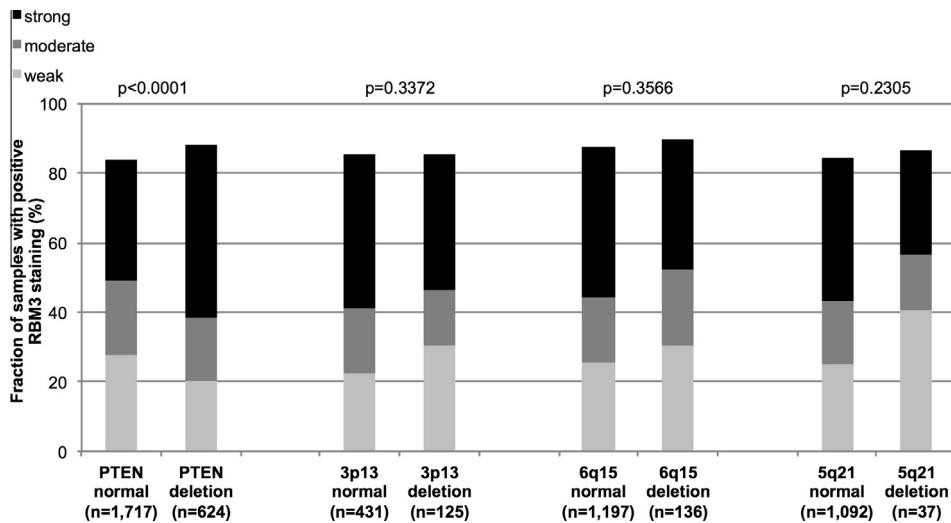


Fig. 5. RNA-binding motif protein 3 (RBM3) expression versus *PTEN*, 3p13, 6q15 and 5q21 deletions probed by fluorescence *in situ* hybridization analysis in ERG positive prostate cancers.

surgical margin status ($p < 0.0001$ each) as well as for RBM3 expression ($p = 0.0084$).

4. Discussion

The results of our study identify high RBM3 expression as an independent prognostic marker for early biochemical recurrence in radically operated prostate cancer.

At the selected experimental conditions, detectable presence of nuclear RBM3 staining occurred in 64% of 8325 interpretable prostate cancers. This is in line with one earlier IHC study analysing RBM3 expression in 88 prostate cancers reporting RBM3 positivity in

62.5% and lower staining intensities in benign prostate glands [12].

The strong association of high level RBM3 staining with early PSA recurrence represents the most significant finding of this study. That the prognostic nature of high RBM3 expression levels was independent of powerful prognostic factors such as Gleason grade, tumour stage, nodal status, PSA, and surgical margin status is remarkable, especially since RBM3 expression was only analysed in a minute tissue specimen measuring 0.6 mm per tumour. From these data, it appears very well possible, that RBM3 expression may serve as an even more powerful prognostic biomarker in a preoperative setting if the analysis is done on diagnostic core needle biopsies. In such a scenario, the amount of

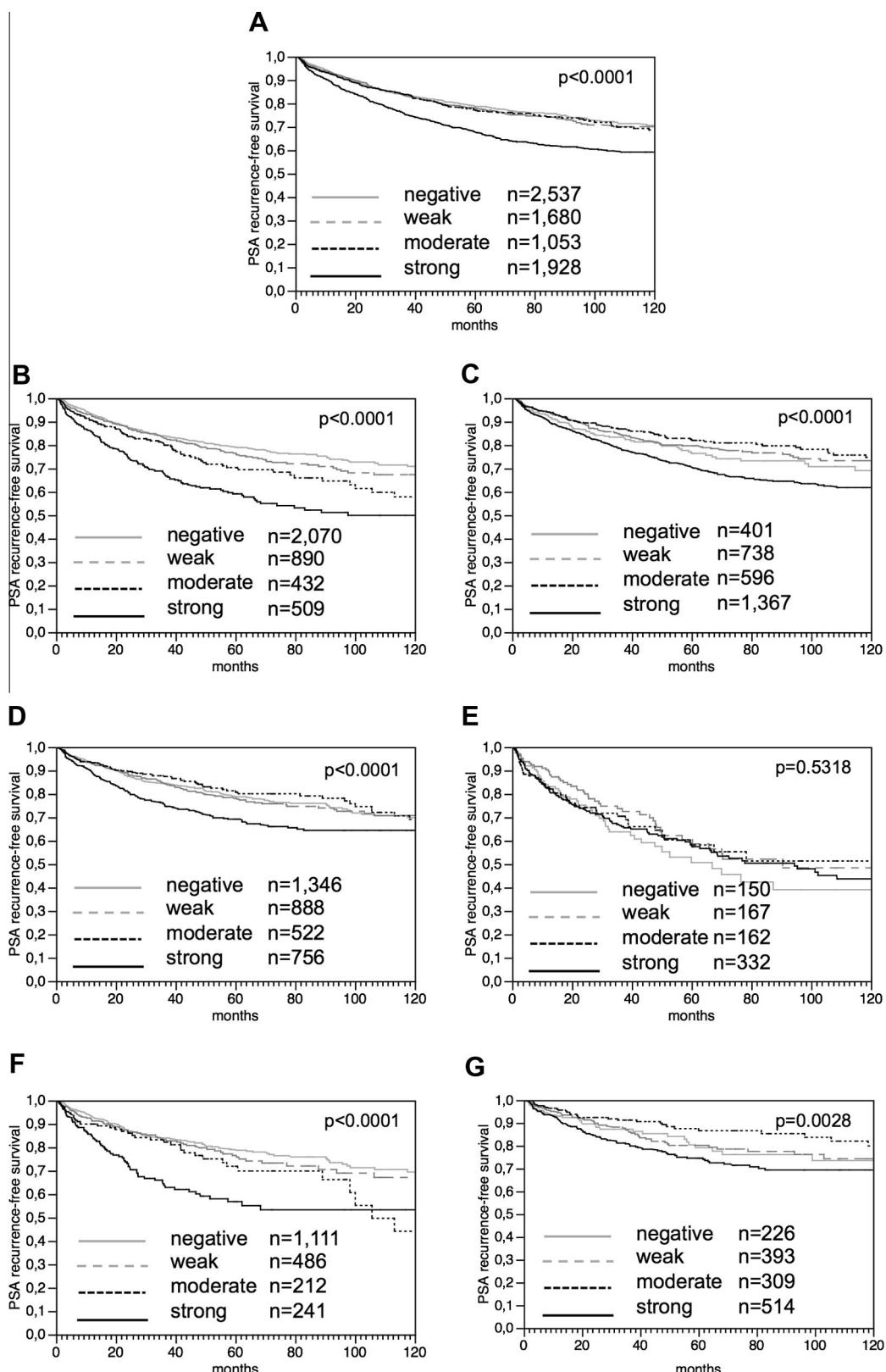


Fig. 6. Association of RNA-binding motif protein 3 (RBM3) immunostaining intensity with biochemical recurrence (prostate-specific antigen (PSA)) in (A) all cancers ($n = 7198$; $p < 0.0001$), (B) ERG negative cancers ($n = 3901$; $p < 0.0001$), (C) ERG positive cancers ($n = 3102$; $p < 0.0001$), (D) PTEN non-deleted cancers ($n = 3512$; $p < 0.0001$), (E) PTEN deleted cancers ($n = 811$; $p = 0.5318$), (F) PTEN non-deleted ERG negative cancers ($n = 2050$; $p < 0.0001$), and (G) PTEN non-deleted ERG positive cancers ($n = 1442$; $p = 0.0028$).

analysable cancer tissue would be comparable to a TMA analysis and other prognostic features such as pT, pN, and surgical margin status were unavailable. Even the Gleason grading is less reliable if only biopsies are analysed, as the Gleason grading as determined on core needle biopsies rarely reflects the final Gleason grading obtained on the resection specimen.

Our finding of high RBM3 expression being linked to poor prognosis is in contrast to the data from Jonsson et al. [12] suggesting high nuclear RBM3 immunostaining as a sign of favourable outcome in a study including 88 prostate cancer patients. These divergent results are most likely caused by differences in experimental procedures, patient selection or issues of cohort size. For example, Jonsson et al. [12] used a mouse monoclonal antibody from Atlas Antibodies while in our study a rabbit polyclonal antibody from Sigma-Aldrich was used. Moreover, Jonsson et al. [12] categorised the RBM3 nuclear fraction (NF) into four groups, namely 0 (0–1%), 1 (2–25%), 2 (26–75%) and 3 (>75%) and nuclear staining intensity (NI) denoted as 0–2, whereby 0 = negative, 1 = intermediate and 2 = moderate-strong intensity. A combined nuclear score (NS) of NF × NI, which had a range of 0–6, was then constructed [12]. In our study the nuclear RBM3 staining was evaluated according to the following scoring system: The staining intensity (0, 1+, 2+, and 3+) and the fraction of positive tumour cells were recorded for each tissue spot. A final score was built from these two parameters: Negative scores had absence of RBM3 staining, weak scores had staining intensity of 1+ in ≤70% of tumour cells or staining intensity of 2+ in 30% of tumour cells; moderate scores had staining intensity of 1+ in ≥70% of tumour cells, staining intensity of 2+ in >30% but in ≤70% of tumour cells or staining intensity of 3+ in 30% of tumour cells; strong scores had staining intensity of 2+ in >70% of tumour cells or staining intensity of 3+ in >30% of tumour cells.

Data from various studies have demonstrated that our TMA containing 11,152 prostate cancer specimens represents a suitable system for assessing potential prognostic markers and enabled us to successfully validate established prognostic biomarkers in prostate cancer such as nuclear p53 accumulation [22], Ki67 labelling index [23], deletions at 6q [17] or CRISP3 expression [24].

Data from studies comparing RBM3 expression with clinical outcome in other tumour types have consistently suggested associations of high RBM3 levels with favourable clinical outcome. Such associations were found in melanoma [11] as well as colorectal [8], and breast cancer [10]. Several of these studies had analysed sizable patient sets including hundreds of patients [8–10] or even involved patient cohorts from clinical trials [11]. Possible explanations for differing prognostic roles of RNA binding proteins such as RBM3 in different tumour types include variable interactions with critical

pathways depending on the spectrum of tissue type specific gene activation. As prostate cancer cells are androgen dependent, it is evident, that pathways are activated in these cells, which will be less important in cancers of the ovary, colon or breast. It is noteworthy, that all available experimental data have suggested a tumour promoting rather than a tumour suppressing role of RBM3 in cell lines. *In vitro* analysis described RBM3 overexpression to be linked to decreased cell death in both neuronal precursor and non-neuronal cell lines [5], and embryonal kidney (HEK293) cells [7]. RBM3 expression also increased cell proliferation in NIH3T3 mouse fibro-blasts and SW480 human colon epithelial cells by mediating expression-levels of COX-2, vascular endothelial growth factor (VEGF) and cyclin D1 [6] while siRNA-mediated RBM3 knockdown was associated with increased cell death in HCT116 colon cancer cells [6] and human embryonal kidney (HEK293) cells [7]. From these data, it appears still possible, that the prognostic role of high RBM3 levels will not be limited to prostate cancer.

Utilising the extensive molecular database attached to our prostate cancer cohort, we were also able to assess the relationship of RBM3 expression with important other molecular features of prostate cancer. About half of prostate cancers carry gene fusions linking the androgen-regulated gene TMPRSS2 with transcription factors of the ETS family [25] resulting in androgen regulation and overexpression of ERG. Our data demonstrate that high RBM3 expression occurs about 3.5 times more frequent in *ERG* positive than in *ERG* negative cancers. Finding this association by two independent approaches for ERG fusion detection (IHC/FISH) largely excludes a false positive association due to inefficient immunostaining for both RBM3 and ERG in a subset of damaged non-reactive tissues. Activation of ERG expression in prostate epithelial cells results in aberrant activation of different signalling cascades involved in the regulation of cell adhesion, matrix remodelling and signal transduction [26–29]. Our study identifies RBM3 as another protein, which is strongly linked to ERG positive cancers. However, as RBM3 retained its prognostic significance in *ERG* positive and *ERG* negative prostate cancers, the prostate specific link to poor prognosis of high RBM3 expression is unrelated to interactions with ERG or ERG dependent factors.

A further subgroup analysis targeted key genomic deletions known to be tightly linked to the ERG status. Others and we had demonstrated that deletions at 3p13 and *PTEN* were linked to ERG positivity and deletions at 5q21 and 6q15 to ERG negativity [16–21]. Given the strong link of both RBM3 immunostaining and all four deletions with ERG status, it was not surprising, that high RBM3 immunostaining was tightly linked to *PTEN*, 6q and 5q deletions if all cancers were analysed.

The retained association of high RBM3 expression with *PTEN* deletions in the subsets of ERG positive and ERG negative prostate cancers argues for a relevant direct or indirect interaction between these molecular features. Specifically, these data suggest, that either activation of one pathway that also induces strong RBM3 expression may facilitate *PTEN* inactivation or else, that *PTEN* inactivation may facilitate development of certain molecular features eventually leading to strong RBM3 expression. A clinically relevant interrelationship with *PTEN* is also supported by marked differences in the prognostic role of RBM3 in *PTEN*-deleted and *PTEN* non-deleted cancers. This was particularly true for the subset of cancers lacking *ERG* fusion and *PTEN* deletion, but had strong RBM3 overexpression. Further analyses revealed that this subset of cancers was enriched for deletions of 5q21 and 6q15. Others and we have shown before that these deletions are linked to poor prognosis [16,17], thus providing an explanation for the adverse features of strongly RBM3 overexpressing tumours in *ERG* negative prostate cancers lacking *PTEN* deletions.

In summary, the strong association of RBM3 overexpression with early PSA recurrence, which was found to be independent of grade, stage, resection margin and nodal status in a series of more than 11,000 cancers, suggests that RBM3 analysis may prove to be instrumental as a prognostic biomarker either alone or in combination with other factors. Moreover, our data link high nuclear RBM3 protein expression to molecularly defined prostate cancer subgroups characterised by ERG positivity and *PTEN* deletions.

Conflict of interest statement

None declared.

Acknowledgements

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

References

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. CA Cancer J Clin 2011;61:69–90.
- [2] Danno S, Nishiyama H, Higashitsuji H, et al. Increased transcript level of RBM3, a member of the glycine-rich RNA-binding protein family, in human cells in response to cold stress. Biochem Biophys Res Commun 1997;236:804–7.
- [3] Wellmann S, Buhrer C, Moderegger E, et al. Oxygen-regulated expression of the RNA-binding proteins RBM3 and CIRP by a HIF-1-independent mechanism. J Cell Sci 2004;117:1785–94.
- [4] Leonart ME. A new generation of proto-oncogenes: cold-inducible RNA binding proteins. Biochim Biophys Acta 2010;1805:43–52.
- [5] Kita H, Carmichael J, Swartz J, et al. Modulation of polyglutamine-induced cell death by genes identified by expression profiling. Hum Mol Genet 2002;11:2279–87.
- [6] Sureban SM, Ramalingam S, Natarajan G, et al. Translation regulatory factor RBM3 is a proto-oncogene that prevents mitotic catastrophe. Oncogene 2008;27:4544–56.
- [7] Wellmann S, Truss M, Bruder E, et al. The RNA-binding protein RBM3 is required for cell proliferation and protects against serum deprivation-induced cell death. Pediatr Res 2010;67:35–41.
- [8] Hjelm B, Brennan DJ, Zendehrokh N, et al. High nuclear RBM3 expression is associated with an improved prognosis in colorectal cancer. Proteomics Clin Appl 2011;5:624–35.
- [9] Ehlen A, Brennan DJ, Nodin B, et al. Expression of the RNA-binding protein RBM3 is associated with a favourable prognosis and cisplatin sensitivity in epithelial ovarian cancer. J Transl Med 2010;8:78.
- [10] Jogi A, Brennan DJ, Ryden L, et al. Nuclear expression of the RNA-binding protein RBM3 is associated with an improved clinical outcome in breast cancer. Mod Pathol 2009;22:1564–74.
- [11] Jonsson L, Bergman J, Nodin B, et al. Low RBM3 protein expression correlates with tumour progression and poor prognosis in malignant melanoma: an analysis of 215 cases from the Malmo Diet and Cancer Study. J Transl Med 2011;9:114.
- [12] Jonsson L, Gaber A, Ulmert D, Uhlen M, Bjartell A, Jirstrom K. High RBM3 expression in prostate cancer independently predicts a reduced risk of biochemical recurrence and disease progression. Diagn Pathol 2011;6:91.
- [13] Erbersdobler A, Fritz H, Schnoger S, et al. Tumour grade, proliferation, apoptosis, microvessel density, p53, and bcl-2 in prostate cancers: differences between tumours located in the transition zone and in the peripheral zone. Eur Urol 2002;41:40–6.
- [14] Mirlacher M, Simon R. Recipient block TMA technique. Methods Mol Biol 2010;664:37–44.
- [15] Minner S, Enodien M, Sirma H, et al. ERG status is unrelated to PSA recurrence in radically operated prostate cancer in the absence of antiandrogen therapy. Clin Cancer Res 2011;17:5878–88.
- [16] Burkhardt L, Fuchs S, Krohn A, et al. CHD1 is a 5q21 tumor suppressor required for ERG rearrangement in prostate cancer. Cancer Res 2013;73:2795–805.
- [17] Kluth M, Hesse J, Heinl A, et al. Genomic deletion of MAP3K7 at 6q12–22 is associated with early PSA recurrence in prostate cancer and absence of TMPRSS2:ERG fusions. Mod Pathol 2013;26:975–83.
- [18] Krohn A, Diedler T, Burkhardt L, et al. Genomic deletion of PTEN is associated with tumor progression and early PSA recurrence in ERG fusion-positive and fusion-negative prostate cancer. Am J Pathol 2012;181:401–12.
- [19] Lapointe J, Li C, Giacomini CP, et al. Genomic profiling reveals alternative genetic pathways of prostate tumorigenesis. Cancer Res 2007;67:8504–10.
- [20] Taylor BS, Schultz N, Hieronymus H, et al. Integrative genomic profiling of human prostate cancer. Cancer Cell 2010;18:11–22.
- [21] Berger MF, Lawrence MS, Demichelis F, et al. The genomic complexity of primary human prostate cancer. Nature 2011;470:214–20.
- [22] Schlomm T, Iwers L, Kirstein P, et al. Clinical significance of p53 alterations in surgically treated prostate cancers. Mod Pathol 2008;21:1371–8.
- [23] Bubendorf L, Sauter G, Moch H, et al. Ki67 labelling index: an independent predictor of progression in prostate cancer treated by radical prostatectomy. J Pathol 1996;178:437–41.
- [24] Grupp K, Kohl S, Sirma H, et al. Cysteine-rich secretory protein 3 overexpression is linked to a subset of *PTEN*-deleted ERG fusion-positive prostate cancers with early biochemical recurrence. Mod Pathol 2013;26:733–42.

- [25] 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.
- [26] 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.
- [27] 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.
- [28] Tomlins SA, Laxman B, Varambally S, et al. Role of the TMPRSS2-ERG gene fusion in prostate cancer. *Neoplasia* 2008;10:177–88.
- [29] 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.

II. Darstellung der Publikation

1.0 Einleitung

Das Prostatakarzinom ist mit 63710 Neuerkrankungen im Jahr 2012 die häufigste Tumorerkrankung des Mannes in Deutschland [1]. 2012 starben zudem deutschlandweit 12957 Patienten an den Folgen eines Prostatakarzinoms. Damit ist das Prostatakarzinom die dritthäufigste Tumor-assoziierte Todesursache bei Männern [1]. Die Mehrzahl der Prostatakarzinome haben allerdings einen indolenten klinischen Verlauf, so dass die Patienten eher mit als an ihrer Karzinomerkrankung versterben. Lediglich eine kleine Minderheit der Karzinome ist charakterisiert durch ein aggressives und schnelles Wachstum, das unbehandelt zur Metastasierung und damit einer lebensbedrohlichen Situation für den Patienten führen kann. Die etablierten prognostischen Parameter, wie der Gleason-Grad und die Tumorausdehnung in den Stanzbiopsien, die Konzentration des prostataspezifischen Antigens (PSA) im Serum sowie das klinische Stadium sind jedoch leider häufig unzureichend für die Einschätzung des Progressionsrisikos der Tumoren. Da die Behandlungsoptionen bei Vorliegen eines Prostatakarzinoms von der „Active Surveillance“ Strategie bis hin zur operativen Entfernung der Prostata reichen [2], stehen Patient und Arzt heute häufig vor der schwierigen Frage nach der optimalen individuellen Therapie für den Patienten. Insbesondere bei der großen Gruppe von Tumoren mit einem mittleren Progressionsrisiko (cT2, Gleason-Score 3+4 und 4+3, und PSA-Wert ≤ 10 ng/ml) ist es schwierig eine Empfehlung abzugeben [2]. Es ist daher zwingend notwendig prognostisch relevante Veränderungen zu identifizieren, welche die etablierten Prognoseparameter bei der Einschätzung der Aggressivität der Tumoren bereits bei der initialen Diagnose eines Prostatakarzinoms unterstützen. Ein primäres Ziel der Prostatakarzinomforschung am Institut für Pathologie am Universitätsklinikum Eppendorf ist daher die Untersuchung von molekularen Veränderungen und deren Assoziation zum Phänotyp und der Prognose des Prostatakarzinoms an einem großen Kollektiv von über 12.000 Tumoren. Es besteht die begründete Hoffnung, dass dadurch neue molekulare Prognosemarker identifiziert werden können, welche eine individuelle Diagnostik unterstützen.

Das RNA-binding motif protein 3 (RBM3) ist ein glycinreiches Protein, dessen Transkription durch niedrige Temperaturen [3] und Hypoxie [4] induziert wird. RBM3 besitzt ein RNA-Erkennungsmotiv auf Grund dessen RBM3 eine zentrale Rolle in der Regulation der Proteine zugeschrieben wird [5]. In vitro Studien zeigten zudem, dass eine erhöhte RBM3-Expression mit einem verminderter Zelltod [6,7] und einer gesteigerten Zellproliferation [7] in Zusammenhang steht. Dementsprechend führte die Herabregulierung von RBM3 zu einem vermehrten Zelltod [8] und einer reduzierten Zellproliferation [7] in Zellkulturversuchen. In immunhistochemischen (IHC) Studien konnte eine erhöhte RBM3-Expression in unterschiedlichen malignen Tumoren nachgewiesen werden [9-13]. Interessanterweise war die starke nukleäre RBM3-Expression in diesen Studien mit einem verlängerten Gesamtüberleben bei Melanomen [12], kolorektalen Karzinomen [9] und Mammakarzinomen [11] assoziiert. Auch beim Prostatakarzinom wurde in einer Studie eine erhöhte RBM3-Expression in malignen Prostataepithelzellen im Vergleich zu den benignen Prostataepithelzellen nachgewiesen [13]. In dieser Studie wurde die starke RBM3-Expression in 88 untersuchten Prostatakarzinomen außerdem mit einer verzögerten Krankheitsprogression in Zusammenhang gesetzt [13]. Allerdings war die Fallzahl in dieser Studie sehr gering, so dass die prognostische Bedeutung der RBM3-Expression beim Prostatakarzinom immer noch als weitestgehend unklar angesehen werden kann.

Ziel der vorliegenden Studie war daher die klinische Relevanz der RBM3-Expression sowie deren Zusammenhang mit häufigen genetischen Veränderungen beim Prostatakarzinom zu klären. Dazu

wurde in unserer Studie zunächst die RBM3-Expression mittels Immunhistochemie an einem Gewebemikroarray (TMA) bestehend aus 11152 unterschiedlichen Prostatatumorproben analysiert und mit der Prognose der Patienten und den klinisch-pathologischen Parametern des Prostatakarzinoms assoziiert. Um mögliche Zusammenhänge mit den häufigen genetischen Veränderungen zu finden, wurde außerdem die zum TMA gehörige molekulare Datenbank in die Untersuchung integriert. Die Ergebnisse unserer Studie zeigen eindeutig, dass eine starke nukleäre RBM3-Expression ein von den etablierten Prognoseparametern unabhängiger Prädiktor für eine ungünstige Prognose beim Prostatakarzinom ist. Außerdem zeigte sich ein starker Zusammenhang zwischen der RBM3-Expression und ERG-positiven (TMPRSS2:ERG-Fusion) sowie PTEN-deletierten Prostatakarzinomen.

2.0 Material und Methoden

2.1 Patienten

In der Studie wurden Prostatapräparate von 11152 Patienten verwendet, die sich zwischen 1992 und 2011 einer radikalen Prostatektomie in der urologischen Klinik der Universitätsklinik Hamburg Eppendorf oder der Martini Klinik Hamburg unterzogen.

Alle Prostatapräparate wurden in einem standardisierten Verfahren aufgearbeitet [14]. Für die molekularen Untersuchungen wurde aus den Gewebeproben ein TMA angefertigt, wie früher beschrieben [15]. Im Wesentlichen wurde von jedem Ektomiepräparat ein repräsentativer Bereich ausgewählt und eine 0,6 mm messende Gewebestanze entnommen und auf einen TMA-Block übertragen. Insgesamt wurden die Proben auf 24 TMA-Blöcke verteilt. Einzelheiten zum Patientenkollektiv bzw. zur histopathologischen Beurteilung der Tumoren sind der Originalpublikation zu entnehmen (siehe Table 1 Publikation). Von 9695 Patienten waren außerdem klinische Verlaufsdaten mit einem Median von 36,8 Monaten vorhanden. Ein Rezidiv wurde angenommen ab einem postoperativen Anstieg des PSA-Wertes auf $\geq 0,2$ ng/ml.

2.2 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ist eine biochemische Methode mit der Proteine mittels eines Antigen-Antikörper-Nachweises direkt im Gewebe durch eine Färbung sichtbar gemacht werden können. Für den Nachweis der RBM3 Expression wurde der Antikörper HPA003624 von der Firma Sigma-Aldrich verwendet. Eine detaillierte Beschreibung des Versuchsablaufes ist in der Originalpublikation vorhanden. Zur Bestimmung der RBM3-Expression wurde die Färbeintensität (0,1+,2+,3+) in den Tumorzellen und die Fraktion der positiven Tumorzellen für jeden Gewebespot bestimmt. Aus diesen 2 Parametern wurde dann ein Score wie folgt gebildet:

1. Negativ: keine RBM3-Immunfärbung,
2. Schwache Färbung: eine Färbeintensität von 1+ in $\leq 70\%$ oder 2+ in $\leq 30\%$ der Tumorzellen,
3. Moderate Färbung: eine Färbeintensität von 1+ in $\geq 70\%$ oder 2+ in $\geq 30\%$ aber $\leq 70\%$ oder 3+ in $\leq 30\%$ der Tumorzellen
4. Starke Färbung: eine Färbeintensität von 2+ in $\geq 70\%$ oder 3+ in $\geq 30\%$ der Tumorzellen.

3.0 Ergebnisse

In insgesamt 8325 (74,9 %) der 11152 Prostatakarzinome konnte die nukleäre RBM3-Anfärbung mittels IHC beurteilt werden. 2827 (25,1 %) der Gewebeproben wurden nicht mit in die Studie einbezogen, da sie entweder keine Tumorzellen enthielten oder das Gewebe komplett fehlte.

Im malignen Prostatagewebe zeigte die nukleäre RBM3-Expression ein stärkeres Expressionsniveau als im benignen Prostatagewebe.

Insgesamt zeigten 5327 der 8325 (64 %) analysierbaren Prostatakarzinome eine nukleäre RBM3-Färbung . Von diesen Fällen zeigten 23,9 % eine schwache, 14,5 % eine moderate und 25,6 % eine starke RBM3-Positivität.

Eine ausführliche Darstellung der Ergebnisse lässt sich der beigefügten Originalpublikation entnehmen. Nachfolgend sind die wichtigsten Resultate zusammengefasst.

1. Eine starke nukleäre RBM3-Färbung ist mit einem ungünstigen Tumorphänotyp assoziiert.
2. Eine starke nukleäre RBM3-Expression ist mit der TMPRSS2:ERG-Fusion assoziiert.
3. Eine starke nukleäre RBM3-Expression ist positiv mit PTEN Deletion und invers mit Deletion von 6q15 und 5q21 assoziiert.
4. Eine starke nukleäre RBM3-Expression ist unabhängig von den etablierten Prognoseparametern (Gleason-Score, präoperativem PSA-Wert und Tumorstadium) mit einem frühen PSA-Rezidiv assoziiert.

4.0 Diskussion

Die Ergebnisse unserer Studie identifizieren eine starke RBM3-Expression als unabhängigen Prognosemarker für die Voraussage eines frühen biochemischen Rezidivs beim Prostatakarzinom.

Eine nukleäre RBM3 Färbung konnte unter den ausgewählten experimentellen Bedingungen in 64 % der 8325 auswertbaren Prostatakarzinompräparate nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit einer früheren IHC Studie an 88 Prostatakarzinomen, in der 62,5% Tumoren RBM3 positiv waren und zudem benigne Prostatadrüsen weniger intensiv angefärbt waren [13].

Der eindeutige Zusammenhang zwischen einer starken immunhistochemischen nukleären RBM3-Färbung und der Wahrscheinlichkeit eines frühen PSA-Rezidivs repräsentiert das bedeutendste Untersuchungsergebnis unserer Studie. Die prognostische Aussagekraft der RBM3-Expression war außerdem unabhängig von den etablierten prognostischen Parametern, wie dem Gleason-Grad, Tumorstadium, dem präoperativen PSA-Wert und dem Status der Lymphknoten und dem Resektionsrand. Dies ist insbesondere deswegen bemerkenswert, da die RBM3-Expression jeweils in einer einzelnen exakt 0,6mm messenden Gewebemikroarrayprobe immunhistochemisch analysiert wurde. Es ist daher anzunehmen, dass die RBM3-Expression, gemessen an einer präoperativen Stanzbiopsie, eine hohe prognostische Aussagekraft besitzen könnte. In diesem Fall wäre die verfügbare Menge des zu analysierenden Gewebes vergleichbar mit der Gewebemenge auf dem TMA.

Der von uns festgestellte Zusammenhang zwischen einer starken nukleären RBM3-Expression und einer ungünstigen Prognose steht im Widerspruch zu der Studie von Jonsson et. al. [13], in der eine starke nukleäre RBM3-Immfärbung mit einer günstigeren Prognose in 88 analysierten Prostatatumoren assoziiert wurde. Die divergente Ergebnisse sind vermutlich erklärbar, durch die

unterschiedlichen experimentellen Vorgehensweisen, die Patientenauswahl und die Kohortengröße. In der Studie von Jonsson et al. [13] wurde ein monoklonaler mouse-Antikörper von der Firma Atlas Antibodies verwendet, wohingegen wir in unserer Studie einen polyklonalen rabbit-Antikörper der Firma Sigma-Aldrich einsetzen. Des Weiteren unterscheiden sich die Auswertungsstrategien klar voneinander. Jonsson et al. [13] kategorisierten die nukleäre RBM3-Fraktion (NF) in vier Gruppen: 0 (0-1%), 1 (2-25%), 2 (26-75%) und 3 (>75%) sowie die Färbeintensität (N1) in drei Gruppen von 0-2, (0= negativ, 1= mittlere Intensität, 2= starke Intensität). Aus NF x N1 wurde dann ein kombinierter nukleärer Score errechnet (0-6) [13]. Dieses Vorgehen unterscheidet sich deutlich von unserer Methode der Klassifizierung von IHC Ergebnissen (siehe Material und Methoden).

In zahlreichen vorherigen Studien konnten wir bereits zeigen, dass unser TMA aus 11152 Prostatakarzinomen ein geeignetes Format darstellt, um die potentielle prognostische Relevanz von molekularen Markern zu beurteilen beziehungsweise zu validieren. So konnten bereits einige potenzielle prognostische Biomarker für das Prostatakarzinom mittels Immunhistochemie oder Fluoreszenz-in-situ Hybridisierung identifiziert werden. Dazu zählen unter anderem die nukleäre p53-Akkumulation [16], der Ki67 Labelling-Index [17], 6q-Deletionen [18] oder die CRISP3-Expression [19].

Studien, die eine Korrelation der RBM3-Expression mit dem klinischen Verlauf in anderen Tumorarten untersuchten, zeigten meistens eine Assoziation der starken RBM3-Expression mit einer günstigen Prognose. Zu den Tumorentitäten, bei denen derartige Daten vorliegen, zählen Melanome [12], kolorektale Karzinome [9] und Mammakarzinome [11]. In der Mehrzahl dieser Studien wurden große Patientengruppen, bestehend aus hunderten Patienten [9-11] oder Patienten aus klinischen Studien [12] analysiert.

Eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche prognostische Relevanz von RNA-bindenden Proteinen, wie RBM3 in verschiedenen Tumorarten, sind die verschiedenen Interaktionen der RNA-bindenden Proteine in kritischen Signalwegen, die in Abhängigkeit vom Gewebe eine spezifische Genaktivierung aufweisen.

Da Prostatakarzinomzellen Androgen-abhängig sind, ist es möglich, dass hier Signalwege aktiviert werden, die in anderen Tumorentitäten wie Ovarialkarzinomen, kolorektalen Karzinomen oder Mammakarzinomen nur eine untergeordnete Rolle spielen. Es ist allerdings bemerkenswert, dass Experimente an Zelllinien, RBM3 eher eine tumorfördernde als eine tumorsuppressive Funktion zuweisen. In in-vitro Analysen konnte eine Assoziation der RBM3-Überexpression mit einem reduzierten Zelltod sowohl in neuronalen Vorläuferzellen und in nicht-neuronalen Zelllinien [6] als auch in embryonalen Nierenzellen (HEK293) [8] gezeigt werden. Die RBM3-Expression führt außerdem zu einer gesteigerten Zellproliferation in NIH3T3 Mäuse-Fibroblasten und in humanen SW480 Kolonepithelzellen über die Modulierung der Expressionslevel von COX2, Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und Cyclin D1 [7]. Zusätzlich führt die siRNA-vermittelte Reduktion der RBM3-Expression zu einem vermehrten Zelltod in HCT116 Kolonkarzinomzellen [7] und humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293) [8]. Basierend auf diesen Ergebnissen scheint es durchaus möglich, dass die ungünstige prognostische Bedeutung einer gesteigerten RBM3-Expression nicht nur auf das Prostatakarzinom limitiert ist.

Die große molekulare Datenbank, die zu unserem Prostata-TMA-Kollektiv gehört, ermöglichte uns Zusammenhänge zwischen einer gesteigerten RBM3-Expression und anderen wichtigen molekularen Veränderungen des Prostatakarzinoms zu untersuchen.

Etwa 50% der Prostatakarzinome weisen eine Genfusion zwischen dem Androgen-regulierten Gen TMPRSS2 und dem Transkriptionsfaktor ERG, ein Mitglied der ETS Familie [20], auf. Diese Fusion führt zu einer Androgen-vermittelten Expression des normalerweise in Prostataepithel inaktiven ERG-Gens in den betroffenen Epithelzellen. Unsere Ergebnisse zeigen, dass eine starke RBM3-Expression 3,5mal häufiger in ERG-positiven Karzinomen als in ERG-negativen Karzinomen auftritt. Dieser Zusammenhang wurde mittels IHC und FISH, zwei voneinander unabhängige Verfahren zur

Detektion von ERG-Fusionen, gefunden. Daher kann eine falsch positive Assoziation, aufgrund einer insuffizienten immunohistochimischen ERG und RBM3 Färbung in einer Gruppe geschädigter, nicht reaktiver Gewebeproben, größtenteils ausgeschlossen werden. Die Expression des Transkriptionsfaktors ERG führt in Prostataepithelzellen zu einer veränderten Aktivierung von Proteinen in Signalkaskaden, die zur Regulation der Zelladhäsion, der Matrixremodellierung und der Signaltransduktion beitragen [21-24]. Unsere Studie identifiziert RBM3 als ein weiteres Protein, das einen starken Zusammenhang mit einem positiven ERG-Status aufweist. Allerdings besitzt die starke RBM3-Expression unabhängig vom ERG-Status eine eindeutige prognostische Relevanz für eine ungünstige Prognose, sowohl in den ERG-positiven als auch in den ERG-negativen Karzinomen.

Eine weitere Subgruppenanalyse umfasste Tumoren mit häufigen chromosomal Deletionen, die bekanntermaßen mit dem ERG-Status assoziiert sind. Sowohl andere Arbeitsgruppen als auch wir konnten bereits zeigen, dass Deletionen von 3p13 und PTEN beim Prostatakarzinom mit einem positivem ERG-Status und Deletionen von 5q21 und 6q15 mit einem negativen ERG-Status in Zusammenhang stehen [18,25-28]. Angesichts der ausgeprägten Assoziation der RBM3-Expression und der genannten 4 Deletionsregionen mit dem ERG-Status ist es nicht überraschend, dass die starke RBM3-Färbung bei Untersuchung aller Tumore ebenfalls mit Deletionen von PTEN, 6q15 und 5q21 assoziiert war. Dass die Assoziation zwischen einer starken RBM3-Expression und dem Vorhandensein von PTEN-Deletion ebenfalls in den Untergruppen der ERG-negativen und ERG-positiven Prostatakarzinome vorhanden war, deutet allerdings auf eine direkte oder indirekte Interaktion zwischen diesen molekularen Veränderungen hin.

Es ist möglich, dass die Aktivierung eines Signalwegs, der die RBM3-Expression induziert, auch die PTEN-Inaktivierung fördert. Es könnte auch sein, dass die PTEN-Inaktivierung die Entwicklung bestimmter molekularer Merkmale vorantreibt, die wiederum zu einer starken RBM3-Expression führen. Eine klinisch relevante Beziehung der RBM3-Expression zur PTEN-Deletion wird durch die deutlichen Unterschiede bezüglich der prognostischen Relevanz der RBM3-Expression in den PTEN-deletierten und PTEN-nicht-deletierten Prostatakarzinomen unterstützt. Dies zeigt sich insbesondere in der Untergruppe der Karzinome ohne ERG-Fusion und ohne PTEN-Deletion, die eher eine starke RBM3-Expression aufzeigten. In einer weiteren Analyse zeigte sich, dass diese Untergruppe von Tumoren zusätzlich gehäuft Deletionen von 5q21 und 6q15 besaß. Sowohl andere Arbeitsgruppen als auch wir konnten bereits zeigen, dass diese Deletionen mit einer schlechten Prognose assoziiert sind [18,25].

Zusammengefasst zeigt unsere Studie eine klare Assoziation zwischen einer gesteigerten RBM3-Expression und einem frühen PSA-Rezidiv in einem Kollektiv aus über 11000 Prostatakarzinomen sowie deren Unabhängigkeit von den etablierten Parametern (Gleason Grad, Tumorstadium, Resektionsrand, Lymphknotenstatus). Daraus resultiert, dass die immunhistochemische RBM3-Analyse alleine oder in Kombination mit anderen Faktoren als prognostischer Biomarker von großem Nutzen sein kann. Darüber hinaus haben unsere Ergebnisse gezeigt, dass eine starke nukleäre RBM3-Expression vor allem in der molekularen Untergruppe der ERG-positiven und PTEN-deletierten Prostatatumoren vorkommt.

5.0 Zusammenfassung

Das RNA-binding motif protein 3 (RBM3) wurde bereits als potentieller prognostischer Biomarker in unterschiedlichen Tumorentitäten beschrieben. Um die klinische Relevanz der RBM3-Expression beim Prostatakarzinom zu klären wurde die RBM3-Expression mit Hilfe der Immunhistochemie an unserem 11152 Prostatakarzinomgewebeproben umfassenden Gewebemikroarray (Tissue

Microarray, TMA) untersucht. Eine RBM3-Immunfärbung wurde in 64% der auswertbaren Prostatakarzinomgewebeproben nachgewiesen. Insgesamt zeigten 25,6% der Tumoren eine starke RBM3-Färbung. Die starke RBM3-Färbung war signifikant assoziiert mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium, hohem Gleason Grad, positivem Lymphknotenstatus und Resektionsrand (jeweils $p < 0,0001$). Des Weiteren war die starke RBM3-Expression signifikant gehäuft in ERG-positiven Prostatakarzinomen und Karzinomen mit PTEN-Deletion (jeweils $p < 0,0001$). Darüber hinaus gab es einen starken Zusammenhang zwischen RBM3-Immunfärbung und einem frühen biochemischen Rezidiv sowohl in allen Tumoren als auch in den Untergruppen der ERG-positiven und ERG-negativen Prostatakarzinomen (jeweils $p < 0,0001$).

In der multivariaten Analyse, die den Status der RBM3-Immunfärbung, den Gleason-Grad, das pT-Stadium, das präoperative Prostataspezifische Antigen (PSA), den chirurgischen Resektionsrand und den Lymphknotenstatus umfasste, blieb die prognostische Relevanz der starken RBM3-Immunfärbung statistisch signifikant ($p = 0,0084$). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass eine starke RBM3-Expression einen unabhängigen prognostischen Marker beim Prostatakarzinom darstellt. Die starke Assoziation mit der ERG-Expression und der PTEN-Deletion lässt vermuten, dass RBM3 mit diesen beiden zentralen molekularen Signalwegen des Prostatakarzinoms interagiert.

6.0 Abstract

The RNA-binding motif protein 3 (RBM3) has recently been suspected as a prognostic biomarker in several cancers. To clarify the prognostic relevance of RBM3 in prostate cancer we analyzed RBM3 expression by immunohistochemistry on a tissue microarray containing 11,152 prostate cancers. RBM3 expression was more often detectable in malignant compared to benign prostate. RBM3 immunostaining was found in 64% of the interpretable prostate cancers and was considered strong in 25.6%. High RBM3 expression was linked to advanced tumour stage, high Gleason score, positive nodal involvement and positive surgical margin status ($p < 0.0001$ each). There was a remarkable accumulation of strong RBM3 expression in v-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog (ERG) positive prostate cancers and tumours harbouring PTEN deletions ($p < 0.0001$ each). Moreover, RBM3 staining was tightly related to early biochemical recurrence if all tumours or subgroups of ERG negative and ERG positive cancers were analysed ($p < 0.0001$ each). In multivariate analysis, including RBM3 staining, Gleason grade, pT stage, prostate-specific antigen (PSA), surgical margin status, and nodal status, the prognostic impact of RBM3 staining retained statistically significance ($p = 0.0084$). In summary, our observations indicate that high RBM3 expression is an independent prognostic marker in prostate cancer. The tight link to ERG activation and PTEN deletions suggest interaction with key molecular pathways in prostate cancer.

7.0 Literaturverzeichnis

1. Robert Koch Institut (RKI) . Krebs in Deutschland 2012. Stand 17.12.2015
2. Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms. Deutsche Gesellschaft für Urologie e. V.; Version 2.0; 2011.
3. Danno S, Nishiyama H, Higashitsuji H, et al. Increased transcript level of RBM3, a member of the glycine-rich protein family, in human cells in response to cold stress. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;236:804–7.
4. Wellmann S, Buhrer C, Moderegger E, et al. Oxygen-regulated expression of the RNA-binding proteins RBM3 and CIRP by a HIF-1-independent mechanism. *J Cell Sci* 2004;117:1785–94.
5. Leonart ME. A new generation of proto-oncogenes: coldinducible RNA binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 2010;1805:43–52.
6. Kita H, Carmichael J, Swartz J, et al. Modulation of polyglutamine-induced cell death by genes identified by expression profiling. *Hum Mol Genet* 2002;11:2279–87.
7. Sureban SM, Ramalingam S, Natarajan G, et al. Translationregulatory factor RBM3 is a proto-oncogene that prevents mitotic catastrophe. *Oncogene* 2008;27:4544–56.
8. Wellmann S, Truss M, Bruder E, et al. The RNA-binding protein RBM3 is required for cell proliferation and protects against serum deprivation-induced cell death. *Pediatr Res* 2010;67:35–41.
9. Hjelm B, Brennan DJ, Zendehrokh N, et al. High nuclear RBM3 expression is associated with an improved prognosis in colorectal cancer. *Proteomics Clin Appl* 2011;5:624–35.
10. Ehlen A, Brennan DJ, Nodin B, et al. Expression of the RNAbinding protein RBM3 is associated with a favourable prognosis and cisplatin sensitivity in epithelial ovarian cancer. *J Transl Med* 2010;8:78.
11. Jogi A, Brennan DJ, Ryden L, et al. Nuclear expression of the RNA-binding protein RBM3 is associated with an improved clinical outcome in breast cancer. *Mod Pathol* 2009;22:1564–74.
12. Jonsson L, Bergman J, Nodin B, et al. Low RBM3 protein expression correlates with tumour progression and poor prognosis in malignant melanoma: an analysis of 215 cases from the Malmo Diet and Cancer Study. *J Transl Med* 2011;9:114.
13. Jonsson L, Gaber A, Ulmert D, Uhlen M, Bjartell A, Jirstrom K. High RBM3 expression in prostate cancer independently predicts a reduced risk of biochemical recurrence and disease progression. *Diagn Pathol* 2011;6:91.
14. Erbersdobler A, Fritz H, Schnoger S, et al. Tumour grade, proliferation, apoptosis, microvessel density, p53, and bcl-2 in prostate cancers: differences between tumours located in the transition zone and in the peripheral zone. *Eur Urol* 2002;41:40–6.
15. Mirlacher M, Simon R. Recipient block TMA technique. *Methods Mol Biol* 2010;664:37–44.
16. Schlomm T, Iwers L, Kirstein P, et al. Clinical significance of p53 alterations in surgically treated prostate cancers. *Mod Pathol* 2008;21:1371–8.
17. Bubendorf L, Sauter G, Moch H, et al. Ki67 labelling index: an independent predictor of progression in prostate cancer treated by radical prostatectomy. *J Pathol* 1996;178:437–41.
18. Kluth M, Hesse J, Heinl A, et al. Genomic deletion of MAP3K7 at 6q12-22 is associated with early PSA recurrence in prostate cancer and absence of TMPRSS2:ERG fusions. *Mod Pathol* 2013;26:975–83.
19. Grupp K, Kohl S, Sirma H, et al. Cysteine-rich secretory protein 3 overexpression is linked

- to a subset of PTEN-deleted ERG fusion-positive prostate cancers with early biochemical recurrence. *Mod Pathol* 2013;26:733–42.
- 20. 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.
 - 21. 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.
 - 22. 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.
 - 23. Tomlins SA, Laxman B, Varambally S, et al. Role of the TMPRSS2-ERG gene fusion in prostate cancer. *Neoplasia* 2008;10:177–88.
 - 24. 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.
 - 25. Burkhardt L, Fuchs S, Krohn A, et al. CHD1 is a 5q21 tumor suppressor required for ERG rearrangement in prostate cancer. *Cancer Res* 2013;73:2795–805.
 - 26. Krohn A, Diedler T, Burkhardt L, et al. Genomic deletion of PTEN is associated with tumor progression and early PSA recurrence in ERG fusion-positive and fusion-negative prostate cancer. *Am J Pathol* 2012;181:401–12.
 - 27. Lapointe J, Li C, Giacomini CP, et al. Genomic profiling reveals alternative genetic pathways of prostate tumorigenesis. *Cancer Res* 2007;67:8504–10.
 - 28. Taylor BS, Schultz N, Hieronymus H, et al. Integrative genomic profiling of human prostate cancer. *Cancer Cell* 2010;18:11–22.

III. Darstellung des Eigenanteils

Eigenanteil:

- Literaturrecherche zum Protein RBM3 bei Tumoren, Prognose-Parametern beim Prostatakarzinom und molekularen bzw. genetischen Veränderungen beim Prostatakarzinom.
- Auswahl des Proteins RBM3 für die Untersuchung und Etablierung des IHC-Antikörpers
- Immunhistochemische Analyse der RBM3-Expression unter Anleitung
- Statistische Auswertung der Ergebnisse
- Erstellung einer ersten Version des Manuskriptes, inklusiver aller Tabellen und Abbildungen

Anteil der Co-Autoren

- IHC-Analyse und pathologische Beurteilung der Tumoren: Katharina Grupp, Stefan Steurer und Sarah Minner
- Datenakquisition, Datenbankgenerierung und statistische Analyse: Kristina Prien, Claudia Hube-Magg, Hüseyin Sirma, Lars Budäus, Alexander Haese, Jakob Izbicki
- Erstellen des Manuskriptes: Katharina Grupp, Maria Christina Tsourlakis und Ronald Simon
- Studiendesign, Studienkoordination und fachliche Revision des Manuskriptes: Ronald Simon, Maria Christina Tsourlakis, Thorsten Schlomm und Guido Sauter.

IV. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Guido Sauter, Dr. Katharina Grupp, Dr. Martina Kluth und PD Dr. Ronald Simon für die hervorragende Betreuung und Unterstützung bedanken.

Besonderer Dank gebührt auch Christina Koop und Inge Brandt, die mir unentwegt hilfsbereit und tatkräftig zur Seite standen.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern, die mich immer unterstützt haben und all denen die mich während des Studiums und bei der Erstellung dieser Arbeit begleiteten.

V. Lebenslauf

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig 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: