

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Institut für Pathologie: Molekularpathologie

Direktor: Professor Dr. med. Guido Sauter

Können Assoziationsstudien die Funktion unbekannter Gene aufdecken? Eine in-silico Assoziationsstudie zwischen der Aktivität des p53 Tumorsuppressors und 96 tumorrelevanten Genen an einem Kollektiv aus 12.247 Prostatakarzinomen

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Humanmedizin

Medizinische Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Khakan Hussein

2017

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 21.09.2017**

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

Prüfungsausschuss, der Vorsitzender: Prof. Dr. Guido Sauter

Prüfungsausschuss, zweite Gutachterin: PD Dr. Sabine Riethdorf

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
1 Einleitung	5
1.1 Gewebemikroarray-basierte Hochdurchsatz-Studien	6
1.2 Der Tumorsuppressor p53	7
1.3 Zielsetzung der Arbeit	8
2 Material und Methoden	10
2.1 Gewebekollektiv	10
2.2 Prostata-Prognose-Gewebemikroarray (Prognose-TMA).....	10
2.2.1 Klinisch-pathologische Datenbank des Prognose-TMA	10
2.2.2 Molekulare Datenbank des TMA.....	12
2.2.3 Einteilung der IHC-Marker in 5 biologische Prozesse.....	14
2.3 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	14
2.3.1 Herstellung der TP53-Deletionssonde	15
2.3.2 Hybridisierung der TP53-Deletionssonde	15
2.3.3 Mikroskopische FISH-Auswertung.....	16
2.4 Immunhistochemie (IHC)	16
2.4.1 Mikroskopische IHC-Auswertung	16
2.5 Bestimmung des p53-Status	17
2.6 Statistische Auswertung.....	17
3 Ergebnisse	18
3.1 Kombiniertes p53-Status der untersuchten Prostatakarzinome	18
3.2 Assoziation des kombinierten p53-Status mit der Expression von 83 potentiell tumorrelevanten Proteinen	18
3.2.1 Assoziation des p53-Inaktivierungsstatus mit DNA-Reparatur-Proteinen	20
3.2.2 Assoziation des p53-Inaktivierungsstatus mit Zell-Homöostase regulatorischen Proteinen	23
3.2.3 Assoziation des p53-Inaktivierungsstatus mit Transkriptionskontroll-Proteinen	29
3.2.4 Assoziation des p53-Inaktivierungsstatus mit Metabolismus-Proteinen	34
3.2.5 Assoziation des p53-Inaktivierungsstatus mit Zell-Adhäsions-, -Gestalts- und Motilitäts-Proteinen	40
3.3 Assoziation des kombinierten p53-Status mit häufigen Deletionen des Prostatakarzinoms	43
4 Diskussion	49
5 Zusammenfassung	54
6 Abstract	55

7 Literaturverzeichnis	56
Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	63
Abkürzungsverzeichnis.....	64
Anhang.....	65
Danksagung.....	69
Lebenslauf.....	70
Eidesstattliche Erklärung.....	71

1 Einleitung

Die Diagnose Krebs ist heute immer seltener mit einer lebensbedrohlichen Situation für den Patienten verbunden. Dies liegt unter anderem daran, dass durch die Verbesserung von frühdiagnostischen Verfahren und der Etablierung von Vorsorgeuntersuchungen viele Tumorentitäten bereits in sehr frühen, gut therapierbaren Stadien entdeckt werden (1). Aber auch die Entwicklung von zielgerichteten Tumortherapien, wie zum Beispiel der Anti-HER2-Therapie beim Mammakarzinom (2, 3), hat zu einer deutlichen Verbesserung der Situation vieler Krebspatienten geführt. Dass solche Therapieansätze heute möglich sind, basiert unter anderem auf dem ständigen Erkenntnisgewinn in der molekularen Onkologie. Die molekulare Onkologie beschäftigt sich mit der Identifizierung von Mechanismen und letztendlich Veränderungen von Genen oder biologischen Prozessen, welche die Entstehung und die Progression von Karzinomen hervorrufen bzw. unterstützen (4). Dank dieser Forschung wissen wir heute zum Beispiel, dass einer der grundlegenden Mechanismen der Tumorentstehung die Deregulierung der Homöostase zwischen Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose ist (4). Des Weiteren sind bereits einige Gene bzw. Proteine identifiziert worden, denen eine onkogene oder tumorsuppressive Wirkung in-vitro und in-vivo nachgewiesen werden konnte (4). Dazu zählt zum Beispiel der Tyrosinkinase-Rezeptor EGFR, dessen Aktivierung zu einer übersteigerten Zellproliferation führt (5) und die Phosphatase PTEN, deren Inaktivierung ebenfalls in eine erhöhte Proliferation der Tumorzellen resultiert (6). Diese beiden Gene spielen in zahlreichen, aber nicht in allen Karzinomentitäten, eine wesentliche Rolle in der Onkogenese (7, 8). Dass sich die einzelnen Tumorentitäten in ihren charakteristischen genetischen und molekularen Veränderungen stark unterscheiden können, erschwert jedoch die Identifizierung von grundlegenden onkogenen Mechanismen. Zusätzlich dazu besitzt jeder Tumor seinen individuellen genetischen Fingerabdruck. Aus diesem Grunde ist die Tumorbiologie für zahlreiche Karzinome noch nicht ausreichend geklärt. Insbesondere die Mechanismen bzw. Gene die zu einem invasiven Wachstum und einer Metastasierung führen sind immer noch weitgehend unbekannt. Ein grundlegendes Verständnis der Karzinogenese und Progression von Tumoren ist jedoch unabdingbar, um neue zielgerichtete Anti-Tumortherapien zu entwickeln. Aus diesem Grund sucht die Karzinomforschung in allen Bereichen nach möglichen Wegen, um in kürzester Zeit ein besseres Verständnis der Tumorbiologie und damit der Funktion der tumorrelevanten Gene zu erzielen.

Durch die ständige Entwicklung und Verbesserung der molekular-biologischen Techniken ist es heute möglich in relativ kurzer Zeit zum Beispiel das Gesamtgenom, das Proteom und das Transkriptom in einem einzelnen Tumor zu bestimmen und so die genetischen und molekularen Veränderungen in diesem einen Tumor zu beschreiben (4, 9, 10). Der Vergleich des genetischen und molekularen Fingerabdruckes von Tumoren einer Tumorentität kann dann zur Identifizierung von rekurrenten Veränderungen genutzt werden (11-16). Während das Mammakarzinom zum Beispiel durch zahlreiche rekurrente Mutationen, Amplifikationen und Deletionen gekennzeichnet ist (17-19), zeichnen sich Prostatakarzinome vor allem durch Translokationen (v.a. TMRSS2:ERG) und Deletionen aus (20-22). Die Charakterisierung kompletter Tumorgenome und die daraus resultierende enorme Anzahl von individuellen Veränderungen stellt die Karzinomforschung allerdings vor die große Herausforderung, die tumorrelevanten Veränderungen („Driver“) von den zufällig aufgetretenen Veränderungen („Passenger“) zu unterscheiden (4, 23). Studien zeigten, dass eine Abgrenzung von molekularen Untergruppen hilfreich sein kann, um klinisch relevante und vermutlich funktionelle Zusam-

menhänge einzelner Veränderungen aufzudecken. Beim Prostatakarzinom zum Beispiel sind die meisten genetischen und molekularen Veränderungen entweder mit dem Auftreten (ERG-positiv) oder dem Fehlen (ERG-negativ) der TMPRSS2:ERG Fusion assoziiert (21, 22, 24-61), welche die häufigste genetische Veränderung beim Prostatakarzinom darstellt (21, 22, 62). Diese Studien zeigen jedoch auch, dass die Grenzen im Verständnis der Tumorbiologie häufig durch die Unkenntnis über die Funktion eines Genes gesetzt werden. Zur Aufklärung der Funktion eines Genes müssen allerdings aufwendige in-vitro und in-vivo Versuche durchgeführt werden, die häufig mehrere Jahre beanspruchen. Ein klassisches Beispiel ist hier der bekannte Tumorsuppressor p53. Bei seiner Entdeckung Ende der 70er Jahre wurde ihm zu nächste eine onkogene Funktion zugesprochen. Erst einige Jahre später wurde klar, dass p53 eine tumorsuppressive Wirkung besitzt. Heute, 30 Jahre und mehr als 50.000 Studien später, ist p53 der wichtigste Tumorsuppressor in zahlreichen Tumorentitäten (63). Obwohl die Möglichkeiten für funktionelle Studien inzwischen massiv verbessert worden sind, stellt die Aufklärung der Funktion eines Genes nach wie vor eine große Herausforderung da. Alternative Ansätze, die Hinweise auf die Genfunktion geben können sind daher von hoher aktueller Bedeutung.

1.1 Gewebemikroarray-basierte Hochdurchsatz-Studien

Die Gewebemikroarray (tissue microarray, TMA) Technik bietet die Möglichkeit mit einem geringen Probeneinsatz in nur einer Analyse mehrere hundert Proben gleichzeitig zu analysieren. Zudem können an einem TMA-Tumorkollektiv mehrere Hundert molekularbiologische Untersuchungen durchgeführt werden (23, 64). Aus diesem Grund ist die TMA-Technik heute eine der wichtigsten Hochdurchsatzmethoden in der Tumorforschung. Am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Eppendorf wurden in den letzten Jahren zahlreiche TMAs aus unterschiedlichen Tumorentitäten aufgebaut (65-68), um zum Beispiel die klinische Relevanz von genetischen und molekularen Veränderungen zu klären. Das mit Abstand größte und weltweit einzigartigste TMA-Kollektiv stellt der Prostata-Prognose-TMA aus mittlerweile über 17.000 Prostatakarzinomen dar. Ursprünglich wurde dieser TMA zur Validierung der prognostischen Relevanz von rekurrenten Alterationen bzw. Identifizierung von molekularen Prognosemarkern beim Prostatakarzinom aufgebaut. Mittlerweile wurde die Deregulation von mehr als 100 Proteinen mittels Immunohistochemie (IHC) sowie der chromosomale Verlust von mehr als 15 Deletionsregionen mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) an diesem TMA-Kollektiv untersucht (24-62, 65, 69-80). Alle Studiendaten wurden in einer molekularen Datenbank gesammelt, so dass der Status jeder einzelnen Veränderung für jeden einzelnen Tumor im TMA nachvollzogen werden kann. Anhand der molekularen Datenbank wurden bereits zahlreiche Alterationen identifiziert, die gehäuft gemeinsam in einem Tumor auftreten. Zum Beispiel sind Deletionen von TP53, PTEN, 3p13 und 16q23 sowie eine Deregulation der Expression von HOOK3, SENP1 und RBM3 klar mit einem ERG-positiven Phänotyp assoziiert (28, 42, 46, 48-50, 75), während Deletionen von 5q und 6q sowie Alterationen von p27, SPINK1 und TYMS gehäuft in Tumoren ohne ERG-Fusion auftreten (31, 32, 34, 47, 55). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die prognostische Relevanz einiger molekularer Marker von dem molekularen Hintergrund in der Zelle abhängt (25, 54, 75). Die Identifizierung solcher molekularer Subgruppen ist dementsprechend essentiell für die Etablierung von prognostischen Multiparameter-Tests für die Routinediagnostik. Zudem können gemeinsam auftretende Veränderungen auch auf einen funktionellen Zusammenhang der betroffenen Gene bzw. Proteine hindeuten. Es stellt sich daher die Frage,

ob die zelluläre Funktion eines Proteins durch die Assoziation mit anderen Proteinen eingegrenzt werden kann. Hätte so zum Beispiel die multipotente Funktion von p53 schneller aufgedeckt werden können?

1.2 Der Tumorsuppressor p53

Das Protein 53 (p53) ist der bekannteste Tumorsuppressor und außerdem das erste Protein dem eine tumor-suppressive Funktion zugeschrieben wurde (81). Es ist daher nicht erstaunlich, dass p53 zu den am Meisten und auch am Besten untersuchten Proteinen bzw. Genen zählt (63). Erstmals beschrieben wurde p53 1979 von mehreren Arbeitsgruppen als Bindungspartner des großen T-Antigens des Simian Virus 40 (SV40) (82-85). Auf Grund der damals nachgewiesenen p53 Überexpression wurde jedoch zunächst davon ausgegangen, dass es sich bei p53 um ein Onkogen handelt (63, 82-85), ohne dass der onkogene Mechanismus oder die Bedeutung von p53 bei Tumoren bekannt war. Mitte der 80er Jahre wurden in Tumorzelllinien jedoch die ersten inaktivierenden Mutationen im TP53 (17p13) Gen, welches für das p53 kodiert, gefunden (86-89). Heute wissen wir, dass p53 ein omnipotenter Tumorsuppressor ist, der eine zentrale Säule in der Abwehr der Tumorentstehung darstellt (siehe Abbildung 1). Die Expression von p53 wird zum Beispiel induziert durch DNA-Schäden (90-93) oder eine gesteigerte Expression von Onkogenen (z.B. MYC) (94, 95). p53 wirkt vor allem als sequenzspezifischer Transkriptionsfaktor (96) und induziert die Expression von Genen die eine zentrale Rolle in der Induktion des Zellzyklus-Arrest (z.B. p21), der Apoptose (z.B. BAX) und der Seneszenz spielen (96-100). Eine Wirkung als transkriptioneller Repressor ist jedoch mittlerweile auch bekannt (101). Außerdem spielt p53 eine zentrale Rolle bei einigen DNA-Reparatur-Mechanismen sowie der Chromosomen-Segregation und damit beim Erhalt der genetischen Stabilität (100, 102, 103). Auf Grund dieser multifunktionellen Eigenschaften wird p53 auch als „Wächter des Genoms“ bezeichnet (104).

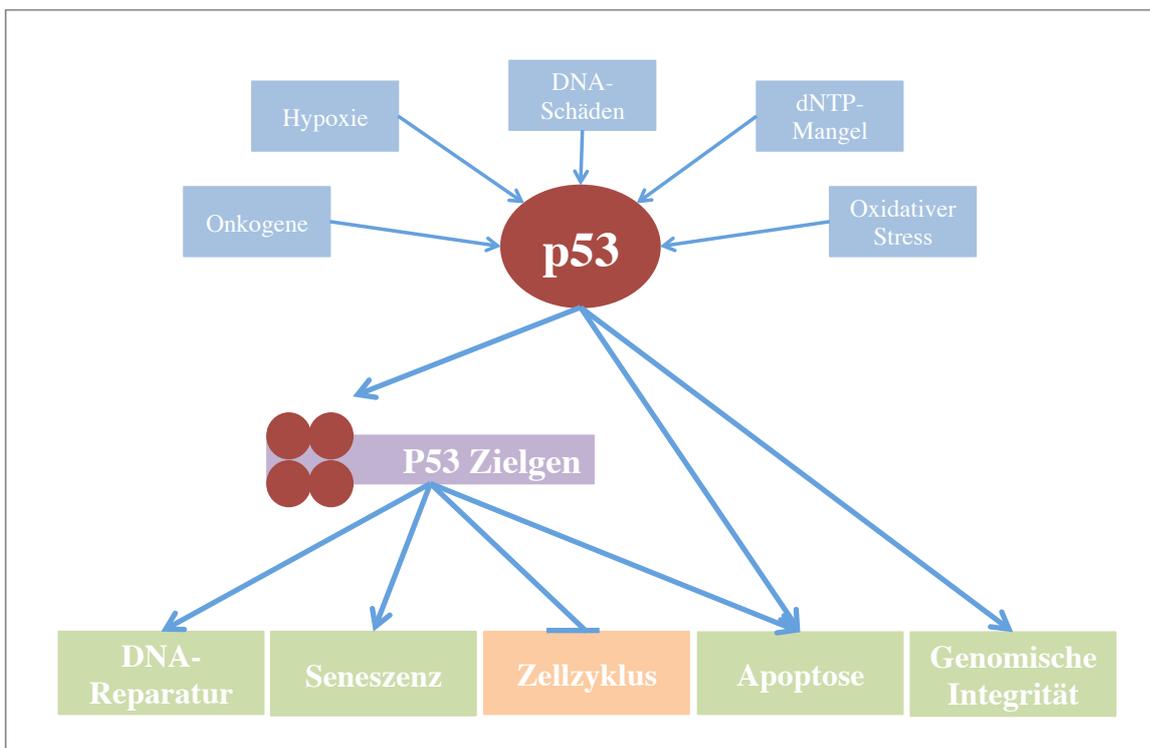


Abbildung 1: Biologische Prozesse in denen p53 eine wesentliche Rolle spielt. Dargestellt sind im oberen Teil der Abbildung endogene oder exogene Einflüsse, die zu einer p53 Expression oder Stabilisierung führen. P53 bindet dann als Tetramer an die p53 Zielgene und es kommt zur Induktion (grün) oder Hemmung (orange) von verschiedenen Tumorrelevanten biologischen Prozessen. Unabhängig von der Funktion als Transkriptionsfaktor hat p53 durch Protein-Protein-Interaktionen einen Einfluss auf die Induktion der Apoptose und den Erhalt der genomischen Integrität.

Eine Inaktivierung von p53 hat dementsprechend schwerwiegende Folgen, wie die Entartung von Zellen oder die Begünstigung eines invasiven Zellwachstums (63, 100). Die Mechanismen die zu einer p53 Inaktivierung führen sind leider sehr vielseitig. Zum einen kann es zu einem beschleunigten Abbau von p53 durch die Überexpression von MDM2 oder virale Infektionen (SV40 und HPV) kommen (105-107). Zum anderen gibt es zahlreiche chromosomale Veränderungen die zu einer vollständigen oder partiellen Inaktivierung von p53 führen. Hierzu zählen Punktmutationen, Rasterschubmutationen, Insertionen oder auch Basendeletionen in den Exons 4-8, welche für die DNA-Bindungsdomäne kodieren (108-110). Eine Besonderheit stellen die monoallelischen dominant-negativen Mutationen in der DNA-Bindungsdomäne dar. Diese führen dazu, dass das defekte p53 mit dem Wildtyp p53 akkumuliert und somit kein funktionsfähiges p53 mehr in der Zelle vorhanden ist (46, 109). Diese Akkumulation lässt sich sehr einfach immunhistochemisch nachweisen, da es hier zu einer starken nukleären Färbung kommt, welche klar von der physiologischen p53 Expression abzugrenzen ist (46). Während Mutationen innerhalb des TP53 Gens in über 50% aller Tumoren vorkommen sind Deletionen des kompletten TP53 Locus eher selten (111, 112). Ein weiterer Unterschied ist, dass die TP53 Deletion je nach Anzahl der betroffenen Allele zu einer heterozygoten oder homozygoten Inaktivierung führen kann. Bei der heterozygoten Inaktivierung ist dementsprechend noch die Expression von funktionsfähigen p53 möglich. In einer Studie innerhalb der Arbeitsgruppe konnte an 7.430 Prostatakarzinomen gezeigt werden, dass die verschiedenen p53 Inaktivierungsmechanismen unterschiedliche Auswirkungen auf das Tumorverhalten haben. Die deutlich schlechteste Prognose zeigten die Patienten, deren Tumoren eine mittels Immunhistochemie nachgewiesene dominant-negative Mutation allein, oder in Kombination mit einer heterozygoten Deletion hatten. Tumoren mit einer heterozygoten TP53 Deletion und/oder einer leicht erhöhten p53 Expression führten zwar zu einer schlechteren Prognose als Tumoren ohne p53 Alteration aber auch zu einer wesentlich günstigeren Prognose als Tumoren mit einer dominant-negativen TP53 Mutation (46). Es ist daher denkbar, dass die TP53 Mutationen mit anderen Alterationen assoziiert sind als die TP53 Deletionen und dementsprechend unterschiedliche Auswirkungen auf Tumor-relevante biologische Prozesse haben.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Bedingt durch die ständige Verbesserung der molekular-biologischen Techniken konnten in den letzten Jahren zahlreiche tumorrelevante molekulare und genetische Veränderungen identifiziert werden, welche zu einer Verbesserung der Diagnostik und Therapie verschiedener Tumorentitäten geführt haben (4, 23). Die Möglichkeit, die Gesamtheit der Alterationen in einem Tumor zu bestimmen und damit rekurrente potentiell tumorrelevante Veränderungen zu identifizieren (4, 23) hat allerdings auch dazu geführt, dass eine Vielzahl von funktionell wenig bzw. gar nicht untersuchten Genen in den Fokus der Tumorforschung geraten sind. Um die Funktion dieser Gene zu klären, müssten in der Regel sehr zeitaufwendige in-vitro Untersuchungen durchgeführt werden. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher zu prüfen, ob Assoziationsstudien dazu beitragen können, Hinweise auf die Funktion „unbekannter“ Gene zu erhalten. Das Projekt basiert auf der Hypothese, dass gemeinsam auftretende Veränderungen oftmals in denselben biologischen Prozess eingreifen

könnten. Ist die Funktion des einen Assoziationspartners bekannt, könnten so Rückschlüsse auf die Funktion des anderen Assoziationspartners erhalten werden. Diese Hypothese soll am Beispiel der multiplen Funktionen des p53 Tumorsuppressors als bekanntem Assoziationspartner getestet werden, in dem p53-assoziierte Proteine identifiziert und anhand ihrer Funktion eingeteilt werden. Der Beweis wäre erbracht, wenn die identifizierten Proteine tatsächlich eine Funktion in den p53-assoziierten biologischen Prozessen innehaben

2 Material und Methoden

2.1 Gewebekollektiv

Ein am Institut für Pathologie etablierter Prostata-Prognose-Gewebemikroarray (Prognose-TMA) bestehend aus 12.427 Prostatakarzinomgewebestücken wurde für die Analyse des p53-Aberrationsstatus mittels Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) und Immunhistochemie (IHC) benutzt. In einer vorherigen p53-Studie am Institut für Pathologie wurde ein Teil dieses TMAs bereits untersucht (46). Die dort erhobenen Daten wurden in der vorliegenden Studie ergänzt. Sowohl die Herstellung der FISH-Sonden als auch die Durchführung und Auswertung der FISH & IHC am Prognose-TMA erfolgte nach einem am Institut für Pathologie etablierten und standardisierten Protokoll.

2.2 Prostata-Prognose-Gewebemikroarray (Prognose-TMA)

Der Prognose-TMA wurde aus 12.427 Prostatektomiepräparaten zusammengestellt. Diese wurden in der Zeit von 1992 bis 2012 am Institut für Urologie und in der Martiniklinik am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf entnommen. Für Herstellung des TMAs wurde pro Patient ein repräsentativer Formalin-fixierter und in Paraffin-eingebetteter Tumorgewebeblock ausgewählt und aus diesem eine 0,6 mm durchmessende Gewebestücke entnommen. Die Gewebestücke wurden auf 27 TMA-Blöcke mit insgesamt 144 bis 522 Karzinomproben verteilt. Um sicherzustellen das ausreichend Tumorgewebe pro Stanze für die Analyse vorhanden war, wurde eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H/E-Färbung) durchgeführt und das Gewebe von einer Pathologin (PD Dr. Sarah Minner und Dr. Maria Christina Tsourlakis) bewertet.

2.2.1 Klinisch-pathologische Datenbank des Prognose-TMA

Zum TMA-Kollektiv zugehörig ist eine klinisch-pathologische Datenbank die in Zusammenarbeit des Instituts für Pathologie und der Martini-Klinik am Universitätsklinikum erstellt wurde. In dieser Datenbank sind unter anderem die pathologischen Bewertungen zum Gleason Score, dem Tumorstadium, dem Status der Lymphknoten und des Resektionsrandes vorhanden. Dazu kommen klinische Parameter wie der präoperative PSA-Wert im Serum und die klinischen Verlaufsdaten im Anschluss an die Ektomie. Klinische Verlaufsdaten zum postoperativen PSA-Wert waren für 11.665 der 12.427 Patienten über einen mittleren Beobachtungszeitraum von 49 Monaten (Bereich: 1 Monat bis 240 Monate) vorhanden. Ein PSA-Rezidiv wurde ab einem Anstieg des PSA-Wertes auf $\geq 0,2$ ng/ml angenommen. Die genaue Zusammensetzung des TMAs bezüglich Alter der Patienten bei Prostatektomie und den oben genannten klinisch-pathologischen Parametern ist in Tabelle 1 dargestellt.

Table 1: Zusammensetzung des Prostata-Prognose-Array (TMA)

Anzahl der Patienten (TMA)		
	Studienkohorte (n=12427)	PSA-Rezidiv (n=2759)
Klinische Verlaufsdaten (Monate)		
Mittelwert	49	-
Median	36,4	-
Alter (Jahre)		
<50	334	81
50-60	3061	705
60-70	7188	1601
>70	1761	370
Präoperativer PSA (ng/ml)		
<4	1585	242
4-10	7480	1355
10-20	2412	737
>20	812	397
pT Kategorie (AJCC 2002)		
pT2	8187	1095
pT3a	2660	817
pT3b	1465	796
pT4	63	51
Gleason Score		
≤3+3	2983	368
3+4	6945	1289
4+3	1848	788
≥4+4	584	311
pN Kategorie		
pN0	6970	1636
pN+	693	393
Resektionsrand		
negativ	9990	1848
positiv	2211	853
Hinweis: Die Anzahl der Patienten entspricht nicht immer 12427 in den einzelnen Kategorien, da es auch Fälle mit fehlenden Daten gibt. Abkürzungen: AJCC: American Joint Committee on Cancer, PSA: Prostata-spezifisches Antigen, pT: pathologisches Tumorstadium, pN: pathologischer Status der Lymphknoten, TMA: tissue microarray / Gewebemikroarray		

2.2.2 Molekulare Datenbank des TMA

In der molekularen Datenbank werden alle Studiendaten festgehalten die mittels IHC oder FISH am Prognose-TMA ermittelt wurden. Zum Zeitpunkt der vorliegenden Studie waren die Ergebnisse von 83 IHC-Studien und 15 FISH-Studien in der molekularen Datenbank, die an 3.132 bis 12.427 der im TMA enthaltenen Karzinome durchgeführt wurden, archiviert (24-62, 65, 69-80, 113-115). Eine detaillierte Darstellung der mittels IHC untersuchten potentiell Tumor-relevanten Proteine und der mittels FISH untersuchten chromosomalen Regionen (Deletionsuntersuchung) ist in Tabelle 2 und 3 zu finden. Die Auswertung der Proteinexpression erfolgte durch einen Pathologen und führte in der Regel zu einer Einteilung des Expressionsniveaus in vier Stufen: negativ, schwach, moderat und stark. In Einzelfällen wurde die Expression in die Kategorien negativ, schwach und stark eingeteilt. Details hierzu sind in Tabelle 2 zu finden. Die Auswertung der Deletionen mittels FISH erfolgte wie am Beispiel der TP53 FISH-Auswertung (Punkt 2.3.3) beschrieben in den zwei Kategorien deletiert und normal (nicht-deletiert).

Tabelle 2: Liste der molekularen Datenbank über die Proteine die mittels Immunohistochemie (IHC) am Prognose-TMA untersucht wurden. Abkürzungen: n=negativ, p=positiv, m=moderat, l=niedrig (für low), w=weak, h=hoch (für high), st.=stark

IHC-Marker			
Protein	Biologische Prozesse	IHC-Kategorien	analysierte Tumoren
ATRX	DNA-Reparatur	n, s, m, st.	7.481
DNase	DNA-Reparatur	n, s, m, st.	12.427
ERCC1	DNA-Reparatur	n, s, m, st.	12.427
LIG4	DNA-Reparatur	n, s, m, st.	11.152
MLH1	DNA-Reparatur	n, s, m, st.	11.152
MSH6	DNA-Reparatur	n, s, m, st.	11.152
p53	DNA-Reparatur	n, l, h.	12.427
p95	DNA-Reparatur	n, s, m, st.	11.152
PMS2	DNA-Reparatur	n, s, m, st.	11.152
Survivin	DNA-Reparatur	n, s, m, st.	12.427
XPA	DNA-Reparatur	n, s, m, st.	12.427
ANX3	Metabolismus	n, s, m, st.	3.132
BGN	Metabolismus	n, s, st.	12.427
CD10	Metabolismus	n, s, m, st.	11.152
CUGBP1	Metabolismus	n, s, m, st.	11.152
ELAVL1	Metabolismus	s, st.	12.427
EZRIN	Metabolismus	n, s, m, st.	11.152
FABP5	Metabolismus	n, s, m, st.	11.152
FASN	Metabolismus	n, s, m, st.	11.152
GGH	Metabolismus	n, s, st.	12.427
GGT1	Metabolismus	n, s, m, st.	12.427
GLO1	Metabolismus	n, s, m, st.	11.152
GSK3alpha	Metabolismus	n, s, m, st.	11.152
GSK3B	Metabolismus	n, s, st.	12.427
HSD3B2	Metabolismus	n, s, m, st.	12.427
KPNA2	Metabolismus	n, s, m, st.	11.152
LPCAT1	Metabolismus	n, s, m, st.	11.152
p62	Metabolismus	n, s, m, st.	12.427
RBM3	Metabolismus	n, s, m, st.	11.152

IHC-Marker			
Protein	Biologische Prozesse	IHC-Kategorien	analysierte Tumoren
SEC14L1	Metabolismus	n, s, m, st.	12.427
SENP1	Metabolismus	n, s, m, st.	12.427
SPINK1	Metabolismus	n, s, m, st.	11.152
Trap 1	Metabolismus	n, s, m, st.	12.427
AZGP1	Regulation der Zell-Homöostase	n, s, m, st.	11.152
BCAR1	Regulation der Zell-Homöostase	n, s, m, st.	11.152
BCL2	Regulation der Zell-Homöostase	s, st.	12.427
CENPF	Regulation der Zell-Homöostase	n, s, m, st.	12.427
CHA	Regulation der Zell-Homöostase	n, s, m, st.	3.261
EGFR	Regulation der Zell-Homöostase	n, s, m, st.	3.261
EHBP1	Regulation der Zell-Homöostase	n, p.	12.427
ELAC2	Regulation der Zell-Homöostase	n, s, m, st.	12.427
FAM13C	Regulation der Zell-Homöostase	n, s, m, st.	12.427
HER2	Regulation der Zell-Homöostase	n, p.	3.261
HLAE	Regulation der Zell-Homöostase	n, s, m, st.	12.427
MTCO2	Regulation der Zell-Homöostase	n, s, m, st.	11.152
mTOR	Regulation der Zell-Homöostase	n, s, m, st.	3.261
NYESO1	Regulation der Zell-Homöostase	n, s, m, st.	11.152
p16	Regulation der Zell-Homöostase	n, s, m, st.	12.427
PDL2	Regulation der Zell-Homöostase	n, s, m, st.	12.427
PSP	Regulation der Zell-Homöostase	n, s, m, st.	11.152
PTTG1	Regulation der Zell-Homöostase	n, p.	12.427
SFRP4	Regulation der Zell-Homöostase	n, s, m, st.	11.152
SSTR2	Regulation der Zell-Homöostase	n, s, m, st.	3.261
TYMS	Regulation der Zell-Homöostase	n, s, m, st.	11.152
AR	transkriptionelle Kontrolle	n, s, m, st.	11.152
ATAD2	transkriptionelle Kontrolle	n, s, m, st.	12.427
BAZ2A	transkriptionelle Kontrolle	n, s, m, st.	11.152
ERG	transkriptionelle Kontrolle	n, p.	12.427
EZH2	transkriptionelle Kontrolle	n, s, m, st.	12.427
FOXA1	transkriptionelle Kontrolle	n, s, m, st.	11.152
FOXP1	transkriptionelle Kontrolle	n, s, m, st.	3.261
FOXP2	transkriptionelle Kontrolle	n, s, m, st.	10.112
HDAC1	transkriptionelle Kontrolle	n, s, m, st.	12.427
HDAC3	transkriptionelle Kontrolle	n, s, m, st.	12.427
HOXB13	transkriptionelle Kontrolle	n, s, m, st.	11.152
MACC1	transkriptionelle Kontrolle	n, s, m, st.	12.427
NCOR2	transkriptionelle Kontrolle	n, s, m, st.	11.152
SNW1	transkriptionelle Kontrolle	n, s, m, st.	12.427
SOX9	transkriptionelle Kontrolle	n, s, m, st.	11.152
SPDEF	transkriptionelle Kontrolle	n, s, m, st.	12.427
TCEAL7	transkriptionelle Kontrolle	n, s, m, st.	12.427
YB-1	transkriptionelle Kontrolle	n, s, m, st.	11.152
ADAM15	Zell-Adhäsion, -Gestalt, - Motilität	n, s, m, st.	12.427
AQP3	Zell-Adhäsion, -Gestalt, - Motilität	n, s, m, st.	12.427
AQP5	Zell-Adhäsion, -Gestalt, - Motilität	n, s, m, st.	12.427
β-Tubulin III	Zell-Adhäsion, -Gestalt, - Motilität	n, s, m, st.	11.152
CD147	Zell-Adhäsion, -Gestalt, - Motilität	n, s, m, st.	11.152
CD166	Zell-Adhäsion, -Gestalt, - Motilität	n, s, m, st.	3.261
COL1A1	Zell-Adhäsion, -Gestalt, - Motilität	n, s, m, st.	12.427
HOOK3	Zell-Adhäsion, -Gestalt, - Motilität	n, s, st.	12.427
KLK2	Zell-Adhäsion, -Gestalt, - Motilität	n, s, m, st.	12.427
PSA	Zell-Adhäsion, -Gestalt, - Motilität	n, s, m, st.	12.427
VIM	Zell-Adhäsion, -Gestalt, - Motilität	n, s, m, st.	11.152

Tabelle 3: Liste der molekularen Datenbank zu den chromosomalen Regionen die mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) am Prognose-TMA untersucht wurden.

FISH-Marker	
Deletionsregion	analysierte Tumoren
3p13	12.427
8p21	12.427
12p13	12.427
17p13	12.427
2q21	4965
2q23	7481
2p21	4699
2q32	3779
5q13	12.427
5q21	12.427
6q15	12.427
12q24	11.152
13q14	12.427
16q23	12.427
18q21	12.427
21q22 (ERG BA)	12.427

2.2.3 Einteilung der IHC-Marker in 5 biologische Prozesse

Die mittels IHC untersuchten Proteine wurden in 5 biologische Prozesse eingeteilt. Dazu wurden in der Gene Ontology Datenbank (<http://amigo.geneontology.org/amigo/landing>) (116) mit Hilfe des Term Enrichment Service die biologischen Prozesse ermittelt, in denen die einzelnen Proteine eine wesentliche Rolle spielen. Aus diesen biologischen Prozessen wurden die Tumor-relevanten zellulären Abläufe, wie zum Beispiel die Kontrolle des Zellzykluses ausgewählt. Zur Vereinfachung der späteren Analyse wurden die biologischen Prozesse, welche eine ähnliche Wirkung oder eine vergleichbares zelluläres Ziel haben, in einer Kategorie zusammengefasst. Dadurch konnten die 83 untersuchten Proteine in die 5 folgenden biologischen Prozess-Kategorien eingeteilt werden.

1. DNA-Reparatur
2. Regulation der Zell-Homöostase: Prozesse, welche das Gleichgewicht zwischen Proliferation, Zelltod und Zelldifferenzierung halten
3. Metabolismus: Fett-, Kohlenhydrat- und Proteinstoffwechsel sowie zellulärer Transport
4. transkriptionelle Kontrolle: Histon-/Chromatin-Modifikation, Transkriptionsfaktoren
5. Zell-Adhäsion, - Gestalt und - Motilität: Cytoskelleproteine, Adhäsionsproteine usw.

2.3 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung ermöglicht die Bestimmung von chromosomalen Veränderungen,

wie zum Beispiel Deletionen oder Amplifikationen direkt in den Zellkernen des zu untersuchenden Gewebes. Der TP53 Kopiezahlstatus wurde bereits in einer früheren Studie des Instituts für Pathologie an 11.152 Tumorproben des Prognose-TMAs bestimmt (46). In der vorliegenden Arbeit wurden diese Tumoren durch die Analyse von weiteren 1.275 Prostatakarzinomproben ergänzt.

2.3.1 Herstellung der TP53-Deletionssonde

Für die Herstellung der TP53-Deletionssonde wurden mit BACs (bacterial artificial chromosome) transformierte DH10B Escherichia Coli (E.coli) verwendet (SourceBioscience, Cambridge, UK). Dazu wurden die E.coli Klone RP11-89D11 und RP11-404G1 in der Datenbank Ensemble ausgewählt, dessen gemeinsame Sequenz zu einer direkten Markierung des TP53 Genes in der FISH verwendet wurde. Für die Isolierung der Plasmid-DNA aus den DH10B E.coli wurde eine Vorkultur aus 10 ml LB-Medium, 30 µl Chloramphenicol und einigen Bakterien angesetzt, für 8 Stunden bei 37°C und 190 rpm inkubiert und dann eine Hauptkultur aus 2 ml Vorkultur, 250 ml LB-Medium und 750 µl Chloramphenicol angesetzt und für 16 Stunden bei 37°C und 190 rpm inkubiert. Aus dem mittels Zentrifugation (4°C, 6000 g, 15 Minuten) hergestellten Bakterienpellet erfolgte die DNA-Isolierung mit dem NucleoBond® BAC 100 Kit nach Angabe des Herstellers (Machery-Nagel, Düren, Deutschland). Die isolierte Plasmid-DNA wurde mit Nuklease-freiem Wasser auf eine Konzentration von 1 µg DNA pro 17,5 µl Lösung in einem braunen Reagiergefäß verdünnt und mit dem Nick Translation Reagent Kit und Spectrum Green dUTPs (Abbott, Illinois, USA) nach Angabe des Herstellers Fluoreszenz-markiert. Zur Entfernung unerwünschter Bestandteile wurde die hergestellte FISH-Sonde mit dem QIAquick® Nucleotide Removal Kit (Qiagen, Venlo, Niederlande) nach Angabe des Herstellers gereinigt. Die beiden hergestellten FISH-Sonden wurden zusammengefügt und in einer Vakuumzentrifuge aufkonzentriert.

2.3.2 Hybridisierung der TP53-Deletionssonde

Für die Durchführung der FISH an formalin-fixiertem, paraffin-eingebetteten TMAs muss zunächst eine Vorbehandlung des Gewebes erfolgen, um die DNA für die Hybridisierung zugänglich zu machen. Dazu wurden die TMAs dreimal für je 10 Minuten in Xylol und zweimal für je 5 Minuten in Ethanol 96% getaucht, für 3 Minuten bei 48°C getrocknet, für 15 Minuten in einer 80°C heißen Pretreatment-Lösung und 2,5 Stunden bei 37°C in einer Proteaselösung inkubiert, in einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert und abschließend für 3 Minuten bei 48°C getrocknet. Zur Hybridisierung der TP53-Deletionssonde wurde ein Hybridisierungsmix aus 14 µl Basismix (15,0 ml Formamid, 4,5 ml 20xSSC, 3,0 g Dextransulfat), 2 µl COT-DNA, 4 µl grüner TP53 Deletionssonde und 0,5 µl oranger Centromer 17 Sonde. Der Hybridisierungsmix wurde auf die TMAs pipettiert und diese mit einem Deckgläschen abgedeckt. Dann erfolgte die Denaturierung der DNA in einem Hybrit bei 72°C für 10 Minuten und anschließend die Hybridisierung der TP53-Deletionssonde und Centromer 17 Sonde bei 37°C für 16-18 Stunden. Abschließend wurden die TMAs in einem Hybridisierungswaschpuffer (100 ml 20xSSC, 3 ml NP40, auf 1000 ml dH₂O, pH-Wert = 7,25) gewaschen, bei Raumtemperatur getrocknet, 1 Tropfen DAPI auf die TMAs geben und diese mit einem Deckgläschen abgedeckt. Die hybridisierten TMAs wurden bis zur mikroskopischen Auswertung bei -20°C gelagert.

2.3.3 Mikroskopische FISH-Auswertung

Die FISH-Analyse wurde mittels eines Lichtmikroskops der Firma Zeiss mit den entsprechenden Filtern (AHF) durchgeführt. Die Auswertung der Gewebeslots erfolgte wie im Folgenden beschrieben:

- Nicht bewertbare Gewebeslots: mangelhafte Hybridisierung (schwaches oder kein Gen-Signal in den Tumorzellkernen und Normalzellkernen), kein oder zu wenig Tumormaterial in den Slots
- Normaler Kopiezustand: gleiche Anzahl an Centromer 17 Signalen und TP53-Signalen.
- Homozygote Deletion: das komplette Fehlen von TP53-Signalen in $\geq 60\%$ der Tumorzellkerne bei Vorkommen von Centromer 17 Signalen in den Tumorzellkernen und den Normalzellkernen
- Heterozygote Deletion: weniger TP53-Signale als Centromer 17 Signale in $\geq 60\%$ der Tumorzellkerne

2.4 Immunhistochemie (IHC)

Die IHC ist eine Methode für eine Antigen-Antikörper-Reaktion und dient der Detektion bestimmter Proteine. Der Nachweis beruht auf einer Reaktion zwischen einem Antikörper und einem bestimmten Abschnitt eines Antigens. Zur p53 Detektion wurde der Antikörper Anti-p53 (Ab-6) (Pantropic), Human (Mouse mAb, DO-1) (Calbiochem, Darmstadt) benutzt. Für die Immunhistochemie wurde die TMAs zunächst vorbehandelt durch eine Entparaffinierung (dreimal je 5 Minuten in Xylol und je 1 Minute in aufsteigender Ethanolreihe) und Rehydrierung der TMAs. Die Inkubation des Anti-p53 Antikörpers erfolgte im DAKO-Immunfärbearomat für 25 Minuten. Abschließend erfolgte die Gegenfärbung der TMAs in einer 1:5 Verdünnung mit Dako REAL™ Hematoxylin (S2020) und die Konservierung der TMAs in einer aufsteigenden Alkoholreihe.

2.4.1 Mikroskopische IHC-Auswertung

Die Auswertung der IHC wurde mittels einer 4-Punkte Skala (0, 1+, 2+, 3+) zur Bewertung der Farbintensität und dem prozentualen Anteil der gefärbten Tumorzellen durchgeführt. Anhand dieser beiden Parameter wurden die Tumoren in vier Kategorien eingeteilt: p53 schwach gefärbt: Farbintensität von 1 in $\leq 70\%$ der Zellen oder 2 in $< 30\%$ der Zellen, p53 moderat gefärbt: Farbintensität von 1 in $> 70\%$ der Zellen, 2 in $\geq 30\%$ und $\leq 70\%$ der Zellen oder 3 in $< 30\%$ der Zellen, p53 stark gefärbt: Farbintensität von 2 in $> 70\%$ der Zellen oder 3 in $\geq 30\%$ der Zellen und p53 negativ: Farbintensität ist 0 in allen Zellen.

2.5 Bestimmung des p53-Status

Zur Bestimmung des p53-Status in den einzelnen Tumoren wurden die TP53-FISH Ergebnisse mit den Resultaten der p53-IHC korreliert und ein Gesamtstatus pro Tumor vergeben. Verwendet wurden ausschließlich Tumoren in den eine Auswertung in beiden Analysen möglich war. Die Tumoren wurden anhand ihres TP53/p53-Status in die folgenden 6 Kategorien eingeteilt:

1. p53 normal: keine p53 Färbung und normaler TP53 Kopiezahlstatus
2. TP53 Deletion: keine p53 Färbung und Verlust einer TP53 Kopie
3. p53 niedrig: schwache bis moderate p53 Färbung und normaler TP53 Kopiezahlstatus
4. p53 niedrig/TP53 Deletion: schwache bis moderate p53 Färbung und Verlust einer TP53 Kopie
5. p53 hoch: starke p53 Färbung und normaler TP53 Kopiezahlstatus
6. p53 hoch/TP53 Deletion: starke p53 Färbung und Verlust einer TP53 Kopie

2.6 Statistische Auswertung

Die vergleichende Analyse der kombinierten TP53-FISH und p53-IHC Auswertung mit den anderen potentiellen Prognosemarkern der molekularen Datenbank, erfolgte mittels eines Chi-Quadrat-Test mit Hilfe der JMP 9.0.2. Statistik-Software. Zusätzlich zu der Analyse des gesamten Tumorkollektivs wurden Analysen in Abhängigkeit vom ERG-Status (ERG-positive und ERG-negative Tumoren) und dem Gleason Score ($\leq 3+3$, $3+4$, $4+3$ und $\geq 4+4$) durchgeführt. Als signifikant wurde ein p-Wert $\leq 0,05$ angenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Kombiniertes p53-Status der untersuchten Prostatakarzinome

Es wurden 1.275 Prostatakarzinome unter Verwendung der TP53-Deletionssonde mittels FISH untersucht. Auf Grund einer unzureichenden Hybridisierung oder dem Fehlen von Tumorgewebe im TMA Spot mussten 750 (58,8%) Gewebeproben aus der anschließenden Analyse ausgeschlossen werden. Für die immunohistochemische p53 Analyse wurde der gleiche TMA verwendet. Hier mussten 369 (28,9%) der Tumorstanzen wegen Fehlen von Tumorgewebe aus der nachfolgenden Analyse ausgeschlossen werden. Insgesamt konnten die Daten aus der vorherigen Studie von Kluth et al. (46) für den TP53 Deletionsstatus von 7.601 Tumoren auf 8.126 Tumoren und für den p53 Proteinstatus von 10.040 Tumoren auf 10.946 Tumoren erhöht werden. Eine TP53 Deletion konnte insgesamt in 1.299 (15,87 %) der 8.128 auswertbaren Prostatakarzinome nachgewiesen werden. Homozygote TP53 Deletionen wurden nicht gefunden. Eine p53 Färbung wurde insgesamt in 1.021 (9,33%) der 10.946 auswertbaren Tumoren detektiert. Davon zeigten 881 (8,05%) Tumoren eine schwache und 140 (1,28%) Tumoren eine starke p53 Färbung.

Um den p53 Status festzulegen wurden die Daten aus der TP53 FISH-Analyse und der p53 IHC-Analyse für jeden Patienten kombiniert. Insgesamt waren 7.099 Tumorstanzen in beiden Analysen auswertbar. Von diesen Tumoren zeigten 569 (8,0%) eine schwache p53 Färbung und keine TP53 Deletion (Bez.: p53 niedrig) und 964 (13,6%) Tumoren eine TP53 Deletion bei einem negativen p53 IHC-Befund (Bez.: TP53 Deletion). Eine Kombination aus einer schwachen p53 Färbung und einer TP53 Deletion konnte für 130 (1,8%) der Tumoren detektiert werden (Bez.: p53 niedrig und TP53 Deletion). Eine starke p53 Färbung bei Fehlen einer TP53 Deletion wurde für 49 (0,7%) Tumoren nachgewiesen (Bez.: p53 hoch). Für 60 (0,8%) der Tumoren konnte eine TP53 Deletion in Kombination mit einer starken p53 Färbung nachgewiesen werden (Bez.: p53 hoch und TP53 Deletion). Weder eine p53 Färbung noch eine TP53 Deletion konnte in 5.327 (75,0%) der untersuchten Tumoren nachgewiesen werden (Bez.: p53 normal).

3.2 Assoziation des kombinierten p53-Status mit der Expression von 83 potentiell tumorrelevanten Proteinen

Um zu prüfen in welchem Zusammenhang der p53 Aberrationsstatus mit der Deregulation von 83 potentiell tumorrelevanten Genen steht, wurde dieser in einem Chi²-Test mit dem immunohistochemischen Status von 83 Proteinen assoziiert, welche in unterschiedlichen biologischen Prozessen eine Rolle inne haben.

In einer ersten Analyse wurden der p53 Aberrationsstatus mit dem IHC-Status der 83 Proteine in allen Prostatakarzinomen assoziiert. Diese Analyse ergab eine signifikante Assoziation des p53 Aberrationsstatus zu 79 (95,2%) der untersuchten Proteine. Kein Zusammenhang mit dem p53-Status zeigte lediglich die Deregulation von EZRIN, SSTR2, mTOR und CHA.

In weiteren Untergruppenanalysen sollte dann geklärt werden, ob diese Assoziationen mit dem p53-Aberrationsstatus unabhängig von anderen molekularen und histologischen Merkmalen des Prostatakarzinoms sind. Als molekularer Parameter wurde der ERG-Status gewählt, da nahezu alle getesteten Parameter (63/83) (24-31, 33-42, 51-61, 75-78, 113, 115), wie auch der p53-Status (46), eine Assoziation zum Vorhandensein der TMPRSS2:ERG-Fusion zeigen. Der statistische signifikante Zusammenhang zwischen p53 und diesen Proteinen könnte daher auch alleine von der gemeinsamen Assoziation zum ERG-Status herrühren. Als histologischer Parameter wurde der Gleason Grad gewählt, da auch zu hier fast alle untersuchten Proteine (81/83), wie auch der p53-Aberrationsstatus (46), eine Assoziation zu einem hohen Gleason Score zeigen (24-31, 33-42, 51-61, 75-78, 113, 115). Basierend darauf wurden alle Zusammenhänge in den a) Untergruppen der ERG-positiven und ERG-negativen und b) Untergruppen der Gleason Score $\leq 3+3$, $3+4$, $4+3$ und $\geq 4+4$ erneut untersucht.

a) Für 9 der Proteine ging die Assoziation zum p53 Aberrationsstatus verloren, wenn die Analyse auf die Untergruppen der ERG-positiven und ERG-negativen Tumoren beschränkt wurde. Es kann davon ausgegangen werden, dass der signifikante Zusammenhang mit dem p53-Status bei der Analyse aller Tumoren allein auf der Assoziation zu ERG bzw. der hohen untersuchten Fallzahl beruht. Für insgesamt 71 der untersuchten Proteine blieb die Assoziation zum p53-Aberrationsstatus zumindest in einer der beiden ERG-Gruppen bestehen. Es kann bei diesen Proteinen somit von einer „echten“ Assoziation zum p53-Status ausgegangen werden. Von diesen Proteinen zeigten 60 (84%) den Zusammenhang sowohl in der Untergruppe der ERG-negativen als auch in der Untergruppe der ERG-positiven Tumoren. Die restlichen 11 (16%) Proteine zeigten die Assoziation entweder in der Gruppe der ERG-negativen (n=6) oder der Gruppe der ERG-positiven (n=5) Karzinome.

b) Für 7 der Proteine ging die Assoziation zum p53 Aberrationsstatus verloren, wenn die Analyse auf die vier Untergruppen der Tumoren mit einem identischen Gleason Score beschränkt wurde. Es kann davon ausgegangen werden, dass der signifikante Zusammenhang mit dem p53-Status bei der Analyse aller Tumoren für diese Proteine durch die Assoziation zum Gleason Grad bzw. die hohe untersuchte Fallzahl zurück geführt werden kann. Für insgesamt 72 der untersuchten Proteine blieb die Assoziation zumindest in einer Untergruppe der Tumoren mit identischem Gleason Score bestehen. Von diesen Proteinen zeigten 22 (30%) die Assoziation zum p53 Aberrationsstatus in allen vier Untergruppen der Tumoren mit einem identischen Gleason Score. Bei den restlichen 50 Proteinen beruhte der Zusammenhang zwischen der deregulierten Protein-Expression und dem p53 Aberrationsstatus auf der gleichsinnigen Beziehung zum Gleason Grad.

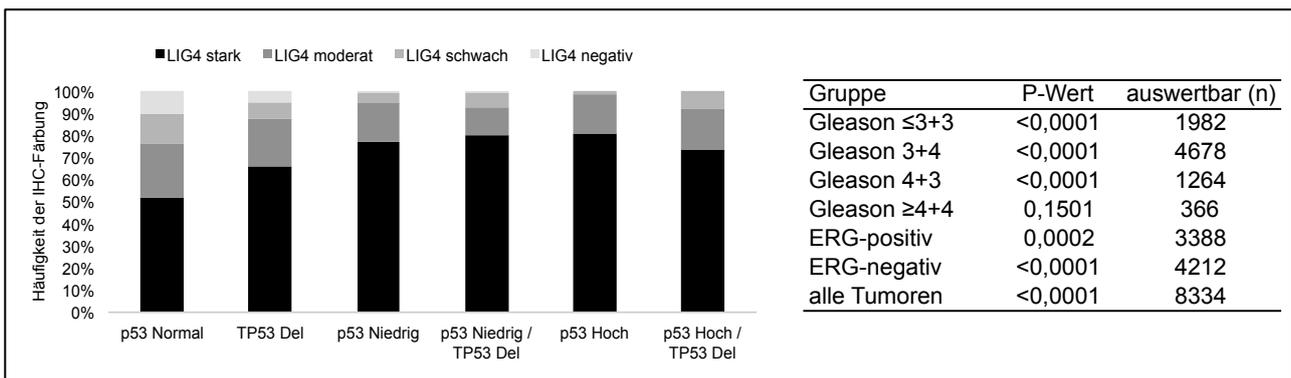
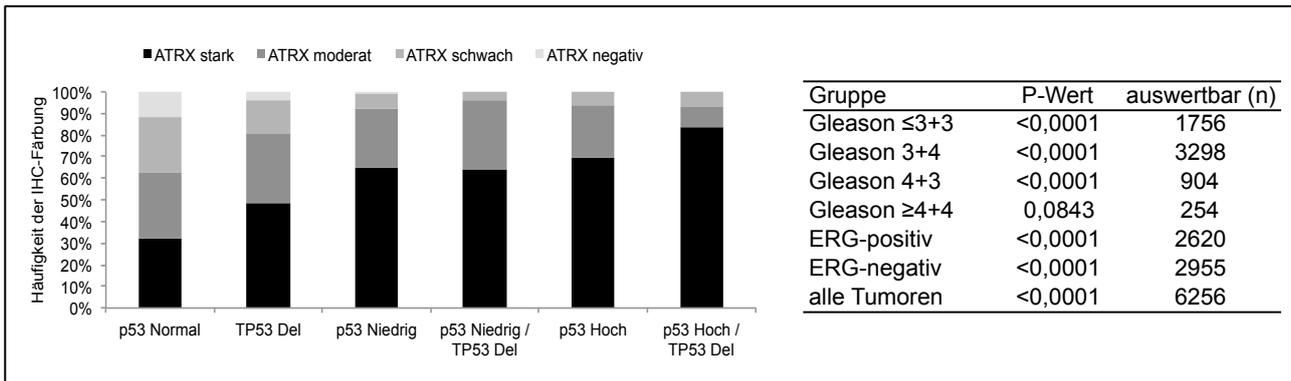
Um zu prüfen, ob die p53-assoziierten Proteine in den gleichen biologischen Prozessen wie p53 eine Rolle spielen, wurden alle untersuchten Proteine in 5 biologische Prozesse eingeteilt (DNA-Reparatur, Zell-Homöostase, transkriptionelle Kontrolle, Metabolismus und Zell-Adhäsion, - Gestalt und – Motilität). Eine signifikante Assoziation mit dem p53 Aberrationsstatus zeigten alle DNA-Reparatur-Proteine (10/10), 85,7% (18/21) der Zell-Homöostase regulatorischen Proteine, alle (19/19) der Transkriptionskontroll-Proteine, 95,5% (21/22) der Metabolismus-Proteine und alle (11/11) Proteine, die eine Funktion bei der Zell-adhäsion, -Gestalt oder –Motilität haben. In einer weiteren Untersuchung wurden die Auswirkungen des p53-Inaktivierungsstatus auf die Expression der Proteine in den 5 biologischen Prozessen geprüft. Die Ergebnisse sind in Abbildung 2-6 (Seite 20-43) dargestellt.

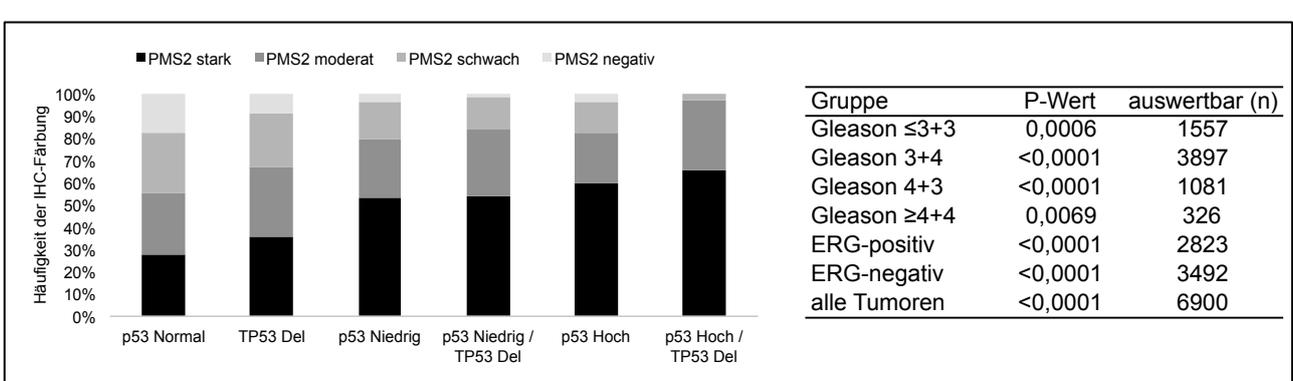
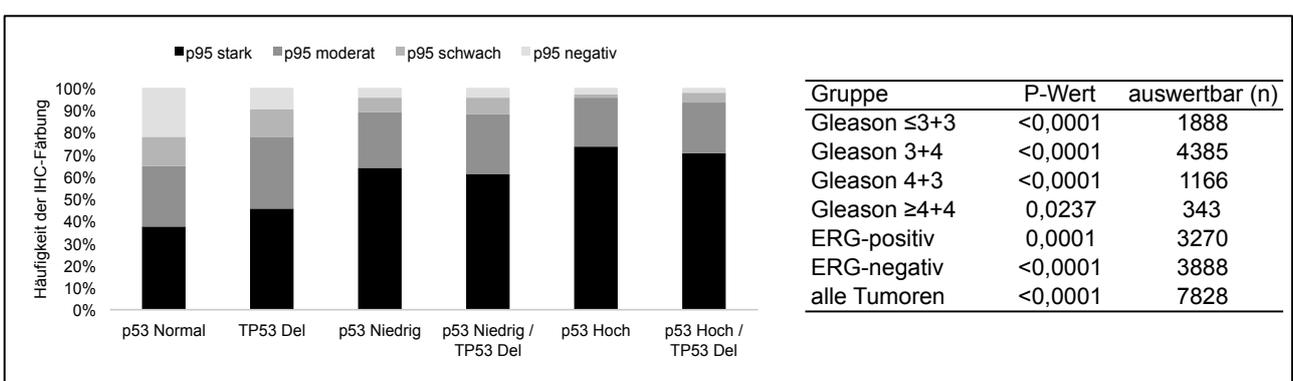
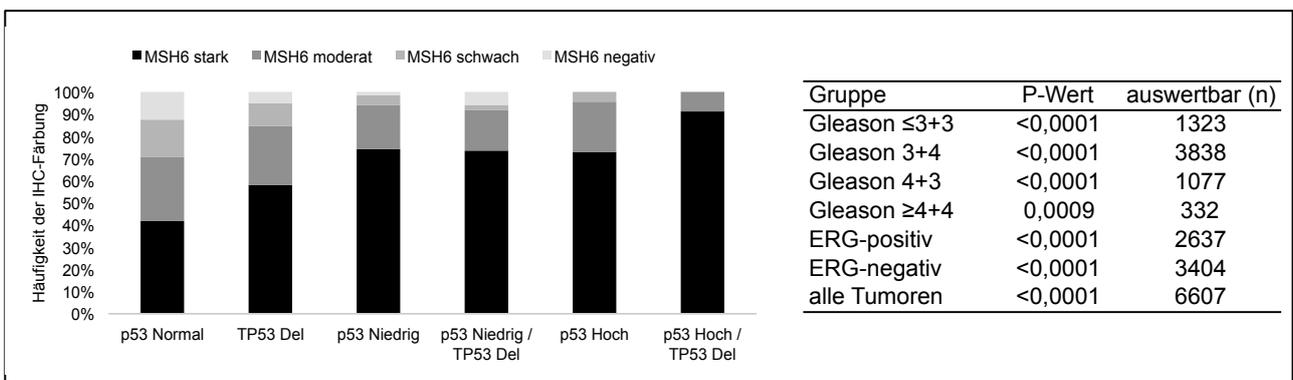
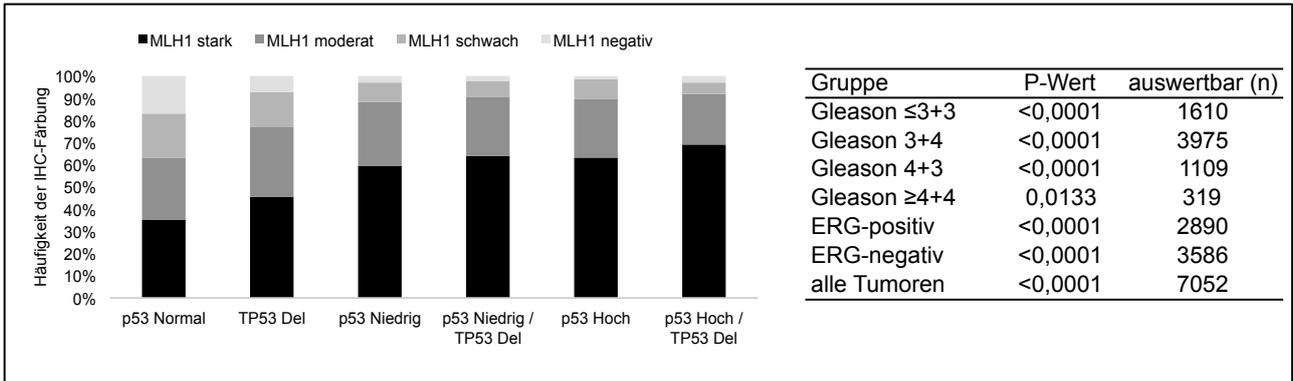
3.2.1 Assoziation des p53-Inaktivierungsstatus mit DNA-Reparatur-Proteinen

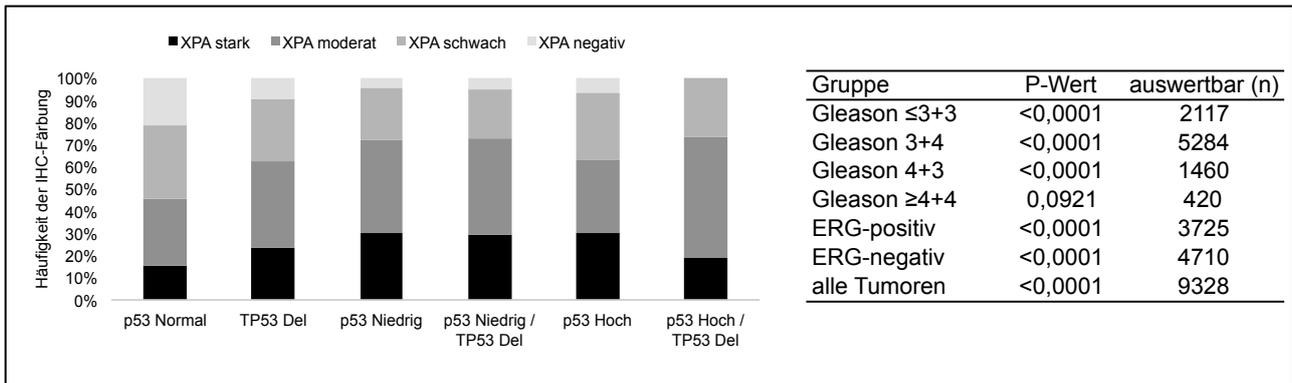
Von den 10 Proteinen, die eine Funktion bei der DNA-Reparatur haben, zeigte bei 7 (70%) Proteinen die Expression eine klare positive Assoziation zum p53-Inaktivierungsstatus. Bei diesen Proteinen stieg die Expression von vollständig funktionsfähigem p53 (p53-normal) über die pathologische erhöhte p53-Expression und partielle Inaktivierung bis hin zur vollständigen p53-Inaktivierung (p53 hoch oder p53 hoch/TP53 Deletion) an. Die Expression eines Proteins (10%) zeigte eine inverse Assoziation zum p53-Inaktivierungsstatus. Hier nahm die Expression von einem p53-normalen Status bis hin zur vollständigen p53-Inaktivierung deutlich ab. Alle Assoziationen waren außerdem sowohl in den vier Untergruppen der Tumoren mit einem identischen Gleason Score als auch den beiden Untergruppen der ERG-positiven und ERG-negativen Karzinomen vorhanden. Die Expression von 2 (20%) Proteinen zeigte keine deutliche Assoziation zum p53-Inaktivierungsstatus. Der insgesamt signifikante p-Wert beruht vermutlich auf der hohen untersuchten Fallzahl (n=9.821 und n=8.966). Alle Ergebnisse sind in Abbildung 2 (Seite 20-22) dargestellt.

Abbildung 2: Assoziation des p53-Status mit 10 DNA-Reparatur-Proteinen. p53 normal: keine p53 Färbung und normaler TP53 Kopiezahlstatus, TP53 Del (Deletion): keine p53 Färbung und Verlust einer TP53 Kopie, p53 niedrig: schwache bis moderate p53 Färbung und normaler TP53 Kopiezahlstatus; p53 niedrig/TP53 Del (Deletion): schwache bis moderate p53 Färbung und Verlust einer TP53 Kopie, p53 hoch: starke p53 Färbung und normaler TP53 Kopiezahlstatus und p53 hoch/TP53 Del (Deletion): starke p53 Färbung und Verlust einer TP53 Kopie. In den Tabellen ist der Zusammenhang auch für Untergruppen mit identischem Gleason Score oder ERG-Status angegeben. Abbildung geht von Seite 20-22.

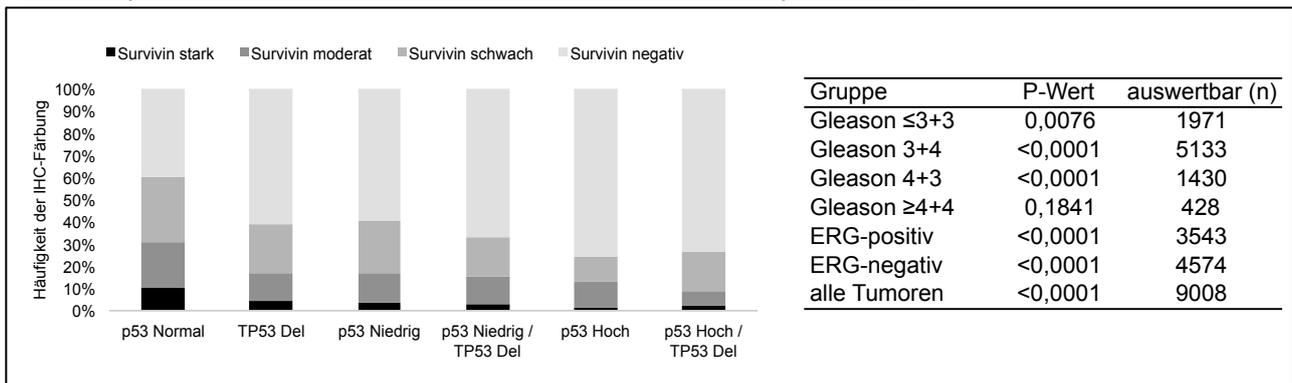
DNA-Reparatur-Proteine mit einer positiven Assoziation zum p53-Status



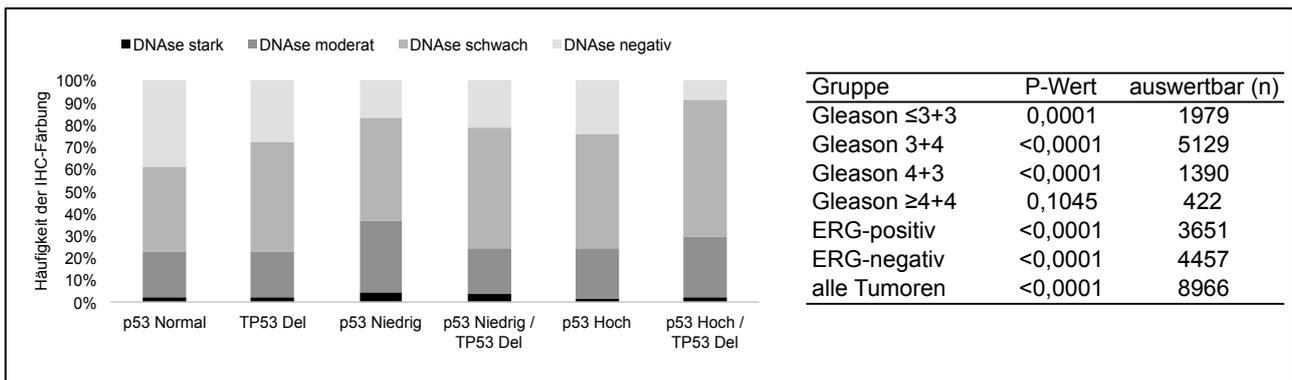
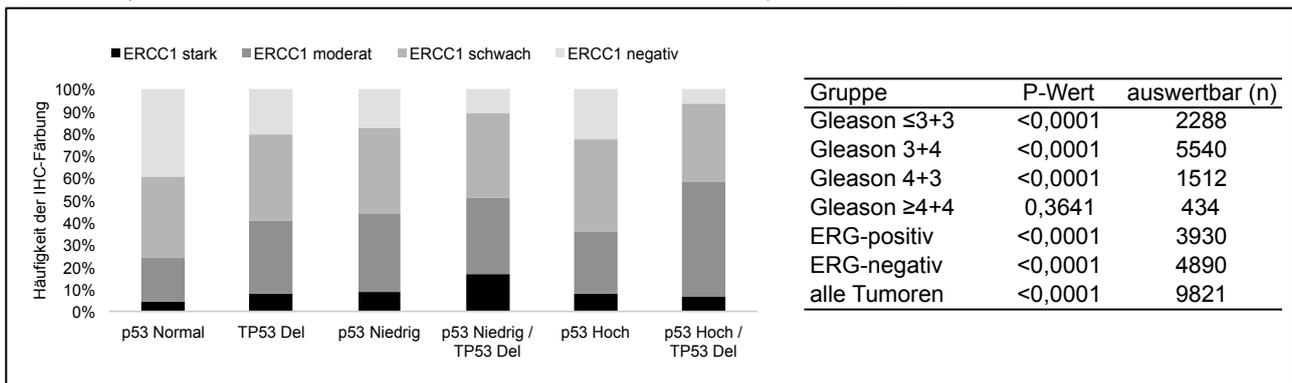




DNA-Reparatur-Proteine mit einer inversen Assoziation zum p53-Status



DNA-Reparatur-Proteine mit keiner klaren Assoziation zum p53-Status

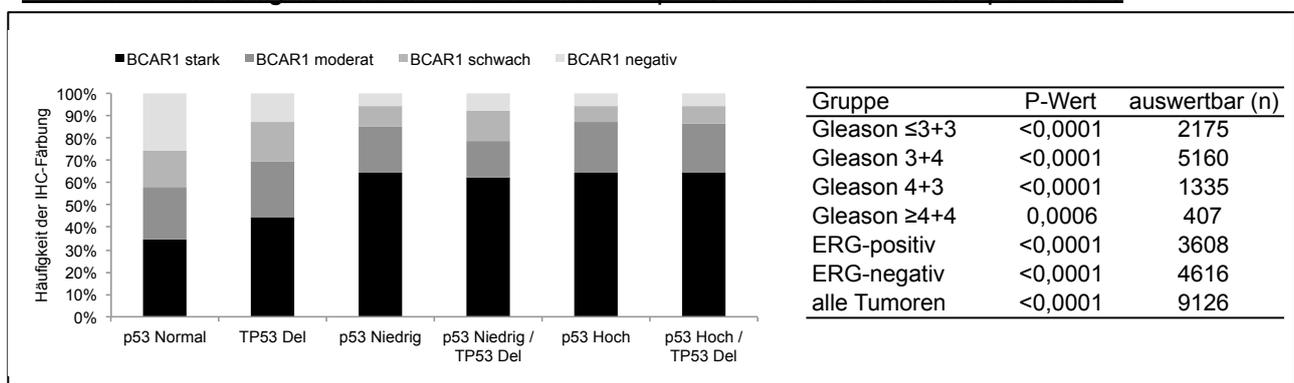


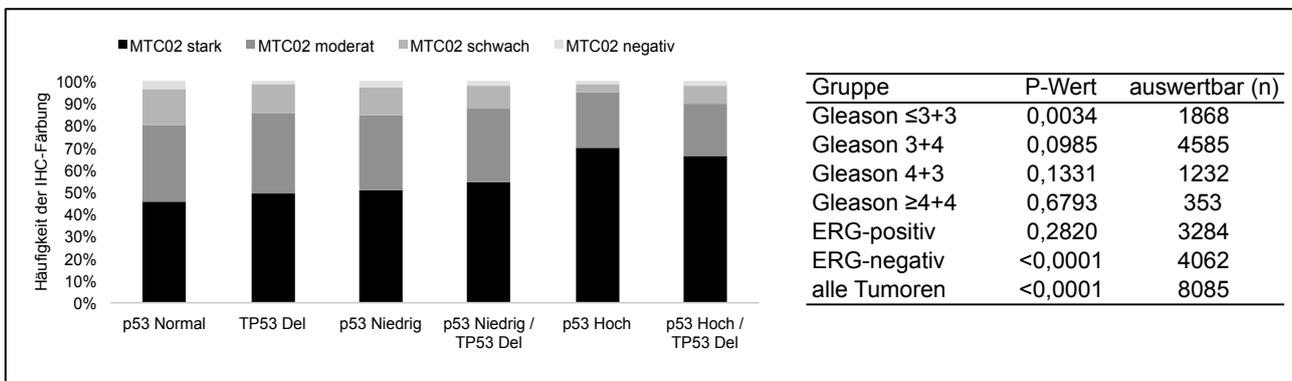
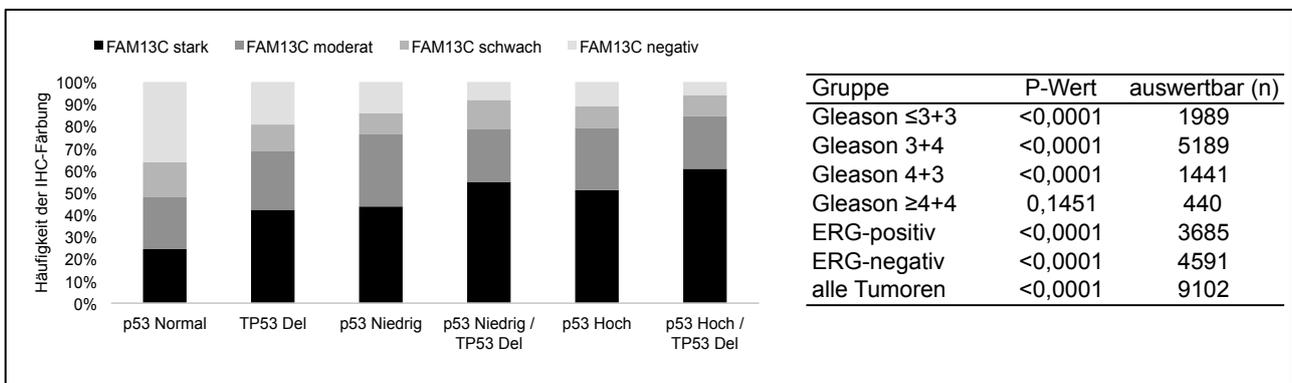
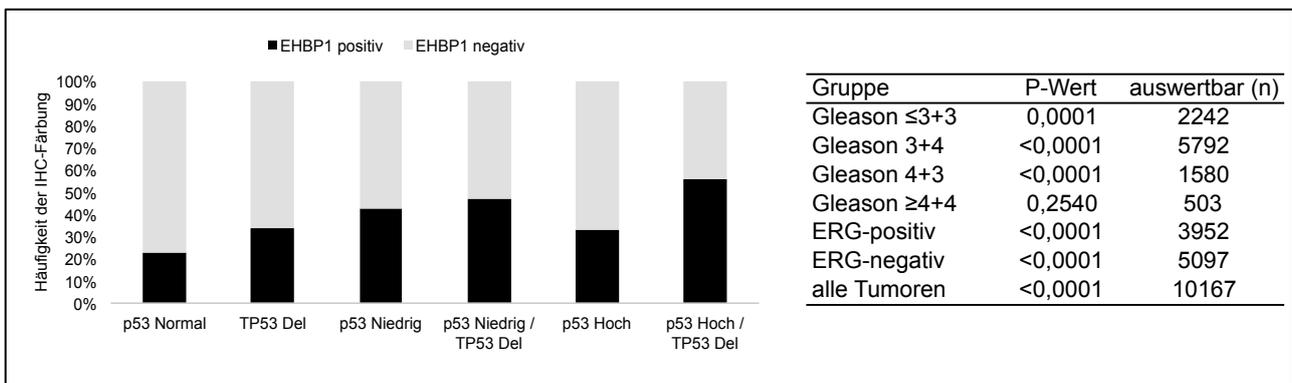
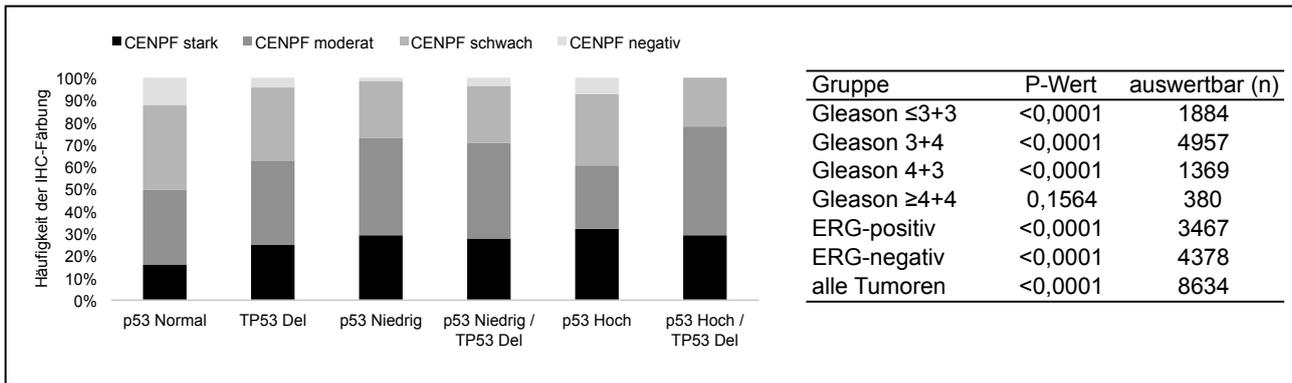
3.2.2 Assoziation des p53-Inaktivierungsstatus mit Zell-Homöostase regulatorischen Proteinen

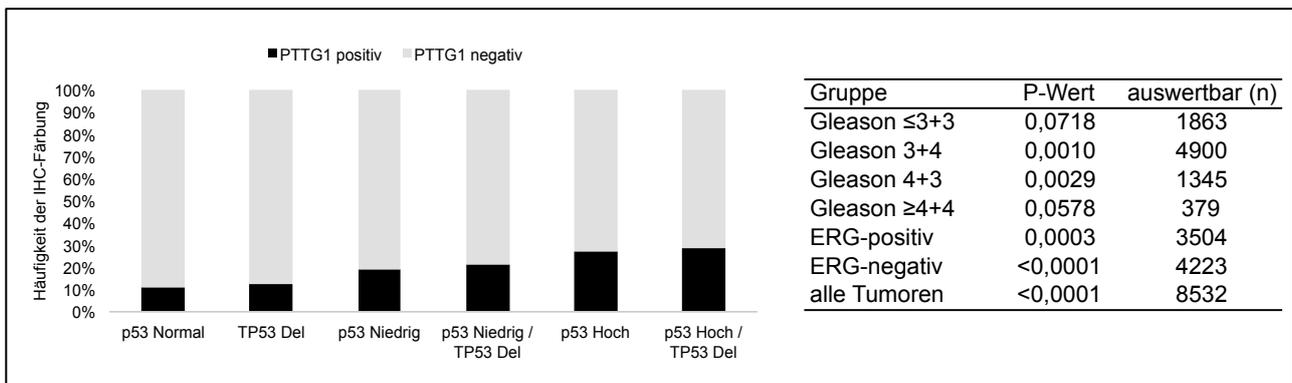
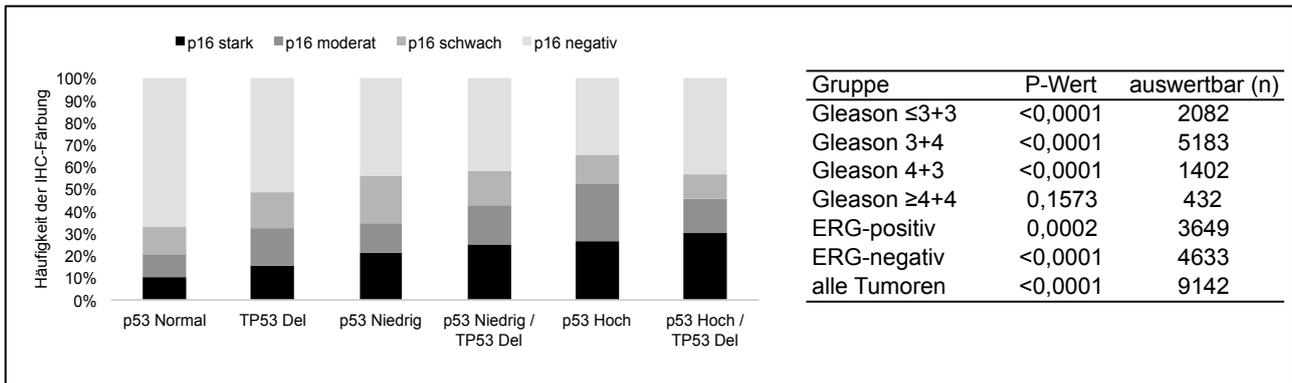
Von den 21 Proteinen, die an der Regulation der Zell-Homöostase beteiligt sind, zeigte die Expression von 7 (33,3%) Proteinen eine klare positive Assoziation zum p53-Inaktivierungsstatus. Bei diesen Proteinen stieg die Expression von vollständig funktionfähigem p53 (p53-normal) über die pathologische erhöhte p53-Expression und partielle Inaktivierung bis hin zur vollständigen p53-Inaktivierung (p53 hoch oder p53 hoch/TP53 Deletion) an. Diese Assoziation zeigte sich bei 5 (71,4%) Proteinen außerdem in den vier Untergruppen der Tumoren mit einem identischen Gleason Score und den beiden Untergruppen der ERG-positiven und ERG-negativen Tumoren. Die Expression eines Proteins (4,8%) zeigte eine inverse Assoziation zum p53-Inaktivierungsstatus. Hier nahm die Expression von einem p53-normalen Status bis hin zur vollständigen p53-Inaktivierung deutlich ab. Diese Assoziation war allerdings sowohl in den Untergruppen der Tumoren mit einem identischen Gleason Score als auch in den ERG-positiven und ERG-negativen Karzinomen nicht mehr nachweisbar. Die Expression von 13 (61,9%) Proteinen zeigte keine deutliche zum Teil aber signifikante Assoziation zum p53-Inaktivierungsstatus. Der signifikante p-Wert für einige der Assoziationen beruht vermutlich auf der hohen untersuchten Fallzahl ($n > 2.700$). Alle Ergebnisse sind in Abbildung 3 (Seite 23-28) dargestellt.

Abbildung 3: Assoziation des p53-Status mit 21 Zell-Homöostase regulatorischen. p53 normal: keine p53 Färbung und normaler TP53 Kopiezahlstatus, TP53 Del (Deletion): keine p53 Färbung und Verlust einer TP53 Kopie, p53 niedrig: schwache bis moderate p53 Färbung und normaler TP53 Kopiezahlstatus; p53 niedrig/TP53 Del (Deletion): schwache bis moderate p53 Färbung und Verlust einer TP53 Kopie, p53 hoch: starke p53 Färbung und normaler TP53 Kopiezahlstatus und p53 hoch/TP53 Del (Deletion): starke p53 Färbung und Verlust einer TP53 Kopie. In den Tabellen ist der Zusammenhang auch für Untergruppen mit identischem Gleason Score oder ERG-Status angegeben. Abbildung geht von Seite 23-28.

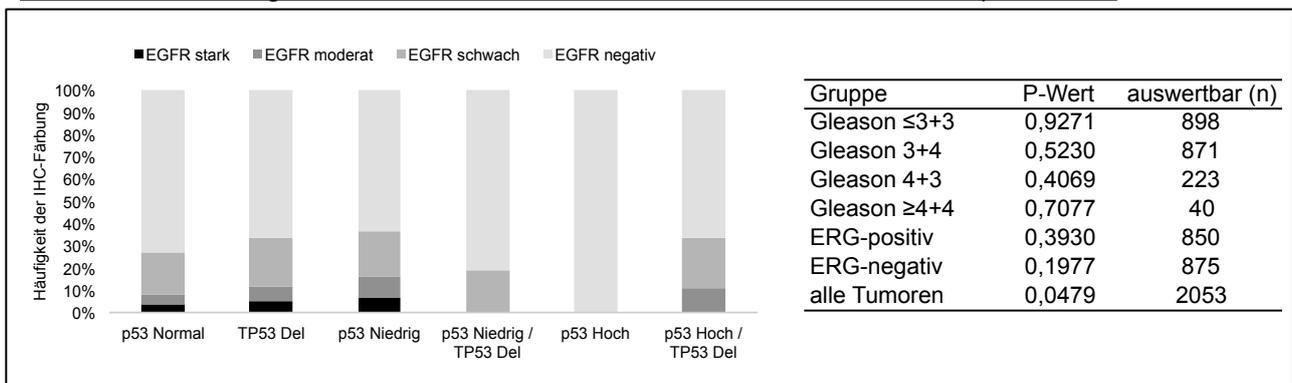
Zell-Homöostase regulatorische Proteine mit einer positiven Assoziation zum p53-Status



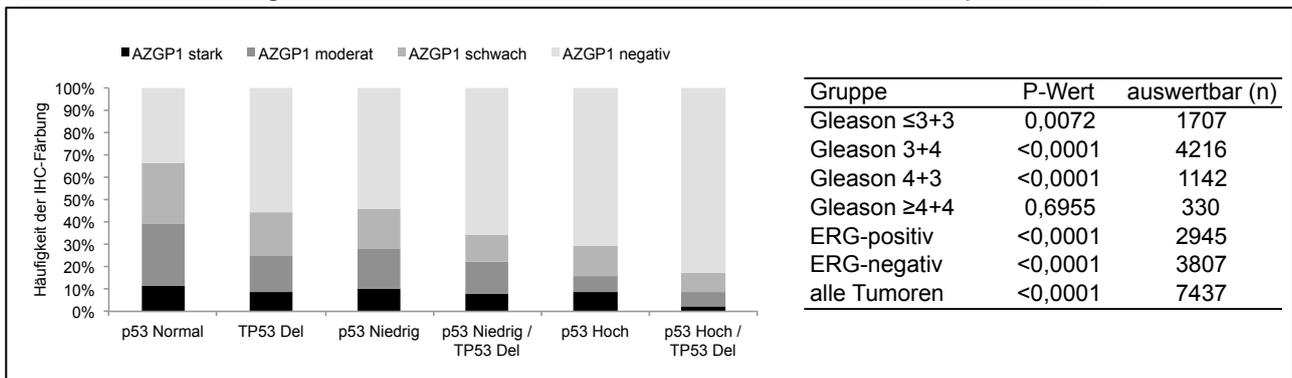


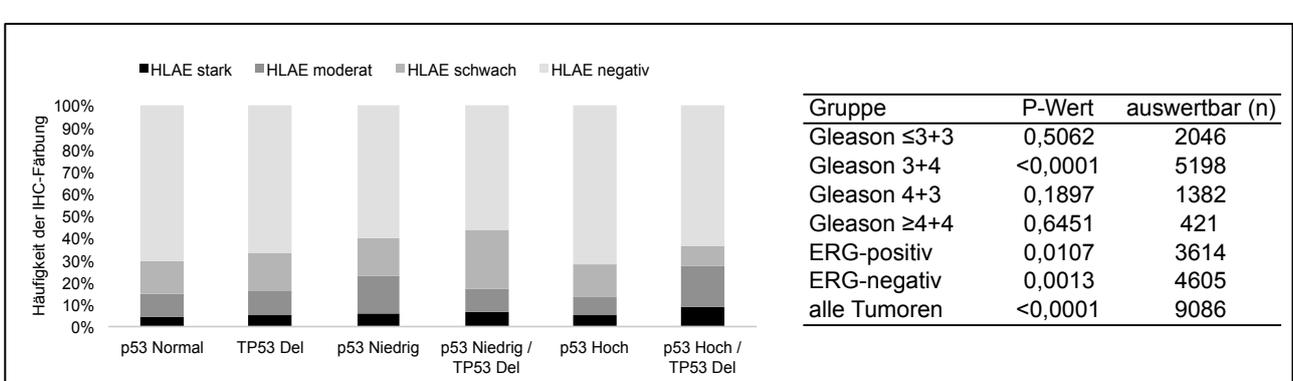
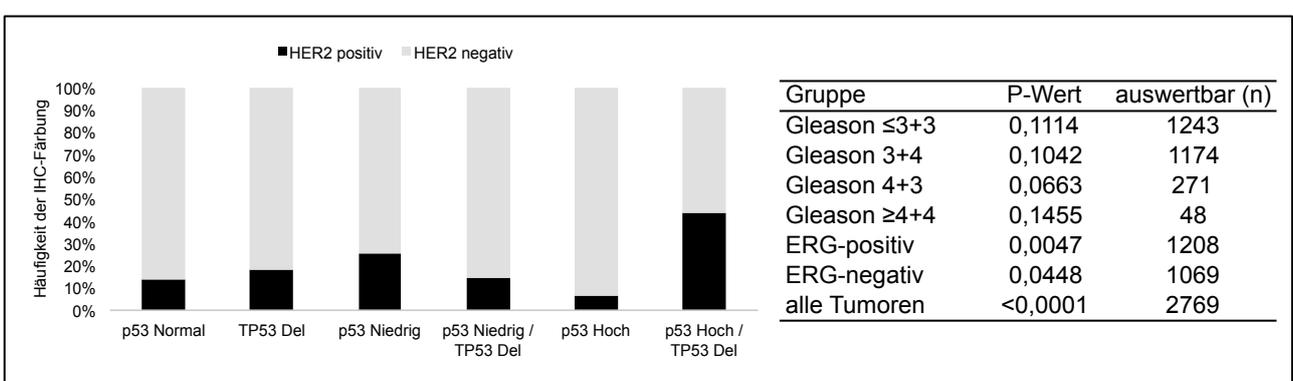
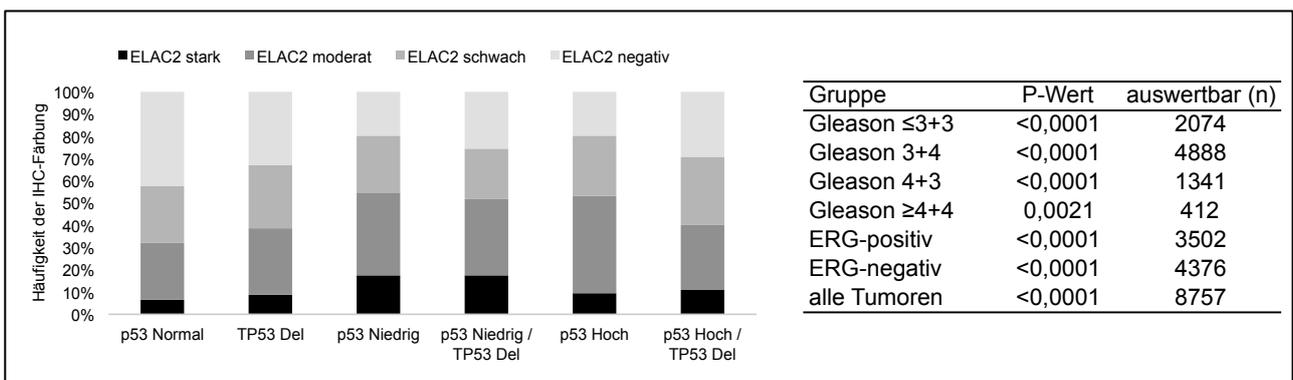
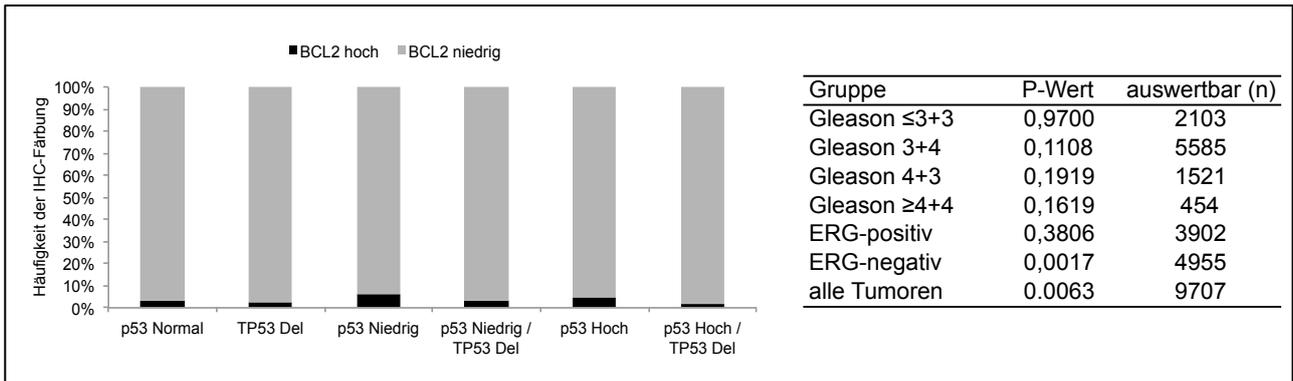


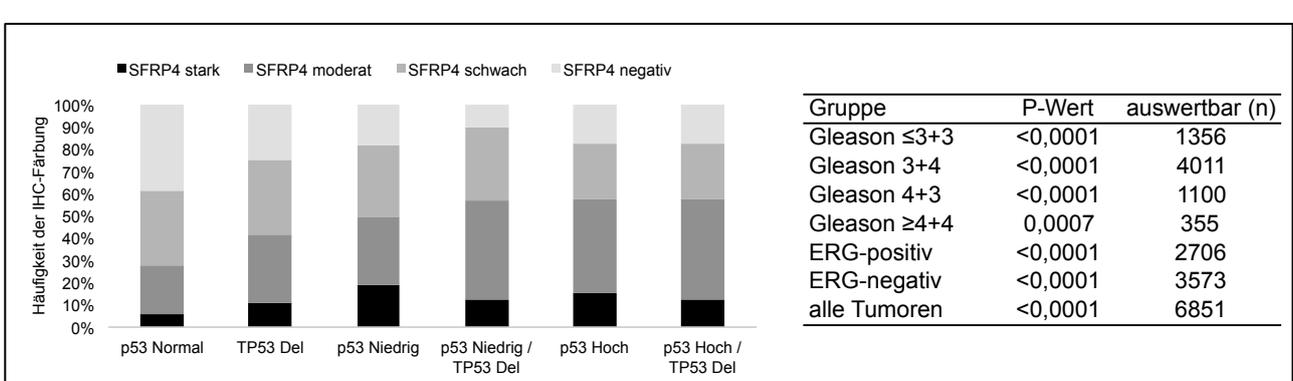
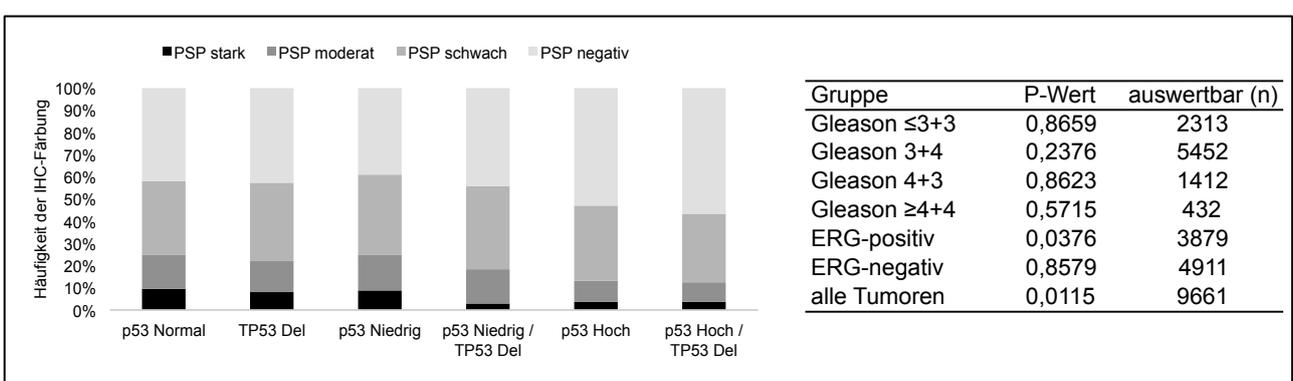
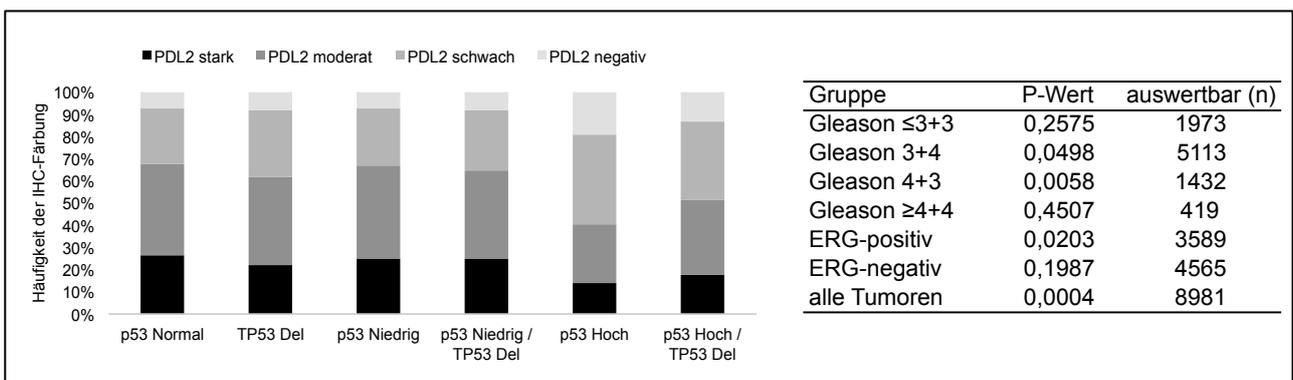
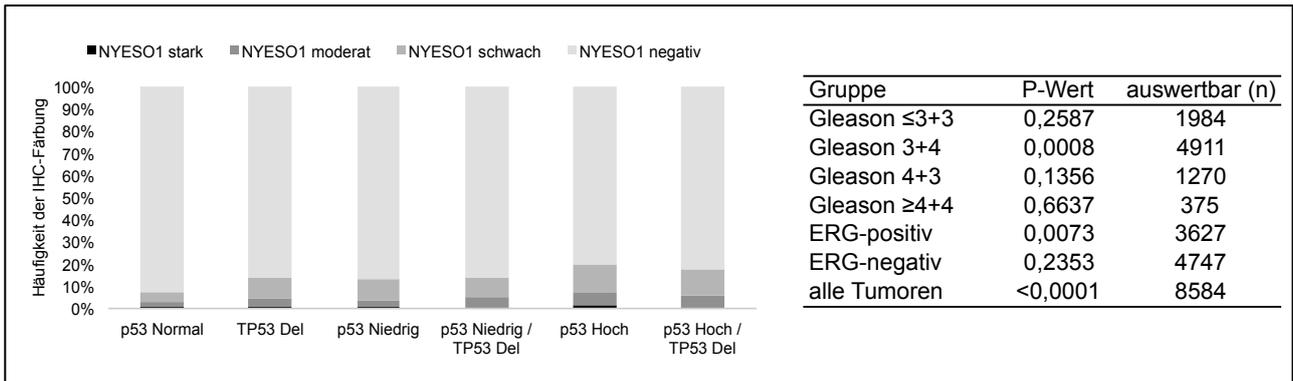
Zell-Homöostase regulatorische Proteine mit einer inversen Assoziation zum p53-Status

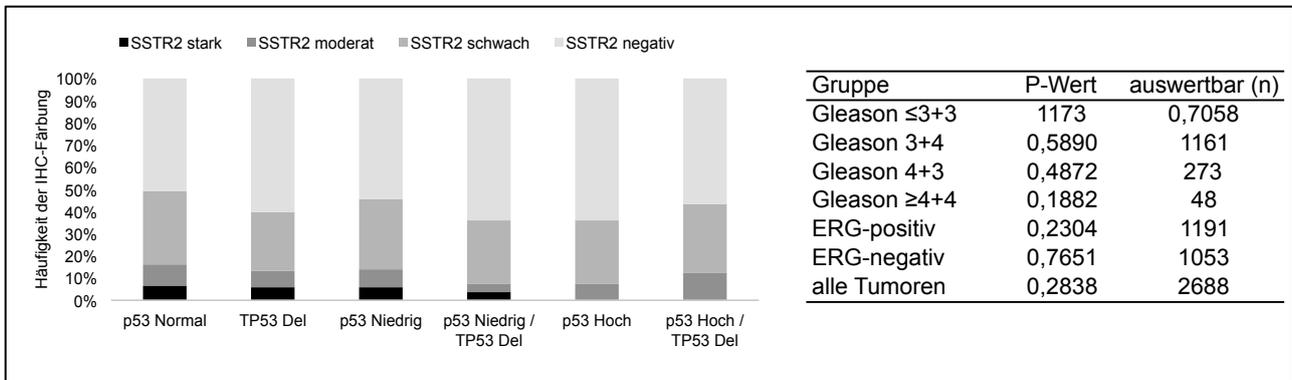
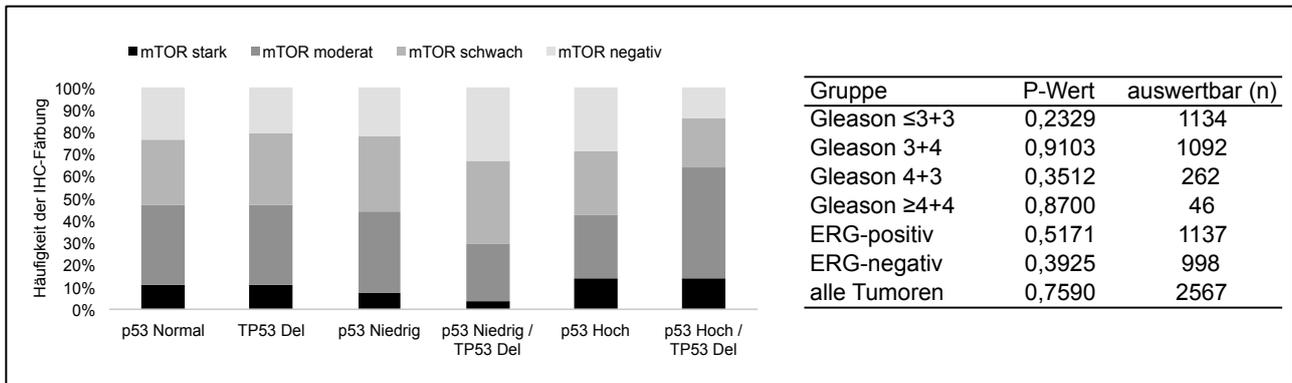
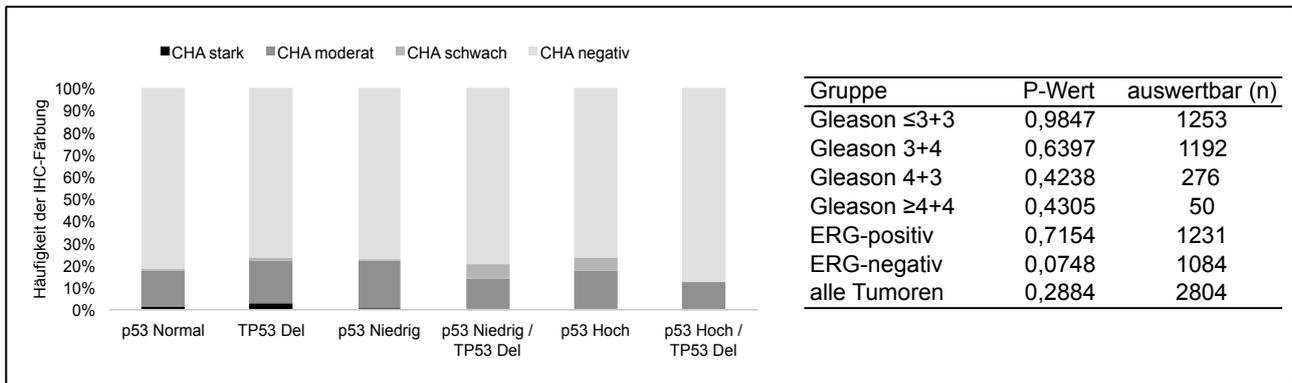
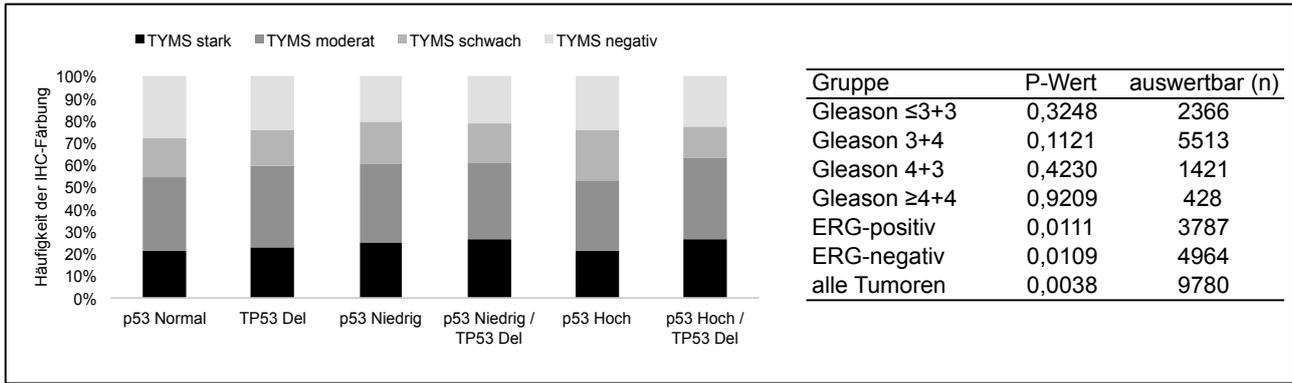


Zell-Homöostase regulatorische Proteine mit keiner klaren Assoziation zum p53-Status







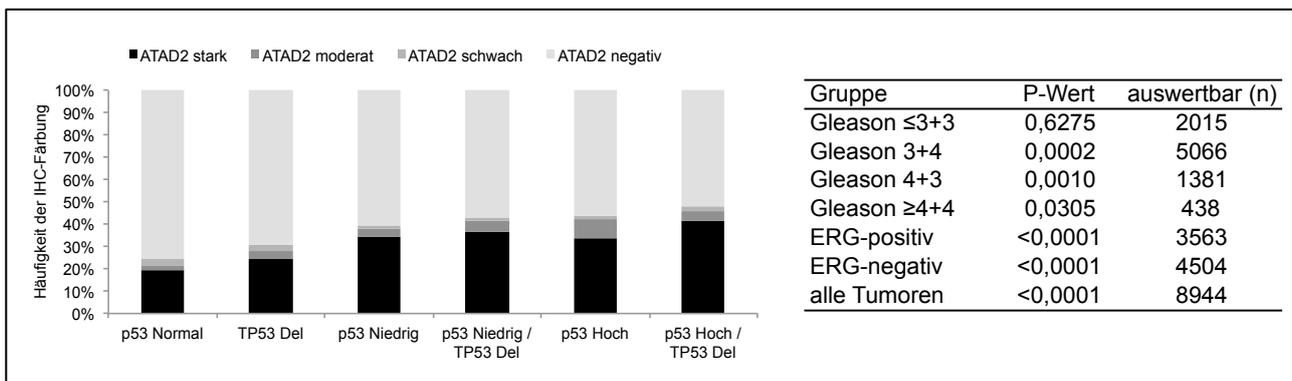
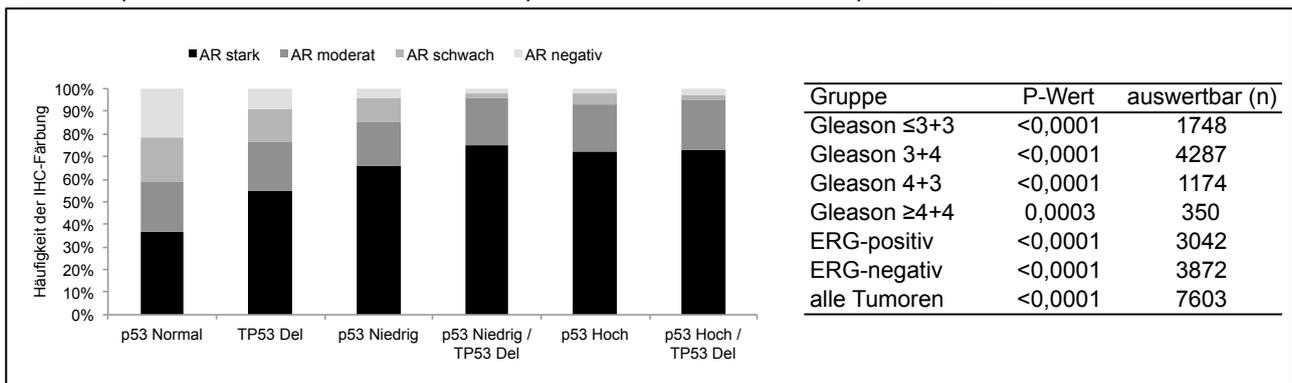


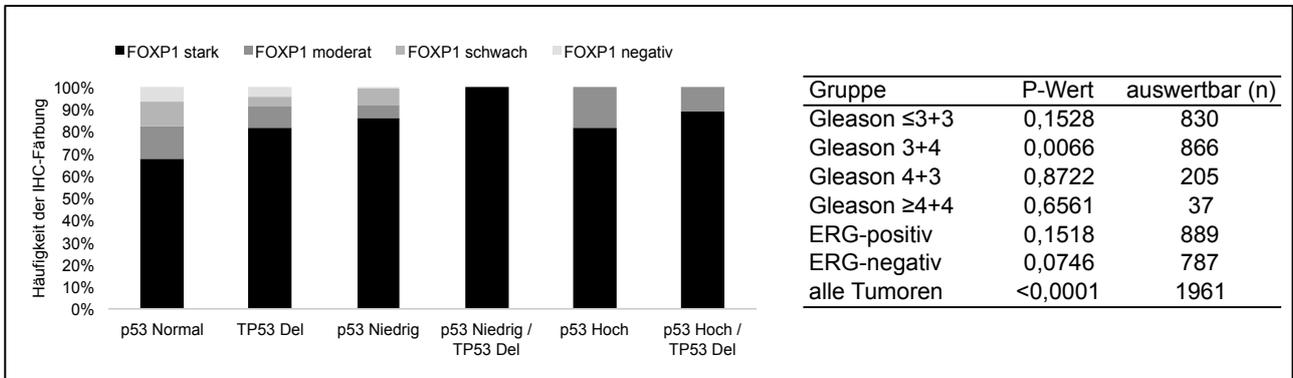
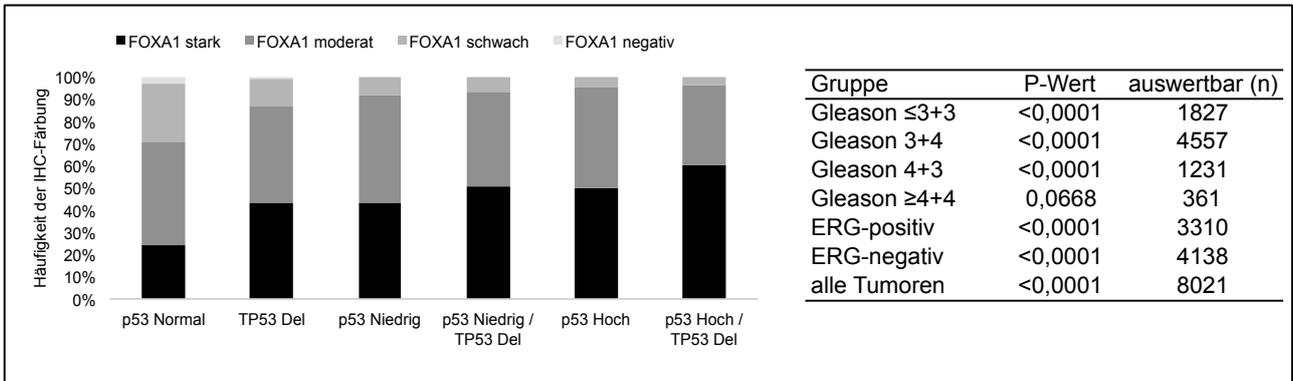
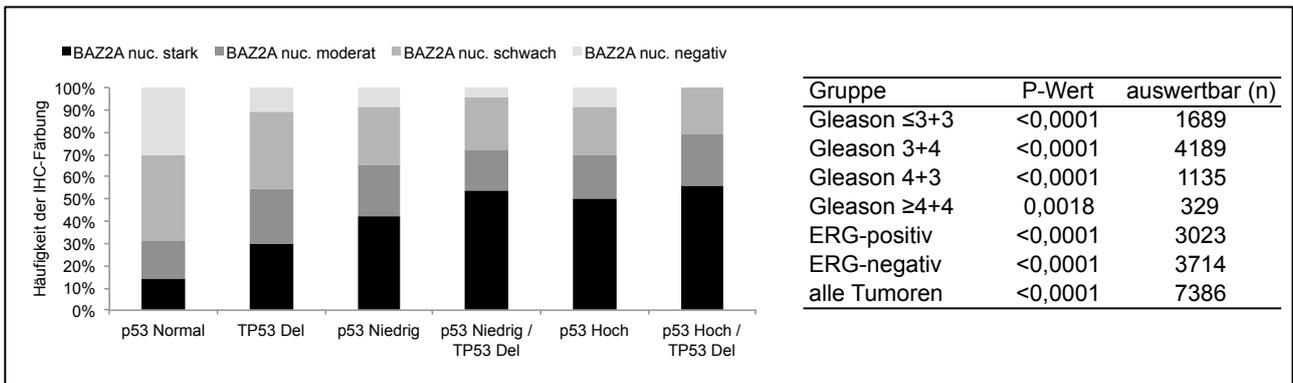
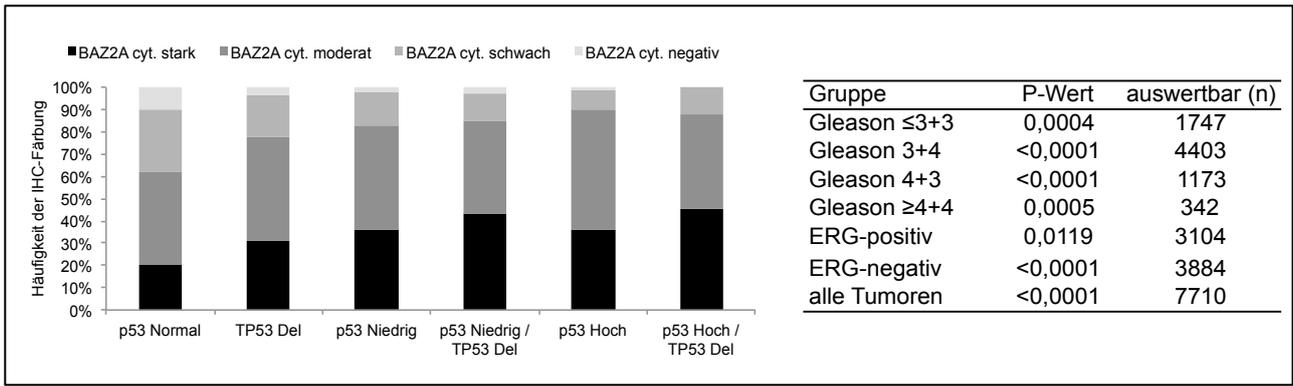
3.2.3 Assoziation des p53-Inaktivierungsstatus mit Transkriptionskontroll-Proteinen

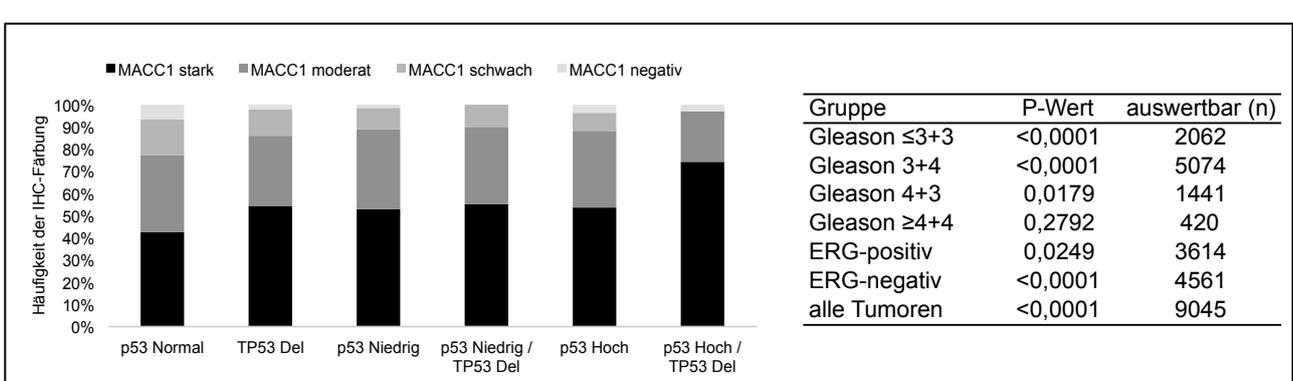
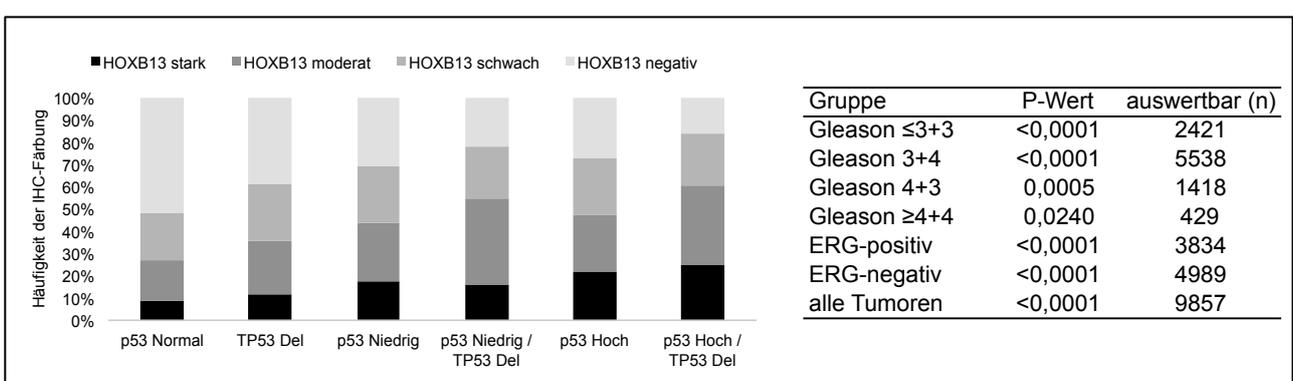
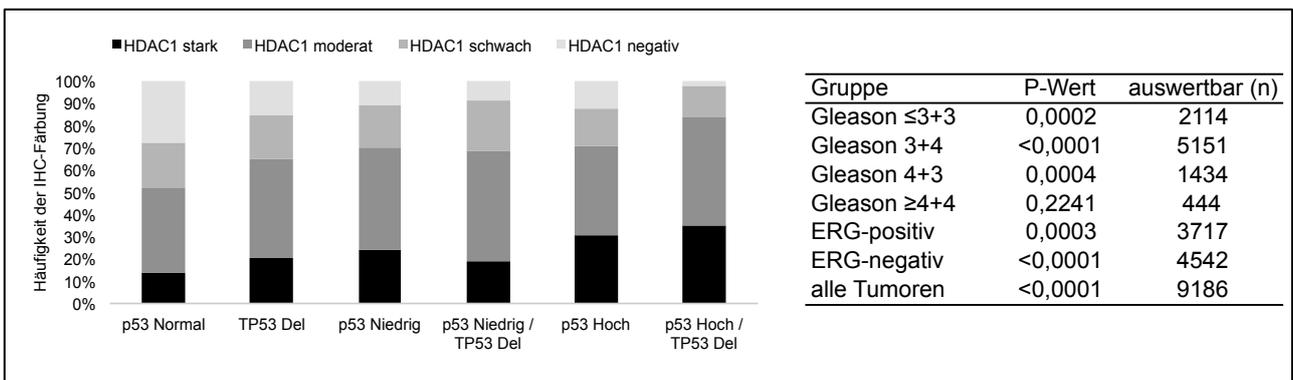
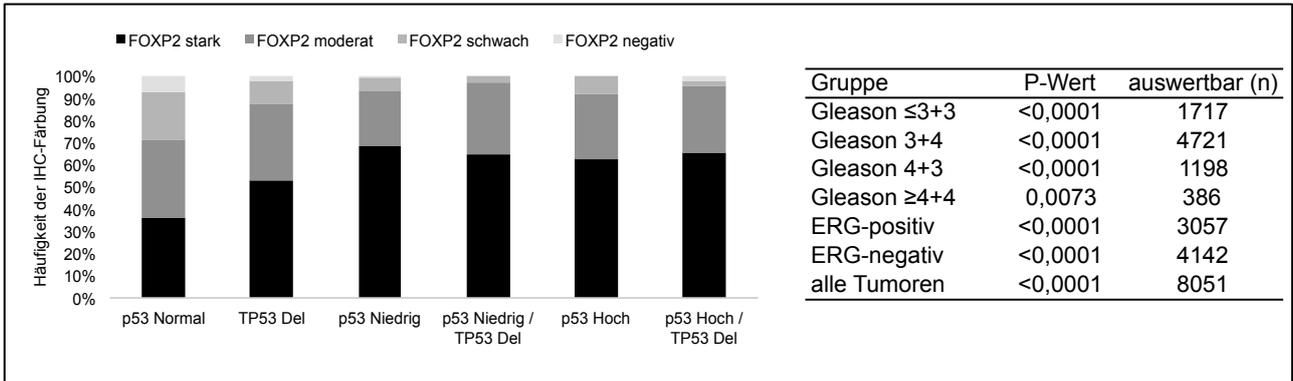
Von den 19 Proteinen, die an der transkriptionellen Kontrolle beteiligt sind, zeigte die Expression von 12 (63,2%) Proteinen eine klare positive Assoziation zum p53-Inaktivierungsstatus. Bei diesen Proteinen stieg die Expression von vollständig funktionsfähigem p53 (p53-normal) über die pathologische erhöhte p53-Expression und partielle Inaktivierung bis hin zur vollständigen p53-Inaktivierung (p53 hoch oder p53 hoch/TP53 Deletion) an. Diese Assoziation war für 10 (83,3%) der 12 Proteine außerdem sowohl in den vier Untergruppen der Tumoren mit einem identischen Gleason Score als auch den Untergruppen der ERG-negativen und ERG-positiven Karzinomen vorhanden. Die Expression von 7 (36,8%) Proteinen zeigte keine deutliche Assoziation zum p53-Inaktivierungsstatus. Der signifikante p-Wert für diese Assoziationen beruht vermutlich auf der hohen untersuchten Fallzahl (n>6.300). Alle Ergebnisse sind in Abbildung 4 (Seite 29-34) dargestellt.

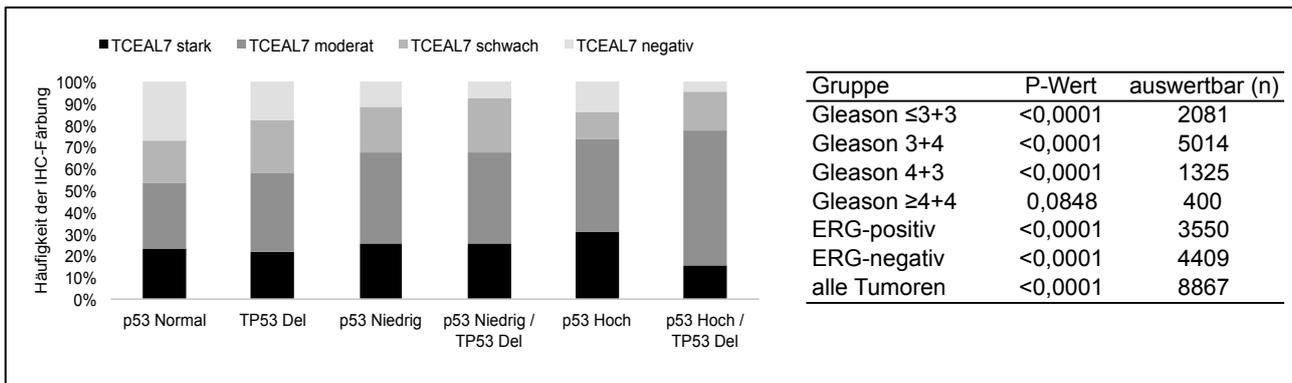
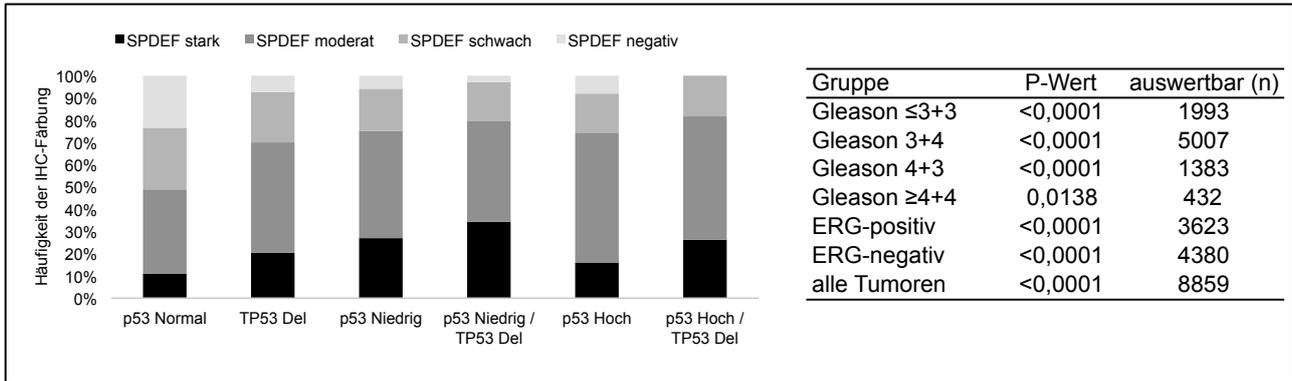
Abbildung 4: Assoziation des p53-Status mit 19 Transkriptionskontroll-Proteinen. p53 normal: keine p53 Färbung und normaler TP53 Kopiezahlsstatus, TP53 Del (Deletion): keine p53 Färbung und Verlust einer TP53 Kopie, p53 niedrig: schwache bis moderate p53 Färbung und normaler TP53 Kopiezahlsstatus; p53 niedrig/TP53 Del (Deletion): schwache bis moderate p53 Färbung und Verlust einer TP53 Kopie, p53 hoch: starke p53 Färbung und normaler TP53 Kopiezahlsstatus und p53 hoch/TP53 Del (Deletion): starke p53 Färbung und Verlust einer TP53 Kopie. In den Tabellen ist der Zusammenhang auch für Untergruppen mit identischem Gleason Score oder ERG-Status angegeben. Abbildung geht von Seite 29-34.

Transkriptionskontroll-Proteine mit einer positiven Assoziation zum p53-Status

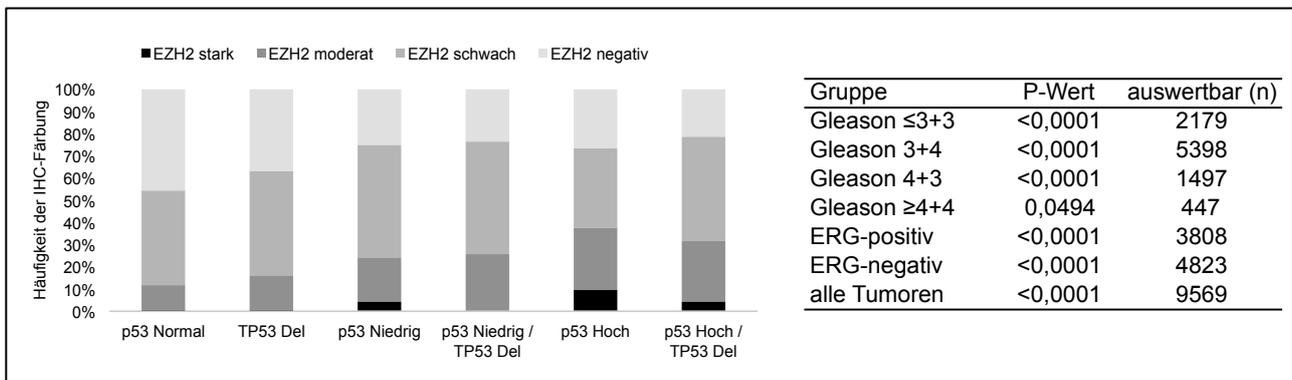
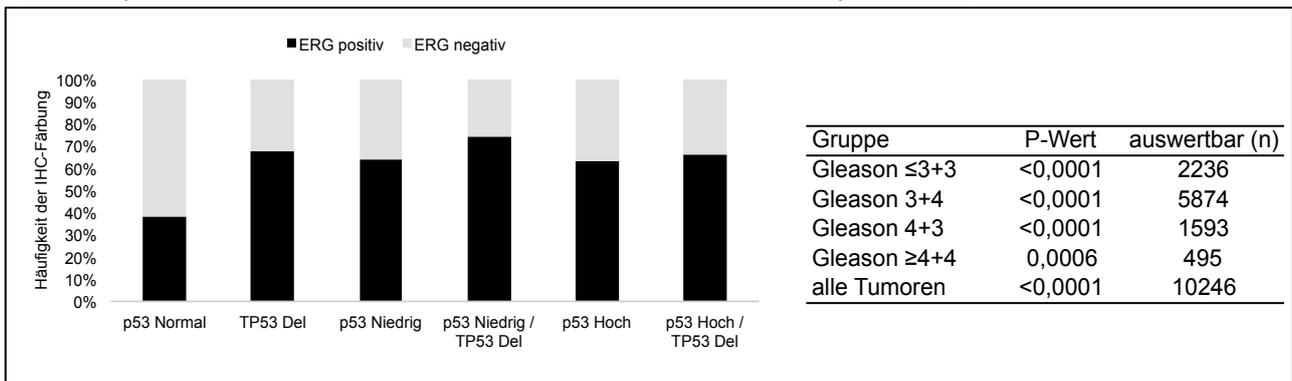


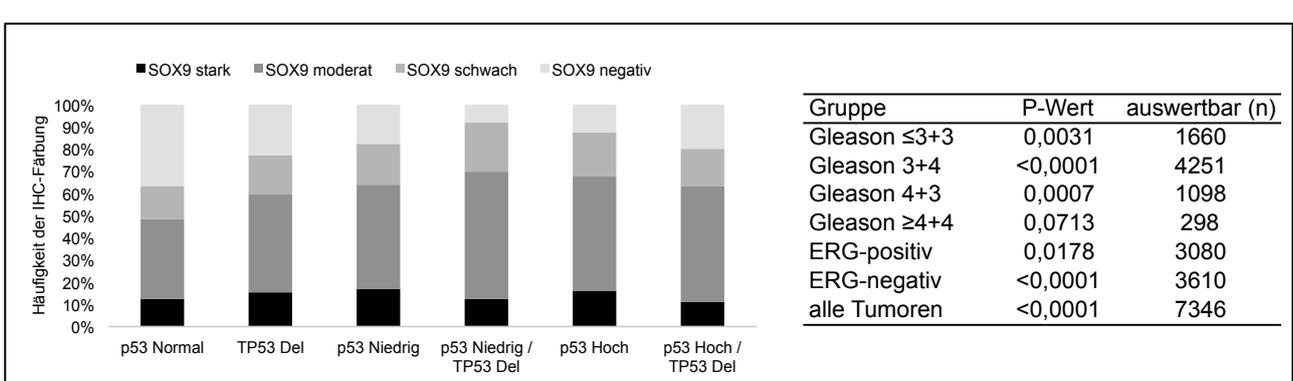
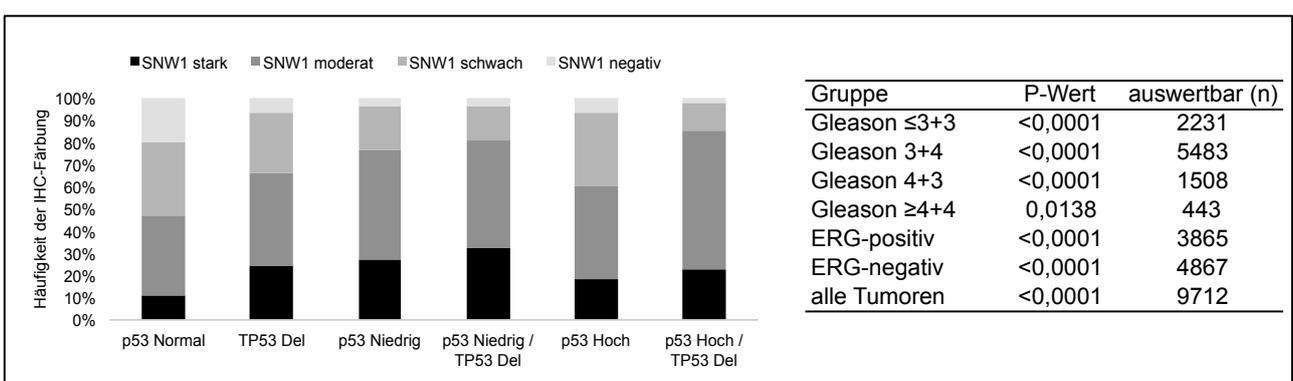
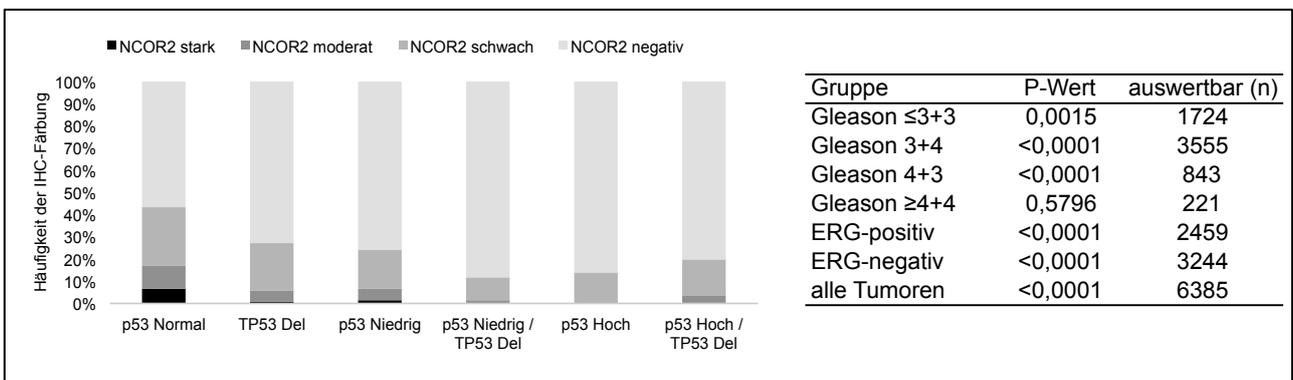
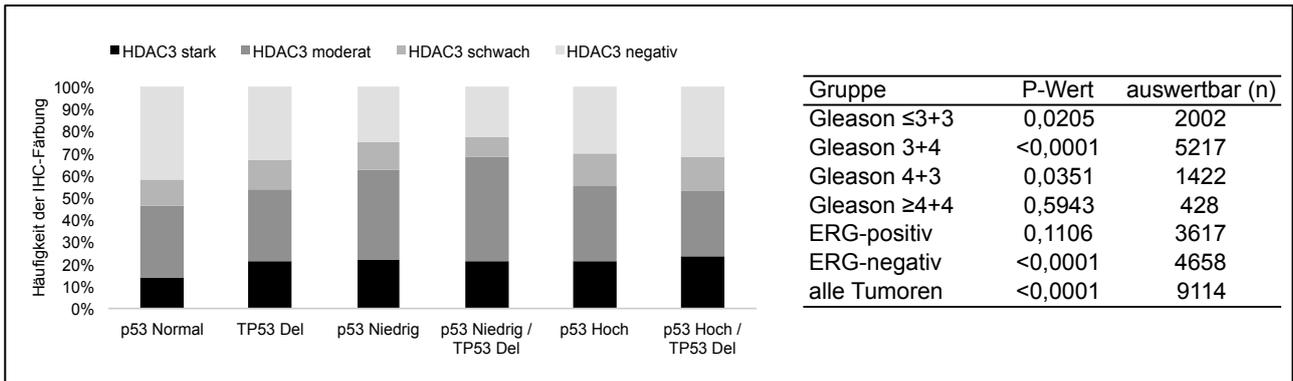


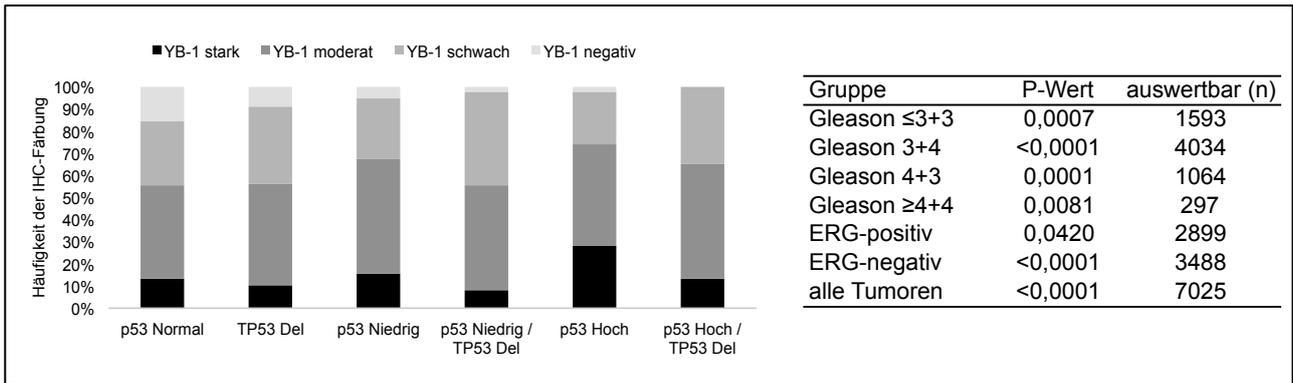




Transkriptionskontroll-Proteine mit keiner klaren Assoziation zum p53-Status





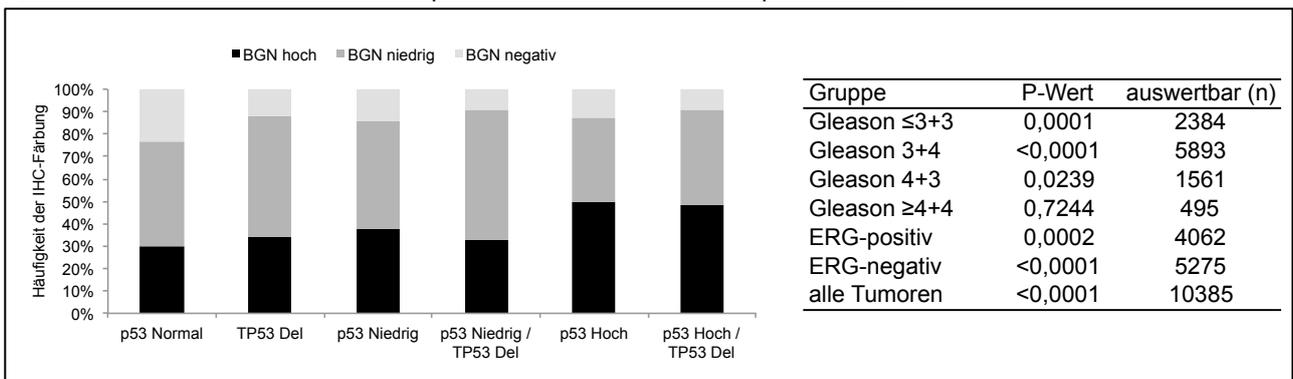


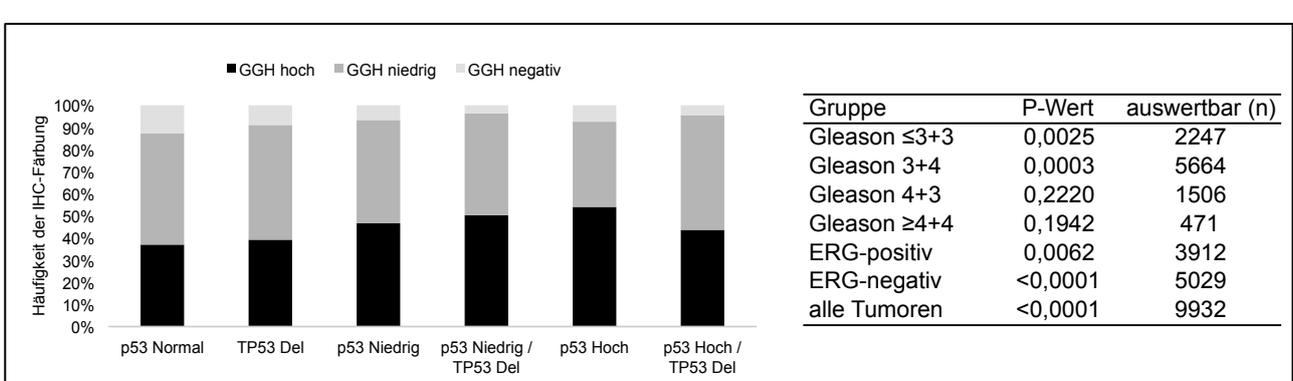
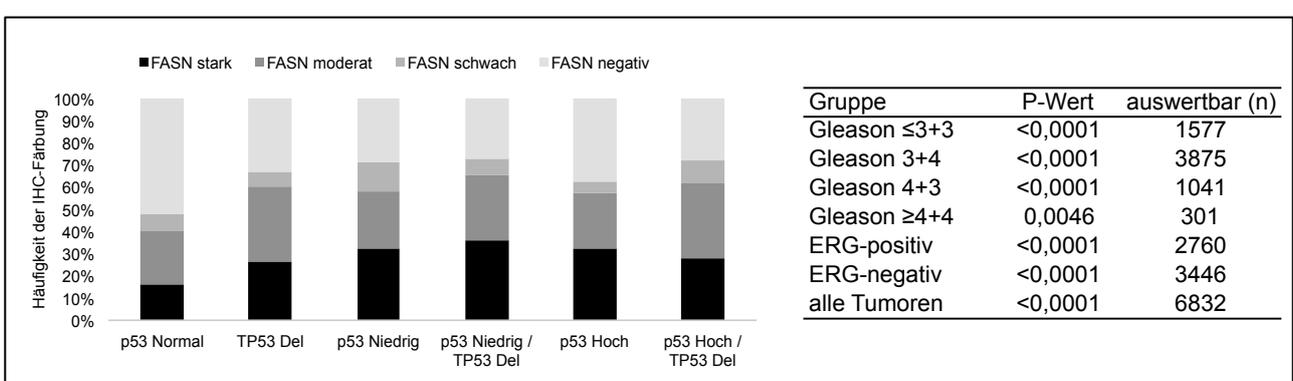
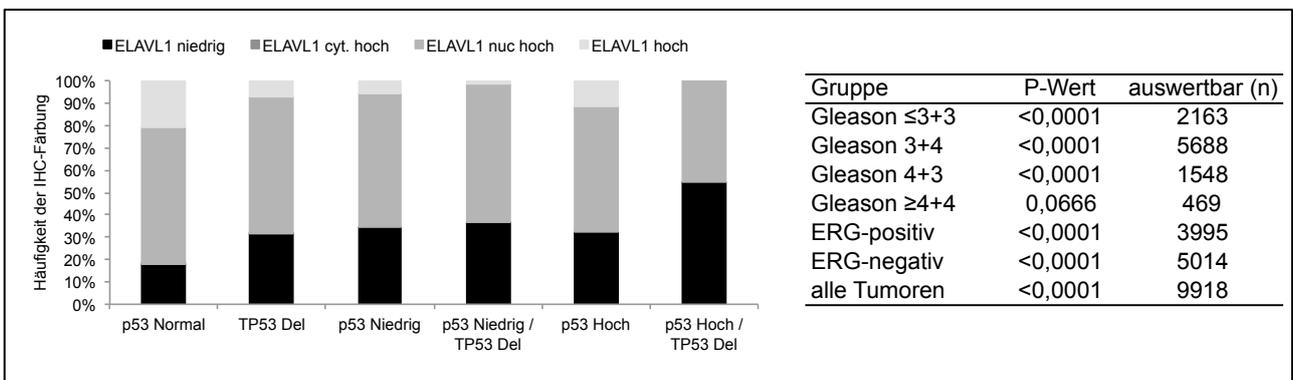
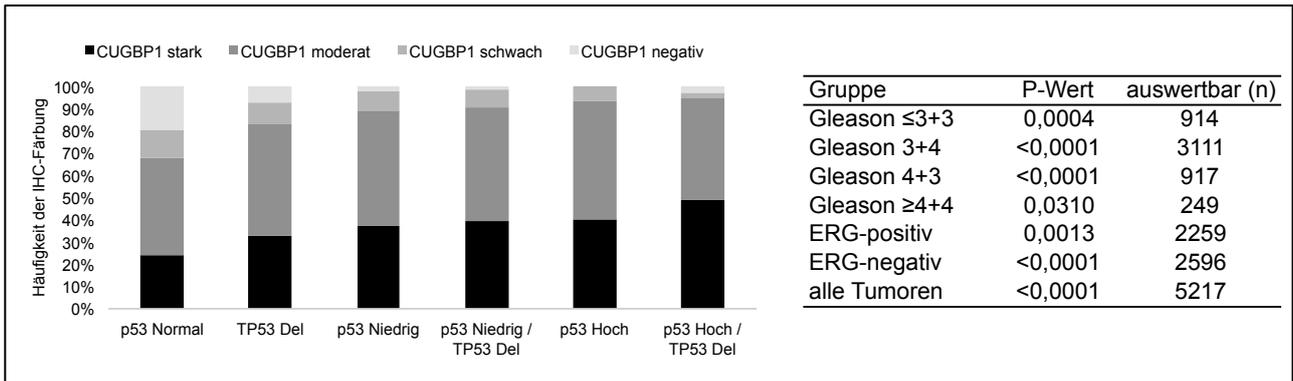
3.2.4 Assoziation des p53-Inaktivierungsstatus mit Metabolismus-Proteinen

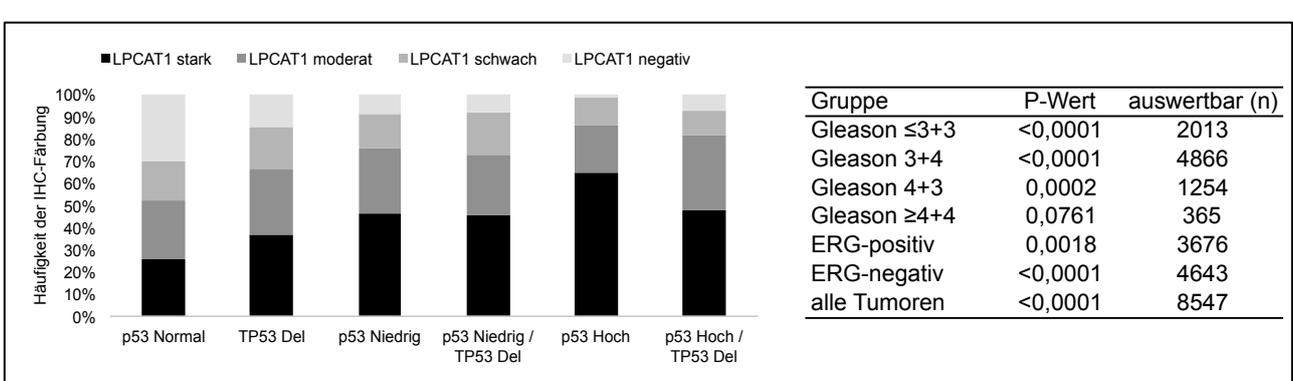
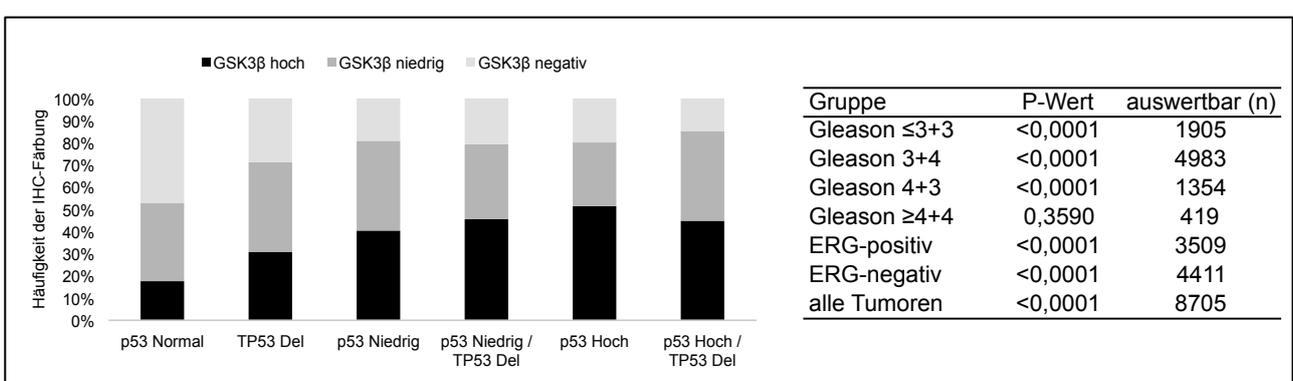
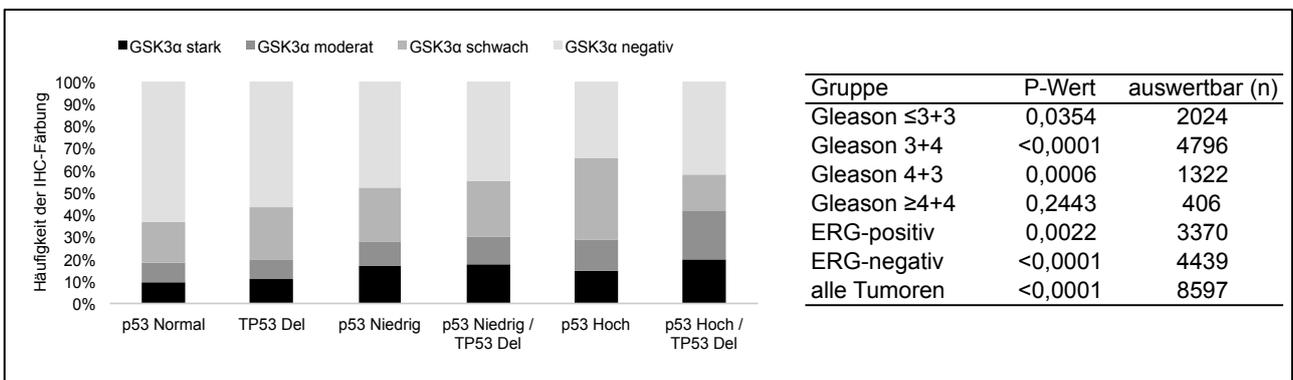
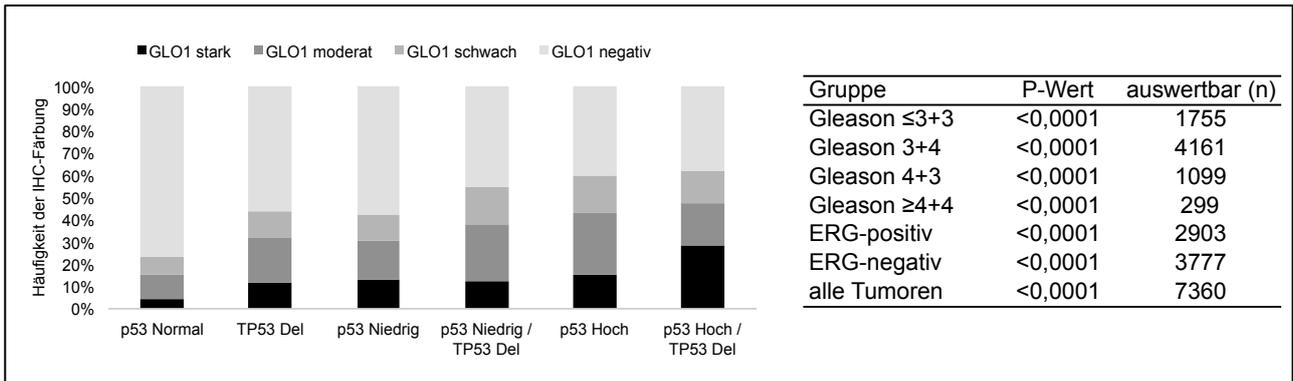
Von den 22 Proteinen, die im Metabolismus der Zelle eine Rolle spielen, zeigte die Expression von 13 (59,1%) Proteinen eine klare positive Assoziation zum p53-Inaktivierungsstatus. Bei diesen Proteinen stieg die Expression von vollständig funktionsfähigem p53 (p53-normal) über die pathologische erhöhte p53-Expression und partielle Inaktivierung bis hin zur vollständigen p53-Inaktivierung (p53 hoch oder p53 hoch/TP53 Deletion) deutlich an. Diese Assoziation war für 10 (76,9%) Proteine außerdem sowohl in den vier Untergruppen der Tumoren mit einem identischen Gleason Score als auch den Untergruppen der ERG-negativen und ERG-positiven Karzinome vorhanden. Die Expression von 9 (40,9%) Proteinen zeigte keine deutliche Assoziation zum p53-Inaktivierungsstatus. Der teilweise signifikante p-Wert beruht vermutlich auf der hohen untersuchten Fallzahl ($n \geq 1.500$). Alle Ergebnisse sind in Abbildung 5 (Seite 34-40) dargestellt.

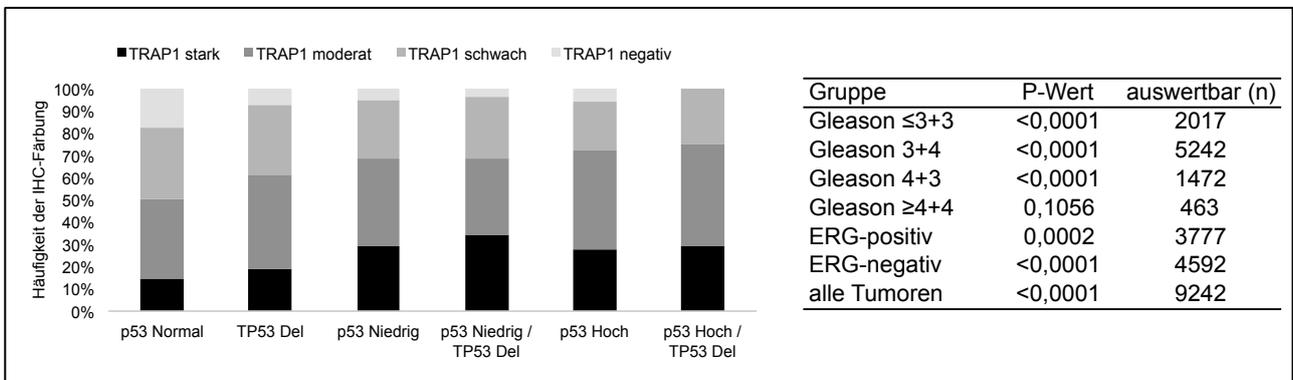
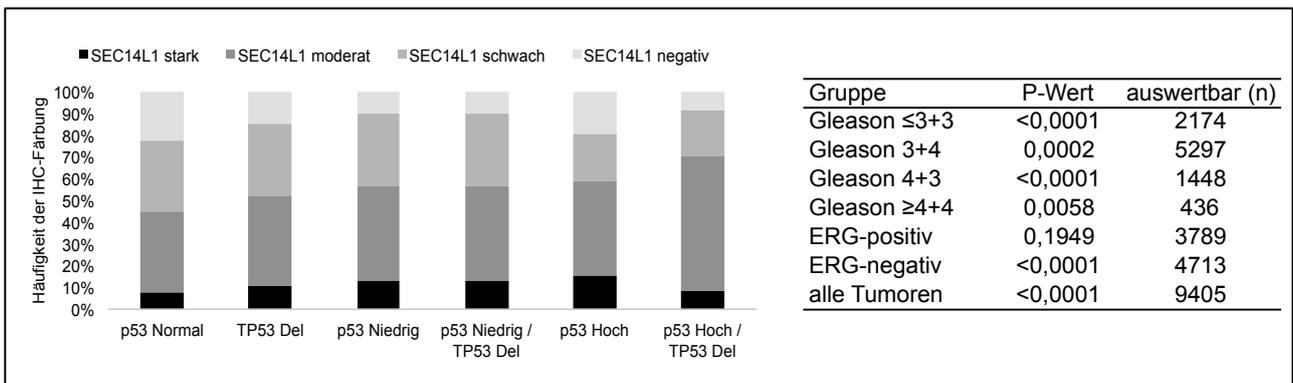
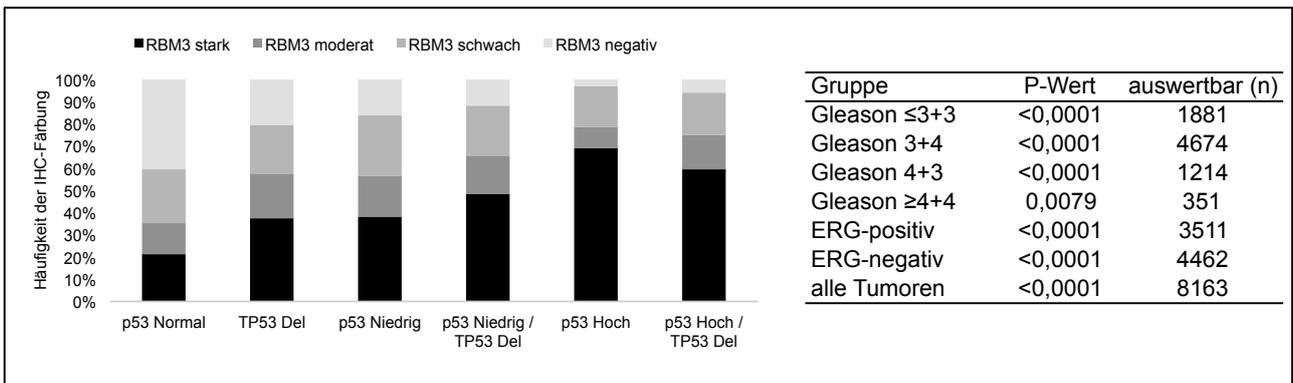
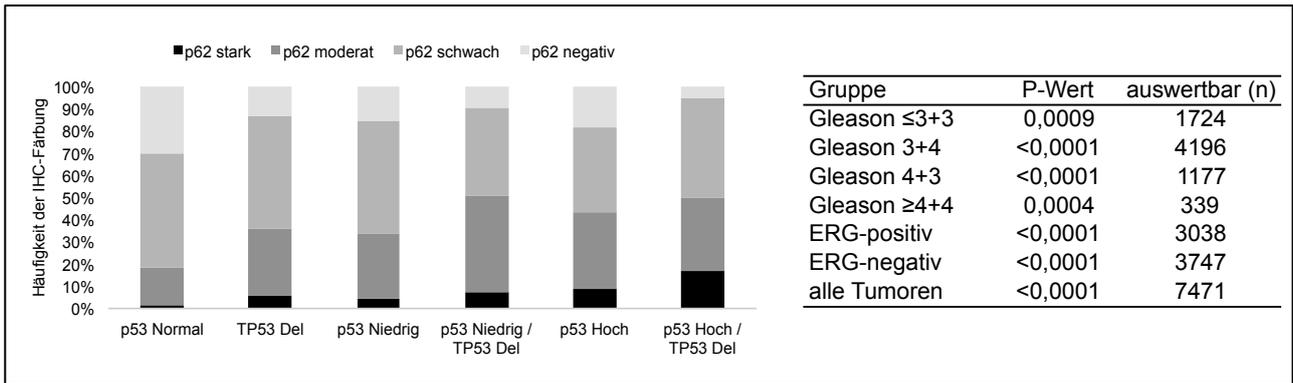
Abbildung 5: Assoziation des p53-Status mit 22 Metabolismus-Proteinen. p53 normal: keine p53 Färbung und normaler TP53 Kopiezahlstatus, TP53 Del (Deletion): keine p53 Färbung und Verlust einer TP53 Kopie, p53 niedrig: schwache bis moderate p53 Färbung und normaler TP53 Kopiezahlstatus; p53 niedrig/TP53 Del (Deletion): schwache bis moderate p53 Färbung und Verlust einer TP53 Kopie, p53 hoch: starke p53 Färbung und normaler TP53 Kopiezahlstatus und p53 hoch/TP53 Del (Deletion): starke p53 Färbung und Verlust einer TP53 Kopie. In den Tabellen ist der Zusammenhang auch für Untergruppen mit identischem Gleason Score oder ERG-Status angegeben. Abbildung geht von Seite 34-40.

Metabolismus-Proteine mit einer positiven Assoziation zum p53-Status

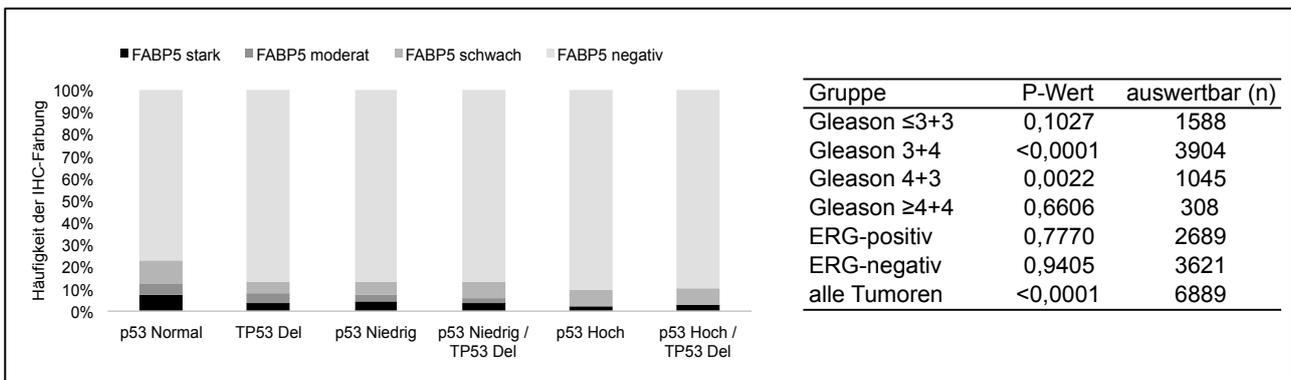
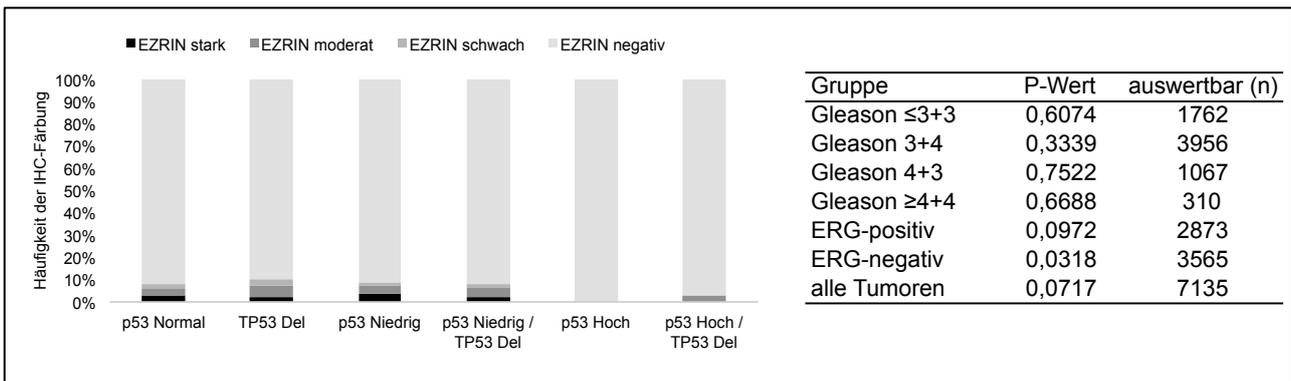
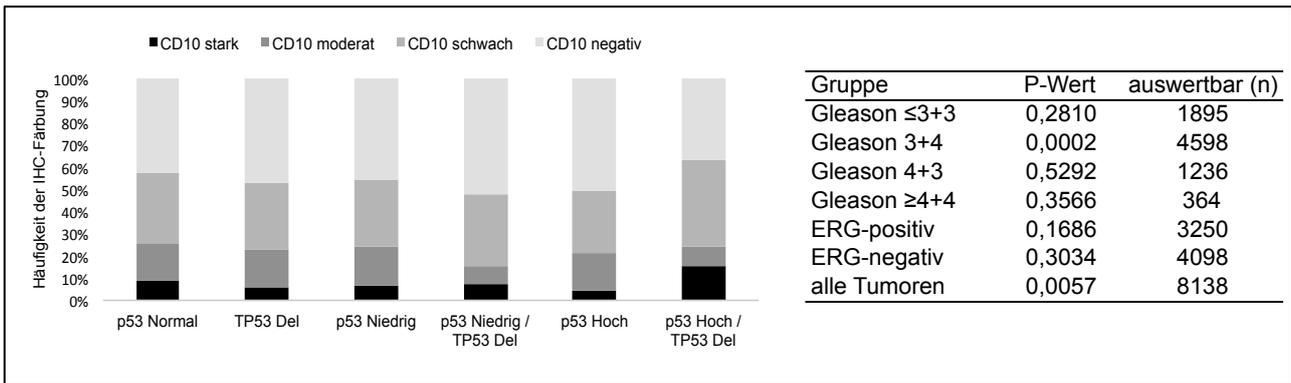
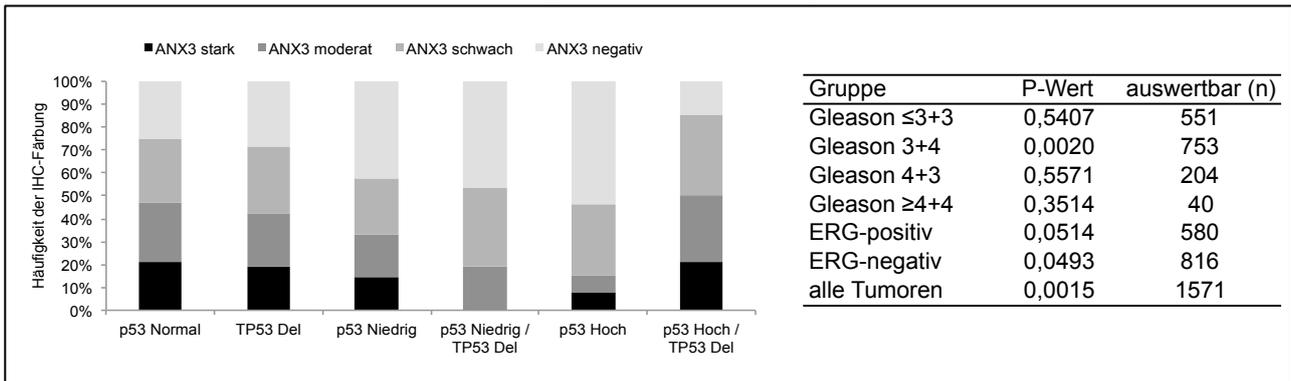


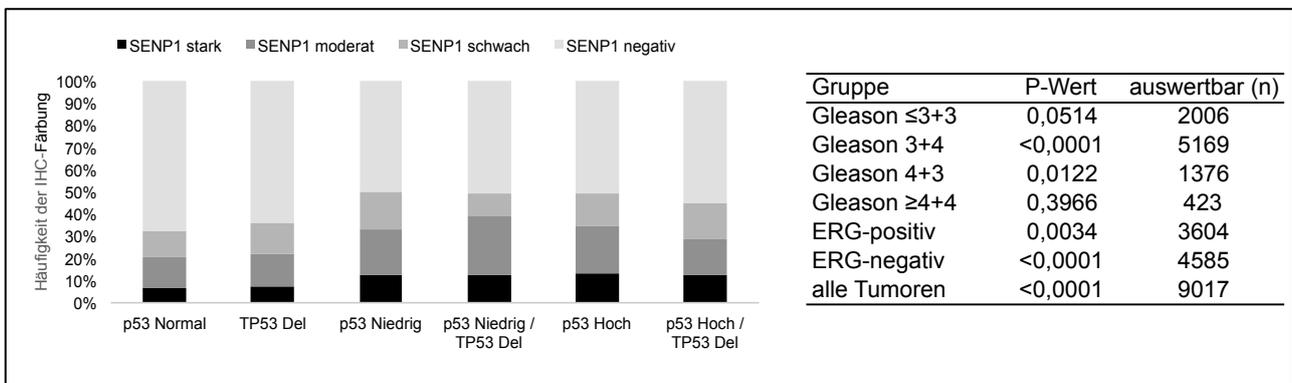
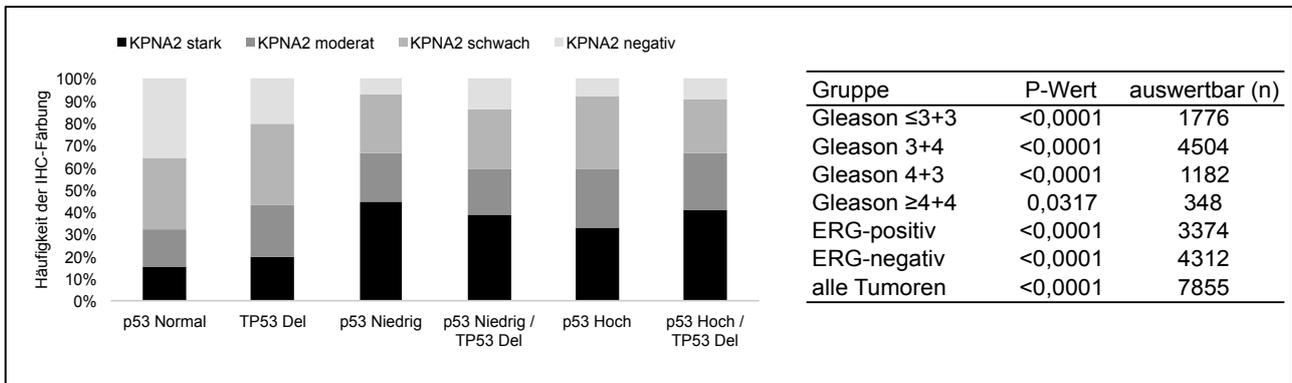
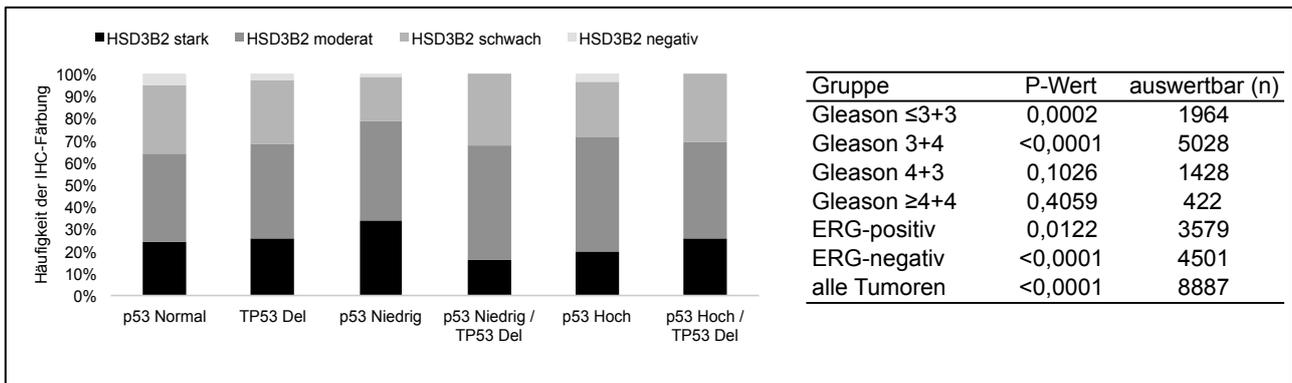
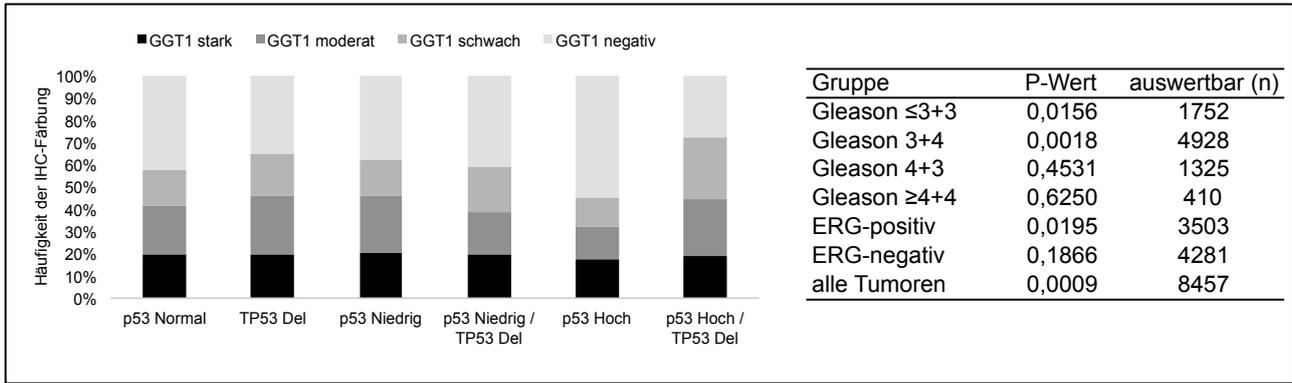


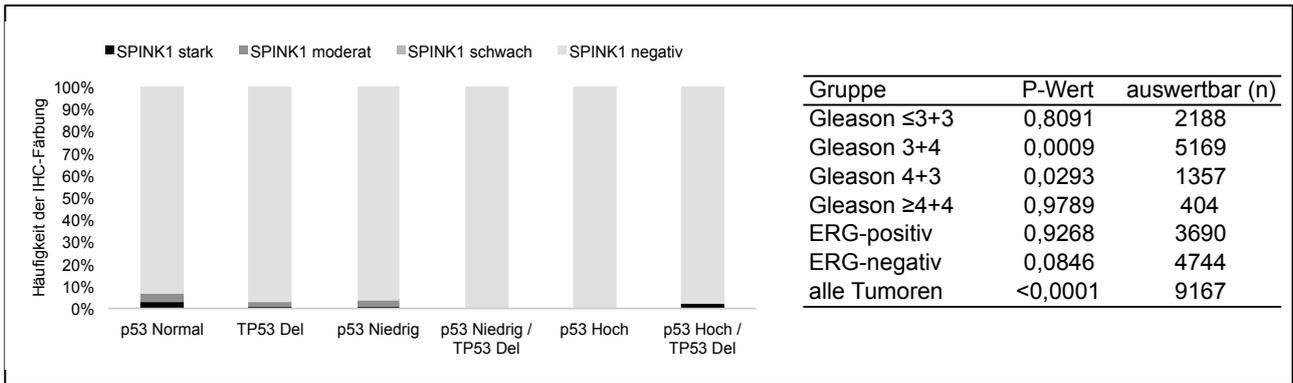




Metabolismus-Proteine mit keiner eindeutigen Assoziation zum p53-Status





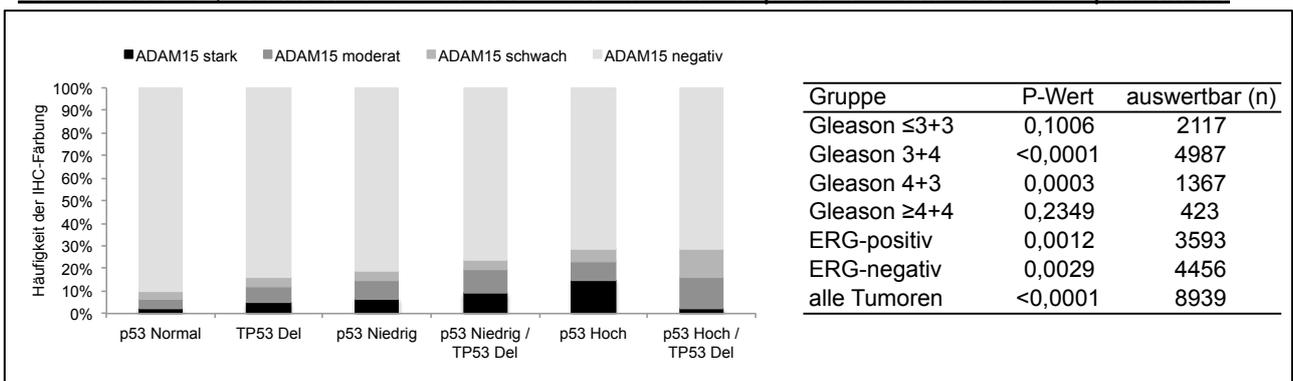


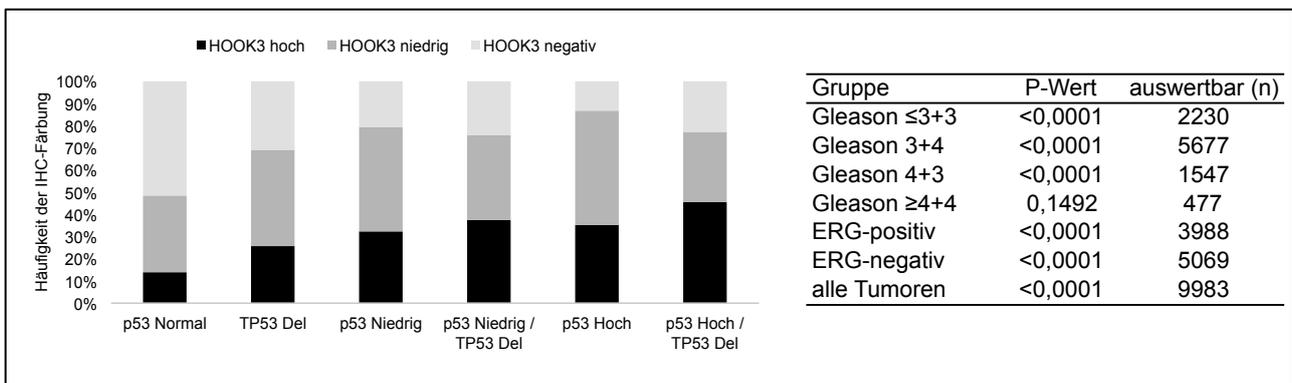
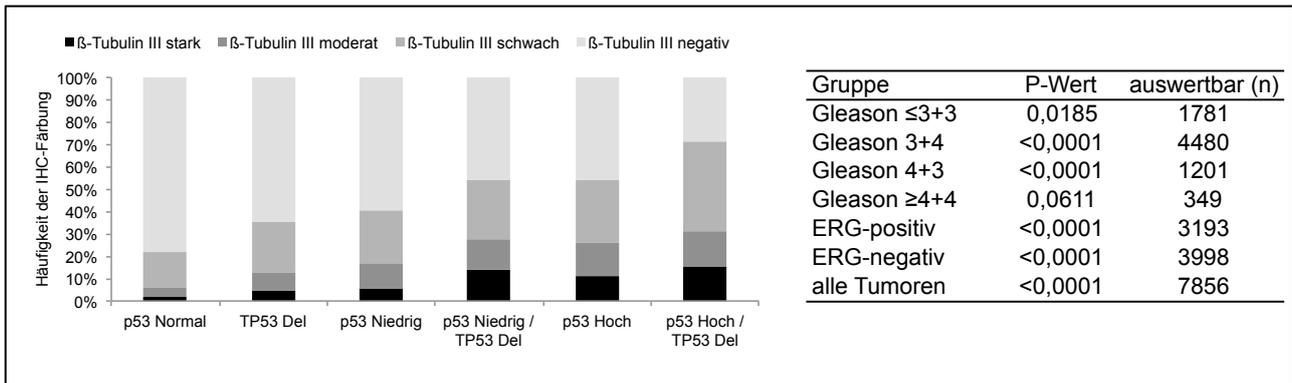
3.2.5 Assoziation des p53-Inaktivierungsstatus mit Zell-Adhäsions-, -Gestalts- und Motilitäts- Proteinen

Von den 11 Proteinen, die bei der Zell-Adhäsion, der Zell-Gestalt und/oder der Zell-Motilität eine Funktion übernehmen, zeigte die Expression von 3 (27,3%) Proteinen eine klare positive Assoziation zum p53-Inaktivierungsstatus. Bei diesen Proteinen stieg die Expression von vollständig funktionsfähigem p53 (p53-normal) über die pathologische erhöhte p53-Expression und partielle Inaktivierung bis hin zur vollständigen p53-Inaktivierung (p53 hoch oder p53 hoch/TP53 Deletion) deutlich an. Diese Assoziation war für 2 (66,7%) Proteine außerdem sowohl in den vier Untergruppen der Tumoren mit einem identischen Gleason Score als auch den beiden Untergruppen der ERG-negativen und ERG-positiven Tumoren vorhanden. Die Expression von 8 (72,7%) Proteinen zeigte keine deutliche Assoziation zum p53-Inaktivierungsstatus. Der teilweise signifikante p-Wert beruht vermutlich auf der hohen untersuchten Fallzahl ($n \geq 8.000$). Alle Ergebnisse sind in Abbildung 6 (Seite 40-43) dargestellt.

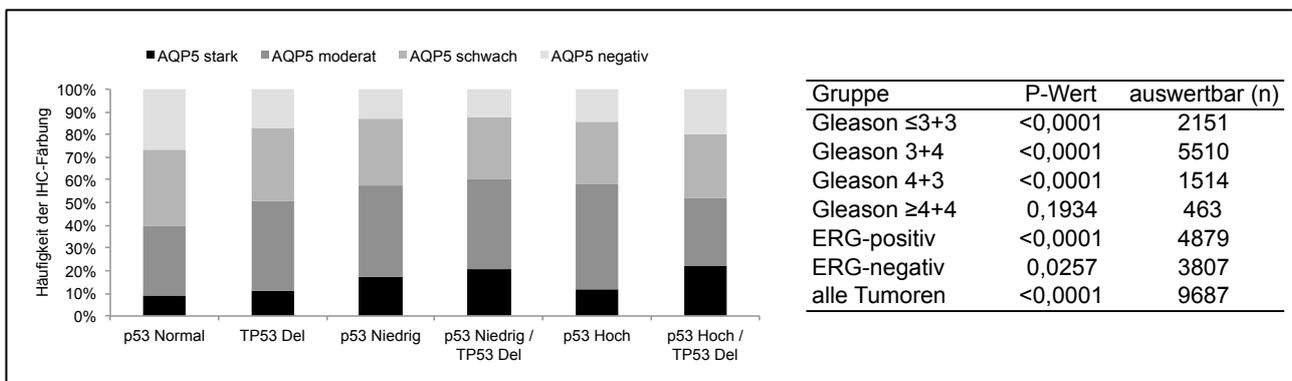
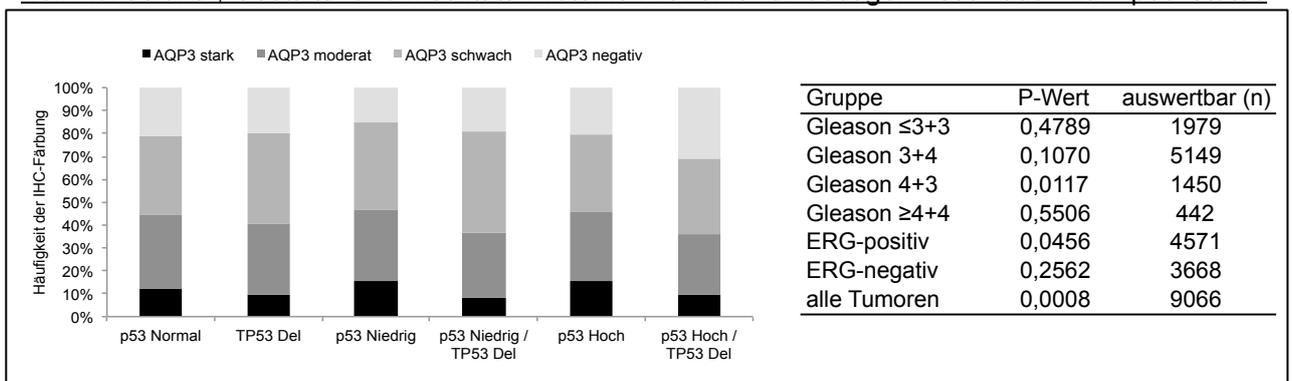
Abbildung 6: Assoziation des p53-Status mit 11 Zell-Adhäsions-, -Gestalts- und -Motilitäts-Proteinen. p53 normal: keine p53 Färbung und normaler TP53 Kopiezahlstatus, TP53 Del (Deletion): keine p53 Färbung und Verlust einer TP53 Kopie, p53 niedrig: schwache bis moderate p53 Färbung und normaler TP53 Kopiezahlstatus; p53 niedrig/TP53 Del (Deletion): schwache bis moderate p53 Färbung und Verlust einer TP53 Kopie, p53 hoch: starke p53 Färbung und normaler TP53 Kopiezahlstatus und p53 hoch/TP53 Del (Deletion): starke p53 Färbung und Verlust einer TP53 Kopie. In den Tabellen ist der Zusammenhang auch für Untergruppen mit identischem Gleason Score oder ERG-Status angegeben. Abbildung geht von Seite 40-43.

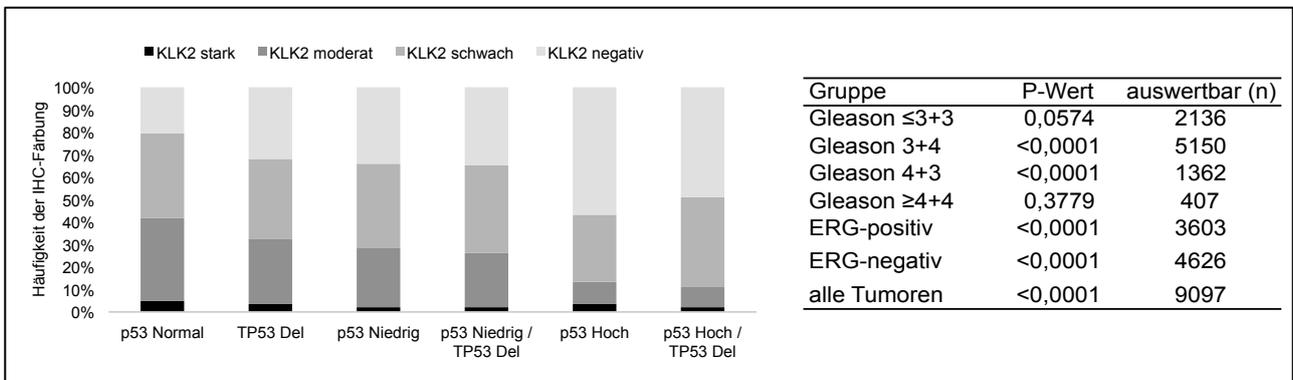
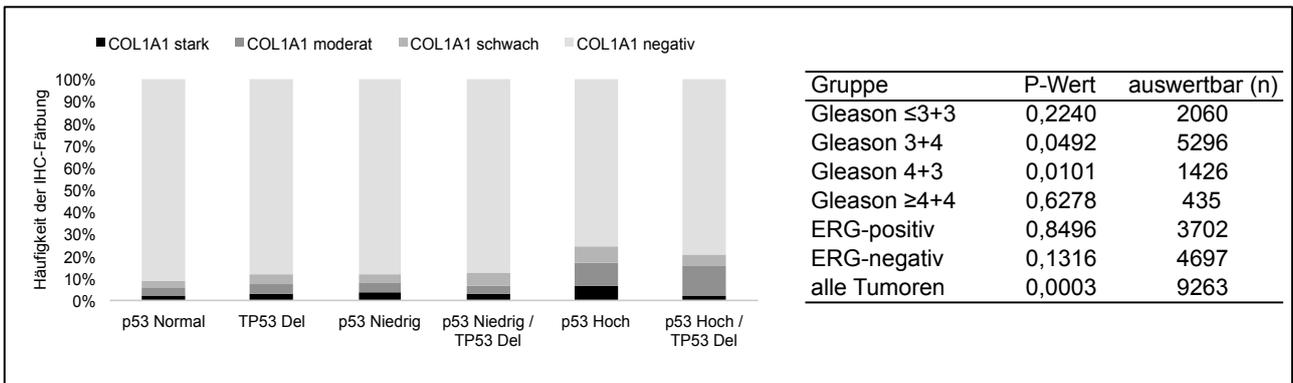
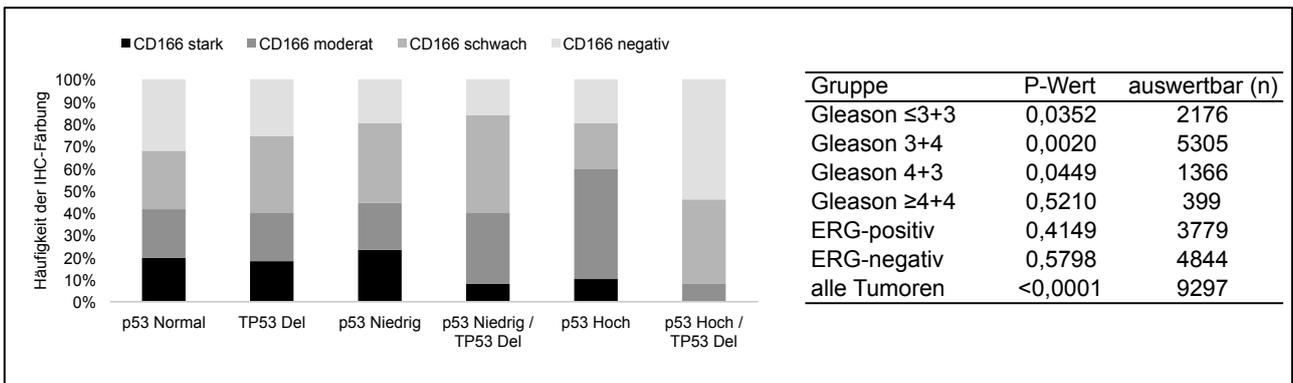
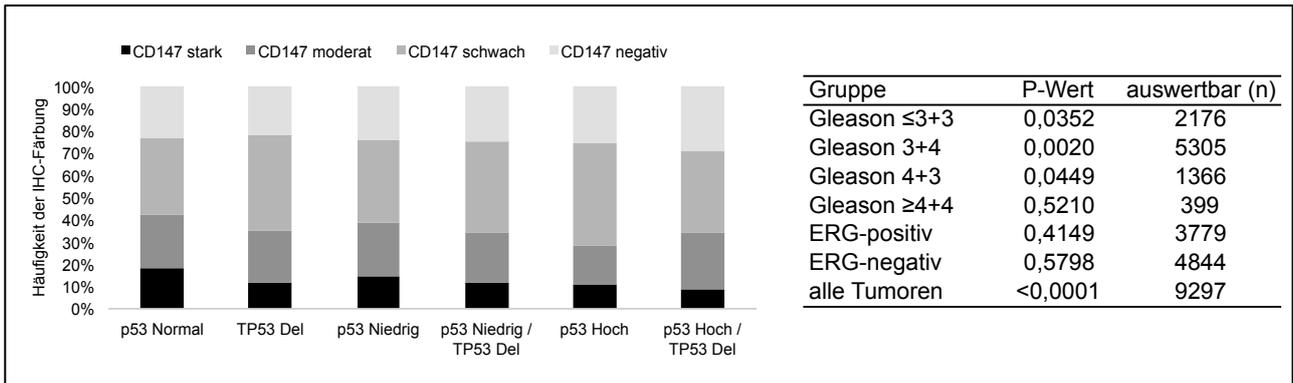
Zell-Adhäsions-, -Gestalts- und Motilitäts-Proteine mit einer positiven Assoziation zum p53-Status

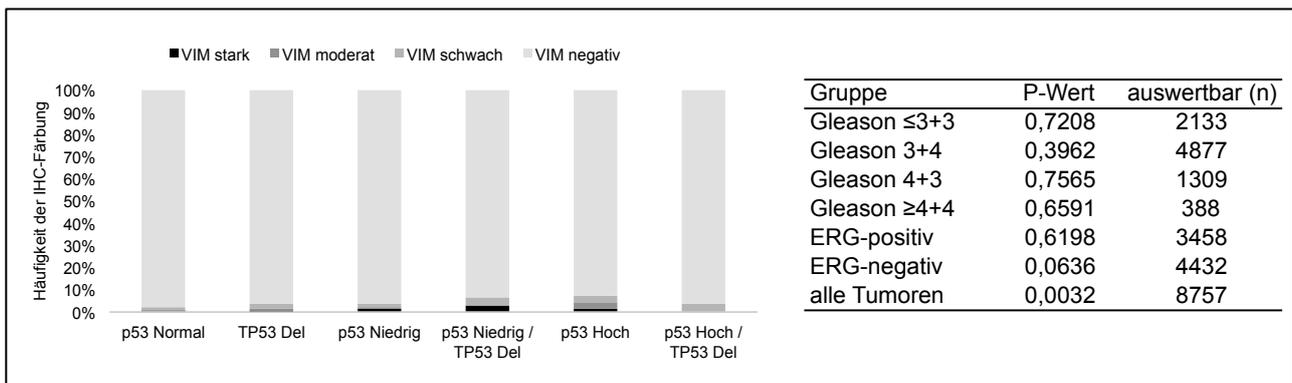
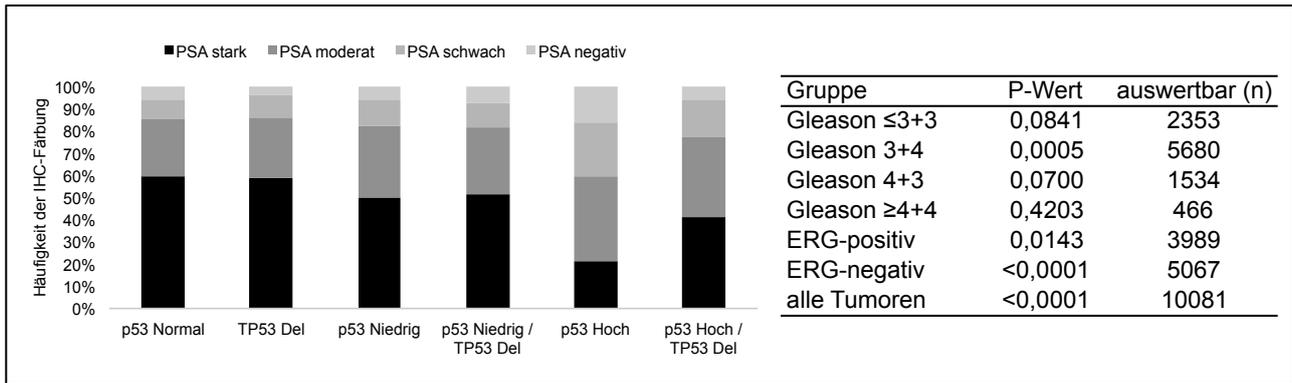




Zell-Adhäsions-, Gestalts- und Motilitäts-Proteine mit keiner eindeutigen Assoziation zum p53-Status







3.3 Assoziation des kombinierten p53-Status mit häufigen Deletionen des Prostatakarzinoms

Um zu prüfen in welchem Zusammenhang der p53 Aberrationsstatus mit dem Auftreten von häufigen Deletionen des Prostatakarzinoms steht, wurde dieser in einem Chi²-Test mit dem mit FISH ermittelten Kopiezahlstatus von 14 chromosomalen Regionen korreliert. Zur Beurteilung der Ergebnisse wurde der p53 Inaktivierungsstatus anhand des mittels IHC und FISH ermittelten p53 Aberrationsstatus wie folgt angenommen: vollständig funktionsfähiges p53: p53 normal, partielle p53 Inaktivierung: TP53 Deletion oder p53niedrig/TP53 Deletion, putative p53 Hochregulierung: p53 niedrig, vollständige p53 Inaktivierung: p53 hoch und p53 hoch/TP53 Deletion.

Die Untersuchung wurde sowohl in allen Tumoren als auch in den Untergruppen der Karzinome mit einem identischen Gleason Grad und identischem ERG-Status durchgeführt. Grund dafür war, dass vorherige Studien gezeigt haben das alle Deletionen, wie auch der p53 Aberrationsstatus, eine massive Assoziation zum Gleason Grad und die meisten Deletionen eine ausgeprägte Assoziation zum ERG-Status besitzen (32, 43-50, 70). Um den Einfluss des Gleason Grades und des ERG-Status zu eliminieren wurden Untergruppenanalysen in Tumoren mit einem identischen Gleason Score ($\leq 3+3$, 3+4, 4+3 und $\geq 4+4$) und einem identischen ERG-Status (ERG-negativ und ERG-positiv) durchgeführt.

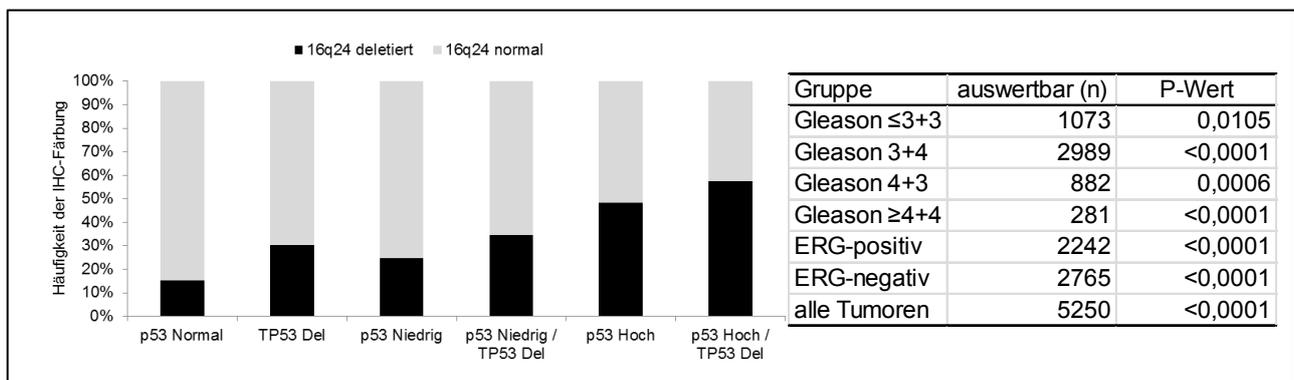
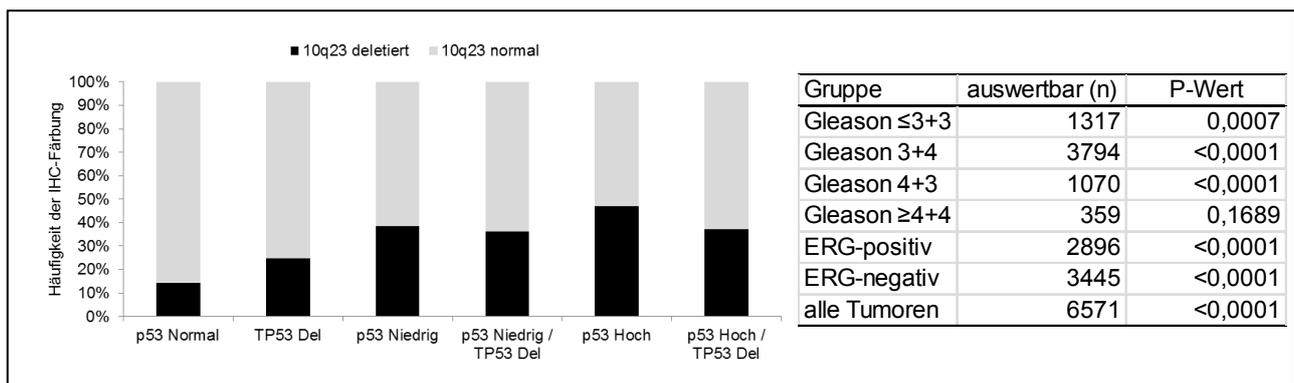
Die Analyse in allen Tumoren zeigte eine deutliche Assoziation des p53 -Aberrationsstatus zum Verlust von 8 (57,1%) der 14 untersuchten chromosomalen Regionen. Demnach zeigten 6 (42,9%) der untersuchten Regionen keinen Zusammenhang zum p53-Status.

Die Untergruppenanalyse in den Tumoren mit einem identischen Gleason Grad zeigte, dass bei 4 Deletionen (5q13, 5q21, 8p21, 12p13) der Zusammenhang zum p53-Aberrationsstatus in fast allen Untergruppen verloren ging. Es daher davon auszugehen das in diesen Fällen keine Assoziation zum p53-Status besteht.

Die Untergruppenanalyse in den Tumoren mit einem identischen ERG-Status zeigte für 5 Deletionen (5q13, 8p21, 10q23, 16q24 und 18q24) einen signifikanten Zusammenhang zum p53-Aberrationsstatus sowohl in den ERG-negativen als auch in den ERG-positiven Tumoren. Für 3 Deletionen (3p13, 12p13 und 12q24) war die Assoziation auf die Untergruppe der ERG-positiven Karzinome beschränkt und für 3 Deletionen (5q21, 6q15 und 13q14) auf die Untergruppe der ERG-negativen Tumoren.

Insgesamt zeigten die Analysen, dass Deletionen in den Regionen 10q23, 16q24 und 18q24 mit dem p53-Aberrationsstatus assoziiert sind. Nicht mit dem p53-Status assoziiert waren Deletionen von 2q, 3p13, 5q13, 5q21, 6q15, 8p21, 12p13, 12q24 und 13q14. Zu diesen nicht-p53-assozierten Deletionen zählten 5q13, 5q21, 8p21 und 12p13, die auf Grund der gleichsinnigen Beziehung zum Gleason Grad als „nicht-assoziert“ identifiziert wurden. Alle Ergebnisse sind in Abbildung 7 und 8 dargestellt.

Abbildung 7: Häufige Deletionen die mit dem p53-Status assoziiert sind. p53 normal: keine p53 Färbung und normaler TP53 Kopiezahlstatus, TP53 Del (Deletion): keine p53 Färbung und Verlust einer TP53 Kopie, p53 niedrig: schwache bis moderate p53 Färbung und normaler TP53 Kopiezahlstatus; p53 niedrig/TP53 Del (Deletion): schwache bis moderate p53 Färbung und Verlust einer TP53 Kopie, p53 hoch: starke p53 Färbung und normaler TP53 Kopiezahlstatus und p53 hoch/TP53 Del (Deletion): starke p53 Färbung und Verlust einer TP53 Kopie. In den Tabellen ist der Zusammenhang auch für Untergruppen mit identischem Gleason Score oder ERG-Status angegeben. Abbildung geht von Seite 44-45.



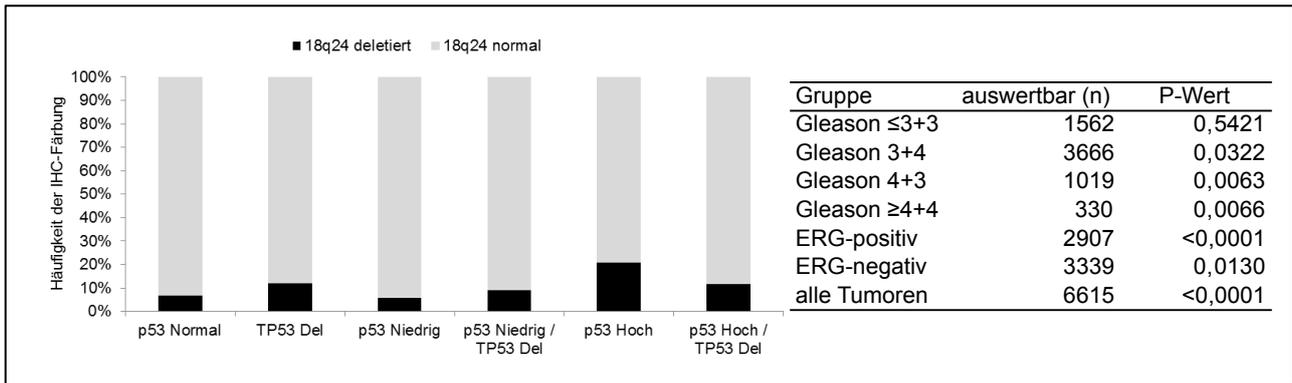
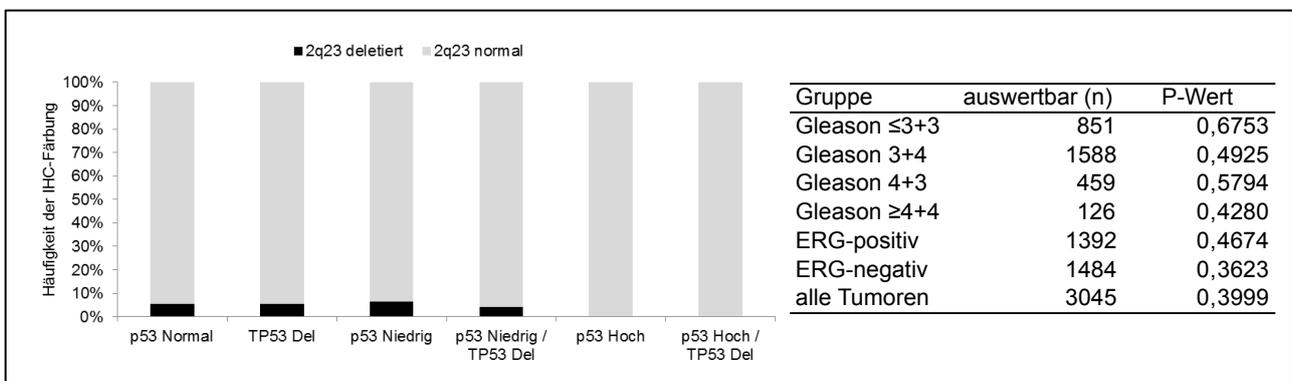
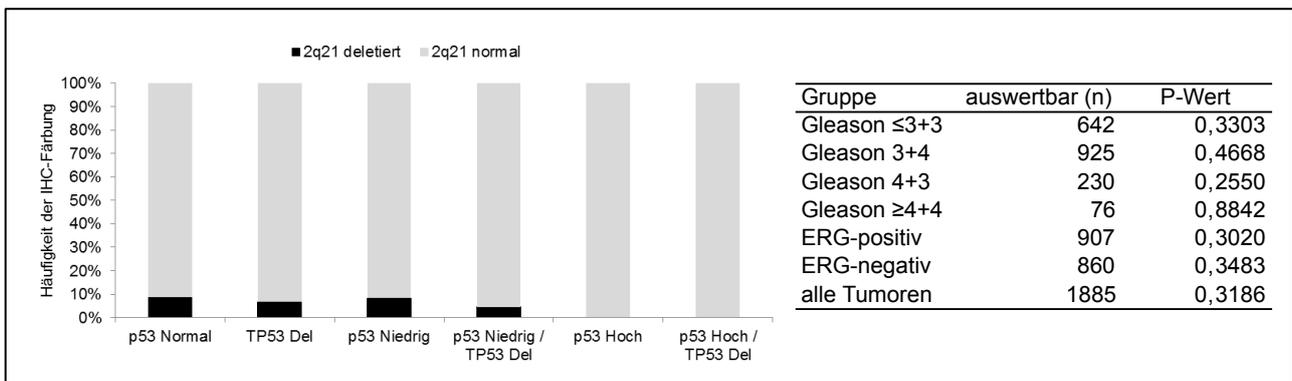
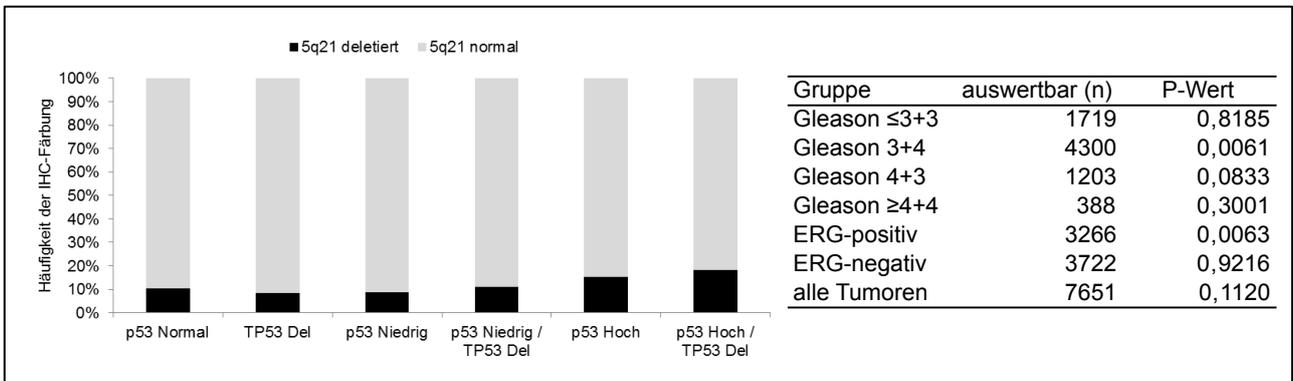
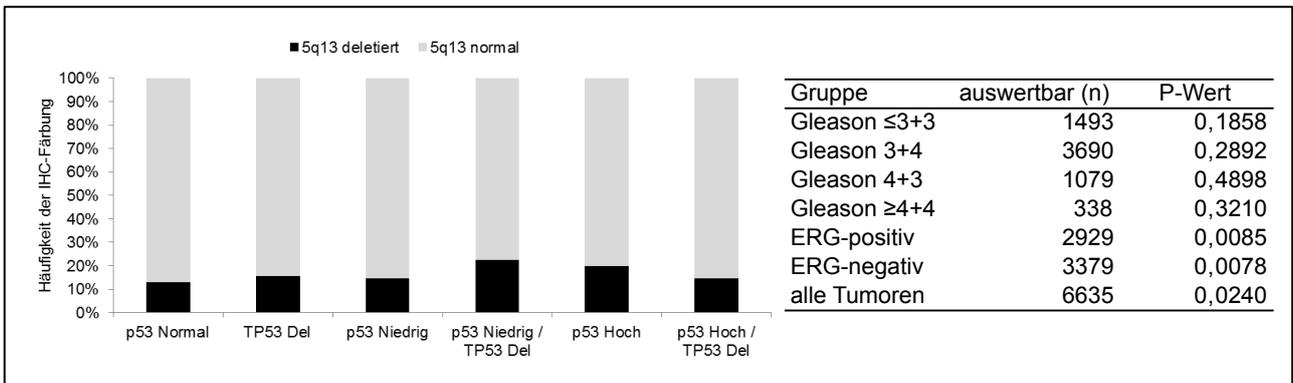
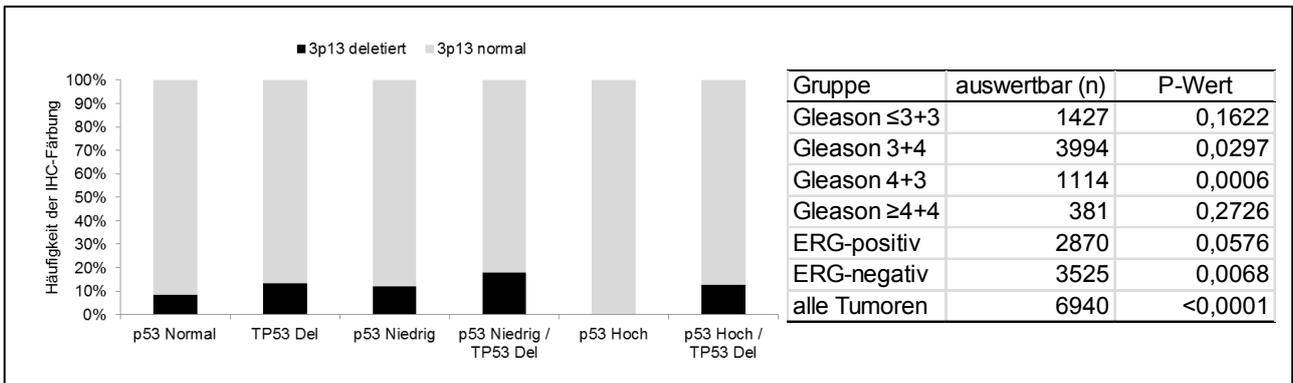
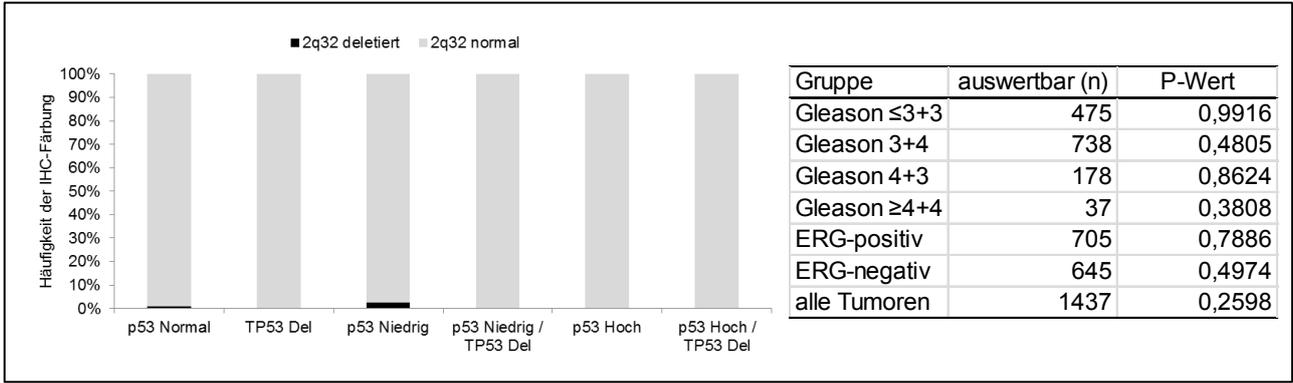
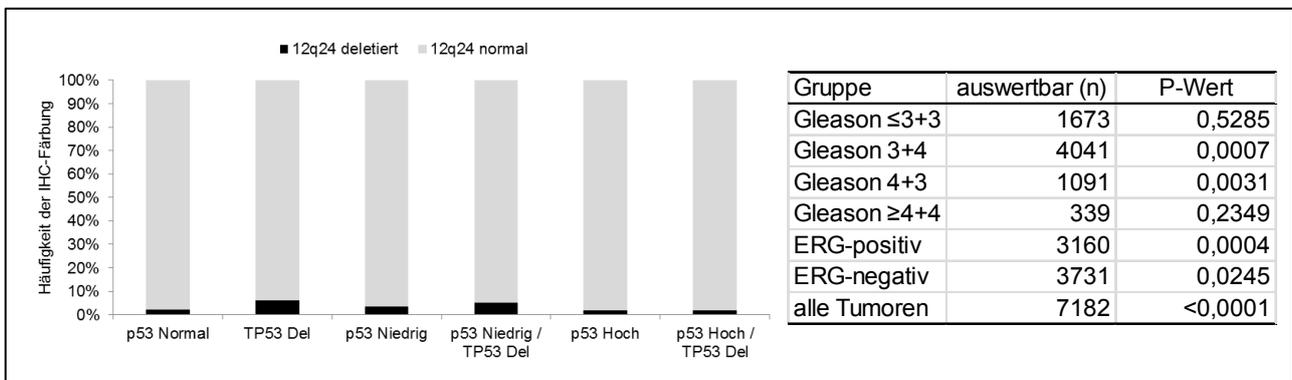
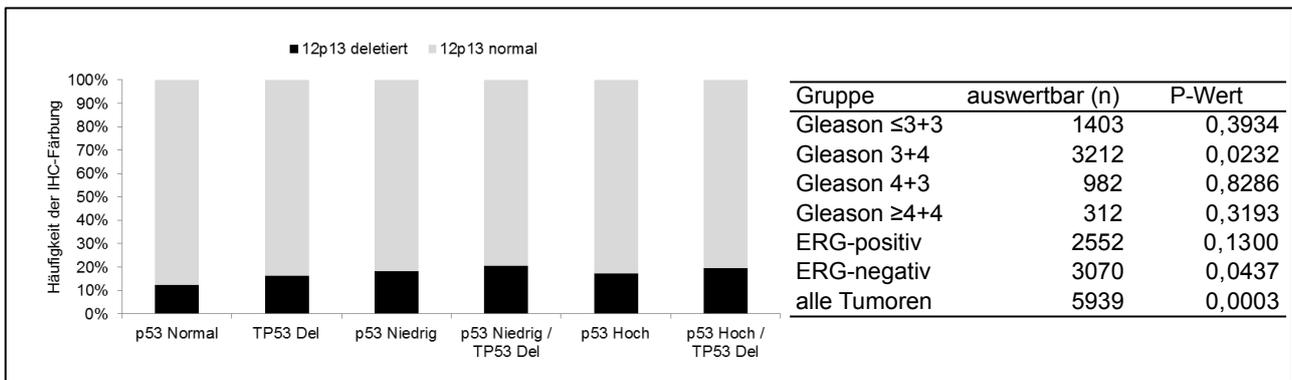
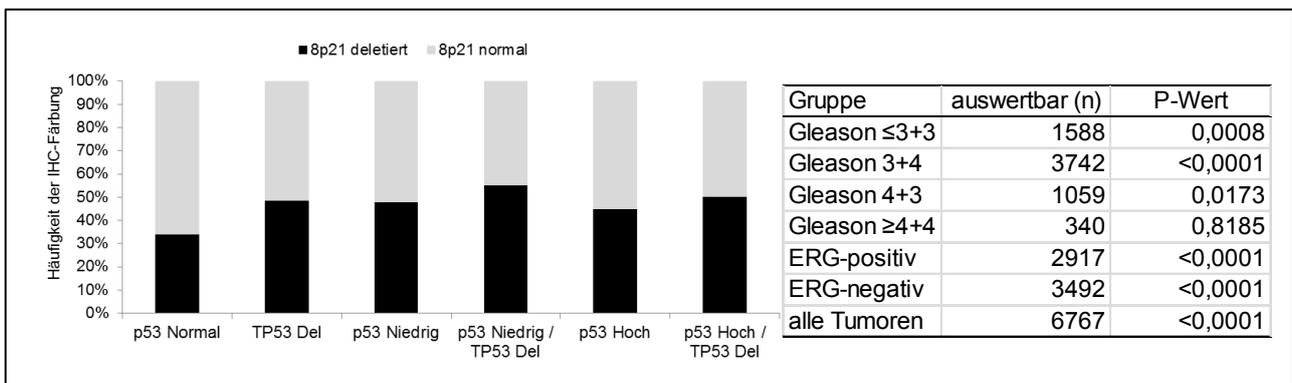
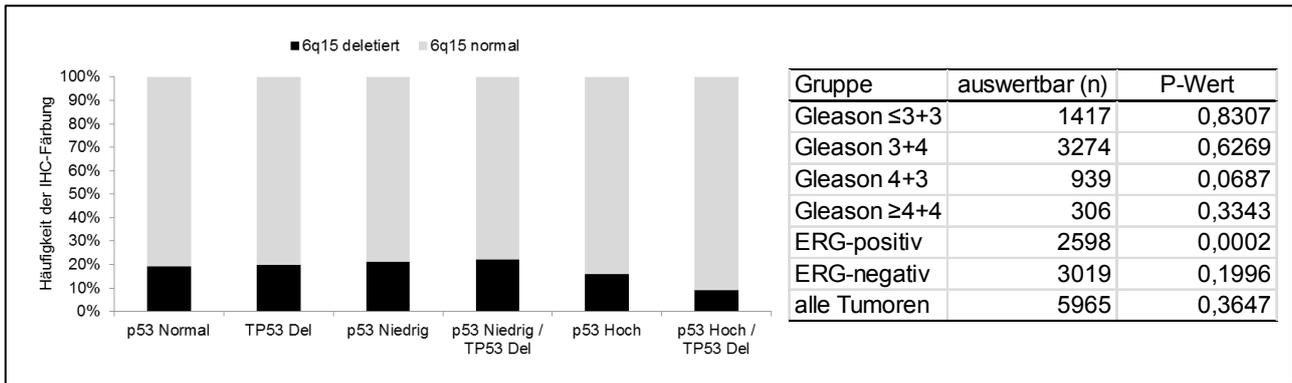
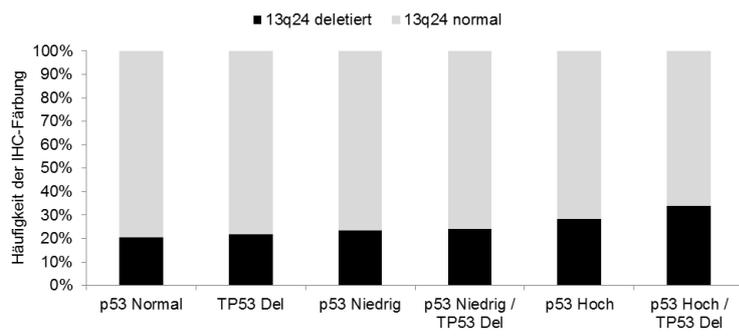


Abbildung 8: Häufige Deletionen die nicht mit dem p53-Status assoziiert sind. p53 normal: keine p53 Färbung und normaler TP53 Kopiezahlstatus, TP53 Del (Deletion): keine p53 Färbung und Verlust einer TP53 Kopie, p53 niedrig: schwache bis moderate p53 Färbung und normaler TP53 Kopiezahlstatus; p53 niedrig/TP53 Del (Deletion): schwache bis moderate p53 Färbung und Verlust einer TP53 Kopie, p53 hoch: starke p53 Färbung und normaler TP53 Kopiezahlstatus und p53 hoch/TP53 Del (Deletion): starke p53 Färbung und Verlust einer TP53 Kopie. In den Tabellen ist der Zusammenhang auch für Untergruppen mit identischem Gleason Score oder ERG-Status angegeben. Abbildung geht von Seite 45-48.









Gruppe	auswertbar (n)	P-Wert
Gleason $\leq 3+3$	1568	0,7975
Gleason 3+4	3977	0,6958
Gleason 4+3	1158	0,4759
Gleason $\geq 4+4$	357	0,9950
ERG-positiv	3110	0,0352
ERG-negativ	3635	0,8332
alle Tumoren	7097	0,0954

4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu prüfen, ob Assoziationsstudien dazu beitragen können, Hinweise auf die Funktion „unbekannter“ Gene zu erhalten. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde der bekannte Tumorsuppressor p53 zur Simulation eines „Protein mit unbekannter Funktion“ verwendet. Der p53 Tumorsuppressor wird in ca. 50% aller menschlichen Tumoren vor allem durch inaktivierende Mutationen, aber auch durch Deletionen oder Kombinationen beider Ereignisse inaktiviert (4, 63, 81). Die p53-Inaktivierung führt in der Zelle zu einer Hemmung der Apoptose, Beschleunigung des Zellzyklus, fehlerhafter DNA-Reparatur und dem Verlust der genomischen Integrität (4). Sollten die Ergebnisse der Arbeit zeigen, dass solche Proteine, die ebenfalls eine Funktion in diesen biologischen Prozessen innehaben, mit dem p53-Status assoziiert sind, könnte diese Art der in-silico Analyse in der Tat dazu beitragen, unbekannte Proteine/Gene funktionell zu klassifizieren.

Die Ergebnisse der Arbeit zeigen eine unterschiedlich starke Assoziation des p53-Status mit nahezu allen (95%) 83 untersuchten Proteine. Lediglich für vier Proteine konnte kein signifikanter Zusammenhang zum p53-Status festgestellt werden. Da nahezu alle in dieser Studie untersuchten Proteine tatsächlich in einem mehr oder weniger engen Kontext zu den vielfältigen p53-assoziierten biologischen Prozessen stehen, ist dieses Ergebnis bereits als erste Bestätigung für die oben genannte Hypothese zu verstehen. p53 ist der bekannteste Tumorsuppressor des menschlichen Genoms und in praktisch alle tumorrelevanten Prozesse involviert. Durch seine Funktion als Transkriptionsfaktor kommt es zum Beispiel zur Induktion der Expression von Apoptose-regulatorischen und Zellzyklus-hemmenden Proteinen (96-100). Eine Assoziation mit Proteinen, die ebenfalls eine wesentliche Funktion innerhalb der Zell-Homöostase (z.B. BCL2, mTOR und p16 (4)) besitzen, zeigt daher die gewünschte Funktionalität der vorliegenden Assoziationsstudie. Unterstützt wird dies außerdem durch die besonders starke Assoziation des p53-Status mit denjenigen Proteinen, die bei der DNA-Reparatur eine Rolle spielen (LIG4, MLH1 und MSH6 (4, 117)). Diese zentrale Funktion des p53 hat dem Protein schließlich den Beinamen „Wächter des Genoms“ eingebracht (104). Dass es durch eine p53-Inaktivierung zu einem Verlust der genomischen Integrität kommt, zeigt auch die starke Assoziation des p53-Status mit dem Auftreten von immerhin 57% der untersuchten Deletionsregionen. Basierend auf diesen Ergebnissen ist anzunehmen, dass auch die Funktion/en eines unbekanntes Genes durch eine solche in-silico Assoziationsstudie zumindest teilweise auf bestimmte biologische Prozesse eingeschränkt werden kann. Dies könnte die Planung und den zeitlichen Aufwand für darauffolgende in-vitro Analysen deutlich optimieren.

Neben der generellen Assoziation des p53-Status mit den 83 Proteinen wurde außerdem der Zusammenhang der analysierten Parameter zum p53-Inaktivierungsstatus untersucht. Diese Analyse führte zu einer wesentlich feineren Möglichkeit der Kategorisierung der „putativen“ p53 Funktionen. Eine deutliche Assoziation mit dem p53-Inaktivierungsstatus zeigten 80% der DNA-Reparatur-Proteine, 63% der Transkriptions-regulatorischen Proteine, 54% der Metabolismus-Proteine, 33% der Zell-Homöostase-assoziierten Proteine und nur 27% der Zell-Adhäsions-, Gestalts- und Motilitäts-Proteine. Hier stieg die Expression der Proteine

mit zunehmender Funktionsunfähigkeit des p53 an. Der p53-Status wurde in der vorliegenden Arbeit anhand des Proteinstatus (IHC) und des Genstatus (FISH) ermittelt. Dadurch konnte der p53-Inaktivierungsstatus in verschiedene Kategorien eingeteilt werden. Eine negative p53 IHC und ein normaler TP53-Kopiezahlstatus kann als funktionsfähiges p53 gewertet werden. Eine schwache p53 Färbung beruht vermutlich auf zellulärem Stress und damit auf eine Reaktion des p53 auf die Akkumulation verschiedener molekularer und genetischer Veränderungen. Die TP53 Deletion konnte ausschließlich heterozygot nachgewiesen werden und steht daher für eine partielle p53-Inaktivierung. Die IHC dient als Surrogat zur Bestimmung einer Vielzahl von dominant-negativen TP53-Mutationen, die zur Akkumulation des defekten p53 mit dem Wildtyp p53 im Zellkern führen können. In der IHC wird diese Akkumulation als starke Färbung sichtbar und kann als vollständige p53-Inaktivierung gewertet werden (46, 109, 110). Es kann davon ausgegangen werden, dass die stufenweise Herauf- oder Herabregulierung eines unbekanntes Proteins in Abhängigkeit von einer partiellen oder vollständigen p53-Inaktivierung auf einen direkten regulatorischen Zusammenhang hinweist. Ein solcher Befund war vor allem bei den DNA-Reparatur-Proteinen und bei zwei Drittel aller Proteine mit einer Rolle bei der Transkriptionsregulation ersichtlich. Tatsächlich übernimmt p53 bekanntermaßen hier eine Schlüsselfunktion (4, 90-93, 100, 102-104). Dass nur ein Drittel der Zell-Homöostase-regulatorischen Proteine einen Zusammenhang mit dem Inaktivierungsstatus aufweisen, ist darauf zurückzuführen, dass neben p53-assoziierten Prozessen (z.B. Apoptose) in dieser Kategorie zelluläre Vorgängen vorhanden sind, bei denen p53 nicht zwingend eine essentielle Funktion aufweist (z.B. Zellproliferation). Diese Analyse zeigt damit nochmals die Eignung von großen Assoziationsstudien zur Erlangung von Hinweisen auf die Funktion von unbekanntes Genen/Proteinen.

Die Daten der Assoziationsstudie zeigen aber auch, dass neben dem p53-Inaktivierungsstatus die Untersuchung von klinisch bzw. biologisch relevanten Untergruppen des Prostatakarzinoms einige Rückschlüsse auf die Funktion eines Proteins ermöglichen kann. Eine der wichtigsten biologischen Untergruppen des Prostatakarzinoms stellt die TMPRSS2:ERG Fusion dar. Bei dieser Fusion gelangt der Transkriptionsfaktor ERG bedingt durch eine Deletion auf Chromosom 21 unter die Kontrolle des Androgen-regulierten Promoters der Serinprotease TMPRSS2 und wird in den betroffenen Tumorzellen exprimiert (118). Die TMPRSS2:ERG Fusion kommt in circa 50% aller Prostatakarzinome vor und ermöglicht daher die einfache Einteilung der Karzinome in die zwei Untergruppen der ERG-positiven (mit Fusion) und der ERG-negativen (ohne Fusion) Karzinome (62). In einer Studie innerhalb der Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass der Verlust der p53-Funktion vermehrt in ERG-positiven Karzinomen vorkommt (46). Eine Assoziation mit der Art der Inaktivierung (d.h. partiell oder komplett) konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht festgestellt werden. Dass der p53-Verlust generell mit einem ERG-positiven Phänotyp assoziiert ist, muss insbesondere dann berücksichtigt werden, wenn eine Assoziation zwischen p53 und einem weiteren ERG-assoziierten Protein gefunden wird. Es besteht zumindest die Möglichkeit, dass dieser Zusammenhang einfach nur dadurch verursacht wurde, dass beide Proteine mit einem positiven ERG-Status assoziiert sind. Bemerkenswerterweise waren circa 20% der gefunden Zusammenhänge in Untergruppen von Tumoren mit identischem ERG-Status nicht mehr vorhanden. Dies deutet demnach daraufhin, dass zwischen diesen untersuchten Proteinen und p53 kein echter funktioneller Zusammenhang besteht. Dieser „funktionelle in-silico Filter“ ist insbesondere vor dem Hintergrund wichtig, dass nahezu alle Aberrationen beim Prostatakarzinom eine Assoziation zu einem positiven oder negativen ERG-Phänotyp aufweisen (21, 22, 24-55, 57-60, 69, 75-78). Dies beruht darauf,

dass es durch die ERG-Expression zu einer Deregulierung von über 1.600 Genen in der betroffenen Zelle kommt (21, 22, 119, 120), was wiederum zu unterschiedlichen molekularen Umgebungen in den ERG-negativen und ERG-positiven Karzinomen führt. Das Beispiel von ERG zeigt, dass durch Untergruppenanalysen unter Umständen ein weiterer „Filter“ verwendet werden kann um „echte“ von „vermeintlichen“ Assoziationen zu trennen.

Vermutlich sind Transkriptionsfaktoren besonders gute Filter in Assoziationsstudien die Expressionsdaten verwenden. Da viele Veränderungen aber auch generell mit der Tumorprogression assoziiert sind, könnten auch morphologische Kriterien eine weitere Filtermöglichkeit darstellen. Der Gleason Grad, zur morphologischen Klassifizierung von Prostatakarzinomen, ist hier eines der besten Beispiele. Mit dem Gleason Grad wird angegeben wie weit sich die Drüsenarchitektur des Karzinomgewebes von der normalen Drüsenarchitektur entfernt hat (Entdifferenzierungsgrad) (121). Zahlreiche Studien konnten zeigen, dass der Gleason Grad in direktem Zusammenhang mit der Aggressivität der Prostatakarzinome steht. Je höher dieser ist, desto aggressiver ist das Karzinom und dementsprechend schlechter ist die Prognose für den Patienten (122, 123). Der Gleason Grad ist daher der wichtigste Prognoseparameter in der Diagnostik des Prostatakarzinoms. Bei der Untergruppen-Analyse der Karzinome mit einem identischen Gleason Grad zeigte sich, dass ein Drittel der p53-assoziierten Hochregulierungen der Genexpression und zwei Drittel der p53 assoziierten Kopiezahlverluste von einer bestimmten klassischen Gleason Grad Gruppe abhing. Es ist bekannt, dass es mit steigender Aggressivität der Tumorzellen zu einer Anhäufung von genetischen und molekularen Veränderungen kommt. Dementsprechend können Zusammenhänge die auf einem bestimmten Gleason Grad beruhen, als zufällige Akkumulation dieser angenommen werden. Insbesondere dann, wenn beide Veränderungen mit einem bestimmten Gleason Grad oder dem Anstieg des Gleason Grades einhergehen. Dies zeigt zum Beispiel die Gleason Grad abhängige Assoziation mit über 60% der p53-assoziierten Deletionen. Sowohl die Rate der meisten Deletionen als auch der p53-Alterationen steigt mit dem Gleason Grad an. Dies beruht darauf, dass sowohl der Verlust von p53 als auch die Entstehung von Deletionen mit einer genomischen Instabilität assoziiert sind, welche ebenfalls mit dem Gleason Grad bzw. der Aggressivität der Tumoren ansteigt (32, 43-50). Die Ergebnisse der Untersuchung zeigen also deutlich, dass auch der Gleason Grad ein morphologischer Parameter ist, welcher zur Identifizierung von „echten“ funktionellen Zusammenhängen beitragen kann.

Parameter die auf „echte“ Assoziationen hinweisen sind vor allem notwendig unter der Kenntnis, dass alle in dieser Arbeit getesteten Parameter in tumorrelevanten Prozessen eine Rolle spielen. Da p53 ein multipotenter Tumorsuppressor ist, dessen Inaktivierung in vielen tumorassoziierten Prozessen und zahlreichen verschiedenen Tumorentitäten eine Rolle spielt (4, 63), ist es wahrscheinlich, dass nicht alle gefundenen Assoziationen auf direkten funktionellen Zusammenhängen beruhen. Vielmehr ist anzunehmen, dass einige der 79 p53-assoziierten Proteine - wenn überhaupt - in einem indirekten funktionellen Zusammenhang mit der Alteration von p53 beim Prostatakarzinom stehen. Um direkte funktionelle Zusammenhänge zu identifizieren sind in-vitro Versuche natürlich unabdingbar. Nichts desto trotz kann zumindest der biologische Prozess, in dem ein Protein eine vermeintlich Rolle spielt auch durch eine indirekte Assoziation mit einem anderen Protein identifiziert werden. Damit wäre zumindest ein Hinweis möglich in welche Richtung in-vitro Untersuchungen zu nächst gehen sollten. Lediglich „Mitläufer“ Assoziationen auf Grund von Akkumulationen genetischer und molekularer Veränderungen stellen ein Problem bei der Klärung der Funktion eines unbekann-

ten Proteins dar. Diese könnten jedoch potentiell mit Hilfe von molekularen und morphologischen Untergruppen herausgefiltert werden.

Generell könnte jedes Protein oder auch jeder chromosomale Lokus der am TMA-Kollektiv untersucht wurde - und zukünftig analysiert wird - eine neue biologische oder klinisch relevante Untergruppe von Prostatakarzinomen definieren. Jeder neue Marker, dessen Funktion bzw. dessen Beteiligung in bestimmten biologischen Prozessen bekannt ist, kann also dazu beitragen die Genauigkeit der funktionellen Einordnung von unbekanntem Markern zu verbessern. Wichtig ist dabei eigentlich nur ein ausreichend großes Tumorkollektiv, um auch seltenere Veränderungen miteinander sicher zu korrelieren, sowie eine ausreichende Menge an Untersuchungsgewebe für die Analyse von mehreren hundert potentiell tumorrelevanten Proteinen oder genetischen Alterationen. Und genau diese Voraussetzungen sind durch die TMA-Technik geschaffen worden. Mit Hilfe von TMAs können nicht nur mehrere Hundert, sondern sogar mehrere Tausend Gewebeproben in nur einem Experiment bearbeitet und analysiert werden (64). Dadurch ist es möglich eine sehr große Anzahl von Proben in einem realistischen Zeit- und Kostenrahmen mittels zum Beispiel IHC oder FISH zu analysieren. Notwendig für die Herstellung eines TMAs und eine valide Probenanalyse ist zudem nur eine kleine Gewebemenge. Studien am Institut für Pathologie haben bereits gezeigt, dass eine 0,6mm durchmessende Gewebestanze aus einem repräsentativen Tumorgewebeblock bereits pro Patient ausreicht, um die klinische Relevanz von putativen molekularen Markern bei unterschiedlichen Tumorentitäten zu klären (64). Diese bedeutet, dass mehrere TMA-Blöcke aus einem Patientenkollektiv hergestellt werden können. Pro TMA-Block können dann auch noch mehrere Schnitte zur Analyse von unterschiedlichen Markern hergestellt werden (64). Am Institut für Pathologie und der Martini-Klinik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf wurde die TMA-Technik genutzt, um in den letzten Jahren ein großes Kollektiv von mittlerweile über 17.000 Prostatakarzinomen zusammen zustellen. Zu diesem TMA-Kollektiv wurde eine klinische Datenbank erstellt, in der klinisch-pathologische Parameter zu den Tumoren und klinische Verlaufsdaten für jeden einzelnen Tumor bzw. Patient festgehalten werden. Der Hamburger-Prostata-Prognose-TMA stellt damit weltweit, das wohl größte Tumorkollektiv zur Validierung von molekularen Prognose-Markern dar. In den letzten Jahren wurden an diesem TMA-Kollektiv (oder Teilen des TMAs) bereits über 100 molekulare Marker bezüglich ihrer klinischen Relevanz beim Prostatakarzinom untersucht und einige vielversprechende Prognose-Parameter, wie z.B. p53-Alterationen, PTEN-Deletionen oder p62 identifiziert (29, 46, 49). Alle Studiendaten wurden in einer molekularen Datenbank gesammelt, so dass für jeden Tumor ein „molekulargenetisches“ Profil vorhanden ist. Anhand dieser Daten können nun molekulare oder auch genetische Veränderungen herausgefiltert werden, welche häufig gemeinsam in einem Tumor auftauchen. Diese Datenbank ist damit weltweit die einzige Datenbank die es ermöglicht eine große Assoziationsstudie durchzuführen und so putative funktionelle Zusammenhänge zweier Marker zu erkennen.

Erste freizugängliche Datenbanken, die einen Vergleich von verschiedenen Veränderungen innerhalb einer Tumorentität ermöglichen, sind innerhalb des „International Cancer Genome Consortium (ICGC)“ und des „The Cancer Genome Atlas (TCGA)“ Projektes entstanden (<https://dcc.icgc.org/>; <https://cancergenome.nih.gov/>). Beide Projekte haben sich zum Ziel gesetzt genetische Veränderungen von unterschiedlichen Tumorentitäten zu identifizieren und so das biologische und klinische Tumorverständnis

zu erweitern. Die Ergebnisse resultieren aus Studien die mittels der Array-basierten komparativen genomischen Hybridisierung (aCGH) oder dem „Next Generation Sequencing (NGS)“ z.B. das Gesamtgenom (aCGH, NGS), das Exom (NGS) oder das Transkriptom (NGS) untersucht haben (<https://dcc.icgc.org/>; <https://cancergenome.nih.gov/>). Alle Studiendaten werden in einer freizugänglichen molekularen Datenbank gesammelt. Zum Prostatakarzinom sind zum Beispiel im ICGC-Portal Daten zu insgesamt 799 untersuchten Tumoren aus 4 NGS-Teilprojekten vorhanden (<https://dcc.icgc.org/>). Das cbiportal (TCGA-Projekt) enthält derzeit Daten zu insgesamt 1.812 Prostatakarzinomen, welche aus 11 Teilprojekten stammen (<http://www.cbiportal.org> (111, 112)). Beide Datenbanken bieten zum Beispiel die Möglichkeit in kurzer Zeit einen Einblick über die Häufigkeit bestimmter Alterationen und teilweise auch Co-Alterationen in verschiedenen Tumorentitäten zu bekommen, den Einfluss einer Gen-Alteration auf die Expression des Genes zu prüfen und direkte und indirekte funktionelle Zusammenhänge zweier oder mehrere bekannter Gene darzustellen. Was jedoch nicht möglich ist, ist die Untersuchung der klinischen Relevanz einer Veränderung oder auch mehrerer Veränderungen in Kombination, sowie die Untersuchung bzw. Festlegung von molekularen Untergruppen innerhalb einer Karzinomentität. Auf Grund der „geringen“ Fallzahl kann außerdem nicht ausgeschlossen werden, dass seltenere Ko-Alterationen nicht aufgedeckt werden. Die Datenbanken stellen allerdings eine sehr gute Basis dar, um „neue“ Alterationen zu finden, welche putative relevant sein könnten, um diese dann an einem großen Tumorkollektiv bezüglich ihrer klinischen Relevanz zu prüfen. Eine Assoziationsstudie, wie sie in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurde, welche Hinweise auf potentielle Funktionen unbekannter Gene gibt, ist mit diesen beiden Datenbanken jedoch nicht möglich.

Insgesamt konnten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass unsere molekulare Datenbank basierend auf einer großen Anzahl von Tumoren, zu denen der Alterationsstatus von 100 molekularen Markern bekannt ist, durch aus genutzt werden kann, um putative biologische Zusammenhänge mehrerer Marker in-silico aufzudecken. Des Weiteren könnten aus diesen Assoziationen außerdem Hinweise auf potentielle Funktionen unbekannter Gene resultieren. Damit könnte dieser Modellansatz zu einem besseren Verständnis der biologischen Vorgänge verschiedener Tumorereignisse beitragen.

5 Zusammenfassung

Die in den letzten Jahren erfolgte Verbesserung der molekularbiologischen Methoden hat dazu geführt, dass immer mehr putativ tumorrelevante Gene identifiziert werden. Für einige dieser Gene ist jedoch unklar, welche biologische Funktion diese in der Zelle haben. Klassische Methoden zur Bestimmung einer Genfunktion, wie zum Beispiel Zellkulturmodelle sind in der Regel zeit- und kostenaufwendig. Daher werden dringend alternative Ansätze benötigt, welche die funktionelle Einordnung von Genen bzw. Proteinen ermöglichen. Solch ein alternativer Ansatz könnte die Assoziation von unbekanntem Genen mit funktionell gut klassifizierten Genen sein. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher zu prüfen, ob eine Assoziationsstudie Hinweise auf die Funktion eines Genes erbringen kann. Dazu wurde die molekulare Datenbank des Instituts für Pathologie verwendet, welche Studienergebnisse zum Expressionsstatus bzw. Kopiezahlstatus von mehr als 100 Proteinen bzw. Genen enthält, die an einem Kollektiv von über 12.000 Prostatakarzinomen mittels Immunohistochemie oder Fluoreszenz in-situ Hybridisierung bestimmt wurden. Als Modell für ein „unbekanntes Gen“ wurde der Tumorsuppressor p53 ausgewählt und geprüft, ob es möglich ist durch die Assoziation mit mehr als 80 Proteinen und 14 Deletionsregionen Hinweise auf die Kernfunktionen von p53 zu erhalten. Um den p53 Aberrationsstatus in den Tumoren festzulegen wurden die Daten aus einer vorherigen TP53 FISH-Analyse (Deletionsstatus) und einer p53 IHC-Analyse (Surrogat für Mutation) kombiniert. Insgesamt waren 7.099 Tumorstanzen in beiden Analysen auswertbar. Von diesen Tumoren zeigten 569 (8,0%) eine schwache p53 Färbung und keine TP53 Deletion und 964 (13,6%) Tumoren eine TP53 Deletion bei einem negativen p53 IHC-Befund (partielle Inaktivierung). Eine Kombination aus einer schwachen p53 Färbung und einer TP53 Deletion konnte für 130 (1,8%) der Tumoren detektiert werden. Eine starke p53 Färbung bei Fehlen einer TP53 Deletion wurde für 49 (0,7%) Tumoren nachgewiesen (komplette Inaktivierung). Für 60 (0,8%) der Tumoren konnte eine TP53 Deletion in Kombination mit einer starken p53 Färbung nachgewiesen werden (komplette Inaktivierung). Weder eine p53 Färbung noch eine TP53 Deletion konnte in 5.327 (75,0%) der untersuchten Tumoren nachgewiesen werden (p53 normal). Eine Assoziation zum p53-Status konnte für 79 (95%) der untersuchten Proteine und 8 (57%) der 14 Deletionsregionen gefunden werden ($p \leq 0,0500$). Untergruppenanalysen zeigten, dass die Assoziation mit 51 (65%) dieser Proteine sowohl in den Untergruppen von Tumoren mit identischem Gleason Grad als auch den Untergruppen der Tumoren mit identischem TMPRSS2:ERG-Status noch vorhanden war. Der p53-Inaktivierungsstatus war mit 42 (50%) von 83 untersuchten Proteinen assoziiert. Hier nahm der Grad die Hochregulierung bzw. Herabregulierung der Proteine mit dem Grad der p53-Inaktivierung (partiell und komplett) zu. Zu diesen Proteinen zählten 8 (70%) der 10 untersuchten DNA-Reparatur-Proteine, 12 (63%) der 19 transkriptionsregulatorischen Proteine, 12 (54%) der 22 Metabolismus-Proteine, 7 (33%) der 21 Zell-Homöostase-Proteine und 3 (27%) der 11 untersuchten Zell-Adhäsions-, Gestalts- und Motilitätsproteine. Insgesamt konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass mit Hilfe von Assoziationsstudien durchaus in-silico Hinweise auf die potentielle Funktion von Genen erzielt werden können. Als zusätzliches Hilfsmittel kann dabei die Unterteilung der Tumoren in molekulare und/oder morphologische Untergruppen genutzt werden.

6 Abstract

Massive improvements of molecular biological technics resulted in a stately increase of the number of identified tumor relevant genes. However, the tumor biological function of most of these genes has not been satisfactorily clarified. Classical methods assign the gene function such as cell culture models typically require high efforts in terms of time and costs. There is, thus, an urgent need of alternative approaches to reveal the function of unknown genes. One possibility is to search for associations between genes with unknown function and genes with well-known functions. It was the aim of the present study to provide proof of principal if such association studies are fishable and suitable to draw conclusions on gene function. We made use of the molecular database of the institute of pathology containing protein expression and gene copy number data from more than 12,000 prostate cancers that been obtained from immunohistochemical (IHC) and fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis of more than 100 proteins and genes, respectively. The tumor suppressor p53 was selected as a model system for a gene with an “unknown” function, and associations were calculated with more than 80 proteins and 15 deleted chromosomal regions in order to test the hypothesis if the function of p53 can be deduced from these associations. In order to determine the p53 status in each tumor, data from previous p53 copy number analysis (p53 deletion) and p53 IHC analysis (as surrogate for inactivating p53 mutations) were combined. This resulted in a total of 7,099 cancers with data on both alterations, including 569 (8,0%) with weak p53 staining but no deletion, 964 (13,6%) cancers with p53 deletion but no staining (partial inactivation), 130 (1,8%) cancers with weak p53 staining and concurrent p53 deletion, and 60 (0,8%) cancers with complete p53 inactivation as indicated by presence of both p53 deletion and strong immunostaining. No p53 alteration (IHC and FISH negative) was found in 5,327 (75,0%) of cancers. The association studies showed that 79 (95%) of the analyzed proteins and 8 (57%) of the analyzed deletion regions were linked to the presence of any p53 alterations ($p \leq 0,0500$). Further subgroup analysis revealed that the associations with 51 (65%) of these proteins held also true in subsets of cancers with identical Gleason grade or identical TMPRSS2:ERG status. The type of p53 inactivation (partial and complete) was linked to 42 (50%) of 83 analyzed proteins. Here, the degree of protein deregulation increased with a degree of p53 inactivation. Among these proteins there were 8 DNA repair proteins, 12 proteins involved in transcriptional regulation, 12 metabolism-associated proteins, 7 proteins involved in cell homeostasis and 4 proteins involved in cell adhesion, shape and modality. In summary, the results of the present study demonstrate that association studies are suitable to obtain *in silico* hints on the potential function of uncharacterized genes. Additional information can be obtained from morphological and molecular characteristics of the analyzed cancers.

7 Literaturverzeichnis

1. Krebs in Deutschland 2009/2010. 9. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, 2013.
2. Weiner LM: An overview of monoclonal antibody therapy of cancer. *Semin Oncol* 26: 41-50, 1999.
3. Loibl S and Gianni L: HER2-positive breast cancer. *Lancet*, 2016.
4. Wagener C and Müller O: Molekulare Onkologie - Entstehung, Progression, klinische Aspekte. 3. Auflage, 2009, Thieme Verlag.
5. Yarden Y: The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur J Cancer* 37 Suppl 4: S3-8, 2001.
6. Mester J and Eng C: When overgrowth bumps into cancer: the PTEN-opathies. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 163C: 114-121, 2013.
7. Chalhoub N and Baker SJ: PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer. *Annu Rev Pathol* 4: 127-150, 2009.
8. Shostak K and Chariot A: EGFR and NF-kappaB: partners in cancer. *Trends Mol Med* 21: 385-393, 2015.
9. Hyman DM, Taylor BS and Baselga J: Implementing Genome-Driven Oncology. *Cell* 168: 584-599, 2017.
10. Serrati S, De Summa S, Pilato B, et al.: Next-generation sequencing: advances and applications in cancer diagnosis. *Onco Targets Ther* 9: 7355-7365, 2016.
11. Glaser AP, Fantini D, Shilatifard A, Schaeffer EM and Meeks JJ: The evolving genomic landscape of urothelial carcinoma. *Nat Rev Urol*, 2017.
12. Reifenberger G, Wirsching HG, Knobbe-Thomsen CB and Weller M: Advances in the molecular genetics of gliomas - implications for classification and therapy. *Nat Rev Clin Oncol*, 2016.
13. Ahn DH, Ciombor KK, Mikhail S and Bekaii-Saab T: Genomic diversity of colorectal cancer: Changing landscape and emerging targets. *World J Gastroenterol* 22: 5668-5677, 2016.
14. Zhang T, Dutton-Regester K, Brown KM and Hayward NK: The genomic landscape of cutaneous melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 29: 266-283, 2016.
15. Simbolo M, Fassan M, Mafficini A, Lawlor RT, Ruzzenente A and Scarpa A: New genomic landscapes and therapeutic targets for biliary tract cancers. *Front Biosci (Landmark Ed)* 21: 707-718, 2016.
16. Verigos J and Magklara A: Revealing the Complexity of Breast Cancer by Next Generation Sequencing. *Cancers (Basel)* 7: 2183-2200, 2015.
17. Silwal-Pandit L, Langerod A and Borresen-Dale AL: TP53 Mutations in Breast and Ovarian Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med* 7, 2017.
18. Ross JS, Ali SM, Wang K, et al.: Comprehensive genomic profiling of inflammatory breast cancer cases reveals a high frequency of clinically relevant genomic alterations. *Breast Cancer Res Treat* 154: 155-162, 2015.
19. Kwei KA, Kung Y, Salari K, Holcomb IN and Pollack JR: Genomic instability in breast cancer: pathogenesis and clinical implications. *Mol Oncol* 4: 255-266, 2010.

20. Berger MF, Lawrence MS, Demichelis F, et al.: The genomic complexity of primary human prostate cancer. *Nature* 470: 214-220, 2011.
21. Taylor BS, Schultz N, Hieronymus H, et al.: Integrative genomic profiling of human prostate cancer. *Cancer Cell* 18: 11-22, 2010.
22. Weischenfeldt J, Simon R, Feuerbach L, et al.: Integrative genomic analyses reveal an androgen-driven somatic alteration landscape in early-onset prostate cancer. *Cancer Cell* 23: 159-170, 2013.
23. Dancau AM, Simon R, Mirlacher M and Sauter G: Tissue Microarrays. *Methods Mol Biol* 1381: 53-65, 2016.
24. Burdelski C, Barreau Y, Simon R, et al.: *Saccharomyces cerevisiae*-like 1 overexpression is frequent in prostate cancer and has markedly different effects in Ets-related gene fusion-positive and fusion-negative cancers. *Hum Pathol* 46: 514-523, 2015.
25. Burdelski C, Bujupi E, Tsourlakis MC, et al.: Loss of SOX9 Expression Is Associated with PSA Recurrence in ERG-Positive and PTEN Deleted Prostate Cancers. *PLoS one* 10: e0128525, 2015.
26. Burdelski C, Dieckmann T, Heumann A, et al.: p16 upregulation is linked to poor prognosis in ERG negative prostate cancer. *Tumour Biol* 37: 12655-12663, 2016.
27. Burdelski C, Kleinhans S, Kluth M, et al.: Reduced AZGP1 expression is an independent predictor of early PSA recurrence and associated with ERG-fusion positive and PTEN deleted prostate cancers. *Int J Cancer*, 2015.
28. Burdelski C, Menan D, Tsourlakis MC, et al.: The prognostic value of SUMO1/Sentrin specific peptidase 1 (SEN1) in prostate cancer is limited to ERG-fusion positive tumors lacking PTEN deletion. *BMC Cancer* 15: 538, 2015.
29. Burdelski C, Reisch V, Hube-Magg C, et al.: Cytoplasmic Accumulation of Sequestosome 1 (p62) Is a Predictor of Biochemical Recurrence, Rapid Tumor Cell Proliferation, and Genomic Instability in Prostate Cancer. *Clin Cancer Res* 21: 3471-3479, 2015.
30. Burdelski C, Ruge OM, Melling N, et al.: HDAC1 overexpression independently predicts biochemical recurrence and is associated with rapid tumor cell proliferation and genomic instability in prostate cancer. *Exp Mol Pathol* 98: 419-426, 2015.
31. Burdelski C, Strauss C, Tsourlakis MC, et al.: Overexpression of thymidylate synthase (TYMS) is associated with aggressive tumor features and early PSA recurrence in prostate cancer. *Oncotarget* 6: 8377-8387, 2015.
32. Burkhardt L, Fuchs S, Krohn A, et al.: CHD1 is a 5q21 tumor suppressor required for ERG rearrangement in prostate cancer. *Cancer research* 73: 2795-2805, 2013.
33. Grupp K, Boumesli R, Tsourlakis MC, et al.: The prognostic impact of high Nijmegen breakage syndrome (NBS1) gene expression in ERG-negative prostate cancers lacking PTEN deletion is driven by KPNA2 expression. *Int J Cancer* 135: 1399-1407, 2014.
34. Grupp K, Diebel F, Sirma H, et al.: SPINK1 expression is tightly linked to 6q15- and 5q21-deleted ERG-fusion negative prostate cancers but unrelated to PSA recurrence. *Prostate* 73: 1690-1698, 2013.
35. Grupp K, Habermann M, Sirma H, et al.: High nuclear karyopherin alpha 2 expression is a strong and independent predictor of biochemical recurrence in prostate cancer patients treated by radical prostatectomy. *Mod Pathol*, 2013.
36. Grupp K, Hohne TS, Prien K, et al.: Reduced CD147 expression is linked to ERG fusion-positive prostate cancers but lacks substantial impact on PSA recurrence in patients treated by radical prostatectomy. *Exp Mol Pathol* 95: 227-234, 2013.
37. Grupp K, Jedrzejewska K, Tsourlakis MC, et al.: High mitochondria content is associated with prostate cancer disease progression. *Mol Cancer* 12: 145, 2013.

38. 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* 26: 733-742, 2013.
39. Grupp K, Ospina-Klinck D, Tsourlakis MC, et al.: NY-ESO-1 expression is tightly linked to TMPRSS2-ERG fusion in prostate cancer. *Prostate* 74: 1012-1022, 2014.
40. Grupp K, Roettger L, Kluth M, et al.: Expression of DNA ligase IV is linked to poor prognosis and characterizes a subset of prostate cancers harboring TMPRSS2:ERG fusion and PTEN deletion. *Oncol Rep* 34: 1211-1220, 2015.
41. Grupp K, Sanader S, Sirma H, et al.: High lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 expression independently predicts high risk for biochemical recurrence in prostate cancers. *Mol Oncol* 7: 1001-1011, 2013.
42. Grupp K, Wilking J, Prien K, et al.: 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. *Eur J Cancer* 50: 852-861, 2014.
43. Kluth M, Ahrary R, Hube-Magg C, et al.: Genomic deletion of chromosome 12p is an independent prognostic marker in prostate cancer. *Oncotarget* 6: 27966-27979, 2015.
44. Kluth M, Amschler NN, Galal R, et al.: Deletion of 8p is an independent prognostic parameter in prostate cancer. *Oncotarget*, 2016.
45. Kluth M, Graunke M, Moller-Koop C, et al.: Deletion of 18q is a strong and independent prognostic feature in prostate cancer. *Oncotarget*, 2016.
46. Kluth M, Harasimowicz S, Burkhardt L, et al.: Clinical significance of different types of p53 gene alteration in surgically treated prostate cancer. *Int J Cancer* 135: 1369-1380, 2014.
47. Kluth M, Hesse J, Heintl 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* 26: 975-983, 2013.
48. Kluth M, Runte F, Barow P, et al.: Concurrent deletion of 16q23 and PTEN is an independent prognostic feature in prostate cancer. *Int J Cancer* 137: 2354-2363, 2015.
49. 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. *The American journal of pathology* 181: 401-412, 2012.
50. Krohn A, Seidel A, Burkhardt L, et al.: Recurrent deletion of 3p13 targets multiple tumour suppressor genes and defines a distinct subgroup of aggressive ERG fusion-positive prostate cancers. *The Journal of pathology* 231: 130-141, 2013.
51. 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* 16: 1553-1560, 2010.
52. 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* 42: 1946-1952, 2011.
53. Minner S, Wittmer C, Graefen M, et al.: High level PSMA expression is associated with early PSA recurrence in surgically treated prostate cancer. *Prostate* 71: 281-288, 2011.
54. Pust A, Kylies D, Hube-Magg C, et al.: Aquaporin 5 expression is frequent in prostate cancer and shows a dichotomous correlation with tumor phenotype and PSA recurrence. *Hum Pathol* 48: 102-110, 2016.
55. Sirma H, Broemel M, Stumm L, et al.: Loss of CDKN1B/p27Kip1 expression is associated with ERG fusion-negative prostate cancer, but is unrelated to patient prognosis. *Oncol Lett* 6: 1245-1252, 2013.
56. Stumm L, Burkhardt L, Steurer S, et al.: Strong expression of the neuronal transcription factor FOXP2 is linked to an increased risk of early PSA recurrence in ERG fusion-negative cancers. *J Clin Pathol* 66: 563-568, 2013.

57. Tsourlakis MC, Khosrawi P, Weigand P, et al.: VEGFR-1 overexpression identifies a small subgroup of aggressive prostate cancers in patients treated by prostatectomy. *Int J Mol Sci* 16: 8591-8606, 2015.
58. Tsourlakis MC, Schoop M, Plass C, et al.: Overexpression of the chromatin remodeler death-domain-associated protein in prostate cancer is an independent predictor of early prostate-specific antigen recurrence. *Hum Pathol* 44: 1789-1796, 2013.
59. Tsourlakis MC, Walter E, Quaas A, et al.: High Nr-CAM expression is associated with favorable phenotype and late PSA recurrence in prostate cancer treated by prostatectomy. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 16: 159-164, 2013.
60. Tsourlakis MC, Weigand P, Grupp K, et al.: betaIII-Tubulin Overexpression Is an Independent Predictor of Prostate Cancer Progression Tightly Linked to ERG Fusion Status and PTEN Deletion. *The American journal of pathology*, 2013.
61. Zabalza CV, Adam M, Burdelski C, et al.: HOXB13 overexpression is an independent predictor of early PSA recurrence in prostate cancer treated by radical prostatectomy. *Oncotarget* 6: 12822-12834, 2015.
62. 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* 17: 5878-5888, 2011.
63. Levine AJ and Oren M: The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat Rev Cancer* 9: 749-758, 2009.
64. *Tissue-Microarrays - Methods and Protocols*. edited by Ronald Simon, Springer Protocols 2010.
65. Erbersdobler A, Isbarn H, Steiner I, et al.: Predictive value of prostate-specific antigen expression in prostate cancer: a tissue microarray study. *Urology* 74: 1169-1173, 2009.
66. Ruiz C, Seibt S, Al Kuraya K, et al.: Tissue microarrays for comparing molecular features with proliferation activity in breast cancer. *Int J Cancer* 118: 2190-2194, 2006.
67. Nienstedt JC, Grobe A, Lebok P, et al.: CD151 expression is frequent but unrelated to clinical outcome in head and neck cancer. *Clin Oral Investig*, 2016.
68. Kilic E, Tennstedt P, Hogner A, et al.: The zinc-finger transcription factor SALL4 is frequently expressed in human cancers: association with clinical outcome in squamous cell carcinoma but not in adenocarcinoma of the esophagus. *Virchows Arch* 468: 483-492, 2016.
69. Bubendorf L, Sauter G, Moch H, et al.: Ki67 labelling index: an independent predictor of progression in prostate cancer treated by radical prostatectomy. *The Journal of pathology* 178: 437-441, 1996.
70. El Gammal AT, Bruchmann M, Zustin J, et al.: Chromosome 8p deletions and 8q gains are associated with tumor progression and poor prognosis in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 16: 56-64, 2010.
71. Fleischmann A, Huland H, Mirlacher M, et al.: Prognostic relevance of Bcl-2 overexpression in surgically treated prostate cancer is not caused by increased copy number or translocation of the gene. *Prostate* 72: 991-997, 2012.
72. Fleischmann A, Schlomm T, Huland H, et al.: Distinct subcellular expression patterns of neutral endopeptidase (CD10) in prostate cancer predict diverging clinical courses in surgically treated patients. *Clin Cancer Res* 14: 7838-7842, 2008.
73. Fleischmann A, Schlomm T, Kollermann J, et al.: Immunological microenvironment in prostate cancer: high mast cell densities are associated with favorable tumor characteristics and good prognosis. *Prostate* 69: 976-981, 2009.
74. Kollermann J, Schlomm T, Bang H, et al.: Expression and prognostic relevance of annexin A3 in prostate cancer. *Eur Urol* 54: 1314-1323, 2008.
75. Melling N, Harutyunyan L, Hube-Magg C, et al.: High-Level HOOK3 Expression Is an Independent Predictor of Poor Prognosis Associated with Genomic Instability in Prostate Cancer. *PloS one* 10: e0134614, 2015.

76. Melling N, Simon R, Mirlacher M, et al.: Loss of RNA-binding motif protein 3 expression is associated with right-sided localization and poor prognosis in colorectal cancer. *Histopathology* 68: 191-198, 2016.
77. Melling N, Taskin B, Hube-Magg C, et al.: Cytoplasmic accumulation of ELAVL1 is an independent predictor of biochemical recurrence associated with genomic instability in prostate cancer. *Prostate* 76: 259-272, 2016.
78. Melling N, Thomsen E, Tsourlakis MC, et al.: Overexpression of enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) characterizes an aggressive subset of prostate cancers and predicts patient prognosis independently from pre- and postoperatively assessed clinicopathological parameters. *Carcinogenesis* 36: 1333-1340, 2015.
79. Schlomm T, Iwers L, Kirstein P, et al.: Clinical significance of p53 alterations in surgically treated prostate cancers. *Mod Pathol* 21: 1371-1378, 2008.
80. Schlomm T, Kirstein P, Iwers L, et al.: Clinical significance of epidermal growth factor receptor protein overexpression and gene copy number gains in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 13: 6579-6584, 2007.
81. Vogelstein B, Lane D and Levine AJ: Surfing the p53 network. *Nature* 408: 307-310, 2000.
82. Lane DP and Crawford LV: T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 278: 261-263, 1979.
83. Kress M, May E, Cassingena R and May P: Simian virus 40-transformed cells express new species of proteins precipitable by anti-simian virus 40 tumor serum. *J Virol* 31: 472-483, 1979.
84. Melero JA, Stitt DT, Mangel WF and Carroll RB: Identification of new polypeptide species (48-55K) immunoprecipitable by antiserum to purified large T antigen and present in SV40-infected and -transformed cells. *Virology* 93: 466-480, 1979.
85. Smith AE, Smith R and Paucha E: Characterization of different tumor antigens present in cells transformed by simian virus 40. *Cell* 18: 335-346, 1979.
86. Wolf D, Harris N and Rotter V: Reconstitution of p53 expression in a nonproducer Ab-MuLV-transformed cell line by transfection of a functional p53 gene. *Cell* 38: 119-126, 1984.
87. Ben David Y, Prideaux VR, Chow V, Benchimol S and Bernstein A: Inactivation of the p53 oncogene by internal deletion or retroviral integration in erythroleukemic cell lines induced by Friend leukemia virus. *Oncogene* 3: 179-185, 1988.
88. Mowat M, Cheng A, Kimura N, Bernstein A and Benchimol S: Rearrangements of the cellular p53 gene in erythroleukaemic cells transformed by Friend virus. *Nature* 314: 633-636, 1985.
89. Wolf D and Rotter V: Major deletions in the gene encoding the p53 tumor antigen cause lack of p53 expression in HL-60 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 790-794, 1985.
90. Carr AM: Cell cycle. Piecing together the p53 puzzle. *Science* 287: 1765-1766, 2000.
91. Meek DW: Mechanisms of switching on p53: a role for covalent modification? *Oncogene* 18: 7666-7675, 1999.
92. Prives C and Hall PA: The p53 pathway. *The Journal of pathology* 187: 112-126, 1999.
93. Giaccia AJ and Kastan MB: The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. *Genes Dev* 12: 2973-2983, 1998.
94. Sherr CJ and Weber JD: The ARF/p53 pathway. *Curr Opin Genet Dev* 10: 94-99, 2000.
95. Lowe SW and Lin AW: Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* 21: 485-495, 2000.
96. Menendez D, Inga A and Resnick MA: The expanding universe of p53 targets. *Nat Rev Cancer* 9: 724-737, 2009.
97. el-Deiry WS, Harper JW, O'Connor PM, et al.: WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer research* 54: 1169-1174, 1994.

98. Miyashita T and Reed JC: Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80: 293-299, 1995.
99. Johmura Y and Nakanishi M: Multiple facets of p53 in senescence induction and maintenance. *Cancer Sci* 107: 1550-1555, 2016.
100. Zheltukhin AO and Chumakov PM: Constitutive and induced functions of the p53 gene. *Biochemistry (Mosc)* 75: 1692-1721, 2010.
101. Ginsberg D, Mechta F, Yaniv M and Oren M: Wild-type p53 can down-modulate the activity of various promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 9979-9983, 1991.
102. Tlsty TD: Genomic instability and its role in neoplasia. *Curr Top Microbiol Immunol* 221: 37-46, 1997.
103. Wahl GM, Linke SP, Paulson TG and Huang LC: Maintaining genetic stability through TP53 mediated checkpoint control. *Cancer Surv* 29: 183-219, 1997.
104. Lane DP: Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 358: 15-16, 1992.
105. Haupt Y, Maya R, Kazaz A and Oren M: Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 387: 296-299, 1997.
106. Honda R, Tanaka H and Yasuda H: Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett* 420: 25-27, 1997.
107. Levine RL and Carroll M: A common genetic mechanism in malignant bone marrow diseases. *N Engl J Med* 360: 2355-2357, 2009.
108. Soussi T and Lozano G: p53 mutation heterogeneity in cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 331: 834-842, 2005.
109. Hussain SP and Harris CC: p53 mutation spectrum and load: the generation of hypotheses linking the exposure of endogenous or exogenous carcinogens to human cancer. *Mutat Res* 428: 23-32, 1999.
110. Bouaoun L, Sonkin D, Ardin M, et al.: TP53 Variations in Human Cancers: New Lessons from the IARC TP53 Database and Genomics Data. *Hum Mutat* 37: 865-876, 2016.
111. Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, et al.: The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov* 2: 401-404, 2012.
112. Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, et al.: Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal* 6: p11, 2013.
113. Jacobsen F, Ashtiani SN, Tennstedt P, et al.: High c-MET expression is frequent but not associated with early PSA recurrence in prostate cancer. *Exp Ther Med* 5: 102-106, 2013.
114. Muller J, Ehlers A, Burkhardt L, et al.: Loss of pSer2448-mTOR expression is linked to adverse prognosis and tumor progression in ERG-fusion-positive cancers. *Int J Cancer* 132: 1333-1340, 2013.
115. Wilczak W, Rashed S, Hube-Magg C, et al.: Up-regulation of mismatch repair genes MSH6, PMS2 and MLH1 parallels development of genetic instability, and is linked to tumor aggressiveness and early PSA recurrence in prostate cancer. *Carcinogenesis*, 2016.
116. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, et al.: Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet* 25: 25-29, 2000.
117. Romeijn RJ, Gorski MM, van Schie MA, et al.: Lig4 and rad54 are required for repair of DNA double-strand breaks induced by P-element excision in *Drosophila*. *Genetics* 169: 795-806, 2005.
118. Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, et al.: Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science* 310: 644-648, 2005.
119. Barbieri CE, Baca SC, Lawrence MS, et al.: Exome sequencing identifies recurrent SPOP, FOXA1 and MED12 mutations in prostate cancer. *Nat Genet* 44: 685-689, 2012.

120. Grasso CS, Wu YM, Robinson DR, et al.: The mutational landscape of lethal castration-resistant prostate cancer. *Nature* 487: 239-243, 2012.
121. Matoso A and Epstein JI: Grading of Prostate Cancer: Past, Present, and Future. *Curr Urol Rep* 17: 25, 2016.
122. Gordetsky J and Epstein J: Grading of prostatic adenocarcinoma: current state and prognostic implications. *Diagn Pathol* 11: 25, 2016.
123. Sauter G, Steurer S, Clauditz TS, et al.: Clinical Utility of Quantitative Gleason Grading in Prostate Biopsies and Prostatectomy Specimens. *Eur Urol* 69: 592-598, 2016.

Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung des Prostata-Prognose-Array (TMA)

Tabelle 2: Liste der molekularen Datenbank über die Proteine die mittels Immunohistochemie (IHC) am Prognose-TMA untersucht wurden.

Tabelle 3: Liste der molekularen Datenbank zu den chromosomalen Regionen die mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) am Prognose-TMA untersucht wurden.

Tabelle 4: Verwendete Reagenzien und Kits

Tabelle 5: verwendete Geräte

Tabelle 6: verwendete Verbrauchsmaterialien

Abbildung 1: Biologische Prozesse in denen p53 eine wesentliche Rolle spielt.

Abbildung 2: Assoziation des p53-Status mit 10 DNA-Reparatur-Proteinen.

Abbildung 3: Assoziation des p53-Status mit 21 Zell-Homöostase regulatorischen.

Abbildung 4: Assoziation des p53-Status mit 19 Transkriptionskontroll-Proteinen.

Abbildung 5: Assoziation des p53-Status mit 22 Metabolismus-Proteinen.

Abbildung 6: Assoziation des p53-Status mit 11 Zell-Adhäsions-, -Gestalts- und –Motilitäts-Proteinen.

Abbildung 7: Häufige Deletionen die mit dem p53-Status assoziiert sind.

Abbildung 8: Häufige Deletionen die nicht mit dem p53-Status assoziiert sind

Abkürzungsverzeichnis

AJCC	American Joint Committee on Cancer (AJCC)	LB	Lysogeny Broth
AHF	aktive harmonische Filter	m	moderat
BACs	Bacterial Artificial Chromosome, bakterielles artifizielles Chromosom	n	negativ
Bez.	Bezeichnung	N	Nodes, Lymphknoten
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol	p.	positiv
Del.	Deletion	pT	pathologisches Tumorstadium
DNA	deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure	pN	pathologischer der Status Lymphknoten
dH₂O	destilliertes Wasser	PSA	Prostata spezifisches Antigen
dUTPs	Abott, Illinois, USA	Rpm	rounds per minute/ Umdrehungen pro Minute
E.coli	Escherichia coli	s	stark
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	SSC	Sodium/ Sodium citrate, Natrium/ Natriumcitrat
H/E-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	SV40	Simian Virus 40
HPV	Human Papillomvirus	TMA	Tissue micro array, Gewebemikroarray
IHC	Immunohistochemie	w	weak
EINHEITEN			
%	Prozent		
°C	Celsius		
g	Gramm		
mg	Milligramm		
ml	Milliliter		
n	Anzahl		
rpm	revolutions per minute, Umdrehungen pro Minute		
μ	Mikro		
μg	Mikrogramm		
μl	Mikroliter		

Anhang

Tabelle 4: Verwendete Reagenzien und Kits

Reagenzien / Kits	Firma
20x SSC	Abbot, Ludwigshafen
CEP 10 Spectrum Green	Abbot, Ludwigshafen
CEP 17 Spectrum Orange	Abbot, Ludwigshafen
CEP 6 Spectrum Orange	Abbot, Ludwigshafen
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich, München
COT Human DNA	Roche, Grenzach-Wyhlen
Dako REAL™ Antibody Diluent (S2022)	Dako, Hamburg
Dako REAL™ EnVision™ Detection System, Peroxidase/DAB, Rabbit/Mouse	Dako, Hamburg
Dako REAL™ Hematoxylin (S2020)	Dako, Hamburg
Dako REAL™ Peroxidase-Blocking Solution (S2023)	Dako, Hamburg
Dako Wash Buffer (S3006)	Dako, Hamburg
Dextransulfat (Natriumsalz)	Roth, Karlsruhe
Diaminobenzidin	Roth, Karlsruhe
EDTA	Sigma-Aldrich, München
Ethanol 80% (vergällt)	VWR, Darmstadt
Ethanol 96% (vergällt)	VWR, Darmstadt
Ethanol Ph Eur (1 Liter)	VWR, Darmstadt
Formamid pro analysi	Merck, Darmstadt
Immersol	Zeiss, Oberkochen
Isopropanol 100%	Merck, Darmstadt
LB broth, Miller	Sigma-Aldrich, München
Mounting Medium with DAPI (VECTASHIELD)	Vector Laboratories
Natrium-Citrat	Sigma-Aldrich, München
Nick Translations Reagent Kit	Abbot, Ludwigshafen
NP-40	Abbot, Ludwigshafen

NucleoBond® BAC 100	Macherey-Nagel, Düren
nukleasefreies Wasser	Sigma-Aldrich, München
Orange dUTP (50 nmol, lyophilisiert)	Abbot, Ludwigshafen
Pretreatment Reagent 500 ml	Abbot, Ludwigshafen
Protease Buffer 500 ml	Abbot, Ludwigshafen
Protease I 500 mg	Abbot, Ludwigshafen
QIAquick Nucleotide Removal Kit (50)	Qiagen, Venlo, Niederlande
Reinigungsbenzin	Biesterfeld Chemiedistribution GmbH
Tris	Sigma-Aldrich, München
Wasserstoffperoxid	VWR, Darmstadt
Xylol	J. T. Baker, Center Valley, USA

Tabelle 5: verwendete Geräte mit Hersteller

Gerät	Firma
Bunsenbrenner, Fireboy	Tecnomara, Zürich, Schweiz
Concentrator Plus	Eppendorf, Hamburg
Dako-Immunfärbeautomat	Dako, Hamburg
Dampfgarer (Multigourmet)	Braun, Kronberg
Folien-Eindecker	Sakura, Heppenheim
Heizplatte	MEDAX GmbH & Co.KG, Neumünster
Heizrührer RCT basic	IKA® Labortechnik
Inkubator	GFL (Gesellschaft für Labortechnik GmbH), Burgwedel
Lab Thermometer IP65LT-101	TFA Dostmann GmbH + Co. KG, Wertheim-Reicholzheim
Lichtmikroskop, Axio Imager.A1	Zeiss, Oberkochen
MS1 Minishaker	IKA® Labortechnik, Staufen
Nanodrop ND 1000	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
ph-Meter 766 Calimatic	Knick , Berlin
Primus	ALS, Jena
Rotor- JA-14	Beckmann, Krefeld
Rotor- JA-20	Beckmann, Krefeld
Thermobrite™	Abbot, Ludwigshafen
Wasserbäder	GFL (Gesellschaft für Labortechnik GmbH), Burgwedel
Zentrifuge, Beckmann J2-21M/E	Beckmann, Krefeld
Zentrifuge, Biofuge 13	Heraeus Thermo Scientific, Hanau

Tabelle 6: verwendete Verbrauchsmaterialien mit Hersteller

Material	Firma
Deckgläser No.1 24 x 60 mm	Marienfeld, Lauda Königshofen
Fixogum	Marabu, Tamm
Safe-Lock Reaktionsgefäße, amber	Eppendorf (Hamburg)
Safe-Lock Reaktionsgefäße, amber, 0,5 ml	Eppendorf (Hamburg)
SafeSeal Reagiergefäß 1,5 ml aus PP	Sarstedt (Nümbrecht-Rommelsdorf)
SafeSeal Reagiergefäß 2 ml	Sarstedt (Nümbrecht-Rommelsdorf)

Danksagung

Meinen speziellen Dank möchte ich Herrn Professor Dr. med. Guido Sauter für die Ermöglichung des Dissertationsthemas aussprechen.

Ich bedanke mich ganz besonders bei meiner Betreuerin Dr. rer. nat. Martina Kluth für ihr Vertrauen und für ihre Hilfsbereitschaft. Sie stand mir mit ihre Fachwissen und wissenschaftlicher Kompetenz immer zur Seite. Außerdem möchte ich mich bei Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Ronald Simon für seine Geduld, fachliche Unterstützung und Motivation bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, vor allem meiner Mutter und meinem Vater für die unendliche Motivierung und ihrer Unterstützung. Außerdem Danke ich meinem Mann dafür, dass er mich immer unterstützt und immer für mich da ist.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Eidesstattliche Erklärung

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 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.

Ort, Datum

Unterschrift