

**Universitätsklinikum Hamburg - Eppendorf
Institut für Pathologie
Abteilung: Molekularpathologie**

Direktor: Professor Dr. med. Guido Sauter

**Ausdehnung der 16q-Deletion während der
Progression des Prostatakarzinoms**

Dissertation:

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

Vorgelegt von:

Jazan Omari

aus Berlin

Hamburg 2017

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 02.11.2017

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Guido Sauter

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter: Prof. Dr. Tobias Lange

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Prostatakarzinom.....	1
1.2	Genetische Veränderungen des Prostatakarzinoms	2
1.3	Deletionen als potentielle Prognosemarker beim Prostatakarzinom	4
1.4	Die 16q-Deletion beim Prostatakarzinom	5
1.5	Zielsetzung der Arbeit.....	7
2	Material und Methoden	8
2.1	Patientenkollektiv/ Heterogenitäts-Gewebemikroarray (TMA)	8
2.2	Escherichia Coli Klone	11
2.3	Reagenzien und Kits.....	11
2.4	Geräte	13
2.5	Verbrauchsmaterialien	14
2.6	Software und Datenbanken.....	15
2.7	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)	15
2.7.1	Herstellung der 16q-FISH-Sonden	15
2.7.2	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung der TMAs	17
2.8	Mikroskopische Auswertung	19
2.9	Bestimmung der 16q-Deletionslänge	21
3	Ergebnisse.....	22
3.1	Auswertbarkeit der FISH-Analyse	22
3.2	Heterogenität der 16q-Deletion beim Prostatakarzinom	22
3.3	Vergleich der 16q-Deletionsrate im Heterogenitäts-TMA und Prognose-TMA	24
3.4	Potentielle Ausdehnung der 16q-Deletionsgröße innerhalb der Tumorprogression	25
4	Diskussion	29
5	Zusammenfassung	34
6	Abstract	35
7	Tabellen – und Abbildungsverzeichnis	36
7.1	Abbildungsverzeichnis	36
7.2	Tabellenverzeichnis	36
8	Abkürzungsverzeichnis	37
9	Literaturverzeichnis.....	40
10	Danksagung.....	44
11	Lebenslauf	45
12	Eidesstaatliche Erklärung.....	46

1 Einleitung

1.1 Das Prostatakarzinom

Das Prostatakarzinom ist vor Lungen- und Darmkrebs der häufigste bösartige Tumor beim Mann. In Deutschland sind jährlich etwa 64.500¹, in den westlichen Industrieländern über 640.000² Neuerkrankungen an diesem Tumor zu verzeichnen. Das Risiko am Prostatakarzinom zu erkranken, steigt mit zunehmenden Alter³. Allerdings werden heute insbesondere Tumoren in frühen Stadien diagnostiziert³. Grund hierfür und für die damit einhergehende häufig gute Prognose des Prostatakarzinoms ist vor allem die verbesserte Frühdiagnostik im Rahmen der Vorsorgenuntersuchung. Zur Früherkennung bzw. zur Basisdiagnostik des Prostatakarzinoms gehört die digital-rektale Untersuchung (DRU) sowie die Bestimmung des Prostata-spezifisches-Antigen (PSA)- Wertes im Serum³. Derbe Areale beim Tastbefund sind karzinomverdächtig⁴. Das PSA gilt als organspezifischer Marker, da es nur von den Epithelzellen der Prostata hergestellt wird. Eine Erhöhung des PSA Wertes kann jedoch auch durch andere gutartige Prostataerkrankungen wie z.B. der benignen Hyperplasie oder einer Entzündung hervorgerufen werden⁵. Im Allgemeinen gilt jedoch ein Anstieg des PSA-Wertes auf >4ng/ml als Karzinom verdächtig⁶. Zur Diagnosesicherung von suspekten Tastbefunden oder erhöhten PSA-Werten gilt als Goldstandard die transrektale, sonographiegesteuerte Entnahme von 10 - 12 entnommen Gewebezyylinder aus der Prostata und die histologische Beurteilung des entnommen Gewebes mittels Gleason-Grad³. Der Gleason-Grad gibt Informationen über die Drüsenmorphologie und lässt damit Rückschlüsse auf die Aggressivität des Tumors zu. Der Gleason Grad 1 beschreibt eine sehr gut differenzierte Drüsenarchitektur, die dem gesunden Prostatagewebe vergleichsweise ähnlich ist. Beim Gleason Grad 5 ist keine Drüsenstruktur mehr erkennbar. Aus den beiden häufigsten Gleason-Graden wird dann der Gleason-Score gebildet (z.B. 3+4)⁷. Abhängig vom Gleason-Score, dem Tumorgehalt in den Biopsiestanzen, dem klinischen Tumorstadium, dem präoperativen PSA-Wert und dem Allgemeinzustand des Patienten erfolgt die Therapieplanung. Die primäre Therapie des lokal begrenzten Prostatakarzinoms ist die radikale Prostatektomie, mit den putativen Nebenwirkungen der Inkontinenz und Impotenz⁸. Jedoch kann bei Patienten mit niedrig malignen Tumoren (Gleason-Score ≤3+3, PSA < 10ng/ml) auch eine aktive Überwachung (Active Surveillance) durchgeführt werden. Dabei werden die Patienten innerhalb der ersten zwei Jahre nach Diagnosestellung alle drei Monate mittels DRU und Bestimmung des PSA-Wertes kontrolliert³. Ziel dabei ist das Aufschieben einer invasiven Therapie bis zur tatsächlichen Tumorprogression. Diese „Therapieform“ basiert auf der Tatsache, dass es sich beim Prostatakarzinom in der Regel um einen langsam wachsenden Tumor handelt, Lediglich 10 % der Erkrankten werden

symptomatisch und nur 3 % der Männer versterben an ihrer Tumorerkrankung³. Ein bestehendes Problem bei der Diagnostik und Therapie des Prostatakarzinoms ist allerdings die Einschätzung des Progressionsrisikos der Tumoren. Insbesondere in der großen Gruppe der Karzinome mit einem Gleason-Score von 3+4 und 4+3 ist eine sichere Einschätzung der Aggressivität der Tumoren nicht möglich⁹. Aus diesem Grund entscheiden sich viele Männer mit einem eigentlich nicht therapiebedürftigen Karzinom für eine Ektomie, um das Risiko einer Progression sicher auszuschließen. Hieraus erschließt sich, von welcher Bedeutung es ist, Prostatakarzinome frühzeitig in aggressive, akut behandlungsbedürftige Tumoren und in indolente, nicht akut behandlungsbedürftige Karzinome einteilen zu können. Große Hoffnung wird daher in die Etablierung von molekularen Prognosemarkern gesetzt, welche die vorhandenen Prognoseparameter, wie zum Beispiel den Gleason-Score, bei der Einschätzung der Aggressivität der Tumoren unterstützen. Daher ist es essentiell die Genetik und Biologie der Prostatakarzinome besser zu verstehen.

1.2 Genetische Veränderungen des Prostatakarzinoms

Das Prostatakarzinom stellt auf genetischer Ebene und damit auch tumorbiologisch eine Besonderheit dar. Anders als die meisten soliden Tumoren, ist das Prostatakarzinom vor allem auf chromosomale Deletionen und Translokationen zurückzuführen¹⁰. Nur selten sind inaktivierenden Punktmutationen in klassischen Tumorsuppressorgenen (z.B. TP53) oder Amplifikationen von bekannten Onkogenen (z.B. MYC) zu finden^{9; 11}.

Die am häufigsten vorliegende genetische Veränderung ist, die vor zehn Jahren identifizierte Fusionen des androgen-abhängigen Gens TMPRSS2 und des Transkriptionsfaktors ERG, die TMPRSS2:ERG Fusion. Durch diese Fusion, die auf einer Deletion in der Region 21q22 zurückzuführen ist, wird der Transkriptionsfaktor ERG über den TMPRSS2-Promotor androgenabhängig aktiviert. Die ERG-Expression ist in circa 50 % aller Prostatakarzinome nachweisbar. In den „gut“ differenzierten Tumoren (Gleason-Score \leq 3+4) ist allerdings eine deutliche Altersabhängigkeit zu beobachten. Hier tritt die TMPRSS2:ERG Fusion bei circa 90 % der Patienten auf, die bei der Erstdiagnose nicht älter als 50 Jahre waren¹². Auf die Prognose der Patienten hat die TMPRSS2:ERG Fusion jedoch keinen Einfluss und ist daher als Prognosemarker ungeeignet.^{12;13} Die ERG-Expression in den Karzinomzellen führt allerdings zu einer Deregulation von mehr als 1.600 Genen¹⁴. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die TMPRSS2:ERG Fusion zu Änderungen des molekularen Hintergrunds der Zelle¹⁴ führt und damit sogar bestimmte Veränderungen begünstigt¹². Auf molekularer Ebene wird das Prostatakarzinom daher häufig in ERG-positive und ERG-negative Untergruppen eingeteilt. Studien konnten zeigen, dass die meisten genetischen und molekularen Veränderungen des Prostatakarzinoms mit einer ERG-Positivität⁹ bzw. ERG-

Negativität⁹ assoziiert sind. Weitere Translokationen sind beim Prostatakarzinom zwar bekannt, spielen jedoch, verglichen mit der TMPRSS2:ERG Fusion oder mit anderen häufigen Deletionen, nur eine untergeordnete Rolle(<5%)¹⁵.

DNA-Verluste (Deletionen) verschiedener chromosomaler Regionen kommen in circa 10 - 40 % aller Prostatakarzinome vor^{11; 14; 16}. Zu den häufigsten Verlusten zählen Deletionen in den Bereichen 8p, 6q, 13q, 16q, 12p, 10q23, 5q und 3p13⁹ (siehe Tabelle 1). Ein charakteristisches Merkmal der meisten Deletionen ist, dass es nicht zur Deletions-bedingten Inaktivierung von wenigen Genen kommt, sondern die häufig großen Bereiche eines chromosomalen Arms von der genetischen Veränderung betroffen sind. Das bedeutet, dass die meisten Deletionen die sogenannte minimal deletierte Region überschreiten und damit eine Vielzahl von Genen einschließen. Dies ist auch der Grund für die Annahme, dass die meisten Deletionen nicht zur Inaktivierung eines bestimmten Tumorsuppressorgens dienen, sondern das eine Vielzahl von Tumor-relevanten Genen in den Einzelnen von den Deletionen betroffenen Regionen lokalisiert sind. Einige Tumorsuppressorgene konnten allerdings bereits identifiziert werden. Dazu zählen die bekannten Tumorsuppressorgene PTEN auf Chromosom 10q23, RB1 auf Chromosom 13q14, CDKN1B auf Chromosom 12p13 und TP53 auf Chromosom 17p13.

Tabelle 1: Häufige Deletionsregionen beim Prostatakarzinom. Taylor et al. 2010: aCGH-Studie an 181 Prostatatumoren, Williams et al. 2014: CGH und aCGH Metaanalyse an 662 Prostata- tumoren, Sun et al. 2007: aCGH Metaanalyse an 872 Prostatatumoren. (Modifiziert von Kluth Diss)

Taylor et al.		Williams et al.		Sun et al.	
Region	(%)	Region	(%)	Region	(%)
8p21.3-p11.21	78,3	8p23.3-p11.21	61,8	8p23.1-p21.1	34,1
6q12-q22.3	62,4	13q12.3-q31.1	52,9	13q14.13-q22.1	28
12p13.31-p12.3	61,3	16q11.2-q24.3	52,3	6q14.1-q21	22,2
13q12.11-q14.2	12,9-47,4	6q12-q22.33	46,7	16q13-q24.3	17,9
16q23.1-q24.1	37,6	5q11.2-q23.3	42,9	5q13.3-q21.2	13,1
10q23.31-q24.33	12,4-34,0	17p13.3-p11.2	37	18q12.1-q23	12,8
2q14.3-q22.3	29,9	10q23.2-q26.12	36,3	2q21.2-q22.3	12,4
5q11.2-q22.2	11,9-26,3	18q12.1-q23	32,8	10q23.1-q25.3	11,8
17p13.1	26,3	2q14.1-q24.2	29,6	4q21.3-q31.3	7,6
3p13	21,2	12p13.31-p12.3	28,9	15q21.1-q25.3	6,7
17q21.31	12,4-14,9	3p13	21,9	12p13.32-p11.23	6
22q12.1-q13.31	13,9	17q21.2-q21.31	21,6		

1.3 Deletionen als potentielle Prognosemarker beim Prostatakarzinom

Zur Einschätzung der Progression eines Prostatakarzinom werden die etablierten Prognoseparametern wie der Gleason Score, der PSA-Wert und das TNM Stadium herangezogen werden³. Die TNM-Klassifikation beschreibt die Ausdehnung des Primärtumors (T), die Metastasierung der regionären Lymphknoten (N) sowie das Vorhandensein von Fernmetastasen (M)¹⁷. Nachteil ist, dass diese in der Regel erst postoperativ erhoben werden können, d.h. zu einem Zeitpunkt, an dem eine Therapieentscheidung für den Patienten längst gefallen ist. Der Gleason-Score, als bisher stärkster bekannter prognostischer Marker, weist den entscheidenden Vorteil auf, dass er bereits im Biopsiematerial bestimmt werden kann¹⁸. Nachteilig ist jedoch einerseits die interobserver Varianz¹⁸ und andererseits das häufige „Upgrading“ des Gleason Scores nach Prostatektomie¹⁹. Dies bedeutet, dass der Gleason-Score im Biopsiematerial nicht zwingend dem „wahren“ Gleason-Score im Ektomiepräparat entspricht. Das allerdings die Einschätzung des Progressionsrisikos starke Auswirkungen auf die Therapiewahl hat – von Active Surveillance bis hin zur Ektomie –macht deutlich, wie dringend prognostische Marker benötigt werden, die dabei helfen können vor der Therapieentscheidung das Prostatakarzinom zuverlässig in akut behandlungsbedürftig und nicht akut behandlungsbedürftig einzustufen.

Große Hoffnung wird dabei in Tumor-relevante genetische Veränderungen als Prognosemarker gesetzt. Die Kriterien, die solch ein Prognoseparameter erfüllen sollte sind:

1. Nachweis mittels gängiger pathologisch-molekulargenetischer Verfahren bereits am Biopsiematerial, 2. Rekurrente bzw. häufige Veränderung, 3. Homogene Verteilung der Veränderung im Tumorgewebe⁹. Leider haben Studien gezeigt, dass die TMPRSS2:ERG Fusion als häufigste genetische Veränderung beim Prostatakarzinom keine Assoziation zur Prognose besitzt^{12; 13}. Anders verhält es sich mit den Deletionen von unterschiedlichen chromosomalen Regionen. Hier konnten in den letzten Jahren Studien für einige der häufigsten Deletionsregionen zeigen, dass der Verlust des chromosomalen Materials sowohl mit einem frühen PSA-Rezidiv als auch mit einem ungünstigen Phänotyp einhergeht. Zu diesen prognostisch relevanten Deletionen zählen 5q21²⁰, 8p21¹⁵, 10q23²¹, 17p13²², 3p13²³, 6q15²⁴, 12p¹⁵ und 16q¹⁵. Zusätzlich dazu konnte innerhalb der Arbeitsgruppe am Institut für Pathologie anhand der 6q und 16q Deletion gezeigt werden, dass die Größe der Deletion einen Einfluss auf die Prognose hat. Genauer gesagt haben Patienten deren Tumoren eine sehr große Deletion von mehreren Megabasen in den Bereichen 6q oder 16q aufweisen eine deutlich ungünstigere Prognose als Patienten deren Tumoren nur eine kleine Deletion von gegebenenfalls nur wenigen Kilobasen auf dem q-Arm des Chromosoms 6 oder 16 haben^{9;15} (persönliche Kommunikation Martina Kluth). Wie diese unterschiedlichen Deletionsgrößen entstehen ist jedoch noch unklar. Bezüglich der heterogenen Verteilung der prognostisch

relevanten Deletionen ist bisher jedoch nur wenig bekannt. Grund dafür ist, dass zur Bestimmung der Heterogenität idealerweise der gesamte Tumor bzw. mehrere unterschiedliche Areale untersucht werden sollten. Am Institut für Pathologie konnte bereits anhand des dort existierenden Heterogenitäts-TMA gezeigt werden, dass die PTEN Deletion auf Chromosom 10q23 eine ausgeprägte Heterogenität aufweist, was die Anwendbarkeit der PTEN Deletion als Prognosemarker einschränkt²¹. Ähnliche Ergebnisse wurden für die 6q-Deletion gefunden, welche eine heterogene Verteilung in circa 50 % aller untersuchten Tumoren aufzeigte. Für die meisten Deletionsregionen ist der Status der Heterogenität jedoch bisher nicht bekannt.

Obwohl zahlreiche Studien in den letzten Jahren durchgeführt wurden, konnte bis heute kein molekularer Prognose-Marker identifiziert und eingeführt werden. Grund für die fehlende klinische Einführung solcher prognostische Marker waren lange Zeit die zu kleinen Patientenkollektive für die dafür notwendige Forschung.

1.4 Die 16q-Deletion beim Prostatakarzinom

Trotz der hohen Inzidenz ist der molekulare Mechanismus der Tumorentstehung und der Progression beim Prostatakarzinom noch weitestgehend unklar. Mehrere Studien konnten allerdings bereits zeigen, dass Verluste verschiedener chromosomaler Regionen bei der Entstehung bzw. der Progression eine große Rolle spielen könnten^{11; 14; 16}. Zu den am häufigsten deletierten Bereichen zählt die 16q-Region²⁵⁻²⁷. Die 16q-Deletion kommt laut Studien in 6-75 % aller Prostatakarzinome vor. Die Varianz in der Deletionsrate kann dabei vor allem durch die Verwendung von unterschiedlichen Methoden zur Messung des Kopiezahlstatus als auch durch die Anzahl der untersuchten Tumoren erklärt werden. Studien, die den Verlust der Heterozygotie (loss of heterozygosity, LOH) untersuchten, konnten einen 16q-Kopiezahlverlust in 42-75 % der 48 bzw. 32 untersuchten Tumoren finden^{29; 36}. In zwei großen Metanalysen an 872 und 602 Tumoren wurde eine 16q-Deletionsrate von 17,9 %¹⁶ und 52,3 %¹¹ gemessen. In der großen aCGH Studie von Taylor et al. betrug die 16q-Deletionsrate 37,6 % in 181 untersuchten Tumoren¹⁴. In zwei FISH-Analysen an 53 und 51 Patienten konnte eine 16q Deletionsrate von 35 %²⁸ und 55 %²⁹ gezeigt werden. In einer großen FISH-Analyse zur Untersuchung der 16q23 Deletion an 3.800 Tumoren konnte innerhalb der Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass die 16q-Deletion in circa 20 % aller Prostatakarzinome vorkommt. Studien konnten sowohl in Primärtumoren als auch in metastasierten Tumoren Verluste im Bereich 16q nachweisen und fanden außerdem eine Assoziation zu einem aggressiveren Verhaltensmuster und einer tendenziell schlechteren Prognose³⁰⁻³². Auch innerhalb der Arbeitsgruppe wurde beschrieben, dass die 16q Deletion mit einem höherem Gleason-Score, einer lymphogenen Metastasierung und

der Wahrscheinlichkeit eines frühen PSA-Rezidivs in Zusammenhang steht. Demzufolge könnten chromosomale Verluste im Bereich 16q eine wesentliche Rolle bei der Progression des Prostatakarzinoms zugeschrieben werden.

Verluste auf dem Chromosom 16 betreffen überwiegend den langen Arm des Chromosoms^{25; 25; 26; 33} und hier in der Regel unterschiedlich große Bereiche. aCGH-Studien haben zum Beispiel gezeigt, dass die 16q-Deletion zwischen 2 und 20 Megabasen des langen Armes betreffen kann^{14; 23; 34; 35}. Neben Veränderungen, die den kompletten 16q Arm betreffen lässt sich die Deletionsregion vor allem auf die distalen Anteile des Chromosoms beschränken. Die 16q24 Deletion am Telomer stellt die häufigste Deletionsvariante dar und korreliert signifikant mit einem aggressiven Tumorverhalten³¹. Eine nähere Definition der Deletionsregion lieferten die Ergebnisse von Suzuki et al und Latil et al. Hier wurde gezeigt, dass sich die Deletionen vorwiegend auf drei voneinander unabhängigen Regionen konzentrieren^{32; 36}, deren proximale Deletionsregion bei 16q21.1 und distale Deletionsregion bei 16q24.3 lokalisiert ist. Innerhalb der Arbeitsgruppe konnte mittels FISH-Analyse an über 3.000 Prostatatumoren allerdings gezeigt werden, dass es sich nicht um drei unabhängige Deletionsregionen handelt, sondern dass vielmehr sehr kleine Deletionen (16q24), mittelgroße Deletionen (16q23-q24) und große Deletionen (16q21-q24) existieren. Interessanterweise zeigten Patienten mit Tumoren die eine große 16q21-q24 Deletion hatten die deutlich schlechteste Prognose im Vergleich zu Patienten deren Tumoren nur eine mittelgroße oder kleine Deletion hatten. Es liegt daher die Vermutung nahe, dass durch die 16q-Deletion eine Vielzahl von potentiellen Tumorsuppressorgenen inaktiviert wird. Gute Kandidaten wären beispielweise CDH1 (E-Cadherin) auf 16q22³⁷, WWOX auf 16q23³⁸, MAF auf 16q23³⁸ sowie FOXF1 auf 16q24³⁸ um nur einige potentielle tumorsuppressive Gene zu nennen.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

In früheren Studien der Arbeitsgruppe am Institut für Pathologie bereits gezeigt werden, dass Deletionen im Bereich 16q23 die Wahrscheinlichkeit eines PSA-Rezidivs erhöhen¹⁵ und dass das Risiko für das Rezidiv mit der Größe der 16q-Deletion ansteigt¹⁵. Unklar ist, wie die unterschiedlichen Größen der 16q-Deletion entstehen und ob es sich bei der 16q-Deletion eher um ein frühes oder spätes Ereignis innerhalb der Tumorprogression handelt. Weiterhin ist nichts darüber bekannt, wie homogen 16q Deletionen in Prostatakarzinomen vorkommen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher:

1. Die Verteilung (Heterogenität) der 16q-Deletion im Tumor zu prüfen und
2. Zu untersuchen, ob die unterschiedlichen Größen der 16q-Deletion de novo entstehen oder ob der Deletionsbereich sich während der Tumorprogression ausdehnt.

Zur Beantwortung dieser Frage wurde der Kopiezahlstatus von drei Regionen des Chromosoms 16 (16q21, 16q23 und 16q24) mittels FISH am Heterogenitäts-TMA des Instituts für Pathologie untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv/ Heterogenitäts-Gewebemikroarray (TMA)

Für die Frage, ob die 16q-Deletion im Verlauf der Tumorprogression wächst oder ob die Länge der 16q-Deletion während der Tumorentwicklung konstant bleibt, wurden Karzinomproben untersucht, die von Patienten in der Klinik für Urologie und der Martiniklinik des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf stammen, bei denen zwischen 1992 und 2012 eine Prostatektomie durchgeführt wurde.

Die Karzinomproben wurden in Form eines Gewebemikroarrays (tissue microarray, TMA) untersucht, der bereits am Institut für Pathologie des UKE existierte und im Folgenden kurz beschrieben wird. Der Heterogenitäts-TMA umfasst 3.170 Prostatakarzinomproben von 317⁹ Patienten. Die Anzahl der Tumorfoci pro Prostata wurden nach Wise et al. bestimmt. Demnach wurde von einem unifokalen Tumor ausgegangen, wenn der Abstand zwischen zwei Tumorarealen ≤ 3 mm war. Zur Herstellung des TMAs wurden ausschließlich als unifokal determinierte Tumoren ausgewählt, die mehrere Tumorblöcke umfassten. Die ausgewählten Tumorfoci hatten einen mittleren Durchmesser von 68,0 mm (maximal 135 mm). Pro Patient wurden zehn verschiedene Tumorareale aus mehreren Gewebelöcken eines Tumorfokus ausgewählt und pro Tumorareal eine 0,6 mm durchmessende Tumorstanze entnommen (siehe Abbildung 1). Die zehn Gewebestanden wurden nebeneinander in einen TMA-Block platziert. Insgesamt waren die Gewebeproben auf sieben TMA-Blöcke verteilt, die zwischen 17 und 50 Tumoren enthielten. Die genaue Zusammensetzung des TMAs bezüglich Alter der Patienten und klinisch – pathologischen Parametern ist in der Tabelle 2 dargestellt. Für die Fluoreszenz in-situ Hybridisierung (FISH) wurden 4 μ m dicke Schnitte der TMA-Blöcke hergestellt. Um sicher zu stellen, dass ausreichend Tumorzellen in den Gewebespots für die FISH-Analyse vorhanden waren, wurde eine immunhistochemische 34 β E12 und AMACR Färbung durchgeführt. Diese wurde dann von einer Pathologin des Instituts für Pathologie (PD Dr. Sarah Minner und Dr. Maria Christina Tsourlakis) ausgewertet. Alle Gewebespots die keine oder nur sehr wenige Tumorzellen enthielten wurden aus der weiteren Analyse ausgeschlossen.

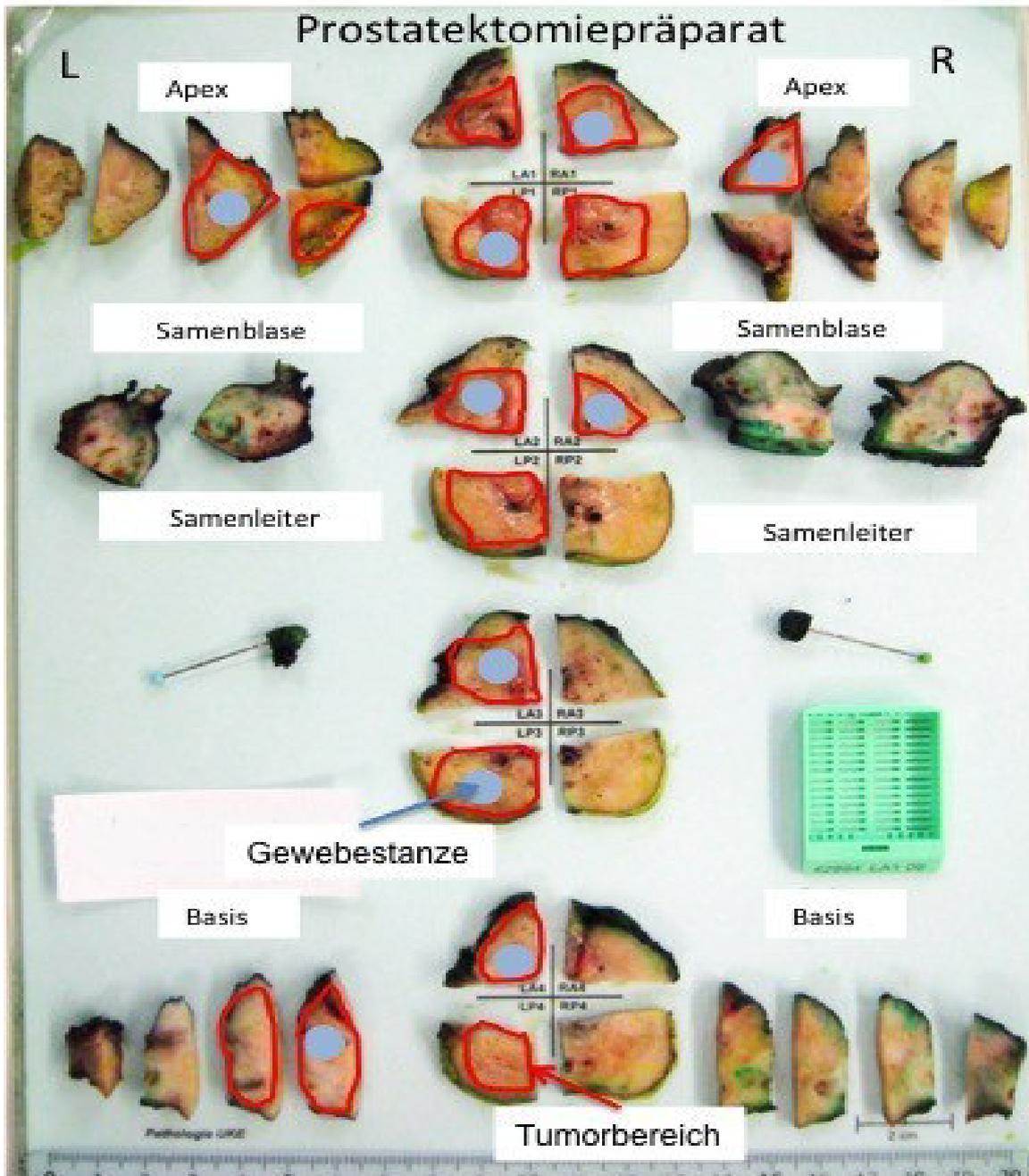


Abbildung 1: Heterogenitätsarray (Abbildung zur Verfügung gestellt vom Institut für Pathologie, UKE)

Tabelle 2: Patienten – Kollektiv des Heterogenitäts – Gewebemikroarray (TMA)

	Prostatektomie- präparat (n = 317)	Prostatektomie- präparat in %
Alter		
≤ 50	2	0,6 %
51 – 59	89	28,2 %
60 – 70	168	53,2 %
> 70	57	18,0 %
Gesamt	316	100 %
pT Kategorie (AJCC 2002)		
pT2	89	28,1 %
pT3a	97	30,6 %
pT3b	129	40,7 %
pT4	2	0,6 %
Gesamt	317	100 %
Gleason-Grad		
≤ 3 + 3	4	1,3 %
3 + 4	154	48,6 %
4 + 3	102	32,2 %
≥ 4 + 4	57	18,0 %
Gesamt	317	100,1 %
pN Kategorie		
pN0	158	74,2 %
pN+	55	25,8 %
Gesamt	213	100 %
Chirurgischer Resektionsrand		
Negative	175	57,0 %
Positiv	132	43,0 %
Gesamt	307	100 %

Bemerkung: Aufgrund von fehlenden Daten ergibt sich in den einzelnen Kategorien nicht immer die Summe von 317. Abkürzungen: pT=pathologisches Tumorstadium, pN= pathologischer Lymphknotenstatus

2.2 Escherichia Coli Klone

Um die FISH-Sonden herzustellen wurden, die von der Firma Source Bioscience (Cambridge, UK) stammenden transformierten DH10B Escherichia Coli (E.Coli) eingesetzt. Für die 16q-Deletionssonden wurden für die Region 16q21 die BACs RP11-575H07 und RP11-631D06, für die Region 16q23 die BACs RP11-190D6 und RP11-345K17 und für die Region 16q24 die BACs RP11-788A09 und RP11-737K02 verwendet. Die Lokalisation der BAC-Sequenzen ist in Abbildung 2 dargestellt.

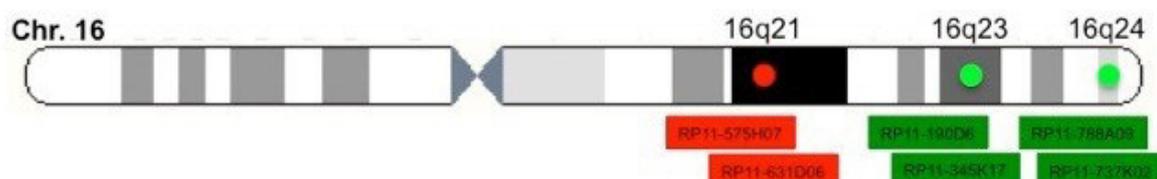


Abbildung 2: Lokalisation der BAC-Klone von der Firma Source Bioscience auf dem langen Arm des Chromosome 16.

2.3 Reagenzien und Kits

In der Tabelle 3 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Reagenzien aufgelistet.

Tabelle 3: Verwendete Reagenzien und Herkunft

Reagenzien / Kits	Firma	Sitz
20x SSC	Abbot	Ludwigshafen
CEP 6 Spectrum Aqua	Abbot	Ludwigshafen
CEP 6 Spectrum Orange	Abbot	Ludwigshafen
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich	München
COT Human DNA	Roche	Grenzach-Wyhlen
Dextransulfat (Natriumsalz)	Roth	Karlsruhe
Ethanol 80 % (vergällt)	VWR	Darmstadt

Ethanol 96 % (vergällt)	VWR	Darmstadt
Ethanol Ph Eur (1 Liter)	VWR	Darmstadt
Formamid pro analysi	Merck	Darmstadt
Green dUTP (50 nmol, lyophilisiert)	Abbot	Ludwigshafen
Immersol	Zeiss	Oberkochen
Isopropanol 100 %	Merck	Darmstadt
LB broth, Miller	Sigma-Aldrich	München
Mounting Medium with DAPI (VECTASHIELD)	Vector Laboratories	Vector Laboratories
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	Biesterfeld

	Chemiedistribution GmbH	Chemiedistribution GmbH
Xylol	J. T. Baker	Center Valley, USA

2.4 Geräte

In der Tabelle 4 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Geräte aufgelistet.

Tabelle 4: Verwendete Geräte und Herkunft

Gerät	Firma	Sitz
Bunsenbrenner, Fireboy	Tecnomara	Zürich, Schweiz
Concentrator Plus	Eppendorf	Hamburg
Heizplatte	MEDAX Gmbh & Co. KG	Neumünster
Heizrührer RCT basic	IKA® Labortechnik	Staufen
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 Scientific,	Thermo Hanau

2.5 Verbrauchsmaterialien

In der Tabelle 5 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Materialien sowie alle den normalen Laborbedarf übersteigende Verbrauchsmaterialien aufgelistet.

Tabelle 5: Verwendete Materialien und Herkunft

Material	Firma	Sitz
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
e e e ier e 1,5 ml aus PP	Sarstedt	Nümbrecht- Rommelsdorf
SafeSeal Reagiergefäß 2 ml	Sarstedt	Nümbrecht- Rommelsdorf

2.6 Software und Datenbanken

Die Auswahl der 16q21, 16q23 und 16q24 -Klone zur Herstellung der drei FISH-Sonden, erfolgte über die Datenbank Ensembl. Für die statistische Auswertung der Daten aus der FISH-Analyse wurde von der Software JMP9.0.2. Gebrauch genommen. Die Resultate wurden über Excel 2007 und Power Point 2007 dargestellt.

2.7 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Bei der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) handelt es sich um ein molekulargenetisches Verfahren, mit dem ausgewählte Gene direkt im Zellkern selektiv markiert werden können. Dabei kommt eine künstlich hergestellte markierte Nukleotid-Sonde zum Einsatz. Diese Sonde bindet mittels Basenpaarungen an eine komplementäre DNA Sequenz im Zellkern des zu untersuchenden Gewebes. Somit können mögliche Chromosomenaberrationen mit einem Mikroskop in-situ analysiert und erfasst werden.

2.7.1 Herstellung der 16q-FISH-Sonden

Zur Herstellung der 16q-FISH-Sonden wurde zunächst reine Plasmid DNA aus den E. coli-Klonen isoliert. Dann wurde eine Fluoreszenz-Markierung der Nukleotidstränge mit anschließender Aufreinigung durchgeführt. Alle im Folgenden beschriebenen Schritte entsprechen dem am Institut für Pathologie standardisierten und etablierten Protokoll zur FISH-Sonden Herstellung.

Kultivierung und Plasmid Isolierung

1. Herstellung einer Vorkultur aus 10 ml LB-Medium (Luria-Broth-Base, 25 g/l dH₂O, autoklaviert; Invitrogen), 30 µl Chloramphenicol und Hinzugabe von mehreren kleinen Bakterienkolonien.
2. Inkubation der Vorkultur bei 37 °C und 190 rpm für 8 Stunden.
3. Herstellung einer Hauptkultur aus 250 ml LB-Medium (Luria-Broth-Base, 25 g/l dH₂O, autoklaviert; Invitrogen), 750 µl Chloramphenicol und 2 ml der Vorkultur.
4. Inkubation der Hauptkultur bei 37 °C und 190 rpm für 16 Stunden.
5. Zentrifugation der Hauptkultur in einem Eppendorf-Zentrifugengefäß bei 4 °C und 6.000 g für 15 min. Die Bakterien setzen sich als Niederschlag am Boden des Zentrifugengefäßes ab.
6. Überstand in eine Sammelgefäß dekantieren und das entstandene E.coli Bakterienpellet in 24 ml RNase A haltigen S1 Buffer resuspendieren – Lyse der Bakterienzellen
7. Hinzugabe von 24 ml S2 Buffer zu der Bakteriensuspension. Nach vorsichtigen Mischen erneute Inkubation für 4 min. bei Raumtemperatur – Ausfällen unerwünschter Zellbestandteile

8. Hinzugabe von 24 ml S3 Buffer zu der Bakteriensuspension und sofortiges vorsichtiges Mischen. Nach 5-6 maligen Umdrehen des Eppendorfgefäße Inkubation auf Eis für weitere 5 min. – Gewinnung der Plasmid-DNA
9. Erneutes Zentrifugieren der Lösung. Der entstandene Überstand enthält das Plasmid.
10. Überstand mit einer Pipette auf eine Anionenaustauscher-Säule geben.
11. Zweimaliges Waschen der Anionenaustauscher-Säule mit 18 ml N3 Buffer. Das Plasmid verbleibt in der Säule
12. Elution der an der Säule gebundenen Plasmid-DNA mit 15 ml auf 50 °C erwärmtem N5 Buffer.
13. 11 ml Isopropanol 100% hinzugegeben, mischen und Zentrifugation bei 4 °C und 16.500 g für 30 min. Isopropanol verwerfen.
14. Zugabe von 5 ml Ethanol 70 %. Erneute Zentrifugieren bei 4 °C und 16.500 g für 10 min. Ethanol verwerfen – Plasmid-DNA befindet sich als Pellet am Boden des Zentrifugen-Röhrchens.
15. Lösen der Plasmid DNA unter Zugabe von 150 µl nucleasefreiem Wasser über Nacht bei 4 °C.
16. Bestimmung der DNA-Konzentration mit dem Peqlab NanoDrop ND – 1000 UV/Vis-Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm. Volumina: 1,5 µl der DNA-Probe und 1,5 µl RNase freies Wasser als Leerwert. Eine Absorption von 1 entspricht einem DNA-Gehalt von 50 µg/ml.

Nick Translation und Sondenaufreinigung

Bei der Nick Translation handelt es sich um ein Verfahren zur Markierung von DNA mit zum Beispiel Digoxigenin markierten Nukleotiden. Die Nick Translation wurde mit dem Nick Translation Reagent Kit der Firma Abbott (Illinois, USA) wie folgt durchgeführt. Der Vorgang erfolgte auf Grund von hoher Licht- und Temperaturempfindlichkeit auf Eis und in lichtundurchlässigen braunen Eppendorf-Tuben.

1. Verdünnung der Plasmid-DNA mit Nuklease freien Wasser auf eine Konzentration von 1 µg/ 17,5 µl.
2. Hinzugabe eines Mastermix, aus 5 µl Nick Translation Buffer, 10 µl 0,1 mM dNTPs, 5 µl 0,1 mM dTTPs, 2,5 µl 0,2 mM Orange dUTPs oder Green dUTPs und 10 µl Nick Translation Enzym (DNA-Polymerase I, DNase I) zur Plasmid DNA
3. Inkubation für 8 Stunden bei 15 °C, Reaktionsstop bei 72 °C für 10 min.
4. Hinzugabe von 19 ml Isopropanol 100 % zum PNI-Buffer, um diesen zu verdünnen
5. Pipettieren von 500 µl des verdünnten PNI Buffers zusammen mit der aus der Nick Translation gewonnen Probe auf die Membran des QIAquick spin column
6. Zentrifugation bei 3.800 g für 1 min. bei Raumtemperatur, Eluat verwerfen.

7. Verdünnen des PE Buffer mit 30 ml absoluten Ethanol
8. Hinzugabe von 750 µl des verdünnten PE-Buffer auf die Membran
9. Zentrifugation bei Raumtemperatur für 1 Minute bei 3.800 g
10. Entfernung des entstandenen Eluats mit anschließender Trockenzentrifugation der Membran für eine weitere Minute bei Raumtemperatur und 17.900 g
11. Aufsetzen der QIAquick spin column auf ein neues Eppendorf-Tube
12. Pipettieren von 60 µl DNase-freiem Wasser auf die Membran, gefolgt von einer einminütigen Inkubation
13. Zentrifugation der Sonde für 1 min. bei Raumtemperatur und 17.900 g. Die Sonde wird eluiert
14. Mischen der Proben und Aufkonzentrierung in einer Vakuumzentrifuge für 20 min. bei 45 °C
15. Bis zur ihrer Verwendung, Lagerung der Sonden bei -20 °C

2.7.2 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung der TMAs

Die Hybridisierung der TMA-Schnitte erfolgte nach einem am Institut für Pathologie etablierten und standardisierten Protokoll, das im Folgenden kurz beschrieben wird.

Vorbehandlung des Gewebes

Um eine Hybridisierung mit den 16q21, 16q23 und 16q24 FISH-Sonden durchführen zu können, müssen die formalin-fixierten und paraffin-eingebetteten TMAs eine Vorbehandlung der Gewebe unterlaufen, in welcher es zur Entparaffinierung und proteolytische Aufbereitung der Gewebeschnitte kommt.

1. TMAs dreimal für 10 min. in Xylol und dann zweimal für 5 Minuten in Ethanol stellen
2. Bei 48 °C für 3 min. mittels einer Heizplatte trocknen
3. Inkubation der TMAs für 15 min. in einer Pretreatment-Lösung (80 °C), zur proteolytischen Vorbehandlung
4. Zweimal für 1 Minute waschen
5. Inkubation der TMAs in eine Proteaselösung bei 37 °C für 150 min.
6. Zweimaliges Waschen für je 1 min. in dH₂O
7. Dehydrierung der TMAs für je 3 min. in Ethanol 70 %, Ethanol 80 % und Ethanol 96 %
8. Bei 48 °C für 3 min. auf einer Heizplatte trocknen

Hybridisierung

Im Anschluss findet die Hybridisierung der TMAs statt. Die hierfür notwendigen Schritte sind:

1. Herstellung eines Hybridisierungsmix für jeden TMA-Schnitt aus 14 µl Basismix (15,0 ml Formamid, 4,5 ml 20xSSC, 3,0 g Dextransulfat), 2 µl COT-DNA, 4 µl 16q-Sonde und 0,5 µl Centromer 16 Sonde,
2. Vortexen des hergestellten Hybridisierungsmixes mit anschließender Zentrifugation bei 2.500 g für 10 Sekunden.
3. Hybridisierungsmix auf die TMAs pipettieren und ein Deckgläschen auf die TMAs legen.
4. Deckgläschen mit Fixogum fixieren, Luftblasen vermeiden
5. Fixogum für 10 min. trocknen lassen.
6. Denaturierung der DNA und Sonde in einem Hybrit bei 72 °C für 10 min.
7. Hybridisierung der Sonde über Nacht bei 37 °C in einem Hybrit.

Waschen

Der Waschprozess dient dem Entfernen von nicht gebundenen FISH-Sonden und wurde wie folgt durchgeführt:

1. Herstellung eines Waschpuffer aus 100 ml 20xSSC, 3 ml NP40 und ad 1000 ml bei einem pH-Wert von 7,25
2. Fixogum entfernen und die TMAs bei Raumtemperatur und im Dunkeln in Waschpuffer stellen, Entfernen der Deckgläschen
3. Waschpuffer in einer zweiten Küvette auf 72 °C erhitzen
4. TMAs für 2 min. im zweiten Waschpuffer waschen und dann kurz in dH₂O waschen
5. TMAs für 10 min., bei Raumtemperatur und im Dunkeln trocknen lassen
6. Ein Tropfen DAPI auf die TMAs geben und TMAs eindeckeln
7. TMAs bis zur mikroskopischen Auswertung bei -20 °C aufbewahren

2.8 Mikroskopische Auswertung

Zur Auswertung der Fluoreszenz-hybridisierten TMA-Schnitte kam ein Lichtmikroskop der Firma Zeiss mit den dazugehörigen Fluoreszenzfiltern zum Einsatz. Zur Auswertung wurden lediglich die Gewebespots herangezogen, die ein deutliches Gensignal aufwiesen. Gewebespots, dessen Gensignal zu schwach oder komplett nicht nachweisbar war, wurden aus der Wertung genommen. Außerdem wurden Gewebespots, die keinen Tumor enthielten mittels Hämatoxylin/Eosin-Färbung detektiert, und dann ebenfalls von der Analyse ausgeschlossen. Bei den in die Auswertung aufgenommenen Gewebespots wurde das Verhältnis zwischen den Gensignalen und den Zentromersignalen beobachtet. Von einer normalen Genkopiezahl war die Rede, wenn sich die beiden Signale im selben Verhältnis darstellten. Wenn sich das Verhältnis der Signale zu Gunsten der Zentromersignale verschoben hat, Gensignale also in 60 % der Zellkerne fehlten, wurde eine heterozygote Deletion angenommen. Lag ein kompletter Verlust der Gensignale bei gleichzeitig deutlich vorhandenen Zentromersignalen vor, wurde eine homozygote Deletion angenommen.

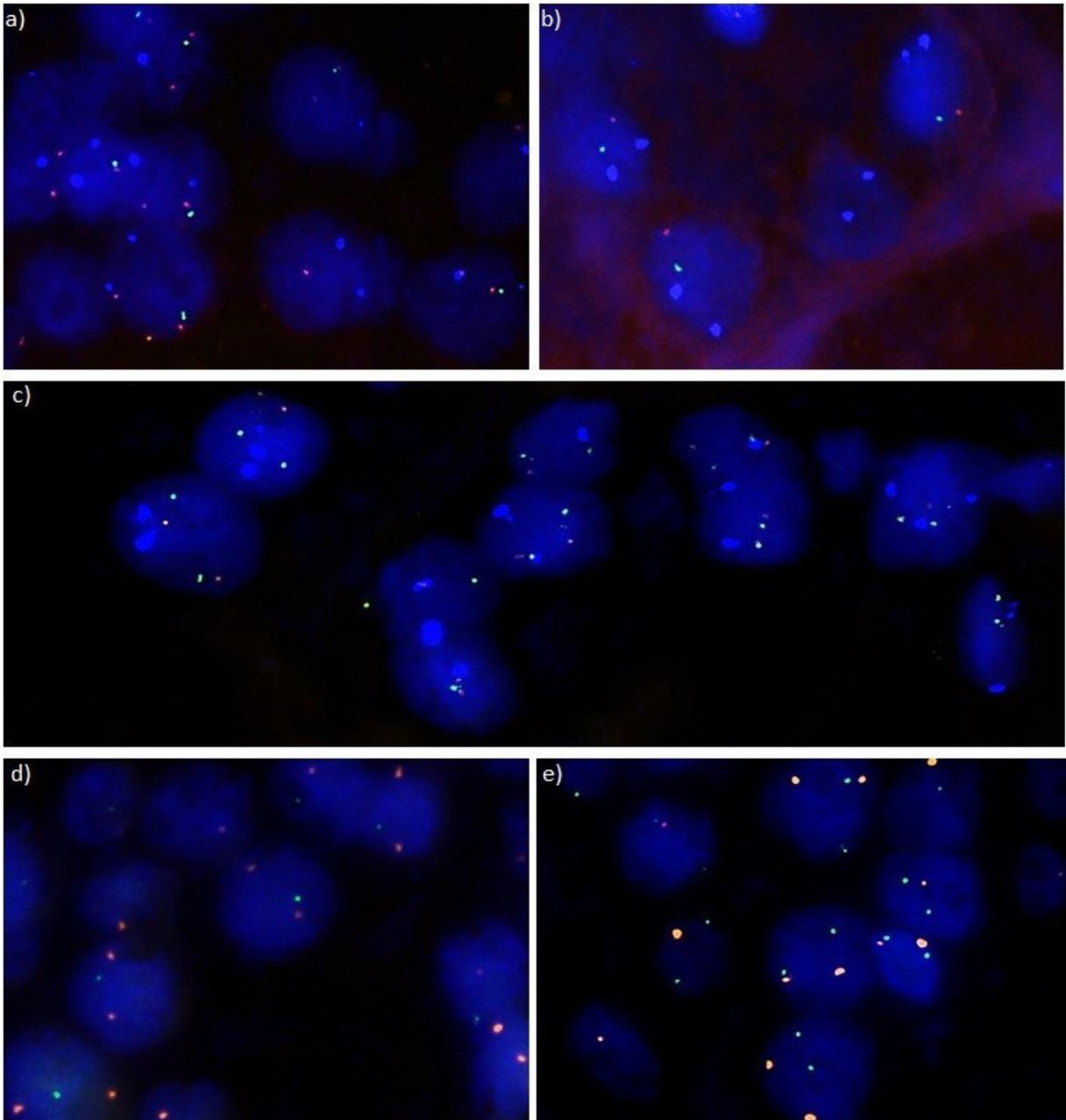


Abbildung 3: Exemplarische Darstellung der FISH-Auswertung.

- a) Heterozygote Deletion von 16q24 mit einem grünen 16q-Signal und 16q21 normal mit zwei orangen 16q-Signalen. Zwei blaue Zentromer 16-Signale.
- b) Heterozygote Deletion von 16q21 mit einem orangen 16q-Signal und von 16q24 mit einem grünen 16q-Signal. Zwei blaue Zentromer 16-Signale.
- c) 16q24 normal mit zwei grünen 16q-Signalen und 16q21 normal mit zwei orangen 16q-Signalen. Zwei blaue Zentromer 16-Signale.
- d) 16q23 Heterozygote Deletion mit einem grünen 16q23-Signal und zwei orangen Zentromer 16 Signalen,
- e) 16q23 Normal mit zwei grünen 16q-Signalen und zwei orangen Zentromer 16 Signalen.

2.9 Bestimmung der 16q-Deletionslänge

Zur Bestimmung der 16q-Deletionslänge wurden nur Gewebestanzes verwendet, für die ein 16q-Kopiezahlstatus in allen drei Auswertungen ermittelt werden konnte. Die 16q-Deletionslänge wurde dann pro Gewebestanze wie folgt bestimmt:

1. keine 16q-Deletion: normaler Kopiezahlstatus für 16q21, 16q23 und 16q24
2. 16q24-Deletion: Deletion im Bereich 16q24, normaler Kopiezahlstatus im Bereich 16q21 und 16q23
3. 16q23-16q24-Deletion: Deletion im Bereich 16q23 und 16q24, normaler Kopiezahlstatus im Bereich 16q21
4. 16q21-16q24-Deletion: Deletion im Bereich 16q21, 16q23 und 16q24

3 Ergebnisse

3.1 Auswertbarkeit der FISH-Analyse

Insgesamt konnte für 1487 (46,9 %) der 3170 Gewebespots der Kopiezahlstatus für alle drei 16q-Loci bestimmt werden. Die restlichen 1687 (53,1 %) der Gewebespots mussten auf Grund von fehlendem Gewebe, zu wenig Tumorzellen in der H/E-Auswertung oder einer unzureichenden Hybridisierung in mindestens einer der drei FISH-Analysen aus den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen werden. Eine heterozygote 16q-Deletion in mindestens einem 16q-Loci konnte bei 446 (30 %) der 1487 analysierbaren Gewebespots nachgewiesen werden. Homozygote 16q-Deletionen wurden nicht detektiert. Ein normaler Kopiezahlstatus in allen untersuchten 16q-Loci konnte für 1041 (70 %) der Gewebeproben ermittelt werden (siehe Tabelle 6).

3.2 Heterogenität der 16q-Deletion beim Prostatakarzinom

Zur Bestimmung der Heterogenität der 16q-Deletion wurden alle Patienten verwendet, für die in mindestens drei der zehn Gewebespots der 16q-Kopiezahlstatus für alle drei 16q-Regionen bestimmt werden konnte. Insgesamt erfüllten 270 (85,17 %) der 317 Patienten dieses Kriterium. Eine 16q-Deletion in mindestens einer der Tumorgewebeproben, unabhängig von der Lokalisation der Deletion, konnte in 88 (32,6 %) der 270 Patienten detektiert werden (siehe Tabelle 6). In der Gruppe der Patienten mit einer 16q-Deletion war die Deletion bei 27 (10,0%) in allen analysierbaren Gewebeproben (n=3-10 Spots) nachweisbar. Die Tumoren dieser Patienten wurden dementsprechend als homogen 16q-deletiert klassifiziert. Bei 61 (22,6%) der Patienten konnte nicht in allen analysierbaren Tumorproben eine 16q-Deletion nachgewiesen werden. Die Tumoren dieser Patienten wurden als heterogen 16q-deletiert eingestuft. Insgesamt war der Anteil an homogen 16q-deletierten Tumoren mit 10,0% geringer als der Anteil an heterogen 16q-deletierten Karzinomen mit 22,60 % (siehe Abbildung 4).

Tabelle 6: Häufigkeit der 16q-Deletion in der Heterogenitätsanalyse auf Basis der einzelnen analysierbaren Tumorgewebeproben und der Patienten mit mindestens drei auswertbaren Karzinomproben.

	keine 16q-Deletion n (%)	16q – Deletion n (%)
Gewebespots n= 1487	1041(70)	446 (30)
Patienten n = 270	182 (67,4)	88 (32,6)

Der Nachweis einer 16q-Deletion in mindestens fünf der analysierbaren Tumorproben war in 20 (74,07 %) der homogen 16q-deletierten und 26 (42,62 %) der heterogen 16q-deletierten Tumoren möglich. Eine ausgeprägte Heterogenität der 16q-Deletion war demnach in den Tumoren von 35 (39,77 %) der Patienten nachweisbar (siehe Abbildung 4).

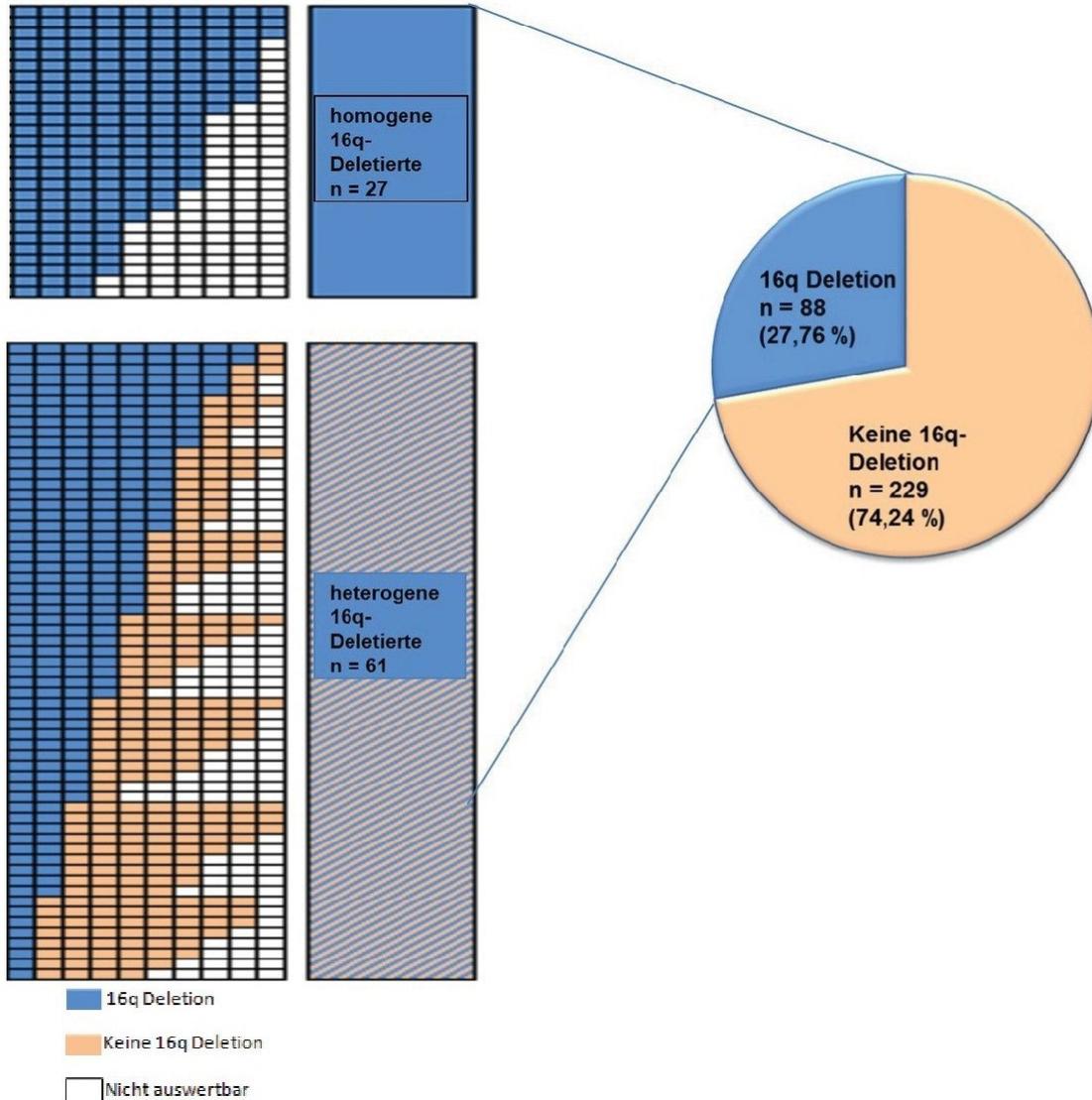


Abbildung 4: Verteilung der 16q-Deletion in jedem Tumor der 88 analysierbaren Patienten. Blau: 16q-Deletion, orange: keine 16q – Deletion, keine Färbung: nicht auswertbar.

3.3 Vergleich der 16q-Deletionsrate im Heterogenitäts-TMA und Prognose-TMA.

Der am Institut für Pathologie früher mit 16q Deletionen untersuchte Prognose-TMA enthält jeweils eine Tumorprobe pro Patient. Von insgesamt 100 Patienten waren 16q Daten dieser Heterogenitätsstudie als auch der Prognosestudie vorhanden. Bei 24 (66,67 %) der Patienten war die in der Heterogenitätsanalyse nachgewiesene 16q24-Deletion ebenfalls mit nur einer Stanze am Prognose-TMA nachweisbar. Bei den Patienten mit einem normalen 16q24-Kopiezahlstatus am Heterogenitäts-TMA wurde immerhin in drei (0,05 %) Fällen eine zusätzliche, offensichtlich kleinherdige 16q24-Deletion am Prognose TMA detektiert ($p < 0,0001$, siehe Abbildung 5).

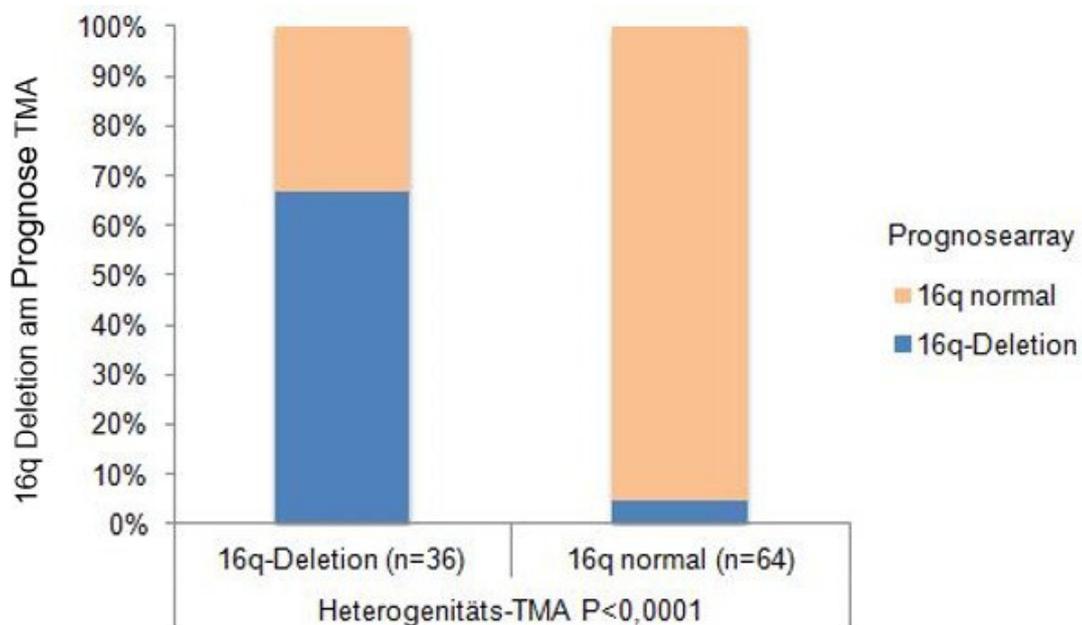


Abbildung 5: Vergleich des Nachweises einer 16q24-Deletion am Heterogenitäts-TMA und Prognose-TMA. Die Daten des Prognose-TMA stammen aus einer vorherigen Studie des Instituts für Pathologie (persönliche Kommunikation AG Ronald Simon).

In einer zweiten Analyse wurde die Anzahl der 16q24-deletierten Gewebeproben herangezogen, um zu prüfen, welchen Einfluss diese auf den Nachweis der 16q24-Deletion im Prognose-TMA hat. Diese Analyse zeigte eine Übereinstimmung von 100 % zwischen den Ergebnissen des Heterogenitäts-TMA und Prognose-TMA, wenn mindestens 5 Tumorproben im Heterogenitäts-TMA eine 16q24-Deletion hatten ($P < 0,0001$, siehe Abbildung 6).

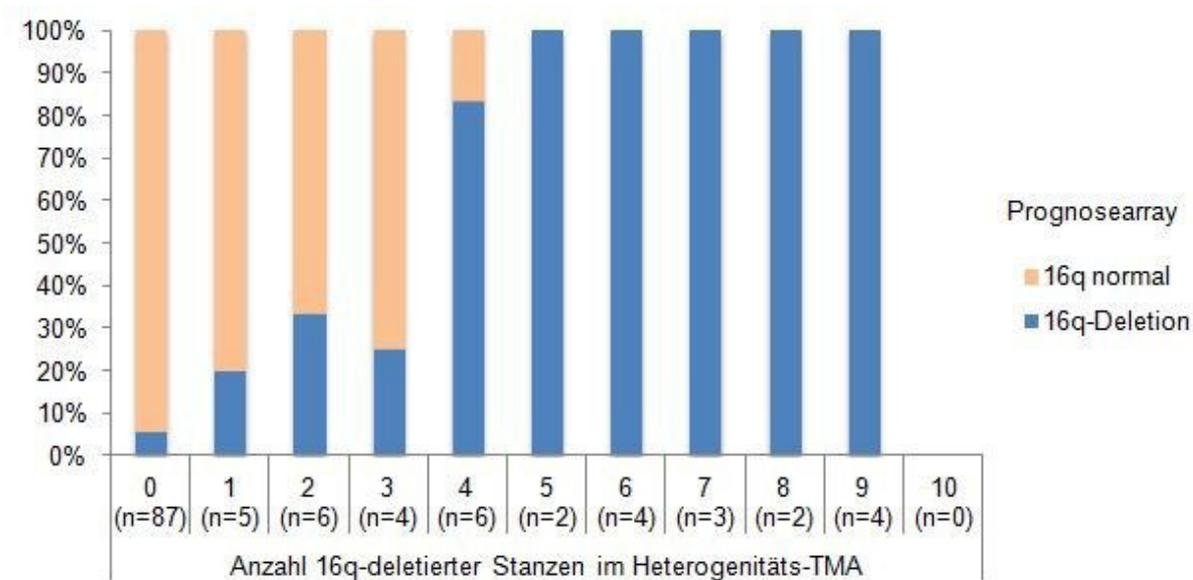


Abbildung 6: Vergleich des Nachweises einer 16q24-Deletion am Heterogenitäts-TMA und Prognose-TMA in Abhängigkeit der 16q24-deletierten Stenzen in der Heterogenitätsanalyse. Die Daten des Prognose-TMA stammen aus einer vorherigen Studie des Instituts für Pathologie (persönliche Kommunikation AG Ronald Simon).

3.4 Potentielle Ausdehnung der 16q-Deletionsgröße innerhalb der Tumorprogression

Um zu prüfen, ob die 16q-Deletion sich während der Tumorprogression ausdehnt oder jede 16q-Deletionsgröße de novo entsteht, wurde zunächst die Größe der 16q-Deletion in jeder Gewebeprobe bestimmt. Verwendet wurden dabei ausschließlich Gewebeproben für die der Kopiezahlstatus in allen drei 16q-Bereichen detektiert werden konnte. Im Anschluss wurden die Patienten ausgewählt, bei denen in mindestens drei von mindestens fünf auswertbaren Tumorgewebeproben eine 16q-Deletion nachgewiesen wurde. Für die Analyse standen damit 59 Patienten bzw. Tumoren zur Verfügung. In diesen Tumoren war in 23 (38,98 %) nur eine 16q-Deletionsgröße in allen deletierten Proben vorhanden. Diese wurden dementsprechend als Karzinome mit einer konstanten 16q-Deletionsgröße klassifiziert. Eine unterschiedliche Größe der 16q-Deletion konnte in 32 (54,24 %) der Tumoren ermittelt werden. Diese wurden als Karzinome mit einer wachsenden 16q-Deletion während der Tumorprogression determiniert.

Bei vier weiteren Tumoren lagen unterschiedliche 16q-Deletionsgrößen vor, welche nicht durch eine Ausdehnung der 16q-Deletion während der Tumorprogression erklärbar waren. Diese Tumoren wurden basierend darauf, als vermutliche Kollisionstumoren aus der weiteren Analyse ausgeschlossen (siehe Abbildung 7). Insgesamt konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den 38,98 % der Karzinome mit einer konstanten 16q-Deletionsgröße und den 61,02 % der Karzinome mit einer wachsenden 16q-Deletionsgröße festgestellt

werden (siehe Tabelle 7).

Tabelle 7: Auftreten und Verteilung der 16q-Deletionsgrößen in der Heterogenitätsanalyse.

Status	Anzahl Patienten (n)	Anteil (%)	Sonderfälle (n)
16q-Del wächst	32	54,24	4 (6,78 %)
16q-Del konstant	23	38,98	0
Gesamt	55	93,21	4

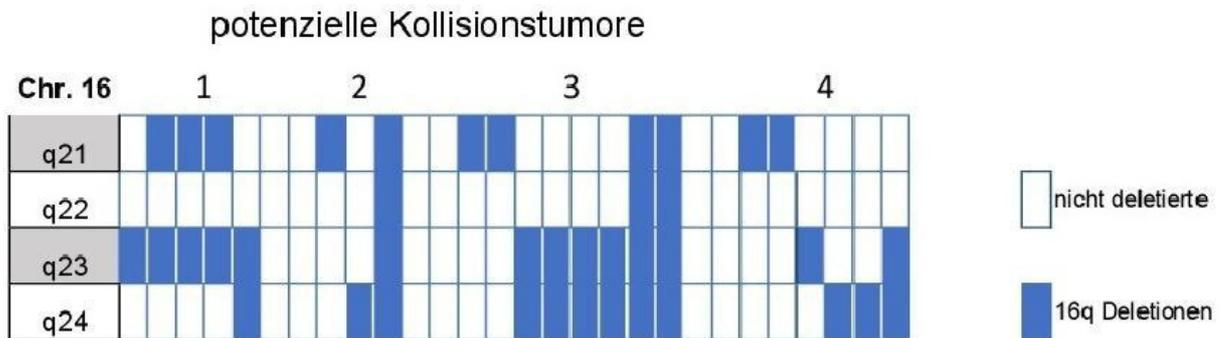


Abbildung 7: Potenzielle Kollisionskarzinome. Die Tumoren weisen unterschiedliche 16q-deletierte Regionen auf, welche nicht durch eine Ausdehnung der 16q-Deletion während der Tumorprogression erklärbar ist.

In der Gruppe der Karzinome mit einer konstanten 16q-Deletionsgröße zeigten vier (17,39 %) und drei (13 %) eine kleine Deletion in der Region 16q24 oder 16q23. Eine Deletion von mittlerer bzw. maximaler Ausdehnung wiesen 16 (69,56 %) der Tumoren auf. Von diesen Tumoren waren acht (34,78 %) homogen 16q-deletiert (siehe Abbildung 8). Die Gruppe der Tumoren mit einer wachsenden 16q-Deletion kann nach dem vermutlichen Ursprung der Deletion in vier Gruppen eingeteilt werden. Die kleinste 16q-Deletion war in sieben (19,44 %) der Tumoren die Region 16q24, in 17 (47,22 %) der Tumoren die Region 16q23, in sechs (16,67 %) der Tumoren die Region 16q23-16q24 und in vier (11,1 %) der Tumoren die Region 16q21. Von diesen Tumoren waren neun (25 %) homogen 16q-deletiert (siehe Abbildung 9).

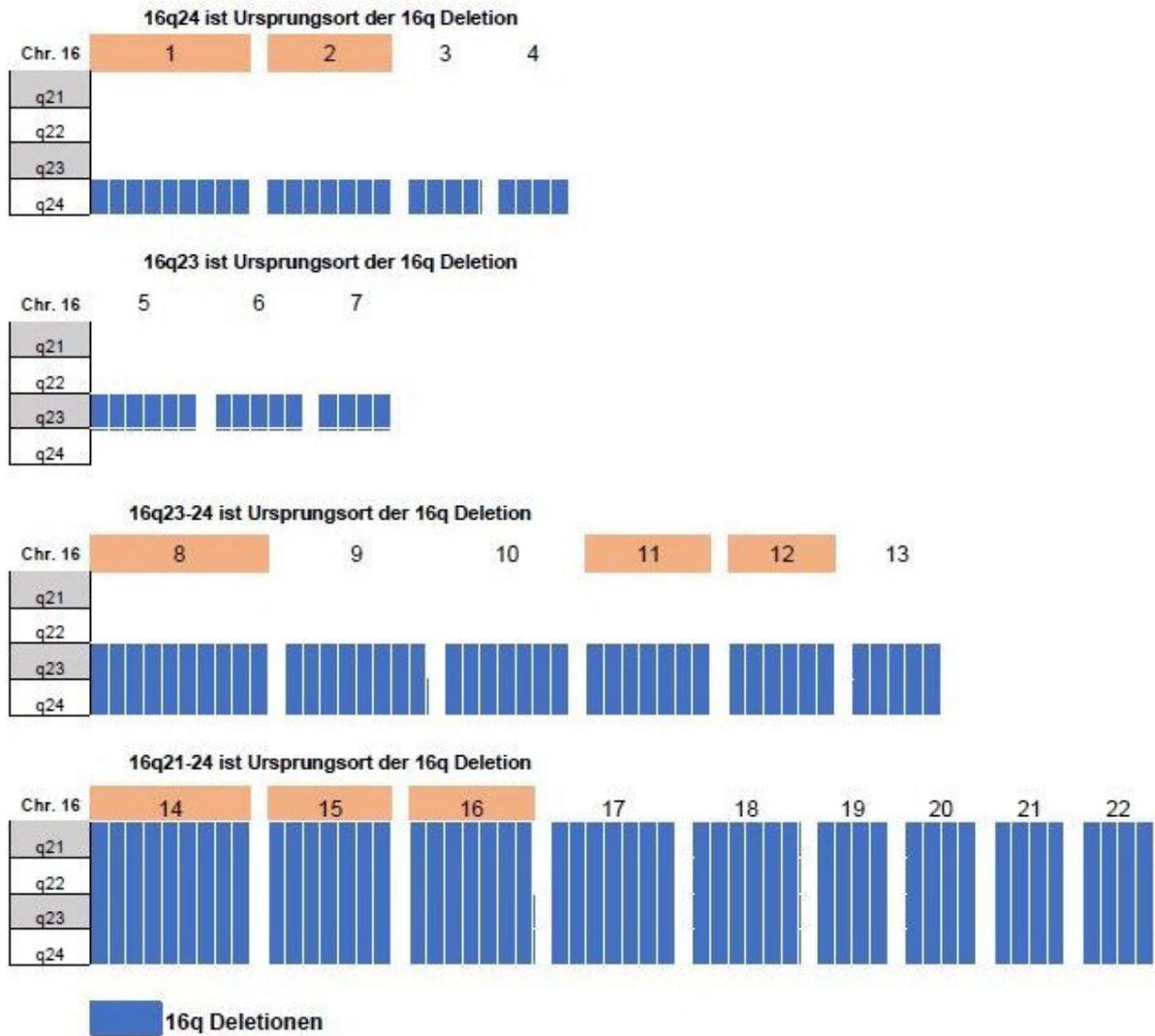


Abbildung 8: Tumoren mit einer konstanten 16q-Deletionsgröße in allen 16q-deletierten Gewebeproben. Orange Markierung: Fälle in denen in allen auswertbaren Stansen eine 16q-Deletion gefunden wurde (homogene 16q-Deletion).

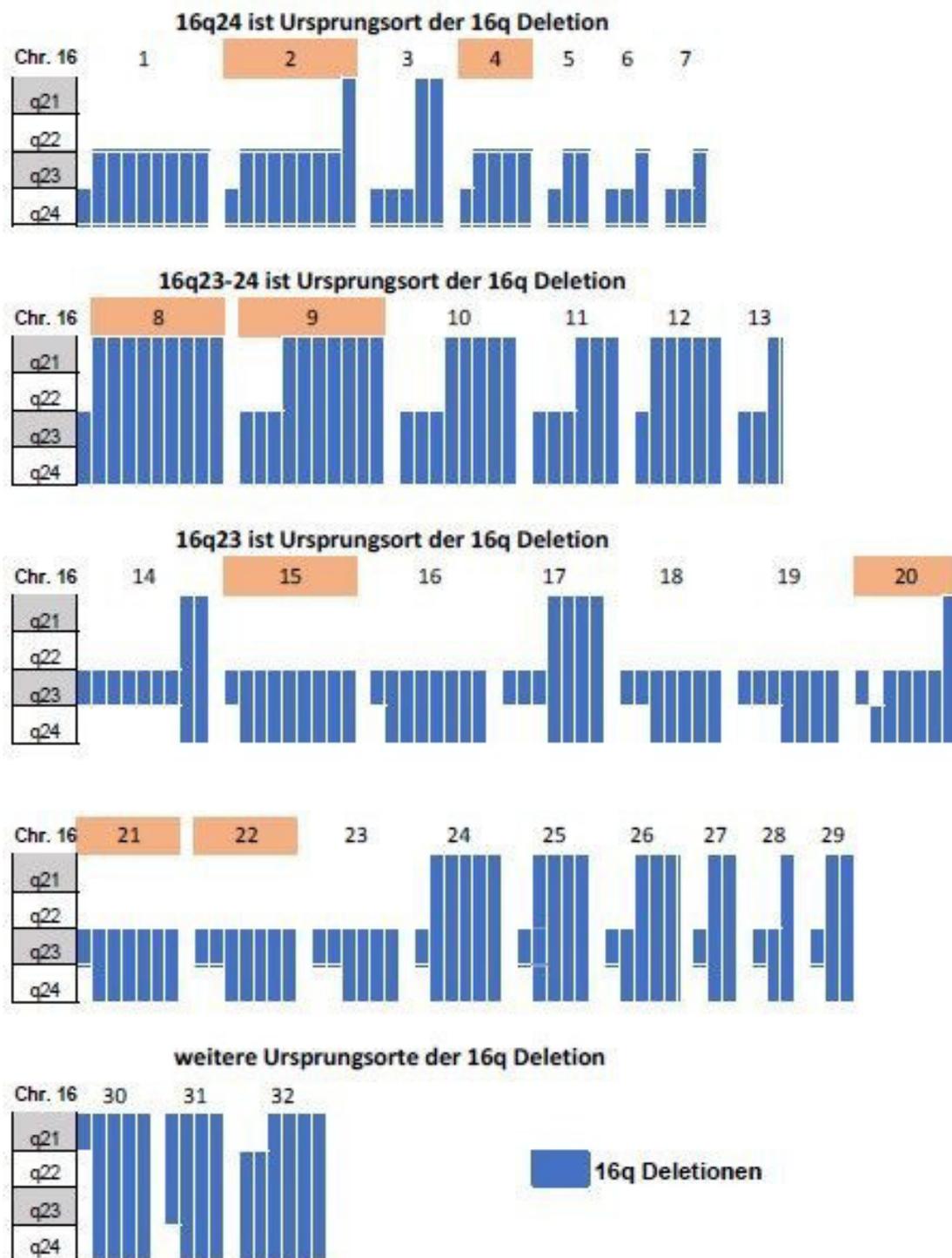


Abbildung 9: Tumoren mit einer wachsenden 16q-Deletionsgröße in den 16q-deletierten Gewebeproben. Orange Markierung: Fälle in denen in allen auswertbaren Stansen eine 16q-Deletion gefunden wurde (homogene 16q – Deletion).

4 Diskussion

Intratumorale Heterogenität ist die Folge von molekularen Selektionsmechanismen während der Tumorprogression. Das Ausmaß der Heterogenität einer bestimmten Veränderung kann Aufschluss darüber geben wie frühzeitig oder spät diese Veränderung während der Tumorausbreitung entstanden ist. Deletionen von Teilen des langen Arms von Chromosom 16 zählen zu den häufigsten strukturellen Veränderungen beim Prostatakarzinom. Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu prüfen, in welchem Ausmaß eine Heterogenität der 16q-Deletion beim Prostatakarzinom vorliegt. Ein weiteres Ziel war zu untersuchen, ob große und kleine 16q-Deletionen de novo entstehen oder ob große Deletion aus kleinen Deletionen hervorgehen. Dazu wurde die Ausdehnung der 16q-Deletion von 270 Tumoren anhand von drei FISH-Sonden (16q21, 16q23 und 16q24) bestimmt.

Eine 16q-Deletion in mindestens einer der drei untersuchten Regionen konnte bei 32,6 % der 270 analysierbaren Tumoren gefunden werden. Diese Deletionsrate ist im mittleren Bereich der Ergebnisse vorheriger Studien, welche die aCGH bzw. SNP Methode zur Bestimmung der 16q-Deletionsrate nutzten und in 6 %³⁴, 10 %³⁵, 13 %²³ und 37 %¹⁴ der insgesamt 442 untersuchten Tumoren eine 16q-Deletion fanden. In zwei großen CGH-Metaanalysen an 872 und 181 Tumoren wurde eine 16q-Deletionsrate von 17,9 %¹⁶ und 52,3 %¹¹ gemessen. Etwas höhere 16q-Deletionsraten von 42-75 % fanden Studien, welche mittels der wenig spezifischen LOH-Methode den 16q-Kopiezahlstatus an 48 bzw. 32 Tumoren untersuchten^{29; 36}. Die verwendeten Methoden der herangezogenen Vergleichsstudien haben gemeinsam, dass sie an isolierter DNA durchgeführt werden. Damit ist eine Verfälschung der Ergebnisse durch Verunreinigungen der Proben mit DNA aus normalen Zellen nicht vollständig auszuschließen. Eine solche Kontamination führt typischerweise zu einer Unterschätzung der wahren Deletionsrate^{39; 40}. Jedoch wurden oft geringe Schwellenwerte für die Definition gewählt, um diesen Effekt auszugleichen. Zu geringe Schwellenwerte führen allerdings leicht zu einer Überschätzung der wahren Deletionsrate. Das unsere Deletionsrate im mittleren Bereich der Ergebnisse dieser Studien liegt, weist auf die Validität der verwendeten Methode hin. Die FISH gilt als der Goldstandard zur Untersuchung von Kopiezahlveränderungen da sie die Möglichkeit bietet den Kopiezahlstatus direkt in den Zellkernen bzw. dem Gewebe zu bestimmen³⁹. In einer eigenen Studie innerhalb der Arbeitsgruppe zur prognostischen Relevanz der 16q-Deletion wurde in 3800 analysierbaren Tumoren mittels FISH eine 16q-Deletionsrate von etwa 21 % gefunden¹⁵. Die etwas höhere 16q-Deletionsrate in der vorliegenden Arbeit ist durch die größere Anzahl der untersuchten Gewebeproben pro Tumor begründbar. In der Heterogenitätsstudie wurden pro Tumor zehn Gewebestanden untersucht. Im Vergleich dazu wurde in der Prognosestudie nur eine Gewebestanze analysiert⁹.

Um zu prüfen, welche Auswirkungen die unterschiedliche Anzahl der analysierten Proben auf die Deletionsrate hat, wurden 100 Patienten ausgewählt, deren Tumoren in beiden Studien untersucht wurden. Diese Analyse zeigte, dass 67 % der 16q-deletierten Tumoren im Heterogenitätsarray bereits bei der Untersuchung von nur einer Stanze im Prognosearray nachgewiesen werden konnten. Eine Übereinstimmung von 100 % wurde erzielt, wenn mindestens fünf der analysierbaren Stenzen in der Heterogenitätsuntersuchung eine 16q-Deletion aufwiesen. Diese Analyse zeigt deutlich, welche Auswirkungen die heterogene Verteilung einer Veränderung auf die Nachweisbarkeit dieser besitzt.

In einer eigenen Studie innerhalb der Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass der Nachweis einer 16q-Deletion mit einer ungünstigen Prognose für den Patienten in Zusammenhang steht¹⁵. Dies bedeutet, dass die 16q-Deletion ein vielversprechender Prognosemarker beim Prostatakarzinom ist. Die in dieser Studie gezeigte Heterogenität der 16q-Deletion in Prostatakarzinomen stellt eine Herausforderung für mögliche routinediagnostische Testverfahren dar. Von einer solchen ausgeprägten Heterogenität waren immerhin fast die Hälfte (40 %) der 16q-deletierten Tumoren betroffen. Zudem wäre der optimale Zeitpunkt für einen solchen Test die Erstdiagnose, bei der lediglich Gewebestanzungen vorliegen. Ein generelles diagnostisches Problem zu diesem Zeitpunkt ist, dass bei der Entnahme der Biopsien nicht sichergestellt ist, dass der wichtige Tumorbereich getroffen wird. Dies kann dazu führen, dass nicht repräsentative Anteile des Tumors analysiert werden.

Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Heterogenitätsarray enthält 317 unifokale Prostatakarzinome. Aus diesen wurden jeweils zehn im Durchmesser 0,6 mm große Stenzen aus unterschiedlichen Arealen (Tumorböcken) entnommen. Damit unterscheidet sich diese Studie deutlich von anderen TMA- Studien mit Untersuchung mehrerer Spots pro Tumor, da in diesen Studien die Stenzen aus lediglich einem Tumorböck pro Patient bzw. pro Prostatakarzinom entnommen und analysiert wurde⁴¹⁻⁴³. Der entscheidende Nachteil der früheren „Heterogenitätsstudien“ ist somit, dass Tumorgewebe aus nur einem Tumorböck untersucht wird. Damit ist eine repräsentative Aussage zu genetischen Veränderungen über den gesamten Tumor nicht möglich. Der in dieser Studie verwendete Heterogenitäts-TMAs bildet nicht nur die Tumorerogenität in bislang unerreichter Weise ab sondern stellt auch ein optimales Werkzeug dar, um die Entstehung und Entwicklung genetischer Veränderungen im zeitlichen Verlauf zu dokumentieren.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher zu klären, ob die kleinen und großen 16q-Deletionen de novo entstehen oder auseinander hervorgehen. Dazu wurde die

Ausdehnung der 16q-Deletion in jeder einzelnen Stanze der 16q-deletierten Tumoren bestimmt. Die Ergebnisse dieser Analyse zeigten, dass etwas weniger als die Hälfte aller 16q-deletierten Tumoren nur eine 16q-Deletionsgröße aufwies, während bei den anderen 50 % der Tumoren kleine (16q23 oder 16q24), mittlere (16q23-q24) oder auch große (16q21-16q24) 16q-Deletionen innerhalb eines Tumors nachweisbar waren. Diese Ergebnisse deuten zunächst darauf hin, dass offensichtlich sowohl eine Ausdehnung der 16q-Deletion während der Tumorprogression möglich ist als auch die de novo Entstehung von bereits mittleren und großen 16q-Deletionen. Es muss allerdings darauf hingewiesen werden, dass zumindest bei einem Teil der Tumoren die konstanten 16q-Deletionsgrößen bedingt durch den Versuchsaufbau quasi „vorgetäuscht“ worden sein könnten. Da im Heterogenitätsarray ausschließlich unifokale Tumoren verwendet wurden aus denen die Entnahme von zehn Stanzen möglich war, handelt es sich hier häufig um sehr große Tumoren. Es ist also möglich, dass es in solchen fortgeschrittenen Tumoren schwieriger ist, alle tatsächlich vorhandenen Deletionsgrößen auch wirklich zu finden. Hier könnte bereits im Großteil der Tumorzellen die Deletion von „klein“ zu „groß“ angewachsen sein, sodass Bereiche mit kleinen Deletionen nicht mehr gefunden werden konnten. Bemerkenswerterweise konnte jedoch immerhin bei der Hälfte der Tumoren belegt werden, dass große 16q-Deletionen aus kleinen 16q-Deletionen hervorgegangen sind. Der molekulare Mechanismus des „Deletionswachstums“ ist jedoch weitgehend unbekannt.

Generell konnten in der vorliegenden Arbeit mit der 16q23 Region und der 16q24 Region zwei Ursprungsorte der 16q-Deletion identifiziert werden. Dieses Ergebnis war unerwartet, da vorherige Studien darauf hinwiesen, dass nur die 16q24-Region die putative Ursprungsregion der 16q-Deletion darstellt. Vier große CGH, aCGH und SNP Studien zeigen deutlich, dass die 16q Deletion in verschiedenen Größen vorkommt: Neben Veränderungen, die den kompletten 16q Arm betreffen lässt sich die Deletionsregion hier vor allem auf die distalen Anteile des Chromosoms beschränken. Die telomerische 16q24 Deletion stellt in diesen Studien die häufigste Deletionsvariante dar. In drei LOH Studien von Suzuki et al, Latil et al und Elo et al. konnten zwar drei voneinander unabhängige Deletionsregionen (16q21; 16q23.2-16q24.2 und 16q24.3) nachgewiesen werden, aber auch diese konzentrierten sich auf die Region 16q24 am Telomer.^{31; 32; 36} Aus diesem Grund wurde zu Beginn der Arbeit davon ausgegangen, dass die 16q-Deletion ein Vertreter der telomerischen Deletionen beim Prostatakarzinom ist. Deletionen werden nach ihrer Entstehung in interstitielle und telomerische Deletionen unterteilt. Während für die Entstehung von interstitiellen Deletionen in jedem Fall zwei Doppelstrangbrüche in einem chromosomalen Abschnitt erfolgen müssen, reicht für die Entstehung der telomerischen Deletionen bereits ein Doppelstrangbruch⁴⁴. Die Ergebnisse unserer Arbeit weisen

zusammen mit den Daten der Literatur darauf hin, dass die 16q-Deletion je nach Bruchpunkt zu den telomerischen oder interstitiellen Deletionen zählt und das in beiden Fällen eine Ausdehnung der Deletion während der Tumorprogression erfolgen kann. Der genaue Mechanismus der zur Entstehung von Deletionen führt ist bisher nicht bekannt. Es gibt jedoch Hinweise, dass durch die Entwicklung von transkriptionellen Schleifen chromosomale Bereiche, welche besonders anfällig für Strangbrüche sind in räumliche Nähe gebracht werden⁴⁵. Bedingt durch diese räumliche Strukturveränderung steigt die Wahrscheinlichkeit eines bzw. zwei Doppelstrangbrüche⁴⁵. Erfolgt dies in der G1-Phase des Zellzyklus steht als Reparatursystem nur die Nicht homologe End-zu-Endverbindung zur Verfügung⁴⁶. Hierbei werden zwei chromosomale Schnittstellen miteinander verbunden ohne dass geprüft werden kann, ob diese tatsächlich zusammengehören. Dies kann daher leicht zum Verlust von chromosomalen Material führen, dass dann durch Exonukleasen abgebaut wird⁴⁴. Der oder die Doppelstrangbrüche sind also zwar repariert wurden, aber dabei ist ein Teil des Chromosoms zunächst unbemerkt verloren gegangen. Es könnte sein, dass genau dieser Mechanismus die Ausdehnung einer Deletion ermöglicht. Wenn zunächst eine kleine Deletion in der Region 16q24 entsteht, rücken entferntere Bruchpunkte auf 16q näher zusammen. Bei der Entwicklung eines neuen „transkriptionellen Hubs“ würden damit zwei ursprünglich weit voneinander entfernte Bruchregionen in räumliche Nähe gebracht werden. Entstehen nun zwei weitere Doppelstrangbrüche kann es zu einer Ausdehnung der Deletion auf zum Beispiel die Region 16q23-q24 kommen. Jeder weitere Aufbau eines „transkriptionellen Hubs“ mit Entstehung eines Doppelstrangbruches könnte so zu einer stärkeren Ausdehnung der 16q-Deletion im Verlauf der Tumorprogression führen.

Das Wissen um die Ausdehnung der 16q-Deletion während der Tumorprogression birgt vermutlich ein großes Potential. Eine Frage, die immer noch im Raum steht, ist die nach der Wachstumsgeschwindigkeit der Prostata Tumoren. Da die Patienten bei der Diagnose der Erkrankung im Durchschnitt bereits über 70 Jahre sind^{2; 47}, stellen sich folgende Fragen: Wann ist es zu der Entartung gekommen? Wie lange hat es bis zur Diagnostik gedauert? Wie lange wird es dauern bis der Tumor ein aggressiveres Verhalten zeigt? Diese Fragen sind insbesondere sehr schwierig zu beantworten, da die meisten Männer eher mit als an ihrem Prostatakarzinom versterben³. Und natürlich sind diese Fragen nicht durch eine einzige Antwort zu klären. Der Verlauf einer Tumorerkrankung hängt von sehr vielen Faktoren ab, aber insbesondere der Zeitpunkt der Entstehung von genetischen Veränderungen hat einen starken Einfluss auf das Progressionsverhalten der Karzinome⁹. Wir wissen, dass die 16q-Deletion bereits zu einem frühen Zeitpunkt der Tumorentwicklung auftreten kann. Je früher die 16q-Deletion entsteht, desto höher ist vermutlich die Wahrscheinlichkeit einer Ausdehnung der 16q-Deletion auf größere Bereiche des

Chromosomes. Die Ausdehnung der Deletion würde jedoch auch zu einer Progression des Tumors führen und damit vermutlich zu einem Wachstumsvorteil der betroffenen Zellen. Es ist daher gar nicht abwegig, dass anhand der Deletionsgröße und der Heterogenität der 16q-Deletion im Tumor das Alter des Tumors abgeschätzt werden könnte. Damit bietet sich eventuell die Möglichkeit zu bestimmen wie lang „die Zündschnur der Bombe“ tatsächlich ist und wie wahrscheinlich ein lebensbedrohlicher Verlauf der Erkrankung wäre. Dies würde eine der dringlichsten Fragen in der Prostatakarzinomforschung klären.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass die 16q-Deletion in allen Phasen der Tumorprogression entstehen kann. Die Größe der Deletion ist dabei entweder im Verlauf der Erkrankung konstant oder es kommt während der Progression zu einer Ausdehnung der 16q-Deletion auf weitere Bereiche des 16q-Arms. Die 16q-Deletion hat damit ein hohes Potential als prognostischer Marker in der Diagnostik des Prostatakarzinoms.

5 Zusammenfassung

Die 16q-Deletion zählt mit einer Häufigkeit von circa 32,6 % zu den häufigsten genetischen Veränderungen beim Prostatakarzinom. Bedingt durch die Deletion kann es zum Verlust von wenigen bis hin zu mehreren Megabasen auf dem langen Arm des Chromosoms 16 kommen. Eine Studie konnte zeigen, dass nicht nur der Nachweis der 16q-Deletion, sondern auch ihre Größe von klinischer Relevanz beim Prostatakarzinom ist. Je größer der deletierte Bereich ist, desto schlechter ist die Prognose für den Patienten. Damit ist die 16q-Deletion einer der vielversprechendsten molekularen Marker beim Prostatakarzinom. Unbekannt ist jedoch, zu welchem Zeitpunkt der Tumorentwicklung die 16q-Deletion entsteht (Heterogenität der Deletion) und wie es zu den unterschiedlichen Ausdehnungen der 16q-Deletion kommt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher zu prüfen, wie heterogen die 16q-Deletion ist und ob große Deletionen aus kleinen Deletionen entstehen können. Dazu wurde der 16q-Kopiezahlsstatus in den Regionen 16q21, 16q23 und 16q24 mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung an einem Heterogenitäts Tissue Microarray untersucht. Der Heterogenitätsarray enthält 317 unifokale Tumoren aus denen jeweils zehn Stenzen aus zehn unterschiedlichen Bereichen des Tumors entnommen wurden. Eine 16q-Deletion konnte in 88 (32,6 %) von 270 analysierbaren Tumoren nachgewiesen werden. Von diesen Tumoren hatten 27 (10,0 %) eine 16q-Deletion in allen analysierbaren Stenzen (homogene Verteilung). In 61 (22,6 %) der Tumoren konnte die 16q-Deletion nicht in allen auswertbaren Stenzen nachgewiesen werden (heterogene Verteilung). Um zu prüfen, ob die 16q-Deletion sich während der Tumorprogression ausdehnt oder jede 16q-Deletionsgröße de novo entsteht wurden die Patienten ausgewählt, bei denen in mindestens drei von mindestens fünf auswertbaren Tumorgewebeproben eine 16q-Deletion nachgewiesen wurde. Dieses Kriterium erfüllten 59 Patienten von denen 23 (38,98 %) nur eine 16q-Deletionsgröße besitzen. In den restlichen 32 (54,24 %) der 16q-deletierten Tumoren wurden mindestens zwei unterschiedliche Größen der 16q-Deletion detektiert. Als Ursprungsort der 16q-Deletion konnte sowohl die 16q24 als auch die 16q23 Region identifiziert werden. Insgesamt zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass die 16q-Deletion zu jedem Zeitpunkt der Tumorprogression auftreten kann. Die unterschiedlichen Größen der Deletion können sowohl de novo als auch durch eine Ausdehnung der Deletion während des Tumorwachstums entstehen.

6 Abstract

Deletion of 16q is one of the most common chromosomal alterations in prostate cancer. The alteration is highly variable in size, extending from a few kilo bases to the entire q-arm. Furthermore, one study has shown that the size of the deletion can be directly associated with prostate cancer prognosis. Tumors with large 16q deletions had the worst prognosis, whereas tumors with small 16q deletions had a better prognosis. Overall, 16q deletion is one of the most promising prognostic markers for prostate cancer aggressiveness. However, the longitudinal development of 16q deletions, i.e. when they occur during tumor progression and whether large 16q deletions can developed from small deletions, is not known. To answer these questions, a 16q deletion size mapping study was performed in a cohort of 317 prostate cancers. From each cancer, 10 distant areas were analyzed using fluorescence in situ hybridization (FISH) probes directed against different regions of chromosome 16q, including 16q21, 16q23 and 16q24. Any deletion of 16q was found in 88 (32,6 %) of 270 analyzable cancers. Of these 88 tumors, 27 (10.0 %) showed 16q deletion across all areas of the tumor (homogenous deletion), whereas 61 (22,6 %) tumors had focal (heterogeneous) 16q deletions. The deletion size was assessed in 59 of the 88 cancers with 16q deletions. Of these, 23 (38.98%) tumors showed a constant (small, medium or large) 16q deletion size across the entire tumor bulk, whereas 32 (54.24 %) tumors showed evidence for growing deletions, i.e., small deletions in some tumor areas but medium-sized or large deletions in other areas. Large deletions appeared to develop through progressive loss of genetic material starting either at 16q23 or at the 16q telomere (16q24). In summary, the results of this study showed that 16q deletion can occur at any time during tumor progression. Small, medium and large 16q deletions can occur de novo or developed during tumor progression.

7 Tabellen – und Abbildungsverzeichnis

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Heterogenitätsarray	9
Abbildung 2:	Lokalisation der BAC-Klone von der Firma Source Biosciene auf dem langen Arm des Chromosome 16	11
Abbildung 3:	Exemplarische Darstellung der FISH-Auswertung.	20
Abbildung 4:	Verteilung der 16q-Deletion in jedem Tumor der 88 analysierbaren Patienten.	23
Abbildung 5:	Vergleich des Nachweises einer 16q24-Deletion am Heterogenitäts-TMA und Prognose-TMA	24
Abbildung 6:	Vergleich des Nachweises einer 16q24-Deletion am Heterogenitäts-TMA und Prognose-TMA in Abhängigkeit der 16q24-deletierten Stenzen in der Heterogenitätsanalyse.	25
Abbildung 7:	Potentielle Kollisionskarzinome.....	26
Abbildung 8:	Tumoren mit einer konstanten 16q-Deletionsgröße in allen 16q-deletierten Gewebeproben	27
Abbildung 9:	Tumoren mit einer wachsenden 16q-Deletionsgröße in den 16q-deletierten Gewebeproben	28

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Häufige Deletionsregionen beim Prostatakarzinom.....	3
Tabelle 2:	Patienten – Kollektiv des Heterogenitäts – Gewebemikroarray (TMA).....	10
Tabelle 3:	Verwendete Reagenzien und Herkunft	11
Tabelle 4:	Verwendete Geräte und Herkunft	13
Tabelle 5:	Verwendete Materialien und Herkunft	14
Tabelle 6:	Häufigkeit der 16q-Deletion in der Heterogenitätsanalyse.....	22
Tabelle 7:	Auftreten und Verteilung der 16q-Deletionsgrößen in der Heterogenitätsanalyse.....	26

8 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
<	kleiner
=	gleich
>	größer
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
aCGH	Array Comparative genomic hybridization
AMACR	Alpha-methylacyl-CoA-Racemase
AJCC	American Joint Committee on Cancer, Chicago/USA
BAC	künstliches bakterielles Chromosom (bacterial artificial chromosome)
Bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
ca.	Circa
CGH	Comparative genomic hybridization
d.h.	das heißt
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Deoxyribonucleic acid)
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DRU	digital rektale Untersuchung
dTTPs	Desoxythymidintriphosphat
dUTPs	Desoxyuridintriphosphat
E.coli	Escherichia Coli

ERG	erythroblast transformation-specific related gen
et al.	und andere (et alii/aliae)
FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
g	Gramm
het del	heterozygot deletiert
homo del	homozygot deletiert
l	Liter
LOH	Verlust der Heterozygotie (loss of heterozygosity)
m	Meter
m	Milli
M	Molar
min.	Minuten
n	Anzahl
N	Lymphknoten (nodes)
N2	Stickstoff (Nitrogenium)
n	Nano
NGS	Next Generation Sequencing / Sequenzierung der nächsten Generation
P	Wahrscheinlichkeit (probability)
pH	pH-Wert (potentia hydrogenii)
PIN	Prostatische intraepitheliale Neoplasie
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
RNA	Ribonukleinsäure (Ribonucleic Acid)
RNase	Ribonuklease rpm Runde pro Minute (rounds per minute)
rpm	revolutions per minute / Umdrehungen pro Minute

SNP	single nucleotide polymorphism / einzelner Nukleotidpolymorphismus
SSC	Sodium/Sodiumcitrat / Natrium/Natriumcitrat
T	Tumor
TMA	Prostata-Prognose-Array (tissue micro array)
TNM	Stadieneinteilung von malignen Tumoren (Classification of Malignant Tumours)- Tumor, Nodal (Lymphknoten), Metastasen
UICC	Internationale Vereinigung gegen Krebs (Union internationale contre le cancer), Genf/Schweiz
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

9 Literaturverzeichnis

- 1 Robert-Koch-Institut. 2015. Gesundheit in Deutschland.
- 2 Jemal, Ahmedin; Bray, Freddie; Center, Melissa M.; Ferlay, Jacques; Ward, Elizabeth; Forman, David. Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians*. 61. 2011. 2. 69–90.
- 3 Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe AWMF): Konsultationsfassung: Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms, Langversion 4.0, 2016 AWMF Registernummer: 043/022OL.
- 4 Jocham, Dieter; Miller, Kurt. 2007. Praxis der Urologie.
- 5 Mottet N. et. al. Guidelines on Prostate Cancer; European Association of Urology 2015. 2015.
- 6 Heidenreich, Axel; Bellmunt, Joaquim; Bolla, Michel; Joniau, Steven et. al. EAU guidelines on prostate cancer. Part 1: screening, diagnosis, and treatment of clinically localised disease. *European urology*. 59. 2011. 1. 61–71.
- 7 Gleason, D. F. Histologic grading of prostate cancer: a perspective. *Human pathology*. 23. 1992. 3. 273–279.
- 8 Schlomm, Thorsten. Radikale Prostatektomie Individualisierte Operationstechniken. *UroForum*. 2013.
- 9 Kluth, Martina. Dissertationsschrift; Bedeutung und Charakterisierung der 6q-Deletion beim Prostatakarzinom. 2015.
- 10 Weischenfeldt J, Simon R, Feuerbach L, Schlangen K, Weichenhan D, Minner S, et al. Integrative genomic analyses reveal an androgen-driven somatic alteration landscape in early-onset prostate cancer. *Cancer cell*. 23. 2013. 2. 159–170.
- 11 Williams, Julia L.; Greer, Peter A.; Squire, Jeremy A. Recurrent copy number alterations in prostate cancer: an in silico meta-analysis of publicly available genomic data. *Cancer genetics*. 207. 2014. 10-12. 474–488.
- 12 Steurer S, Mayer PS, Adam M, et al. TMPRSS2-ERG Genfusionen korrelieren mit jungem Patientenalter in Low-grade-Prostatakarzinomen; *European Urology* 07/2014.
- 13 Minner S, Enodien M, Sirma H, Luebke AM, Krohn A, Mayer PS, et al. ERG status is unrelated to PSA recurrence in radically operated prostate cancer in the absence of antihormonal therapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 17. 2011. 18. 5878–5888.
- 14 Taylor BS, Schultz N, Hieronymus H, Gopalan A, Xiao Y, Carver BS, et al. Integrative genomic profiling of human prostate cancer. *Cancer cell*. 18. 2010. 1. 11–22.
- 15 Kluth, Martina; Runte, Frederic; Barow, Philipp; Omari, Jazan et al. Concurrent deletion of 16q23 and PTEN is an independent prognostic feature in prostate cancer. *International journal of cancer*. 137. 2015. 10. 2354–2363.
- 16 Sun J, Liu W, Adams TS, Sun J, Li X, Turner AR, et al. DNA copy number alterations in prostate cancers: a combined analysis of published CGH studies. *The Prostate*. 67. 2007. 7. 692–700.

- 17 Sobin, L. H. 2010. TNM classification of malignant tumours.
- 18 Schlomm, Thorsten; Sauter, Guido. BEURTEILUNG DES PROSTATAKARZINOMS Gleason-Score: Status 2016. Perspektiven der Urologie und Nephrologie 2016-Deutsches Ärzteblatt.
- 19 Nayyar, Rishi; Singh, Prabhjot; Gupta, Narmada P.; Hemal, Ashok K.; Dogra, Prem N.; Seth, Amlesh; Kumar, Rajeev. Upgrading of Gleason score on radical prostatectomy specimen compared to the pre-operative needle core biopsy: an Indian experience. *Indian journal of urology : IJU : journal of the Urological Society of India*. 26. 2010. 1. 56–59.
- 20 Burkhardt L, Fuchs S, Krohn A, Masser S, Mader M, Kluth M, et al. CHD1 is a 5q21 tumor suppressor required for ERG rearrangement in prostate cancer. *Cancer research*. 73. 2013. 9. 2795–2805.
- 21 Krohn A, Diedler T, Burkhardt L, Mayer PS, De Silva C, Meyer-Kornblum M, 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. 2012. 2. 401–412.
- 22 Kluth M, Harasimowicz S, Burkhardt L, Grupp K, Krohn A, Prien K, et al. Clinical significance of different types of p53 gene alteration in surgically treated prostate cancer. *International journal of cancer*. 135. 2014. 6. 1369–1380.
- 23 Krohn A, Seidel A, Burkhardt L, Bachmann F, Mader M, Grupp K, 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. 2013. 1. 130–141.
- 24 Kluth M, Hesse J, Heintz 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. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 26. 2013. 7. 975–983.
- 25 Cher, M. L.; Ito, T.; Weidner, N.; Carroll, P. R.; Jensen, R. H. Mapping of regions of physical deletion on chromosome 16q in prostate cancer cells by fluorescence in situ hybridization (FISH). *The Journal of urology*. 153. 1995. 1. 249–254.
- 26 Visakorpi, Tapio; Hyytinen, Eija; Koivisto, Pasi; Tanner, Minna; et al. In vivo amplification of the androgen receptor gene and progression of human prostate cancer. *Nature genetics*. 9. 1995. 4. 401–406.
- 27 Joos, S.; Bergerheim, U. S.; Pan, Y.; Matsuyama, H.; et. al. Mapping of chromosomal gains and losses in prostate cancer by comparative genomic hybridization. *Genes, chromosomes & cancer*. 14. 1995. 4. 267–276.
- 28 Pan, Y.; Matsuyama, H.; Wang, N.; Yoshihiro, S.; Haggarth, L.; Li, C.; et. al. Chromosome 16q24 deletion and decreased E-cadherin expression: possible association with metastatic potential in prostate cancer. *The Prostate*. 36. 1998. 1. 31–38.
- 29 Matsuyama, Hideyasu; Pan, Yi; et. al. Clinical significance of chromosome 8p, 10q, and 16q deletions in prostate cancer. *The Prostate*. 54. 2003. 2. 103–111.

- 30 Carter, B. S.; Ewing, C. M.; Ward, W. S.; Treiger, B. F.; et. al. Allelic loss of chromosomes 16q and 10q in human prostate cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 87. 1990. 22. 8751–8755.
- 31 Elo, J. P.; Harkonen, P.; Kyllonen, A. P.; Lukkarinen, O.; Vihko, P. Three independently deleted regions at chromosome arm 16q in human prostate cancer: allelic loss at 16q24.1-q24.2 is associated with aggressive behaviour of the disease, recurrent growth, poor differentiation of the tumour and poor prognosis for the patient. *British journal of cancer*. 79. 1999. 1. 156–160.
- 32 Latil, A.; Cussenot, O.; Fournier, G.; Driouch, K.; Lidereau, R. Loss of heterozygosity at chromosome 16q in prostate adenocarcinoma: identification of three independent regions. *Cancer research*. 57. 1997. 6. 1058–1062.
- 33 Bergerheim, U. S.; Kunimi, K.; Collins, V. P.; Ekman, P. Deletion mapping of chromosomes 8, 10, and 16 in human prostatic carcinoma. *Genes, chromosomes & cancer*. 3. 1991. 3. 215–220.
- 34 Mao X, Boyd LK, Yanez-Munoz RJ, et al. Chromosome rearrangement associated inactivation of tumour suppressor genes in prostate cancer. *American journal of cancer research*. 1. 2011. 5. 604–617.
- 35 Huang S, Gulzar ZG, Salari K, et al. Recurrent deletion of CHD1 in prostate cancer with relevance to cell invasiveness. *Oncogene*. 31. 2012. 37. 4164–4170.
- 36 Suzuki H, Komiya A, Emi M, et al. Three distinct commonly deleted regions of chromosome arm 16q in human primary and metastatic prostate cancers. *Genes, chromosomes & cancer*. 17. 1996. 4. 225–233.
- 37 Umbas R, Schalken JA, Aalders TW, et al. Expression of the cellular adhesion molecule E-cadherin is reduced or absent in high-grade prostate cancer. *Cancer research*. 52. 1992. 18. 5104–5109.
- 38 Watson JE, Doggett NA, Albertson DG, et al. Integration of high-resolution array comparative genomic hybridization analysis of chromosome 16q with expression array data refines common regions of loss at 16q23-qter and identifies underlying candidate tumor suppressor genes in prostate cancer. *Oncogene*. 23. 2004. 19. 3487–3494.
- 39 Kallioniemi; Visakorpi; Karhu; Pinkel. *Gene Copy Number Analysis by Fluorescence in Situ Hybridization and Comparative Genomic Hybridization. Methods (San Diego, Calif.)*. 9. 1996. 1. 113–121.
- 40 Oros KK, Arcand SL, Bayani J, Squire JA, Mes-Masson AM, Tonin PN. Analysis of genomic abnormalities in tumors: a review of available methods for Illumina two-color SNP genotyping and evaluation of performance. *Cancer genetics*. 206. 2013. 4. 103–115.
- 41 Prudnikova TY, Soultz N, Kutsenko OS, Mostovich LA, Haraldson K, Ernberg I, et al. Heterogeneity of d-glucuronyl C5-epimerase expression and epigenetic regulation in prostate cancer. *Cancer medicine*. 2. 2013. 5. 654–661.
- 42 Yoshimoto M, Ding K, Sweet JM, Ludkovski O, Trottier G, Song KS, et al. PTEN losses exhibit heterogeneity in multifocal prostatic adenocarcinoma and are associated with higher Gleason grade. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 26. 2013. 3. 435–447.

- 43 Kristiansen G, Fritzsche FR, Wassermann K, Jäger C, Töls A, Lein M, et al. GOLPH2 protein expression as a novel tissue biomarker for prostate cancer: implications for tissue-based diagnostics. *British journal of cancer*. 99. 2008. 6. 939–948.
- 44 Hirsch-Kauffmann, Monica; Schweiger, Manfred; Schweiger, Michal-Ruth. 2009. *Biologie und molekulare Medizin für Mediziner und Naturwissenschaftler*.
- 45 Baca SC, Prandi D, Lawrence MS, et al. Punctuated evolution of prostate cancer genomes. *Cell*. 153. 2013. 3. 666–677.
- 46 Sedlacek, Hans-Harald. 2013. *Onkologie - die Tumorerkrankungen des Menschen*.
- 47 Batzler, Wolf Ulrich. 2008. *Krebs in Deutschland 2003 - 2004*.

10 Danksagung

Zu Beginn danke ich Herrn Prof. Dr. Sauter für die Vergabe des Dissertationsthemas und für eine sehr lehrreiche und spannende Zeit an seinem Institut für experimentelle Pathologie.

Für einen stets organisierten Ablauf möchte ich mich ganz besonders bei Frau Dr. Martina Kluth bedanken, die durch eine ausgezeichnete Betreuung einen erfolgreichen Abschluss der Promotionsarbeit erst ermöglicht hat. Insbesondere für die außerordentlich engagierte und hilfreiche Betreuung meiner Arbeit möchte ich vom ganzen Herzen danke sagen.

Zuletzt gebührt mein Dank meiner Familie und insbesondere meiner Verlobten, Nada Aoudi, für deren ständige Unterstützung sowie deren aufgebrachte Geduld während der Promotionszeit.

11 Lebenslauf

Lebenslauf entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

12 Eidesstaatliche 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 Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

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

Unterschrift