

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Pathologie

Direktor Prof. Dr. med. G. Sauter

Die reduzierte AZGP1 Expression ist ein unabhängiger Prognosefaktor für den frühzeitigen Wiederanstieg von PSA und assoziiert mit positiver ERG-Fusion und PTEN-deletierten Prostatakarzinomen

Dissertation

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

vorgelegt von:

Sandra Carina Kleinhans

aus Prien am Chiemsee

Hamburg 2022

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am:
11.01.2023

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

Prüfungsausschuss, die Vorsitzende: PD Dr. Andrea Kristina Horst

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. Guido Sauter

Inhaltsverzeichnis

1. Publikation der Originalarbeit	1
„Reduced AZGP1 expression is an independent predictor of early PSA recurrence and associated with ERG fusion positive and PTEN deleted prostate cancers“	
2. Darstellung der Publikation	13
2.1 Einleitung.....	13
2.2 Material und Methoden.....	15
2.2.1 Patienten	15
2.2.2 Immunhistochemie	15
2.3 Ergebnisse	17
2.4 Diskussion.....	18
2.5 Zusammenfassung	21
2.6 Abstract.....	22
2.7 Literaturverzeichnis	23
3. Erklärung des Eigenanteils.....	28
4. Danksagung.....	29
5. Lebenslauf	30
6. Eidesstattliche Versicherung	31

1. Publikation der Originalarbeit



IJC

International Journal of Cancer

Reduced AZGP1 expression is an independent predictor of early PSA recurrence and associated with ERG-fusion positive and PTEN deleted prostate cancers

Christoph Burdelski^{1,2†}, Sandra Kleinhans^{1†}, Martina Kluth¹, Claudia Hube-Magg¹, Sarah Minner¹, Christina Koop¹, Markus Graefen³, Hans Heinzer³, Maria Christina Tsourlakis¹, Waldemar Wilczak¹, Andreas Marx¹, Guido Sauter¹, Corinna Wittmer¹, Hartwig Huland³, Ronald Simon¹, Thorsten Schlomm^{3,4} and Stefan Steurer¹

¹ Institute of Pathology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

² General, Visceral and Thoracic Surgery Department and Clinic, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

³ Martini-Clinic, Prostate Cancer Center, University Medical Center Hamburg- Eppendorf, Hamburg, Germany

⁴ Department of Urology, Section for Translational Prostate Cancer Research, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

Zinc-alpha 2-glycoprotein (AZGP1) is involved in lipid metabolism and was suggested as a candidate prognostic biomarker in prostate cancer. To evaluate the clinical impact and relationship with key genomic alterations in prostate cancer, AZGP1 expression was analyzed by immunohistochemistry on a tissue microarray containing 11,152 prostate cancers. Data on ERG status and PTEN, 3p13, 5q21 and 6q15 deletions were available from earlier studies. AZGP1 expression was strong in benign prostatic glands but absent in 38.0% of 8,510 interpretable prostate cancers. Reduced AZGP1 expression was associated with TPMRSS2:ERG fusions, both by FISH and immunohistochemical analysis ($p<0.0001$ each). For example, AZGP1 was absent in

54.6% of 2,029 ERG IHC positive but in only 28.1% of 2,398 ERG negative cancers. Irrespective of the ERG status, reduced AZGP1 expression was tightly linked to high Gleason score, advanced pathological tumor stage, positive nodal status and early PSA recurrence ($p<0.0001$ each). Reduced AZGP1 expression was also strongly associated with PTEN deletions.

AZGP1 immunostaining was lacking in 62.7% of 842 PTEN deleted but in only 37.3% of PTEN non-deleted cancers but retained strong prognostic influence in both subgroups ($p<0.0001$ each). The prognostic role of AZGP1 expression was also independent of Gleason score, pT stage, pN stage, surgical margin status and preoperative PSA, irrespective of whether preoperative or postoperative variables were used for modeling. In conclusion, the results of our study demonstrate that reduced AZGP1 expression is strongly related to adverse prostate cancer prognosis, independently of established clinic-pathological variables and PTEN deletions.

Key words: AZGP1, IHC, prostate cancer, TPMRSS2:ERG fusion, tissue microarray, prognosis

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

†C.B. and S.K. contributed equally to this work.

Disclosure of potential conflict of interest: The authors declare no conflict of interests.

DOI: 10.1002/ijc.29860

History: Received 4 Nov 2014; Accepted 26 Aug 2015; Online 18

Sep 2015

Correspondence to: Dr. Stefan Steurer, Institute of Pathology,
University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg,
Germany, Tel.: 149-40-7410-56513, Fax: 149 40-7410-55997,
E-mail: s.steurer@uke.de

What's new?

Zinc-binding Alpha-2-Glycoprotein 1 (AZGP1) is a secreted protein involved in lipid degradation and a putative prognostic marker in prostate cancer. Here the authors analyzed a tissue microarray containing more than 11,000 prostate cancer samples and found AZGP1 overall downregulated in cancers as compared to benign prostate tissue. Reduced AZGP1 expression was tightly linked to poor clinical outcome and was found in cancers harboring both fusions of the proto-oncogene ERG and deletions of the PTEN tumor suppressor gene. These results underscore the clinical potential of AZGP1 analysis in the care of prostate cancer patients.

Prostate cancer is the most prevalent cancer in men in Western societies.¹ Although most prostate cancers are characterized by a rather indolent clinical course, it represents the third most common cause of cancer related death in men. Despite major advances in biomarker discovery there is still a dramatic lack of clinically applicable prognostic markers in prostate cancer. Currently, Gleason score, tumor extent on biopsies, preoperative prostate-specific antigen (PSA) and clinical stage are the only clinically useful prognostic markers in this disease, however, their predictive power is not sufficiently strong to allow for optimal individual treatment decisions. It is hoped that a better understanding of disease biology will eventually lead to the identification of clinically applicable molecular markers that enable a more reliable prediction of prostate cancer aggressiveness.

Zinc-binding Alpha-2-Glycoprotein 1 (AZGP1) is a soluble protein that is known to stimulate lipid degradation in adipocytes.²⁻⁴ AZGP1 is physiologically expressed in various normal tissues including several types of secretory epithelial cells as for example found in breast, prostate and liver as well as in salivary, bronchial, gastrointestinal and sweat glands.⁵ Consistent with its production by secretory epithelial cells, AZGP1 protein has been identified in most body fluids.⁶ Expression of AZGP1 is also found in several tumor entities such as in carcinomas of prostate,⁷ breast⁸⁻¹⁰ and uterine cervix.¹¹ In prostate cancer, AZGP1 was first analyzed in 1990.¹² Since then, several authors have performed AZGP1 expression analyses in normal and neoplastic prostate, and some of them have proposed a clinically relevant

association between reduced AZGP1 expression and high Gleason grade as well as advanced pathological tumor stage.^{7,13-15} Several studies even suggested a link between low expression levels and poor clinical outcome based on the analysis of patient cohorts including up to 228 patients,^{7,12-17} and one study described a three-protein biomarker panel, including AZGP1, for prediction of prostate cancer related death.¹⁸

The promising findings of these studies prompted us for a thorough evaluation of the clinical impact of AZGP1 in prostate cancer. We designed this study to further address the question whether the prognostic role of AZGP1 expression might be limited to particular clinical molecularly defined prostate cancer subgroups. For this purpose, we utilized our preexisting tissue microarray containing >11,000 prostate cancer specimens with clinical follow-up and attached molecular database. Our data identify reduced AZGP1 protein expression as a strong predictor of PSA recurrence in prostate cancer, which is independent of established clinic-pathological features.

Material and Methods

Patients

A consecutive series of radical prostatectomy specimens were available from 11,152 patients, undergoing surgery between 1992 and 2011 at the Department of Urology and the Martini Clinics at the University Medical Center Hamburg-Eppendorf. Follow-up data were available for a total of 9,695 patients with a median follow-up of 31.2 months (range: 0.3 to 228 months; Table 1). Prostate specific antigen (PSA) values were measured

following surgery and PSA recurrence was defined as the time point when postoperative PSA was at least 0.2 ng/ml and increasing at subsequent measurements, according to the guidelines recommended by the European Association of Urology.¹⁹ The fraction of patients with a PSA recurrence within 3 months after surgery was 2.4% in our cohort. All prostate specimens were analyzed according to a standard procedure, including a complete embedding of the entire prostate for histological analysis.²⁰ The usage of archived diagnostic left-over tissues for manufacturing of tissue microarrays and their analysis for research purposes as well as patient data analysis has been approved by the local ethics committee (Ethics commission Hamburg, WF-049/09 and PV3652). All work has been carried out in compliance with the Helsinki Declaration. Usage of patient data and routinely archived formalin fixed left-over patient tissue samples for research purposes by the attending physician is approved by local laws (HmbKHG, §12,1). The TMA manufacturing process was described earlier in detail.²¹ In short, one 0.6 mm core was taken from a representative tissue block from each patient. The tissues were distributed among 24 TMA blocks, each containing 144 to 522 tumor samples. For internal controls, each TMA block also contained various control tissues, including normal prostate tissue. The molecular database attached to this TMA contained results on ERG expression in 9,619 (expanded from Ref. 22), ERG break apart FISH analysis in 6,106 (expanded from Ref. 23) and deletion status of CHD1 (5q21) in 7,222 (expanded from Ref. 24), MAP3K7 (6q15) in 3,523 (expanded from Ref. 25), PTEN (10q23) in 6,109 (expanded from Ref. 26) and FOXP1 (3p13) in 6,410 (expanded from Ref. 27) cancers.

Immunohistochemistry

Freshly cut TMA sections were immunostained on one day and in one

experiment. Slides were deparaffinized and exposed to heat-induced antigen retrieval for 5 min in an autoclave at 121°C in pH 7.8 Tris-EDTA-Citrate buffer. Primary antibody specific for AZGP1 (rabbit polyclonal antibody, Proteintech Group, Chicago; cat#13399-1-AP; dilution 1:1,800) was applied at 37°C for 60 min. Bound antibody was then visualized using the EnVision Kit (Dako, Glostrup, Denmark) according to the manufacturers directions. The staining intensity (0, 11, 21, 31) and the fraction of positive tumor cells were recorded for each tissue spot. A final score was built from these two variables according to the following criteria: Tumors with complete absence of staining were scored as “negative”. Tumors with a score “weak” had a staining intensity of 11 in 70% of tumor cells or 21 in 30% of tumor cells. A score “moderate” was given to cancers with a staining intensity of 11 in >70% of tumor cells, or 21 in >30% and 70% of tumor cells, or 31 in 30% of tumor cells. The score was “strong” if staining intensity was 21 in >70% of tumor cells or 31 in >30% of tumor cells. This is a standardized scoring system used by our group with the purpose of defining a group with high expression level, a group with low or absent expression and two intermediate groups. In our experience this works well to define whether molecular features are associated with tumor phenotype and clinical outcome.^{28,29}

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

	No. of patients	
	Study cohort on tissue microarray (n=11,152)	Biochemical relapse among categories (n=1,824)
Follow-up (mo)		
Mean	53.4	–
Median	36.8	–
Age (y)		
<50	318	49
50–60	2,768	460
60–70	6,548	1,081
>70	1,439	232
Pretreatment PSA (ng/ml)		
<4	1,407	142
4–10	6,735	827
10–20	2,159	521
>20	720	309
pT category (AJCC 2002)		
pT2	7,370	570
pT3a	2,409	587
pT3b	1,262	618
pT4	63	49
Gleason grade		
<3 + 3	2,859	193
3 + 4	6,183	849
4 + 3	1,565	573
>4 + 4	482	208
pN category		
pN0	6,117	1,126
pN1	561	291
Surgical margin		
negative	8,984	1,146
positive	1,970	642

Statistics

Statistical calculations were performed with JMP 9 software (SAS Institute, NC). Contingency tables and the chi² test were performed to search for associations between molecular markers and tumor phenotype. Survival curves were calculated according to Kaplan-Meier. The LogRank test was applied to detect significant differences between groups. Cox proportional hazards regression

analysis was performed to test the statistical independence and significance between pathological, molecular and clinical variables. Separate analyses were performed using different sets of variables available either before or after prostatectomy.

Results

Technical aspects

A total of 2,642 (23.7%) tissue samples were noninformative due to the complete lack of tissue or absence of unequivocal cancer cells.

Immunohistochemistry of AZGP1 in prostate cancer

AZGP1 expression was moderate to strong in benign prostate glands. In prostate cancer, AZGP1 expression was lost in 38.0% of 8,510 interpretable cases (Fig. 1). The staining was cytoplasmatic with higher intensities at the luminal edge of the tumor cells. Detectable AZGP1 staining was considered weak in 24.7%, moderate in 26.2% and strong in 11.1% of cases.

Association with ERG status

To evaluate whether AZGP1 expression is associated with ERG status we made use of our molecular database attached to the TMA. Data on both interpretable AZGP1 staining and ERG status obtained by FISH were available in 4,427 patients and by IHC in 6,844 tumors. Loss of AZGP1 immunostaining was markedly more frequent in ERG positive (54.3%) than in ERG negative tumors (27.5%; p < 0.0001; Fig. 2). The comparison of AZGP1 staining with FISH-ERG status showed comparable results: Loss of AZGP1 immunostaining was found in only 28.1% of ERG-fusion negative cancers but in 54.6% ERG-fusion positive cancers (p < 0.0001; Fig. 2).

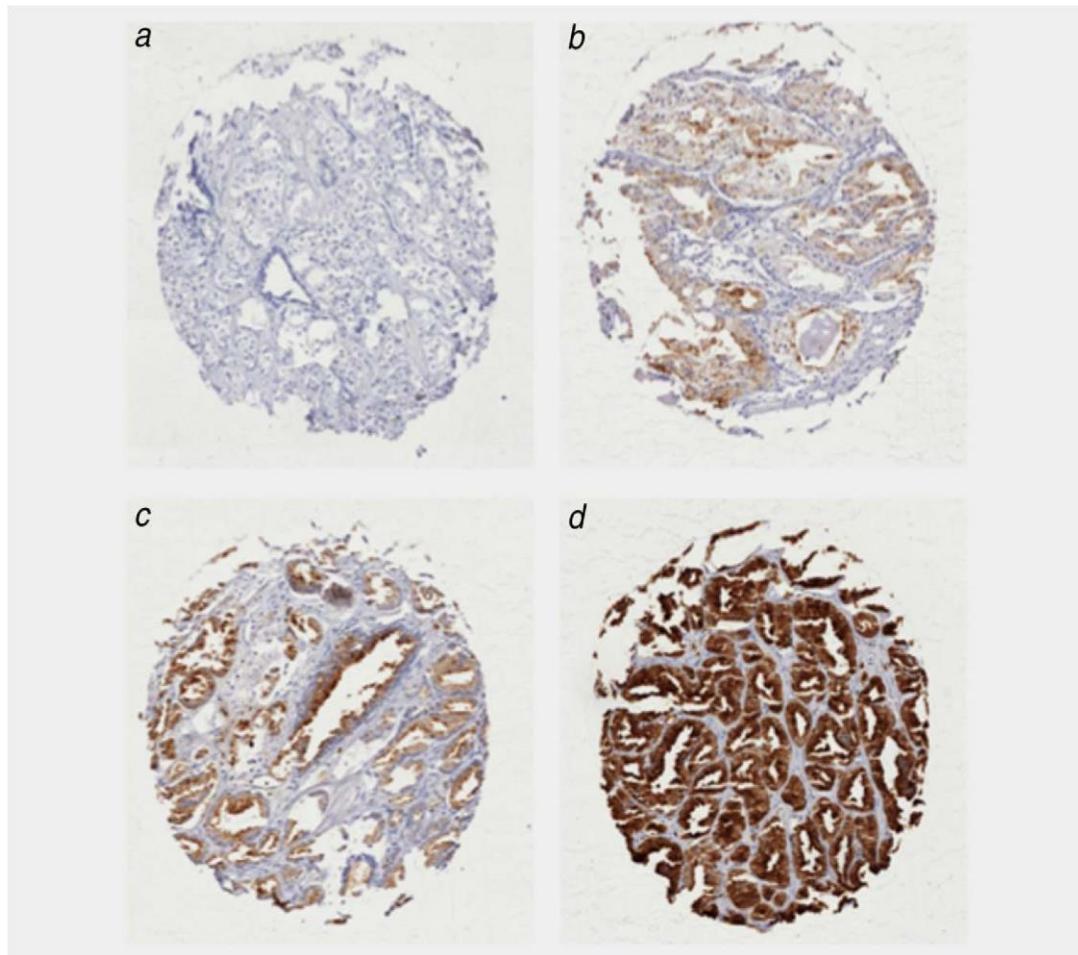


Figure 1. Representative images of AZGP1 immunostaining in prostate cancer. (a) negative, (b) weak, (c) moderate and (d) strong staining.

Association with other key genomic alterations

Previous studies have provided evidence for distinct molecular subgroups of prostate cancers defined by gene rearrangements and several genomic deletions. For example, others and us have described a strong link between PTEN, 3p13 deletion and ERG positivity and between 5q21, 6q15 deletions and ERG negativity.^{24–26,30–32} To study, whether AZGP1 expression might be particularly linked to these genomic deletions, AZGP1 data were compared with preexisting findings on PTEN, 3p13, 6q15 and 5q21 deletions. As expected for a feature that is tightly linked to ERG expression, the analysis of all cancers revealed a strong association

between reduced or lost AZGP1 expression and PTEN as well as 3p13 deletions ($p < 0.0001$ each), and between high AZGP1 expression and 6q15 as well as 5q21 deletions ($p < 0.0001$, Fig. 3). Subgroup analyses of ERG positive and ERG negative cancers revealed a marked link between reduced AZGP1 expression and PTEN deletions in both subgroups. For example, negative AZGP1 immunostaining was seen in 42.4% of PTEN deleted ERG positive cancers but in only 25.9% of non-PTEN deleted ERG positive cancers ($p < 0.0001$). All other analyzed deletions were largely unrelated to AZGP1 expression in cancers stratified according to their ERG status (Supporting Information Fig. 1).

Relationship with tumor phenotype and PSA recurrence

The comparison of AZGP1 expression with tumor phenotype and PSA recurrence was separately done for ERG-negative and ERG positive cancers due to the striking AZGP1 expression differences between these subgroups. These analyses revealed similar findings for both subgroups with a strong association between low AZGP1 expression and unfavorable features in ERG negative as well as in ERG positive tumors (Table 2). In both subgroups, low AZGP1 expression was linked to advanced stage, high Gleason score, positive nodal status, high preoperative PSA-level ($p < 0.0001$ each), and early PSA recurrence ($p < 0.0001$) (Figs. 4a and 4b). A subgroup analysis with respect to PSA recurrence was also performed for AZGP1 expression in PTEN-deleted and PTENnon-deleted cancers because of the strong relationship of these two molecular markers and the known strong prognostic role of PTEN deletions (Figs. 4c and 4d). For this analysis, tumors with positive (weak, moderate, strong) AZGP1 expression were grouped together. The analysis revealed, that the prognostic impact of AZGP1 loss was independent of PTEN deletions. A significant association between lost/ reduced AZGP1 expression and an increased risk for PSA recurrence was found in all subgroups defined by PTEN deletion and ERG status with the only exception of the small group of 244 PTEN deleted ERG negative cancers. If all cancers were jointly analyzed, there was a significant relationship between loss of AZGP1 expression and high tumor stage, high Gleason score, positive nodal status, positive surgical margin, preoperative PSA-level ($p < 0.0001$ each) and early PSA recurrence ($p < 0.0001$) (Supporting Information Table 1 and Supporting Information Fig. 2).

Ki67 labeling index and AZGP1 loss

The comparison of AZGP1 expression with

the Ki67-labeling index (LI) revealed a negative association with AZGP1 expression. The group of AZGP1 negative cancers ($n=52,008$) had a mean Ki67 LI of 3.18 ± 0.06% whereas AZGP1 positive cancers ($n=53,292$) showed 2.60 ± 0.07% Ki67 staining ($p < 0.0001$).

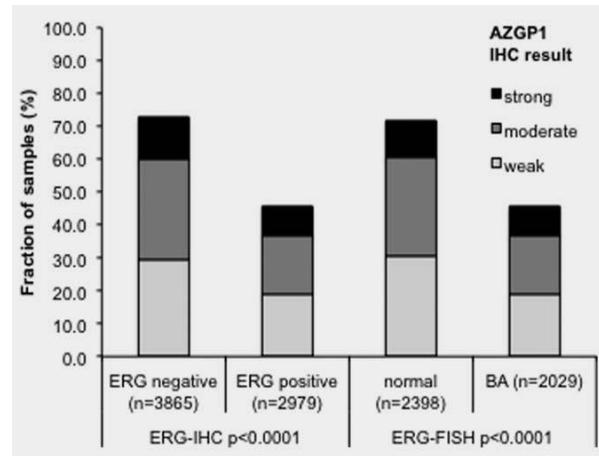


Figure 2. Associations between AZGP1 immunostaining and ERGfusion status by IHC and FISH analysis. BA5ERG breakage (Break Apart).

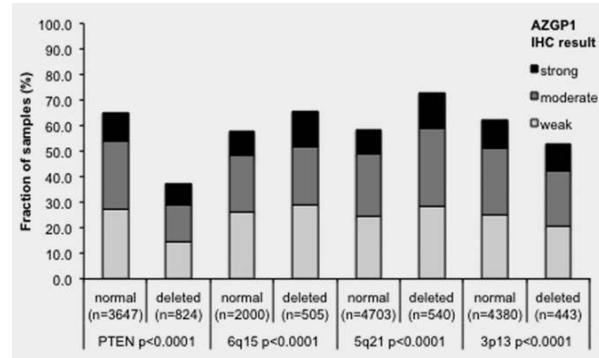


Figure 3. Associations between positive AZGP1 immunostaining and deletion of PTEN, 5q21, 6q15, 3p13 in all cancers.

Multivariate analysis

Multivariate analyses evaluating the clinical relevance of AZGP1 loss were performed in four scenarios. We used a pre-defined set of prognostic variables that are available before or after surgery (Supporting Information Table 2). No. 1 was utilizing all postoperatively available variables including pT, pN, margin status, pre-operative PSA value and Gleason score obtained on the resected prostate.

Scenario 2 was utilizing all postoperatively available variables with the exception of nodal status. The rational for this approach was that lymphadenectomy is not a routine procedure in the surgical therapy of prostate cancer and that excluding pN in multivariate analysis increases case numbers. The next two scenarios tried to better model the preoperative situation. Scenario 3 included AZGP1 loss, preoperative PSA, clinical stage (cT) and the Gleason score obtained on the prostatectomy specimen. Because the post-operative Gleason score varies from the preoperative Gleason score, another multivariate analysis was added as scenario 4. In this scenario, the preoperative Gleason score obtained on the original biopsy was combined with pre-operative PSA, clinical stage and AZGP1 loss. In summary, all 4 scenarios—especially these modeling the preoperative situation—suggested an independent prognostic role of reduced/lost AZGP1 expression in prostate cancer.

Discussion

The results of our study identify loss of AZGP1 expression as a strong predictor of unfavorable clinical course in prostate cancer, which is independent of established clinicpathological and molecular prognostic features.

The fraction of AZGP1 negative (38%) and weakly positive (25%) cancers in our TMA, which was made from one single 0.6 mm tissue spot per cancer, was higher than fraction of cancers with reduced expression in previous studies analyzing large sections (27–46%) or TMAs with 2–3 spots per tumor (7–53%) in cohorts of 48–826 prostate cancers.^{7,12,14,16,33} These discrepancies may be due to the limited sampling (one spot per cancer) in our TMA in case of a potential AZGP1 heterogeneity, or to differences in the antibodies, scoring criteria, or experimental conditions in these studies. However, we have previously demonstrated that our “single spot” TMA approach is optimal for detecting relevant associations even in cases of heterogeneous markers.³⁴ Our

observation of high-level AZGP1 expression in benign prostate tissue is also consistent with earlier data.^{12,16,33}

The successful analysis of more than 7,000 prostate cancers with clinical follow-up data identified reduced AZGP1 expression as a powerful prognostic biomarker. Considering the difference of >15% points in the recurrence free survival 60 month after surgery, the prognostic impact of AZGP1 is comparable to the strongest established prognostic biomarkers in prostate cancer such as PTEN deletions²⁶ and p53 alterations.²⁰ This strong link with patient outcome also explains that multiple studies analyzing cohorts of only between 48 and 227 patients have unanimously suggested a worse prognosis in prostate cancers with lost or reduced AZGP1 expression.^{13–16,33,35} The exact reason for the paramount prognostic role of a protein stimulating lipid degradation in adipocytes remains unclear. There are, however, an increasing number of reports identifying a link between lipid metabolism and cancer development and progression (reviewed in Ref. 36).

The prognostic utility of AZGP1 protein analysis is also underscored by the results of our multivariate analysis. That strong independent association of reduced AZGP1 expression with early PSA recurrence in prostate cancers was found in all analyzed scenarios including various combinations of preoperatively and postoperatively available variables strongly supports the concept of AZGP1 expression scoring representing a biomarker with clinical relevance in prostate cancers. A limitation of our study is that the fraction of patients who developed distant metastases, or died from their cancers, was too small for meaningful statistical analysis.

If AZGP1 is considered for clinical application before treatment decisions are taken, molecular analyses of cancer tissues must by default be limited to biopsy material. It is thus of note, that our approach of analyzing molecular features on one minute

Table 2. Association between AZGP1 immunostaining results and prostate cancer phenotype in ERG-fusion negative and positive prostate cancers

CancerCellBiology	AZGP1 IHC result in ERG negative cancers						AZGP1 IHC result in ERG positive cancers					
	n evaluable	Negative (%)	Weak (%)	Moderate (%)	Strong (%)	p values	n evaluable	Negative (%)	Weak (%)	Moderate (%)	Strong (%)	p values
All cancers	3,865	27.5	29.8	30.2	12.5		2,979	54.3	18.8	18.2	8.7	
Tumor stage												
pT2	2,568	20.5	31.7	33.8	14.1		1,759	44.7	22.5	22.8	9.9	
pT3a	818	35.9	28	25.4	10.6		814	63.8	14.4	13.5	8.4	
pT3b	447	50.3	22.6	19.7	7.4		377	76.7	11.4	7.7	4.2	
pT4	17	64.7	11.8	17.6	5.9		18	88.9	11.1	0	0	
Gleason grade												
<313	840	15.8	34.8	34.2	15.2		658	39.7	26.3	23.7	10.3	
314	2,164	24.7	30.7	32.1	12.5		1,762	51.5	19.4	19.8	9.3	
413	633	42.5	23.5	23.4	10.6		442	81	7.7	6.3	5	
>414	209	56.5	18.7	17.2	7.7		100	81	9	6	4	
Lymph node metastasis												
N0	2,186	29.2	28.9	29.6	12.3		1,637	58.6	17.3	15.9	8.2	
N1	191	57.6	16.8	17.8	7.9		171	80.7	11.7	4.7	2.9	
Preop. PSA level (ng/ml)												
<4	391	26.3	29.7	31.2	12.8		403	47.6	21.3	19.4	11.7	
4–10	2,308	23.4	30	32.9	13.7		1,829	51.7	19.3	20.1	8.9	
11–20	830	32.9	30.4	26.6	10.1		533	62.1	16.5	13.3	8.1	
>20	303	45.5	26.7	18.2	9.6		178	73	14	10.7	2.2	
Surgical margin												
Negative	3,089	25.3	30.3	31.7	12.7		2,339	52.7	18.8	19.4	9.1	
Positive	704	36.6	28	24	11.4		588	60.4	17.7	14.6	7.3	

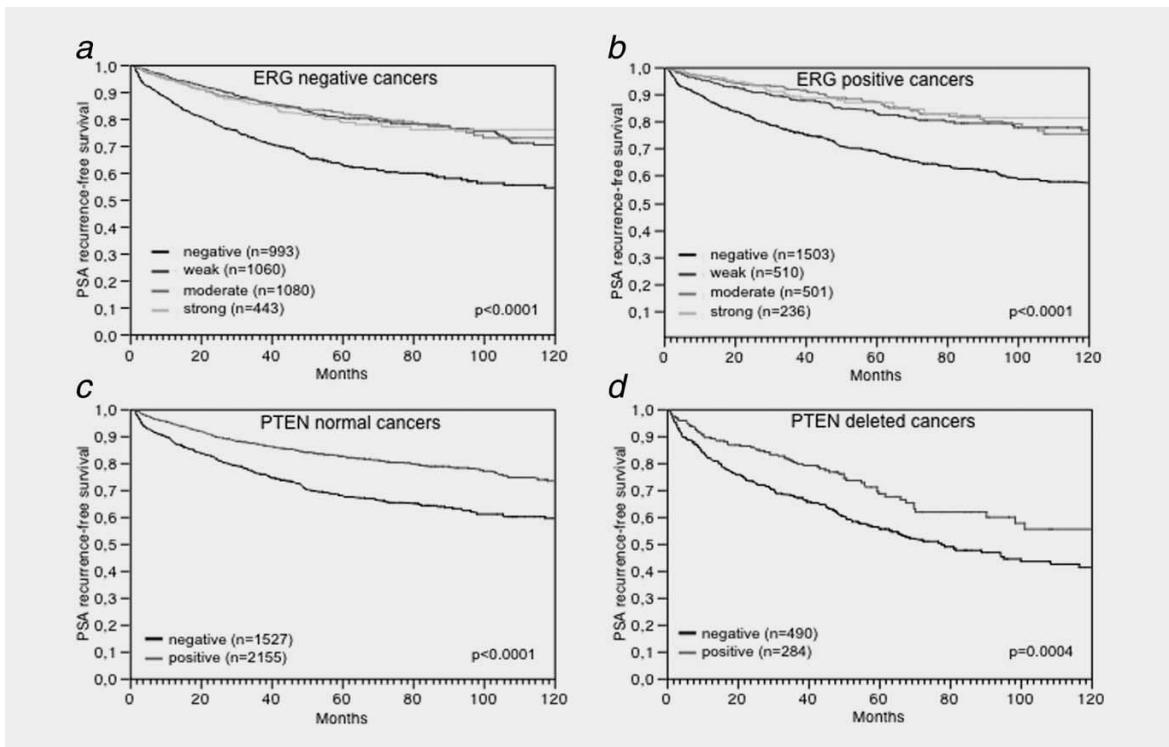


Figure 4. Association between AZGP1 expression and biochemical recurrence in (a) ERG-fusion negative cancers, (b) ERG-fusion positive cancers, (c) PTEN normal cancers and (d) PTEN deleted cancers.

TMA tissue specimen, measuring 0.6 mm in diameter, closely models the molecular analyses of core needle biopsies where comparable amounts of tissues are evaluated. As our samples were not exactly taken from the “worst” area of each tumor but randomly from within a representative cancer area, it appears possible, that our TMA spot is similarly representative of a “donor cancer” as a selected tumor containing “real-live” biopsy would be.

The large number of cancers analyzed in this study enabled us to separately analyze the role of AZGP1 in tumors of different molecular subtypes, the most common of which is the TMPRSS2:ERG gene fusion. Gene fusions involving the androgen-regulated gene TMPRSS2 and ERG, a member of the ETS family of transcription factors, occur in about 50% of prostate cancers and result in strong

ERG protein overexpression.³⁷ Our data demonstrate for the first time, that reduced AZGP1 expression was markedly more frequent in ERG positive than in ERG negative cancers. Finding such an inverse association by two independent approaches for ERG fusion detection (immunohistochemistry/FISH) provides strong support for the validity of our measurements. It is of note that inverse associations cannot be caused by technical issues leading to non-reactivity of a subset of tissue samples to all analyzed biomarkers. This finding is also in line with the study by Massoner et al. who analyzed 92 prostate cancers and described that AZGP1 appeared downregulated in ERG positive cancers.³⁸

Certain chromosomal deletions are tightly linked to either positive or negative ERG status. In particular, deletions at 3p13 and 10q23 (PTEN) were found to be associated with ERG positive cancers, while 5q21 and

6q15 were linked to ERG negative cancers.^{26,30–32} In earlier studies, we had identified biomarkers that were significantly linked to some of these genomic defined subgroups. For example, CRISP3 overexpression is strongly associated with PTEN deleted ERG positive prostate cancer.³⁹ SPINK1 expression is tightly linked to 6q15- and 5q21-deleted ERG negative prostate cancers.⁴⁰ A strong link between reduced AZGP1 expression and presence of PTEN deletions was found in this study, which was independent from the known association between PTEN deletions and ERG fusions. These findings are well in line with recent analyses linking PTEN deletion and function to AZGP1 expression.⁴¹ PTEN is a multifunctional lipid phosphatase that negatively regulates the phosphatidylinositol (PI)23 kinase/AKT pathway. Reduced PTEN function leads to increased AKT levels, which – as recently shown – induces increased GATA-2 expression.⁴² Furthermore, GATA-2 has been shown to repress androgen induced AZGP1 expression.⁴³ Hence, our data provide strong *in vivo* validation for a functional relationship earlier identified *in vitro*. These data further demonstrate the power of large-scale TMAs for identification of functional interrelations of molecular pathways. That AZGP1 expression remained a strong prognostic factor in cancer subgroups of identical PTEN status further underscores the prognostic potential of AZGP1 expression analysis.

In summary, our study pinpoints AZGP1 as a major prognosticator in prostate cancer, which is largely independent of known prognostic factors. We thus anticipate, that AZGP1 expression analysis has the potential

for clinical routine application – either alone, or more likely, in combination with other biomarkers. On the RNA level, AZGP1 is already part of a 68 gene signature,⁴⁴ that has been recently brought to the market as a commercial prostate cancer prognosticator. Our large-scale tissue microarray approach will continue to proof highly instrumental for continuously identifying better combination of prognostic biomarkers in the future.

Acknowledgement

We thank Janett Luttgens, Sünje Seekamp and Inge Brandt for excellent technical assistance.

Authors' Contributions

Conception and design: S.S., T.S., G.S.
Acquisition of data: M.K., S.H. and A.K. performed the IHC experiments, J.G., T.H. and R.G. constructed the tissue microarray. S.M., M.C.T. and C.K. performed the IHC stainings and supervised TMA manufacturing. Analysis and interpretation of data: C.C. and S.K. analyzed the IHC experiments; R.S. and M.K. performed the statistical analyses. Writing, review, and revision of the manuscript: C.B., C.H.-M. and R.S. wrote, H.H., A.M., C.W. and W.W. reviewed, and G.S., T.S. and S.S. revised the manuscript. Administrative, technical, or material support: M.G., T.S. and H.H. provided clinical data. Study supervision: T.S., S.S.

References

1. Jemal A, Ward E, Wu X, et al. Geographic patterns of prostate cancer mortality and variations in access to medical care in the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:590–5.
2. Burgi W, Schmid K. Preparation and properties of Zn-alpha 2-glycoprotein of normal human plasma. *J Biol Chem* 1961;236:1066–74.
3. Frenette G, Dube JY, Lazure C, et al. The major 40-kDa glycoprotein in human prostatic fluid is identical to Zn-alpha 2-glycoprotein. *Prostate* 1987;11:257–70.
4. Bing C, Bao Y, Jenkins J, et al. Zinc-alpha2-glycoprotein, a lipid mobilizing factor, is expressed in adipocytes and is up-regulated in mice with cancer cachexia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101: 2500–5.
5. Tada T, Ohkubo I, Niwa M, et al. Immunohistochemical localization of Zn-alpha 2-glycoprotein in normal human tissues. *J Histochem Cytochem* 1991;39:1221–6.
6. Ohkubo I, Niwa M, Takashima A, et al. Human seminal plasma Zn-alpha 2-glycoprotein: its purification and properties as compared with human plasma Zn-alpha 2-glycoprotein. *Biochim Biophys Acta* 1990;1034:152–6.
7. Henshall SM, Horvath LG, Quinn DI, et al. Zincalpha2-glycoprotein expression as a predictor of metastatic prostate cancer following radical prostatectomy. *J Natl Cancer Inst* 2006;98:1420–4.
8. Diez-Itza I, Sanchez LM, Allende MT, et al. Znalpha 2-glycoprotein levels in breast cancer cytosols and correlation with clinical, histological and biochemical parameters. *Eur J Cancer* 1993;29A: 1256–60.
9. Dubois V, Delort L, Mishellany F, et al. Zincalpha2-glycoprotein: a new biomarker of breast cancer? *Anticancer Res* 2010;30:2919–25.
10. Freije JP, Fueyo A, Uriá J, et al. Human Zn-alpha2-glycoprotein cDNA cloning and expression analysis in benign and malignant breast tissues. *FEBS Lett* 1991;290:247–9.
11. Abdul-Rahman PS, Lim BK, Hashim OH. Expression of high-abundance proteins in sera of patients with endometrial and cervical cancers: analysis using 2-DE with silver staining and lectin detection methods. *Electrophoresis* 2007;28: 1989–96.
12. Gagnon S, Tetu B, Dube JY, et al. Expression of Zn-alpha 2-glycoprotein and PSP-94 in prostatic adenocarcinoma. An immunohistochemical study of 88 cases. *Am J Pathol* 1990;136:1147–52.
13. Yip PY, Kench JG, Rasiah KK, et al. Low AZGP1 expression predicts for recurrence in marginpositive, localized prostate cancer. *Prostate* 2011; 71:1638–45.
14. Lapointe J, Li C, Higgins JP, van de Rijn M, et al. Gene expression profiling identifies clinically relevant subtypes of prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:811–6.
15. Descazeaud A, de la Taille A, Allory Y, et al. Characterization of ZAG protein expression in prostate cancer using a semi-automated microscope system. *Prostate* 2006;66:1037–43.
16. O'Hurley G, O'Grady A, Smyth P, et al. Evaluation of zinc-alpha-2-glycoprotein and proteasome subunit beta-type 6 expression in prostate cancer using tissue microarray technology. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, in press.
17. Mills J, Oliver A, Sherwin JC, et al. Utility of RhoC and ZAG protein expression as biomarkers for prediction of PSA failure following radical prostatectomy for high grade prostate cancer. *Pathology* 2012;44:513–8.
18. Severi G, Fitzgerald LM, Muller DC, et al. A three-protein biomarker panel assessed in diagnostic tissue predicts death from prostate cancer for men with localized disease - Severi – 2014 – Cancer Medicine – Wiley Online Library. *Cancer Med* 2014;3:1266–74.
19. Mottet N, Bellmunt J, Bolla M, et al. Guia de la EAU sobre el cancer de prostata. Parte II: tratamiento del cancer de prostata avanzado, recidivante y resistente a la castracion. *Actas Urologicas Espanolas*– 2011;35:565–79.
20. Schlossm T, Iwers L, Kirstein P, et al. Clinical significance of p53 alterations in surgically treated prostate cancers. *Mod Pathol* 2008;21:1371–8.
21. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 1998;4: 844–7.
22. Weischenfeldt J, Simon R, Feuerbach L, et al. Integrative genomic analyses reveal an androgendriven somatic alteration landscape in early-onset prostate cancer. *Cancer Cell* 2013;23:159–70.
23. Minner S, Enodion M, Sirma H, et al. ERG status unrelated to PSA recurrence in radically operated prostate cancer in the absence of antiandrogen therapy. *Clin Cancer Res* 2011;17:5878–88.
24. Burkhardt L, Fuchs S, Krohn A, et al. CHD1 is a 5q21 tumor suppressor required for ERG rearrangement in prostate cancer. *Cancer Res* 2013; 73:2795–805.
25. Kluth M, Hesse J, Heinl A, et al. Genomic deletion of MAP3K7 at 6q12-22 is associated with early PSA recurrence in prostate cancer and absence of TMPRSS2:ERG fusions. *Mod Pathol* 2013;26:975–83.
26. Krohn A, Diedler T, Burkhardt L, et al. Genomic deletion of PTEN is associated with tumor progression and early PSA recurrence in ERG fusion-positive and fusion-negative prostate cancer. *Am J Pathol* 2012;181:401–12.
27. 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. *J Pathol* 2013;231:130–41.
28. Dancau A-M, Simon R, Mirlacher M, et al. Tissue microarrays. Methods in Molecular Biology (Clifton, NJ) 2010;576:49–60.
29. Simon R, Mirlacher M, Sauter G. Immunohistochemical analysis of tissue microarrays. Methods Mol Biol (Clifton, NJ) 2010;664:113–26.
30. Berger MF, Lawrence MS, Demichelis F, et al. The genomic complexity of primary human prostate cancer. *Nature* 2011;470:214–20.
31. Taylor BS, Schultz N, Hieronymus H, et al. Integrative genomic profiling of human prostate cancer. *Cancer Cell* 2010;18:11–22.
32. Lapointe J, Li C, Giacomini CP, et al. Genomic profiling reveals alternative genetic pathways of prostate tumorigenesis. *Cancer Res* 2007;67: 8504–10.
33. Hale LP, Price DT, Sanchez LM, et al. Zincalpha-2-glycoprotein is expressed by malignant prostatic epithelium and may serve as a potential serum marker for prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2001;7:846–53.
34. Tennstedt P, Koster P, Breuchmann A, et al. The impact of the number of cores on tissue microarray studies investigating prostate cancer biomarkers. *Int J Oncol* 2012;40:261–8.
35. Byrne JC, Downes MR, O'Donoghue N, et al. 2D-DIGE as a strategy to identify serum markers for the progression of prostate cancer. *J Proteome Res* 2009;8:942–57.
36. Zadra G, Photopoulos C, Loda M. The fat side of prostate cancer. *Biochim Biophys Acta* 2013;1831: 1518–32.
37. Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, et al. Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science* 2005;310: 644–8.
38. Massoner P, Kugler KG, Unterberger K, et al. Characterization of transcriptional changes in ERG rearrangement-positive prostate cancer identifies the regulation of metabolic sensors such as neuropeptide Y. *PLoS One* 2013;8:e55207
39. Grupp K, Kohl S, Sirma H, et al. Cysteine-rich secretory protein 3 overexpression is linked to a subset of PTEN-deleted ERG fusion-positive prostate cancers with early biochemical recurrence. *Mod Pathol* 2013;26:733–42.
40. 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* 2013;73: 1690–8.

41. Choucair K, Ejdelman J, Brimo F, et al. PTENgenomic deletion predicts prostate cancer recurrence and is associated with low AR expression and transcriptional activity. *BMC Cancer* 2012;12: 543
42. Wang Y, He X, Ngeow J, et al. GATA2 negatively regulates PTEN by preventing nuclear translocation of androgen receptor and by androgen-independent suppression of PTEN transcription in breast cancer. *Hum Mol Genet* 2012;21:569–76.
43. Bohm M, Locke WJ, Sutherland RL, et al. A rolefor GATA-2 in transition to an aggressive phenotype in prostate cancer through modulation of key androgen-regulated genes. *Oncogene* 2009;28: 3847–56.
44. Nakagawa T, Kollmeyer TM, Morlan BW, et al. A tissue biomarker panel predicting systemic progression after PSA recurrence postdefinitive prostate cancer therapy. *PLoS One* 2008;3:e2318

2. Darstellung der Publikation

2.1 Einleitung

Das Prostatakarzinom ist die bei Männern am häufigsten auftretende Krebsart der westlichen Gesellschaft. In Nord- und Westeuropa liegt die Inzidenz bei über 200/100.000 Männer, doch auch andere Regionen zeigen eine zunehmende Prävalenz der Erkrankung. Das Prostatakarzinom stellt die insgesamt dritthäufigste tumorassoziierte Todesursache bei Männern dar, verläuft aber dennoch klinisch meist indolent. Die verschiedenen Therapieansätze reichen von aktiver und abwartender Überwachung bis hin zu Einzel- und Kombinationstherapien aus operativen Therapien, Strahlentherapien, Chemotherapien sowie weiterer Verfahren einschließlich HIFU (Hochintensiver Fokussierter Ultraschall), hormoneller und thermischer Behandlungen. Gerade im Hinblick auf die Vielzahl von Therapiemöglichkeiten sind eine genaue Diagnostik und zuverlässige Verlaufsprognose essenziell [Jemal A et al, 2005, EAU 2016]. Doch obwohl die Erforschung von Biomarkern zunehmend voranschreitet, besteht insbesondere in Anbetracht der hohen Prävalenz der Tumorerkrankung noch ein erheblicher Mangel an klinisch anwendbaren Prognosefaktoren. Aktuell erfolgt die Klassifikation und Einteilung der Karzinome durch den Gleason-Score, den prozentualen Tumoranteil in Biopsien und Gewebeproben, das Prostataspezifische Antigen (PSA) und das klinische Stadium. Diese Kriterien reichen jedoch nicht aus, um eine optimale individualisierte Therapie festzulegen und so eine Übertherapie bzw. Untertherapie zu vermeiden. Aus diesem Grund ist es notwendig, weiter nach klinisch anwendbaren relevanten molekularen Markern zu forschen, welche eine noch zuverlässigere Aussage über die Aggressivität von Prostatakarzinomen erlauben.

Bei dem Zink-bindenden Alpha-2-Glykoprotein (AZGP1) handelt es sich um ein lösliches Protein, welches den Fettabbau in Adipozyten anregt [Burgi et al. 1961, Frenette et al. 1987, Bing et al. 2004]. Es wird physiologisch in verschiedenen Geweben exprimiert, hierunter verschiedene Arten von sekretorischen Epithelzellen. Diese zeigen sich beispielsweise im Gewebe der Brust, der Leber und der Prostata sowie in Speichel-, Bronchial-, Gastrointestinal- und Schweißdrüsen [Tada et al. 1991]. Dementsprechend findet sich AZGP1 in den meisten Körperflüssigkeiten [Ohkubo et al. 1990]. Die Ausbildung von AZGP1 zeigt sich auch in verschiedenen Tumoren wie beispielsweise Prostatakarzinomen, Mammakarzinomen und Cervixkarzinomen [Henshall et al. 2006, Diez-Itza et al. 1993, Dubois et al. 2010, Freije et al. 1991, Abdul-Rahman et al. 2007]. Im Zusammenhang mit Prostatakarzinomen war AZGP1 erstmalig 1990 analysiert worden [Gagnon et al. 1990].

Seitdem haben einige Autoren die Expression von AZGP1 in normalem und tumorösem Prostatagewebe erforscht und einen möglichen Zusammenhang zwischen reduzierter AZGP1 Expression und hohem Gleason-Score sowie fortgeschrittenem pathologischen Tumorstadium hergestellt [Henshall et al. 2006, Yip et al. 2011, Lapointe et al. 2004, Descazeaud et al. 2006]. In mehreren Studien wurde zudem ein Zusammenhang zwischen niedriger Expression und ungünstigem klinischen Verlauf vermutet. Die Ergebnisse dieser Studien beruhten auf der Auswertung von Patientengruppen mit bis zu 228 Patienten [Henshall et al. 2006, Gagnon et al. 1990, Yip et al. 2011, Lapointe et al. 2004, Descazeaud et al. 2006, O'Hurley et al. 2010, Mills et al. 2012]. Eine der Studien verwendete ein Panel aus drei Proteinbiomarkern, einschließlich AZGP1, zur Prognose von Prostatakarzinom assoziierten Todesursachen [Severi et al. 2014].

Diese vielversprechenden Analysen waren der ausschlaggebende Grund dafür, eine ausgiebigere Analyse der klinischen Auswirkung von AZGP1 auf Prostatakarzinome durchzuführen. Die folgende Studie soll die bestehenden Erkenntnisse ergänzen und des Weiteren feststellen, ob die Rolle der AZGP1-Expression als Prognosefaktor auf spezielle klinische oder molekulare Untergruppen von Prostatakarzinomen begrenzt ist. Zu diesem Zweck wurde ein bereits bestehender Tissue Microarray (TMA) verwendet. Dieser enthält über 11.000 Gewebsproben von Prostatakarzinomen sowie klinische Verlaufsdaten und eine zugehörige molekularer Datenbank. Basierend auf unseren Daten war die reduzierte Expression von AZGP1, unabhängig von bestehenden klinisch-pathologischen Faktoren, ein bedeutsamer Prognosefaktor von PSA-Rezidiven in Prostatakarzinomen.

2.2 Material und Methoden

2.2.1 Patienten

Für die vorliegende Arbeit standen Präparate von 11.152 Patienten zur Verfügung, bei denen zwischen 1992 und 2011 in der Urologischen Klinik und der Martiniklinik im Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE) eine radikale Prostatektomie durchgeführt wurde. Klinische Verlaufsdaten lagen nach einer medianen Verlaufskontrolle nach 31,2 Monaten für insgesamt 9.695 Patienten vor. Die Gewebsproben wurden nach einem Standardverfahren analysiert, in welchem die gesamte Prostata zur histologischen Begutachtung aufgearbeitet wurde [Schlomm et al. 2008, Kononen et al. 1998]. Repräsentative Gewebsproben eines jeden Patienten lagen auf insgesamt 24 TMA Blöcken mit jeweils 144 bis 522 Gewebszylinern von 0,6 mm Durchmesser vor.

Die mit diesem TMA verknüpfte molekulare Datenbank erhält Ergebnisse über die ERG-Expression, die Break Apart ERG FISH Analyse sowie den Deletionsstatus von CHD1 (5q21), MAP3K7 (6q15), PTEN (10q23) und FOXP1 (3p13) Tumoren [Weischenfeldt et al. 2013, Minner et al. 2011, Burkhardt et al. 2013, Kluth et al. 2013, Krohn et al. 2012, Krohn et al. 2013].

2.2.2 Immunhistochemie

Die frisch bearbeiteten TMA Abschnitte wurden in einem Experiment innerhalb eines Tages immungefärbt. Eine ausführlichere Beschreibung des IHC-Protokolls ist in der beigefügten Originalpublikation dargestellt. Der primäre AZGP1-spezifische Antikörper (rabbit polyclonal antibody, Proteintech Group, Chigaco, USA; cat#13399-1-AP) wurde in einer Verdünnung von 1:1800 verwendet. Der gebundene Antikörper wurde anschließend mit dem EnVision Kit (Dako, Glorstrup, Denmark) nach den Anweisungen des Herstellers sichtbar gemacht.

Die endgültige Auswertung erfolgte nach einem standardisierten System. Dieses hat sich in der Vergangenheit bewährt, um zu prüfen, ob Zusammenhänge zwischen molekularen Markern und Tumor Phänotyp oder klinischem Outcome bestehen. Hiernach wurden folgenden Kriterien verwendet: Tumore ohne Färbung wurden als „negativ“ eingestuft. Als „schwach“ wurden Gewebszyliner mit einer Farbintensität von 1+ in $\leq 70\%$ der Tumorzellen oder 2+ in $\leq 30\%$ der Tumorzellen bezeichnet. Als „moderat“ wurden Karzinome mit einer Anfärbung von 1+ in $> 70\%$ der Tumorzellen gewertet, einer Färbung

von 2+ in >30% und \leq 70% der Tumorzellen oder 3+ in \leq 30% der Tumorzellen. Das Ergebnis wurde als „stark“ eingestuft sofern eine Farbintensität von 2+ in >70% der Tumorzellen oder von 3+ in > 30% der Tumorzellen vorlag [Dancau et al. 2010, Simon et al. 2010].

2.3 Ergebnisse

Ein auswertbarer AZGP1 Befund lag in insgesamt 8.510 (76,3%) der mittels immunhistochemischem Verfahren untersuchten Gewebeproben vor. 2.642 (23,7%) Fälle wurden aufgrund von mangelndem Gewebe oder nicht eindeutig als Karzinom klassifizierbarer Zellen von der Auswertung ausgeschlossen. Die Färbung zeigte sich im Zytoplasma mit einer verstärkten Intensität am luminalen Rand der Karzinomzellen.

In gutartigem Prostatagewebe fand sich eine mäßige bis starke Expression von AZGP1. Im Gegensatz dazu zeigte sich in 38,0% aller verwertbaren Prostatakarzinomproben ein AZGP1 Verlust. Eine ausführlichere Darstellung der Ergebnisse ist in der beigefügten Originalpublikation zu finden. Im Wesentlichen lagen die folgenden Ergebnisse vor:

1. In einem Subset von Prostatakarzinomen besteht ein Expressionsverlust von AZGP1.
2. Der Verlust der AZGP1-Expression ist assoziiert mit ERG-positiven Tumoren.
3. Unabhängig vom ERG Status zeigt sich ein Zusammenhang zwischen niedriger AZGP1-Expression und fortgeschrittenem Tumorstadium, hohem Gleason Score, positivem Lymphknotenbefall, hohen präoperativen PSA-Werten und frühzeitigen PSA-Rezidiven.
4. Es besteht ein Zusammenhang zwischen verminderter AZGP1 Expression und PTEN Deletionen.
5. Die prognostische Aussagekraft des Expressionsverlustes von AZGP1 bleibt auch unabhängig von etablierten klinisch-pathologischen Variablen und PTEN Status bestehen und geht mit einer schlechten Prognose einher.

2.4 Diskussion

In der von uns durchgeführten Studie erwies sich der Verlust der AZGP1 Expression als ein aussagekräftiger Prognosefaktor von ungünstigen klinischen Verläufen beim Prostatakarzinom, unabhängig von etablierten klinisch-pathologischen Faktoren und molekularen Markern.

Unsere Ergebnisse zeigten einen Anteil an AZGP1-negativen (38%) und schwach-positiven Gewebeproben (25%). Dies ist ein insgesamt höherer Anteil, als er sich in vorangegangenen Studien gezeigt hatte, die mit Fallzahlen zwischen 24 und 826 Prostatakarzinomen arbeiteten und in denen entweder Großschnitte (27-46%) oder TMAs mit mehreren Stanzen pro Tumor verwendet wurden (7-53%) [Henshall et al. 2006, Gagnon et al. 1990, Lapointe et al. 2004, O'Hurley et al. 2010, Hale et al. 2001]. Diese Abweichungen lassen sich möglicherweise darauf zurückführen, dass eine AZGP1 Heterogenität vorliegen könnte, für unsere Auswertung jeweils aber nur eine Probe pro Tumor entnommen wurde. Eine andere mögliche Erklärung liegt darin, dass Unterschiede in den verwendeten Antikörpern, dem Scoring-System oder den experimentellen Bedingungen der Studie vorliegen. Das angewandte Verfahren mit der Auswahl einer repräsentativen Probe pro Tumor zum Nachweis von signifikanten Assoziationen auch im Falle von heterogenen Markern hat sich jedoch bereits in zahlreichen Studien bewährt [Tennstedt et al. 2012]. Des Weiteren passt unsere Häufigkeit von Fällen mit starker AZGP1 Expression in gutartigem Prostatagewebe zu den Ergebnissen früherer Analysen [Gagnon et al. 1990, O'Hurley et al. 2010, Hale et al. 2001].

Die erfolgreiche Auswertung von über 7000 Prostatakarzinomen mit klinischen Verlaufsdaten identifiziert AZGP1 als hochwertigen prognostischen Biomarker. Bedenkt man die signifikanten Unterschiede in der Expression von AZGP1, welche einen Zusammenhang mit dem PSA-basierten rezidivfreien Überleben über 60 Monate postoperativ zeigen, so muss AZGP1 als einer der stärksten vorhandenen Biomarker des Prostatakarzinoms betrachtet werden, vergleichbar mit PTEN Deletionen [Krohn et al. 2012] und p53 Veränderungen [Schlomm et al. 2008]. Dies wird auch dadurch bestätigt, dass bereits mehrere Studien mit niedrigeren Fallzahlen zwischen 48 und 227 Patienten gleichfalls eine Assoziation zwischen einer ungünstigen Prognose und einem Verlust bzw. Reduktion der AZGP1 Expression hergestellt haben [Yip et al. 2011, Lapointe et al. 2004, Descazeaud et al. 2006, O'Hurley et al. 2010, Hale et al. 2001, Byrne et al. 2009]. Generell werden zunehmend Zusammenhänge zwischen dem Lipidstoffwechsel und der Entwicklung von Krebszellen gefunden. Die genaue Ursache für die Beziehung zwischen dem Verhalten

von Tumorzellen und einem Protein, das den Lipidabbau in Adipozyten fördert, ist hierbei jedoch noch unbekannt [Zadra et al. 2013].

Der prognostische Wert von AZGP1 als klinischer Marker wird auch durch unsere multivariate Analyse bestätigt. In sämtlichen Analysen der verschiedenen Kombinationen von prä- und postoperativ verfügbaren Variablen zeigte sich ein deutlicher Zusammenhang zwischen einer verminderten AZGP1 Expression und früh auftretenden PSA Rezidiven.

Sollte AZGP1 als klinischer Marker künftig standardmäßig zur Festlegung der Therapie von Prostatakarzinomen herangezogen werden sollen, so wird die Festlegung des AZGP1 Status anhand von Biopsiegewebe erfolgen müssen. Der von uns angewandte TMA ist mit den Gegebenheiten einer gezielten Biopsie vergleichbar, da die ausgewerteten Proben aus randomisierten Karzinomregionen entnommen wurden und nicht speziell aus den Arealen mit dem signifikantesten Karzinomanteil.

Die große Anzahl an Karzinomen, welche im Rahmen dieser Studie ausgewertet wurden, ermöglichte es uns zu analysieren welche Rolle AZGP1 in Tumoren mit verschiedenen molekularen Untergruppen spielt. Eine der Bekanntesten ist hierbei die Fusion des androgen gesteuerten Gens TMPRSS2 mit ERG, einem Mitglied der Familie der ETS Transkriptionsfaktoren. Diese Genfusionen tauchen in etwa 50 % der Prostatakarzinomen auf und verursachen eine ausgeprägte Überexpression des ERG Proteins [Tomlins et al. 2005]. Die Ergebnisse unserer Studie zeigten, dass die reduzierte AZGP1 Expression deutlich häufiger in ERG-positiven als ERG-negativen Karzinomen auftritt. Die Stichhaltigkeit unserer Auswertungen wird auch dadurch bekräftigt, dass sich dieses Ergebnis in zwei voneinander unabhängigen Methoden zum Nachweis einer ERG Fusion darstellen ließ (Immunhistochemie/FISH). Unsere Erkenntnisse deckten sich auch mit einer Studie von Massoner et al. (2013), in der 92 Prostatakarzinome analysiert wurden. Darin zeigte sich, dass AZGP1 in ERG-positiven Karzinomen verringert vorzukommen scheint. Einige chromosomale Deletionen sind eng mit entweder positivem oder negativem ERG Status verknüpft. Insbesondere Deletionen auf 3p13 und 10q23 (PTEN) konnten mit ERG positiven Karzinomen assoziiert werden, 5q21 und 6g15 zeigten hingegen eine Verbindung mit ERG negativen Karzinomen [Krohn et al. 2012, Berger et al. 2011, Taylor et al. 2010, Lapointe et al. 2007]. In einigen vorangegangenen Studien aus der UKE Pathologie waren auch Biomarker gefunden worden, welche in enger Verbindung mit einigen der genannten Untergruppen stehen. So ist beispielsweise die Überexpression von CRISP2 stark mit ERG positiven Karzinomen assoziiert, in denen PTEN Deletionen bestehen [Grupp et al. 2013a]. Auch besteht ein enger Zusammenhang zwischen der Expression von SPINK1 und

Deletionen von 6g15 und 5q21 in ERG negativen Prostatakarzinomen [Grupp et al. 2013b]. Wir hatten in unserer Studie einen Zusammenhang zwischen verminderter AZGP1 Expression und PTEN Deletionen gezeigt. Dieser war unabhängig von der bekannten Korrelation zwischen ERG Fusionen und PTEN Deletionen. Damit passen unsere Ergebnisse gut zu anderen bestehenden Analysen, in denen die Deletionen und Funktionen von PTEN mit der AZGP1 Expression assoziiert werden [Choucair et al. 2012]. PTEN ist eine multifunktionale lipide Phosphatase welche eine Rolle in der Regulation des Phosphatidylinositol(PI)₂ Kinase/AKT Signalweges spielt. Eine Einschränkung der PTEN Funktion führt zu erhöhten Mengen von AKT, was wiederum eine erhöhte GATA-2 Expression bewirkt [Wang et al. 2012]. GATA-2 kann nachweislich die Expression von androgen induziertem AZGP1 hemmen [Bohm et al. 2009]. Unsere Daten bekräftigen *in vivo* den *in vitro* bereits hergestellten Zusammenhang zwischen den genannten Markern. Diese Ergebnisse demonstrieren erneut die Eignung groß angelegter TMAs zum Aufzeigen der funktionellen Beziehung zwischen molekularen Signalwegen.

In unserer Studie hat sich AZGP1 als vielversprechender Prognosefaktor für Prostatakarzinome erwiesen. Auch in Untergruppen mit identischem PTEN Status bestand eine starke Aussagekraft. AZGP1 war weitestgehend unabhängig von bisher etablierten klinischen Faktoren. Potenziell könnte AZGP1 in Zukunft daher Teil von klinischen Routineanwendungen werden, entweder allein oder zusammen mit anderen Biomarkern. Auf der RNA Ebene wird AZGP1 bereits als Teil eines kommerziellen Prostatakarzinom Prognosekits mit 68 Gensignaturen angewendet [Nakagawa et al. 2008]. Durch die Anwendung des UKE Prostatakarzinom Tissue Microarrays werden auch in Zukunft zunehmend verbesserte Kombinationen von Biomarkern identifiziert werden.

2.5 Zusammenfassung

Das Prostatakarzinom ist die häufigste Tumorerkrankung bei Männern in der westlichen Gesellschaft und die insgesamt dritthäufigste Todesursache bei krebsassoziierten Erkrankungen des Mannes. Dennoch besteht weiterhin ein Mangel an klinisch anwendbaren prognostischen molekularen Markern. Als möglicher Prognosemarker bietet sich das am Fettstoffwechsel beteiligte Zink-Alpha 2-Glykoprotein (AZGP1) an. Ziel der Studie war es, die klinische Relevanz der AZGP1-Expression in Korrelation mit Prostatakrebszellen und bekannten genetischen Schlüsselmarkern zu erforschen. Dazu wurde die AZGP1-Expression immunhistochemisch an einem Gewebemikroarray aus 11.152 Prostatatumoren untersucht. Die Ergebnisse wurden auch mit verfügbaren Daten aus vorigen Studien zum ERG-Status sowie PTEN, 3p13, 5q21 und 6q15 Deletionen verglichen. Die AZGP1-Expression war in benignen Prostatadrüsenzellen stark ausgeprägt, jedoch in 38,0% von 8.510 auswertbaren Prostatakarzinomen nicht vorhanden. Die Verminderung der AZGP1-Expression war in FISH und immunhistochemischen Analysen mit der TMPRSS2-ERG Fusion assoziiert (jeweils $p<0,0001$). So war AZGP1 in 54,6% von 2.029 ERG immunhistochemisch positiven Karzinomen, jedoch nur in 28,1% von 2398 ERG negativen Tumoren nicht nachweisbar. Unabhängig des ERG Status war die verminderte AZGP1-Expression auch eng mit einem hohen Gleason-Score, fortgeschrittenem histologischem Tumorstadium, Lymphknotenmetastasierung und frühzeitigem PSA-Wiederanstieg verknüpft. Die verminderte AZGP1-Expression ging zudem signifikant mit PTEN Deletionen einher. Die AZGP1-Färbung fehlte in 62,7% der 842 Karzinome mit PTEN Deletionen, jedoch nur in 37,3% der Karzinome ohne PTEN Deletion. Die AZGP1-Expression hatte jedoch auch unabhängig vom Status der PTEN Deletion eine starke prognostische Aussagekraft. Ebenfalls war die AZGP1-Expression als prognostischer Marker unabhängig von Gleason-Score, pT Stadium, pN Stadium, chirurgischem Absetzungsrand und präoperativem PSA Wert. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der Studie, dass eine verminderte AZGP1-Expression, unabhängig von etablierten klinisch-pathologischen Parametern und PTEN Deletionen, mit einer ungünstigen Prognose von Prostatakarzinomen verknüpft ist.

2.6 Abstract

Zinc-alpha 2-glycoprotein (AZGP1) is involved in lipid metabolism and was suggested as a candidate prognostic biomarker in prostate cancer. To evaluate the clinical impact and relationship with key genomic alterations in prostate cancer, AZGP1 expression was analyzed by immunohistochemistry on a tissue microarray containing 11,152 prostate cancers. Data on ERG status and PTEN, 3p13, 5q21 and 6q15 deletions were available from earlier studies. AZGP1 expression was strong in benign prostatic glands but absent in 38.0% of 8,510 interpretable prostate cancers. Reduced AZGP1 expression was associated with TPMRSS2:ERG fusions, both by FISH and immunohistochemical analysis ($p<0.0001$ each). For example, AZGP1 was absent in 54.6% of 2,029 ERG IHC positive but in only 28.1% of 2,398 ERG negative cancers. Irrespective of the ERG status, reduced AZGP1 expression was tightly linked to high Gleason score, advanced pathological tumor stage, positive nodal status and early PSA recurrence ($p<0.0001$ each). Reduced AZGP1 expression was also strongly associated with PTEN deletions. AZGP1 immunostaining was lacking in 62.7% of 842 PTEN deleted but in only 37.3% of PTEN non-deleted cancers but retained strong prognostic influence in both subgroups ($p<0.0001$ each). The prognostic role of AZGP1 expression was also independent of Gleason score, pT stage, pN stage, surgical margin status and preoperative PSA, irrespective of whether preoperative or postoperative variables were used for modeling. In conclusion, the results of our study demonstrate that reduced AZGP1 expression is strongly related to adverse prostate cancer prognosis, independently of established clinic-pathological variables and PTEN deletions.

2.7 Literaturverzeichnis

- Abdul-Rahman PS, Lim BK, Hashim OH. Expression of high-abundance proteins in sera of patients with endometrial and cervical cancers: analysis using 2-DE with silver staining and lectin detection methods. *Electrophoresis* 2007;28: 1989–96.
- Berger MF, Lawrence MS, Demichelis F, et al. The genomic complexity of primary human prostate cancer. *Nature* 2011;470:214–20.
- Bing C, Bao Y, Jenkins J, et al. Zinc-alpha2-glycoprotein, a lipid mobilizing factor, is expressed in adipocytes and is up-regulated in mice with cancer cachexia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101: 2500–5.
- Bohm M, Locke WJ, Sutherland RL, et al. A role for GATA-2 in transition to an aggressive phenotype in prostate cancer through modulation of key androgen-regulated genes. *Oncogene* 2009;28:3847–56.
- Burgi W, Schmid K. Preparation and properties of Zn-alpha 2-glycoprotein of normal human plasma. *J Biol Chem* 1961;236:1066–74.
- Burkhardt L, Fuchs S, Krohn A, et al. CHD1 is a 5q21 tumor suppressor required for ERG rearrangement in prostate cancer. *Cancer Res* 2013;73:2795–805.
- Byrne JC, Downes MR, O'Donoghue N, et al. 2D-DIGE as a strategy to identify serum markers for the progression of prostate cancer. *J Proteome Res* 2009;8:942–57.
- Choucair K, Ejdelman J, Brimo F, et al. PTEN genomic deletion predicts prostate cancer recurrence and is associated with low AR expression and transcriptional activity. *BMC Cancer* 2012;12:543
- Dancau A-M, Simon R, Mirlacher M, et al. Tissue microarrays. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, NJ) 2010;576:49–60.
- Descazeaud A, de la Taille A, Allory Y, et al. Characterization of ZAG protein expression in prostate cancer using a semi-automated microscope system. *Prostate* 2006;66:1037–43.

Diez-Itza I, Sanchez LM, Allende MT, et al. Znalpha 2-glycoprotein levels in breast cancer cytosols and correlation with clinical, histological and biochemical parameters. *Eur J Cancer* 1993;29A:1256–60.

Dubois V, Delort L, Mishellany F, et al. Zincalpha2-glycoprotein: a new biomarker of breast cancer? *Anticancer Res* 2010;30:2919–25.

Freije JP, Fueyo A, Uria J, et al. Human Zn-alpha-2-glycoprotein cDNA cloning and expression analysis in benign and malignant breast tissues. *FEBS Lett* 1991;290:247–9.

Frenette G, Dube JY, Lazure C, et al. The major 40-kDa glycoprotein in human prostatic fluid is identical to Zn-alpha 2-glycoprotein. *Prostate* 1987;11:257–70.

Gagnon S, Tetu B, Dube JY, et al. Expression of Zn-alpha 2-glycoprotein and PSP-94 in prostatic adenocarcinoma. An immunohistochemical study of 88 cases. *Am J Pathol* 1990;136:1147–52.

Grupp K, Kohl S, Sirma H, et al. Cysteine-rich secretory protein 3 overexpression is linked to a subset of PTEN-deleted ERG fusion-positive prostate cancers with early biochemical recurrence. *Mod Pathol* 2013;26:733–42. (A)

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* 2013;73:1690–8. (B)

Hale LP, Price DT, Sanchez LM, et al. Zinc alpha-2-glycoprotein is expressed by malignant prostatic epithelium and may serve as a potential serum marker for prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2001;7:846–53.

Henshall SM, Horvath LG, Quinn DI, et al. Zincalpha2-glycoprotein expression as a predictor of metastatic prostate cancer following radical prostatectomy. *J Natl Cancer Inst* 2006;98:1420–4.

Jemal A, Ward E, Wu X, et al. Geographic patterns of prostate cancer mortality and variations in access to medical care in the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:590–5

Kluth M, Hesse J, Heinl A, et al. Genomic deletion of MAP3K7 at 6q12-22 is associated with early PSA recurrence in prostate cancer and absence of TMPRSS2:ERG fusions. *Mod Pathol* 2013;26:975–83.

Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 1998;4:844–7.

Krohn A, Diedler T, Burkhardt L, et al. Genomic deletion of PTEN is associated with tumor progression and early PSA recurrence in ERG fusion-positive and fusion-negative prostate cancer. *Am J Pathol* 2012;181:401–12.

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. *J Pathol* 2013;231:130–41.

Lapointe J, Li C, Higgins JP, van de Rijn M, et al. Gene expression profiling identifies clinically relevant subtypes of prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:811–6.

Lapointe J, Li C, Giacomini CP, et al. Genomic profiling reveals alternative genetic pathways of prostate tumorigenesis. *Cancer Res* 2007;67:8504–10.

Massoner P, Kugler KG, Unterberger K, et al. Characterization of transcriptional changes in ERG rearrangement-positive prostate cancer identifies the regulation of metabolic sensors such as neuropeptide Y. *PLoS One* 2013;8:e55207

Mills J, Oliver A, Sherwin JC, et al. Utility of RhoC and ZAG protein expression as biomarkers for prediction of PSA failure following radical prostatectomy for high grade prostate cancer. *Pathology* 2012;44:513–8.

Minner S, Enodien M, Sirma H, et al. ERG status is unrelated to PSA recurrence in radically operated prostate cancer in the absence of antihormonal therapy. Clin Cancer Res 2011;17:5878–88.

Mottet N, Bellmunt J, Bolla M, et al. Guía de la EAU sobre el c_ancer de pr_ostata. Parte II: tratamiento del c_ancer de pr_ostata avanzado, recidivante y resistente a la castraci_on. Actas Urologicas EspaÑolas 2011;35:565–79.

N. Mottet (Chair), J. Bellmunt, E. Briers (Patient Representative), M. Bolla, P. Cornford (Vice-chair), M. De Santis, A. Henry, S. Joniau, T. Lam, M.D. Mason, V. Matveev, H. van der Poel, T.H. van der Kwast, O. Rouvière,T. Wiegel, Guidelines Associates: R.C.N. van den Bergh, T. van den Broeck, N.J. van Casteren, W. Everaerts, L. Marconi, P. Moldovan, members of the EAU – ESTRO – SIOG Prostate Cancer Guidelines Panel. EAU – ESTRO – SIOG Guidelines on Prostate Cancer. EAU Guidelines Prostate Cancer Update March 2016. ISBN 978-90-79754-98-4. Publisher: EAU Guidelines Office.

Nakagawa T, Kollmeyer TM, Morlan BW, et al. A tissue biomarker panel predicting systemic progression after PSA recurrence postdefinitive prostate cancer therapy. PLoS One 2008;3:e2318

O'Hurley G, O'Grady A, Smyth P, et al. Evaluation of zinc-alpha-2-glycoprotein and proteasome subunit beta-type 6 expression in prostate cancer using tissue microarray technology. Appl Immunohistochem Mol Morphol, in press.

Ohkubo I, Niwa M, Takashima A, et al. Human seminal plasma Zn-alpha 2-glycoprotein: its purification and properties as compared with human plasma Zn-alpha 2-glycoprotein. Biochim Biophys Acta 1990;1034:152–6.

Schlomm T, Iwers L, Kirstein P, et al. Clinical significance of p53 alterations in surgically treated prostate cancers. Mod Pathol 2008;21:1371–8.

Severi G, Fitzgerald LM, Muller DC, et al. A three-protein biomarker panel assessed in diagnostic tissue predicts death from prostate cancer for men with localized disease - Severi – 2014 – Cancer Medicine – Wiley Online Library. Cancer Med 2014;3:1266–74.

Simon R, Mirlacher M, Sauter G. Immunohistochemical analysis of tissue microarrays. Methods Mol Biol (Clifton, NJ) 2010;664:113–26.

Tada T, Ohkubo I, Niwa M, et al. Immunohistochemical localization of Zn-alpha 2-glycoprotein in normal human tissues. J Histochem Cytochem 1991;39:1221–6.

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

Tennstedt P, Köster P, Brüchmann A, et al. The impact of the number of cores on tissue microarray studies investigating prostate cancer biomarkers. Int J Oncol 2012;40:261–8.

Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, et al. Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. Science 2005;310:644–8.

Wang Y, He X, Ngeow J, et al. GATA2 negatively regulates PTEN by preventing nuclear translocation of androgen receptor and by androgen-independent suppression of PTEN transcription in breast cancer. Hum Mol Genet 2012;21:569–76.

Weischenfeldt J, Simon R, Feuerbach L, et al. Integrative genomic analyses reveal an androgendriven somatic alteration landscape in early-onset prostate cancer. Cancer Cell 2013;23:159–70.

Yip PY, Kench JG, Rasiah KK, et al. Low AZGP1 expression predicts for recurrence in marginpositive, localized prostate cancer. Prostate 2011; 71:1638–45.

Zadra G, Photopoulos C, Loda M. The fat side of prostate cancer. Biochim Biophys Acta 2013;1831:1518–32.

3. Erklärung des Eigenanteils

Ich habe an der der Erweiterung und Erneuerung des TMA Kollektivs mitgearbeitet. Des Weiteren habe ich bei der immunhistochemischen Aufarbeitung mitgeholfen und bei der statistischen Analyse assistiert. Die gewonnenen Daten wurden von mir in Datenbanken übertragen.

Weiterhin habe ich an der Literatursuche und Zusammenfassung der Literaturrecherche zu AZGP1 mitgearbeitet. Ich habe zudem an der Erstellung der ersten Fassung des Manuskripts mitgewirkt.

Beteiligung der Ko-Autoren

Verfassung des Manuskripts: Christoph Burdelski, Claudia Hube-Magg, Ronald Simon

Datenakquisition, statistische Analysen und Dateninterpretation:

Martina Kluth, Sarah Minner, Maria Christina Tsourlakis, Christina Koop, Ronald Simon

Studiendesign und -Koordination sowie fachliche Revision des Manuskriptes:

Stefan Steurer, Thorsten Schlomm, Guido Sauter, Hartwig Huland, Andreas Marx, Corinna Wittmer, Waldemar Wilczak

Administrative, technische oder materielle Unterstützung:

Markus Graefen, Thorsten Schlomm, Hans Heinzer

4. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Guido Sauter dafür bedanken, dass mir die Durchführung dieser Doktorarbeit an seinem Institut für Pathologie ermöglicht wurde. Durch ihn wurde mein Wissen über Seminare, Vorlesungen und Praktika hinweg deutlich vertieft sowie mein Interesse an der Forschung geweckt, insbesondere in der Uropathologie. Des Weiteren bin ich dankbar für die ausgezeichnete Betreuung, die ich während der gesamten Zeit der Erstellung der Doktorarbeit erhalten habe.

Des Weiteren möchte ich mich auch bei PD Dr. Ronald Simon, Dr. Christoph Burdelski und Dr. Martina Kluth für die hervorragende Betreuung und Unterstützung bedanken.

Besonderen Dank möchte ich auch an Christina Koop, Julia Schumann, Sünje Seekamp und Inge Brandt aussprechen für ihre kontinuierliche Hilfsbereitschaft und hervorragende technische Unterstützung.

Darüber hinaus danke ich meinen Eltern, die mich über die letzten Jahre hinweg stets motiviert und tatkräftig unterstützt haben. Außerdem möchte ich meiner Familie und allen meinen Freunden danken, die während der Erstellung dieser Arbeit stets ein offenes Ohr und unerschütterliche Geduld bewiesen haben.

5. Lebenslauf

Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

6. Eidestattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne 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: