

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Anatomie und Experimentelle Morphologie
Prof. Dr. Udo Schumacher

**Untersuchung zur prognostischen Bedeutung der Expression der
DEAD-box RNA-Helicase DDX21 beim Prostatakarzinom**

Dissertation

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

vorgelegt von:

Helge von Kriegstein
aus Frankfurt am Main

Hamburg 2023

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 19.03.2024**

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

Prüfungsausschuss, die Vorsitzende: Prof. Dr. Gunhild von Amsberg

Prüfungsausschuss, zweite Gutachterin: PD Dr. Franziska Büscheck

Inhalt

Inhalt	III
Angaben zu bereits publizierten Daten	V
Abkürzungen	VI
1 Einleitung	1
1.1 Lage, Aufbau und Aufgabe der Prostata	1
1.2 Epidemiologie und Risikofaktoren des Prostatakarzinoms	3
1.3 Histopathologische Untersuchung des Prostatakarzinoms	5
1.4 Molekularbiologie des Prostatakarzinoms	8
1.5 Therapie des Prostatakarzinoms	12
1.5.1 Konservative Therapieansätze	12
1.5.2 Radikale Prostatektomie	13
1.5.3 Definitive Radiatio	13
1.5.4 Brachytherapie	14
1.5.5 Verlaufskontrolle	14
1.5.6 Therapie des rezidierten Prostatakarzinoms	14
1.5.7 Therapie des metastasierten Prostatakarzinoms	15
1.6 Tumorprogression des Prostatakarzinoms	16
1.7 DDX21	18
2 Zielsetzung	20
3 Material und Methoden	22
3.1 Tissue Micro Array und Patientendaten	22
3.2 Immunhistochemie	23
3.3 Statistische Analyse	24
3.4 Geräte	25
3.5 Reagenzien	25
4 Ergebnisse	27
4.1 Eine vermehrte DDX21- Expression geht mit einem aggressiveren Tumorphänotypen einher.	27
4.2 Die DDX21-Expression ist mit dem TMPRSS2:ERG Fusionsstatus und der PTEN- Deletion assoziiert.	29
4.3 Die DDX21-Expression prognostiziert bei ERG- negativen Patienten ein früheres BCR.	30
5 Diskussion	33
6 Zusammenfassung	40
7 Abstract	43

Literatur	45
Danksagung	58
Lebenslauf	59
Eidesstattliche Erklärung	60

Angaben zu bereits publizierten Daten dieser Dissertation

Teile dieser Dissertation wurden bereits 2020 publiziert in:

LANGE, T., SAMATOV, T. R., GALATENKO, V. V., STEFFEN, P., VON KRIEGSTEIN, H., SPETHMANN, T., WICKLEIN, D., MAAR, H., KUPFERNAGEL, K., LABITZKY, V., HANIKA, S., STARZONEK, S., AHLERS, A. K., RIECKEN, K., SIMON, R., POLONSKI, A., SAUTER, G., SCHLOMM, T., HULAND, H., JOHNSEN, S. A., SCHLUTER, H., TONEVITSKY, A. G. & SCHUMACHER, U. 2020. Xenograft-derived mRNA/miR and protein interaction networks of systemic dissemination in human prostate cancer. *Eur J Cancer*, 137, 93-107.

Abkürzungen

ABC-AP	Avidin- Biotin- Komplex Alkalische- Phosphatase
ADP	Adenosindiphosphat
ADT	Androgendeprievierende Therapie
AJCC	American Joint Comission on Cancer
AKT	Proteinkinase B
<i>aqua dest.</i>	<i>aqua destillata</i>
AR	Androgenrezeptor
ARE	androgen response element
BCR	biochemisches Rezidiv
BRCA1/2	Breast Cancer 1/2 , early- onset
CHD1	Chromodomain- helicase- DNA- binding- protein- 1
cm	Zentimeter
CRPC	kastrationsresistentes Prostatakarzinom
CSS	cancer- specific- survival
cT	klinisches Tumorstadium
CTC	zirkulierende Tumorzellen
DCN	Decorin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT1	DNA Methyltransferase- 1
DRU	Digital rektale Untersuchung
EMT	epithelial- mesenchymale Transition
ERG	v- ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog
FDA	Food and Drug Administration
FISH	Fluoreszenz- <i>in- situ</i> - Hybridisierung
FOXP1	Forkhead- box- protein P1
g	Gramm
GnRH	Gonadotropin- Releasing- Hormon
Gy	Gray
HGPIN	hochgradige intraepitheliale prostatistische Neoplasie
hnRNA	heterogene nukleäre Ribonukleinsäure
HSPC	hormonsensitives Prostatakarzinom
IHC	immunhistochemische Färbung
MAP3K7	Mitogen- activated- protein- kinase- kinase- kinase- 7
MET	mesenchymal- epitheliale Transition
MFS	metastasis- free- survival
mHSPC	hormonsensitives, metastasiertes Prostatakarzinom

miRNA	mikro- Ribonukleinsäure
ml	Milliliter
MRT	Magnetresonanztomogramm
mTOR	mechanistic target of Rapamycin
µm	Mikrometer
NCCN	National Comprehensive Cancer Network
NDRG1	N- myc downstream regulated gene 1
ng	Nanogramm
OSS	overall- survival
PCa	Prostatakarzinom
PIN	Intraepitheliale prostatistische Neoplasie
PIP2	Phosphatidylinositol- 4,5- bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol- 3,4,5- triphosphat
PI3K	Phosphoinositid- 3- Kinase
pN	Lymphknotenstatus
Pol	Polymerase
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
P-TEFb	positiver Transkriptionselongationsfaktor b
PTEN	phosphatase- and- tensin- homolog
R	Resektionsrand
RR	relatives Risiko
RFS	rezidivfreies Überleben
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
S	Svedberg
SK	Sedimentationskoeffizient
snoRNA	kleine nukleoläre Ribonukleinsäure
snRNP	kleines nukleoläres Ribonukleoprotein
TBS	Tris- buffered- saline
TBS-T	Tris- buffered- saline and TWEEN
TMA	Tissue Microarray
TMPRSS2	Transmembrane- protease, serine 2
TPA	12- O- tetradecanoyl phorbol- 13- acetate
TRE	TPA response element
TRUS	Transrektaler Ultraschall
UICC	Union for International Cancer Control
UKE	Universitätsklinikum Hamburg- Eppendorf
WHO	Weltgesundheitsorganisation

1 Einleitung

1.1 Aufbau und Funktion der Prostata

Die Prostata ist ein unpaares Organ im kleinen Becken des Mannes und wird zu den inneren Geschlechtsorganen gezählt (Faller *et al.*, 2008). Sie misst ungefähr 3 x 4 x 2 Zentimeter (cm) und wiegt etwa 20 Gramm (g). Sie hat keinerlei Kontakt zum Peritoneum. Sie umschließt die Urethra unmittelbar unterhalb des Harnblasenausganges. Die von den Samenblasen ausgehenden, ebenfalls durch die Prostata verlaufenden Ductus ejaculatorii münden am Colliculus seminalis in die Urethra. Nach dorsal wird die Prostata nur durch die Fascia rectoprostatica (klinisch: Denonvilliers-Faszie) vom Rektum getrennt. Kaudal liegt die Prostata dem Musculus transversus perinei profundus auf (Schuenke *et al.*, 2015). Das reichhaltige Bindegewebsgerüst der Prostata enthält einen hohen Anteil an glatten Muskelzellen (fibromuskuläres Stroma), weshalb die Prostata relativ fest ist. Außerdem ist das Organ von einer bindegewebigen Kapsel umschlossen (Abb. 1). Entlang der Urethra verlaufen skelettmuskuläre Anteile des äußeren Blasensphinkters bis in die Prostata hinein. Die Prostata besteht aus 40 bis 50 tubuloalveolären apokrinen Drüsen, die über bis zu 30 Ausführungsgänge zusammen mit den Ductus ejaculatorii am Colliculus seminalis in die Urethra münden.

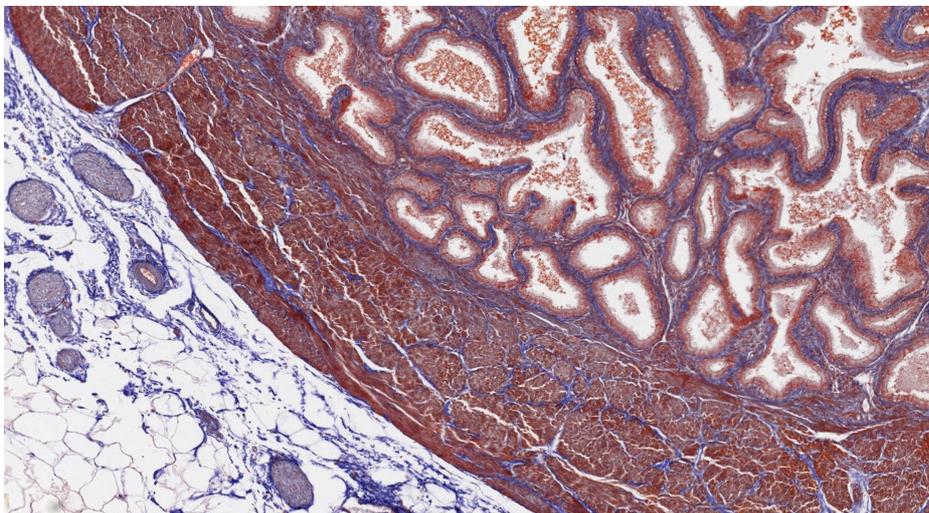


Abb. 1: Feinbau der Prostata (Amboss, 2021)

Rechts im Bild sieht man die tubuloalveolären Prostatadrüsen, die in ein dichtes fibromuskuläres Stroma (blau angefärbt) eingebettet sind. Das Stroma geht außen in die Prostatakapsel über, die stellenweise mit reichlich glatter Muskulatur (rot angefärbt) durchsetzt ist (Prostata, Ladewig-Färbung, ca. 50-fache Vergrößerung).

Das Drüsenepithel besteht aus zweireihigem prismatischem Epithel und bildet je nach Aktivitätszustand unregelmäßige Auffaltungen (Abb. 2). Der Sekretionsmechanismus der Prostata lässt sich als apokrin bezeichnen und so finden sich Vorwölbungen der sich mit dem Sekret luminal abschnürenden, apikalen Zellmembran (Aposomen). Das Prostatasekret dient der Verflüssigung des Ejakulats und enthält u.a. das prostataspezifische Antigen (PSA), eine Serinprotease mit großer, in der Bewertung jedoch umstrittener Bedeutung für die Diagnostik des Prostatakarzinoms (Welsch *et al.*, 2014).

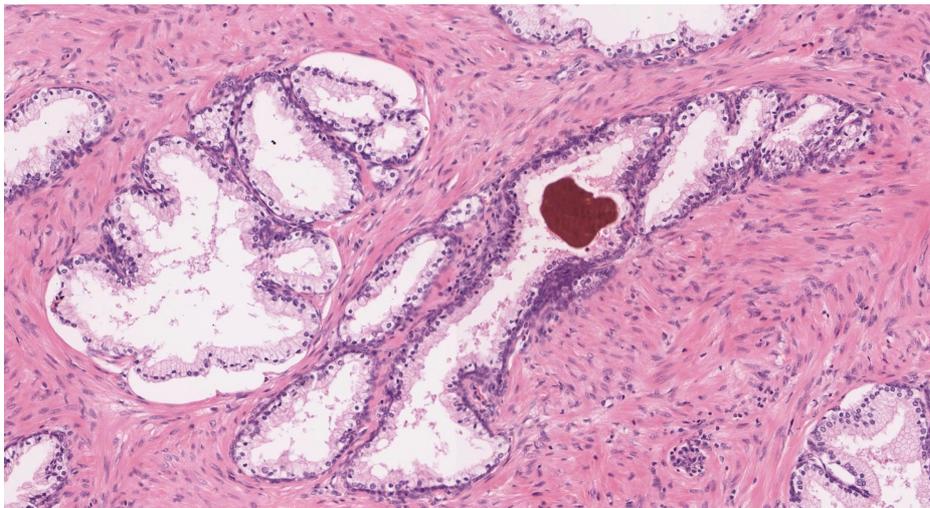
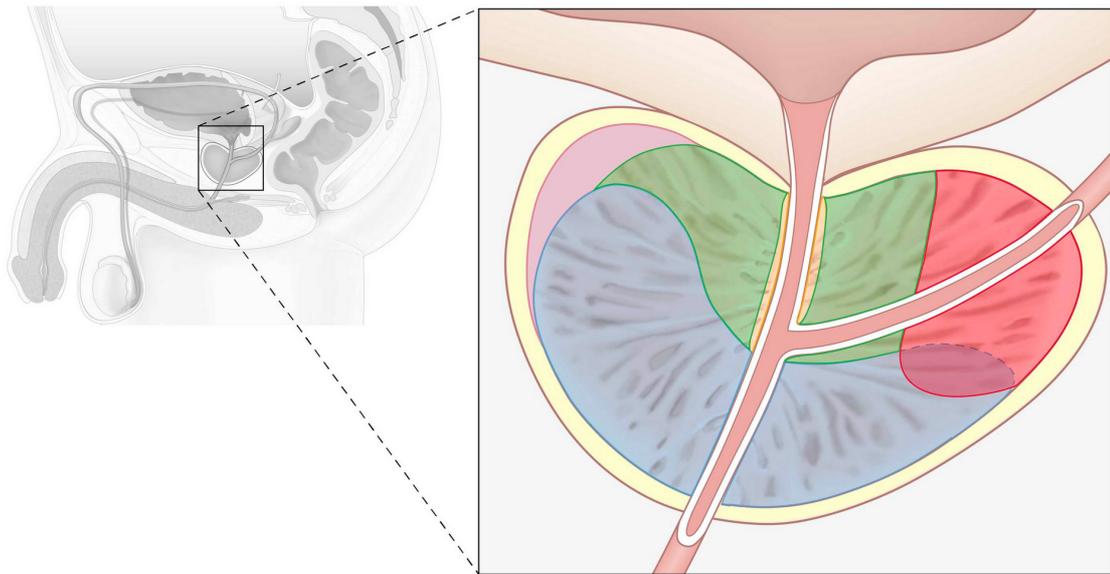


Abb. 2: Drüsen der Prostata (Amboss, 2021)

Das zweireihige Epithel der tubuloalveolären Prostatadrüsen besteht aus Basalzellen und kubischen bis zylindrischen Hauptzellen. Im Drüsenlumen kommen gelegentlich, wie hier zu sehen, dunkelrote Prostatasteine (Corpora amylacea) vor, die aus eingedicktem Sekret und abgeschilferten Zellen entstehen (Prostata, H.E.- Färbung, ca. 200-fache Vergrößerung).

Die Prostata wird klinisch nach McNeal in fünf histologische Zonen eingeteilt (Abb. 3). Die periurethrale Mantelzone umschließt die Harnröhre im proximalen Segment zwischen Blasen Hals und Colliculus seminalis. Beidseits lateral der Periurethralzone liegt die Transitionszone, die zusammen mit der Periurethralzone etwa 10% des Drüsengewebes enthält. Dorsokraniel der Urethra liegt die zentrale Zone, die etwa 20% des Drüsengewebes enthält und von den Ductus ejaculatorii durchzogen wird. Die ventral gelegene anteriore Zone besteht aus fibromuskulärem Bindegewebe und macht etwa 5% der Organmasse aus, enthält jedoch keine Drüsen. Die größte Zone ist die periphere Zone, die beidseits im lateralen Teil, sowie im dorsokaudalen Teil etwa 70% des Drüsengewebes beinhaltet. In dieser Zone entstehen die meisten Karzinome (Schuenke *et al.*, 2015).



- | | | | |
|---|-----------------|---|--------------------------|
| 1 | Prostata-Kapsel | 4 | Periurethrale Mantelzone |
| 2 | Anteriore Zone | 5 | Zentrale Zone |
| 3 | Transitionszone | 6 | Periphere Zone |

Abb. 3: Zoneneinteilung der Prostata nach McNeal (Amboss, 2021)

Die Prostata ist von einer bindegewebigen Kapsel umgeben (1) und kann klinisch in 5 Zonen (nach McNeal) eingeteilt werden: Die schmale anteriore Zone (2) besteht hauptsächlich aus Bindegewebe und Muskeln und ist drüsenfrei. Die Transitionszone (3) besteht wie die zentrale (5) und periphere Zone (6, auch Außenzone genannt) aus Drüsengewebe. Sie geht von der periurethralen Mantelzone (4) aus, die ebenfalls Drüsen besitzt und die proximale Harnröhre umschließt.

1.2 Epidemiologie und Risikofaktoren des Prostatakarzinoms

Das Prostatakarzinom (PCa) ist die häufigste Krebserkrankung des Mannes in der westlichen Welt (Torre *et al.*, 2015). Die Inzidenz wird für Deutschland mit 60.000 neuerkrankten Männern pro Jahr angegeben (Robert-Koch-Institut, 2017). In Autopsiestudien konnte gezeigt werden, dass die Prävalenz mit steigendem Lebensalter zunimmt (Sakr *et al.*, 1994). Damit ist das hohe Lebensalter der wichtigste Risikofaktor für die Entstehung eines PCa (Grozescu and Popa, 2017). So liegt die Prävalenz des PCa bei Männern in ihrer siebten Lebensdekade bei 64 % (Abb. 4) (Sakr *et al.*, 1994).

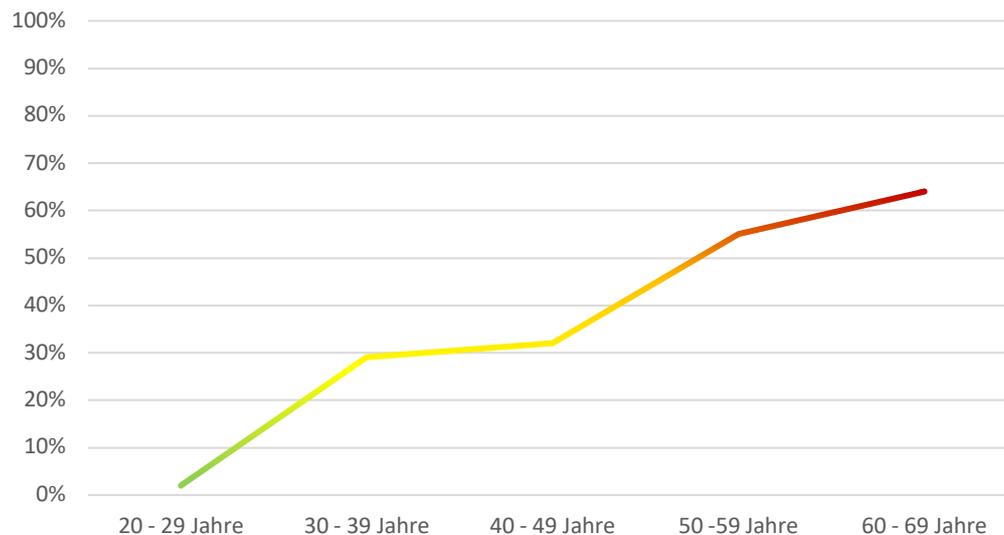


Abb. 4: Prävalenz des PCa nach Altersgruppen

Die Prävalenz des PCa steigt mit zunehmendem Alter an. Sie liegt in der dritten Lebensdekade noch bei ca. 2 %, bleibt in der vierten und fünften bei ca. 29 % bzw. 32 % stabil und steigt ab der sechsten Lebensdekade stark an, so dass von den 50 bis 59-jährigen Männern bereits mehr als jeder zweite betroffen ist (55 %). In der siebten Lebensdekade sind mit 64 % bereits knapp zwei Drittel der Männer betroffen (Sakr *et al.*, 1994).

Ein weiterer Risikofaktor für die Entstehung eines PCa ist die familiäre Vorbelastung. 5 % bis 15 % aller Männer mit PCa haben mindestens einen Verwandten, der ebenfalls betroffen ist. Gegenüber Männern mit negativer Familienanamnese ist das relative Risiko (RR), an einem PCa zu erkranken, bei Männern mit betroffenem Vater (RR 2,2) oder betroffenem Bruder (RR 3,4) signifikant erhöht. Mehrere Fälle in der Familie verdoppeln dieses Risiko gegenüber Männern mit nur einem betroffenen Verwandten (Heidegger *et al.*, 2019).

Die meisten PCa-Erkrankungen nehmen einen klinisch unauffälligen Verlauf. Trotzdem ist das PCa die dritthäufigste Krebstodesursache bei Männern (Thompson and Tangen, 2012). Das größte Problem ist die schlechte Vorhersagbarkeit der Aggressivität des Tumors und eines damit einhergehenden ungünstigen Verlaufs. Da trotz größtenteils guter Prognose und schlechter Vorhersagbarkeit seltenerer ungünstiger Verläufe die Rate radikaler Therapieansätze (radikale Prostatektomie und definitive Radiatio) gegenüber dem konservativen Management der Erkrankung („*active Surveillance*“ und „*watch and wait*“) kontinuierlich steigt, muss von einer Überdiagnostik und Übertherapie der Erkrankung in

der westlichen Welt ausgegangen werden (Grozescu and Popa, 2017). Dies verdeutlicht die immense Bedeutung der Verbesserung der Vorhersagbarkeit des klinischen Verlaufs. Hierzu werden verschiedene Untersuchungen durchgeführt, unter denen die histopathologische Untersuchung einen hohen Stellenwert einnimmt.

1.3 Histopathologische Untersuchung des Prostatakarzinoms

Die Tastuntersuchung der Prostata und die Bestimmung des PSA-Wertes sind die wichtigsten ersten diagnostischen Maßnahmen bei einem Verdacht auf ein vorliegendes PCa. Bei einem auffälligen Tastbefund in der digital rektalen Untersuchung (DRU) oder einem auffälligen PSA-Wert wird in der Regel eine transrektale Ultraschalluntersuchung (TRUS) durchgeführt, um tumorsuspekte Läsionen zu identifizieren. Darüber hinaus kann eine weitergehende Bildgebung mittels Magnetresonanztomogramm (MRT) des Beckens angefertigt werden. Die diagnostische Biopsie des PCa erfolgt üblicherweise noch mittels einer transrektal durchgeführten Stanzbiopsie, bei der 10 bis 12 Stanzzyylinder aus allen Zonen des Organs entnommen werden. Die Ultraschallsteuerung der Biopsie wird zunehmend ergänzt durch die Fusion mit zuvor angefertigten magnetresonanztomographischen Darstellungen der Prostata (Streicher *et al.*, 2019). Die Untersuchung der Stanzzyylinder erfolgt histopathologisch. Die große Heterogenität des PCa führt häufig dazu, dass gutartiges Drüsengewebe, prostatistische intraepitheliale Neoplasie (PIN), und karzinomatös entartetes Gewebe nebeneinander gemischt vorliegen, sodass die Diagnose erschwert wird (Grozescu and Popa, 2017). Um trotz dieser Umstände die Diagnostik zu vereinheitlichen, wurde bereits 1966 die histopathologische Einteilung in fünf Grade nach Gleason entwickelt (Abb. 5), bei der die Drüsenarchitektur beurteilt wird: Grad 1 beschreibt einfache, runde, dichtgepackte, gut abgrenzbare Drüsen, mithin gesundes prostatistisches Gewebe. Grad 2 beschreibt eine Auflockerung des Gewebes und der Drüsenverbände. Grad 3 beschreibt kleine oder mittelgroße Drüsen irregulärer Form und Anordnung, die nicht mehr eindeutig abgrenzbar sind und zum Teil papilläres oder kribriiformes Epithel aufweisen. Grad 4 beschreibt kleine, mittelgroße oder große konfluierende Drüsen, die säulenartig angeordnet sind. Grad 5 beschreibt die Aufhebung der Drüsenstruktur mit infiltrierendem Wachstum und papilläres oder kribriiformes Epithel mit zentralen Nekrosen (Gleason, 1992).

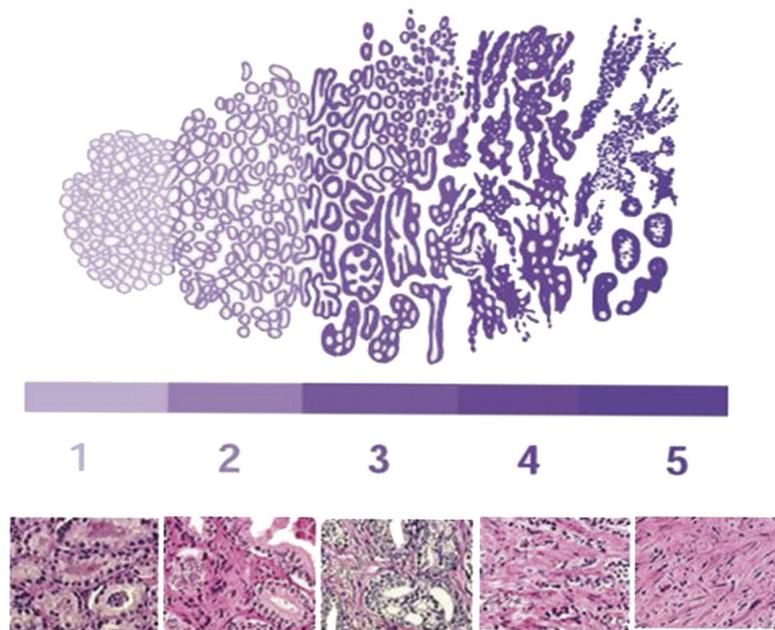


Abb. 5: Beurteilung der Drüsenarchitektur nach Gleason (Harnden *et al.*, 2007)
 Schematische Darstellung des Gleason-Grading-Systems im Vergleich mit H.E.-Präparaten.

Die Einteilung und Beurteilung ist immer wieder Gegenstand substantieller Veränderungen durch Konsenskonferenzen, so zuletzt 2014 (Epstein *et al.*, 2016). Es wurden für Grad 3 bis Grad 5 neue Untergruppen definiert. Grad 3 wird nun nach Dichte eingeteilt in locker, intermediär und dicht, sowie nach Drüsenarchitektur in atroph, verzweigt, muzinös fibroplastisch, Paneth-Zell-artig, PIN-artig sowie pseudohyperplastisch. Grad 4 wird nach Drüsenarchitektur eingeteilt in deformiert, klein- oder großflächig konfluierend, glomeruloid, kribriform, papillär, duktal und nicht-dukta. Grad 5 wird nach Drüsenarchitektur eingeteilt in einzellig, einreihig, kribriform mit Komedonekrose, pseudorosettenbildend, solide mit oder ohne Komedonekrosen (Kweldam *et al.*, 2019). In der präoperativen pathologischen Diagnostik (an Biopsiegewebe) werden der Primärgrad sowie der Sekundärgrad bestimmt, die zusammen den Gleason-Score ergeben. Der Primärgrad beschreibt die am häufigsten vorliegende Veränderung, der Sekundärgrad beschreibt die schwerwiegendste Veränderung. Sollte die schwerwiegendere Veränderung auch häufiger vorliegen, wird die seltenere, weniger schwerwiegende als Sekundärgrad angegeben. Anhand dieser Beschreibung wird das PCa in 5 Schweregrade eingeteilt (Tabelle 1) (Litwin and Tan, 2017). In der postoperativen Diagnostik (an Prostatektomiegewebe) bezeichnet der Primärgrad das am häufigsten vorliegende Muster und der Sekundärgrad das zweithäufigste Muster. Hier gibt es die Möglichkeit einen Tertiärgrad hinzuzufügen, sollten kleinere Anteile eines noch höhergradigen Musters vorliegen (Schlomm and Sauter, 2016).

Tabelle 1: Pathologisches Gradingssystem der Internationalen Gesellschaft für Uro-pathologie

Tumorgrad	Gleason-Score
Grad 1	3 + 3
Grad 2	3 + 4
Grad 3	4 + 3
Grad 4	4 + 4, 3 + 5 und 5 + 3
Grad 5	4 + 5, 5 + 4 und 5 + 5

Trotz der weiteren Differenzierung der Grade bleibt das System problematisch. Gleason selbst beschreibt bereits die Einschränkungen der Untersuchungsmethode. Die Einteilung ist trotz des Versuches der Objektivierung bis heute subjektiv und von Untersucher zu Untersucher verschieden. Selbst ein einzelner Untersucher kann bei wiederholter Beurteilung zu unterschiedlichen Ergebnissen kommen (Gleason, 1992, Munjal and Leslie, 2021).

Um den klinischen Verlauf präoperativ besser vorhersagen zu können, wurde durch das *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN, USA) eine Einteilung der lokal begrenzten Erkrankung anhand der verfügbaren Untersuchungsmethoden in fünf Risikogruppen vorgenommen (Tabelle 2). In dieser Einteilung werden verschiedene Eigenschaften des Tumors bewertet: Das klinische Tumorstadium (cT- Stadium) nach TNM- Klassifikation (Tabelle 3), der Gleason- Score (s.o.), sowie der PSA- Wert sollen Auskunft geben über das Risiko einer weiteren Progression der Erkrankung. Diese neue Einteilung wurde 2016 in die Tumorklassifikationen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) aufgenommen, welche als internationaler Standard der pathologischen Tumordiagnostik gilt (Epstein *et al.*, 2016, Litwin and Tan, 2017).

Tabelle 2: Risikogruppen nach NCCN

Risiko	cT- Stadium	Gleason Score	PSA- Wert	Sonstiges
sehr gering	T1c	≤ 6	< 10 ng/mL	weniger als 3 Stenzen mit ≤ 50 % Tumormasse und PSA- Dichte < 0,15 ng/mL/g
gering	T1 bis T2a	≤ 6	< 10 ng/mL	-
mittel	T2b bis T2c	≤ 7	10 – 20 ng/mL	-
hoch	T3a	8 bis 10	> 20 ng/mL	-
sehr hoch	T3b bis T4	Primärgrad 5, oder 4 Stenzen mit Grad 8 – 10	-	-

Tabelle 3: 8. Auflage der TNM- Klassifikation des PCa der American Joint Commission on Cancer (AJCC) und der Union for International Cancer Control (UICC) (Paner et al., 2018)

Tumor	
T0	Kein Tumornachweis
T1	nicht tastbar oder in Bildgebung nachweisbar
T1a/b	Zufallsbefund in der aus anderen Gründen entfernten Prostata
T1c	Biopsiebefund nach erhöhtem PSA
T2	Tastbar / in Bildgebung nachweisbar
T3	Organübergreifendes Wachstum
T3a	Kapselbefall
T3b	Befall der Samenblasen
T4	Befall anderer lokaler Strukturen
Lymphknoten	
N0	Keine befallenen Lymphknoten
N1	Pelvine Lymphknoten befallen
Metastasen	
M0	Keine Metastasen
M1a	Entfernte Lymphknoten befallen (z.B. paraaortal)
M1b	Knochenmetastasen
M1c	Eingeweide (z.B. Leber, Lunge) befallen

Wie aus Tabelle 2 ersichtlich wird, besteht eine der drei Kategorien ausschließlich aus dem Gleason-Score, sodass die o.g. Einschränkungen der Methode auch die Aussagekraft der Klassifikation zumindest teilweise begrenzen. Die Entwicklung weiterer diagnostisch einsetzbarer Marker zur individuellen Risikostratifikation des PCa sind also unerlässlich, um die bereits erwähnte Übertherapie der Erkrankung und die damit verbundenen Kosten und Risiken zu reduzieren. Besonderes Augenmerk wird dabei auf die Identifikation neuer molekularbiologischer Marker gelegt.

1.4 Molekularbiologie des Prostatakarzinoms

Mittels molekularbiologischer Methoden wie Gensequenzierung, Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) oder Mikrosatellitenanalysen konnte in den letzten Jahren eine Vielzahl verschiedener molekularbiologischer Veränderungen identifiziert werden, die einen Einfluss auf die Tumorprogression beim PCa haben. Es handelt sich dabei überwiegend um strukturelle Chromosomenaberrationen, genauer Fusionen und Deletionen, die im Folgenden beschrieben werden.

Durch Deletion oder Translokation eines Teils des Chromosomabschnitts 21q22 kommt es in ca. 50 % der PCa zur Fusion der Gene *transmembrane-protease, serine-2 (TMPRSS2)* und *v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog (ERG)*. Da die Expression von *TMPRSS2* von einem androgenabhängigen Promotor reguliert wird, führt diese Fusion dazu, dass auch die Expression von ERG androgenabhängig wird. Dementsprechend führt die *TMPRSS2:ERG*-Fusion in der Prostata zu einer vermehrten Expression des Transkriptionsfaktors ERG (Minner *et al.*, 2013, Tomlins *et al.*, 2005). Die Überexpression von ERG führt in gutartigen Prostataepithelzellen *in vitro* und *in vivo* zu Entdifferenzierung (Tomlins *et al.*, 2007), Migration und Invasion (Tomlins *et al.*, 2008). Somit kann eine Schlüsselposition der Überexpression von ERG in der Tumorentstehung und möglicherweise auch der Metastasierung angenommen werden (Yu *et al.*, 2010). Diese für epitheliale Tumore ungewöhnliche Veränderung in Form eines Fusionsgens ist PCa-spezifisch (Scheble *et al.*, 2010). Da gezeigt werden konnte, dass der *TMPRSS2:ERG*-Fusionsstatus innerhalb eines Tumors heterogen ist, muss vermutet werden, dass nicht alle Tumorzellen innerhalb von Tumoren, die als *TMPRSS2:ERG*-Fusions-positiv klassifiziert wurden, auf eine Androgendeprivation ansprechen (Minner *et al.*, 2013). Es konnte gezeigt werden, dass der *TMPRSS2:ERG*-Fusions-Status keine prognostische Relevanz hat (Krohn *et al.*, 2012).

Das *PTEN*-Gen kodiert für das Enzym phosphatase- and- tensin- homolog (PTEN). PTEN ist ein bekannter Tumorsuppressor, der den Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)/Proteinkinase-B (AKT)/mechanistic-target-of-Rapamycin (mTOR)/Signalweg negativ reguliert (Stambolic *et al.*, 1998, Wu *et al.*, 1998). PI3K phosphoryliert zu Beginn des Signalweges durch extrazelluläre Stimuli am Tyrosinkinase-Rezeptor Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃). PTEN dephosphoryliert PIP₃ zu PIP₂ und verhindert so die konsekutive aktivierende Phosphorylierung von AKT (Molinari and Frattini, 2013) (Abb. 6). Der Verlust der PTEN-Funktion führt so zu einer dauerhaften Aktivierung von AKT mit entsprechender Überaktivität des folgenden Signalweges und resultiert in massiv gesteigerter Zellproliferation und letztlich in einer erhöhten Kanzerogenese (Haddadi *et al.*, 2018). *In vivo* führt die prostata-spezifische Depletion von *PTEN* zur Entwicklung eines PCa (Wang *et al.*, 2003). Die Inaktivierung der PTEN-Funktion ist eine der häufigsten Veränderungen in bösartigen Tumoren und findet sich in einer Vielzahl von Neoplasien unterschiedlichen Organursprungs wie z.B. dem Mammakarzinom, dem Endometriumkarzinom, dem Glioblastom und dem PCa (Hollander *et al.*, 2011, Li *et al.*, 1997). Die Mechanismen, die zu der Inaktivierung führen, sind vielfältig und tumorspezifisch. Im PCa lässt sich eine *PTEN*-Deletion (10q23del) in ca. 20 % aller Fälle nachweisen (Krohn *et al.*, 2012). Weitere

Veränderungen von *PTEN* wie Mutation oder Neuordnung einzelner Genabschnitte (z.B. Inversionen) sind bekannt und eine Veränderung (inkl. Deletion) zeigt sich in ca. 50 % aller PCa (Poluri and Audet-Walsh, 2018). Auch für die Tumorprogression scheint *PTEN* eine bedeutende Rolle zu spielen (Whang *et al.*, 1998, Latini *et al.*, 2001).

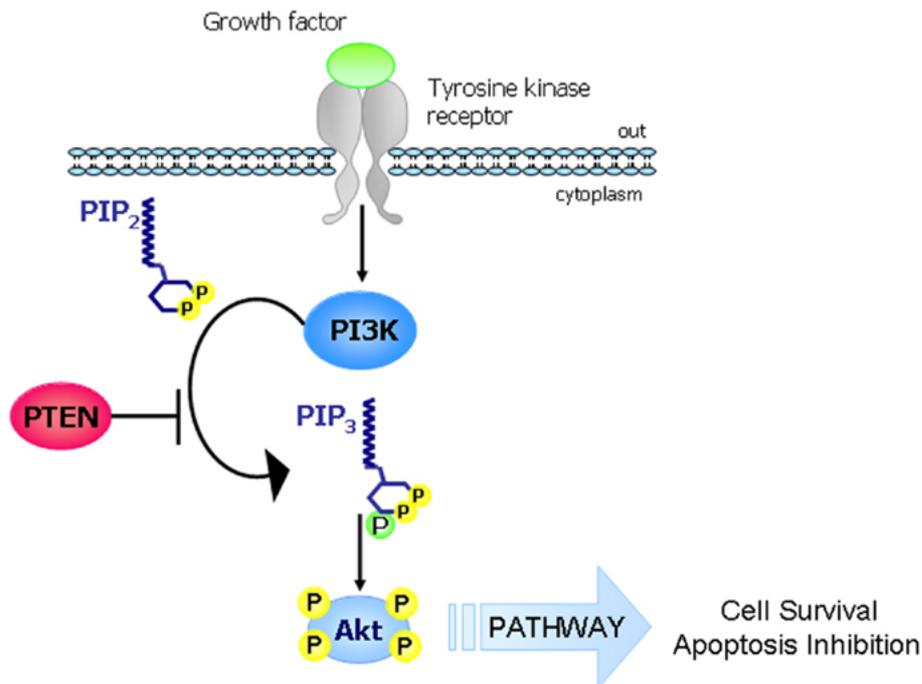


Abb. 6: PTEN reguliert den PI3K/ AKT/ mTOR-Signalweg (Molinari and Frattini, 2013)

PTEN reguliert den PI3K-Signalweg, anders als hier vereinfacht dargestellt, durch Dephosphorylierung von PIP₃ zu PIP₂. Eine Inhibition von *PTEN* führt also zu einer Zunahme der PIP₃-Konzentration und damit zu einer gesteigerten Aktivierung des nachfolgenden Signalweges (Molinari and Frattini, 2013, Haddadi *et al.*, 2018).

Eine weitere häufige Deletion des PCa, die 6q15-Deletion, betrifft einen kurzen DNA-Abschnitt, auf dem sich vor allem das *mitogen-activated-protein-kinase-kinase-7* (*MAP3K7*)-Gen befindet. Es wird angenommen, dass *MAP3K7* ein Tumorsuppressorprotein im PCa ist, da eine Korrelation zwischen dem Vorliegen der Deletion und einem hohen Gleason-Grad gezeigt werden konnte (Wu *et al.*, 2012). Der Mechanismus ist bis heute nicht aufgeklärt (Washino *et al.*, 2019), jedoch zeigte sich ein Zusammenhang zwischen einer *MAP3K7*-Suppression und einer gestörten Differenzierung der Zellen, sowie eine reduzierte bis komplett fehlende Expression von E-Cadherin, einem Adhäsionsmolekül. Diese reduzierte Expression kann ursächlich für die

Ablösung einzelner Tumorzellen vom Zellverband sein, und somit eine Aussaat des Tumors begünstigen (Rodrigues *et al.*, 2015). Auffällig ist, dass die 6q15- Deletion ganz überwiegend in *TMPRSS2:ERG*- Fusion- negativen Tumoren beobachtet wird (Kluth *et al.*, 2013). Das Fehlen von ERG in Tumorfoci mit 6q15- Deletion deutet daraufhin, dass die 6q15- Deletion die Bildung der *TMPRSS2:ERG*- Fusion verhindert. (Kluth *et al.*, 2016).

Das chromodomain- helicase- DNA- binding- protein- 1 (CHD1) ist ein auf 5q21 kodiertes Protein, das an der Bildung, Bewegung und Entfernung von Nukleosomen in der DNA beteiligt ist. Damit kommt dem Protein eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der leichteren Zugänglichkeit des Euchromatins für Transkriptionsfaktoren zu (Gaspar-Maia *et al.*, 2009). Ein Zusammenhang zwischen der 5q21- Deletion und der Tumorprogression konnte gezeigt werden, sodass angenommen wird, dass es sich bei CHD1 um einen Tumorsuppressor im PCa handelt (Burkhardt *et al.*, 2013). CHD1-deletierte Patienten haben darüber hinaus ein erhöhtes Risiko für das Auftreten postoperativer Fernmetastasen und die Depletion von CHD1 führt zu einer gesteigerten spontanen Metastasierung im PCa-Mausmodell (Oh-Hohenhorst *et al.*, 2022). Darüber hinaus scheint die 5q21- Deletion in einem funktionellen Zusammenhang mit der *TMPRSS2:ERG*- Fusion zu stehen, da gezeigt werden konnte, dass in Tumorzonen mit 5q21- Deletion ERG nicht exprimiert wird, wohingegen das Vorliegen von funktionalem CHD1 die ERG- Expression fördert (Burkhardt *et al.*, 2013, Kluth *et al.*, 2019).

Die 3p13- Deletion ist eine weitere häufige PCa- spezifische Aberration. Der Transkriptionsfaktor Forkhead- box- protein P1 (FOXP1) ist ein potentiell Tumorsuppressorprotein das auf 3p13 kodiert ist. Ein Zusammenhang zwischen der 3p13- Deletion und dem verminderten Vorliegen von FOXP1 und einer schlechteren Prognose konnte für das PCa gezeigt werden (Krohn *et al.*, 2013). Es konnte gezeigt werden, dass die 3p13- Deletion mit der *TMPRSS2:ERG*- Fusion und der PTEN- Deletion vergesellschaftet ist und überwiegend in späten Stadien der Progression entsteht (Kluth *et al.*, 2018).

Allerdings sind im PCa nicht nur genomische Aberrationen für die Progression und die damit einhergehende Verschlechterung der Prognose von Bedeutung. Eine klinisch besonders relevante Veränderung betrifft den Androgenrezeptor (AR). Die im Behandlungsverlauf häufig gewählte therapeutische Androgendeprivation (ADT) verliert in der Regel nach 24 bis 36 Monaten ihre Wirkung und man spricht vom kastrationsresistenten PCa (CRPC) (Chandrasekar *et al.*, 2015). Für diese Resistenzentwicklung werden verschiedene Mechanismen diskutiert, wie AR- Genamplifikation (Shen and Abate-Shen, 2010),

AR- Hypersensitivität (Visakorpi *et al.*, 1995), AR- Splice- Varianten mit fehlender AR- Liganden- Bindungsdomäne (z.B. AR- splice- variant 7) (Antonarakis *et al.*, 2014). sowie Mutationen in AR-Co- Aktivatoren bzw. -Co- Repressoren (Labbe and Brown, 2018). Weitere molekularbiologische Veränderungen wie c- Myc- Amplifikation oder *FOXA1*- Mutationen wurden beschrieben und werden weiterhin untersucht (Labbe and Brown, 2018). Da ein Zusammenhang mit diesen Veränderungen in der vorliegenden Arbeit allerdings nicht untersucht wurde, werden sie an dieser Stelle nicht weiter besprochen.

Ein großes Problem in der Diagnostik und der Prognoseabschätzung des PCa stellt die große Heterogenität der Erkrankung dar. PCa treten meist multifokal auf und nicht nur die Tumorfoci können sich interfokal voneinander in ihrem molekularbiologischen Profil unterscheiden, sondern auch intrafokal liegt häufig eine große Heterogenität vor, was die eindeutige Identifizierung möglicher therapeutischer Targets erschwert. (Yadav *et al.*, 2018, Minner *et al.*, 2013, Kluth *et al.*, 2016, Kluth *et al.*, 2019, Maitland *et al.*, 2019).

1.5 Therapie des Prostatakarzinoms

Nach der Diagnosestellung gibt es verschiedene Möglichkeiten der Therapie des PCa. Die Therapie sollte unbedingt im Rahmen multidisziplinärer Tumorkonferenzen diskutiert und die Entscheidung nach Besprechen der Vor- und Nachteile einzelner Therapieformen mit dem Patienten gemeinsam getroffen werden. Im Folgenden wird ein kurzer Überblick über gängige Therapieoptionen beim PCa gegeben.

1.5.1 Konservative Therapieansätze

Für Patienten mit lokalem, nicht fortgeschrittenem PCa mit sehr geringem Risiko (s.o.) gibt es die konservative Strategie der „*active surveillance*“, die darauf abzielt, v.a. jüngeren Männern mit sehr geringem Progressionsrisiko die radikaleren, nebenwirkungsbehafteten Therapieformen zu ersparen, ohne die Möglichkeit einer kurativen Behandlung bei einem späteren Progress auszuschließen. Um dies zu gewährleisten, werden in regelmäßigen Abständen und nach festgesetztem Schema Kontrollen durchgeführt. Im Gegensatz dazu gibt es die ebenfalls konservative Strategie des „*watchful waiting*“, welche für alle Stadien des PCa angewandt werden kann und darauf abzielt, Männern mit einer kürzeren Lebenserwartung die Nebenwirkungen einer radikalen Therapie zu ersparen und sich auf die Kontrolle eventuell auftretender Symptome zu konzentrieren. Der Ansatz des „*watchful waiting*“ ist ausschließlich palliativ anzuwenden (Tabelle 4) (Mottet *et al.*, 2017).

Tabelle 4: “Active surveillance” und “watchful waiting” im Vergleich

	<i>Active surveillance</i>	<i>watchful waiting</i>
Intention	kurativ	palliativ
Kontrollen	regelmäßig	patientenspezifisch
Assessment	DRU, PSA, Biopsie, MRT	nicht definiert
Lebenserwartung	> 10 Jahre	< 10 Jahre
Ziel	Nebenwirkungsreduktion ohne Reduktion der Prognose	Nebenwirkungsreduktion
geeignete Patienten	mit niedrigem Risiko	Patienten aller Stadien

1.5.2 Radikale Prostatektomie

Die nerverhaltende radikale Prostatektomie verfolgt das kurative Ziel einer Entfernung des Tumors *in sano*. Aufgrund der meist multifokalen Beschaffenheit des PCa kann diese nur in der vollständigen Entfernung der erkrankten Prostata erfolgen. Typische Komplikationen sind Harninkontinenz (12 Monate postoperativ sind noch ca. 20 % der Patienten harninkontinent) und/ oder eine erektile Dysfunktion (ca. 70 %) (Haglund *et al.*, 2015). Ein erhöhtes Risiko für einen kapselüberschreitenden neoplastischen Prozess ist eine relative Kontraindikation für den Eingriff. Bei Befall der pelvinen Lymphknoten kann zusätzlich eine Lymphadenektomie durchgeführt werden. Eine adjuvante Bestrahlung des Tumorbetts kann bei nicht erreichter Tumorfreiheit eine sinnvolle Ergänzung des Behandlungskonzeptes sein (Mottet *et al.*, 2017).

1.5.3 Definitive Radiatio

Die intensitätsmodulierte Strahlentherapie stellt aufgrund der gegenüber der dreidimensional- konformalen Strahlung verringerten Nebenwirkungen den Goldstandard der externen Strahlentherapie dar. Bei Männern mit PCa der niedrigen Risikogruppen zeigte sich, dass eine Strahlendosis von 74 – 80 Gray (Gy) das Überleben, gemessen am Auftreten biochemischer Rezidive (BCR s. 1.5.5) im Zeitraum von 5 Jahren, signifikant verbessert (Kuban *et al.*, 2011, Zietman *et al.*, 2010, Beckendorf *et al.*, 2011). Darüber hinaus ist die Strahlentherapie eine Behandlungssäule auch in allen höheren Stadien des PCa (Mottet *et al.*, 2017).

1.5.4 Brachytherapie

Bei der Low-dose-rate Brachytherapie werden radioaktive seeds in die Prostata eingebracht, die eine Bestrahlung des Tumors von innen ermöglichen. Die seeds verbleiben anschließend im Organ. Diese Therapieform eignet sich ausschließlich für Patienten mit niedrigen Tumorstadien. Die wichtigste Komplikation ist auch hier die Harninkontinenz (Mottet *et al.*, 2017).

1.5.5 Verlaufskontrolle

Die Verlaufskontrolle nach lokaler, kurativ intendierter Therapie erfolgt mittels Messung des PSA-Wertes. Hierbei ist ein in mindestens zwei postoperativ durchgeführten Messungen bestätigter Wert von $> 0,2$ ng/ml ausschlaggebend für die Diagnose eines BCR. Bei alleiniger Strahlentherapie ist ein in mindestens zwei Messungen bestätigter Wert $> 0,2$ ng/ml über dem postinterventionellen Nadir als BCR definiert. Der Nadir bezeichnet den niedrigsten PSA-Wert, der nach einer therapeutischen Intervention gemessen wird. Bildgebende Verfahren wie ein MRT mit Kontrastmittel oder ein MRT mit endorektaler Spule sind in Bezug auf die Lokalisation des Rezidivs aussagekräftig, jedoch nur bei Symptomen bzw. therapeutischer Konsequenz indiziert (AWMF *et al.*, 2021).

1.5.6 Therapie des rezidierten Prostatakarzinoms

Zur Therapie des PSA-Rezidivs stehen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung. Bei günstigen prognostischen Kriterien wie einer PSA-Verdopplungszeit von > 12 Monaten oder einem Gleason Score von < 8 kann abgewartet werden. Es kann dem Patienten aber auch eine perkutane Salvagestrahlentherapie mit kurativer Intention angeboten werden. Diese kann bei erhöhtem Progressionsrisiko ($PSA > 0,7$ ng/ml) durch eine ADT ergänzt werden. Die ADT kann mittels Androgenrezeptorblockern, GnRH-Analoga, GnRH-Antagonisten, Östrogenen und Testosteronbiosynthesehemmern durchgeführt werden (Tabelle 5). Eine Alternative zur medikamentösen antiandrogenen Therapie ist in Ausnahmefällen die Orchiektomie. Bei ungünstigen prognostischen Kriterien wie der PSA Verdopplungszeit < 12 Monaten oder einem Gleason Score von 8 bis 10 sollte nicht mehr abgewartet werden, sondern die perkutane Salvagestrahlentherapie mit ADT erfolgen (AWMF *et al.*, 2021).

Tabelle 5: Substanzklassen und Wirkstoffe zur antiandrogenen Therapie

Substanzklasse	Wirkstoffe
Androgenrezeptorblocker	1. Generation Bicalutamid (Iversen <i>et al.</i> , 2010)
	2. Generation Apalutamid (Smith <i>et al.</i> , 2018, Chi <i>et al.</i> , 2019)
	Darolutamid (Fizazi <i>et al.</i> , 2020)
	Enzalutamid (Armstrong <i>et al.</i> , 2019)
GnRH-Analoga	Buserelin (Debruyne, 1988)
	Goserelin (Dijkman <i>et al.</i> , 1995)
	Leuprorelin (Lawton <i>et al.</i> , 2001)
GnRH-Antagonisten	Degarelix (Klotz <i>et al.</i> , 2008)
	Relugolix (Shore <i>et al.</i> , 2020)
Testosteronbiosynthesehemmer	Abirateron (Fizazi <i>et al.</i> , 2019, Ryan <i>et al.</i> , 2013)

1.5.7 Therapie des metastasierten Prostatakarzinoms

Das metastasierte PCa kann in zwei Gruppen eingeteilt werden: das hormonsensitive, metastasierte PCa (mHSPC) und das o.g. CRPC. Für beide Gruppen gilt, dass die Therapie nicht mehr in kurativer Absicht erfolgt. Daraus folgt, dass das individuelle Therapiekonzept in enger Abstimmung mit dem Patienten festgelegt werden muss. Hierbei muss insbesondere auf den palliativen Charakter der Therapie, den Einfluss der Therapie auf die Lebensqualität und die unerwünschten Wirkungen der Therapie eingegangen werden. Die Planung der Therapie orientiert sich außerdem idealerweise am Allgemeinzustand und der individuellen Lebenserwartung des Patienten. Für Patienten mit mHSPC kommen sowohl eine ADT als auch die Kombination der ADT mit einer klassischen Chemotherapie mit Docetaxel in Frage. Bei CRPC-Patienten wird die Entscheidung über eine Fortführung der Therapie anhand ausschlaggebender Kriterien wie Patientenpräferenz, Symptomatik, Nebenwirkungen, Komorbidität, Lebenserwartung, Lebensqualität, Progressionsdynamik und genereller Tumorlast getroffen (AWMF *et al.*, 2021).

Da sich die vorliegende Arbeit vor allem mit der Prognose des PCa in der molekularbiologischen Diagnostik befasst, wird an dieser Stelle auf eine tiefere Darstellung der vielfältigen Therapieoptionen des PCa verzichtet. Der o.g. relativen Übertherapie geringgradig maligner Tumore stehen unzureichende Behandlungsmöglichkeiten bei fortgeschrittener Erkrankung gegenüber. Metastasierung ist die Hauptursache für Todesfälle im Zusammenhang mit dem PCa (Wang *et al.*, 2018a). Um dem entgegenzutreten, bedarf es eines besseren Verständnisses der Progression des PCa.

1.6 Tumorprogression des Prostatakarzinoms

Das PCa metastasiert zunächst in die benachbarten Lymphknoten, gefolgt von Metastasen in Knochen, Lunge und Leber (Wang *et al.*, 2018a). Metastasen entstehen durch die Ablösung einzelner oder mehrerer Zellen vom Primarius, die die Fähigkeit zur Migration besitzen und die an einem vom Primarius entfernten Teil des Körpers Absiedelungen in Form neuer Tumore bilden (Suhail *et al.*, 2019). Diese abgelösten Tumorzellen bezeichnet man als zirkulierende Tumorzellen (CTCs), sobald sie in den Blutstrom eingetreten sind (Intravasation). Teilweise lassen sich im peripheren Blut von Patienten mit wenigen Metastasen sehr viele CTCs nachweisen (Nagrath *et al.*, 2007). Dies und die Tatsache, dass die Metastasierung nicht in alle Gewebe und Organe erfolgt, sondern bestimmte Organe von bestimmten Tumorentitäten bevorzugt werden (Fidler, 2003), stützt die Hypothese, dass zusätzlich zu den Veränderungen innerhalb der Tumorzellen auch die Umgebungsbedingungen für die metastatische Kolonisierung von entscheidender Bedeutung sind (Nieto *et al.*, 2016).

Eine wichtige Rolle in diesem Prozess wird der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) zugeschrieben (Wang *et al.*, 2018a), einem in der Embryonalperiode physiologischen Vorgang während der Gastrulation. EMT ist ein komplexer biochemischer Prozess, der es polaren Epithelzellen ermöglicht, sich von der Basalmembran zu lösen, nachdem sie einen mesenchymalen Phänotyp angenommen haben. Dieser mesenchymale Phänotyp zeichnet sich unter anderem durch eine verbesserte Fähigkeit zur Migration und Invasion und verminderten Empfindlichkeit gegenüber der durch die Ablösung vom Primärtumor induzierten Apoptose (Anoikis) aus. Durch den umgekehrten Prozess, die mesenchymal-epitheliale Transition (MET), entstehen sekundäre Epithelien. Die EMT ist auch in der Gewebsregeneration, z.B. im Rahmen der Wundheilung, aber auch im Gewebeumbau, z.B. der Fibrosierung von Organen, beschrieben. Im Gegensatz zur embryonalen EMT ist diese entzündungs- oder traumaassoziiert. Eine dritte Form der EMT tritt schließlich in Zellen auf, die zuvor Veränderungen in Genen, die das klonale Wachstum und somit die Tumorgenese begünstigen, erfahren haben (Kalluri and Weinberg, 2009). Die EMT wird in der Regel induziert durch die Expression EMT-spezifischer Transkriptionsfaktoren (u.a. Snail, Zeb, Twist) und miRNAs. Die Ausprägung mesenchymaler Merkmale ist hierbei sehr unterschiedlich. Die Zellen oszillieren zumeist innerhalb eines Spektrums zwischen dem epithelialen und dem mesenchymalen Zustand (Abb. 7). Einige Zellen erwerben nur einige wenige mesenchymale Merkmale, während andere ihre epithelialen Merkmale vollständig verlieren. Die MET beendet schließlich den hybriden Zustand und ermöglicht den Zellen die metastatische Kolonisierung (Nieto *et al.*, 2016), da mit ihr der proliferative Charakter epithelialer Zellen zurückkehrt.

Zum besseren Verständnis der Metastasierungsmechanismen des PCa wurden mehrere Xenograft-Modelle etabliert. Hierbei wurden von menschlichen Tumoren gewonnene Tumorzellen zur Modellierung des Tumorwachstums und der Progression *in vivo* genutzt. Häufig verwendete humane PCa- Zelllinien sind u.a. PC- 3, LNCaP , DU- 145, und VcaP. Da diese Zelllinien *in vivo* ein unterschiedlich stark ausgeprägtes Metastasierungsverhalten zeigen, eignen sie sich, um anhand der Herauf- bzw. Herabregulation der Expression verschiedener Gene und der darauffolgenden Veränderung des Metastasierungsverhaltens die Mechanismen des metastatischen Prozesses zu entschlüsseln (Lange *et al.*, 2012). Auf diese Weise konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Depletion von CD46 in schwach metastatischen PCa-Zellen *in vitro* die EMT begünstigt und *in vivo* die Bildung von Mikrometastasen induziert (Lange *et al.*, 2020).

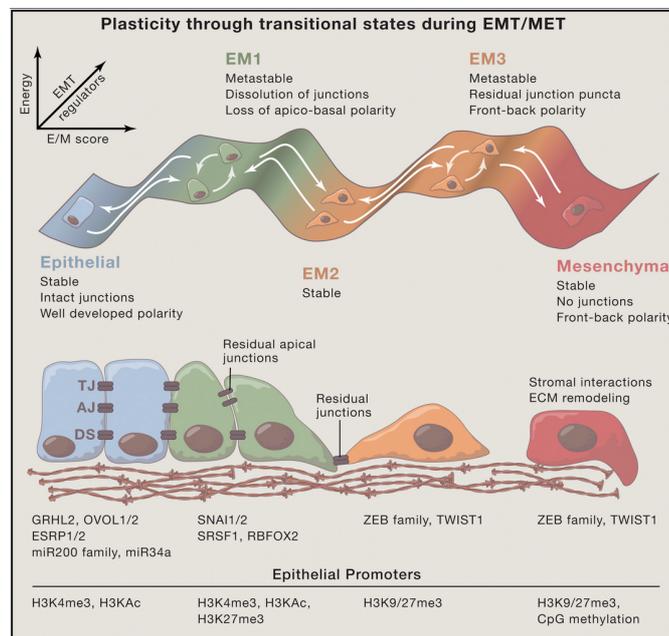


Abb. 7: Verschiedene transitorische Zustände der EMT/ MET (Nieto *et al.*, 2016).

Die EMT kann als Spektrum zwischen zwei Polen, epithelial (E) und mesenchymal (M), betrachtet werden, innerhalb dessen sich die Zellen in intermediären Zwischenstadien (EM) befinden. Bei diesen Zwischenstadien wird angenommen, dass diese eine variable Stabilität, u.a. in Abhängigkeit von der thermodynamischen Energie, aufweisen. Bei der EMT verlieren die Zellen zunehmend die apikobasale Polarität und Zell- Zell- Kontakte wie tight junctions (TJ), adherens junctions (AJ) und Desmosomen (DS).

1.7 DDX21

DDX21 ist eine DEAD-box Helikase, die zahlreiche Funktionen in der Biogenese von Ribosomen erfüllt (Valdez *et al.*, 2002). Ribosomen bestehen aus ribosomaler Ribonukleinsäure (rRNA) und ca. 80 Proteinen. Die Bestandteile der Ribosomen werden durch drei verschiedene RNA- Polymerasen (Pol I – III) durch Transkription ribosomaler DNA (rDNA) synthetisiert. Pol I synthetisiert 18S- rRNA, 5,8S- rRNA und 28S- rRNA. 18S- rRNA wird prozessiert zur 40S Untereinheit. 5,8S- rRNA und 28S- rRNA werden, gemeinsam mit der von Pol III synthetisierten 5S- rRNA, prozessiert zur 60S Untereinheit des Ribosoms. Pol II synthetisiert zum einen die heterogene nukleäre RNA (hnRNA) für die ribosomalen Proteine, zum anderen small nucleolar RNAs (snoRNAs), die für die Prozessierung und Modifikation der rRNA von Bedeutung sind (Leary and Huang, 2001, Calo *et al.*, 2015). Im Nukleoplasma ist DDX21 Teil des 7SK small nuclear ribonucleoprotein- Komplexes (7SK snRNP). ADP- ribosyliertes DDX21 transloziert in den Nukleolus (Kim *et al.*, 2019).

Promotorgebundenes DDX21 katalysiert mittels seiner Helikaseaktivität die Lösung des positiven Transkriptionselongationsfaktors b (P- TEFb) vom 7SK- snRNP- Komplex. Hierdurch wird die Transkription der Zielgene des Promotors stimuliert (Abb. 8) (Calo *et al.*, 2015).

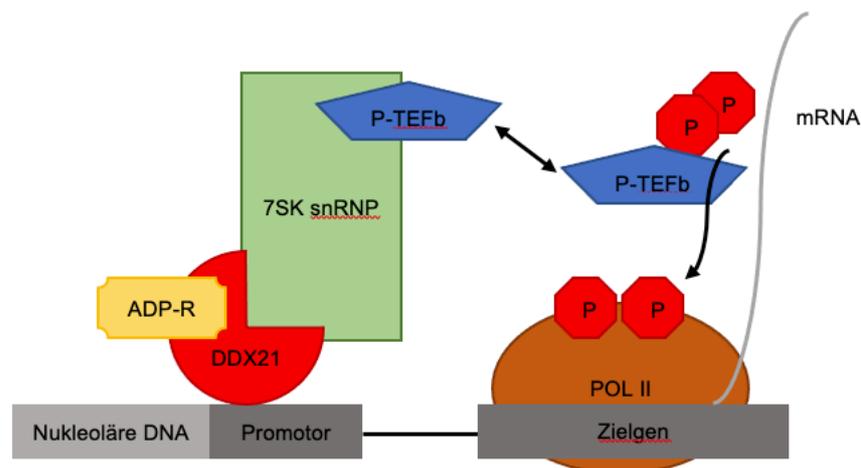


Abb. 8: DDX21 ist ein Aktivator für die POL II- vermittelte Transkription

ADP-ribosyliertes DDX21 (die ADP- Ribosylgruppe ist hier mit ADP-R gekennzeichnet) bindet an den Promotor eines Zielgens. P-TEFb löst sich daraufhin vom 7SK- snRNP- Komplex und phosphoryliert zwei negative Transkriptionsfaktoren der POL II und inaktiviert sie somit. Infolgedessen beginnt POL II mit der Polymerisation der mRNA.

DDX21 reguliert die Prozessierung und Modifikation von Bestandteilen der ribosomalen 40S Untereinheit (Sloan *et al.*, 2015). Viele Promotoren von durch Pol II transkribierten Genen rekrutieren DDX21 als Transkriptionsfaktor (Calo *et al.*, 2015). Wie oben bereits erwähnt transkribiert Pol II vor allem die Gene für ribosomale Proteine und polymerisiert snoRNAs für die Prozessierung und Modifikation der rRNA. DDX21 ist also einerseits Transkriptionsfaktor für die Proteinbausteine der Ribosomen, andererseits beteiligt an der Biogenese der ribosomalen RNA-Bausteine. DDX21 kann folglich als ein für die Biogenese zentrales Enzym angesehen werden.

2 Zielsetzung

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte bereits nachgewiesen werden, dass die Expression der DEAD-box Helikase DDX21 mit dem metastatischen Potential von PCa- Xenograftmodellen zunimmt. Dazu passend wurden in den Xenografttumoren neben DDX21 auch signifikant veränderte Expressionslevel von sieben Mikro-RNAs (miR- 9, 15a, 15b, 16, 23b, 34a, 186) gemessen, die mit DDX21 interagieren. Die Primärtumoren und spontanen Lungenmetastasen des am stärksten metastasierenden Xenograftmodells der Zelllinie PC- 3 wiesen im Vergleich zu den nicht metastasierenden Xenograft- Primärtumoren der Zelllinie DU- 145 deutlich verstärkte nukleäre und nukleoläre Proteinlevel von DDX21 auf. Aufgrund der hohen Anzahl zwischen den Modellen gleichgerichtet veränderter, interagierender miRs suggerierten diese Ergebnisse, dass DDX21 als „Knotenpunkt“ eines metastasierungsassoziierten mRNA/ miR Netzwerks fungieren könnte (Lange *et al.*, 2020). Es wurden bereits einige Experimente zur funktionellen Analyse von DDX21 in Tumorzellen unterschiedlicher Entität *in vitro* durchgeführt (Holmstrom *et al.*, 2008, Hirai *et al.*, 2013, Calo *et al.*, 2015, Sloan *et al.*, 2015, Song *et al.*, 2017, Xing *et al.*, 2017, Zhang *et al.*, 2018, Argaud *et al.*, 2019, Kim *et al.*, 2019, McRae *et al.*, 2020, Santoriello *et al.*, 2020, Wang *et al.*, 2020, Marcaida *et al.*, 2020), jedoch wurden nur wenige Experimente zum Verständnis von DDX21 *in vivo* durchgeführt (Zhang *et al.*, 2014, Cao *et al.*, 2018, Kim *et al.*, 2019, Johansson *et al.*, 2020). Die klinische Relevanz von DDX21 wurde bisher lediglich in einer einzigen Studie zum kolorektalen Karzinom untersucht (Tanaka *et al.*, 2020). Zur funktionellen Rolle von DDX21 im PCa- Tiermodell gibt es bis dato nur die genannte Vorarbeit der Arbeitsgruppe (Lange *et al.*, 2020), aber keine Untersuchungen zur Rolle von DDX21 im PCa an humanem Material. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Beantwortung der Frage, ob die Proteinexpression und –lokalisierung von DDX21 mit einem besonders aggressiven Tumorphänotypen in Patienten assoziiert ist. Hierbei sollten der präoperative PSA- Wert, das pT- Stadium, cT- Stadium, der Gleason-Score in der präoperativen Biopsie und im Prostatektomiepräparat, das pN- Stadium sowie der R- Status betrachtet werden. Außerdem sollte der Frage nachgegangen werden, ob die Proteinexpression/ -lokalisierung von DDX21 in unterschiedlichen molekularen PCa- Subtypen grundsätzlich mit bestimmten genomischen Aberrationen vergesellschaftet ist. Hierfür sollten die *TMPRSS2:ERG*- Fusion sowie die 10q23-, 5q21- und 3p13- Deletion betrachtet werden. Es sollte außerdem untersucht werden, ob die Proteinexpression/ -lokalisierung von DDX21 als Marker zur Prognoseabschätzung von PCa- Patienten herangezogen werden kann, ggf. spezifisch innerhalb der o.g. molekularen PCa- Subtypen. Dazu wurde der bereits etablierte Hamburger *tissue microarray* (TMA) des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg- Eppendorf (UKE) (Prof. Dr. med. Guido Sauter) verwendet. Zusätzlich zu den

Gewebeproben standen dabei auch vielfältige histopathologische Untersuchungsergebnisse, präoperativ- klinische Daten, sowie postoperative Verlaufparameter zur Verfügung. Als Endpunkt wurde das BCR festgelegt. Die Prognoseabschätzung in Bezug auf das rezidivfreie Überleben radikal prostatektomierter Patienten sollte univariat und multivariat unter Berücksichtigung verschiedener etablierter Parameter erfolgen.

3 Material und Methoden

3.1 Gewebemikroarray und Patientendaten

Die vorliegenden Untersuchungen wurden an einem TMA des Instituts für Pathologie des UKE mit 17.753 PCa- Patientenproben durchgeführt. Üblicherweise werden immunhistochemische Färbungen an Präparaten vorgenommen, die bis zu wenige Zentimeter groß sind. Im Anschluss werden die gefärbten Präparate einzeln mikroskopisch analysiert. Im Gegensatz dazu handelt es sich beim TMA um ein Hochdurchsatzverfahren, bei dem von jeder Gewebeprobe nur ein 0,6 mm großer Stanzzyylinder in einem Paraffinblock platziert wird. In einem Block können bis zu 1000 Stanzzyylinder platziert werden. Vom Paraffinblock werden anschließend wie gewohnt mit dem Mikrotom 4 – 5 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt und auf Objektträger gezogen. Dadurch wird eine schnelle und vor allem untereinander vergleichbare Färbung und Analyse einer sehr großen Anzahl von Proben ermöglicht. Die große Probenzahl und vergleichbare Anfärbung erlaubt die Ableitung statistisch belastbarer Ergebnisse. In der vorliegenden Arbeit wurden Stenzen aus Karzinomarealen von Prostatektomiepräparaten analysiert. Die Proben verteilten sich auf 39 Objektträger mit 144 bis 522 Stenzen. Das Material stammte von Patienten, die sich an der Martini- Klinik Hamburg (Prof. Dr. med. Markus Graefen) im Zeitraum von 1992 bis 2015 einer radikalen Prostatektomie unterzogen hatten.

Der PSA- Wert der Patienten wurde präoperativ, postoperativ und anschließend im Abstand von 3 Monaten im ersten Jahr gemessen, gefolgt von halbjährlichen Messungen im zweiten Jahr und jährlichen Messungen nach dem dritten Jahr. Postoperative PSA- Werte über 0,2 ng/ml wurden als BCR definiert. Die Herstellung des TMA wurde vielfach beschrieben, beispielsweise 1998 von Kononen *et al.* und 2008 von Schlomm *et al.* Letztlich war jedes Prostatektomiepräparat mit einer runden Stanze aus dem primären Tumorfokus, definiert durch die Ausdehnung und/ oder den höchsten Gleason- Grad, mit einem Durchmesser von ca. 600 µm auf den Objektträgern repräsentiert (Kononen *et al.*, 1998, Schlomm *et al.*, 2008). Unserer Arbeitsgruppe stand nur eine pseudonymisierte Liste für die Zuordnung der einzelnen Patienten zu den TMA- Koordinaten zur Verfügung, so dass wir die Färbeergebnissen der einzelnen Stenzen Pseudonymen zuordnen konnten. Zu keinem Zeitpunkt hatten wir selbst Einsicht in die klinischen und histopathologischen Daten der Patienten. Die Korrelation der Färberesultate mit den klinischen, histopathologischen und molekularen Daten erfolgte anschließend freundlicherweise durch Prof. Dr. G. Sauter und Mitarbeiter, die über ein entsprechendes Ethikvotum der Ärztekammer Hamburg verfügen. Die Auswertung der Färbung wurde nach Auftreten und Lokalisation der Immunreaktivität (negativ, nukleär, nukleolär) eingeteilt.

3.2 Immunhistochemie

Für den Nachweis von DDX21 wurde eine immunhistochemische Färbung (IHC) am Paraffinschnitt etabliert. Hierfür wurden Gewebeschnitte von humaner Gallenblase (freundlicherweise überlassen von Prof. Dr. med. Andreas Gocht, Lübeck) als Positivkontrolle sowie eine Isotypenkontrolle vom Kontrollgewebe bei der Färbung mitgeführt. Die Schnitte wurden entparaffiniert und in absteigender Ethanolreihe rehydriert. Nach Austestung verschiedener Vorbehandlungen der Gewebeschnitte sowie unterschiedlicher Endkonzentrationen des Primärantikörpers wurde folgendes Vorgehen festgelegt: Die Schnitte wurden in Citratpuffer (pH = 6) in einem Druckkocher für 10 Minuten bei 121 °C vorbehandelt. Durch die Vorbehandlung wurden die Epitope demaskiert bzw. unspezifische Bindungsstellen für die Antikörper verringert. Nach der Vorbehandlung wurden die Schnitte zweimal mit TBS- T (30,29 g Trizma Base + 43,54 g NaCl + 100 ml HCl [2 mol/l] auf 5 l *aqua dest.* [pH = 7,6] + 0,1% TWEEN-20) gewaschen, sowie einmalig für 5 Minuten mit TBS (Zusammensetzung wie bei TBS- T, nur ohne TWEEN- 20) gespült. Nach der Vorbehandlung wurden die Schnitte für 60 Minuten mit dem Primärantikörper gegen DDX21 (Abcam, Cambridge, UK, ab182156) in einer Endkonzentration von 4,58 µg/mL, verdünnt in Antibody-Diluent (Dako, Glostrup, DK), bei Raumtemperatur inkubiert. Als Isotypenkontrolle wurde monoklonales Rabbit-IgG (Abcam, ab125938) in einer Endkonzentration von 4,59 µg/mL verwendet. Anschließend wurden die Schnitte mit TBS- T und TBS wie oben beschrieben gewaschen und mit einem biotinylierten swine- anti- rabbit- Sekundärantikörper (Dako, E0353, Endkonzentration 2,5 µg/mL) für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Schnitte erneut mit TBS- T und TBS gewaschen. Zur Visualisierung der Bindung des Primärantikörpers an DDX21 wurde die Avidin- Biotin- Komplex- Methode angewandt. Bei dieser immunhistochemischen Färbetechnik handelt es sich um ein indirektes Nachweisverfahren, da der Primärantikörper zur Sichtbarmachung über den Zwischenschritt des biotinylierten Sekundärantikörpers an ein enzymatisches Amplifikationssystem gekoppelt wird. Als Amplifikator wurde dabei in diesem Versuch an Avidin gekoppelte alkalische Phosphatase (ABC- AP) eingesetzt. Die Schnitte wurden dazu 30 Minuten lang bei Raumtemperatur mit ABC- AP (Vector-Laboratories, Burlingame, USA) inkubiert. Danach wurden die Schnitte wiederum mit TBS- T und TBS gewaschen. Als Chromogen kam Permanent Red (Zytomed Systems, Berlin, D) als Substrat für die Alkalische Phosphatase zum Einsatz. Die Schnitte wurden für 14 Minuten mit Permanent Red bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend nach dem oben beschriebenen Verfahren mit TBS- T und TBS gewaschen. Der Umsatz von Permanent Red führte zu einer roten Färbung. Die Schnitte wurden 3 Minuten mit Leitungswasser und 2 Minuten mit destilliertem Wasser gespült und 4 Sekunden mit Mayers Hämalaunlösung (Merck, Darmstadt, D) zur besseren Kontrastdarstellung gefärbt (Anfärbung der Zellkerne).

Im Anschluss wurden die Schnitte 5 Minuten mit Leitungswasser und 2 Minuten mit destilliertem Wasser gespült. Nach der anschließenden Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol wurden die Schnitte mit Eukitt eingedeckelt.

3.3 Statistische Analyse

Die Berechnungen wurden freundlicherweise durch das Institut für Pathologie des UKE vorgenommen.

Die statistische Analyse wurde mittels JMP® 11- Software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) durchgeführt. Es wurden Kontingenztafeln erstellt und der Chi-Quadrat-Test (Wahrscheinlichkeit) durchgeführt, um Assoziationen zwischen molekularen Parametern und Tumorphänotyp zu bestimmen. Die Überlebenskurven wurden nach Kaplan-Meier berechnet. Der Log-Rank-Test wurde angewendet, um signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen festzustellen. Eine Cox- Regressionsanalyse wurde durchgeführt, um die statistische Unabhängigkeit und Signifikanz zwischen pathologischen, molekularen und klinischen Variablen zu testen. Es wurden multivariate Analysen durchgeführt, um die klinische Relevanz der DDX21- Expression in vier verschiedenen Szenarien zu bewerten. In Szenario 1 wurden alle postoperativ verfügbaren Parameter wie präoperativer PSA- Spiegel im Serum, pathologisches Tumorstadium (pT), pathologischer Gleason-Grad basierend auf der Analyse des gesamten Prostatektomiepräparates, pathologischer Lymphknotenstatus (pN), Resektionsrand und DDX21-Expression berücksichtigt. Szenario 2 enthielt mit Ausnahme von pN dieselben Parameter wie Szenario 1. Der Grund für den Ausschluss war, dass sowohl die Indikation als auch der Grad der Lymphknotendisektion in der chirurgischen Therapie des PCa nicht standardisiert sind und dass der Ausschluss von pN in multivariaten Analysen die Anzahl der analysierbaren Fälle erheblich erhöhen kann. Szenario 3 umfasste die DDX21- Expression, den präoperativen PSA- Spiegel, das klinische Tumorstadium (cT) und den Gleason-Grad, der in den Prostatektomieproben bestimmt wurde. Da die postoperative Beurteilung des Gleason- Grades eines Tumors dem präoperativ bestimmten Gleason- Grad überlegen ist (Epstein *et al.*, 2012), wurde Szenario 4 hinzugefügt, in dem der präoperative Gleason- Grad, der in Stanzbiopsien bestimmt wurde, mit präoperativem PSA, cT- Stadium und DDX21- Expression kombiniert wurde.

3.4 Geräte

Deckgläser für Mikroskopie	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Druckkocher Pascal	Dako (Glostrup, DK)
Durchlichtmikroskop Axiostar	Carl-Zeiss (Oberkochen, D)
Eisbereiter	Hoshizaki (Toyoake, Japan)
Einweg-Pasteurpipetten	Roth (Karlsruhe, D)
Kolbenhubpipetten	Eppendorf (Hamburg, D)
Kolbenhubpipetten	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Gefrierschrank – 20 °C	Liebherr (Biberach, D)
Kühlschrank 4 °C	Liebherr (Biberach, D)
Magnetrührer IKA RCT basic	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Mikrotom HM 430	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Objekträger	Marienfeld (Lauda-Königshofen, D)
Objekträger Strecktisch	Medax (Neumünster, D)
Paraffin-Streckbad	Medax (Neumünster, D)
pH-Meter MP220	Mettler Toledo (Columbus, USA)
Pipettenspitze 20, 100, 200 µl	Sarstedt (Nümbrecht, D)
Reagiergefäß 1,5 ml	Sarstedt (Nümbrecht, D)
Rollenmischer RM 5	Hecht-Assistent (Sondheim, D)
SafeLock Tubes 2,0 ml	Eppendorf (Hamburg, D)
SafeSeal Gefäß 0,5 ml	Sarstedt (Nümbrecht, D)
Schüttelmaschine REAX 2000	Heidolph (Schwabach, D)
Stainer Varistain 24 – 4	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Sterilisationskammer Varioklav 75 S	HP-Labortechnik (Oberschleißheim, D)
Transformer iMed 1000	Noratel (Grafenau, D)
Wärmeschrank	Melag (Berlin, D)
Wippschüttler ST 5	Ingenieurbüro CAT (Ballrechten- Dottingen, D)

3.5 Reagenzien

Citronensäure-Monohydrat (EMSURE)	Merck (Darmstadt, D)
Dako Antibody Diluent (S0809)	Dako (Glostrup, DK)
Dako swine anti-rabbit biotinylated (E0353)	Dako (Glostrup, DK)
Ethanol 96 % (2206.5000)	Th. Geyer GmbH & Co. KG (Renningen, D)
Ethanol 99 % (2212.5000)	Th. Geyer GmbH & Co. KG (Renningen, D)
Eukitt	O. Kindler GmbH (Freiburg, D)
Mayers Hämalaunlösung	Merck (Darmstadt, D)

Natriumchlorid, crystalline	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Permanent AP Red Kit	Zytomed Systems (Berlin, D)
Rabbit IgG (ab125938)	Abcam (Cambridge, UK)
Recombinant Anti-DDX21 (ab182156)	Abcam (Cambridge, UK)
Salzsäure 2,0 mol/L	Th. Geyer GmbH & Co. KG (Renningen, D)
TWEEN 20 (Polysorbat)	Merck (Darmstadt, D)
Trizma base, crystalline	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
Vectastain ABC-AP Kit	Vector- Laboratories (Burlingame, USA)
Xylolersatz Medium HS200-5	DiaTec (Bamberg, D)
Xylol z.A. (326.1000)	Th. Geyer GmbH & Co. KG (Renningen, D)

4 Ergebnisse

4.1 Eine vermehrte DDX21- Expression geht mit einem aggressiveren Tumorphänotypen einher

Die Korrelationen zwischen PCa- Phänotyp und IHC- Färbung (Abb. 9) sind in Tabelle 6 zusammengefasst. Übereinstimmend mit den Voruntersuchungen, in denen die Xenografttumore mit stärkerem Metastasierungsverhalten eine erhöhte DDX21- Expression aufwiesen, zeigten Patienten mit DDX21- positiven Tumoren einen aggressiveren Tumorphänotypen als Patienten mit DDX21-negativen Tumoren. Die Zunahme der DDX21- Expression mit zunehmender Aggressivität des Tumors konnte über alle untersuchten phänotypischen Merkmale (pT- Stadium, Gleason- Score im Prostatektomiepräparat, Vorliegen von Lymphknotenmetastasen, präoperativer PSA- Wert im Serum, alle $p < 0,0001$, R- Status $p < 0,05$) nukleär, insbesondere aber auch nukleolär beobachtet werden.

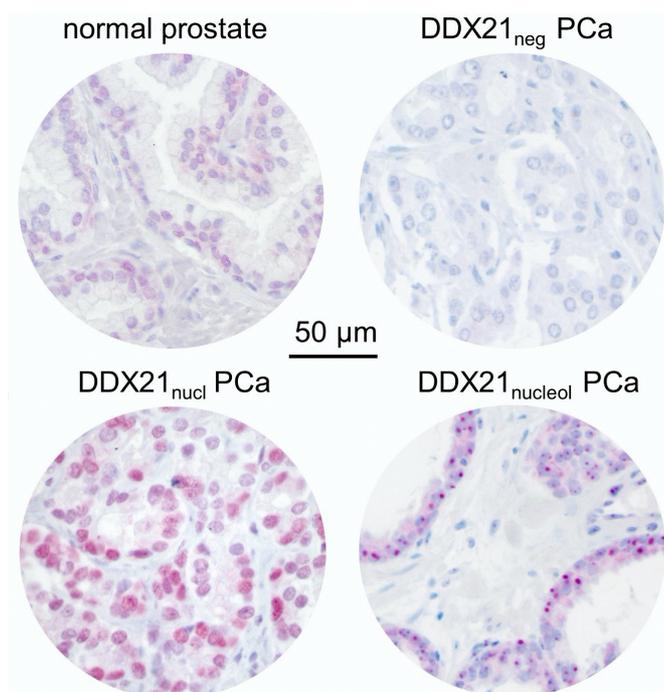


Abb. 9: Immunhistochemische Färbung von DDX21 (Lange et al., 2020)

Auswertung der IHC-Färbung nach Auftreten und Lokalisation der Immunreaktivität. Im Uhrzeigersinn von oben links: normales Prostatagewebe, PCa ohne DDX21- Expression, PCa mit nucleärer DDX21-Expression, PCa mit nucleolärer DDX21- Expression.

Am eindeutigsten zeigte sich bei diesen Merkmalen die Assoziation zwischen der DDX21-Expression und dem höheren Gleason-Score im Prostatektomiepräparat. Bei einem Gleason-Score von $\leq 3 + 3$ waren 21,1 % DDX21-negativ, 70,4 % zeigten eine nukleäre DDX21-Expression und 8,5 % eine nukleoläre DDX21-Expression. Bei einem Gleason-Score von $\geq 4 + 4$ zeigten sich die Werte entsprechend verschoben hin zur nukleären bzw. nukleolären Expression (6,6 %, 79 %, 14,4 %) ($p < 0,0001$). Ebenso war unter den Patienten mit höheren Tumorstadien und nachweisbaren Lymphknotenmetastasen eine signifikante Zunahme eines positiven DDX21-Nachweises zu verzeichnen. Ein relativ schwacher, aber dennoch signifikanter Zusammenhang zeigte sich auch zwischen R-Status und DDX21-Status (R0 13,1 %, 72,4 %, 14,6 % versus R1 10,9 %, 73,5 %, 15,6 %, $p < 0,05$) (Tabelle 6).

Tabelle 6: Assoziation zwischen DDX21-Status und Tumorphänotyp

DDX21	Parameter	n beurteilbar	negativ (%)	nukleär (%)	nukleolär (%)	p Wert
	Gesamt	10799	12,7	72,6	14,8	
	pT Stadium					
	pT2	6810	14,4	72,2	13,3	< 0,0001
	pT3a	2455	10,8	70,7	18,5	
	pT3b – pT4	1494	7,4	77,4	15,2	
	pGleason-Score					
	$\leq 3 + 3$	1986	21,1	70,4	8,5	< 0,0001
	3 + 4	5769	12,6	71,6	15,7	
	3 + 4 Tert. 5	486	7,4	74,9	17,7	
	4 + 3	1097	9,1	74,0	16,9	
	4 + 3 Tert. 5	769	4,3	76,2	19,5	
	$\geq 4 + 4$	610	6,6	79,0	14,4	
	Lymphknotenmetastasen					
	N0	6506	12,4	71,3	16,2	< 0,0001
	N+	791	7,1	74,7	18,2	
	Präop. PSA-Wert (ng/mL)					
	< 4	1260	11,9	71,6	16,5	< 0,0001
	4 – 10	6381	12,3	72,0	15,7	
	10 – 20	2297	14,0	73,7	12,4	
	> 20	793	12,5	76,2	11,3	
	Resektionsrand					
	R0	8540	13,1	72,4	14,6	0,0127
	R1	2219	10,9	73,5	15,6	

4.2 Die DDX21-Expression ist mit dem *TMPRSS2:ERG* Fusionsstatus und der *PTEN*-Deletion assoziiert.

In der Untergruppe der *TMPRSS2:ERG*-fusion (*ERG*)-positiven Tumore zeigte sich gegenüber der Untergruppe der *ERG*-negativen Tumore eine deutliche Zunahme der nukleolären Expression von *DDX21* zu Lasten der *DDX21*-negativen Fälle ($p < 0,0001$, Abb. 10). Der *ERG*-Status wurde bereits im Vorfeld mittels *ERG*-IHC und *ERG*-FISH bestimmt und gehört zum molekularen Datensatz des TMA.

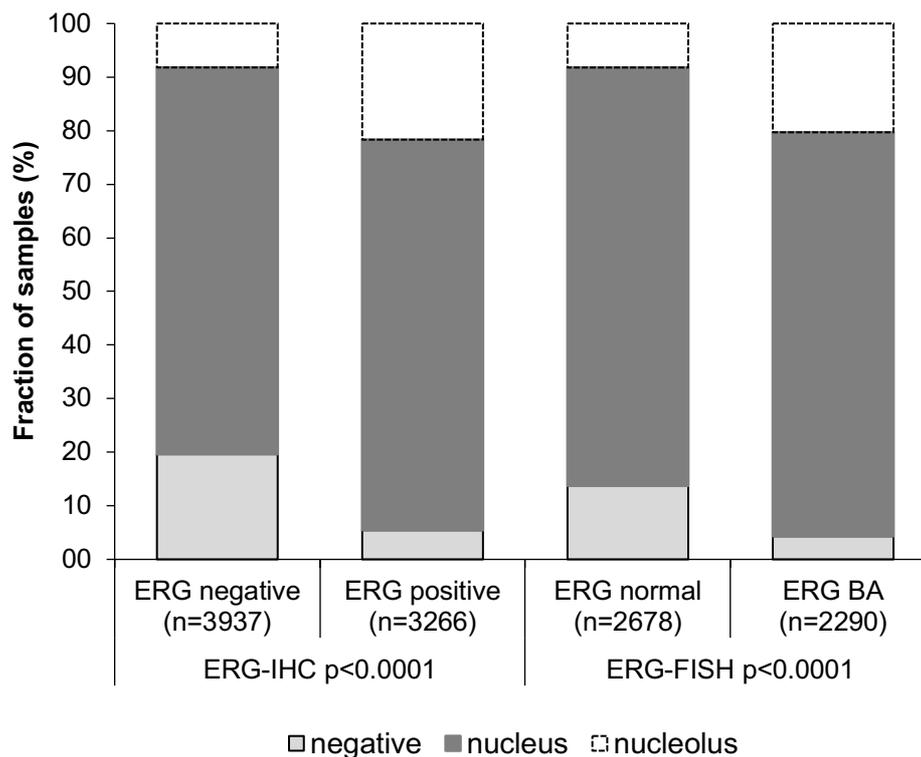


Abb. 10: Fraktionen nach *DDX21*-Expression und *ERG*-Status in %

In der Untergruppe der Patienten mit *PTEN*-Deletion (10q23del) zeigte sich gegenüber der Gruppe mit normalem *PTEN*-Status ebenfalls eine Häufung der Fälle mit nukleolärer *DDX21* Expression zu Lasten der Fälle ohne nachweisbare *DDX21* Level. Auch dieses Ergebnis war statistisch signifikant ($p < 0,0001$, Abb. 11). Assoziationen zwischen der *DDX21*-Expression/Lokalisation und anderen häufigen Deletionen wie 5q21 (*CHD1*, $p=0,013$) und 3p13 (*FOXP1*, $p=0,004$) waren vergleichsweise schwach. Eine Assoziation mit der im Vorfeld bestimmten 6q15-Deletion (*MAP3K7/TAK1*, $p=0,193$) bestand nicht (Abb. 11). Der 10q23-, 5q21- und 3p13-Deletionsstatus wurde ebenfalls bereits im Vorfeld mittels FISH bestimmt und wurde der molekularen Datenbank des Instituts für Pathologie des UKE entnommen (Prof. Dr. G. Sauter).

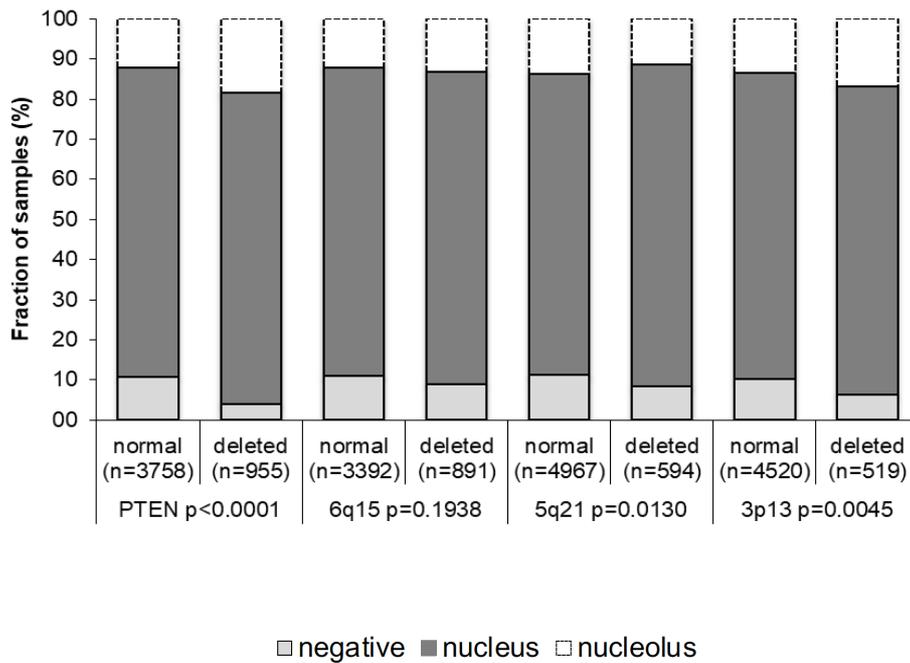


Abb. 11: Fraktionen nach DDX21-Expression und typischen Deletionen in %

4.3 Die DDX21-Expression prognostiziert bei ERG-negativen Patienten ein früheres BCR

Bei Betrachtung des gesamten Patientenkollektivs mit einem Beobachtungszeitraum von 10 Jahren ($n = 9073$) prognostizierte der DDX21- Status (negativ vs. nukleär vs. nukleolär) ein früheres BCR bei beiden Patientengruppen mit nachweisbarer DDX21- Expression ($p < 0,0001$, Abb. 12).

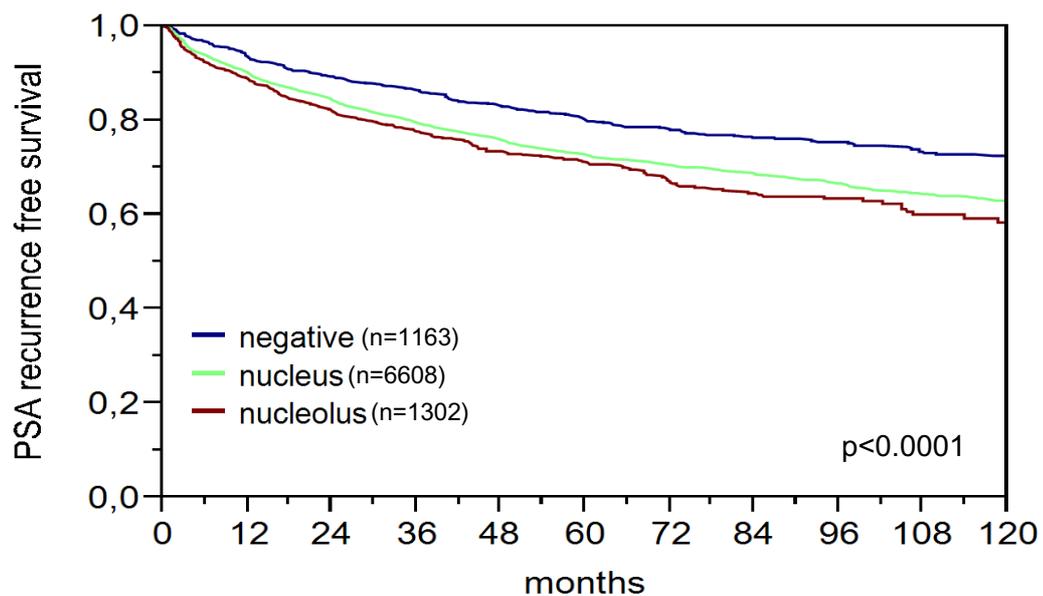


Abb. 12: BCR-freies Überleben alle Tumore

Dieser Effekt beruhte hauptsächlich auf der Untergruppe der ERG- negativen Patienten, in der ein nukleolärer DDX21-Nachweis mit einer besonders schlechten Prognose bezogen auf das BCR- freie Überleben einherging ($p < 0,0001$, Abb. 13). Im Gegensatz dazu hatte der DDX21- Status in der ERG- positiven Untergruppe keinen prognostischen Wert ($p = 0,1$, Abb. 14).

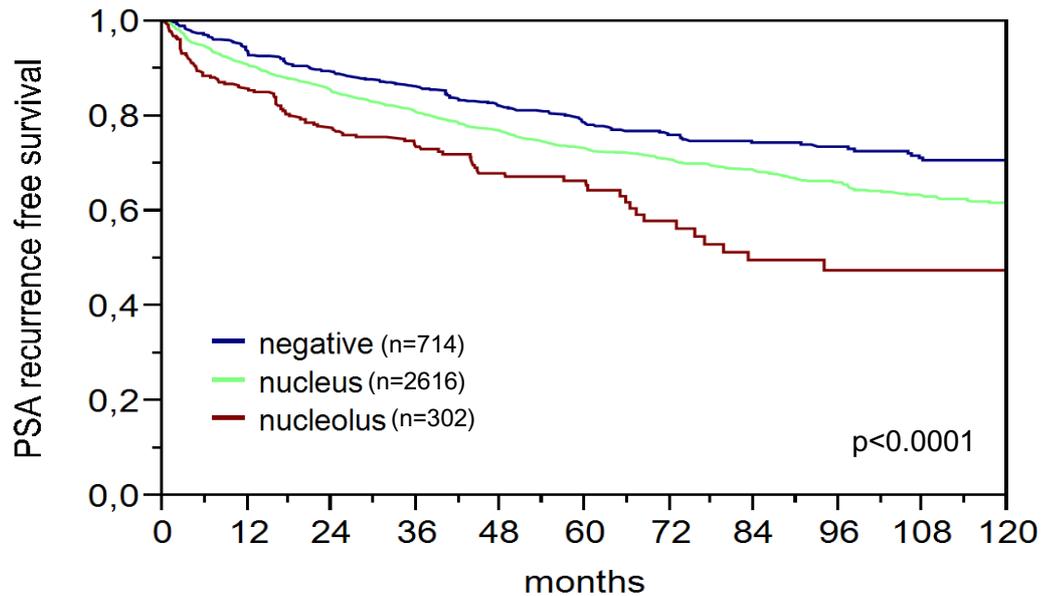


Abb. 13: BCR-freies Überleben ERG- negative Tumore

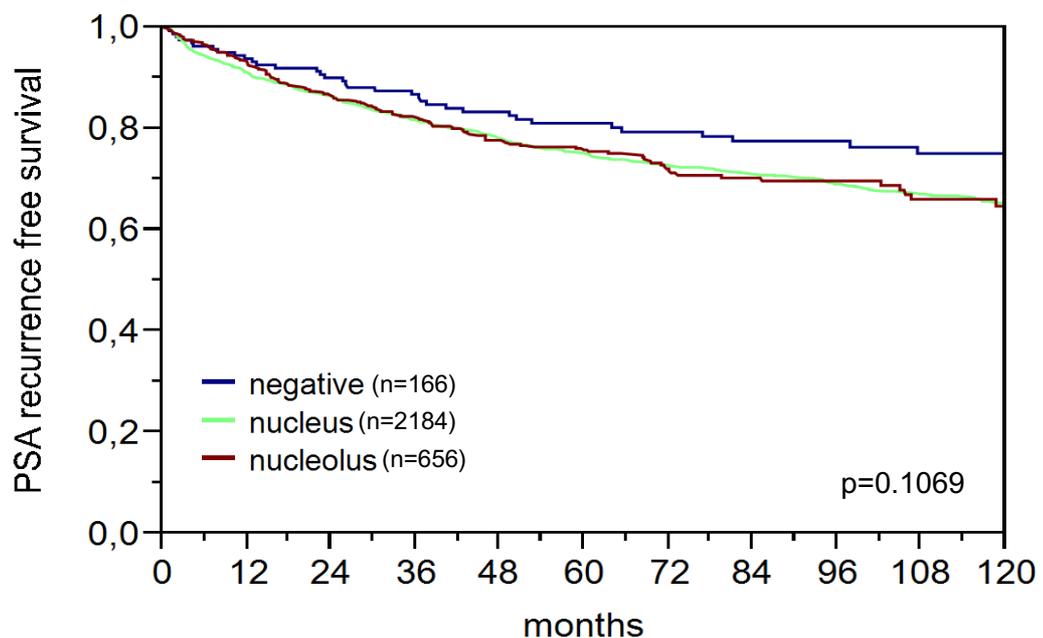


Abb. 14: BCR-freies Überleben ERG- positive Tumore

In der multivariaten Analyse zeigte sich ein signifikanter unabhängiger Vorhersagewert in multivariaten Szenarien mit den Anpassungsvariablen präoperativer PSA- Wert, cT- Stadium, und prä- oder postoperativer Gleason-Score (Tabelle 7). Sofern pT- Status, pN- Status oder R- Status in die multivariate Analyse einbezogen wurden, verlor der DDX21- Status seinen prognostischen Aussagewert.

Tabelle 7: Multivariate Analyse der prognostischen Rolle des DDX21- Status im PCa

Szenario	n	p Wert							
		Präop. PSA	pT Stadium	cT Stadium	Gleason Prostatektomie	Gleason Biopsie	pN Stadium	R Stadium	p Wert
Nr. 1	5923	<0,0001	<0,0001	-	<0,0001	-	<0,0001	<0,0001	0,089
Nr. 2	8976	<0,0001	<0,0001	-	<0,0001	-	-	<0,0001	0,149
Nr. 3	8835	<0,0001	-	<0,0001	<0,0001	-	-	-	0,019
Nr. 4	7729	<0,0001	-	<0,0001	-	<0,0001	-	-	0,0029

5 Diskussion

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass PCa mit nachweisbarer DDX21-Expression aggressiver sind und die Patienten ein früheres BCR erleiden als Patienten ohne nachweisbare DDX21-Expression. Dieser Befund legt nahe, dass die Annahme eines prometastatischen Effektes von DDX21 im von Lange *et al.* vorgeschlagenen mRNA/ miR- Netzwerk der spontanen systemischen Dissemination beim PCa zutrifft. Von Lange *et al.* waren zur Entschlüsselung des Netzwerkes die Genexpression mittels Genchip *microarray* und die Proteinexpression mittels massenspektrometrischer Proteomanalytik in Xenograft-Primärtumoren mit hohem (PC-3), moderatem (VcaP) und niedrigem (DU145) metastatischem Potential verglichen worden. Dabei konnte u.a. gezeigt werden, dass die DDX21-Expression mit steigendem Metastasierungspotential der PCa- Xenograftmodelle zunimmt (Lange *et al.*, 2020). Diese Zunahme könnte durch die gleichzeitige Abnahme von miR- 34 und miR- 16 in dem Interaktionsnetzwerk erklärt werden, da beide miRs die Expression von DDX21 posttranskriptionell regulieren (Kaller *et al.*, 2011, Selbach *et al.*, 2008). Außerdem ist bekannt, dass miR- 34 und miR- 16 *in vitro* die Expression typischer EMT- Transkriptionsfaktoren in Zellen des kolorektalen Karzinoms (Kaller and Hermeking, 2016) sowie des Bronchialkarzinoms (Wang *et al.*, 2018b) hemmen. Passend zur Abnahme von miR-34 und miR-16 waren in dem Netzwerk von Lange *et al.* Marker der EMT in den stärker metastasierenden Xenografts auf Gen- und Proteinexpression erhöht. Üblicherweise erreichen miRNAs diese Inhibition mittels Basenpaarung an einem komplementären mRNA- Strang. Der entsprechende Abschnitt auf der mRNA wird damit für die ribosomale Translation kompetitiv blockiert. Die so markierte mRNA wird anschließend durch 3'- 5'- Exoribonukleasen abgebaut (Valencia-Sanchez *et al.*, 2006). Es lässt sich also vermuten, dass DDX21 funktionell mit der EMT zusammenhängt, was sich auch in der Regulation durch zumindest teilweise gleiche miRs äußert.

Damit DDX21 seine Wirkung als Co- Aktivator der Pol II entfalten kann, muss vorher eine PARP- 1 vermittelte ADP- Ribosylierung erfolgen. ADP- ribosyliertes DDX21 transloziert in den Nukleolus (Kim *et al.*, 2019). Neben der ADP-Ribosylierung von DDX21 spielen PARP eine wichtige Rolle bei der Reparatur von DNA- Einzelstrangbrüchen mittels Basenexzisions-reparatur. Wenn diese Reparatur ausbleibt und auch nicht anderweitig kompensiert wird, entstehen in der Folge Doppelstrangbrüche und es kommt letztlich zum Untergang der Zelle. Der wichtigste Kompensationsmechanismus für eine defekte PARP- vermittelte Einzelstrangreparatur sind die Proteine BRCA1 (Breast Cancer 1, early- onset) und BRCA2. Sie sind kodiert auf den gleichnamigen Genen *BRCA1* und *BRCA2*. Sie sind in der Lage, mittels homologer Rekombination Doppelstrangbrüche zu

reparieren. Für Mammakarzinom- Zellen konnte *in vivo* im Xenograftmodell gezeigt werden, dass die PARP- Inhibition das Tumorwachstum jedoch nicht nur durch die verminderte Einzelstrangreparatur beeinträchtigt, sondern auch durch die Veränderung der DDX21- ADP- Ribosylierung, Translokation von DDX21 in den Nukleolus und rRNA- Konzentration (Kim *et al.*, 2019). Auch wurde DDX21 bereits als potentiell therapeutisches Ziel beim Mammakarzinom diskutiert (Zhang *et al.*, 2014). Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine Depletion von DDX21 die Polymerisation von 18S- rRNA und 28S- rRNA unterdrückt und DDX21 somit auch einen stimulierenden Einfluss auf Pol I haben könnte (Yang *et al.*, 2003, Henning *et al.*, 2003). Außerdem verhindert die DDX21- Depletion die G₁/S-Zellzyklusprogression und induziert einen G₁- Arrest (Holmstrom *et al.*, 2008). Eine PARP- Inhibition ist besonders wirksam, wenn in den Genen *BRCA1* und *BRCA2* eine die Proteinfunktion einschränkende Mutation vorliegt. PARP- Inhibitoren (z.B. Olaparib) werden schon seit einigen Jahren z.B. in der Therapie des Mammakarzinoms eingesetzt. Seit 2020 wird die PARP- Inhibition jedoch auch vermehrt in der Therapie des metastasierten CRPC unter Berücksichtigung des *BRCA*- Mutationsstatus angewandt (Nientiedt *et al.*, 2021). Möglicherweise ist eine PARP- Inhibition im Hinblick auf die Verhinderung der Translokation von DDX21 in den Nukleolus auch beim PCa sinnvoll.

DDX21 ist ein Co- Aktivator des onkogenen Transkriptionsfaktors c- Jun (Gustafson and Wessel, 2010). Zusammen mit c- Fos bildet c- Jun den Transkriptionsfaktor AP- 1. In PCa- Zellen (LNCaP und PC- 3) konnte gezeigt werden, dass c- Jun ein wichtiger Faktor in der Progression des hormon- sensitiven PCa (HSPC) zum CRPC ist. Hier wirkt es im Rahmen einer Signalkaskade zusammen mit den Proteinen N- cadherin und N- myc downstream regulated gene 1 (NDRG1), welches auf dem gleichnamigen Gen kodiert ist. N- cadherin ist ein bedeutendes Transmembranprotein, das Zell- Zell- Kontakte vermittelt und wichtige Funktionen in der EMT vermittelt. Es fördert die Migration und Invasion von Zellen. N- cadherin fördert die Heterodimerisierung von c- Jun und c- Fos zur bereits erwähnten Bildung von AP- 1. AP- 1 bildet einen Komplex mit dem aktivierten AR und besitzt eine höhere Affinität zum *12- O- tetradecanoyl- phorbol- 13- acetate (TPA) response element (TRE)* als zum *androgen response element (ARE)* im Promotor von *NDRG1*. Am TRE wirkt der Komplex in Verbindung mit der DNA Methyltransferase- 1 (DNMT1) durch DNA- Methylierung unterdrückend auf die Transkription des Zielgens *NDRG1*. *NDRG1* hemmt die Expression mesenchymaler Marker (u.a. N- cadherin, Vimentin, Slug, Snail). Der Verlust von *NDRG1* führt also zu einer Verschiebung hin zum mesenchymalen Zustand. Da die Hemmung von N- cadherin durch die unterdrückte *NDRG1*- Expression wegfällt, entsteht ein *circulus vitiosus*: die

N-cadherin/ c- Jun/ NDRG1- Achse (Abb. 15) (Quan *et al.*, 2021). In neuronal differenzierten PC12- Zellen (Phäochromozytomzellen aus dem Nebennierenmark der Ratte) konnte gezeigt werden, dass die Inaktivierung von DDX21 durch Genmutation bzw. durch Mikroinjektion von anti- DDX21- Antikörpern zu einer Inhibition der c- Jun- vermittelten Transkription führt (Fuller-Pace, 2006). Die Depletion von c- Jun führt in HeLa- Zellen *in vitro* zu einer verminderten Translokation von DDX21 in den Nukleolus (Holmstrom *et al.*, 2008).

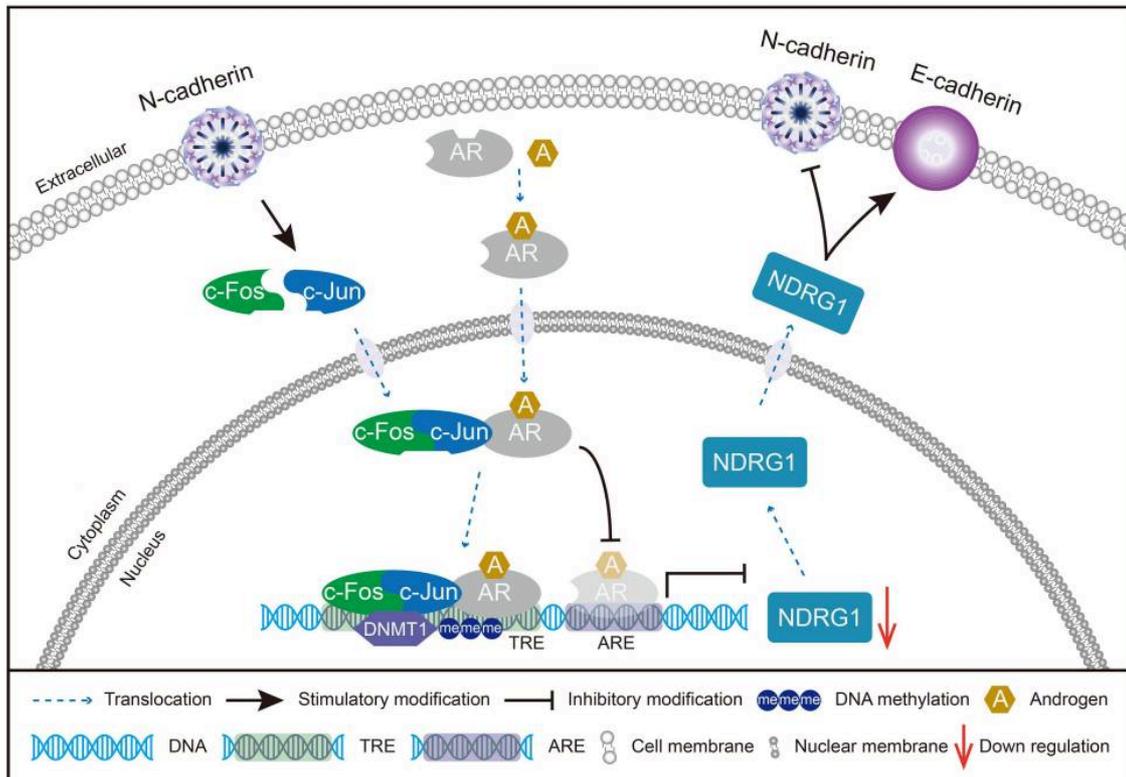


Abb. 15: Modell der N-cadherin/ cJun/ NDRG1- Achse in der Progression des PCa (Quan *et al.*, 2021)

Die Bildung von AP- 1 aus c- Fos und c- Jun wird durch N- cadherin begünstigt. AP- 1 bildet einen Komplex mit dem aktivierten AR und besitzt so eine höhere Affinität zum *TRE* als der aktivierte AR zum *ARE*. Die Transkription von *NDRG1* wird so herunterreguliert, was letztlich in einer vermehrten Expression von N- cadherin resultiert und so einen *circulus vitiosus* in Gang setzt.

Im Interaktionsnetzwerk von Lange *et al.* ist c- Jun übereinstimmend mit DDX21 verändert (Lange *et al.*, 2020). Um die Vermutung zu untermauern, dass DDX21 über die Aktivierung von c- Jun dessen EMT- induzierende Funktion fördern könnte, sind weitere funktionelle

Untersuchungen von DDX21 an PCa-Zelllinien *in vitro* und in Xenograft- Modellen *in vivo* notwendig.

Die deutliche Assoziation von PTEN- Deletion und erhöhter DDX21- Expression könnte mit der vermehrten Aktivität des PI3K/ AKT/ mTOR-Signalweg erklärt werden (Abb. 6). PTEN ist, wie bereits beschrieben, ein bekanntes Tumorsuppressorprotein, das im Normalzustand die Aktivität von AKT reguliert. Beim Wegfall der PTEN- Funktion wird die Phosphorylierung von AKT nicht mehr unterbunden, was zur dauerhaften Aktivierung des folgenden Signalweges führt (Alvarez-Garcia *et al.*, 2019). Ein Zusammenhang des PI3K/ AKT/ mTOR-Signalweges mit der DDX21- Expression oder -funktion ist bislang nicht beschrieben worden. Denkbar wäre, dass im Rahmen der zahlreichen onkogenen Funktionen des Signalweges im PCa (Shorning *et al.*, 2020) u.a. auch die DDX21- Expression gefördert wird. Dieser Zusammenhang bleibt allerdings hypothetisch und muss in weiteren funktionellen Untersuchungen von DDX21 betrachtet werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass der Vergleich der nukleolären mit der nukleären Lokalisation von DDX21 weitere prognostische Relevanz in der Untergruppe der *TMPRSS2:ERG*- negativen PCa- Patienten hat. Offensichtlich beeinflusst nukleoläres DDX21 die PCa-Progression also nur dann besonders, wenn ERG nicht überexprimiert wird. Wie oben bereits erwähnt, führt eine Überexpression von ERG zu erheblich gesteigerter Entdifferenzierung, Migration und Invasion (Tomlins *et al.*, 2007, Tomlins *et al.*, 2008). Allerdings hatte der ERG-Status per se in einer Hamburger Studie an einer Vorgänger-Version desselben TMAs keinerlei prognostische Relevanz (Krohn *et al.*, 2012), sodass unwahrscheinlich ist, dass DDX21 seine prognostische Wirkung wegen eines überlagernden prognostischen Effekts der *TMPRSS2:ERG*-Fusion verliert. Stattdessen muss beachtet werden, dass der Anteil DDX21-negativer Patienten in der Untergruppe ERG-positiver Patienten deutlich reduziert war (5,5% gegenüber 19,6% bei ERG-negativen Patienten). Allein diese geringere Fallzahl limitiert die statistische Signifikanz eines evtl. Effekts. Die Zunahme von Fällen mit insbesondere nukleolärer DDX21-Lokalisation im ERG-positiven Subset lässt sich möglicherweise durch die bekannte Interaktion von ERG mit PARP1 erklären (Brenner *et al.*, 2011). Eine weitere Überlegung ist, dass ERG mit seinem zentralen Einfluss auf die Tumorzellproliferation die funktionellen Effekte von DDX21 überlagert. Die Beziehung zwischen *TMPRSS2:ERG*- Fusion und DDX21 sollte durch weitere Untersuchungen näher beleuchtet werden.

Die Assoziation der vermehrten Expression von DDX21 mit dem Vorliegen einer 3p13- Deletion lässt sich bislang auf Basis der verfügbaren Erkenntnisse nicht funktionell

erklären, da die funktionellen Mechanismen der 3p13- Deletion noch nicht ausreichend entschlüsselt werden konnten. Jedoch scheint im Rahmen der Veränderungen der Tumorzelle hin zur Tumorprogression die Assoziation beider Merkmale plausibel, da sie jeweils mit einer schlechteren Prognose assoziiert sind.

Die Aussagekraft der vorliegenden Arbeit muss in erster Linie angesichts der Auswahl des BCR nach radikaler Prostatektomie als primärem Endpunkt kritisch diskutiert werden. Wie Patienten mit einem BCR weiter behandelt werden sollen, ist Gegenstand kontroverser Diskussionen. Innerhalb von 10 Jahren erleiden 20 – 40 % der Patienten, die sich einer radikalen Prostatektomie unterziehen, ein BCR. Das Auftreten eines BCR hat jedoch nicht zwangsläufig einen Einfluss auf die Lebensqualität des Patienten. Auch lässt es keinen Rückschluss auf das Vorliegen eines rezidierten metastasierten PCa mit klinischer Relevanz zu (Artibani *et al.*, 2018). Auch in Bezug auf das Gesamtüberleben (*overall-survival*, OS) ist die Aussagekraft in Folge des in der Regel erhöhten Patientenalters von > 60 Jahren erheblich eingeschränkt. So zeigt sich in einem Vergleich des OS mit dem Krebs-spezifischen Überleben (*cancer-specific-survival*, CSS), dass das Risiko, am PCa zu versterben, in den ersten 15 Jahren nach Auftreten eines BCR in etwa gleich ist zum Risiko, an anderen Ursachen zu versterben (Abb. 16) (Bianco *et al.*, 2005).

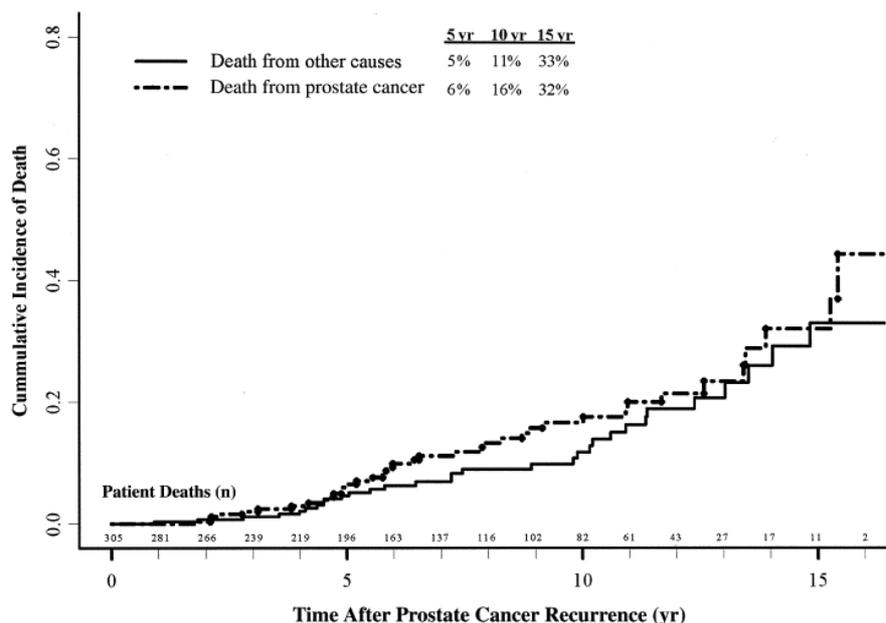


Abb. 16: PCa- spezifische Todesfälle und Todesfälle anderer Ursachen nach Auftreten eines BCR (Bianco *et al.*, 2005)

Das Risiko, nach Auftreten eines BCR am PCa (gestrichelte Linie) zu versterben, ist in den ersten 15 Jahren nach dem Auftreten des BCR etwa gleich dem Risiko, an anderen Ursachen (durchgezogene Linie) zu versterben.

So wurde auch in einer aktuellen Studie am vergrößerten Hamburger Kollektiv deutlich, dass für den Endpunkt des CSS ein hoher Gleason-Score ($\geq 4+4$ vs. $\leq 3+3$) viel bedeutsamer ist (Hazard Ratio (HR): +17.86) als das Vorliegen eines BCR (HR: +4.4) (Oh-Hohenhorst *et al.*, 2022). Auch in Bezug auf die Vorhersage des Metastasen-freien Überlebens (*metastasis-free-survival*, MFS) ist die Aussagekraft des BCR umstritten. Wie von Boorjian *et al.* gezeigt werden konnte, sind 75,8% der Patienten, die sich einer radikalen Prostatektomie, also einer kurativ intendierten, lokalen Therapie unterzogen, noch 15 Jahre nach Auftreten eines BCR frei von Metastasen (Abb. 17) (Boorjian *et al.*, 2011). Trotzdem ist das BCR kein irrelevanter Marker, tritt es doch regelhaft als notwendiges Durchgangsstadium, vor einer weiteren Progression zum metastatischen Rezidiv des PCa auf und erhöht somit das Risiko einer weiteren Progression (Pound *et al.*, 1999, Boorjian *et al.*, 2011, Artibani *et al.*, 2018). Dies zeigt sich auch in den Daten der Arbeitsgruppe am Hamburger Kollektiv, in dem der Einfluss des BCR auf das MFS zusätzlich vom R-Status abhängt. Bei R0-resezierten Patienten erhöht sich das Risiko für ein postoperatives Auftreten von Metastasen bei Vorliegen eines BCR sehr deutlich gegenüber Patienten ohne BCR (HR: +264). Dieser Effekt wird bei einem Tumorbefall des Resektionsrandes (R1) klar abgeschwächt (HR: +12.85) (Oh-Hohenhorst *et al.*, 2022). Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass das BCR als Surrogatmarker für das MFS oder das CSS kritisch betrachtet werden muss und in Anbetracht des in der Regel erhöhten Patientenalters insbesondere nicht als Surrogatmarker für das OS dienen kann. Es liefert jedoch einen Hinweis darauf, ob ein PCa grundsätzlich die Gefahr einer weiteren Progression in sich birgt. Die Identifikation weiterer Marker, die die Progression vom BCR zum metastasierten PCa-Rezidiv prognostizieren, ist ein unerlässlicher Schritt für die Aussagekraft des BCR in Bezug auf das MFS und das CSS und damit auch die klinische Relevanz der Ergebnisse von Studien, die sich, wie die vorliegende Arbeit, des BCR als primärem Endpunkt bedienen.

Aus den Befunden zu den vielfältigen Funktionen von DDX21 lässt sich ableiten, dass DDX21 als Co-Faktor für die Aktivierung von Pol II, aber auch als Co-Aktivator von c-Jun eine zentrale Rolle in der Progression des PCa spielt. Ebenso kann aus den Befunden aus dem Tiermodell eine prometastatische Funktion angenommen werden. Hieraus ergibt sich die Schlussfolgerung, dass eine wirksame Inhibition der DDX21-Aktivität eine verminderte Fähigkeit zur Zellteilung, Migration und Invasion von *TMPRSS2:ERG*-negativen PCa-Zellen zur Folge haben könnte. Einschränkend muss festgehalten werden, dass zahlreiche der zitierten Befunde nicht an PCa-Zellen erhoben wurden. Dies sollte in weiteren Untersuchungen erfolgen. Ebenso wenig kann aufgrund der extremen Heterogenität des PCa angenommen werden, dass eine DDX21-Inhibition einen vollständigen Verlust dieser

prometastatischen Eigenschaften der PCa- Zelle bewirken kann. Nichtsdestotrotz ergibt sich die Vermutung, dass eine DDX21-gerichtete Therapie vorteilhaft für Patienten mit hoher DDX21-Expression sein könnte.

6 Zusammenfassung

Hintergrund: Das PCa ist die häufigste Krebserkrankung des Mannes in der westlichen Welt (Torre *et al.*, 2015). Die Prävalenz nimmt mit steigendem Lebensalter zu (Sakr *et al.*, 1994). Die meisten PCa-Erkrankungen nehmen einen klinisch unauffälligen Verlauf. Trotzdem ist das PCa die dritthäufigste Krebstodesursache bei Männern (Thompson and Tangen, 2012) und 90% der Krebs-bedingten Todesfälle sind durch Metastasen verursacht. Das größte Problem ist die schlechte Vorhersagbarkeit der PCa- Progression bis hin zur Metastasierung. Trotz insgesamt guter Prognose steigt die Rate radikaler Therapieansätze gegenüber dem konservativen Management der Erkrankung kontinuierlich an, so dass von einer Überdiagnostik und Übertherapie der Erkrankung in der westlichen Welt ausgegangen werden muss (Grozescu and Popa, 2017). Die Verbesserung der Vorhersagbarkeit des klinischen Verlaufs ist also zentral zur Vermeidung der Übertherapie. Insbesondere der Identifikation neuer molekularbiologischer Marker der Progression wird dabei zentrale Bedeutung zugesprochen. Ein solcher Marker könnte die DEAD-box RNA Helikase DDX21 sein, die bereits im PCa- Xenograftmodell als Teil eines prometastatischen Interaktionsnetzwerkes identifiziert werden konnte (Lange *et al.*, 2020).

Zielsetzung: In der vorliegenden Arbeit sollten folgende Fragen beantwortet werden: (1) Ist die Proteinexpression/ -lokalisierung von DDX21 mit einem besonders aggressiven Tumorphänotypen in Bezug auf präoperatives PSA, pT- Stadium, cT- Stadium, Gleason-Score, pN- Stadium sowie R- Status assoziiert? (2) Ist die Proteinexpression/ -lokalisierung von DDX21 mit bestimmten genomischen Aberrationen, wie *TMPRSS2:ERG*- Fusion, 10q23-, 5q21- und 3p13- Deletion vergesellschaftet? (3) Kommt der Proteinexpression/ -lokalisierung von DDX21 in den o.g. unterschiedlichen molekularen PCa- Subtypen auch eine unterschiedliche prognostische Bedeutung zu?

Methoden: Die Untersuchungen wurden an einem PCa-TMA mit 17.753 Proben von Patienten durchgeführt, die sich an der Martini-Klinik Hamburg im Zeitraum von 1992 bis 2015 einer radikalen Prostatektomie unterzogen hatten. Der PSA- Wert der Patienten wurde präoperativ, postoperativ und anschließend im Abstand von 3 Monaten im ersten Jahr gemessen, gefolgt von halbjährlichen Messungen im zweiten Jahr und jährlichen Messungen nach dem dritten Jahr. Postoperative PSA- Werte über 0,2 ng/ml wurden als BCR definiert. Die Patientenproben wurden immunhistochemisch auf die DDX21- Expression hin untersucht. Die Auswertung der Färbung wurde nach Auftreten und Lokalisation der Immunreaktivität (negativ, nukleär, nukleolär) eingeteilt. Die statistische Korrelation der Färberesultate mit den klinischen, histopathologischen und molekularen

Daten erfolgte anschließend durch Prof. Dr. G. Sauter und Mitarbeiter, die über ein entsprechendes Ethikvotum der Ärztekammer Hamburg verfügen.

Ergebnisse: Es konnte gezeigt werden, dass Patienten mit DDX21-positiven Tumoren einen aggressiveren Tumorphänotypen aufweisen als Patienten mit DDX21-negativen Tumoren. Dabei wurde ebenfalls gezeigt, dass die Aggressivität des Phänotyps (pT- Stadium, Gleason-Score, Vorliegen von Lymphknotenmetastasen und PSA- Wert, alle $p < 0,0001$, R- Status $p < 0,05$) mit dem Expressionsmuster von negativ über nukleär zu nukleolär zunimmt. In der Untergruppe der *TMPRSS2:ERG*-fusion (ERG)-positiven Tumore zeigte sich gegenüber den ERG- negativen Tumore eine deutliche Zunahme der nukleolären Expression von DDX21 zu Lasten der DDX21- negativen Fälle ($p < 0,0001$). In der Gruppe der Patienten mit PTEN- Deletion (10q23del) zeigte sich gegenüber der Gruppe mit normalem PTEN- Status ebenfalls eine Häufung der Fälle mit nukleolärer DDX21 Expression zu Lasten der Fälle ohne nachweisbare DDX21- Expression ($p < 0,0001$). Bei Betrachtung eines Beobachtungszeitraumes von 10 Jahren ($n = 9073$) prognostizierte der DDX21- Status (negativ vs. nukleär vs. nukleolär) ein geringeres BCR- freies Überleben bei Patienten mit nachweisbarer DDX21- Expression ($p < 0,0001$). Dieser Effekt beruhte hauptsächlich auf der Untergruppe der ERG- negativen Patienten, in der ein nukleolärer DDX21-Nachweis mit einer besonders schlechten Prognose einherging ($p < 0,0001$). In der multivariaten Analyse zeigte sich ein unabhängiger Vorhersagewert in multivariaten Szenarien mit den Anpassungsvariablen präoperativer PSA- Wert, cT- Stadium, und prä- oder postoperativer Gleason- Score.

Diskussion: Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass DDX21- positive PCa aggressiver sind als DDX21- negative PCa und die Patienten frühere BCR erleiden. Dieser Befund legt nahe, dass die Hypothese eines prometastatischen Effektes von DDX21 im von Lange *et al.* vorgeschlagenen Interaktionsnetzwerk der systemischen Disseminierung zutrifft. Dieser Effekt kann mit vielfältigen Funktionen von DDX21 als Co-Faktor der Ribosomenbiogenese und als Co- Aktivator onkogener Transkriptionsfaktoren wie c-Jun erklärt werden. Damit könnte DDX21 eine aktivierende Rolle innerhalb der 2021 von Quan *et al.* beschriebenen N- cadherin/ c- Jun/ NDRG1- Achse zukommen, die wiederum einen Faktor bei der Progression des HSPC hin zum CRPC darstellt (Quan *et al.*, 2021). Da DDX21 v.a. nukleolär wirkt, ist es bedeutsam zu beachten, dass die Translokation von DDX21 in den Nukleolus einer PARP- vermittelten ADP- Ribosylierung bedarf. Basierend auf diesem Mechanismus kann die Hypothese aufgestellt werden, dass DDX21- positive PCa- Patienten von einer therapeutischen PARP- Inhibition profitieren könnten.

Limitationen: Limitationen der o.g. Ergebnisse und Schlussfolgerungen ergeben sich aus der Tatsache, dass bis dato die meisten Versuche zu den Funktionen von DDX21 lediglich *in vitro* und häufig in Zellen anderer Tumorentitäten durchgeführt wurden. Weitere Untersuchungen an PCa- Zelllinien und -Xenograftmodellen sind also zur Validierung der vorgeschlagenen Rolle von DDX21 in der Progression des PCa unerlässlich. Eine Limitation der prognostischen Bedeutung ergibt sich aus dem BCR als primärem Endpunkt, welches nur bedingt als Surrogatmarker für MFS oder CSS dienen kann.

7 Abstract

Background: PCa is the most common malignancy in men in the western world (Torre *et al.*, 2015). The prevalence increases with age (Sakr *et al.*, 1994). Although most PCa take a clinically inapparent course, PCa is the third leading cause of cancer death in men (Thompson and Tangen, 2012) with distant metastases accounting for 90% of these deaths. The biggest problem is the poor predictability of PCa progression and metastasis. Although PCa patients face a good prognosis in general, the rate of radical therapeutic approaches is constantly increasing compared to conservative management of PCa. Overdiagnosis and overtreatment of PCa in the western world must be assumed (Grozescu and Popa, 2017). Therefore, improving the predictability of PCa progression is important to reduce overtreatment. In particular, the identification of new molecular markers of progression seems to serve this purpose. The DEAD-box RNA helicase DDX21, already identified as part of a pro-metastatic interaction network in PCa xenograft models (Lange *et al.*, 2020) could represent one of this markers.

Aim: The present study aimed to answer the following questions: (1) Is the protein expression/ localization of DDX21 associated with an aggressive tumor phenotype, defined by preoperative PSA value, pT stage, cT stage, Gleason score, pN stage and R stage? (2) Is the protein expression/ localization of DDX21 associated with certain genomic aberrations, such as *TMPRSS2:ERG* fusion, 10q23, 5q21 and 3p13 deletion? (3) Does the protein expression/ localization of DDX21 in the above-mentioned different molecular PCa subtypes also have different prognostic significance?

Methods: The investigations were conducted on a PCa TMA with samples from 17,753 patients who had undergone radical prostatectomy at the Martini-Klinik in Hamburg between 1992 and 2015. PSA levels were measured preoperatively, postoperatively, and then every 3 months in the first year, followed by semi-annual measurements in the second year and annual measurements after the third year. Postoperative PSA levels above 0.2 ng/ml were defined as BCR. The samples were analyzed for DDX21 expression using immunohistochemistry. The evaluation of the staining was classified according to the occurrence and localization of the immunoreactivity (negative, nuclear, nucleolar). The statistical correlation of the results with the clinical, histopathological, and molecular data was then conducted by Prof. Dr. G. Sauter and his colleagues according to the vote of the ethics committee of the Ärztekammer Hamburg.

Results: It could be demonstrated that patients with DDX21-positive tumors suffered from more aggressive tumor phenotypes than patients with DDX21-negative tumors. The aggressiveness of the phenotype (pT stage, Gleason score, presence of lymph node

metastases and PSA value, all $p < 0.0001$, R status $p < 0.05$) increased with the expression pattern from negative to nuclear to nucleolar. In the subset of ERG- positive tumors or PTEN- deleted tumors there was a distinct increase in the nucleolar expression of DDX21 compared to ERG- negative tumors or tumors with normal PTEN- status respectively ($p < 0.0001$).

During the 10- year observation period ($n = 9,073$), the DDX21- status (negative vs. nuclear vs. nucleolar) predicted a lower BCR-free survival in patients with detectable DDX21 expression ($p < 0.0001$). This effect was mainly based on the subset of ERG-negative tumors in which nucleolar localization of DDX21 was associated with a particularly poor prognosis ($p < 0.0001$). The multivariate analysis, showed an independent predictive value with the adjustment variables preoperative PSA value, cT stage, and preoperative or postoperative Gleason score.

Discussion: The present work shows that DDX21- positive PCa are more aggressive than DDX21- negative PCa and that patients with detectable DDX21 expression suffer from earlier BCR. These findings indicate that the hypothesis of a pro-metastatic effect of DDX21, which was derived from a pro-metastatic interaction network based on PCa xenograft models by Lange *et al.*, is correct and has translational relevance. This effect can be explained by the multiple functions of DDX21 as a co-factor in ribosome biogenesis and as a co- activator of oncogenic transcription factors such as c-Jun. Thus, DDX21 could play an activating role within the N-cadherin/ c- Jun/ NDRG1- axis, proposed by Quan *et al.* in 2021, which seems to be a driver in the progression of HSPC to CRPC (Quan *et al.*, 2021). Since DDX21 unfolds its effects in the nucleolus, it is an important notion that the translocation of DDX21 requires PARP- mediated ADP- ribosylation. Based on this mechanism and the present observations, it can be hypothesized that DDX21- positive PCa patients could benefit from therapeutic PARP inhibition.

Limitations: Limitations of the results and conclusions above arise from the fact that most experiments on the functions of DDX21 have only been conducted *in vitro* and often in cells of different tumor entities. Further studies on PCa cell lines and xenograft models are therefore essential to validate the proposed role of DDX21 in PCa progression. A limitation of the prognostic importance arises from BCR as primary endpoint, which can only serve to a limited extent as a surrogate marker for MFS or CSS.

Literatur

- AMBOSS GmbH. 2021. Prostata, Bläschendrüse und Cowper-Drüse. [Online im Internet]
URL: <https://next.amboss.com/de/article/dp0ooS?q=prostata#Zbe4c359b1c5a9b39d7c8301e11f263ef>. [Stand: 08.05.2021, 17:49].
- AWMF, DEUTSCHE KREBSGESELLSCHAFT, DEUTSCHE KREBSHILFE.
S3-Leitlinie Prostatakarzinom. Langversion 6.2. 2021. AWMF-Registernummer:
043/022OL. https://www.leitlinienprogramm.onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Prostatakarzinom/Version_6/LL_Prostatakarzinom_Langversion_6.2.pdf. [Stand: 08.11.2021, 11:06].
- ALVAREZ-GARCIA, V., TAWIL, Y., WISE, H. M. & LESLIE, N. R. 2019. Mechanisms of PTEN loss in cancer: It's all about diversity. *Semin Cancer Biol*, 59, 66-79.
- ANTONARAKIS, E. S., LU, C., WANG, H., LUBER, B., NAKAZAWA, M., ROESER, J. C., CHEN, Y., MOHAMMAD, T. A., CHEN, Y., FEDOR, H. L., LOTAN, T. L., ZHENG, Q., DE MARZO, A. M., ISAACS, J. T., ISAACS, W. B., NADAL, R., PALLER, C. J., DENMEADE, S. R., CARDUCCI, M. A., EISENBERGER, M. A. & LUO, J. 2014. AR-V7 and resistance to enzalutamide and abiraterone in prostate cancer. *N Engl J Med*, 371, 1028-38.
- ARGAUD, D., BOULANGER, M. C., CHIGNON, A., MKANNEZ, G. & MATHIEU, P. 2019. Enhancer-mediated enrichment of interacting JMJD3-DDX21 to ENPP2 locus prevents R-loop formation and promotes transcription. *Nucleic Acids Res*, 47, 8424-8438.
- ARMSTRONG, A. J., SZMULEWITZ, R. Z., PETRYLAK, D. P., HOLZBEIERLEIN, J., VILLERS, A., AZAD, A., ALCARAZ, A., ALEKSEEV, B., IGUCHI, T., SHORE, N. D., ROSBROOK, B., SUGG, J., BARON, B., CHEN, L. & STENZL, A. 2019. ARCHES: A Randomized, Phase III Study of Androgen Deprivation Therapy With Enzalutamide or Placebo in Men With Metastatic Hormone-Sensitive Prostate Cancer. *J Clin Oncol*, 37, 2974-2986.
- ARTIBANI, W., PORCARO, A. B., DE MARCO, V., CERRUTO, M. A. & SIRACUSANO, S. 2018. Management of Biochemical Recurrence after Primary Curative Treatment for Prostate Cancer: A Review. *Urol Int*, 100, 251-262.
- BECKENDORF, V., GUERIF, S., LE PRISE, E., COSSET, J. M., BOUGNOUX, A., CHAUVET, B., SALEM, N., CHAPET, O., BOURDAIN, S., BACHAUD, J. M., MAINGON, P., HANNOUN-LEVI, J. M., MALISSARD, L., SIMON, J. M., POMMIER, P., HAY, M., DUBRAY, B., LAGRANGE, J. L., LUPORSI, E. & BEY, P. 2011. 70 Gy versus 80 Gy in localized prostate cancer: 5-year results of GETUG 06 randomized trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 80, 1056-63.

- BIANCO, F. J., JR., SCARDINO, P. T. & EASTHAM, J. A. 2005. Radical prostatectomy: long-term cancer control and recovery of sexual and urinary function ("trifecta"). *Urology*, 66, 83-94.
- BOORJIAN, S. A., THOMPSON, R. H., TOLLEFSON, M. K., RANGEL, L. J., BERGSTRALH, E. J., BLUTE, M. L. & KARNES, R. J. 2011. Long-term risk of clinical progression after biochemical recurrence following radical prostatectomy: the impact of time from surgery to recurrence. *Eur Urol*, 59, 893-9.
- BRENNER, J. C., ATEEQ, B., LI, Y., YOCUM, A. K., CAO, Q., ASANGANI, I. A., PATEL, S., WANG, X., LIANG, H., YU, J., PALANISAMY, N., SIDDIQUI, J., YAN, W., CAO, X., MEHRA, R., SABOLCH, A., BASRUR, V., LONIGRO, R. J., YANG, J., TOMLINS, S. A., MAHER, C. A., ELENITOBA-JOHNSON, K. S., HUSSAIN, M., NAVONE, N. M., PIENTA, K. J., VARAMBALLY, S., FENG, F. Y. & CHINNAIYAN, A. M. 2011. Mechanistic rationale for inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in ETS gene fusion-positive prostate cancer. *Cancer Cell*, 19, 664-78.
- BURKHARDT, L., FUCHS, S., KROHN, A., MASSER, S., MADER, M., KLUTH, M., BACHMANN, F., HULAND, H., STEUBER, T., GRAEFEN, M., SCHLOMM, T., MINNER, S., SAUTER, G., SIRMA, H. & SIMON, R. 2013. CHD1 is a 5q21 tumor suppressor required for ERG rearrangement in prostate cancer. *Cancer Res*, 73, 2795-805.
- CALO, E., FLYNN, R. A., MARTIN, L., SPITALE, R. C., CHANG, H. Y. & WYSOCKA, J. 2015. RNA helicase DDX21 coordinates transcription and ribosomal RNA processing. *Nature*, 518, 249-53.
- CAO, J., WU, N., HAN, Y., HOU, Q., ZHAO, Y., PAN, Y., XIE, X. & CHEN, F. 2018. DDX21 promotes gastric cancer proliferation by regulating cell cycle. *Biochem Biophys Res Commun*, 505, 1189-1194.
- CHANDRASEKAR, T., YANG, J. C., GAO, A. C. & EVANS, C. P. 2015. Mechanisms of resistance in castration-resistant prostate cancer (CRPC). *Transl Androl Urol*, 4, 365-80.
- CHI, K. N., AGARWAL, N., BJARTELL, A., CHUNG, B. H., PEREIRA DE SANTANA GOMES, A. J., GIVEN, R., JUAREZ SOTO, A., MERSEBURGER, A. S., OZGUROGLU, M., UEMURA, H., YE, D., DEPRINCE, K., NAINI, V., LI, J., CHENG, S., YU, M. K., ZHANG, K., LARSEN, J. S., MCCARTHY, S., CHOWDHURY, S. & INVESTIGATORS, T. 2019. Apalutamide for Metastatic, Castration-Sensitive Prostate Cancer. *N Engl J Med*, 381, 13-24.
- DEBRUYNE, F. M. 1988. Results of a Dutch trial with the LHRH agonist buserelin in patients with metastatic prostatic cancer and results of EORTC studies in prostatic cancer. *Am J Clin Oncol*, 11 Suppl 1, S33-5.

- DIJKMAN, G. A., DEBRUYNE, F. M., FERNANDEZ DEL MORAL, P., PLASMAN, J. W., HOEFAKKER, J. W., IDEMA, J. G. & SYKES, M. 1995. A randomised trial comparing the safety and efficacy of the Zoladex 10.8-mg depot, administered every 12 weeks, to that of the Zoladex 3.6-mg depot, administered every 4 weeks, in patients with advanced prostate cancer. The Dutch South East Cooperative Urological Group. *Eur Urol*, 27, 43-6.
- EPSTEIN, J. I., EGEVAD, L., AMIN, M. B., DELAHUNT, B., SRIGLEY, J. R., HUMPHREY, P. A. & GRADING, C. 2016. The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma: Definition of Grading Patterns and Proposal for a New Grading System. *Am J Surg Pathol*, 40, 244-52.
- EPSTEIN, J. I., FENG, Z., TROCK, B. J. & PIERORAZIO, P. M. 2012. Upgrading and downgrading of prostate cancer from biopsy to radical prostatectomy: incidence and predictive factors using the modified Gleason grading system and factoring in tertiary grades. *Eur Urol*, 61, 1019-24.
- FALLER, A., SCHUENKE, M. & SCHUENKE, G. 2008. *Der Körper des Menschen*, Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
- FIDLER, I. J. 2003. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*, 3, 453-8.
- FIZAZI, K., SHORE, N., TAMMELA, T. L., ULYS, A., VJATERS, E., POLYAKOV, S., JIEVALTAS, M., LUZ, M., ALEKSEEV, B., KUSS, I., LE BERRE, M. A., PETRENCIUC, O., SNAPIR, A., SARAPOHJA, T., SMITH, M. R. & INVESTIGATORS, A. 2020. Nonmetastatic, Castration-Resistant Prostate Cancer and Survival with Darolutamide. *N Engl J Med*, 383, 1040-1049.
- FIZAZI, K., TRAN, N., FEIN, L., MATSUBARA, N., RODRIGUEZ-ANTOLIN, A., ALEKSEEV, B. Y., OZGUROGLU, M., YE, D., FEYERABEND, S., PROTHEROE, A., SULUR, G., LUNA, Y., LI, S., MUNDLE, S. & CHI, K. N. 2019. Abiraterone acetate plus prednisone in patients with newly diagnosed high-risk metastatic castration-sensitive prostate cancer (LATITUDE): final overall survival analysis of a randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet Oncol*, 20, 686-700.
- FULLER-PACE, F. V. 2006. DExD/H box RNA helicases: multifunctional proteins with important roles in transcriptional regulation. *Nucleic Acids Res*, 34, 4206-15.
- GASPAR-MAIA, A., ALAJEM, A., POLESSO, F., SRIDHARAN, R., MASON, M. J., HEIDERSBACH, A., RAMALHO-SANTOS, J., MCMANUS, M. T., PLATH, K., MESHORER, E. & RAMALHO-SANTOS, M. 2009. Chd1 regulates open chromatin and pluripotency of embryonic stem cells. *Nature*, 460, 863-8.

- GLEASON, D. F. 1992. Histologic grading of prostate cancer: a perspective. *Hum Pathol*, 23, 273-9.
- GROZESCU, T. & POPA, F. 2017. Prostate cancer between prognosis and adequate/proper therapy. *J Med Life*, 10, 5-12.
- GUSTAFSON, E. A. & WESSEL, G. M. 2010. DEAD-box helicases: posttranslational regulation and function. *Biochem Biophys Res Commun*, 395, 1-6.
- HADDADI, N., LIN, Y., TRAVIS, G., SIMPSON, A. M., NASSIF, N. T. & MCGOWAN, E. M. 2018. PTEN/PTENP1: 'Regulating the regulator of RTK-dependent PI3K/Akt signalling', new targets for cancer therapy. *Mol Cancer*, 17, 37.
- HAGLIND, E., CARLSSON, S., STRANNE, J., WALLERSTEDT, A., WILDERANG, U., THORSTEINSDOTTIR, T., LAGERKVIST, M., DAMBER, J. E., BJARTELL, A., HUGOSSON, J., WIKLUND, P., STEINECK, G. & COMMITTEE, L. S. 2015. Urinary Incontinence and Erectile Dysfunction After Robotic Versus Open Radical Prostatectomy: A Prospective, Controlled, Nonrandomised Trial. *Eur Urol*, 68, 216-25.
- HARNDEN, P., SHELLEY, M. D., COLES, B., STAFFURTH, J. & MASON, M. D. 2007. Should the Gleason grading system for prostate cancer be modified to account for high-grade tertiary components? A systematic review and meta-analysis. *Lancet Oncol*, 8, 411-9.
- HEIDEGGER, I., TSAUR, I., BORGMANN, H., SURCEL, C., KRETSCHMER, A., MATHIEU, R., VISSCHERE, P., VALERIO, M., VAN DEN BERGH, R. C. N., OST, P., TILKI, D., GANDAGLIA, G., PLOUSSARD, G. & PARTY, E.-Y. P. C. W. 2019. Hereditary prostate cancer - Primetime for genetic testing? *Cancer Treat Rev*, 81, 101927.
- HENNING, D., SO, R. B., JIN, R., LAU, L. F. & VALDEZ, B. C. 2003. Silencing of RNA helicase II/Gualpha inhibits mammalian ribosomal RNA production. *J Biol Chem*, 278, 52307-14.
- HIRAI, Y., LOUVET, E., ODA, T., KUMETA, M., WATANABE, Y., HORIGOME, T. & TAKEYASU, K. 2013. Nucleolar scaffold protein, WDR46, determines the granular compartmental localization of nucleolin and DDX21. *Genes Cells*, 18, 780-97.
- HOLLANDER, M. C., BLUMENTHAL, G. M. & DENNIS, P. A. 2011. PTEN loss in the continuum of common cancers, rare syndromes and mouse models. *Nat Rev Cancer*, 11, 289-301.
- HOLMSTROM, T. H., MIALON, A., KALLIO, M., NYMALM, Y., MANNERMAA, L., HOLM, T., JOHANSSON, H., BLACK, E., GILLESPIE, D., SALMINEN, T. A., LANGEL, U., VALDEZ, B. C. & WESTERMARCK, J. 2008. c-Jun supports ribosomal RNA

- processing and nucleolar localization of RNA helicase DDX21. *J Biol Chem*, 283, 7046-53.
- IVERSEN, P., MCLEOD, D. G., SEE, W. A., MORRIS, T., ARMSTRONG, J., WIRTH, M. P. & CASODEX EARLY PROSTATE CANCER TRIALISTS, G. 2010. Antiandrogen monotherapy in patients with localized or locally advanced prostate cancer: final results from the bicalutamide Early Prostate Cancer programme at a median follow-up of 9.7 years. *BJU Int*, 105, 1074-81.
- JOHANSSON, J. A., MARIE, K. L., LU, Y., BROMBIN, A., SANTORIELLO, C., ZENG, Z., ZICH, J., GAUTIER, P., VON KRIEGSHEIM, A., BRUNSDON, H., WHEELER, A. P., DREGER, M., HOUSTON, D. R., DOOLEY, C. M., SIMS, A. H., BUSCH-NENTWICH, E. M., ZON, L. I., ILLINGWORTH, R. S. & PATTON, E. E. 2020. PRL3-DDX21 Transcriptional Control of Endolysosomal Genes Restricts Melanocyte Stem Cell Differentiation. *Dev Cell*, 54, 317-332 e9.
- KALLER, M. & HERMEKING, H. 2016. Interplay Between Transcription Factors and MicroRNAs Regulating Epithelial-Mesenchymal Transitions in Colorectal Cancer. *Adv Exp Med Biol*, 937, 71-92.
- KALLER, M., LIFFERS, S. T., OELJEKLAUS, S., KUHLMANN, K., ROH, S., HOFFMANN, R., WARSCHEID, B. & HERMEKING, H. 2011. Genome-wide characterization of miR-34a induced changes in protein and mRNA expression by a combined pulsed SILAC and microarray analysis. *Mol Cell Proteomics*, 10, M111 010462.
- KALLURI, R. & WEINBERG, R. A. 2009. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*, 119, 1420-8.
- KIM, D. S., CAMACHO, C. V., NAGARI, A., MALLADI, V. S., CHALLA, S. & KRAUS, W. L. 2019. Activation of PARP-1 by snoRNAs Controls Ribosome Biogenesis and Cell Growth via the RNA Helicase DDX21. *Mol Cell*, 75, 1270-1285 e14.
- KLOTZ, L., BOCCON-GIBOD, L., SHORE, N. D., ANDREOU, C., PERSSON, B. E., CANTOR, P., JENSEN, J. K., OLESEN, T. K. & SCHRODER, F. H. 2008. The efficacy and safety of degarelix: a 12-month, comparative, randomized, open-label, parallel-group phase III study in patients with prostate cancer. *BJU Int*, 102, 1531-8.
- KLUTH, M., AL KILANI, Z., OZDEN, C., HUSSEIN, K., FROGH, S., MOLLER-KOOP, C., BURANDT, E., STEURER, S., BUSCHECK, F., JACOBSEN, F., LUEBKE, A. M., MINNER, S., TSOURLAKIS, M. C., HOEFLMAYER, D., WITTMER, C., SCHLOMM, T., SAUTER, G., SIMON, R. & WILCZAK, W. 2019. 5q21 deletion is often heterogeneous in prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, 58, 509-515.

- KLUTH, M., HESSE, J., HEINL, A., KROHN, A., STEURER, S., SIRMA, H., SIMON, R., MAYER, P. S., SCHUMACHER, U., GRUPP, K., IZBICKI, J. R., PANTEL, K., DIKOMEY, E., KORBEL, J. O., PLASS, C., SAUTER, G., SCHLOMM, T. & MINNER, S. 2013. Genomic deletion of MAP3K7 at 6q12-22 is associated with early PSA recurrence in prostate cancer and absence of TMPRSS2:ERG fusions. *Mod Pathol*, 26, 975-83.
- KLUTH, M., MEYER, D., KROHN, A., FREUDENTHALER, F., BAUER, M., SALOMON, G., HEINZER, H., MICHL, U., STEURER, S., SIMON, R., SAUTER, G., SCHLOMM, T. & MINNER, S. 2016. Heterogeneity and chronology of 6q15 deletion and ERG-fusion in prostate cancer. *Oncotarget*, 7, 3897-904.
- KLUTH, M., VOLTA, H., HUSSEIN, M., TASKIN, B., FROGH, S., MOLLER-KOOP, C., BUSCHECK, F., JACOBSEN, F., TSOURLAKIS, M. C., LUBKE, A. M., HINSCH, A., CLAUDITZ, T., GRAEFEN, M., HEINZER, H., HULAND, H., MINNER, S., SAUTER, G., WILCZAK, W., SCHLOMM, T. & SIMON, R. 2018. Deletion of 3p13 is a late event linked to progression of TMPRSS2:ERG fusion prostate cancer. *Cancer Manag Res*, 10, 5909-5917.
- KONONEN, J., BUBENDORF, L., KALLIONIEMI, A., BARLUND, M., SCHRAML, P., LEIGHTON, S., TORHORST, J., MIHATSCH, M. J., SAUTER, G. & KALLIONIEMI, O. P. 1998. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*, 4, 844-7.
- KROHN, A., DIEDLER, T., BURKHARDT, L., MAYER, P. S., DE SILVA, C., MEYER-KORNBLUM, M., KOTSCHAU, D., TENNSTEDT, P., HUANG, J., GERHAUSER, C., MADER, M., KURTZ, S., SIRMA, H., SAAD, F., STEUBER, T., GRAEFEN, M., PLASS, C., SAUTER, G., SIMON, R., MINNER, S. & SCHLOMM, T. 2012. 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*, 181, 401-12.
- KROHN, A., SEIDEL, A., BURKHARDT, L., BACHMANN, F., MADER, M., GRUPP, K., EICHENAUER, T., BECKER, A., ADAM, M., GRAEFEN, M., HULAND, H., KURTZ, S., STEURER, S., TSOURLAKIS, M. C., MINNER, S., MICHL, U., SCHLOMM, T., SAUTER, G., SIMON, R. & SIRMA, H. 2013. Recurrent deletion of 3p13 targets multiple tumour suppressor genes and defines a distinct subgroup of aggressive ERG fusion-positive prostate cancers. *J Pathol*, 231, 130-41.
- KUBAN, D. A., LEVY, L. B., CHEUNG, M. R., LEE, A. K., CHOI, S., FRANK, S. & POLLACK, A. 2011. Long-term failure patterns and survival in a randomized dose-escalation trial for prostate cancer. Who dies of disease? *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 79, 1310-7.

- KWELDAM, C. F., VAN LEENDERS, G. J. & VAN DER KWAST, T. 2019. Grading of prostate cancer: a work in progress. *Histopathology*, 74, 146-160.
- LABBE, D. P. & BROWN, M. 2018. Transcriptional Regulation in Prostate Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 8.
- LANGE, T., SAMATOV, T. R., GALATENKO, V. V., STEFFEN, P., VON KRIEGSTEIN, H., SPETHMANN, T., WICKLEIN, D., MAAR, H., KUPFERNAGEL, K., LABITZKY, V., HANIKA, S., STARZONEK, S., AHLERS, A. K., RIECKEN, K., SIMON, R., POLONSKI, A., SAUTER, G., SCHLOMM, T., HULAND, H., JOHNSEN, S. A., SCHLUTER, H., TONEVITSKY, A. G. & SCHUMACHER, U. 2020. Xenograft-derived mRNA/miR and protein interaction networks of systemic dissemination in human prostate cancer. *Eur J Cancer*, 137, 93-107.
- LANGE, T., ULLRICH, S., MULLER, I., NENTWICH, M. F., STUBKE, K., FELDHAUS, S., KNIES, C., HELLWINKEL, O. J., VESSELLA, R. L., ABRAMJUK, C., ANDERS, M., SCHRODER-SCHWARZ, J., SCHLOMM, T., HULAND, H., SAUTER, G. & SCHUMACHER, U. 2012. Human prostate cancer in a clinically relevant xenograft mouse model: identification of beta(1,6)-branched oligosaccharides as a marker of tumor progression. *Clin Cancer Res*, 18, 1364-73.
- LATINI, J. M., RIEGER-CHRIST, K. M., WANG, D. S., SILVERMAN, M. L., LIBERTINO, J. A. & SUMMERHAYES, I. C. 2001. Loss of heterozygosity and microsatellite instability at chromosomal sites 1Q and 10Q in morphologically distinct regions of late stage prostate lesions. *J Urol*, 166, 1931-6.
- LAWTON, C. A., WINTER, K., MURRAY, K., MACHTAY, M., MESIC, J. B., HANKS, G. E., COUGHLIN, C. T. & PILEPICH, M. V. 2001. Updated results of the phase III Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) trial 85-31 evaluating the potential benefit of androgen suppression following standard radiation therapy for unfavorable prognosis carcinoma of the prostate. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 49, 937-46.
- LEARY, D. J. & HUANG, S. 2001. Regulation of ribosome biogenesis within the nucleolus. *FEBS Lett*, 509, 145-50.
- LI, J., YEN, C., LIAW, D., PODSYPANINA, K., BOSE, S., WANG, S. I., PUC, J., MILIAREISIS, C., RODGERS, L., MCCOMBIE, R., BIGNER, S. H., GIOVANELLA, B. C., ITTMANN, M., TYCKO, B., HIBSHOOSH, H., WIGLER, M. H. & PARSONS, R. 1997. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science*, 275, 1943-7.
- LITWIN, M. S. & TAN, H. J. 2017. The Diagnosis and Treatment of Prostate Cancer: A Review. *JAMA*, 317, 2532-2542.

- MAITLAND, N. J., FRAME, F. M., RANE, J. K., ERB, H. H., PACKER, J. R., ARCHER, L. K. & PELLACANI, D. 2019. Resolution of Cellular Heterogeneity in Human Prostate Cancers: Implications for Diagnosis and Treatment. *Adv Exp Med Biol*, 1164, 207-224.
- MARCAIDA, M. J., KAUZLARIC, A., DUPERREX, A., SULZLE, J., MONCRIEFFE, M. C., ADEBAJO, D., MANLEY, S., TRONO, D. & DAL PERARO, M. 2020. The Human RNA Helicase DDX21 Presents a Dimerization Interface Necessary for Helicase Activity. *iScience*, 23, 101811.
- MCRAE, E. K. S., DUPAS, S. J., BOOY, E. P., PIRAGASAM, R. S., FAHLMAN, R. P. & MCKENNA, S. A. 2020. An RNA guanine quadruplex regulated pathway to TRAIL-sensitization by DDX21. *RNA*, 26, 44-57.
- MINNER, S., GARTNER, M., FREUDENTHALER, F., BAUER, M., KLUTH, M., SALOMON, G., HEINZER, H., GRAEFEN, M., BOKEMEYER, C., SIMON, R., SAUTER, G., SCHLOMM, T. & WILCZAK, W. 2013. Marked heterogeneity of ERG expression in large primary prostate cancers. *Mod Pathol*, 26, 106-16.
- MOLINARI, F. & FRATTINI, M. 2013. Functions and Regulation of the PTEN Gene in Colorectal Cancer. *Front Oncol*, 3, 326.
- MOTTET, N., BELLMUNT, J., BOLLA, M., BRIERS, E., CUMBERBATCH, M. G., DE SANTIS, M., FOSSATI, N., GROSS, T., HENRY, A. M., JONIAU, S., LAM, T. B., MASON, M. D., MATVEEV, V. B., MOLDOVAN, P. C., VAN DEN BERGH, R. C. N., VAN DEN BROECK, T., VAN DER POEL, H. G., VAN DER KWAST, T. H., ROUVIERE, O., SCHOOTS, I. G., WIEGEL, T. & CORNFORD, P. 2017. EAU-ESTRO-SIOG Guidelines on Prostate Cancer. Part 1: Screening, Diagnosis, and Local Treatment with Curative Intent. *Eur Urol*, 71, 618-629.
- MUNJAL, A. & LESLIE, S. W. 2021. Gleason Score. *StatPearls*. Treasure Island (FL).
- NAGRATH, S., SEQUIST, L. V., MAHESWARAN, S., BELL, D. W., IRIMIA, D., ULKUS, L., SMITH, M. R., KWAK, E. L., DIGUMARTHY, S., MUZIKANSKY, A., RYAN, P., BALIS, U. J., TOMPKINS, R. G., HABER, D. A. & TONER, M. 2007. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature*, 450, 1235-9.
- NIENTIEDT, C., DUENSING, A., ZSCHABITZ, S., JAGER, D., HOHENFELLNER, M., STENZINGER, A. & DUENSING, S. 2021. PARP inhibition in prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, 60, 344-351.
- NIETO, M. A., HUANG, R. Y., JACKSON, R. A. & THIERY, J. P. 2016. Emt: 2016. *Cell*, 166, 21-45.
- OH-HOENHORST, S. J., TILKI, D., AHLERS, A. K., SULING, A., HAHN, O., TENNSTEDT, P., MATUSZCAK, C., MAAR, H., LABITZKY, V., HANIKA, S.,

- STARZONEK, S., BAUMGART, S., JOHNSEN, S. A., KLUTH, M., SIRMA, H., SIMON, R., SAUTER, G., HULAND, H., SCHUMACHER, U. & LANGE, T. 2022. CHD1 loss negatively influences metastasis-free survival in R0-resected prostate cancer patients and promotes spontaneous metastasis in vivo. *Cancer Gene Ther*, 29, 49-61.
- PANER, G. P., STADLER, W. M., HANSEL, D. E., MONTIRONI, R., LIN, D. W. & AMIN, M. B. 2018. Updates in the Eighth Edition of the Tumor-Node-Metastasis Staging Classification for Urologic Cancers. *Eur Urol*, 73, 560-569.
- POLURI, R. T. K. & AUDET-WALSH, E. 2018. Genomic Deletion at 10q23 in Prostate Cancer: More Than PTEN Loss? *Front Oncol*, 8, 246.
- POUND, C. R., PARTIN, A. W., EISENBERGER, M. A., CHAN, D. W., PEARSON, J. D. & WALSH, P. C. 1999. Natural history of progression after PSA elevation following radical prostatectomy. *JAMA*, 281, 1591-7.
- QUAN, Y., ZHANG, X., BUTLER, W., DU, Z., WANG, M., LIU, Y. & PING, H. 2021. The role of N-cadherin/c-Jun/NDRG1 axis in the progression of prostate cancer. *Int J Biol Sci*, 17, 3288-3304.
- ROBERT-KOCH-INSTITUT 2017. *Krebs in Deutschland für 2013/2014*, Berlin, Robert-Koch-Institut.
- RODRIGUES, L. U., RIDER, L., NIETO, C., ROMERO, L., KARIMPOUR-FARD, A., LODA, M., LUCIA, M. S., WU, M., SHI, L., CIMIC, A., SIRINTRAPUN, S. J., NOLLEY, R., PAC, C., CHEN, H., PEEHL, D. M., XU, J., LIU, W., COSTELLO, J. C. & CRAMER, S. D. 2015. Coordinate loss of MAP3K7 and CHD1 promotes aggressive prostate cancer. *Cancer Res*, 75, 1021-34.
- RYAN, C. J., SMITH, M. R., DE BONO, J. S., MOLINA, A., LOGOTHETIS, C. J., DE SOUZA, P., FIZAZI, K., MAINWARING, P., PIULATS, J. M., NG, S., CARLES, J., MULDER, P. F., BASCH, E., SMALL, E. J., SAAD, F., SCHRIJVERS, D., VAN POPPEL, H., MUKHERJEE, S. D., SUTTMANN, H., GERRITSEN, W. R., FLAIG, T. W., GEORGE, D. J., YU, E. Y., EFSTATHIOU, E., PANTUCK, A., WINQUIST, E., HIGANO, C. S., TAPLIN, M. E., PARK, Y., KHEOH, T., GRIFFIN, T., SCHER, H. I., RATHKOPF, D. E. & INVESTIGATORS, C.-A.-. 2013. Abiraterone in metastatic prostate cancer without previous chemotherapy. *N Engl J Med*, 368, 138-48.
- SAKR, W. A., GRIGNON, D. J., CRISSMAN, J. D., HEILBRUN, L. K., CASSIN, B. J., PONTES, J. J. & HAAS, G. P. 1994. High grade prostatic intraepithelial neoplasia (HGPIN) and prostatic adenocarcinoma between the ages of 20-69: an autopsy study of 249 cases. *In Vivo*, 8, 439-43.

- SANTORIELLO, C., SPORRIJ, A., YANG, S., FLYNN, R. A., HENRIQUES, T., DORJSUREN, B., CUSTO GREIG, E., MCCALL, W., STANHOPE, M. E., FAZIO, M., SUPERDOCK, M., LICHTIG, A., ADATTO, I., ABRAHAM, B. J., KALOCSAY, M., JURYNEC, M., ZHOU, Y., ADELMAN, K., CALO, E. & ZON, L. I. 2020. RNA helicase DDX21 mediates nucleotide stress responses in neural crest and melanoma cells. *Nat Cell Biol*, 22, 372-379.
- SCHEBLE, V. J., BRAUN, M., BEROUKHIM, R., MERMEL, C. H., RUIZ, C., WILBERTZ, T., STIEDL, A. C., PETERSEN, K., REISCHL, M., KUEFER, R., SCHILLING, D., FEND, F., KRISTIANSEN, G., MEYERSON, M., RUBIN, M. A., BUBENDORF, L. & PERNER, S. 2010. ERG rearrangement is specific to prostate cancer and does not occur in any other common tumor. *Mod Pathol*, 23, 1061-7.
- SCHLOMM, T., IWERS, L., KIRSTEIN, P., JESSEN, B., KOLLERMANN, J., MINNER, S., PASSOW-DROLET, A., MIRLACHER, M., MILDE-LANGOSCH, K., GRAEFEN, M., HAESE, A., STEUBER, T., SIMON, R., HULAND, H., SAUTER, G. & ERBERSDOBLER, A. 2008. Clinical significance of p53 alterations in surgically treated prostate cancers. *Mod Pathol*, 21, 1371-8.
- SCHLOMM, T. & SAUTER, G. 2016. Gleason-Score: Status 2016. *Deutsches Ärzteblatt*, 33-34/2016, 14-17.
- SCHUENKE, M., SCHULTE, E. & SCHUMACHER, U. 2015. *Prometheus LernAtlas der Anatomie Innere Organe*, Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
- SELBACH, M., SCHWANHAUSSER, B., THIERFELDER, N., FANG, Z., KHANIN, R. & RAJEWSKY, N. 2008. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature*, 455, 58-63.
- SHEN, M. M. & ABATE-SHEN, C. 2010. Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges. *Genes Dev*, 24, 1967-2000.
- SHORE, N. D., SAAD, F., COOKSON, M. S., GEORGE, D. J., SALTZSTEIN, D. R., TUTRONE, R., AKAZA, H., BOSSI, A., VAN VEENHUYZEN, D. F., SELBY, B., FAN, X., KANG, V., WALLING, J., TOMBAL, B. & INVESTIGATORS, H. S. 2020. Oral Relugolix for Androgen-Deprivation Therapy in Advanced Prostate Cancer. *N Engl J Med*, 382, 2187-2196.
- SHORNING, B. Y., DASS, M. S., SMALLEY, M. J. & PEARSON, H. B. 2020. The PI3K-AKT-mTOR Pathway and Prostate Cancer: At the Crossroads of AR, MAPK, and WNT Signaling. *Int J Mol Sci*, 21.
- SLOAN, K. E., LEISEGANG, M. S., DOEBELE, C., RAMIREZ, A. S., SIMM, S., SAFFERTHAL, C., KRETSCHMER, J., SCHORGE, T., MARKOUTSA, S., HAAG, S., KARAS, M., EBERSBERGER, I., SCHLEIFF, E., WATKINS, N. J. & BOHNSACK, M. T. 2015. The association of late-acting snoRNPs with human pre-

- ribosomal complexes requires the RNA helicase DDX21. *Nucleic Acids Res*, 43, 553-64.
- SMITH, M. R., SAAD, F., CHOWDHURY, S., OUDARD, S., HADASCHIK, B. A., GRAFF, J. N., OLMOS, D., MAINWARING, P. N., LEE, J. Y., UEMURA, H., LOPEZ-GITLITZ, A., TRUDEL, G. C., ESPINA, B. M., SHU, Y., PARK, Y. C., RACKOFF, W. R., YU, M. K., SMALL, E. J. & INVESTIGATORS, S. 2018. Apalutamide Treatment and Metastasis-free Survival in Prostate Cancer. *N Engl J Med*, 378, 1408-1418.
- SONG, C., HOTZ-WAGENBLATT, A., VOIT, R. & GRUMMT, I. 2017. SIRT7 and the DEAD-box helicase DDX21 cooperate to resolve genomic R loops and safeguard genome stability. *Genes Dev*, 31, 1370-1381.
- STAMBOLIC, V., SUZUKI, A., DE LA POMPA, J. L., BROTHERS, G. M., MIRTSOS, C., SASAKI, T., RULAND, J., PENNINGER, J. M., SIDEROVSKI, D. P. & MAK, T. W. 1998. Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell*, 95, 29-39.
- STREICHER, J., MEYERSON, B. L., KARIVEDU, V. & SIDANA, A. 2019. A review of optimal prostate biopsy: indications and techniques. *Ther Adv Urol*, 11, 1756287219870074.
- SUHAIL, Y., CAIN, M. P., VANAJA, K., KURYWCHAK, P. A., LEVCHENKO, A., KALLURI, R. & KSHITIZ 2019. Systems Biology of Cancer Metastasis. *Cell Syst*, 9, 109-127.
- TANAKA, A., WANG, J. Y., SHIA, J., ZHOU, Y., OGAWA, M., HENDRICKSON, R. C., KLIMSTRA, D. S. & ROEHL, M. H. 2020. DEAD-box RNA helicase protein DDX21 as a prognosis marker for early stage colorectal cancer with microsatellite instability. *Sci Rep*, 10, 22085.
- THOMPSON, I. M., JR. & TANGEN, C. M. 2012. Prostate cancer--uncertainty and a way forward. *N Engl J Med*, 367, 270-1.
- TOMLINS, S. A., LAXMAN, B., DHANASEKARAN, S. M., HELGESON, B. E., CAO, X., MORRIS, D. S., MENON, A., JING, X., CAO, Q., HAN, B., YU, J., WANG, L., MONTIE, J. E., RUBIN, M. A., PIENTA, K. J., ROULSTON, D., SHAH, R. B., VARAMBALLY, S., MEHRA, R. & CHINNAIYAN, A. M. 2007. Distinct classes of chromosomal rearrangements create oncogenic ETS gene fusions in prostate cancer. *Nature*, 448, 595-9.
- TOMLINS, S. A., LAXMAN, B., VARAMBALLY, S., CAO, X., YU, J., HELGESON, B. E., CAO, Q., PRENSNER, J. R., RUBIN, M. A., SHAH, R. B., MEHRA, R. & CHINNAIYAN, A. M. 2008. Role of the TMPRSS2-ERG gene fusion in prostate cancer. *Neoplasia*, 10, 177-88.

- TOMLINS, S. A., RHODES, D. R., PERNER, S., DHANASEKARAN, S. M., MEHRA, R., SUN, X. W., VARAMBALLY, S., CAO, X., TCHINDA, J., KUEFER, R., LEE, C., MONTIE, J. E., SHAH, R. B., PIENTA, K. J., RUBIN, M. A. & CHINNAIYAN, A. M. 2005. Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science*, 310, 644-8.
- TORRE, L. A., BRAY, F., SIEGEL, R. L., FERLAY, J., LORTET-TIEULENT, J. & JEMAL, A. 2015. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*, 65, 87-108.
- VALDEZ, B. C., YANG, H., HONG, E. & SEQUITIN, A. M. 2002. Genomic structure of newly identified paralogue of RNA helicase II/Gu: detection of pseudogenes and multiple alternatively spliced mRNAs. *Gene*, 284, 53-61.
- VALENCIA-SANCHEZ, M. A., LIU, J., HANNON, G. J. & PARKER, R. 2006. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes Dev*, 20, 515-24.
- VISAKORPI, T., HYYTINEN, E., KOIVISTO, P., TANNER, M., KEINANEN, R., PALMBERG, C., PALOTIE, A., TAMMELA, T., ISOLA, J. & KALLIONIEMI, O. P. 1995. In vivo amplification of the androgen receptor gene and progression of human prostate cancer. *Nat Genet*, 9, 401-6.
- WANG, G., ZHAO, D., SPRING, D. J. & DEPINHO, R. A. 2018a. Genetics and biology of prostate cancer. *Genes Dev*, 32, 1105-1140.
- WANG, H., ZHANG, Y., WU, Q., WANG, Y. B. & WANG, W. 2018b. miR-16 mimics inhibit TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition via activation of autophagy in non-small cell lung carcinoma cells. *Oncol Rep*, 39, 247-254.
- WANG, S., GAO, J., LEI, Q., ROZENGURT, N., PRITCHARD, C., JIAO, J., THOMAS, G. V., LI, G., ROY-BURMAN, P., NELSON, P. S., LIU, X. & WU, H. 2003. Prostate-specific deletion of the murine Pten tumor suppressor gene leads to metastatic prostate cancer. *Cancer Cell*, 4, 209-21.
- WANG, X., WU, Z., QIN, W., SUN, T., LU, S., LI, Y., WANG, Y., HU, X., XU, D., WU, Y., CHEN, Q., YAO, W., LIU, M., WEI, M. & WU, H. 2020. Long non-coding RNA ZFAS1 promotes colorectal cancer tumorigenesis and development through DDX21-POLR1B regulatory axis. *Aging (Albany NY)*, 12, 22656-22687.
- WASHINO, S., RIDER, L. C., ROMERO, L., JILLSON, L. K., AFFANDI, T., OHM, A. M., LAM, E. T., REYLAND, M. E., COSTELLO, J. C. & CRAMER, S. D. 2019. Loss of MAP3K7 Sensitizes Prostate Cancer Cells to CDK1/2 Inhibition and DNA Damage by Disrupting Homologous Recombination. *Mol Cancer Res*, 17, 1985-1998.
- WELSCH, U., DELLER, T. & KUMMER, W. 2014. *Lehrbuch Histologie*, München, Elsevier Urban & Fischer Verlag.

- WHANG, Y. E., WU, X., SUZUKI, H., REITER, R. E., TRAN, C., VESSELLA, R. L., SAID, J. W., ISAACS, W. B. & SAWYERS, C. L. 1998. Inactivation of the tumor suppressor PTEN/MMAC1 in advanced human prostate cancer through loss of expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 5246-50.
- WU, M., SHI, L., CIMIC, A., ROMERO, L., SUI, G., LEES, C. J., CLINE, J. M., SEALS, D. F., SIRINTRAPUN, J. S., MCCOY, T. P., LIU, W., KIM, J. W., HAWKINS, G. A., PEEHL, D. M., XU, J. & CRAMER, S. D. 2012. Suppression of Tak1 promotes prostate tumorigenesis. *Cancer Res*, 72, 2833-43.
- WU, X., SENECHAL, K., NESHAT, M. S., WHANG, Y. E. & SAWYERS, C. L. 1998. The PTEN/MMAC1 tumor suppressor phosphatase functions as a negative regulator of the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 15587-91.
- XING, Y. H., YAO, R. W., ZHANG, Y., GUO, C. J., JIANG, S., XU, G., DONG, R., YANG, L. & CHEN, L. L. 2017. SLERT Regulates DDX21 Rings Associated with Pol I Transcription. *Cell*, 169, 664-678 e16.
- YADAV, S. S., STOCKERT, J. A., HACKERT, V., YADAV, K. K. & TEWARI, A. K. 2018. Intratumor heterogeneity in prostate cancer. *Urol Oncol*, 36, 349-360.
- YANG, H., ZHOU, J., OCHS, R. L., HENNING, D., JIN, R. & VALDEZ, B. C. 2003. Down-regulation of RNA helicase II/Gu results in the depletion of 18 and 28 S rRNAs in *Xenopus* oocyte. *J Biol Chem*, 278, 38847-59.
- YU, J., YU, J., MANI, R. S., CAO, Q., BRENNER, C. J., CAO, X., WANG, X., WU, L., LI, J., HU, M., GONG, Y., CHENG, H., LAXMAN, B., VELLAICHAMY, A., SHANKAR, S., LI, Y., DHANASEKARAN, S. M., MOREY, R., BARRETTE, T., LONIGRO, R. J., TOMLINS, S. A., VARAMBALLY, S., QIN, Z. S. & CHINNAIYAN, A. M. 2010. An integrated network of androgen receptor, polycomb, and TMPRSS2-ERG gene fusions in prostate cancer progression. *Cancer Cell*, 17, 443-54.
- ZHANG, H., ZHANG, Y., CHEN, C., ZHU, X., ZHANG, C., XIA, Y., ZHAO, Y., ANDRISANI, O. M. & KONG, L. 2018. A double-negative feedback loop between DEAD-box protein DDX21 and Snail regulates epithelial-mesenchymal transition and metastasis in breast cancer. *Cancer Lett*, 437, 67-78.
- ZHANG, Y., BAYSAC, K. C., YEE, L. F., SAPORITA, A. J. & WEBER, J. D. 2014. Elevated DDX21 regulates c-Jun activity and rRNA processing in human breast cancers. *Breast Cancer Res*, 16, 449.
- ZIETMAN, A. L., BAE, K., SLATER, J. D., SHIPLEY, W. U., EFSTATHIOU, J. A., COEN, J. J., BUSH, D. A., LUNT, M., SPIEGEL, D. Y., SKOWRONSKI, R., JABOLA, B. R. & ROSSI, C. J. 2010. Randomized trial comparing conventional-dose with high-dose conformal radiation therapy in early-stage adenocarcinoma of the prostate:

long-term results from proton radiation oncology group/american college of radiology 95-09. *J Clin Oncol*, 28, 1106-11.

Danksagung

Mein Dank gilt allen, die mich bei der Erstellung dieser Dissertation unterstützt haben.

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Tobias Lange danke ich für die Überlassung des Forschungsthemas und die exzellente Betreuung durch den gesamten Prozess. Die nahezu ständige Verfügbarkeit auch an Wochenenden und Feiertagen und über den Lehrstuhlwechsel hinaus, sowie die rechtzeitige Navigation aus Sackgassen heraus, haben mir das Erstellen dieser Arbeit unendlich erleichtert.

Prof. Dr. Udo Schumacher danke ich für das Interesse an meiner Arbeit und damit verbundene Anregungen und konstruktive Kritik, sowie für kleinere und größere Ratschläge bezüglich der Experimente.

Prof. Dr. Guido Sauter, Prof. Dr. Markus Graefen und Prof. Dr. Ronald Simon danke ich für die Bereitstellung der Patientenproben und die statistische Auswertung der Daten.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Anatomie und Experimentelle Morphologie danke ich für die kollegiale Arbeitsatmosphäre und praktische Hilfestellung bei der Durchführung der Experimente. Insbesondere Jennifer Schröder-Schwarz, Tobias Gosau und Christine Knies danke ich für die Einarbeitung und technische Assistenz im Labor, ohne die mir die Erstellung dieser Arbeit überhaupt nicht möglich gewesen wäre.

Meinen Eltern, Geschwistern und ganz besonders meiner Frau gebührt mein besonderer Dank für die stets positive und ermutigende Unterstützung während des Medizinstudiums und der Erstellung dieser Dissertation und meines gesamten Weges.

Lebenslauf

Name	von Kriegstein
Vorname	Helge
Geburtsdatum und -ort	21.06.1988 in Frankfurt am Main
Seit 01/2023	Assistenzarzt in der Martiniklinik am UKE, Hamburg
01/2022 – 10/2022	Assistenzarzt in der Urologie im Elbeklinikum Stade
11/2021	Ärztliche Approbation
10/2015 – 11/2021	Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg
2012 – 2015	Gesundheits- und Krankenpfleger in verschiedenen Hamburger Krankenhäusern
09/2012	Examen zum Gesundheits- und Krankenpfleger
10/2009 – 09/2012	Ausbildung zum Gesundheits- und Krankenpfleger in Frankfurt am Main
10/2008 – 03/2009	Studium der Rechtswissenschaften an der Universität Konstanz
2007 – 2008	Zivildienst im Bürgerhospital Frankfurt am Main
06/2007	Abitur an der Freien Waldorfschule Frankfurt am Main

Eidesstattliche Erklärung

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

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen 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.

A handwritten signature in black ink, reading "Helge von Kriegstein". The signature is written in a cursive, flowing style.

Helge von Kriegstein

Hamburg, den 26.02.2023