

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Pathologie
Sektion Molekularpathologie

Direktor: Prof. Dr. med. Guido Sauter

Dissertation unter der Anleitung von PD Dr. rer. nat. Ronald Simon

Prävalenz und klinische Signifikanz von TPD52-Gen-Amplifikationen im humanen Prostatakarzinom

Dissertation

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

vorgelegt von:

Julia Carolin Rohwer
aus Bad Segeberg

Hamburg 2012

Angenommen von der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 02.11.2012

Veröffentlicht mit Genehmigung der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. G. Sauter

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD Dr. C. Mühlhausen

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: PD Dr. F. Chun

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
1.1	Das Prostatakarzinom	1
1.1.1	Ätiologie und Risikofaktoren.....	1
1.1.2	Pathologie und Stadieneinteilung	2
1.1.3	Klinik und Diagnostik.....	6
1.1.4	Therapiemöglichkeiten	7
1.2	Molekulare Veränderungen beim Prostatakarzinom	9
1.2.1	Hereditäres Prostatakarzinom	9
1.2.2	Sporadisches Prostatakarzinom	9
1.3	TPD52 – Stand der Forschung.....	12
1.3.1	Das Gen, seine Expression und seine Genprodukte.....	12
1.3.2	Das onkogene Potential von TPD52	13
1.3.3	Bedeutung von TPD52 in malignen Neoplasien.....	14
1.3.4	TPD52 als mögliches Therapieziel	15
1.4	Ziel dieser Arbeit	16
2	Material und Methoden	17
2.1	Gewebekollektiv	17
2.1.1	Der Hamburger Prostate Cancer Prognosis-Array.....	17
2.1.2	Der Hamburger Prostate Progression-Array	19
2.2	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH).....	20
2.2.1	Kultivierung des TPD52-spezifischen Escherichia coli-Klons.....	21
2.2.2	DNA-Extraktion aus der Escherichia coli-Kultur.....	21
2.2.3	DIG-Nick-Translation zur Sondenherstellung.....	23
2.2.4	Entparaffinierung und proteolytische Vorbehandlung der Gewebeschnitte	24
2.2.5	Hybridisierung	25
2.2.6	Waschen.....	26
2.2.7	Fluoreszenz-Detektion	26
2.2.8	Auswertung am Fluoreszenzmikroskop.....	28
2.3	Statistische Berechnungen	29

3	Ergebnisse	30
3.1	TPD52-Gen-Amplifikationen im humanen Prostatakarzinom	30
3.2	Assoziation zu klinisch-pathologischen Parametern	31
3.3	Assoziation zur Patientenprognose	33
3.4	Weitere Assoziationen	35
3.4.1	Assoziation zum p53-Status.....	35
3.4.2	Assoziation zum Ki-67 labeling index.....	36
3.4.3	Assoziation zum MYC-Status.....	37
3.5	TPD52-Gen-Amplifikationen in nicht-malignen Veränderungen und unterschiedlichen Progressionsstadien des Prostatakarzinoms.....	39
4	Diskussion	40
5	Zusammenfassung	45
6	Abkürzungsverzeichnis	46
7	Literaturverzeichnis	49
8	Danksagung	53
9	Lebenslauf	54
10	Eidesstattliche Erklärung	55

1 EINLEITUNG

1.1 Das Prostatakarzinom

Das Prostatakarzinom ist das am häufigsten diagnostizierte Malignom bei Männern in den Industrienationen und steht bei den zum Tode führenden Krebserkrankungen des Mannes nach dem Bronchialkarzinom und dem kolorektalen Karzinom an dritter Stelle. Allein 2008 starben weltweit 258.400 Männer an dieser Erkrankung [1]. Etwa 50.000 neue Fälle werden pro Jahr in Deutschland entdeckt [2] und in der Martiniklinik am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf werden jährlich fast 2.000 radikale Prostatektomien durchgeführt [3]. Während der letzten Jahrzehnte ist die Fallzahl kontinuierlich gestiegen, zum Teil bedingt durch eine höhere Lebenserwartung [4]. Autopsiestudien zufolge ist die Prävalenz des Prostatakarzinoms noch weitaus größer: Bei 64% der Männer in der 7. Lebensdekade wurde ein zumeist mikroskopisch kleines, gut differenziertes Adenokarzinom der Prostata entdeckt. Trotz hoher Prävalenz dieser „latenten“ Prostatakarzinome liegt das Risiko, ein klinisch relevantes Karzinom zu entwickeln, bei lediglich 9%. Mit gegenwärtig zur Verfügung stehenden Mitteln der Früherkennung sind die klinisch insignifikanten Tumoren nicht sicher von solchen mit schlechter Prognose zu unterscheiden [5].

1.1.1 Ätiologie und Risikofaktoren

Obwohl John Adams das Prostatakarzinom bereits 1853 erstmals beschrieb [6], ist dessen kausale Pathogenese bislang ungeklärt; man geht von einem multifaktoriellen Geschehen aus. Da sich für nahezu alle untersuchten Parameter in der Literatur ein uneinheitliches Bild findet, ist zur Zeit keine sichere Form der Prävention möglich [5].

Vergleichbar mit dem Kolon- und Mammakarzinom findet sich auch beim Prostatakarzinom eine familiäre Häufung von Karzinomfällen. Bis zu 20% der Fälle in der Gesamtpopulation können als familiäres Prostatakarzinom angesehen werden [7]. Als Subgruppe hiervon zeichnen sich die hereditären Prostatakarzinome ab, welche – durch strengere Einschlusskriterien charakterisiert – etwa 5-10% aller Prostatakarzinome und dabei einen überproportional großen Anteil bei jüngeren Patienten ausmachen. Das Alter stellt den höchsten Risikofaktor für die Entwicklung eines Prostatakarzinoms dar. Vor dem 40. Lebensjahr tritt es nur ausgesprochen selten auf, mit zunehmendem Patientenalter steigt die Inzidenz rapide an [5]. Einer der etabliertesten Risikofaktoren ist die ethnische Herkunft. Die jährliche Inzidenz pro 100.000 Einwohner bewegt sich zwischen 1,3 in China, 3,4 in

Japan, 30 in Deutschland, 60 bei weißen und 95 bei farbigen US-Amerikanern [2]. Da die Inzidenz des Prostatakarzinoms bei Einwanderern aus Ländern mit niedrigem Risiko in Länder mit hohem Risiko ansteigt, scheinen auch Lebensgewohnheiten wie beispielsweise Essgewohnheiten und Umweltfaktoren das Prostatakarzinomwachstum zu beeinflussen [8]. Die zentrale Rolle der Androgene auf die Prostata und deren Karzinogenese ist bekannt, der genaue Mechanismus jedoch unklar. Ob allein Testosteron oder etwa eine hormonelle Unausgewogenheit die Karzinogenese initiiert bzw. fördert und ob die Serumandrogenkonzentration auch die androgene Aktivität auf Gewebeebene widerspiegelt, konnte bisher nicht geklärt werden [5]. Sicher ist, dass beispielsweise Eunuchen (vor Einsetzen der Pubertät kastrierte Männer) diese Tumorentität nicht entwickeln [9]. Wie bei zahlreichen anderen Krebserkrankungen wird auch bei der Pathogenese des Prostatakarzinoms die Beteiligung von Entzündungsprozessen bzw. Infektionen diskutiert. Während häufigem Ejakulieren ein protektiver Effekt zugesprochen wird, scheinen Syphilis, Gonorrhö, Papillomaviren oder das Zytomegalievirus in der Anamnese das Risiko für Prostatakrebs zu erhöhen [10].

1.1.2 Pathologie und Stadieneinteilung

Nach McNeal lassen sich vier unterschiedliche Zonen in der Prostata definieren: 90% aller Prostatakarzinome treten in dem zum Rektum hin gelegenen Teil der peripheren Zone auf. Die übrigen entstehen meist in der zentral gelegenen sogenannten Übergangszone, aus der sich auch die benigne Prostatahyperplasie (BPH) entwickelt. Alle Zonen der Prostata haben kleine Drüsen und Ausführungsgänge, die mit kubischem Epithel ausgekleidet und in bindegewebiges Stroma eingebettet sind. 98% der Prostatakarzinome entstehen als Adenokarzinome aus diesem Drüsenepithel. Selten finden sich Plattenepithel- oder Übergangsepithelkarzinome, neuroendokrine und Karzinoidtumoren sowie Sarkome [2].

Zum Grading des meist multifokal auftretenden Adenokarzinoms hat sich unter den vielen konkurrierenden Systemen weltweit der Gleason-Score durchgesetzt. Schon 1974 veröffentlichte der Pathologe Donald Gleason seine Beobachtung, welche die zunehmende Entdifferenzierung des Tumors durch Verlust der histologischen Drüsenarchitektur in fünf Abstufungen beschrieb [11]. Die Ähnlichkeit bzw. Abweichung von der normalen Drüsenarchitektur bestimmt dabei die in der Abbildung 1 dargestellte Musterzuteilung (Zeichnung angelehnt an die Standardzeichnung, gefunden in [12]).



Abbildung 1: Adenokarzinom der Prostata: Histologisches Grading nach Gleason.

Aufgrund der häufigen parallelen Präsenz mehrerer Wachstumsmuster wird die Summe (Score) aus dem vorherrschenden (primären) und dem zweithäufigsten (sekundären) Muster ermittelt. Liegt nur ein Muster vor, wird sein Wert verdoppelt. So können Summenwerte zwischen 2 (1+1) und 10 (5+5) vergeben werden. Langjährige Verlaufsbeobachtungen haben gezeigt, dass Gleason-Scores bis 6 mit einer günstigen Prognose einhergehen. Bei Nachweis eines Gleason-Scores von 7 ist von einer deutlich schlechteren Prognose auszugehen. Hierbei spielt die Menge der Gleason-Grad-4-Anteile eine große prognostische Rolle, sodass zwischen dem Score 3+4=7 (bessere Prognose) und 4+3=7 (schlechtere Prognose) differenziert werden muss. Tumoren mit einem Gleason-Score von 8-10 sind meist hochaggressiv [5]. In einer Konsensuskonferenz im Jahre 2005 wurden zur Verbesserung des bislang genutzten Systems Empfehlungen für ein modifiziertes Gleason-Grading (wie beispielsweise Einführung des tertiären Gleason-Musters) entwickelt [13].

Was die lokale Ausdehnung betrifft, wächst das Prostatakarzinom gewöhnlich in Richtung Apex. Beim weiteren Fortschreiten wird die Kapsel – bevorzugt im Bereich der Perineuralspalten der Nervendurchgangsstellen – penetriert und anschließend das Samenbläschen infiltriert. Die erste Station der lymphogenen Streuung sind die Lymphknoten in der Fossa obturatoria sowie der Iliakalgefäße. Sie werden beim Lymphknotenstaging als Indikator für positive oder negative Lymphknotenausbreitung genutzt. Als weiter entfernte Lymphknotenstationen sind die präsakralen, inguinalen und paraaortalen Regionen zu nennen. Bevorzugter Ort der hämatogenen Streuung ist das Skelettsystem. Am häufigsten betroffen von den überwiegend osteoblastischen Metastasen sind die Lendenwirbelkörper, der proximale Femur, das Becken, Rippen, Sternum, Schädel und der Humerus [2].

Die Stadieneinteilung (Staging) des Adenokarzinoms der Prostata erfolgt gemäß der TNM-Klassifikation, welche zuletzt 2009 von der Union Internationale Contre le Cancer (UICC) geändert wurde (siehe Tab. 1). Die übrigen Prostatatumoren werden andersartig klassifiziert [14]. Es werden die lokale Ausdehnung des Primärtumors (T-Stadium), der regionäre Lymphknotenbefall (N-Stadium) und das Vorliegen möglicher Fernmetastasen (M-Stadium) beurteilt. Dabei unterscheidet man zwischen einer klinischen und einer pathologischen Stadieneinteilung: die klinische (cTNM) basiert auf der digital-rektalen Untersuchung, dem PSA-Wert und bildgebenden Verfahren und ist für die Wahl der Therapieform entscheidend, die pathologische (pTNM) basiert auf dem endgültigen histologischen Befund und kann prognostische Aussagen treffen [5].

Tabelle 1: TNM-Klassifikation der UICC für das Adenokarzinom der Prostata (2009)**T-Stadium – Ausdehnung der Primärtumors**

T1	Tumor weder tastbar noch in bildgebenden Verfahren sichtbar
T1a	Zufälliger Befund, bis 5% des resezierten Gewebes
T1b	Zufälliger Befund, mehr als 5% des resezierten Gewebes
T1c	Diagnose durch Nadelbiopsie bei PSA-Erhöhung, nicht palpierbar
T2	Tumor auf Prostata begrenzt
T2a	Tumor in <50% eines Seitenlappens
T2b	Tumor in >50% eines Seitenlappens
T2c	Tumor in beiden Seitenlappen
T3	Extrakapsuläre Ausbreitung des Tumors
T3a	Kapselüberschreitung ohne Befall der Samenblasen
T3b	Befall von Samenblase und / oder Blasenhal
T4	Befall anderer Nachbarstrukturen als Samenblase oder Blasenhal

N-Stadium – regionäre Lymphknoten

N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Regionäre Lymphknotenmetastasen

M-Stadium – Fernmetastasierung

M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen vorhanden
M1a	Lymphknotenmetastasen in nichtregionären Lymphknoten
M1b	Knochenmetastasen
M1c	Andere Fernmetastasen

1.1.3 Klinik und Diagnostik

Frühstadien des Prostatakarzinoms sind meist symptomlos. In fortgeschrittenen Stadien hingegen kann es zu Obstruktionssymptomen oder – weitaus seltener – zu Hämaturie kommen. Wird keine Vorsorgeuntersuchung durchgeführt, werden viele Betroffene erstmals durch das Auftreten von Skelettbeschwerden aufmerksam, welche nicht selten zunächst als degenerativ fehlgedeutet werden. Diese sind schon Zeichen des in den Knochen metastasierten Tumors.

Bei der Krebsvorsorgeuntersuchung, empfohlen für Männer ab dem 45. Lebensjahr, wird als erster diagnostischer Schritt die digital-rektale Untersuchung durchgeführt. Bei einer Verhärtung ist eine bioptische, meist ultraschallgesteuert transrektal durchgeführte Abklärung notwendig.

Das prostataspezifische Antigen (PSA) ist ein Glykoprotein, das ausschließlich in Prostatagewebe gebildet wird. Es lässt sich im Serum mittels Radio- oder Enzymimmunoassay nachweisen (Normalwert bis 4 ng/ml) und ist sowohl bei benigner Prostatahyperplasie (BPH) als auch beim Vorliegen eines Karzinoms erhöht. Letzteres erhöht den PSA-Serum-Wert jedoch um den Faktor 10 mehr als eine entsprechende Gewebsmenge BPH. Der Serum-PSA-Wert wird auch bei Vorsorgeuntersuchungen eingesetzt, wo 2% aller Männer über 50 Jahre unabhängig vom Rektalbefund eine deutliche PSA-Erhöhung über 10 ng/ml zeigen. Hiervon haben 60% ein behandlungsbedürftiges Prostatakarzinom. Eine verbesserte Vorhersagefähigkeit des PSA-Wertes gelingt mit der Bestimmung des PSA-Quotienten (freies PSA zu Gesamt-PSA), der PSA-Anstiegsgeschwindigkeit sowie der PSA-Dichte (PSA-Wert in Relation zum Prostatavolumen). Auch zur Therapiekontrolle ist der PSA-Wert ein sehr wertvoller Marker.

Als weitere diagnostische Methoden werden die Kernspintomographie zur Einschätzung der lokalen Tumorausdehnung und eventueller Lymphknotenmetastasen, die Knochenszintigraphie zur Entdeckung von möglichen Fernmetastasen und die Nierensonographie mit i.v.-Urogramm zum Ausschluss einer Harnleiterobstruktion durchgeführt [2].

1.1.4 Therapiemöglichkeiten

Die Säulen der Therapie des Prostatakarzinoms sind die chirurgische Intervention, Strahlentherapie und Hormontherapie. Diese werden neben der „active surveillance“ (abwartende Haltung) stadienabhängig und risikoadjustiert angewendet.

Patienten mit einem inzidenten Prostatakarzinom im Stadium T1a, das z.B. anlässlich einer transurethralen Resektion (TUR) bei BPH entdeckt worden ist, benötigen häufig keine weitere Therapie. Im Rahmen der „active surveillance“ sollten sie jedoch sorgfältig mit PSA-Serum-Untersuchungen sowie transrektaler Sonographie nachbeobachtet werden. Bei Patienten, die jünger als 60 Jahre alt sind, wird allerdings wegen Gefahr des Tumorprogresses auch gelegentlich die radikale Prostatektomie empfohlen.

Die Therapie der Wahl des lokalisierten Prostatakarzinoms (Stadium T1b bis T3, N0, M0) ist die radikale Prostatektomie. Hierbei wird die gesamte Prostata inklusive ihrer Kapsel und den Bläschendrüsen entfernt. Im Allgemeinen werden auch die regionalen Lymphknoten entfernt, nur bei geringem Metastasierungsrisiko (PSA <10 ng/ml, klinisches T1b/c-Stadium, kein hoher Gleason-Score in der Biopsie) werden sie belassen [2, 15]. Ein positiver, d.h. tumorbefallener Resektionsrand wird als direkter Kontakt der Tumorzellen mit dem Präparaterand definiert. Die prognostische Relevanz eines positiven Resektionsrandes wurde in zahlreichen Untersuchungen gezeigt [5]. In der Nachsorge ist der PSA-Wert ein sicherer und spezifischer Tumormarker und jedes PSA-Rezidiv als Hinweis auf einen Residualtumor oder eine Metastasierung zu werten. Liegt der PSA-Wert nach 5 Jahren noch unterhalb der Nachweisgrenze, darf von einer Heilung ausgegangen werden.

Als therapeutische Alternative steht die Strahlentherapie zur Verfügung. Sie wird als perkutane Hochvolttherapie (Mehrfelderbestrahlung) mit einer Gesamtdosis von 62 bis 74 Gy, als Brachytherapie (irreversible Einbringung radioaktiver Jod- bzw. Palladium-Seeds in die Prostata) oder als Afterloading-Behandlung (temporäre Einbringung von radioaktivem Iridium durch perineale Nadeln in die Prostata) durchgeführt. Bei den letzten beiden Verfahren kann zusätzlich eine perkutane Bestrahlung zur Aufsättigung notwendig sein [2].

Die Therapie der Wahl des operativ nicht kurablen Prostatakarzinoms (Stadium T3 bis T4, N1 bis N4, M1) ist die antiandrogene Therapie. Schon in den 40er Jahren entdeckte der kanadisch-US-amerikanische Chirurg Charles B. Huggins die Behandlung von Prostatakrebs durch Hormonentzug und wurde dafür 1966 mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet [16]. Als Formen der antiandrogenen Therapie stehen Orchiektomie, steroidale und nichtsteroidale Antiandrogene wie Cyproteronacetat, Bicaltamid und Flutamid sowie LH-

RH-Agonisten und -Antagonisten zur Verfügung. Die LH-RH-Agonisten führen durch kontinuierliche Verabreichung zur Erschöpfung der LH-Ausschüttung im Hypophysenvorderlappen, wodurch die Testosteronproduktion sistiert und der Testosteronspiegel auf Kastrationsniveau abfällt (<50 ng/dl). Etwa 80% der Tumorzellklone sind hormonsensitiv, 20% hormonresistent. 80% der Patienten mit metastasiertem Prostatakarzinom können bei antiandrogener Therapie mit einer Remissionszeit von 2-4 Jahren rechnen. Dennoch folgt anschließend meist ein erneutes Wachstum des hormonresistenten Prostatazellklone. Insgesamt beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate dieser Patienten maximal 50%. Unklar ist bislang, ob eine zudem durchgeführte Ausschaltung der in der Nebennierenrinde produzierten Androgene einen zusätzlichen therapeutischen Effekt hat [2].

Das hormonrefraktäre Prostatakarzinom (HR) definiert sich über Testosteronspiegel im Kastrationsbereich, drei konsekutive PSA-Anstiege im zweiwöchentlichen Intervall (zwei davon 50% über dem Tiefstwert), Progredienz von Knochen- und Weichteilläsionen sowie Antiandrogenentzug über wenigstens vier Wochen und / oder weiterer PSA-Anstieg trotz sekundärer Hormonmanipulationen [15]. Für Patienten mit dieser fortgeschrittenen Form des Prostatakarzinoms stehen nur wenige Therapiemethoden zur Verfügung, die stets im Einzelfall abzuwägen sind. Mögliche Optionen sind chemotherapeutische Konzepte (z.B. Docetaxel plus Prednison [17]), Analgetikatherapie, Zoledronsäure und umschriebene Bestrahlung bei ossären Metastasen [2].

Neue targetspezifische Medikamente wie Trastuzumab / Herceptin® bei Brustkrebs, Imatinib / Glivec® bei der chronischen myeloischen Leukämie und gastrointestinalen Stromatumoren sowie Gefitinib / Iressa® beim Bronchialkarzinom [18] erzielen beachtliche Erfolge und lassen hoffen, dass auch Prostatakarzinompatienten – insbesondere im schwer therapierbaren metastasierten oder hormonrefraktären Stadium – von solchen gezielt wirkenden Therapien profitieren können. Die Wirkung dieser Medikamente, die beispielsweise auf PSMA (Prostate Specific Membrane Antigen), EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), PSCA (Prostate Stem Cell Antigen) oder HER-2/neu (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2) zielen, wurde in präklinischen sowie klinischen Phase-I- und -II-Studien an Prostatakarzinompatienten getestet [19]. Die Ergebnisse der wenigsten dieser Studien waren jedoch so erfolgsversprechend, dass Phase-III-Studien nachfolgten. Keine der targetspezifischen Therapien spielt gegenwärtig eine Rolle in der klinischen Routine [5].

1.2 Molekulare Veränderungen beim Prostatakarzinom

Durch die Anhäufung verschiedener genetischer Veränderungen wird die maligne Entartung einer Zelle begünstigt. Auch die Fähigkeit zur Metastasierung, dem klinisch signifikantesten Schritt einer Tumorerkrankung, wird wahrscheinlich bereits im Primärtumor ausgebildet und ist somit dort detektierbar. Diese molekularen Prozesse gilt es zu identifizieren und für die klinische Routine zu nutzen [5].

1.2.1 Hereditäres Prostatakarzinom

Nur 5-10% aller Prostatakarzinome gehören zu den hereditären Prostatakarzinomen. Die zuverlässige Identifikation von Prädispositionsgenen ist schwierig und erbrachte uneinheitliche Ergebnisse. Einzelne Gene, die wahrscheinlich für die Prostatakarzinogenese bestimmter Subgruppen verantwortlich sind, konnten im Rahmen sogenannter Linkage-Studien in Hochrisikofamilien entdeckt werden. Hierzu gehören u.a. die Gene HPC1 (Hereditäres Prostatakarzinom 1, Chr. 1q24), PCAP (Prostate Cancer Predisposing Locus, Chr. 1q42) und HPCX (Hereditäres Prostatakarzinom X, Chr. Xq27-28). Unwahrscheinlich ist jedoch, dass ein einziges Gen für die Genese aller hereditären Prostatakarzinome verantwortlich ist [5].

1.2.2 Sporadisches Prostatakarzinom

Das sporadisch auftretende Prostatakarzinom ist die dominierende Variante. Über 10.000 publizierte Studien haben zahlreiche vielversprechende molekulare Marker für das Prostatakarzinom hervorgebracht, von denen sich bisher keiner in der klinischen Routine durchsetzen konnte. Grund hierfür sind die vielfach geringen Fallzahlen mit bis zu 100 Patienten, das oftmals heterogene Behandlungsspektrum und fehlende Kopplung der Daten an prognostisch relevante Endpunkte. Die meisten der auf diese Weise entdeckten Biomarker wurden hiernach nicht weiter verfolgt; gering ist die Anzahl derer, welche von verschiedenen Forscherteams intensiv untersucht wurden [20].

Der in diesen Studien am häufigsten untersuchte potentielle Marker *p53* reguliert als Transkriptionsfaktor nach DNA-Schädigung die Expression von Genen, die an der Kontrolle des Zellzyklus, Induktion der Apoptose (programmierter Zelltod) oder an der DNA-Reparatur beteiligt sind. Deswegen wird *p53* seit 1992 auch als „Wächter des Genoms“ bezeichnet [21]. Die *p53*-Inaktivierung erfolgt meist durch Mutation, welche eine nukleäre Akkumulation bewirkt und sich somit als immunhistochemisch positiv darstellt. Schlomm und Mitarbeiter

zählten mehr als 800 Studien, die p53 mit sehr unterschiedlichen Ergebnissen beim Prostatakarzinom untersucht hatten. Der Anteil p53-mutierter Prostatakarzinome liegt DNA-Sequenzierungen zufolge wohl unter 10% und ist mit einer schlechten Patientenprognose assoziiert [20].

Der am zweithäufigsten in diesen Studien untersuchte potentielle Marker war der *Ki-67 labeling index*. Der Umstand, dass das Protein Ki-67 in proliferierenden Zellen vorhanden ist, während es in ruhenden Zellen fehlt, macht es zu einem guten Marker, um die Wachstumsfraktion einer Zellpopulation zu bestimmen. Der prozentuale Anteil von Ki-67-positiven Zellen (Ki-67 labeling index oder Ki-67 LI) liegt beim Prostatakarzinom typischerweise zwischen 2 und 15 und zeigt eine deutliche Assoziation mit dem PSA-Rezidiv. Da der Ki-67 LI auch stark mit dem Gleason-Score korreliert, verbleibt unklar, wie viele zusätzliche klinisch signifikante Informationen durch dessen Analyse gewonnen werden können [20].

Im Jahre 2005 identifizierten Tomlins und Mitarbeiter die *Genfusion von TMPRSS2 und ERG* [22], die bei 40 bis 60% der Patienten zu finden ist und deren Entdeckung sich inzwischen als eine der wichtigsten Genveränderungen beim Prostatakarzinom herausgestellt hat. Durch die Fusion gerät die Expression des onkogenen Transkriptionsfaktors ERG unter die Kontrolle des androgenregulierten TMPRSS2-Gens. Die Expression dieses Fusionsgens ist mit einer ungünstigen Prognose assoziiert. Zur Zeit laufende Studien untersuchen die TMPRSS2/ERG-Genfusion als potentiellen neuen diagnostischen und prognostischen Marker in Serum und Urin [5].

2007 zeigte eine Metaanalyse von 41 CGH-Studien, dass Chromosom *8p-Deletionen und 8q-Zugewinne* zu den häufigsten genetischen Veränderungen beim Prostatakarzinom gehören [23]. El Gammal und Mitarbeiter konnten mittels FISH-Analyse nachweisen, dass 8p-Deletionen schon in frühen Tumorstadien gehäuft auftreten und somit wohl eher eine Rolle in der initialen Karzinogenese spielen. Der Anteil von 8q-Zugewinnen hingegen stieg stark von den Primärtumoren zu fortgeschrittenen Tumoren an, weswegen eine wichtige Bedeutung bei der Tumorprogression zu niedrig differenzierten und hormonrefraktären Stadien sowie bei der Metastasenbildung vermutet wird [24]. Die meisten Zielgene – am ehesten Tumorsuppressorgene in der Region 8p und Onkogene in der Region 8q – sowie die biologische und klinische Bedeutung dieser Veränderungen sind jedoch noch unbekannt [23].

Eines der möglichen Zielgene auf 8q ist *MYC*, ein im Bereich 8q24.21 gelegenes Onkogen, dem eine wichtige Rolle in der Prostatakarzinogenese zugesprochen wird [25]. Auch die

MYC-Amplifikation zeigte in FISH-Analysen ihre größten Anteile bei fortgeschrittenen und aggressiven Prostatatumoren [24, 26, 27]. Die Zugewinne fielen jedoch meist gering aus, sogenannte „high level“-Amplifikationen gab es fast nie [24, 25].

Ein anderer Abschnitt auf dem langen Arm des Chromosoms 8, der neben der Region 8q24 schon in mehreren Studien zum Prostatakarzinom als amplifiziert beschrieben wurde, ist 8q21 [28-33]. In diesem Bereich ist u.a. das Gen *TPD52* lokalisiert. Dieses hat durch seine häufige Überexpression in Prostatakarzinomgewebe großes Interesse bei Wissenschaftlern geweckt [34-36]. Als mögliches Zielgen der Region 8q21 und Gegenstand dieser Arbeit wird auf *TPD52* im Folgenden näher eingegangen.

1.3 TPD52 – Stand der Forschung

1.3.1 Das Gen, seine Expression und seine Genprodukte

Das Gen TPD52 ist auf Chromosom 8q21.13 lokalisiert und setzt sich aus wenigstens neun Exons zusammen, die eine genomische Region von etwa 140 kbp umfassen. Sein Genprodukt Tumorprotein D52 gehört zur gleichnamigen Familie, der ebenso Tumorprotein D53 (TPD52L1 auf Chr. 6q22), D54 (TPD52L2 auf Chr. 20q13) und D55 (TPD52L3 oder NYD-SP25 auf Chr. 9p24) zugerechnet werden [37].

Ein Kennzeichen der Tumorprotein D52-Familie ist das alternative Spleißen. TPD52 kodiert vorwiegend das Tumorprotein D52 (184 Aminosäuren) sowie das Protein PrLZ (prostate leucine zipper), auch PC-1 (human prostate and colon gene-1) genannt (224 Aminosäuren). Während das TPD52-Transkript bzw. -Protein in mehreren Studien mittels Northern Blot, Western Blot, Immunhistochemie und Immunfluoreszenz in fast allen Körpergeweben in unterschiedlichem Ausmaß und besonders stark in Prostata, Niere, Colon, Dünndarm und B-Lymphozyten nachgewiesen werden konnte [37], isolierten Wang und Mitarbeiter das Protein PrLZ lediglich aus humaner Prostata sowie in minimalem Ausmaß aus Drüsengewebe mit sekretorischer Funktion (z.B. Epiphyse, Speicheldrüse, Pankreas) [34].

Experimentell konnte eine Regulierbarkeit der TPD52-Expression durch Entzug und Beigabe von Estradiol [38] und des synthetischen Androgens R1881 (Methyltrienolon) [34, 36, 39]) demonstriert werden. Wang und Mitarbeiter waren hierbei die einzigen, welche neben dem Tumorprotein D52 auch das Genprodukt PrLZ untersuchten und nur für dieses die Regulierbarkeit durch Androgene nachwiesen, während das Tumorprotein D52 gleichmäßig vorgefunden wurde und durch Androgenentzug oder -beigabe unbeeinflusst blieb [34]. Eine mögliche Erklärung für den Effekt dieser mitogenen Stimuli, welche bekanntermaßen in Brust- bzw. Prostatagewebe die Zellteilung anregen, liefern androgenresponsive Elemente in der Promotorregion von TPD52 [39, 40].

Die Genprodukte von TPD52 sind hydrophile Polypeptide, bestehend aus ca. 200 Aminosäuren. Typischerweise enthalten sie eine 50 Aminosäuren umfassende sogenannte Coiled-coil-Struktur (Doppelwendel) [41], welche für Interaktionen mit anderen D52-Proteinen, weiteren Mitgliedern der D52-Familie sowie MAL2 (eine integrale Komponente im apikalen Transportapparat polarisierter Zellen) und Annexin VI (involviert in Membrantransport, Bindung ist Calcium-abhängig) notwendig ist [37]. N- sowie C-terminal gelegen finden sich sogenannte PEST-Sequenzen [41], die, durch einen hohen

Gehalt an den Aminosäuren Prolin (P), Glutaminsäure (E), Serin (S) und Threonin (T) charakterisiert, eine Domäne bilden, deren Struktur von proteolytischen Enzymen erkannt wird [42] und somit an der Regulation der Proteinstabilität beteiligt ist [41].

Das Tumorprotein D52 ist in multiplen Zellbestandteilen lokalisiert: Es wurde zytoplasmatisch, perinukleär sowie inner- und außerhalb von endo- und exozytotischen Kompartimenten nachgewiesen [37]. Zu seinen physiologischen Hauptfunktionen gehört die Steuerung von exo- und endozytotischen Funktionen sowie des Vesikel- und Membrantransports [41].

1.3.2 Das onkogene Potential von TPD52

Neben seinen physiologischen Eigenschaften scheint TPD52 – wie einige Studien an Zelllinien belegen – auch eine erhebliche onkogene Rolle in der Prostatakarzinogenese zu spielen. Expression von TPD52-Isoformen in Prostatakarzinomzelllinien führte zu verankerungsunabhängigem Zellwachstum [43], Tumorwachstum nach Inokulation [43, 44] und Anstieg der Proliferations- [43, 44] sowie Migrations- und Invasionsrate [44]. Nach reduzierter TPD52-Expression konnte eine erhöhte Apoptoserate aufgezeigt werden [45], während eine erhöhte PrLZ-Expression bei Androgen-Entzug androgenabhängige Prostatakarzinomzellen vor der Apoptose bewahrte [46]. Zhang und Mitarbeiter bewiesen, dass PC-1- / PrLZ-Überexpression androgenunabhängige Progression und Resistenz gegenüber dem Androgenantagonisten Casodex begünstigte. In ihren Versuchen stimulierte die PC-1-Überexpression durch Phosphorylierung den AKT/Proteinkinase B-Signalweg, welcher eine wichtige Rolle in der Entwicklung des Prostatakarzinoms zum hormonrefraktären Stadium spielt [43].

1.3.3 Bedeutung von TPD52 in malignen Neoplasien

Eine Überexpression von TPD52 konnte bereits in multiplen malignen Geweben wie dem Mamma- [47], Bronchial- [48] Ovarial- [49, 50] und kolorektalen Karzinom [51] sowie testikulären Keimzelltumoren [52] und B-Zell-Neoplasien [53] nachgewiesen werden. Zu einem Teil ist sie bedingt durch eine erhöhte TPD52-Genkopiezahl auf Chromosom 8q21, was beispielsweise die Arbeitsgruppe um Byrne und Balleine für das Mamma- und Ovarialkarzinom beschrieb. Die Überexpression kann jedoch auch ohne Genzugewinn bzw. -amplifikation auftreten [49, 54].

Auch beim Prostatakarzinom konnte mittels immunhistochemischer Studien eine erhöhte TPD52-Expression nachgewiesen werden: 2004 untersuchten Wang und Mitarbeiter 100 Proben radikaler Prostatektomien. Eine starke Immunfärbung fand sich überwiegend in den Epithelzellen von prostatistischen intraepithelialen Neoplasien (85% der Fälle) und Prostatakarzinomen (75% der Fälle), während nicht betroffenes Nachbargewebe und benigne Prostatahyperplasien in 75 bzw. 78% der Fälle eine schwache Anfärbung zeigten [34]. 2007 zeigte die Arbeitsgruppe in einem ähnlichen Experiment, dass die Häufigkeit der PrLZ-Positivität von benignen Veränderungen (23% bei n=72, überwiegend einfach +) über das lokalisierte Prostatakarzinom (45% bei n=72) und hormonsensitive metastasierte Tumoren (39% bei n=36) zu hormonrefraktären Karzinomen (53% bei n=36, überwiegend doppelt ++) signifikant anstieg [35]. Rubin und Mitarbeiter wiesen eine schwache bis mittelstarke Expression von TPD52 in benignen Veränderungen und eine starke Expression in intraepithelialen Neoplasien sowie dem Prostatakarzinom nach, wobei sich bei ihnen kein Unterschied in der Expression zwischen klinisch lokalisierten und hormonrefraktären Prostatakarzinomen erkennen ließ. Allerdings war eine starke TPD52-Expression tendenziell vermehrt bei Männern zu finden, die nachfolgend ein PSA-Rezidiv erlitten [36].

1.3.4 TPD52 als mögliches Therapieziel

Wegen seines onkogenen Potentials und den geschilderten Veränderungen in der Expression und Genkopiezahl erscheint TPD52 bedeutsam für das Überleben der Tumorzelle und stellt damit ein exzellentes potentiell Ziel für die Entwicklung eines Tumorimpfstoffes dar [55]. Das Ziel eines Impfstoffes gegen Krebs ist es, die gegen die Tumorantigene gerichtete Immunantwort des Patienten zu initiieren bzw. zu verstärken [56]. Scanlan und Mitarbeiter erbrachten den Nachweis, dass humanes Tumorprotein D52 in der Lage ist, gegen sich gerichtete Immunglobulin G-Antikörper zu induzieren [57]. Ein optimaler Tumorimpfstoff enthält wenigstens zwei antigene Epitope: eines zur Induktion der spezifischen zytotoxischen T-Zell-Antwort, das andere zur Aktivierung von T-Helfer-Zellen. Hierfür ist insbesondere die Strategie der sich überlappenden synthetischen Peptide geeignet, welche von Mirshahidi und Mitarbeitern am Mausmodell untersucht wurde. Zur Evaluation von Sicherheit, Immunogenität und Anti-Tumor-Effekt dieser Methode impften sie Mäuse mit sich überlappenden synthetischen Peptiden, welche die gesamte Sequenz und somit alle möglichen Epitope von murinem Tumorprotein D52 enthielten, welches zu 86% mit dem humanen D52 übereinstimmt. Es resultierte eine spezifische zellvermittelte Immunantwort, die nach Inokulation von TPD52-exprimierenden Mammakarzinomzellen zu einem signifikanten Überlebensvorteil bei den zuvor geimpften Mäusen führte. Zusätzlich konnte keine schädliche autoimmune Reaktion nachgewiesen werden [56]. Ebenso erreichte die Arbeitsgruppe um Payton mit murinem D52 als proteinbasierten Impfstoff am Mausmodell eine Immunisierung, welche bei nachfolgender Injektion von TPD52-überexprimierenden Tumorzellen (mKSA und 3T3.mD52) ein Tumorstillstand in bis zu 50% der Fälle verhinderte bzw. verspätet einsetzen ließ, gleichfalls ohne Hinweis auf Autoimmunität [55].

Auch für das Prostatakarzinom erfolgte im Mausmodell der Nachweis einer induzierbaren zellvermittelten Immunantwort gegenüber TPD52-überexprimierenden Prostatakarzinomzellen ohne Hinweis auf Autoimmunität. Anhand des TRAMP-Modells (transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate) erzielten Lewis und Mitarbeiter die besten Ergebnisse mit mD52-DNA als Impfstoff, kombiniert mit dem löslichen Zytokin GM-CSF [58]. Diese Erkenntnisse lassen hoffen, dass das humane Ortholog von TPD52 als Impfstoffantigen bei Patienten mit TPD52-überexprimierenden Prostatakarzinomen zur Behandlung appliziert werden könnte. Klinische Studien am Menschen fehlen jedoch bislang.

1.4 Ziel dieser Arbeit

Trotz großer wissenschaftlicher Bemühungen sind Ätiologie und Pathogenese des Prostatakarzinoms noch weitgehend unverstanden und Therapiemöglichkeiten für das fortgeschrittene Prostatakarzinom nur sehr eingeschränkt verfügbar. Das Gen TPD52 ist auf Chromosom 8q21 lokalisiert, einem der am häufigsten amplifizierten Bereiche im Genom des humanen Prostatakarzinoms. Vorausgegangene Arbeiten weisen darauf hin, dass dieses Gen eine besondere Bedeutung für die Entstehung, Progression und vielleicht auch Therapie des Prostatakarzinoms haben könnte. Allerdings wurden die bisherigen Studien nur an relativ kleinen Fallzahlen, am Zelllinienmodell oder ohne die nötigen Follow-up-Daten durchgeführt. Ziel dieser Arbeit war es daher, die TPD52-Genkopiezahl an einem großen sowohl klinisch als auch molekular gut charakterisierten Prostatagewebekollektiv zu untersuchen. Auf diese Weise sollten mögliche Korrelationen zwischen Gen-Amplifikation und histopathologischen Parametern bzw. Patientenüberleben aufgedeckt und somit Prävalenz und klinische Signifikanz von TPD52-Gen-Amplifikationen im humanen Prostatakarzinom bestimmt werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Gewebekollektiv

Um mehr als 3000 Prostatakarzinomgewebe unter standardisierten Bedingungen zu untersuchen, standen zwei schon in früheren Projekten [24, 59-62] verwendete Tissue Microarrays (TMAs) zur Verfügung: zum einen der Hamburger Prostate Cancer Prognosis-Array mit vorhandenen klinischen Follow-up-Daten, zum anderen der Hamburger Prostate Progression-Array mit Prostatagewebeproben unterschiedlicher Dignität, Differenzierung und TNM-Stadien.

2.1.1 Der Hamburger Prostate Cancer Prognosis-Array

Der Hamburger Prostate Cancer Prognosis-Array enthält neben verschiedener Kontrollgewebe 3261 Prostatakarzinomgewebezylinder von jeweils 0,6 mm Durchmesser, die auf sieben Paraffinblöcke mit je 129-522 Proben verteilt sind (siehe Abb. 2 aus [20]).

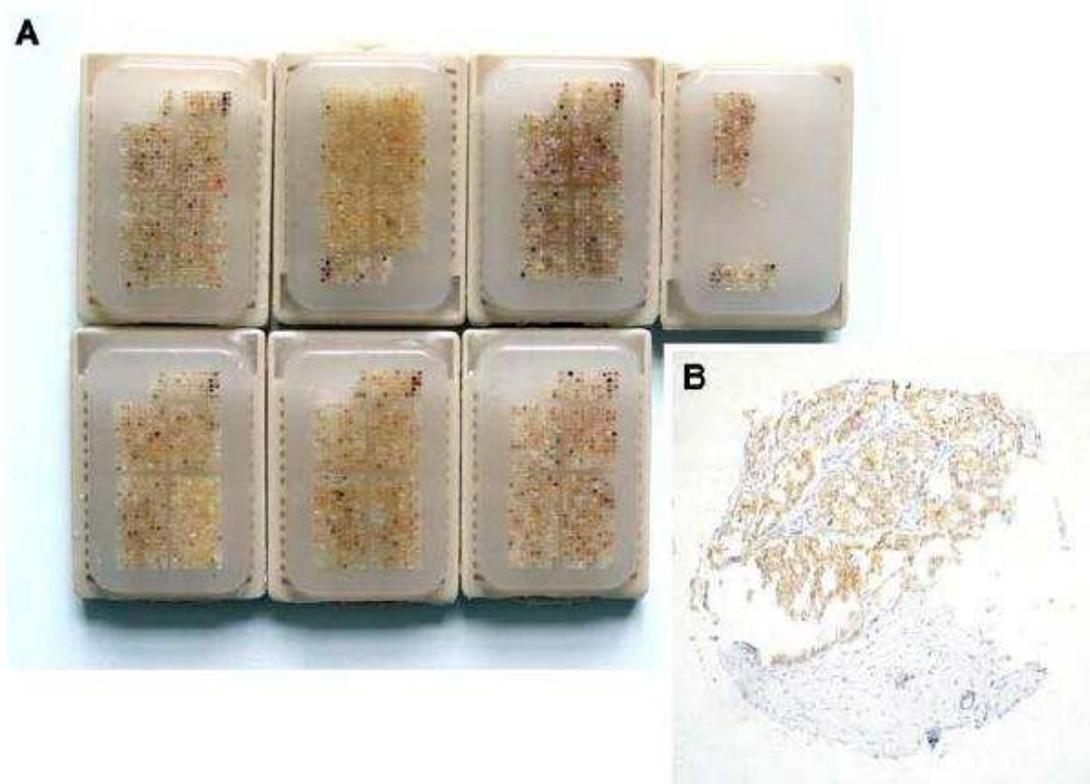


Abbildung 2: A) Paraffinblöcke des Hamburger Prostate Cancer Prognosis-Arrays. B) Ein repräsentativer Gewebespot mit PSA-Immunfärbung. Verwendung der Abbildungen mit freundlicher Genehmigung von Prof. Thorsten Schlomm.

Die Gewebeproben stammen aus den Operationspräparaten radikaler Prostatektomien von 3261 Patienten, die zwischen 1992 und 2005 in der Klinik für Urologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf behandelt wurden. Zum Zeitpunkt der Operation betrug das Durchschnittsalter 62 Jahre bei folgender Altersverteilung: 2,7% unter 50 Jahre; 32,6% 50-60 Jahre; 59,0% 60-70 Jahre; 5,7% älter als 70 Jahre. Für 2698 Patienten waren Follow-up-Daten über einen Zeitraum von einem bis zu 194 Monaten vorhanden (Mittelwert 51,3 Monate; Median 39,7 Monate) (Stand Mai 2009).

Keiner der Patienten erhielt adjuvante Therapie, nur im Falle eines biochemischen Rezidivs wurde eine sogenannte Salvage-Therapie (salvage engl. für Rettung) initiiert. Bei allen Patienten wurden postoperativ PSA-Werte bestimmt: im ersten Jahr vierteljährlich, im zweiten Jahr halbjährlich und ab dem dritten Jahr ein Mal jährlich. Ein postoperativer PSA von 0,1 ng/ml sowie ein Anstieg nach einem initial nicht detektierbaren PSA-Wert wurde als biochemisches Rezidiv definiert. Der erste PSA-Wert größer oder gleich 0,1 ng/ml definierte den Zeitpunkt des Rezidivs und somit das Ende des rezidivfreien Überlebens. Patienten ohne Hinweis auf ein Tumorrezidiv wurden an ihrem letzten Follow-up-Termin zensiert [63].

Die Validität der klinischen Daten konnte in einer früheren Analyse durch Schlomm und Mitarbeiter demonstriert werden. Sie verglichen standardisierte klinisch-pathologische Parameter (Gleason-Score, pT-Stadium, präoperativer PSA-Serumspiegel, Vorhandensein eines positiven Resektionsrandes) mit dem biochemischen Rezidiv, wobei bei allen erwarteten Assoziationen ein hoher Level von statistischer Signifikanz (jeweils $p < 0,0001$) gefunden wurde [63].

2.1.2 Der Hamburger Prostate Progression-Array

Der aus einem einzelnen Block bestehende Hamburger Prostate Progression-Array besteht aus 359 Tumorgewebeproben und 16 Kontrollgeweben. Er enthält neben Proben unterschiedlicher pathologischer Tumor-Stadien (pTx) auch welche von prostatistischen Veränderungen benigner Dignität (BPH), prostatistische intraepitheliale Neoplasien (PIN) sowie Lymphknotenmetastasen (LK-Metastasen) und hormon-refraktäre Karzinome (HR). Eine Übersicht zeigt Tabelle 2.

Tabelle 2: Übersicht Hamburger Prostate Progression-Array

Histologische Diagnose	Anzahl (n)
Benigne Prostatahyperplasie (BPH)	50
Prostatistische intraepitheliale Neoplasie (PIN)	50
pT2b	50
pT3b	55
Gleason 8-9	56
Lymphknotenmetastasen (LK-Metastasen)	55
Hormonrefraktäre Karzinome (HR)	43
Kontrollgewebeproben	16
Gesamt	375

2.2 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Um eine TPD52-spezifische Sonden-DNA für die FISH-Analyse zu erhalten, wurde der Escherichia coli-Klon mit dem plasmid-basierten künstlichen Bakterienchromosom gewählt und kultiviert, welcher dieses Gen umfasst (pBac-E. coli-Klon RP11-92K15). Nach der erfolgreichen DNA-Extraktion aus dieser Kultur erfolgte mittels DIG-Nick-Translation die Herstellung der TPD52-spezifischen digoxigenierten Sonden-DNA. Für die zwei-farbige FISH-Analyse wurden nun 4 µm dicke TMA-Schnitte entparaffiniert und proteolytisch vorbehandelt. Bei der anschließenden Gewebehybridisierung kam neben der selbst hergestellten TPD52-spezifischen Sonden-DNA eine kommerzielle Sonde als Referenz für das zu TPD52 gehörige Zentromer von Chromosom 8 (Cep 8-Sonde, Spectrum Orange; Vysis) zum Einsatz. Die anschließende Detektion der Digoxigenin-markierten Sonden-DNA wurde mit dem „Fluorescent Antibody Enhancer Set for DIG Detection“ von Roche durchgeführt, welches ein grünes Fluoreszenzspektrum bewirkte. In den folgenden Abschnitten sind die einzelnen Arbeitsschritte im Detail beschrieben; hier eine Übersicht:

- 1) Kultivierung des TPD52-spezifischen Escherichia coli-Klons
- 2) DNA-Extraktion aus der Escherichia coli-Kultur
- 3) DIG-Nick-Translation zur Sondenherstellung
- 4) Entparaffinierung und proteolytische Vorbehandlung der Gewebeschnitte
- 5) Hybridisierung
- 6) Waschen
- 7) Fluoreszenz-Detektion
- 8) Auswertung am Fluoreszenzmikroskop

2.2.1 Kultivierung des TPD52-spezifischen Escherichia coli-Klons

Die Kultivierung des Escherichia coli-Klons mit dem plasmid-basierten künstlichen Bakterienchromosom, welches das Gen TPD52 umfasst (pBac-E. coli-Klon RP11-92K15) erfolgte nach etabliertem Laborprotokoll.

Einzelne Arbeitsschritte der Kultivierung:

1. 13 ml LB-Medium (Luria-Broth-Base, 25 g/l dH₂O, autoklaviert; Invitrogen) in einen 100 ml Erlenmeyerkolben geben
2. 39 µl Chloramphenicol-Lösung (Antibiotikum, 34 mg/ml Ethanol abs.; Sigma-Aldrich) hinzugeben
3. mit einer Pipettenspitze einen Abstrich aus der Stab-Stock-Kultur des pBac-E. coli-Klons (RP11-92K15, Länge: ca. 170 kbp, umfasst das zu untersuchende Gen TPD52, gelegen auf Chromosom 8q21.13) nehmen
4. Animpfen des Mediums durch Abwurf der Pipettenspitze in den Erlenmeyerkolben
5. Inkubation der angeimpften Kultur über 2 Tage bei Raumtemperatur und 200 rpm im Schüttelinkubator
6. Mittels einer Pipette 13 µl der trüb gewordenen Kultur in einen mit erneut 13 ml LB-Medium und 39 µl Chloramphenicol-Lösung versetzten, 100 ml fassenden Erlenmeyerkolben überimpfen
7. erneute Inkubation der überimpften Kultur für 2 Tage bei Raumtemperatur und 200 rpm im Schüttelinkubator

2.2.2 DNA-Extraktion aus der Escherichia coli-Kultur

Die DNA-Extraktion erfolgte aus der pBac-E. coli-Flüssigkeitskultur (siehe 2.2.1) mit Hilfe des „QIAprep Spin Miniprep Kit“ von QIAGEN nach leicht modifiziertem Protokoll. Im Extraktionskit waren alle notwendigen Reagenzien sowie die „QIAprep spin“-Säulen enthalten.

Einzelne Arbeitsschritte der DNA-Extraktion:

1. 2 ml der pBac-E. coli-Kultur über 2 min in einer Tischzentrifuge (Centrifuge 5424; Eppendorf) bei 13000 rpm im 2 ml fassenden Eppendorf-Tube pelletieren, Medium abkippen
2. erneut 2 ml der pBac-E.coli-Kultur im selben Eppendorf-Tube über 2 min bei 13000 rpm pelletieren, Medium abkippen

3. Reste im Eppendorf-Tube vollständig mit einer Pipette abnehmen
4. das Pellet in 250 µl Puffer P1 vollständig resuspendieren (Puffer P1 im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahren)
5. 250 µl Puffer P2 zur Suspension hinzufügen und vorsichtig 4-6 x invertieren, Blaufärbung der Suspension durch einen Farbmaler; hier nicht länger als 5 min bis zum folgenden Schritt warten
6. 350 µl Puffer N3 hinzufügen und sofort vorsichtig 4-6 x invertieren, Bildung eines weißen Niederschlages, dann 15 min in einer Tischzentrifuge bei 13000 rpm zentrifugieren
7. Überstand auf eine „QIAprep spin“-Säule in einem „2 ml collection tube“ pipettieren, dann 1 min in einer Tischzentrifuge bei 13000 rpm zentrifugieren
8. Durchfluss verwerfen
9. 2 x nacheinander die „QIAprep spin“-Säule mit 500 µl Puffer PE beladen und 1 min in einer Tischzentrifuge bei 13000 rpm zentrifugieren, den Durchfluss jeweils verwerfen
10. zum vollständigen Trocknen erneut 1 min bei 13000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugieren
11. Durchfluss und „2 ml collection tube“ verwerfen
12. „QIAprep spin“-Säule in ein 1,5 ml fassendes Eppendorf-Tube setzen
13. 50 µl von auf 70 °C erwärmten Puffer EB auf die Mitte der Membran der „QIAprep spin“-Säule pipettieren, 1 min bei Raumtemperatur inkubieren, anschließend 1 min in einer Tischzentrifuge bei 13000 rpm zentrifugieren
14. „QIAprep spin“-Säule verwerfen
15. Bestimmung der DNA-Konzentration und ihrer Reinheit durch photometrische Messung am NanoDrop ND-1000-Spektrophotometer (Pqlab) mit dem Programm „ND3.1.0: Nucleic Acid“; als Referenz für den Nullwert wurden 1,5 µl des Elutionspuffers EB verwendet; für die DIG-Nick-Translation wurden nur solche Proben ausgewählt, die über einen ausreichenden DNA-Gehalt (mind. 50 ng/µl) und eine ausreichende Reinheit (260/280-Ratio entsprechend dem DNA-Protein-Verhältnis zwischen 1,8 und 2,0) verfügten
16. Aufbewahrung im 1,5 ml-Eppendorf-Tube bei 4 °C
17. Autoklavierung aller Arbeitsmaterialien, die mit gentechnisch veränderten Organismen (GVO) in Kontakt gekommen waren

2.2.3 DIG-Nick-Translation zur Sondenherstellung

Die DIG-Nick-Translation ist eine Methode, bei der im gleichen Arbeitsschritt sowohl die DNA auf die optimale Fragmentlänge für die spätere Hybridisierung zerkleinert als auch gleichmäßig Digoxigenin-markierte Nukleotide in den DNA-Doppelstrang eingebaut werden. Bei dieser DIG-Nick-Translation wurde mit dem „Nick Translation System“ von Invitrogen gearbeitet, wobei für den Ansatz von 50 μ l eine Mindestmenge von 1 μ g DNA notwendig war. Das Kit-Protokoll wurde in modifizierter Weise angewandt: Zum einen wurde das zulässige Höchstvolumen an pBAC-DNA-Lösung von 38 μ l als Standardvolumen gewählt (welches ca. 2 μ g DNA entspricht), zum anderen wurde nach Ablauf der Standardinkubationszeit ein weiterer Pol I-DNase-Enzym-Mix zum Zwecke einer erneuten Inkubation hinzugegeben.

Einzelne Arbeitsschritte der Sondenherstellung:

1. Pipettieransatz für 50 μ l im 0,5 ml Eppendorf-Tube auf Eis:
 - 5 μ l dNTP-Mix ohne dTTP (0,2 mM je Nukleotid; Invitrogen)
 - 1 μ l Digoxigenin-dUTP (1 mM; Roche)
 - 38 μ l pBAC-DNA-Lösung (entsprechend ca. 2 μ g DNA; aus Abschnitt 2.2.2)
 - 5 μ l Pol I-DNase-Enzym-Mix (0,5 U/ μ l Pol I, 0,4 mU/ μ l DNase; Invitrogen)
 - 1 μ l Pol I (10 U/ μ l; Invitrogen)
2. Ansatz mit einem Vortex durchmischen, anschließend herunterzentrifugieren
3. Inkubation über 90 min bei 15 °C im Thermocycler (MJ Research PTC-100 Programmable Thermal Controller)
4. Zugabe von (weiteren) 5 μ l Pol I-DNase-Enzym-Mix, mit der Pipette durchmischen
5. Inkubation über 15 min bei 15 °C im Thermocycler
6. Zugabe von 5 μ l Stop-Puffer (0,5 M EDTA, pH 8,0; Invitrogen)
7. Ansatz mit einem Vortex durchmischen, anschließend herunterzentrifugieren
8. zur ca. 4-fachen Einengung / Konzentrierung der Sonden diese ca. 25 min bei 45 °C mit geöffnetem Deckel im Eppendorf Concentrator plus zentrifugieren
9. Lagerung der Sonden-DNA bei 4 °C

2.2.4 Entparaffinierung und proteolytische Vorbehandlung der Gewebeschnitte

Mit Hilfe eines Mikrotoms wurden 4 µm dünne Gewebeschnitte der TMA-Blöcke angefertigt und auf einem Objektträger (auch Slide genannt) fixiert. Diese Schnitte mussten vor der eigentlichen Hybridisierung gemäß dem Protokoll des „Paraffin Pretreatment Reagent Kit“ von Vysis entparaffiniert und proteolytisch vorbehandelt werden.

Einzelne Arbeitsschritte der Vorbehandlung der Gewebeschnitte:

1. TMA-Schnitte (Objektträger-fixiert) 3 x 10 min in Xylol (Merck) stellen
2. TMA-Schnitte 2 x 5 min in Ethanol (96%; Merck) stellen
3. TMA-Schnitte 3 min auf einer 48 °C warmen Heizplatte (Medax) lufttrocknen
4. TMA-Schnitte 15 min in 80 °C warmer Pretreatmentlösung (VP 2000 Pretreatment Reagent, NaSCN, pH 5,4; Vysis) inkubieren (Objektträgerküvette im Wasserbad; GFL)
5. TMA-Schnitte in der Küvette 2 min mit destilliertem Wasser (dH₂O) waschen
6. TMA-Schnitte 150 min in 37 °C warmer Proteaselösung (VP 2000 Protease Buffer (0,01 M HCl, pH 2,0; Vysis) + Protease I (Pepsin 250 g; Vysis)) inkubieren (Objektträgerküvette im Wasserbad)
7. TMA-Schnitte in der Küvette 2 min mit dH₂O waschen
8. TMA-Schnitte 3 min in Ethanol (70%; Merck) stellen
9. TMA-Schnitte 3 min in Ethanol (80%; Merck) stellen
10. TMA-Schnitte 3 min in Ethanol (96%; Merck) stellen
11. TMA-Schnitte 3 min auf einer 48 °C warmen Heizplatte lufttrocknen

2.2.5 Hybridisierung

Das Gewebe der TMA-Schnitte wurde mit zwei Sonden gleichzeitig hybridisiert: zum einen mit unserer im Arbeitsschritt 2.2.3 selbst hergestellten Sonden-DNA (8q21.13, Klon-Nr.: RP11-92K15, spezifisch für TPD52), zum anderen mit einer kommerziellen Sonde als Referenz für das Zentromer des Chromosoms 8 (Cep 8-Sonde, Spectrum Orange; Vysis). Da die Cep 8-Sonde in einer mit einem Basis-Hybridisierungsmix verdünnten Form geliefert wird, fügten wir für unseren Ansatz weniger des selbst hergestellten Basis-Hybridisierungsmix hinzu als üblicherweise bei unverdünnten Cep-Sonden. Ebenso im Ansatz enthalten war Cot-DNA, welche dem Abblocken unspezifischer Bindungsstellen und repetitiver Sequenzen dient.

Die einzelnen Arbeitsschritte der Hybridisierung:

1. Herstellung des Basis-Hybridisierungsmix:
 - a. 5,0 ml deionisiertes Formamid, 1,5 ml 20xSCC (Saline-Sodium-Citrat) und 1,0 g Dextransulfat in ein kleines Becherglas geben
 - b. bei 60 °C auf einem Heizrührer rühren, bis sich das Dextransulfat gelöst hat
 - c. Suspension mit 2 M HCl auf pH 7 einstellen
 - d. Mit dH₂O auf 7 ml auffüllen
 - e. Lagerung bei 4 °C
2. Herstellung des Sonden-Hybridisierungsmix:
 - a. Pipettieransatz für 20 µl:
 - 10,5 µl Basis-Hybridisierungsmix (siehe oben)
 - 2,0 µl Cot-DNA (1 µg/µl; Roche)
 - 3,5 µl Sonden-DNA (von Arbeitsschritt 2.2.3)
 - 4,0 µl Cep 8 Spectrum Orange (Vysis)
 - b. Ansatz mit einem Vortex durchmischen, anschließend herunterzentrifugieren
3. 20 µl Sonden-Hybridisierungsmix auf einen TMA-Schnitt pipettieren, mit einem 24x32 mm messenden Deckgläschen eindeckeln, eventuell vorhandene Luftbläschen austreichen und mit Fixogum (Klebemittel; Marabu) versiegeln
4. die so präparierten Gewebeschnitte in ein Hybrite-Gerät (Thermobrite von Abbott Molecular) legen und das Hybridisierungsprogramm starten: 10 min bei 72 °C denaturieren, anschließend ca. 36 h bei 37 °C inkubieren

2.2.6 Waschen

Im Anschluss an die Hybridisierung wurden die TMA-Schnitte gewaschen, um unspezifisch gebundene Sonden-DNA zu entfernen.

Die einzelnen Arbeitsschritte des Waschens:

1. TMA-Schnitte aus dem Hybrite nehmen und Fixogum vorsichtig entfernen
2. TMA-Schnitte in Hybridisierungswaschpuffer (2xSSC (Saline-Sodium-Citrat; Vysis), 0,3% NP40 (Octylphenoxypolyethoxyethanol; Vysis)) bei Raumtemperatur stellen, Deckgläschen lösen sich langsam, diese vorsichtig entfernen
3. TMA-Schnitte 2 min bei 72 °C im Hybridisierungswaschpuffer (2xSSC, 0,3% NP40) waschen
4. TMA-Schnitte bis zur Fluoreszenz-Detektion in eine Küvette mit 1xPBS (Phosphate-buffered saline; Dako) stellen

2.2.7 Fluoreszenz-Detektion

Zur Fluoreszenz-Detektion wurde das „Fluorescent Antibody Enhancer Set for DIG Detection“ von Roche eingesetzt. Die 3-stufige Antikörper-Kaskade mit dem fluoreszenzgekoppelten Tertiärantikörper erbrachte den Vorteil, die Fluoreszenzsignale für unsere selbst hergestellte Sonden-DNA zu verstärken. Insbesondere ab dem Einsatz des dritten Antikörpers war es notwendig, den Arbeitsraum stark abzdunkeln. Die eingesetzte Blocking-Solution (bestehend aus niedermolekularen Proteinen) diente zur Absättigung freier Bindungsstellen von proteinbindenden Oberflächen, um eine unspezifische Antikörper-Bindung zu verhindern. Nach der Fluoreszenz-Detektion wurde das gesamte Chromatin der TMA-Schnitte mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) eingefärbt, um später am Mikroskop die Zugehörigkeit eines Gen- oder Zentromersignals zu einem Zellkern bestimmen zu können. Das eingesetzte Antifade verhinderte das schnelle Ausbleichen der Fluorochrome.

Einzelne Arbeitsschritte der Fluoreszenz-Detektion:

1. TMA-Schnitte der Küvette mit 1xPBS (siehe letzter Arbeitsschritt von 2.2.7) entnehmen, Flüssigkeit abtropfen lassen
2. Objektträger in einer sogenannten „trockenen Kammer“ mit jeweils 500 µl 1xBlocking-Solution (10xBlocking-Solution aus Set-Flasche mit 1xPBS 1:10 verdünnen) 45 min bei Raumtemperatur inkubieren
3. Blocking-Solution abkippen, eventuell vorsichtig mit einem Papiertuch abtupfen

4. je 50 μ l Maus-Anti-DIG-Antikörper-Lösung (3 μ l Antikörper aus dem Set-Tube mit 50 μ l 1xBlocking-Solution verdünnen) auf die Objektträger pipettieren, mit Parafilm abdecken, eventuell Luftbläschen herausstreichen und 75 min in einer sogenannten „feuchten Kammer“ im Brutschrank (WTB Binder) bei 37 °C inkubieren
5. Objektträger für jeweils 3 min in 3 Küvetten mit je 100 ml Detektionswaschpuffer (1xPBS, 0,2% Tween20 = Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat) bei 37 °C stellen, dabei leicht schütteln
6. Wiederholung Schritt 4 mit je 50 μ l Anti-Maus-Antikörper-DIG-Lösung
7. Wiederholung Schritt 5
8. Wiederholung Schritt 4 mit je 50 μ l Anti-DIG-Fluorescein-Lösung, hierbei und bei den folgenden Schritten besonders auf einen abgedunkelten Arbeitsbereich achten
9. Wiederholung Schritt 5, mit auf jeweils 5 min verlängerter Waschzeit
10. Objektträger bei Raumtemperatur lufttrocknen lassen
11. auf die Objektträger je 50 μ l DAPI-Antifade (4',6-Diamidin-2-phenylindol, Vectashield Mounting Medium with DAPI; Vector) geben und mit 24x32 mm messenden Deckgläschen abdecken, mind. 15 min inkubieren
12. anschließend Auswertung am Fluoreszenzmikroskop oder Zwischenlagerung im Gefrierschrank bei ca. -18 °C

2.2.8 Auswertung am Fluoreszenzmikroskop

Zur Auswertung der fluoreszenz-hybridisierten TMA-Schnitte stand ein Epifluoreszenzmikroskop des Typs „Axio Scope.A1“ von Zeiss zur Verfügung. Bei jedem einzelnen Gewebespot wurden mindestens 20 repräsentative Zellkerne (blauer Filter, angefärbt durch das sich in die kleine Furche des DNA-Doppelstranges eingelagerte DAPI) genau betrachtet und die durchschnittliche Anzahl der TPD52- (grüner Filter, FITC = Fluoresceinisothiocyanat) und Zentromer 8-Signale (roter Filter, Rhodamin) notiert.

Anhand der TPD52-Genkopiezahl sowie der TPD52:Cep8-Ratio (also dem Kopiezahlverhältnis von TPD52 zu Zentromer 8) ließ sich eine Einteilung vornehmen: Lagen mindestens doppelt so viele TPD52- wie Zentromersignale vor (d.h. Ratio ≥ 2), wurde das Gewebe als amplifiziert gewertet. Hierbei wurde zwischen „high level“-Amplifikationen mit mind. 20 Gensignalen pro Zellkern und „low level“-Amplifikationen mit geringerem Genzugewinn unterschieden. Bei einer TPD52:Cep8-Ratio zwischen 1 und 2 (also $1,0 < \text{Ratio} < 2,0$), wurde die Genkopiezahl des entsprechenden Tumors als „Gain“ klassifiziert. Betrug die Ratio 1, aber die Kopiezahl von TPD52 und Zentromer 8 war gleichermaßen erhöht (z.B. jeweils 4), wurde eine Polysomie angenommen. Alle anderen Gewebe (d.h. Ratio =1 sowie Kopiezahl von TPD52 und Zentromer 8 =2) wurden als „nicht amplifiziert“, d.h. mit „normaler“ Genkopiezahl gewertet.

Mit dem Software-Programm „Axio Vision“ ließen sich mehrdimensionale Bildaufnahmen in 63-facher und 100-facher Vergrößerung anfertigen. Hierbei konnte für jede Filterfarbe (FITS, Rhodamin und DAPI) je nach Leuchtstärke eine eigene Belichtungszeit ausgewählt werden. Auswertungsbeispiele zeigt die Abbildung 3.

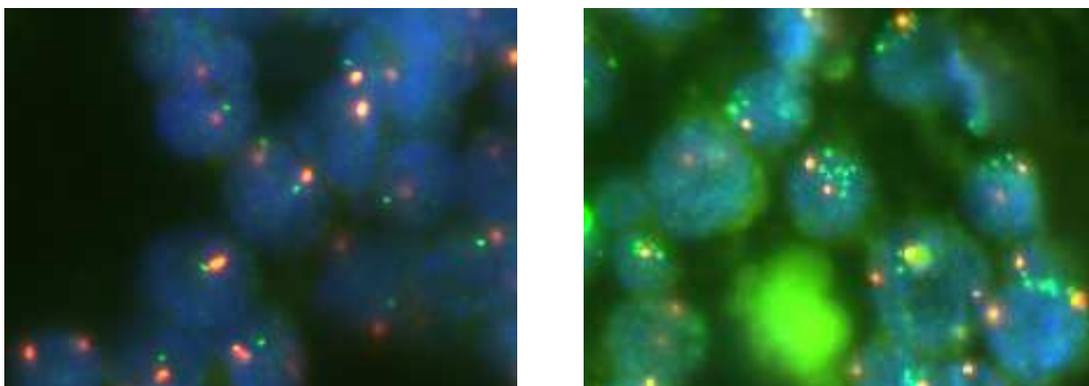


Abbildung 3: Zweifarbige FISH-Analyse von TPD52 (grün) und dem Zentromer des Chromosoms 8 (rot). Das Chromatin stellt sich nach Einfärbung mit DAPI blau dar. Links: Prostatakarzinom-Zellen ohne TPD52-Kopiezahlveränderungen (je 2 Kopien TPD52 und Zentromer 8). Rechts: Eine amplifizierte Prostatakarzinomprobe mit zwei Zentromer 8-Signalen bei einem Mehrfachen an TPD52-Signalen pro Zellkern.

2.3 Statistische Berechnungen

Die statistischen Berechnungen wurden mit der „JMP – Statistical Discovery Software“ (SAS Institute, Cary, NC, USA) durchgeführt. Für die deskriptive Statistik wurden Median- und Mittelwerte, Konfidenzintervalle, Standardabweichungen sowie minimale und maximale Werte bestimmt. Um den Zusammenhang zwischen Tumorstaging (pT- und pN-Stadium), Gleason-Score, präoperativem PSA-Serumspiegel, Resektionsrandstatus, MYC- und p53-Status sowie dem Ki-67 labeling index mit dem TPD52-FISH-Status darzustellen, wurden Kontingenztafeln und der Chi-Quadrat-Test angewandt. Der Kaplan-Meier-Schätzer wurde genutzt, um graphisch das PSA-rezidivfreie Überleben von Patienten mit bzw. ohne TPD52-Genkopiezahlvermehrungen darzustellen. Unterschiede zwischen diesen Gruppen wurden mit Hilfe des Logrank-Tests beurteilt. Die gleiche Analyse erfolgte zur graphischen Darstellung des PSA-rezidivfreien Überlebens von Patienten mit TPD52- und / oder MYC-Zugewinnen im Vergleich zu denen ohne genspezifischen Zugewinn. Mit der Cox-Regression wurden in einer multivariaten Analyse die Abhängigkeiten einiger analysierter Variablen untereinander in Relation zum biochemischen Rezidiv getestet. Mit dem ANOVA-Test (analysis of variance) wurden Mittelwertsunterschiede für den Ki-67 labeling index in Tumoren mit und ohne TPD52-Veränderungen beurteilt. Alle Tests waren zweiseitig ausgelegt mit einem auf 0,05 festgelegten Signifikanzniveau.

3 ERGEBNISSE

3.1 TPD52-Gen-Amplifikationen im humanen Prostatakarzinom

Für diese Studie wurden die Daten von 2525 der 3261 (77,4%) Gewebeproben des Hamburger Prostate Cancer Prognosis-Arrays eingesetzt. Bei diesen Proben war nach immunhistochemischer Färbung mit dem Antikörper 34 β E12 ein ausgeprägter Basalzellverlust detektierbar und somit eindeutig Prostatakarzinomgewebe vorhanden. Die übrigen 736 Spots auf dem TMA wurden von dieser Studie ausgeschlossen, da sie entweder keinerlei Gewebe enthielten oder das Gewebe nicht zweifelsfrei als Tumorgewebe identifiziert werden konnte. Von den verbliebenen 2525 Tumoren konnten 1617 (64,0%) erfolgreich mit der FISH analysiert werden. Bei den übrigen 908 Tumoren konnte kein Resultat erhalten werden, weil entweder keine Fluoreszenzsignale für TPD52 sichtbar waren (762 Spots = 30,2%) oder der Gewebespot auf dem TMA-Schnitt fehlte (146 Spots = 5,8%). Eine TPD52-Gen-Amplifikation gemäß den vordefinierten Kriterien (siehe Abschnitt 2.2.8) wurde in 34 (2,1%) der 1617 Tumoren gefunden. Dabei zeigten sich durchschnittlich 6 TPD52-Gensignale pro Zellkern bei einer Spanne von 4 bis 12 Signalen („low level“). „High level“-Amplifikationen mit mehr als 20 Gensignalen pro Zellkern fanden sich nicht. TPD52-Zugewinne, die nicht den Schwellenwert für eine Amplifikation erreichten (Gains), wurden in weiteren 59 (3,6%) Tumoren gefunden. Polysomien, d.h. eine Vermehrung von Gen- und Zentromer-Signal gleichermaßen, wurden in 211 (13,0%) Fällen detektiert. Repräsentative Bilder von amplifizierten und polysomen Gewebespots zeigt Abbildung 4.

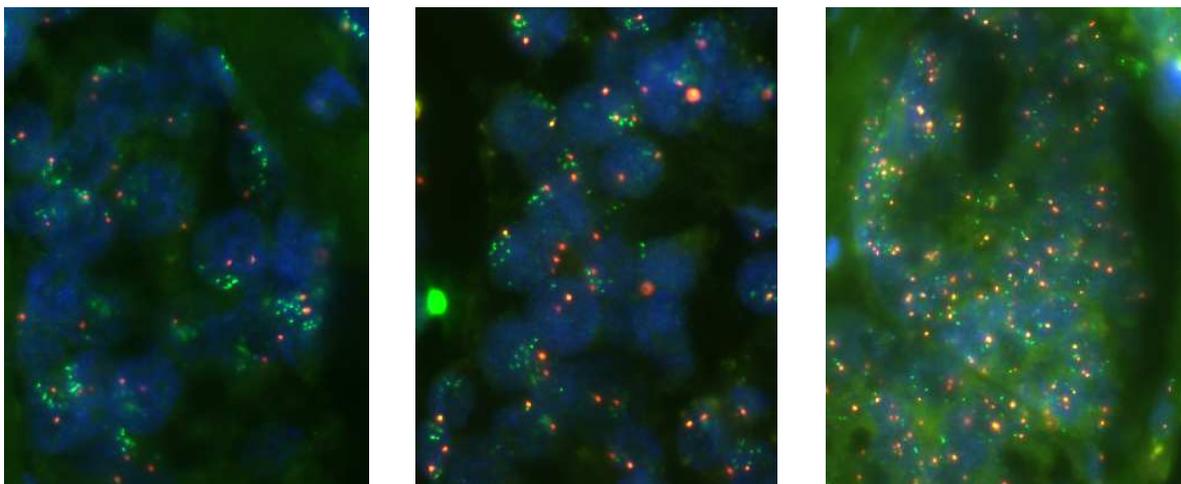


Abbildung 4: FISH-Analyse von Prostatakarzinomgewebe des Hamburger Prostate Cancer Prognosis-Arrays mit grüner TPD52- und roter Zentromer 8-Sonde. Links: TPD52-Amplifikation, Slide F, Spot B2k. Mitte: TPD52-Amplifikation, Slide B, Spot B4b. Rechts: Polysomie, Slide C, Spot D8l.

3.2 Assoziation zu klinisch-pathologischen Parametern

Durch die statistische Auswertung ließen sich für einige klinisch-pathologische Parameter Assoziationen mit dem TPD52-FISH-Status erkennen. Wie der Ergebnis-Tabelle 3 zu entnehmen ist, korrelierte die TPD52-Amplifikationsrate hochsignifikant mit einem hohen Gleason-Score ($p < 0,0001$), fortgeschrittenen Tumorstadien ($p < 0,0001$) sowie erhöhten präoperativen PSA-Serumspiegeln ($p = 0,0007$). Auch bezüglich des Lymphknotenstatus zeichnete sich eine Tendenz ab: Die amplifizierte Tumoren waren anteilmäßig häufiger bei den nodalpositiven (7,1%) als bei den nodalnegativen Tumoren (2,8%) zu finden. Dieser Unterschied war statistisch jedoch nicht signifikant ($p = 0,172$).

Tabelle 3: Korrelation zwischen klinisch-pathologischen Parametern und dem TPD52-Status

	Gesamt	Analysierbar	Polysomie	Gain	Amplifikation	p-Wert
	(n)	(n)	(%)	(%)	(%)	
Alle Tumoren	2525	1617	13,0	3,6	2,1	
PSA-Wert (ng/ml)						
<4	367	231	11,3	2,2	1,7	0,0007
4-10	1255	812	10,0	3,9	1,9	
10-20	540	348	20,1	3,7	2,3	
>20	198	132	13,6	3,8	5,3	
Tumorstadium						
pT2	1525	973	8,8	2,8	0,8	<0,0001
pT3a	518	330	19,7	3,9	4,9	
pT3b	316	218	21,1	6,0	4,1	
pT4	38	26	19,2	7,7	3,9	
Gleason-Score						
≤3+3	1009	631	7,6	2,1	0,3	<0,0001
3+4	1071	701	12,6	3,9	3,0	
4+3	270	179	27,9	7,3	3,9	
≥4+4	48	37	43,2	5,4	10,8	
Nodalstatus						
pN0	1290	834	15,8	3,7	2,8	0,172
pN+	85	56	23,2	3,6	7,1	
Resektionsränder						
Negativ	1882	1201	12,6	3,5	2,2	0,8491
Positiv	513	344	14,2	3,8	2,3	

Aufgrund teilweise fehlender Daten ergeben die Zahlen nicht in allen Kategorien die Summe von 2525.

3.3 Assoziation zur Patientenprognose

Für 1459 der analysierbaren Tumoren lagen Follow-up-Daten vor. Der TPD52-Gen-Status zeigte hierbei einen hochsignifikanten Zusammenhang ($p < 0,0001$) mit dem PSA-rezidivfreien Überleben der Patienten nach radikaler Prostatektomie (siehe Abb. 5). So ließen Patienten mit TPD52-amplifizierten Tumoren das höchste Risiko für einen frühen PSA-Wiederanstieg erkennen, während Patienten mit normalem TPD52-Status das geringste Risiko hierfür aufwiesen. Die Prognose der Patienten, deren Tumoren eine Polysomie bzw. ein TPD52-Gain aufwiesen, lag zwischen diesen beiden Extremen. Ein Vergleich der Gruppen zeigte keinen signifikanten Unterschied in der Prognose von Tumoren mit verschiedenen geringfügigen Kopiezahlzugewinnen (Gains vs. Polysomien: $p = 0,2335$), jedoch einen hochsignifikanten Unterschied zu Tumoren mit einer Amplifikation (Polysomien vs. Amplifikationen: $p = 0,0007$).

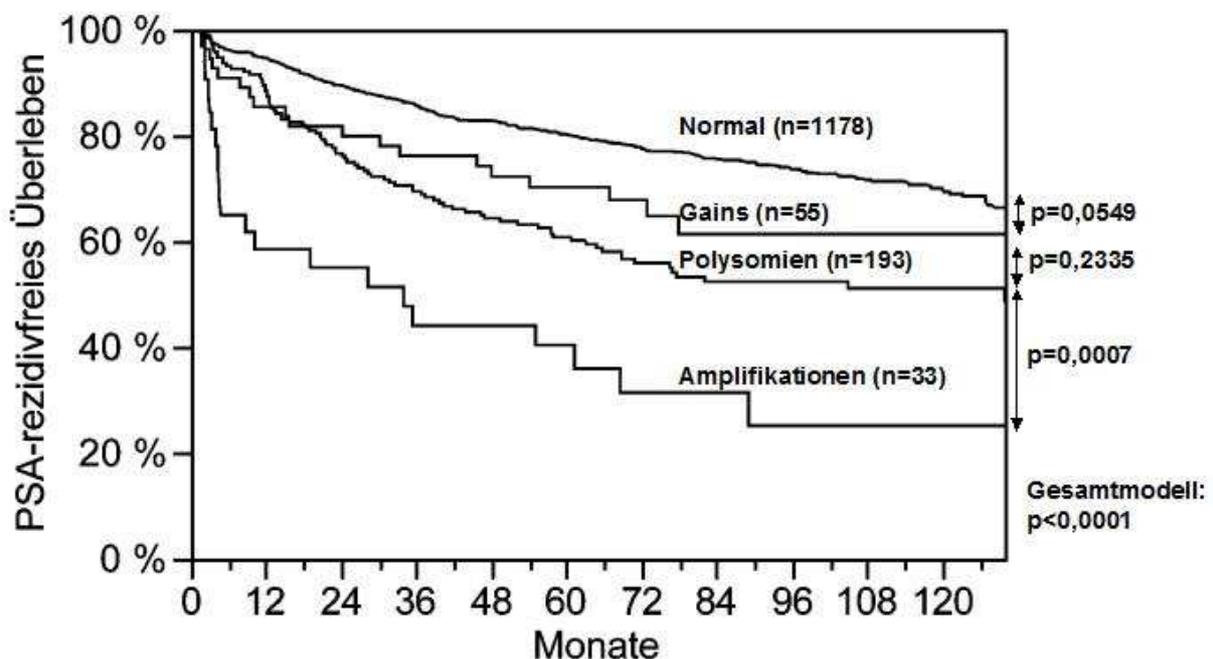


Abbildung 5: Kaplan-Meier-Kurve: Einfluss des TPD52-Gen-Status auf das Risiko des biochemischen Rezidivs nach radikaler Prostatektomie.

In einer Multivariatanalyse (Cox-Regression), die Tumor-Stadium, Gleason-Score und präoperativen PSA-Serumspiegel einschloss, zeigte sich die TPD52-Amplifikation als unabhängig von etablierten Prognosefaktoren ($p=0,0157$) (siehe Tab. 4).

Tabelle 4: Einfluss verschiedener potentieller prognostischer Faktoren auf das Risiko des biochemischen Rezidivs von Prostatakarzinompatienten (Multivariat-Analyse, Cox-Regression)

Parameter	Hazard-Ratio	95% KI	p-Wert *	p-Wert #
PSA-Wert (ng/ml)				
<4 vs. 4-10	1,05	0,73 - 1,48	0,7779	0,0001
4-10 vs. 10-20	0,64	0,51 - 0,81	0,0003	
10-20 vs. >20	0,92	0,69 - 1,22	0,5528	
Tumorstadium				
pT2 vs. pT3a	0,50	0,38 - 0,66	<0.0001	<0.0001
pT3a vs. pT3b	0,48	0,37 - 0,61	<0.0001	
pT3b vs. pT4	0,48	0,31 - 0,78	0,0038	
Gleason score				
$\leq 3+3$ vs. 3+4	0,50	0,36 - 0,67	<0.0001	<0.0001
3+4 vs. 4+3	0,24	0,17 - 0,34	<0.0001	
4+3 vs. $\geq 4+4$	0,76	0,5 - 1,21	0,2432	
TPD52-FISH-Status				
Normal vs. Polysomien	0,91	0,7 - 1,2	0,5061	0,0157
Polysomien vs. Gains	1,05	0,64 - 1,79	0,8626	
Gains vs. Amplifikationen	0,45	0,24 - 0,85	0,0146	

(95% KI = 95%iges Konfidenzintervall, * Subgruppenanalyse, # Gesamtmodell)

3.4 Weitere Assoziationen

Aus vorangegangenen Studien am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf lagen für den Hamburger Prostate Cancer Prognosis-Array Daten zum p53-Status, Ki-67 labeling index und MYC-Status vor.

3.4.1 Assoziation zum p53-Status

Die Ergebnisse der immunhistochemischen (IHC) Bestimmung der nukleären p53-Anreicherung standen für 1593 Tumoren, zu denen ebenfalls TPD52-Daten vorlagen, zur Verfügung. In diesem Kollektiv zeigten 43 Tumoren (2,7%) eine p53-Positivität. Zwischen dem p53-IHC- und dem TPD52-FISH-Status ergab sich ein statistisch hochsignifikanter Zusammenhang ($p=0,0005$). Während der Anteil der TPD52-amplifizierten Spots bei den p53-negativen Geweben 2,0% (31 von 1550) betrug, lag er bei den p53-positiven Geweben bei 4,7% (2 von 43). Ähnlich verhielt es sich bei den Polysomien bzw. Gains: Der Anteil der Tumoren mit TPD52-Alteration betrug 12,6% bzw. 3,3% bei den p53-negativen Geweben, 30,2% bzw. 11,6% bei den p53-positiven Geweben (siehe Abb. 6).

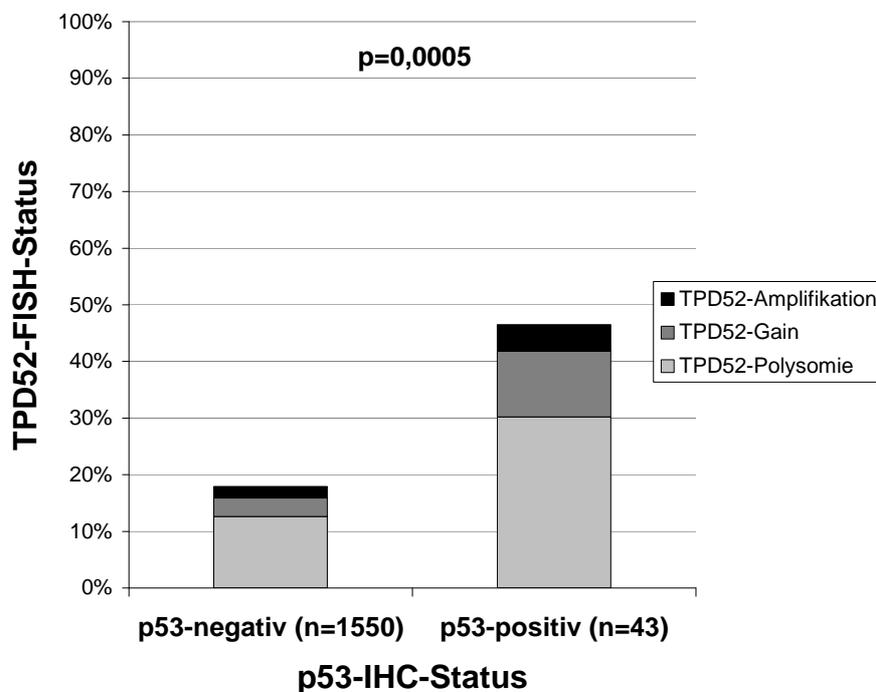


Abbildung 6: Assoziation zwischen dem p53-IHC- und TPD52-FISH-Status.

3.4.2 Assoziation zum Ki-67 labeling index

Zum Vergleich des TPD52-Status mit der Zellproliferation, immunhistochemisch am Ki-67 labeling index gemessen, standen Daten für 1493 Tumoren zur Verfügung. Hierbei zeigten sich nur geringfügige Unterschiede des medianen Ki-67 LI in den einzelnen TPD52-Subgruppen. Bei hoher Fallzahl in den meisten Subgruppen zeigte sich dennoch im Gesamtmodell ein statistisch signifikanter Zusammenhang ($p < 0,0001$). In einer Analyse der Subgruppen zeigte sich der signifikante Unterschied jedoch nur zwischen Tumoren mit normaler Kopiezahl und solchen mit Polysomie (Median „Normal“ = 3,8 vs. Median „Polysomien“ = 6,1; $p < 0,0001$) bzw. zwischen Tumoren mit normaler Kopiezahl und solchen mit erhöhter Kopiezahl (Median „Normal“ = 3,8 vs. Median „Polysomien + Gains + Amplifikationen“ = 5,6; $p < 0,0001$). Die Zusammenhänge sind in Abbildung 7 als Box-Plots dargestellt.

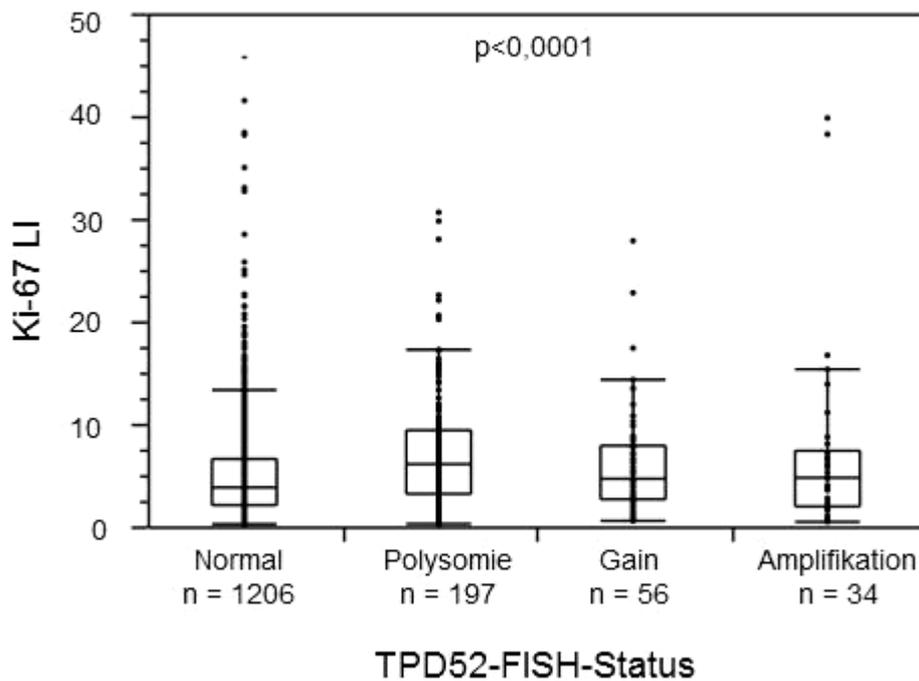


Abbildung 7: Beziehung zwischen dem TPD52-FISH-Status und Zellproliferation, gemessen durch den Ki-67 labeling index.

3.4.3 Assoziation zum MYC-Status

Eine kombinierte Analyse von TPD52- und MYC-FISH-Daten konnte in 1178 Fällen erfolgreich durchgeführt werden. Insgesamt 47 Tumoren zeigten in diesem Kollektiv eine Amplifikation für MYC und / oder TPD52. Davon waren 21 Tumoren nur MYC- und weitere 21 Tumoren nur TPD52-amplifiziert. Eine Ko-Amplifikation zeigte sich lediglich in 5 der amplifizierten Tumoren (10,6%). Die beobachtete Häufigkeit einer TPD52/MYC-Ko-Amplifikation ($5/1178=0,42\%$) war damit etwa 8x größer als die erwartete Häufigkeit, wenn beide Veränderungen komplett unabhängig voneinander auftreten würden (Wahrscheinlichkeit der MYC-Amplifikation: $26/1178=2,2\%$; Wahrscheinlichkeit der TPD52-Amplifikation: $26/1178=2,2\%$; Wahrscheinlichkeit einer unabhängigen Ko-Amplifikation: $2,2\% \times 2,2\% = 0,05\%$). Der auf diese Weise demonstrierte Zusammenhang zwischen TPD52- und MYC-Amplifikation war statistisch hochsignifikant ($p < 0,0001$). Auch im Gesamtmodell wurde zwischen dem MYC- und dem TPD52-Status ein statistisch hochsignifikanter Zusammenhang ($p < 0,0001$) ersichtlich (siehe Abb. 8): Tumoren ohne MYC-spezifischen Zugewinn wiesen in 4,5% der Fälle TPD52-Zugewinne in Form von Gains und Amplifikationen auf, während Tumoren mit MYC-Gain zu 30% und Tumoren mit MYC-Amplifikation zu 38,4% TPD52-Zugewinne erkennen ließen.

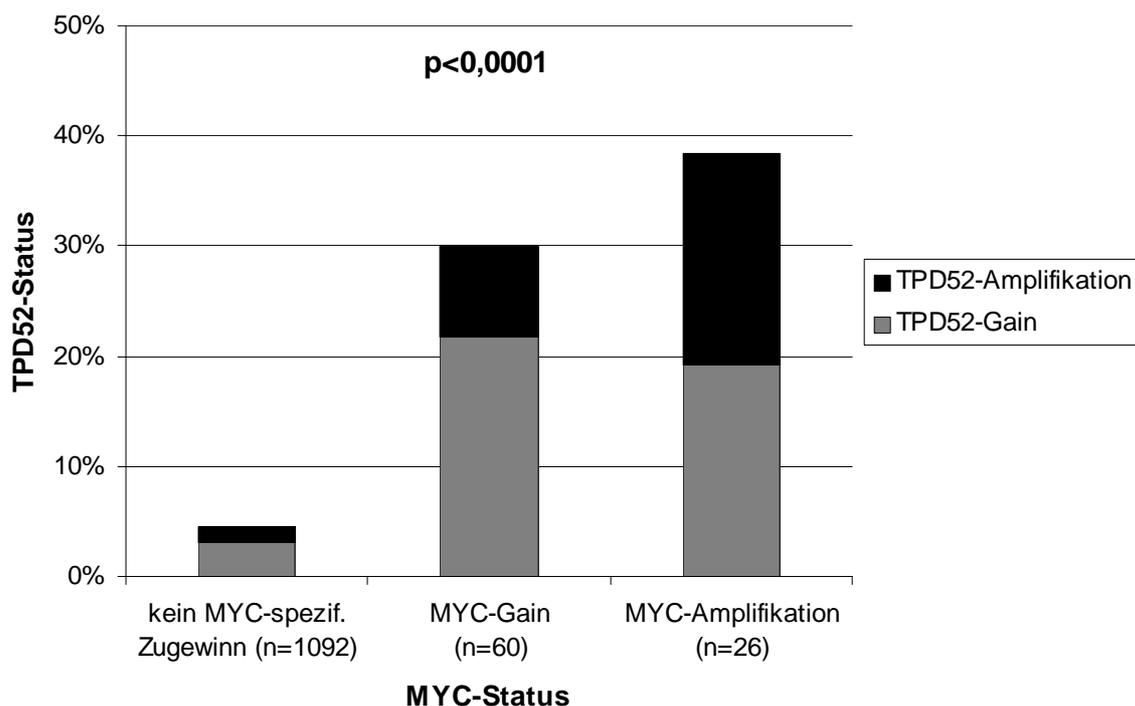


Abbildung 8: Assoziation zwischen dem MYC- und TPD52-Gen-Status.

Gemeinsame Follow-up-Daten waren für TPD52 und MYC in 1055 Fällen vorhanden. Mit Hilfe des Kaplan-Meier-Schätzers konnte graphisch das PSA-rezidivfreie Überleben von Patienten mit bzw. ohne TPD52- bzw. MYC-Zugewinnen dargestellt werden (siehe Abb. 9). Hierbei zeigte sich ein statistisch hochsignifikanter Zusammenhang ($p < 0,0001$).

Während das höchste Risiko für einen frühen PSA-Wiederaufstieg diejenigen Patienten erkennen ließen, deren Tumoren sowohl einen TPD52- als auch einen MYC-Zugewinn (bestehend aus Amplifikationen und Gains) aufwiesen, zeigten Patienten mit Tumoren ohne Gen-spezifischen Zugewinn (d.h. alle Tumoren mit normalem oder polysomem TPD52- und MYC-Status) hierfür das geringste Risiko. Die Überlebenskurve der Patienten mit Tumoren mit alleinigem TPD52- oder alleinigem MYC-Zugewinn lag zwischen diesen beiden Extremen.

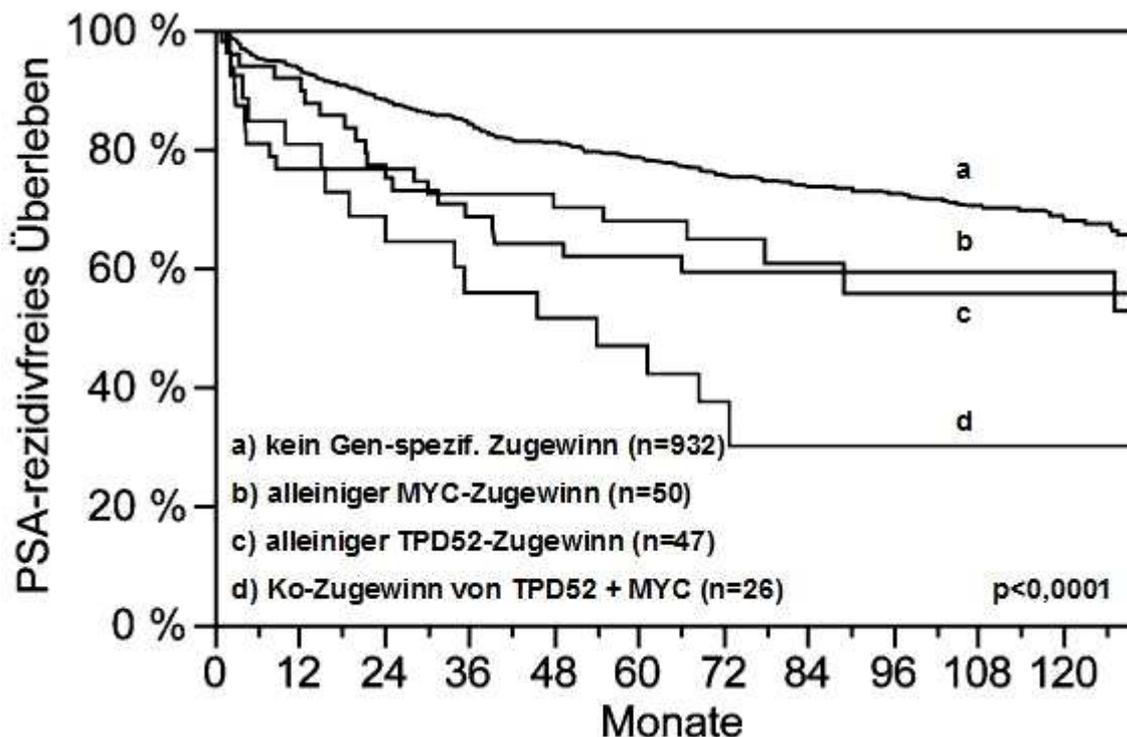


Abbildung 9: Kaplan-Meier-Kurve: Einfluss des TPD52- bzw. MYC-Zugewinns auf das Risiko des biochemischen Rezidivs nach radikaler Prostatektomie.

3.5 TPD52-Gen-Amplifikationen in nicht-malignen Veränderungen und unterschiedlichen Progressionsstadien des Prostatakarzinoms

Von den 359 Tumorgewebeproben des Hamburger Prostate Progression-Arrays konnten 131 (36,5%) erfolgreich mit der FISH ausgewertet werden. Bei den übrigen 228 Tumoren fehlte entweder der Gewebespot auf dem TMA-Schnitt (112 Spots = 31,2%) oder es waren keine Fluoreszenzsignale sichtbar (116 Spots = 32,3%).

In allen Gewebespots von nicht-malignen Läsionen (BPH und PIN) wurden durch die FISH zwei TPD52- sowie zwei Zentromersignale pro Zellkern sichtbar, d.h. es lagen keinerlei Kopiezahlveränderungen vor.

Bei den verschiedenen Progressionsstadien des Prostatakarzinoms fanden sich TPD52-Amplifikationen, Gains und Polysomien zu unterschiedlichen Anteilen. Bei den Lymphknotenmetastasen zeigten sich mit je 15,4% anteilmäßig die meisten Amplifikationen und Gains. Die meisten Polysomien fanden sich mit anteilmäßig jeweils 57,1% bei den Geweben mit einem Gleason-Score von 8-9 sowie bei den hormonrefraktären Prostatakarzinomen. Die hormonrefraktären Karzinome wiesen mit 78,5% den größten Gesamtanteil an genetischen Veränderungen (Summe aus Polysomien, Gains und Amplifikationen) auf. Eine Ergebnisübersicht zeigt Tabelle 5.

Tabelle 5: Prävalenz von TPD52-Genkopiezahlvermehrungen in nicht-malignem und malignem Prostatagewebe anhand des Hamburger Prostate Progression-Arrays

Histologische Diagnose	Gesamt (n)	Analysierbar (n)	Polysomie (%)	Gain (%)	Amplifikation (%)	p-Wert
BPH	50	20	0,0	0,0	0,0	<0,0001
PIN	50	27	0,0	0,0	0,0	
pT2b	50	28	0,0	3,6	0,0	
pT3b	55	22	18,2	0,0	4,6	
Gleason 8-9	56	7	57,1	14,3	0,0	
LK-Metastasen	55	13	15,4	15,4	15,4	
HR	43	14	57,1	14,3	7,1	

4 DISKUSSION

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Prävalenz und klinische Signifikanz von TPD52-Gen-Amplifikationen beim humanen Prostatakarzinom zu bestimmen. Dafür wurden in dieser Studie mehr als 1600 Prostatakarzinomproben erfolgreich analysiert. Hierbei fanden sich in 2,1% der Tumorgewebeproben TPD52-Gen-Amplifikationen. In weiteren 3,6% wurden TPD52-Gains registriert, d.h. Genkopiezahlvermehrungen, die nicht den Schwellenwert für eine Amplifikation erreichten. Polysomien traten in 13,0% der Fälle auf. Folglich wurde ein Gesamt-Zugewinn von TPD52 in 18,7% der Fälle gezählt.

Auf „high level“-Amplifikationen mit mehr als 20 Gensignalen pro Zellkern gab es in dieser Arbeit keinen Hinweis, die Amplifikationen lagen immer im „low level“-Bereich. Im Mittel zeigten amplifizierte Tumoren 6 Genkopien bei einer Spanne von 4-12 Genkopien. Die Tatsache, dass die Kopiezahl in der Region von TPD52 nur in solch geringem Ausmaß vermehrt zu finden ist, wird auch von Rubin und Mitarbeitern bestätigt, die in ihrer FISH-Analyse bei 37 lokalisierten Prostatakarzinomen eine mittlere TPD52-Genkopiezahl von 2,8 (Spanne 2-6) und bei 12 metastasierten hormonrefraktären Karzinomen eine mittlere TPD52-Genkopiezahl von 3,3 (Spanne 2-4) ermittelten [36].

Nur eine weitere Studie hatte bislang zusätzlich zu Rubin und Mitarbeitern die Kopiezahl von TPD52 beim Prostatakarzinom mittels FISH untersucht: Wang und Mitarbeiter analysierten 40 hormonrefraktäre Prostatakarzinome und fanden eine Amplifikation in 27 (68%) Tumoren. Hierbei definierten sie „low level“-Amplifikationen (45% der Fälle) mit 3-4 Gensignalen und „high level“-Amplifikationen (23% der Fälle) mit ≥ 5 Gensignalen pro Zelle oder Signalclustern ohne Einbeziehung der Zentromer-Anzahl [34]. Im Gegensatz zu diesem recht hohen Anteil zeigten die 14 in der vorliegenden Studie analysierbaren hormonrefraktären Karzinome in nur 21% der Fälle einen TPD52-Zugewinn, jedoch mit Zählung nach einer anderen Definition (siehe Abschnitt 2.2.8). Nach der von Wang und Mitarbeitern angewandten Definition (siehe oben) wäre bei diesen 14 Karzinomen ein ähnlich hoher Zugewinn gezählt worden, nämlich „low level“-Amplifikationen in 50% und „high level“-Amplifikationen in 21% der Fälle.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie passen ebenfalls gut zu den Ergebnisse von Studien, die mit klassischer komparativer genomischer Hybridisierung (CGH) Zugewinne im Bereich von 8q im Allgemeinen oder von 8q21 im Speziellen beim humanen Prostatakarzinom untersucht haben. Die CGH ist ein molekularzytogenetisches Screening-Verfahren, bei dem

durch vergleichende Hybridisierung von Tumor- und Normal-DNA genetische Aberrationen auf chromosomaler und subchromosomaler Ebene detektiert werden können [64]. In insgesamt acht zwischen 1998 und 2006 veröffentlichten CGH-Studien mit 16 bis 55 untersuchten Tumoren zeigten sich 8q21-Zugewinne in 6 bis 91% der Fälle (siehe Tab. 6).

Tabelle 6: CGH-Studien, die 8q21-Zugewinne im humanen Prostatakarzinom beschreiben

Autor	Jahr der Veröffentlichung	Analysierbare Tumoren (n)	Anteil der Gains	Anteil der Amplifikationen	Ref.
Ribeiro FR	2006	51	6% (8q)		[65]
Schulz WA	2002	55	18% (8q)		[30]
Teixeira MR	2004	33	37% (8q)		[31]
Cher ML	1998	32	41% (8q12-22.1)		[66]
El Gedaily A	2001	27	48% (8q)	4% (8q21)	[28]
Sattler HP	1999	16	50% (8q)		[67]
Nupponen NN	1998	37	73% (8q)		[29]
Kim SH	2000	23	91% (8q)		[68]

In diesen Studien wurden etwa 10x häufiger Gains (in ca. 40-50% der Fälle) als Amplifikationen (4% der Fälle) gefunden, was mit der in der vorliegenden Studie gefundenen Relation von geringfügigen Kopiezahlzugewinnen (Polysomien und Gains: zusammen 16,6%) im Vergleich zu Amplifikationen (2,1%) in etwa übereinstimmt. Die absoluten Unterschiede wie auch die Schwankungen bei den verschiedenen CGH-Studien sind vermutlich auf verschiedene Schwellenwerte, ungleiche Definitionen der Gains sowie unterschiedliche Aggressivität der untersuchten Tumoren (Bsp: Ribeiro 2006: nur T2/3-Tumoren [65]; Nupponen 1998: nur hormonrefraktäre Tumoren [29]) zurückzuführen.

Die im Rahmen dieser Arbeit gemessenen hochsignifikanten Korrelationen der TPD52-Amplifikation mit einem hohen Gleason-Score, hohen präoperativen PSA-Serumspiegeln sowie fortgeschrittenen Tumorprogressionsstadien bestätigen die Validität der Daten. Diese Zusammenhänge werden durch zahlreiche FISH-Analysen zu 8q bestätigt [24, 26, 27, 36, 69-72]. Hierbei sind ähnliche Ergebnisse von Studien zu 8q21 und 8q24 nicht überraschend, da – wie in dieser Studie in Abschnitt 3.4.3 gezeigt – die Amplikons nicht unabhängig voneinander auftreten, sondern korreliert sind.

Die Tatsache, dass nicht-maligne Veränderungen (BPH und PIN) keinerlei TPD52-Zugewinne zeigten, spricht gegen eine Bedeutung in der initialen Tumorentstehung. Fortgeschrittene bzw. aggressive Karzinome (Gleason-Score 8-9, Lymphknotenmetastasen, HR-Tumoren) wiesen hingegen einen großen Anteil an TPD52-Genkopiezahlveränderungen

auf, was die Relevanz von TPD52 bei der Progression und Metastasierung des Prostatakarzinoms befürwortet. Infolgedessen kann man bei den wenigen lokal begrenzten Prostatakarzinomen (pT2 und pT3), die einen TPD52-Zugewinn aufwiesen, mit einer schlechteren Prognose rechnen.

Tatsächlich wurde im Rahmen dieser Studie eine statistisch hochsignifikante Korrelation der TPD52-Amplifikation mit einem früher eintretenden PSA-Rezidiv aufgedeckt ($p < 0,0001$). Auch diesen Zusammenhang können mehrere Studien zu 8q bestätigen [24, 69, 70, 72], wobei für die Amplikons 8q21 und 8q24 durch ihre Assoziation ein jeweils ähnlicher Effekt auf die Prognose zu finden ist. Interessant ist, dass bereits geringe Kopiezahlerhöhungen (Polysomien, Gains) eine Tendenz zu einem früheren Rezidiv aufwiesen, größere Veränderungen (Amplifikationen) jedoch mit einem noch dramatischeren Ausgang im Zusammenhang standen, welcher statistisch hochsignifikant war ($p = 0,0007$). Die TPD52-Prognoserelevanz war sogar unabhängig von anderen etablierten Markern.

MYC ist ein auf 8q24 lokalisiertes Onkogen, dem eine wichtige Rolle in der Prostatakarzinogenese zugesprochen wird [25]. Naheliegend ist daher die Vermutung, dass die Prognoserelevanz von TPD52 vielleicht nur durch eine MYC-Ko-Alteration zustande gekommen sein könnte. Tatsächlich zeigte sich im Rahmen dieser Studie ein Zusammenhang zwischen TPD52- und MYC-Amplifikation, denn eine Ko-Amplifikation trat 8x häufiger auf, als es bei Unabhängigkeit zu erwarten gewesen wäre. Jedoch zeigten Tumoren mit TPD52-MYC-Ko-Zugewinn in dieser Studie auch das höchste Risiko für ein frühes biochemisches Rezidiv, was auf einen zusätzlichen Effekt des TPD52-Zugewinns hinweist.

Die statistisch signifikante Korrelation der TPD52-Amplifikation mit dem als Proliferationsmarker fungierenden Ki-67 labeling index beruht am ehesten auf der hohen Fallzahl analysierter Tumoren. Die nur geringfügigen Unterschiede des medianen Ki-67 LI in den einzelnen TPD52-Subgruppen sprechen gegen TPD52 als relevanten Proliferationstreiber. Jedoch könnte eine erhöhte Expression des Tumorprotein D52 durchaus mit vermehrtem Wachstum und einer erhöhten Proliferationsrate in Verbindung stehen, wie einige funktionelle Studien an Prostatakarzinomzelllinien gezeigt haben [43-46].

Erwartungsgemäß konnte auch eine Korrelation der TPD52-Amplifikation mit p53-Positivität nachgewiesen werden, da die durch den p53-Funktionsverlust bedingte genetische Instabilität praktisch alle genetische Veränderungen begünstigt [73].

Auch wenn nicht mit Sicherheit davon ausgegangen werden darf, dass TPD52 das Zielgen der Region 8q21 ist, gibt es doch einige Argumente, die es befürworten.

Zum einen demonstrierten funktionelle Studien an TPD52-exprimierenden Prostatakarzinomzelllinien ein beachtliches onkogenes Potential des Tumorproteins D52 (siehe Abschnitt 1.3.2): Neben dem o.g. Anstieg der Wachstums- und Proliferationsrate wurden in vitro verankerungsunabhängiges Zellwachstum, Erniedrigung der Apoptoserate und androgenunabhängige Progression nachgewiesen. Im Mausmodell wurde nach Inokulation dieser genveränderten Zelllinien im Vergleich zu unveränderten Zelllinien beschleunigtes lokales Tumorwachstum aufgezeigt [43-46].

Zum anderen sollte TPD52 trotz des eher gering ausgeprägten Genzugewinns in Tumoren mit TPD52-Veränderung eine relevante Rolle bezüglich der Prostatakarzinogenese nicht aberkannt werden, da schon eine geringfügige Veränderung der Kopiezahl eines oder mehrerer Gene für bestimmte Erkrankungen der biologisch relevante Mechanismus ist. So wurde die genetische Ursache des Down-Syndroms 1959 von Jérôme Lejeune erkannt: Bei den betroffenen Patienten besaß jede Zelle 47 anstelle der üblichen 46 Chromosomen [74]. Dieses überzählige Chromosom 21 bewirkt beim Patienten einen vielschichtigen Symptomenkomplex aus geistiger Retardierung, phänotypischen Auffälligkeiten und Organfehlbildungen [75]. Auch beim Prostatakarzinom findet sich ein Beispiel: Die Mutation eines Allels des Tumorsuppressorgens PTEN (phosphatase and tensin homolog) bewirkt eine Absenkung seiner Expressionsrate unter einen kritischen Schwellenwert [76] („Phänomen der Haploinsuffizienz“). Die Tatsache, dass die Mutation von PTEN in 5-27% der lokalisierten und in 30-58% der metastasierten Prostatakarzinome gefunden wurde, spricht trotz der geringfügige Veränderung auf genetischer Ebene für eine entscheidende Rolle bei der Entstehung und Progression von Prostatakarzinomen [77].

Die in dieser Arbeit genutzte Tissue Microarray-Technologie erlaubt eine Analyse von mehreren tausend paraffinfixierten Gewebeproben mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung oder anderen Methoden in einem einzelnen Experiment. Hierdurch kann auf große Tumorkollektive mit beachtlichen Follow-up-Daten zurückgegriffen werden. Durch die standardisierten und simultanen Analysen wird zusätzlich eine sehr gute Vergleichbarkeit garantiert [5]. Insbesondere bei der Anwendung der TMA-Technik beim Prostatakarzinom, einem histologisch sehr heterogenen Malignom, stellt sich jedoch die Frage, ob die entnommenen Gewebezyylinder die biologische Charakteristik des Gesamttumors repräsentieren. Deswegen wurden zahlreiche Studien durchgeführt, welche die Ergebnisse von TMA-Studien mit den Erkenntnissen von klassischen Großschnitten verglichen. Hierbei zeigte sich, dass alle etablierten Assoziationen molekularer Marker mittels TMA reproduzierbar waren, selbst wenn nur ein einzelner Gewebespot von 0,6 mm Durchmesser

pro Patientenprobe analysiert wurde. Zudem zeigte sich eine Überlegenheit der TMA-Technologie beim Auffinden neuer klinisch relevanter Assoziationen in zahlreichen verschiedenen Tumortypen [78]. Auch der in der vorliegenden Studie eingesetzte Hamburger Prostate Cancer Prognosis-Array wurde in einer Vielzahl von verschiedenen Studien verwendet, um die prognostische Relevanz von beispielsweise p53 [59], EGFR [60], CD10 [61], HER2 und dem Ki-67 labeling index [62] zu belegen.

Trotz der hervorragenden Eignung der TMA-Technik für die FISH-Analyse können methodische Probleme auftreten: Bei verschiedenen Auswertern kann es – bedingt durch schwache Fluoreszenzsignale, Artefakte, zu stark proteolysiertes Gewebe und „persönliche“ Auswertekriterien – zu unterschiedlichen Ergebnissen für die einzelnen Gewebesots kommen. Dieses geschieht v.a. bei Zugewinnen geringeren Ausmaßes. Aus diesem Grund ist es wichtig, dass – wie für diese Arbeit geschehen – nur eine einzelne Person die Auswertung vornimmt und nach präzise festgelegten Kriterien durchführt.

Zusammenfassend zeigen die Daten der vorliegenden Studie, dass TPD52-Zugewinne bei ca. 19% der Prostatakarzinome vorkommen, typischerweise jedoch nur geringgradig ausgeprägt sind. Obwohl Zugewinne von TPD52 auf 8q21 und MYC auf 8q24 häufig assoziiert sind, handelt es sich um unabhängige molekulare Ereignisse. Tumoren mit 8q21-Zugewinnen charakterisieren eine Untergruppe aggressiver Tumoren mit einer hohen Rezidivierungsneigung und entsprechend schlechter Prognose. Impfstoffe gegen TPD52-überexprimierende Tumoren werden zumindest beim Mammakarzinom als Therapeutikum diskutiert. Ihre Verfügbarkeit lässt hoffen, dass, sollte sich diese Therapiemethode in klinischen Studien als wirkungsvoll erweisen, auch Prostatakarzinompatienten – insbesondere im metastasierten und hormonrefraktären Stadium – davon profitieren könnten.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Das Prostatakarzinom ist das am häufigsten diagnostizierte Malignom bei Männern in den Industrienationen. Die molekularen Prozesse, welche die Entstehung dieser Tumorentität begünstigen, gilt es zu identifizieren und für die klinische Routine zu nutzen. Bekanntlich gehören Kopiezahlzugewinne auf Chromosom 8q zu den häufigsten zytogenetischen Veränderungen des Prostatakarzinoms. Vorausgegangene Arbeiten weisen darauf hin, dass das auf 8q21 gelegene Gen TPD52 eine besondere Bedeutung für die Entstehung, Progression und vielleicht auch Therapie des Prostatakarzinoms haben könnte. Um die Auswirkungen von TPD52-Zugewinnen auf den Phänotyp des Prostatakarzinoms und die Patientenprognose besser zu verstehen, wurden TPD52-Kopiezahlveränderungen mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung an einem klinisch und molekular gut charakterisierten Tissue Microarray mit mehr als 3200 Prostatakarzinomproben untersucht. Bei den 1617 analysierbaren Tumoren fanden sich in 2,1% der Fälle TPD52-Amplifikationen mit einer Spanne von 4-12 Genkopien pro Zellkern. Zusätzlich fanden sich zu 3,6% TPD52-Gains und zu 13% Polysomien. Die TPD52-Amplifikation war mit einem hohen Gleason-Score ($p < 0,0001$), fortgeschrittenen Tumorstadien ($p < 0,0001$), erhöhten präoperativen PSA-Serumspiegeln ($p = 0,0007$), p53-Positivität ($p = 0,0005$), einem hohen Ki-67 labeling index ($p < 0,0001$), Amplifikation von MYC ($p < 0,0001$) sowie einem frühen PSA-Rezidiv ($p < 0,0001$) assoziiert. In einer Multivariatanalyse zeigte sich die TPD52-Amplifikation als unabhängiger Prognoseparameter ($p = 0,0157$). Patienten mit Tumoren, die einen gemeinsamen Zugewinn von TPD52 und MYC aufwiesen, zeigten ein deutlich früheres PSA-Rezidiv, als Patienten mit Tumoren, bei denen nur eines der Gene in erhöhter Kopiezahl vorlag ($p < 0,0001$). Einen besonders großen Anteil an TPD52-Zugewinnen zeigten v.a. fortgeschrittene und aggressive Prostatakarzinome (46% bei 13 Lymphknotenmetastasen; 71% bei 7 Tumoren mit Gleason-Score 8-9; 79% bei 14 hormonrefraktären Karzinomen). Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass TPD52-Zugewinne bei ca. 19% der Prostatakarzinome vorkommen, jedoch typischerweise nur geringgradig ausgeprägt sind. Obwohl Zugewinne von TPD52 auf 8q21 und MYC auf 8q24 häufig assoziiert sind, handelt es sich um unabhängige molekulare Ereignisse. Die Tumoren mit 8q21-Zugewinnen charakterisieren eine Untergruppe aggressiver Tumoren mit hoher Rezidivierungsneigung und entsprechend schlechter Prognose. Die Verfügbarkeit von Impfstoffen gegen TPD52-überexprimierende Tumoren lässt hoffen, dass diese im Erfolgsfall klinischer Studien auch als Therapieoption beim Prostatakarzinom gesehen werden könnten.

6 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

95% KI	95%iges Konfidenzintervall
Abb.	Abbildung
AKT	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog
ANOVA	analysis of variance (Test)
Bac	bacterial artificial chromosome (künstliches Bakterienchromosom)
BPH	benigne Prostatahyperplasie
CD10	membrane metallo-endopeptidase (auch: MME)
CGH	komparative genomische Hybridisierung
Chr.	Chromosom
cTNM	klinische TNM-Klassifikation
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddH ₂ O	destilliertes und autoklaviertes Wasser
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	epidermal growth factor receptor
ERG	v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog (avian)
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat

GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
GVO	gentechnisch veränderter Organismus
HCl	Chlorwasserstoff (bildet in Wasser gelöst Salzsäure)
HER-2/neu	human epidermal growth factor receptor 2
HPC1	hereditäres Prostatakarzinom 1
HPCX	hereditäres Prostatakarzinom X
HR	hormonrefraktäres Karzinom
IHC	Immunhistochemie
i.v.	intravenös
Ki-67 LI	Ki-67 labeling index
LB-Medium	Luria-Broth-Base
LH-RH	luteinisierendes Hormon Releasing-Hormon
LK-Metastasen	Lymphknoten-Metastasen
M	molare Masse
MAL2	mal, T-cell differentiation protein 2
mD52	murines D52
MYC	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)
n	Anzahl n untersuchter / analysierbarer Proben
NaSCN	Natriumthiocyanat
neg.	negativ
NP40	Octylphenoxypolyethoxyethanol
p	den kurzen Arm des Chromosoms betreffend
p53	Protein p53
pBac	Plasmid-basiertes künstliches Bakterienchromosom
PBS	phosphate-buffered saline
PC-1	human prostate and colon gene-1 (Spleißingvariante zu TPD52)
PCAP	prostate cancer predisposing locus

pH	pondus Hydrogenii
PIN	prostatistische intraepitheliale Neoplasie
Pol I	DNA-Polymerase I
pos.	positiv
PrLZ	prostate leucine zipper (Spleißingvariante zu TPD52)
PSA	prostataspezifisches Antigen
PSCA	prostate stem cell antigen
PSMA	prostate specific membrane antigen
PTEN	phosphatase and tensin homolog
pTNM	pathologische TNM-Klassifikation
p-Wert	p=probability, engl. für Wahrscheinlichkeit; Signifikanzwert
q	den langen Arm des Chromosoms betreffend
SCC	Saline-Sodium-Citrat
spezif.	spezifisch
Tab.	Tabelle
TMA	Tissue Microarray
TMPRSS2	transmembrane protease, serine 2
TNM	Tumor-, Nodus- und Metastasen-Stadium (für Klassifikation)
TPD52	Tumorprotein D52
TRAMP	transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate
TUR	transurethrale Resektion
Tween20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
VEGF	vascular endothelial growth factor

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Jemal, A, Bray, F, Center, MM, et al. *Global cancer statistics*. CA Cancer J Clin, 2011. 61(2): p. 69-90.
2. Hautmann, R, Huland, H. *Urologie*. 4. Aufl., Springer Medizin Verlag, Heidelberg 2010. p. 238-50.
3. Martini-Klinik am UKE GmbH. *Strukturierter Qualitätsbericht für das Berichtsjahr 2010*. Hamburg 2011.
4. Eble, JL, Sauter, G, Epstein, JI, et al. *Pathology and genetics of tumours of the urinary system and male genital organs. World Health Organization classification of tumours*. IARC, Lyon 2004. p. 159-216.
5. Rübber, H. *Uroonkologie*. 5. Aufl., Springer Medizin Verlag, Heidelberg 2009.
6. Adams, J. *A case of scirrhous of the prostate gland, with a corresponding affection of the lymphatic glands in the lumbar region and in the pelvis*. The Lancet, 1853. 1: p. 393.
7. Hemminki, K, Sundquist, J, Bermejo, JL. *How common is familial cancer?* Ann Oncol, 2008. 19(1): p. 163-7.
8. Whittemore, AS, Kolonel, LN, Wu, AH, et al. *Prostate cancer in relation to diet, physical activity, and body size in blacks, whites, and Asians in the United States and Canada*. J Natl Cancer Inst, 1995. 87(9): p. 652-61.
9. Ross, RK, Paganini-Hill, A, Henderson, BE. *The etiology of prostate cancer: what does the epidemiology suggest?* Prostate, 1983. 4(4): p. 333-44.
10. Klein, EA, Silverman, R. *Inflammation, infection, and prostate cancer*. Curr Opin Urol, 2008. 18(3): p. 315-9.
11. Gleason, DF, Mellinger, GT. *Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging*. J Urol, 1974. 111(1): p. 58-64.
12. Humphrey, PA. *Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate*. Mod Pathol, 2004. 17(3): p. 292-306.
13. Epstein, JI, Allsbrook, WC, Jr., Amin, MB, Egevad, LL. *The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma*. Am J Surg Pathol, 2005. 29(9): p. 1228-42.
14. Schmelz, HU, Sparwasser, C, Weidner, W. *Facharztwissen Urologie - Differenzierte Diagnostik und Therapie*. 2. Aufl., Springer Medizin Verlag, Heidelberg 2010. p. 313-75.
15. Heidenreich, A, Aus, G, Bolla, M, et al. *EAU guidelines on prostate cancer*. Eur Urol, 2008. 53(1): p. 68-80.
16. Huggins, C. *Endocrine Control of Prostatic Cancer*. Science, 1943. 97(2529): p. 541-4.
17. Tannock, IF, de Wit, R, Berry, WR, et al. *Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer*. N Engl J Med, 2004. 351(15): p. 1502-12.
18. Benson, JD, Chen, YN, Cornell-Kennon, SA, et al. *Validating cancer drug targets*. Nature, 2006. 441(7092): p. 451-6.
19. Ross, JS, Gray, KE, Webb, IJ, et al. *Antibody-based therapeutics: focus on prostate cancer*. Cancer Metastasis Rev, 2005. 24(4): p. 521-37.
20. Schlomm, T, Erbersdobler, A, Mirlacher, M, Sauter, G. *Molecular staging of prostate cancer in the year 2007*. World J Urol, 2007. 25(1): p. 19-30.
21. Lane, DP. *Cancer. p53, guardian of the genome*. Nature, 1992. 358(6381): p. 15-6.
22. Tomlins, SA, Rhodes, DR, Perner, S, et al. *Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer*. Science, 2005. 310(5748): p. 644-8.

23. Sun, J, Liu, W, Adams, TS, et al. *DNA copy number alterations in prostate cancers: a combined analysis of published CGH studies*. Prostate, 2007. 67(7): p. 692-700.
24. El Gammal, AT, Bruchmann, M, Zustin, J, et al. *Chromosome 8p deletions and 8q gains are associated with tumor progression and poor prognosis in prostate cancer*. Clin Cancer Res, 2010. 16(1): p. 56-64.
25. Koh, CM, Bieberich, CJ, Dang, CV, et al. *MYC and Prostate Cancer*. Genes Cancer, 2010. 1(6): p. 617-28.
26. Miyoshi, Y, Uemura, H, Fujinami, K, et al. *Fluorescence in situ hybridization evaluation of c-myc and androgen receptor gene amplification and chromosomal anomalies in prostate cancer in Japanese patients*. Prostate, 2000. 43(3): p. 225-32.
27. Jenkins, RB, Qian, J, Lieber, MM, Bostwick, DG. *Detection of c-myc oncogene amplification and chromosomal anomalies in metastatic prostatic carcinoma by fluorescence in situ hybridization*. Cancer Res, 1997. 57(3): p. 524-31.
28. El Gedaily, A, Bubendorf, L, Willi, N, et al. *Discovery of new DNA amplification loci in prostate cancer by comparative genomic hybridization*. Prostate, 2001. 46(3): p. 184-90.
29. Nupponen, NN, Kakkola, L, Koivisto, P, Visakorpi, T. *Genetic alterations in hormone-refractory recurrent prostate carcinomas*. Am J Pathol, 1998. 153(1): p. 141-8.
30. Schulz, WA, Elo, JP, Florl, AR, et al. *Genomewide DNA hypomethylation is associated with alterations on chromosome 8 in prostate carcinoma*. Genes Chromosomes Cancer, 2002. 35(1): p. 58-65.
31. Teixeira, MR, Ribeiro, FR, Eknaes, M, et al. *Genomic analysis of prostate carcinoma specimens obtained via ultrasound-guided needle biopsy may be of use in preoperative decision-making*. Cancer, 2004. 101(8): p. 1786-93.
32. van Duin, M, van Marion, R, Vissers, K, et al. *High-resolution array comparative genomic hybridization of chromosome arm 8q: evaluation of genetic progression markers for prostate cancer*. Genes Chromosomes Cancer, 2005. 44(4): p. 438-49.
33. Jiang, M, Li, M, Fu, X, et al. *Simultaneously detection of genomic and expression alterations in prostate cancer using cDNA microarray*. Prostate, 2008. 68(14): p. 1496-509.
34. Wang, R, Xu, J, Saramaki, O, et al. *PrLZ, a novel prostate-specific and androgen-responsive gene of the TPD52 family, amplified in chromosome 8q21.1 and overexpressed in human prostate cancer*. Cancer Res, 2004. 64(5): p. 1589-94.
35. Wang, R, Xu, J, Mabeesh, N, et al. *PrLZ is expressed in normal prostate development and in human prostate cancer progression*. Clin Cancer Res, 2007. 13(20): p. 6040-8.
36. Rubin, MA, Varambally, S, Beroukhim, R, et al. *Overexpression, amplification, and androgen regulation of TPD52 in prostate cancer*. Cancer Res, 2004. 64(11): p. 3814-22.
37. Della-Franca, A, Byrne, JA. *TPD52 (tumor protein D52)*. Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol, 2010. Zugriff online im Internet, Stand: 03.10.2011, URL: <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/TPD52ID42676ch8q21.html>.
38. Byrne, JA, Mattei, MG, Basset, P. *Definition of the tumor protein D52 (TPD52) gene family through cloning of D52 homologues in human (hD53) and mouse (mD52)*. Genomics, 1996. 35(3): p. 523-32.
39. Nelson, PS, Clegg, N, Arnold, H, et al. *The program of androgen-responsive genes in neoplastic prostate epithelium*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. 99(18): p. 11890-5.
40. Wang, J, Zhang, H, Liang, RX, et al. *Identification and characterization of the novel human prostate cancer-specific PC-1 gene promoter*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. 357(1): p. 8-13.

41. Boutros, R, Fanayan, S, Shehata, M, Byrne, JA. *The tumor protein D52 family: many pieces, many puzzles*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. 325(4): p. 1115-21.
42. Clark, DP, Pazdernik, NJ. *Molekulare Biotechnologie - Grundlagen und Anwendungen*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2009.
43. Zhang, H, Wang, J, Pang, B, et al. *PC-1/PrLZ contributes to malignant progression in prostate cancer*. Cancer Res, 2007. 67(18): p. 8906-13.
44. Li, L, Zhang, D, Zhang, L, et al. *PrLZ expression is associated with the progression of prostate cancer LNCaP cells*. Mol Carcinog, 2009. 48(5): p. 432-40.
45. Ummanni, R, Teller, S, Junker, H, et al. *Altered expression of tumor protein D52 regulates apoptosis and migration of prostate cancer cells*. FEBS J, 2008. 275(22): p. 5703-13.
46. Zhang, D, He, D, Xue, Y, et al. *PrLZ protects prostate cancer cells from apoptosis induced by androgen deprivation via the activation of Stat3/Bcl-2 pathway*. Cancer Res, 2011. 71(6): p. 2193-202.
47. Byrne, JA, Tomasetto, C, Garnier, JM, et al. *A screening method to identify genes commonly overexpressed in carcinomas and the identification of a novel complementary DNA sequence*. Cancer Res, 1995. 55(13): p. 2896-903.
48. Chen, SL, Maroulakou, IG, Green, JE, et al. *Isolation and characterization of a novel gene expressed in multiple cancers*. Oncogene, 1996. 12(4): p. 741-51.
49. Byrne, JA, Balleine, RL, Schoenberg Fejzo, M, et al. *Tumor protein D52 (TPD52) is overexpressed and a gene amplification target in ovarian cancer*. Int J Cancer, 2005. 117(6): p. 1049-54.
50. Byrne, JA, Maleki, S, Hardy, JR, et al. *MAL2 and tumor protein D52 (TPD52) are frequently overexpressed in ovarian carcinoma, but differentially associated with histological subtype and patient outcome*. BMC Cancer, 2010. 10: p. 497.
51. Petrova, DT, Asif, AR, Armstrong, VW, et al. *Expression of chloride intracellular channel protein 1 (CLIC1) and tumor protein D52 (TPD52) as potential biomarkers for colorectal cancer*. Clin Biochem, 2008. 41(14-15): p. 1224-36.
52. Alagaratnam, S, Hardy, JR, Lothe, RA, et al. *TPD52, a candidate gene from genomic studies, is overexpressed in testicular germ cell tumours*. Mol Cell Endocrinol, 2009. 306(1-2): p. 75-80.
53. Tiacci, E, Orvietani, PL, Bigerna, B, et al. *Tumor protein D52 (TPD52): a novel B-cell/plasma-cell molecule with unique expression pattern and Ca(2+)-dependent association with annexin VI*. Blood, 2005. 105(7): p. 2812-20.
54. Balleine, RL, Fejzo, MS, Sathasivam, P, et al. *The hD52 (TPD52) gene is a candidate target gene for events resulting in increased 8q21 copy number in human breast carcinoma*. Genes Chromosomes Cancer, 2000. 29(1): p. 48-57.
55. Payton, LA, Lewis, JD, Byrne, JA, Bright, RK. *Vaccination with metastasis-related tumor associated antigen TPD52 and CpG/ODN induces protective tumor immunity*. Cancer Immunol Immunother, 2008. 57(6): p. 799-811.
56. Mirshahidi, S, Kramer, VG, Whitney, JB, et al. *Overlapping synthetic peptides encoding TPD52 as breast cancer vaccine in mice: prolonged survival*. Vaccine, 2009. 27(12): p. 1825-33.
57. Scanlan, MJ, Gout, I, Gordon, CM, et al. *Humoral immunity to human breast cancer: antigen definition and quantitative analysis of mRNA expression*. Cancer Immun, 2001. 1: p. 4.
58. Lewis, JD, Sullivan, LA, Byrne, JA, et al. *Memory and cellular immunity induced by a DNA vaccine encoding self antigen TPD52 administered with soluble GM-CSF*. Cancer Immunol Immunother, 2009. 58(8): p. 1337-49.
59. Schlomm, T, Iwers, L, Kirstein, P, et al. *Clinical significance of p53 alterations in surgically treated prostate cancers*. Mod Pathol, 2008. 21(11): p. 1371-8.

60. Schlomm, T, Kirstein, P, Iwers, L, et al. *Clinical significance of epidermal growth factor receptor protein overexpression and gene copy number gains in prostate cancer*. Clin Cancer Res, 2007. 13(22 Pt 1): p. 6579-84.
61. Fleischmann, A, Schlomm, T, Huland, H, et al. *Distinct subcellular expression patterns of neutral endopeptidase (CD10) in prostate cancer predict diverging clinical courses in surgically treated patients*. Clin Cancer Res, 2008. 14(23): p. 7838-42.
62. Minner, S, Jessen, B, Stiedenroth, L, et al. *Low level HER2 overexpression is associated with rapid tumor cell proliferation and poor prognosis in prostate cancer*. Clin Cancer Res, 2010. 16(5): p. 1553-60.
63. Schlomm, T, Chun, F, Erbersdobler, A. *From gene to clinic: TMA-based clinical validation of molecular markers in prostate cancer*. Methods Mol Biol, 2010. 664: p. 177-89.
64. Petersen, I, Schwendel, A, Bockmuhl, U, Dietel, M. *Die komparative genomische Hybridisierung. Eine Screeningmethode in der genetischen Tumordiagnostik*. Pathologe, 1996. 17(5): p. 333-41.
65. Ribeiro, FR, Diep, CB, Jeronimo, C, et al. *Statistical dissection of genetic pathways involved in prostate carcinogenesis*. Genes Chromosomes Cancer, 2006. 45(2): p. 154-63.
66. Cher, ML, Lewis, PE, Banerjee, M, et al. *A similar pattern of chromosomal alterations in prostate cancers from African-Americans and Caucasian Americans*. Clin Cancer Res, 1998. 4(5): p. 1273-8.
67. Sattler, HP, Rohde, V, Bonkhoff, H, et al. *Comparative genomic hybridization reveals DNA copy number gains to frequently occur in human prostate cancer*. Prostate, 1999. 39(2): p. 79-86.
68. Kim, SH, Kim, MS, Jensen, RH. *Genetic alterations in microdissected prostate cancer cells by comparative genomic hybridization*. Prostate Cancer Prostatic Dis, 2000. 3(2): p. 110-114.
69. Sato, K, Qian, J, Slezak, JM, et al. *Clinical significance of alterations of chromosome 8 in high-grade, advanced, nonmetastatic prostate carcinoma*. J Natl Cancer Inst, 1999. 91(18): p. 1574-80.
70. Qian, J, Hirasawa, K, Bostwick, DG, et al. *Loss of p53 and c-myc overrepresentation in stage T(2-3)N(1-3)M(0) prostate cancer are potential markers for cancer progression*. Mod Pathol, 2002. 15(1): p. 35-44.
71. Das, K, Lau, W, Sivaswaren, C, et al. *Chromosomal changes in prostate cancer: a fluorescence in situ hybridization study*. Clin Genet, 2005. 68(1): p. 40-7.
72. Ribeiro, FR, Henrique, R, Martins, AT, et al. *Relative copy number gain of MYC in diagnostic needle biopsies is an independent prognostic factor for prostate cancer patients*. Eur Urol, 2007. 52(1): p. 116-25.
73. Vogelstein, B, Lane, D, Levine, AJ. *Surfing the p53 network*. Nature, 2000. 408(6810): p. 307-10.
74. Lejeune, J, Gautier, M, Turpin, R. *Étude des chromosomes somatiques de neuf enfants mongoliens*. C R Hebd Seances Acad Sci, 1959. 248(11): p. 1721-2.
75. Buselmaier, W, Tariverdian, G. *Humangenetik*. 4. Aufl., Springer Medizin Verlag, Heidelberg 2007. p. 133-5.
76. Hiddemann, W, Bartram, C. *Die Onkologie - Teil 1*. 2. Aufl., Springer Medizin Verlag, Heidelberg 2010.
77. Elo, JP, Visakorpi, T. *Molecular genetics of prostate cancer*. Ann Med, 2001. 33(2): p. 130-41.
78. Sauter, G. *Representativity of TMA studies*. Methods Mol Biol, 2010. 664: p. 27-35.

8 DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die diese Arbeit ermöglicht und zum Gelingen maßgeblich beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt:

Prof. Dr. Guido Sauter

... für die Möglichkeit, an seinem Institut die Untersuchungen zu diesem interessanten Thema unter sehr guten Voraussetzungen durchzuführen,

PD Dr. Ronald Simon

... für die enthusiastische Leitung und fachkundige Betreuung dieser Arbeit,

Lia Burkhardt, Antje Krohn und insbesondere Frederik Holst

... für die unermüdliche Unterstützung bei der Durchführung meiner Experimente und dem Mikroskopieren,

Dr. Pierre Tennstedt

... für seine engagierte Assistenz bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse,

Silvia Schnöger und Sascha Eghtessadi aus dem „FISH-Labor“

... für die gute Zusammenarbeit

und last but not least meiner Familie

... für die Ermöglichung meines Wunschstudiums, ihr Vertrauen in meine Fähigkeiten und Beistand in allen Lebenslagen.

9 LEBENSLAUF

... entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

10 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.

Unterschrift: 