

02.UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Aus dem Institut für Pathologie

Direktor: Prof. Dr. G. Sauter

Heterogenität von p53 Mutationen beim Prostatakarzinom

Dissertation

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

vorgelegt von:

Johanna Maria Hanisch
aus Frankfurt (Oder)

Hamburg 2014

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 02.02.2015**

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

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

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. A. Marx

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	S. 4
1.1. Prostatakarzinom	S. 4
1.2. Tumorsuppressor p53	S. 8
1.3. Heterogenität	S. 11
2. Material und Methoden	S. 12
2.1. Makroskopie	S. 12
2.2. Heterogenitäts-TMAs	S. 14
2.3. Immunhistochemie	S. 17
2.4. Auswertung der Immunhistochemie	S. 18
2.4.1. Auswertung der TMAs pro spot	S. 18
2.4.2. Auswertung der TMAs auf Tumorebene	S. 19
2.4.3. Heterogenität in Metastasen	S. 20
3. Ergebnisse	S.21
3.1. p53-Status gesamt	S.21
3.2. p53-Status in unifokalen Prostatakarzinomen	S.21
3.3. p53-Status in multifokalen Prostatakarzinomen	S.22
3.4. p53-Status in Metastasen	S.22
3.5. Vergleich Primärtumor versus Metastasen	S.22
4. Diskussion	S.25
5. Zusammenfassung	S.32
6. Abkürzungsverzeichnis	S.34
7. Literaturverzeichnis	S.35
8. Danksagung	S.41
9. Lebenslauf	S.42
10. Eidesstattliche Erklärung	S.43

1. Einleitung

1.1 Prostatakarzinom

Laut Krebsforschungszentrum wurde im Jahr 2010 bei rund 65.000 Patienten in Deutschland ein Prostatakarzinom diagnostiziert. Das Prostatakarzinom ist somit der häufigste Tumor bei Männern (Laibach-Kuehner 2014).

In Autopsiestudien finden sich bei vollständiger Aufarbeitung von Prostaten bei circa 33% der 60jährigen und bei bis zu 90% der 90jährigen Patienten ein latentes Prostatakarzinom, welches nicht Todesursache war und keine Symptome verursachte (Haag, Hanhart, Mueller 2010/11).

Die meisten Prostatakarzinome werden zu Lebzeiten der Patienten nicht entdeckt. Dennoch ist es der bei Männern am häufigsten diagnostizierte maligne Tumor und die zweithäufigste tumorbedingte Todesursache. Das Lebenszeitrisiko, an einem klinisch symptomatischen Prostatakarzinom zu erkranken, beträgt 10% (Haag et al. 2010/11).

Neben der digital-rektalen Untersuchung und bildgebenden Verfahren (Sonographie transrektal/transabdominal, MRT, PET/CT) wird als Standardmethode die Messung des PSA-Wertes im Serum zur Erkennung von Veränderungen der Prostata genutzt.

Das PSA ist ein Protein, welches ausschließlich von Prostatagewebe gebildet wird. Es kommt physiologischer Weise im Blut in drei Fraktionen vor, entsteht aber vermehrt bei Entzündungen, nach Manipulationen des Urogenitaltraktes oder aber bei Karzinomerkrankung (de Gruyter 2007).

Ein normaler PSA-Wert ($<2,5\mu\text{g/l}$, altersabhängig maximal $4,0\mu\text{g/l}$) schließt ein Karzinom nicht aus; erhöhte Werte korrelieren jedoch mit steigendem Risiko einer Prostatakarzinomentstehung bzw. Tumorprogression (Thompson et al. 2004). Weder die Geschwindigkeit, mit der das PSA ansteigt, noch die Dopplungszeit des selbigen können die pathologische Progression vorhersagen. Daher ist die jährliche Biopsieentnahme bei fraglicher Progression des Tumors nicht durch serologische Untersuchungen zu ersetzen (Ross et al. 2010).

Die geringe Spezifität des PSA für Prostatakarzinome führt dagegen zu unnötigen Biopsien und erhöht den Anteil der Patienten, unter den neu diagnostizierten Prostatkarzinompatienten, die eigentlich keiner Therapie bedürfen. Deshalb ist die Entwicklung neuer Biomarker relevant. Bisher konnte jedoch kein singulärer Marker

gefunden werden, der das PSA in seiner Rolle als Marker für die Detektion und Progression von Prostatakarzinomen ablösen kann (Cary u. Cooperberg 2013).

Außerdem besteht ein großer Bedarf an Parametern, die es erlauben, Tumoren mit ungünstiger Prognose von denjenigen mit günstiger Prognose zu unterscheiden. Die aktuelle Situation stellt sich so dar, dass Patienten, bei denen eine günstige Prognose vermutet werden darf, häufig konservativ behandelt werden. Das geschieht im Rahmen einer sogenannten „active surveillance“, einer engmaschigen Überwachung, die eine Progression des Tumors aufdecken soll und somit die Notwendigkeit einer invasiven Therapie gegebenenfalls feststellt. Dieser Trend, Patienten mit Prostatakrebs mittels active surveillance zu führen, stützt sich auf die Annahme, dass die Lebensqualität der Patienten unter active surveillance kurzzeitig besser ist als jener mit invasiven Therapien.

Besondere Risiken der invasiven Therapie mittels Prostatektomie sind Inkontinenz und Impotenz. Folglich sind Risiken und Nutzen der Prostatektomie im Einzelfall abzuwägen. Die Entscheidung für active surveillance birgt allerdings eine erhebliche psychosoziale Komponente. Einige Patienten leiden beispielsweise stark unter der Angst vor dem fortschreitenden Tumor (Dall’Era et al. 2012).

Gegenwärtig wird das Verfahren der active surveillance bei Patienten eingesetzt, welche ein PSA von unter 10ng/ml und in maximal 30% der Stanzbiopsien einen maximalen Gleason-Score von 3+4=7 aufweisen. Der Gleason-Score ist ein Instrument zur feingeweblichen Bewertung von Prostatakarzinomen. Mit Hilfe des Scores wird der Entdifferenzierungsgrad des Tumors (Grad 2-10) beurteilt, wobei zwei als hochdifferenziert und 10 als undifferenziert/anaplastisch definiert ist (Haag et al. 20010/11).

Patienten mit einem höheren PSA oder einem ungünstigeren Gleason-Score bzw. mehr Tumolvolumen in den Stanzbiopsien wird eine potentiell kurative Therapie, meist eine Operation, bei höherem Alter eine Strahlentherapie empfohlen.

Das Vorliegen einer günstigen klinisch-pathologischen Risikokonstellation ist allerdings keine Garantie für einen günstigen Krankheitsverlauf. Immer wieder findet man bei Patienten, welche den Kriterien für eine active surveillance entsprochen hätten, nach dennoch durchgeführter Prostatektomie eine wesentlich ungünstigere Tumorkonstellation im Prostatektomiepräparat als angenommen. Suardi et al. (2010) fand in 7 bis 10% der von ihnen untersuchten 874 Patienten, die den von van den

Bergh et al. bzw. Carter et al. vorgeschlagenen Kriterien der active surveillance entsprachen, einen fortgeschrittenen Tumor. Fortgeschritten wurde in diesem Fall definiert als kapselüberschreitend, Samenblasen- und oder Lymphknoten infiltrierend. Bei bis zu 28% der Patienten zeigte sich nach Prostatektomie in der Histologie ein Gleason-Score von 7 bis 10.

Es ist auch davon auszugehen, dass die histologische Beurteilung des Tumorgewebes allein für eine Einschätzung des biologischen Aggressionspotentials eines Tumors nicht ausreicht.

Berechtigte Hoffnung besteht darin, dass molekulare Veränderungen gefunden werden, die mehr über das erwartete Tumorverhalten aussagen als morphologische Parameter. Fortschritte in den Methoden der Genomuntersuchungen der letzten Jahre haben zu gravierenden Erweiterungen in Kenntnissen über das Prostatakarzinom geführt. Dazu zählen die vorhandenen Möglichkeiten des „next generation sequencing“. Diese Methoden erlauben eine gleichzeitige, vollständige Analyse des Genoms sowie die Analyse quantitativer Genomveränderungen, DNA-Mutationen, Methylierungsmustern und Expression von RNA oder MikroRNA. Die parallele Sequenzablesung macht es möglich, in kurzer Zeit Millionen von Fragmenten zu generieren, welche jedoch im Vergleich zur Methode von Sanger (650-800 bp) kleine Fragmente (35-250 bp) sind und somit ein erhöhtes Fehlerpotential aufweisen (Mardis 2008, Reis-Filho 2009). Mittlerweile wurden mehr als 300 Prostatakarzinome mit neuartigen Methoden profiliert.

Die Erkenntnisse insgesamt zeigen: quantitative Genomveränderungen kommen häufig vor, wobei Deletionen wesentlich häufiger sind als Amplifikationen, auch Rearrangements, insbesondere Translokationen, kommen beim Prostatakarzinom besonders häufig vor.

Die vor allem an der Karzinomentstehung beteiligten Gene werden als Onkogene bzw. Tumorsuppressorgene bezeichnet. Sie spielen eine wichtige Rolle in der Regulation von Zellwachstum und in der Regulation, Differenzierung und Kontrolle der Apoptose und Reparaturmechanismen. Der Verlust von Tumorsuppressorgenen durch Deletionen oder die Überexpression von Onkogenen durch Amplifikationen führen zum Verlust ihrer Funktionen (Sauter 1998). Eher selten sind Mutationen spezifischer Gene. Studien verweisen darauf, dass Deletionen von PTEN, 8p, 17p, 6q,

5q oder 3p bei Prostatakarzinomen mit einer deutlich ungünstigeren Prognose assoziiert sind (Lotan et al. 2011, Yoshimoto et al. 2007). Im Gegensatz zu anderen Tumoren wurden beim Prostatakarziom keine mit relevanter Häufigkeit auftretenden prostatakarzinomspezifischen homogenen Mutationen ausreichend nachgewiesen.

Mutationsanalysen ergaben, dass keine einzige Mutation häufiger als in 10% der Karzinome vorkommt und dass die Mutationen im Wesentlichen unspezifische Tumorgene, wie zum Beispiel p53, betreffen.

Zu dieser Aussage gibt es einige Ausnahmen. Barbieri et al. (2012) haben in einer Studie unter den Genen SPOP, FOXA1, TP53, PTEN, CDKN1B, MED12, THSD7B, SCN11A, NIPA2, PIK3CA, ZNF595 und C14/49, welche als die Gene mit größter Signifikanz bei der Entstehung des lokalisierten Prostatakarzinoms beschrieben wurden, SPOP als häufigste Mutation mit 13% gefunden. Bei der Untersuchung von weiter fortgeschrittenen, hormonenzugsresistenten (CR) Tumoren wurden folgende neun Gene als am häufigsten mutiert gefunden: TP53, ZFH3, RB1, PTEN, APC, AR, MLL2, OR5L1, CDK12. Dabei traten TP53 Mutationen in 40% der Fälle auf. Genomische Untersuchungen zeigen auch, dass es mit der TMPRSS2-ERG Translokation eine weitgehend prostatakarzinomspezifische molekulare Veränderung gibt. Bei dieser Translokation kommt der Transkriptionsfaktor ERG in den Einfluss des androgen-regulierten Gen TMPRSS-2, was zu einer konstanten Überexpression von ERG und damit zu einer weitgehenden Umprogrammierung der betroffenen Prostataepithelien bzw. Prostatakarzinomzellen führt (Tomlins, 2005).

Diese TMPRSS2-ERG Fusionen konnten in circa 50% von 1500 untersuchten Prostatakarzinomen nachgewiesen werden (Kumar-Sinha et al. 2008). Jedoch ist die Ansicht bezüglich des prognostischen Wertes und der klinischen Nutzbarkeit von TMPRSS2-ERG Genfusionen nicht eindeutig (Chow et al. 2012).

1.2. Tumorsuppressor p53

P53 ist das bei menschlichen Tumoren am häufigsten mutierte Tumorsuppressorgen und Gegenstand vieler Forschungsprojekte. Es wurde 1979 durch Lane und Crawford zuerst als Onkogen beschrieben, da eine vermehrte Expression mit erhöhter Wahrscheinlichkeit von Tumorentstehung in Zusammenhang gebracht wurde. Später wurde festgestellt, dass nur die mutierte Form von p53 tumorigen ist, während der Wildtyp die Entstehung von Tumoren unterdrückt. Heute gilt p53 als Tumorsuppressorgen (Dahm-Daphi 2000).

Die Funktion von p53 als Tumorsuppressor wird bei der Analyse des autosomal-dominant vererbten Li-Fraumeni-Syndroms deutlich. Eine Erkrankung, der eine Keimbahnmutation eines p53-Allels zu Grunde liegt. Diese Mutation hat zur Folge, dass die Patienten schon in jungen Jahren vermehrt an Mammakarzinomen, Sarkomen und anderen Tumoren erkranken (Malkin et al. 1990). Das mutierte p53 Protein besitzt auch onkogene Eigenschaften wie zum Beispiel die Steigerung der Invasivität und erhöhte Chemo- sowie Strahlenresistenz von Tumoren (Burg 2010, Skinner et al. 2012).

P53 liegt auf Chromosom 17p13 und ist ein 20kb großes Gen, welches für ein aus 393 Aminosäuren bestehendes Protein kodiert und ein Molekulargewicht von 37,5kDa hat. Seinen Namen verdankt es der Eigenschaft, in der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese auf Höhe eines 53kDa schweren Proteins zu laufen (Isobe et al. 1986). P53 hat zahlreiche tumorrelevante Funktionen. Es reguliert unter anderem DNA-Reparaturprozesse und die DNA-schadensabhängige Selbstzerstörung von Zellen. Diese Mechanismen sind wichtig, um Schäden im Erbgut nicht auf weitere Generationen zu übertragen und um die Entstehung von Tumoren zu unterdrücken. Bei vielen Tumoren, wie zum Beispiel dem Kolon-, dem Harnblasen- und dem Lungen-Karzinom, kommen p53 Mutationen in fast der Hälfte der Tumoren vor (Porter, Gown et al. 1992). Beim Prostatakarzinom finden sich vorrangig Punktmutationen im Sinne von missense Mutationen (74%) (Brosh and Rotter 2009). Die Rate der somatischen Mutationen ist höher als zunächst angenommen wurde, im Vergleich zu anderen Tumoren aber gering (Kau et al. 2010).

Bei zahlreichen Tumorarten ist gezeigt worden, dass die p53 Mutationen prognostisch relevant sind. Sequenzstudien des Gesamtgenoms haben gezeigt, dass eine p53 Mutation beim Prostatakarzinom in circa 5% der Fälle vorkommt. Diese Zahl ist zwar deutlich geringer als bei den meisten anderen Tumorarten, doch ist p53 die am häufigsten vorkommende Mutation beim Prostatakarzinom. Eine große- am Institut für Pathologie des UKE durchgeführte- Studie (Schlomm et al. 2008) hat unter anderem gezeigt, dass p53 Veränderungen hoch signifikant mit einer ungünstigen Patientenprognose bei Prostatakarzinompatienten vergesellschaftet sind. In der Studie wurden 2514 Prostatektomiepräparate immunhistochemisch auf p53 Mutationen untersucht. Es fand sich eine niedrige Rate an p53 Mutationen. Die Mutationen fanden sich besonders in Tumoren fortgeschrittenen Stadiums, mit hohem Gleason-Score und chirurgisch nicht tumorzellfreien Schnitträndern. Es wurde geschlussfolgert, dass p53 Mutationen besonders in einer Subpopulation von biologisch aggressiven Tumoren auftreten, die gleichzeitig ein hohes Risiko der Tumorprogression bergen.

Diese mit p53 Mutationen assoziierte ungünstige Prognose beim Prostatakarzinom passt gut zu einer kürzlich erhobenen Studie von Haffner et al. (2013), welche mehrere Tumorregionen eines Prostatakarzinoms mittels Gesamtgenomsequenzierung untersucht haben. In dieser Studie fand sich eine p53 Mutation in einer kleinen, low grade (G3) Subpopulation des Primärtumors. Die gleiche Subpopulation wurde auch in Metastasen gefunden. Das spricht dafür, dass p53 ein spätes Ereignis in der Tumorprogression sein und eine Rolle in der Entstehung von Metastasierung spielen könnte.

Angesichts der Seltenheit von p53 Veränderungen beim Prostatakarzinom sind bisher keine Studien bekannt, die an relevanten Fallzahlen systematisch der Frage nachgegangen sind, in wie weit p53 Veränderungen im Laufe der Prostatakarzinomerkrankung in Subpopulationen vorkommen und in welcher Art das Auftreten solcher p53 Veränderung für das Vorkommen von Metastasen verantwortlich sein könnte.

Deshalb wird im vorliegenden Projekt das Ziel verfolgt, einen wissenschaftlichen Beitrag zur Beantwortung dieser Frage zu leisten. Grundlage dafür ist ein Kollektiv von 871 Prostatakarzinomen in dem mit Hilfe von Heterogenitäts-Tissuemicroarrays (TMAs) nach dem Vorkommen von p53 Subpopulationen gesucht wurde. In einem Teilkollektiv von 76 Fällen wurden dabei auch systematisch multiple

Lymphknotenmetastasen evaluiert, sodass der Befund in den Lymphknotenmetastasen mit demjenigen in Primärtumoren verglichen werden konnte.

Die Untersuchung bestätigt, dass p53 Veränderungen beim Prostatakarzinom insgesamt selten sind und eher spätere Ereignisse darstellen. Eine klinisch relevante Beziehung zur Metastasierung wurde nicht gefunden.

1.3. Heterogenität

Es wird postuliert, dass verschiedene Entartungen und somit unterschiedlich aggressive und differenziert zu behandelnde Subtypen von Prostatakarzinomen parallel in einem Organ vorkommen können. Das heißt, dass Tumoren heterogen sein können.

Die Bestimmung der Heterogenität von genetischen Veränderungen ist in sofern wichtig, als dass sie ein kritischer Faktor zur Abschätzung des Erfolges von zielgerichteten Therapien (targeted cancer therapies) ist.

Eine eventuell vorliegende Heterogenität limitiert die molekulare Diagnostik in dem Sinne, dass molekulare Assays nur bedingt aussagekräftig sind, wenn der zu analysierende Biomarker nur in einem Teil des Tumors repräsentiert ist.

Auch kann Heterogenität zu Therapieversagen führen, wenn der medikamentöse Angriffspunkt nicht homogen vorhanden ist (Minner et al. 2013). Um die Heterogenität von p53 Mutationen zu ermitteln, wurden in dieser Studie soweit möglich Proben aus unterschiedlichen Tumorfoci entnommen und analysiert.

2. Material und Methoden

2.1. Makroskopie

Die 871 in diesem Projekt untersuchten Prostatektomiepräparate wurden in der Martini-Klinik, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE) in den Jahren 2009-2011 reseziert und zur Diagnostik im Institut für Pathologie des UKE untersucht. Die Präparate sind im Rahmen der Operation farblich markiert (anterior, posterior, lateral, periurethral) und anschließend für circa 12 Stunden in 4% gepufferter Formalinlösung gelagert worden. Nach standardisiertem Verfahren wurden alle Prostatektomiepräparate beschrieben, in je nach Größe des Präparates unterschiedlich viele Scheiben mit einer Schichtdicke von circa 2mm geschnitten und photodokumentiert. Ebenso wurde mit dem dazugehörenden periprostatistischem Fettgewebe, den Samenblasen und Lymphknoten verfahren. Die makroskopische Aufarbeitung ist in Abbildung 1. exemplarisch dargestellt.

Die Gewebescheiben wurden zum Härten in Paraffin gebettet (Blöcke) und dadurch schneidbar gemacht. Mit dem Mikrotom wurden Scheiben von 4 µm geschnitten, die danach auf Objektträger übertragen, fixiert und mit HE gefärbt wurden. Es folgten die mikroskopische Beurteilung der Präparate und die Markierung von Tumorarealen auf den Objektträgern. Es wurde die Anzahl der Tumorfoci (Mindestabstand von >3 mm zum nächstdichtesten Tumorareal eines Blockes, bzw. >4mm zum angrenzenden Block) bestimmt.

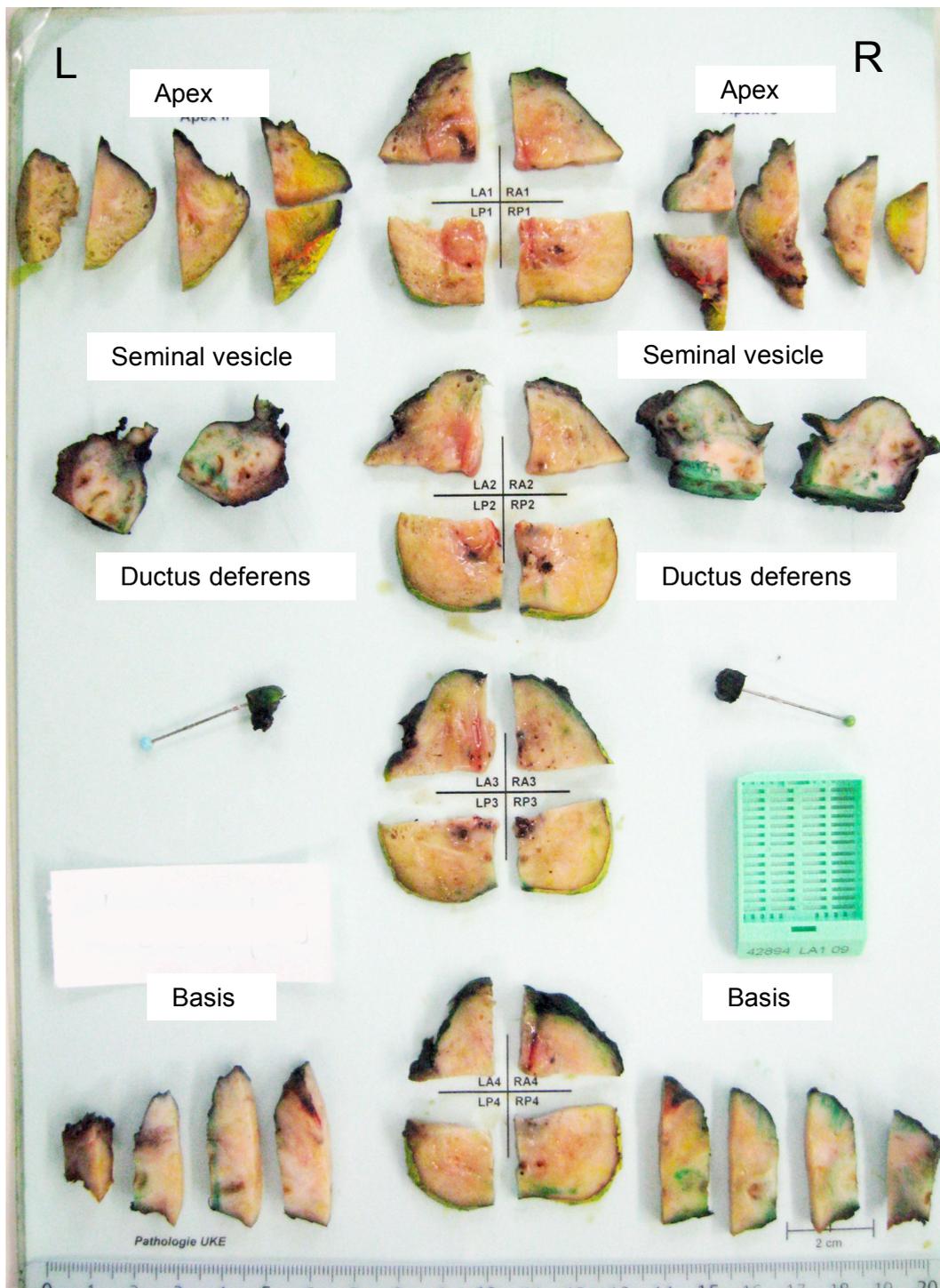


Abbildung 1: Makroskopische Aufarbeitung einer Prostata

2.2. Heterogenitäts-TMAs

Für die Untersuchung wurde ein neues Konzept für Heterogenitätsuntersuchungen angewendet: ein Heterogenitäts-TMA.

Das Konzept von Heterogenitäts-TMAs ist in Abbildung 2. dargestellt. Das Verfahren wurde erstmals anhand einer ERG-Untersuchung bei Prostatakarzinomen vorgestellt (Minner et al. 2013)

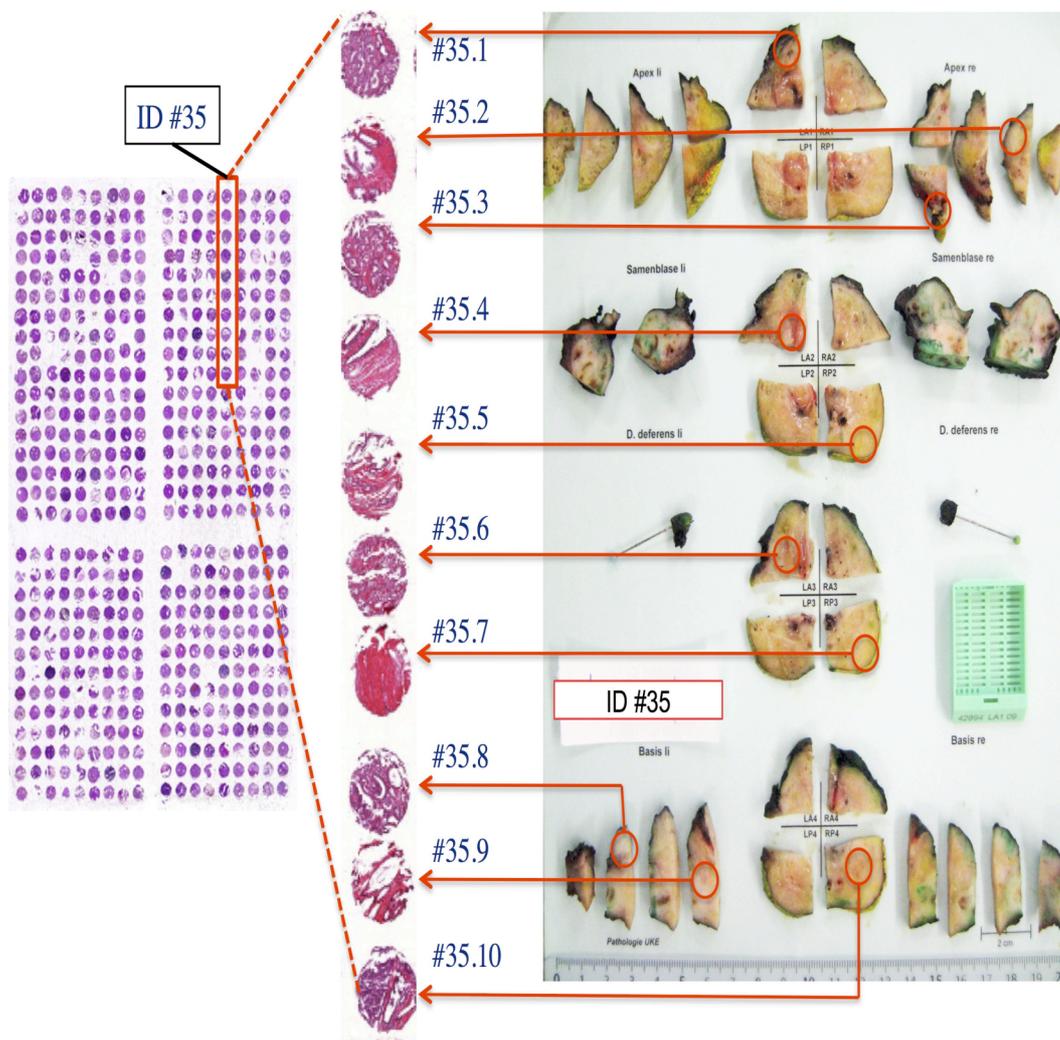


Abbildung 2: Heterogenitäts-TMA

Das Prinzip besteht darin, dass von mehreren tumorenhaltenden Blöcken des Primärtumors jeweils eine oder mehrere Stanzzyylinder entnommen werden, sodass diese auf einem Tissuemikroarray zusammengefasst werden können. Gleichzeitig können bei diesem Ansatz auch eine oder mehrere Stenzen von jeweils einer oder mehreren Metastasen entnommen werden. Die zeitgleiche Untersuchung von multiplen Proben aus dem Primärtumor und Metastasen erlaubt eine systematische, vergleichende Untersuchung von molekularen Veränderungen in Primärtumor und Metastasen.

Von besonderer Bedeutung ist die Möglichkeit, systematisch Gewebe zu untersuchen, das im Tumor möglichst weit voneinander entfernt ist (durch Verwendung multipler, speziell nach diesem Gesichtspunkt ausgesuchter Gewebeblöcke). Es besteht auch die Möglichkeit, innerhalb von Metastasen durch die Entnahme mehrerer Proben aus einer einzigen Metastase die Heterogenität zu bestimmen.

Für die Untersuchungen wurden fünf verschiedene Heterogenitäts-TMAs verwendet.

TMA1 (PRO 16.2.) wurde speziell für das Projekt hergestellt. Dieser TMA beinhaltet Gewebeproben von 76 verschiedenen Patienten mit metastasierendem Prostatakarzinom. Von jedem Patienten bzw. von jedem Primärtumor wurden 10 verschiedene Stenzen entnommen; wenn möglich wurden dabei 10 verschiedene Blöcke ausgewählt. Wenn weniger Blöcke vorhanden waren, wurden von den größten tumortragenden Blöcken jeweils zwei Stenzen entnommen, und zwar von den am weitesten von einander entfernten Tumorarealen. Gleichzeitig wurden Stenzen von den Metastasen entnommen: von der ersten jeweils drei und von der zweiten jeweils zwei Stenzen, von allen anderen Lymphknotenmetastasen jeweils eine Stanze. Der Array enthielt insgesamt am Ende 1727 verschiedene Stanzzyylinder, davon 760 von 76 Primärtumoren und 967 von 207 Metastasen.

TMA2 (PRO12.2) ist ein vorbestehender TMA. Dieser TMA beinhaltet Material von 150 Primärtumoren aus ausgewählten großen Tumoren. Es wurden jeweils 10 Gewebeproben pro Tumor entnommen. Dabei stammten die Tumorproben in 79 der 150 Tumoren von einem einzigen Tumorfokus und in 71 der 150 Tumoren aus Tumoren mit mehreren (2-3) Tumorfoci.

TMA3 (PRO 11.2) beinhaltet Material von 138 Primärtumoren aus ausgewählten großen Tumoren. Es wurden jeweils 10 Gewebeproben pro Tumor entnommen. Dabei stammten die Tumorproben in 45 der 138 Tumoren von einem einzigen Tumorfokus und in 93 der 138 Tumoren aus Tumoren mit mehreren (2-3) Tumorfoci.

TMA4 (PRO 7.2) und TMA5 (PRO 17.2) stammten von insgesamt 507 Patienten mit unifokalen Prostatakarzinomen, wobei jeweils 10 verschiedene Gewebeproben aus möglichst weit von einander entfernten Regionen dieser unifokalen Tumoren entnommen wurden.

Insgesamt enthalten diese TMAs 8710 Primärtumorproben von insgesamt 871 Patienten. Von den TMA-Blöcken wurden an einem Tag Schnitte frisch für die geplante Studie angefertigt. Alle Schnitte der einzelnen TMAs wurden an einem Tag in einem Experiment untersucht.

2.3. Immunhistochemie

Die für die Antikörperuntersuchungen nötigen Mikroarraysektionen wurden ebenfalls an einem Tag frisch geschnitten.

Um nachzuweisen, dass es sich bei dem zu untersuchenden Gewebe aus dem TMA tatsächlich um Prostatakrebszellen handelt, wurden die Schnitte immunhistochemisch auf Zytokeratine (low molecular weight cytokeratins) untersucht. Dazu wurde nach Erhitzen der Gewebeproben im Autoclave mit Zitratpuffer (pH=7.8) der Antikörper 34 β E12 (clone MA903; Dako; 1:12.5) zur Darstellung der Zytokeratine eingesetzt. Um das p53 Protein nachzuweisen, wurde nach beschriebener Gewebepreparation im Autoclave der Antikörper DO1 (Oncogene; 1:3600) genutzt. Zur Visualisierung der immunhistochemischen Färbungen wurde das Envision system (DAKO) verwendet. Als Positivkontrollen dienten Gewebeproben aus Kolonkarzinomen mit bekannten p53 Veränderungen. Für die Negativkontrollen wurde in jeden TMA-Block gesundes Prostata-, Lungen-, Leber-, Haut-, Lymphknoten-, und Nierengewebe aufgenommen. Es wurden ausschließlich Gewebeproben mit Basalzellverlust (definitive Prostatakrebszellen) in die p53 Untersuchung eingeschlossen.

P53-Positivität wurde angenommen, wenn mehr als 1% der Tumorzellen angefärbt waren. Um die physiologische p53 Expression von p53 Mutationen zu unterscheiden und diese miteinander zu vergleichen, wurde die Anfärbbarkeit auf einer Intensitätsskala von 0-3 beurteilt (0, 1+,2+,3+ Färbeintensität). Der prozentuale Anteil von angefärbten Tumorzellen wurde abgeschätzt.

2.4. Auswertung der Ergebnisse der Immunhistochemie

2.4.1. Auswertung der TMAs pro Gewebespots

Die TMAs wurden von einem Pathologen mit besonderer Kenntnis in Prostatapathologie untersucht. Dabei wurden Gewebespots ohne Karzinomzellen von der Untersuchung ausgeschlossen. Im Fall von vorhandenen Prostatakarzinomanteilen wurde die p53 Färbeintensität (nukleär) semiquantitativ eingeteilt in negativ: keine Färbung oder 1+/2+ Färbeintensität in <10% der Tumorzellen, schwach positiv: 1+ Färbeintensität in $\geq 10\%$, oder 2+ Färbeintensität in $\geq 10\%$ aber <70% der Tumorzellen, oder 3+ Färbeintensität in <10% der Tumorzellen und stark positiv: 2+ Färbeintensität in $\geq 70\%$ der Tumorzellen, oder 3+ Färbeintensität in $\geq 10\%$ der Tumorzellen.

Beispiele für negative, schwach positive und stark positive Fälle sind in den Abbildungen 3a-d dargestellt.

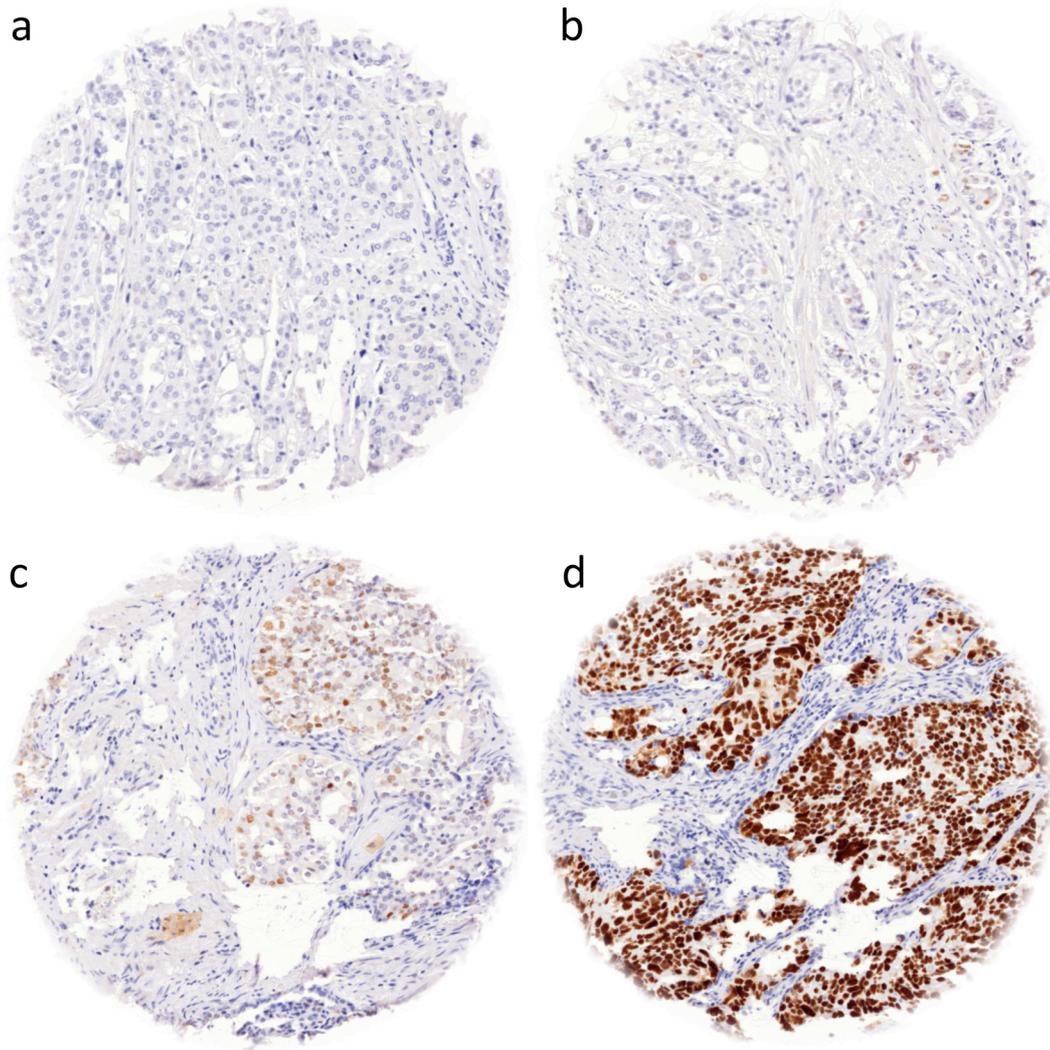


Abbildung 3: P53 Färbung: 3a) negativ, b-c) schwach, d) stark

2.4.2. Auswertung der TMAs auf Tumorebene

Die Tumore wurden bezüglich ihres p53 Status wie folgt klassifiziert: negativ, heterogen positiv, homogen positiv. Ein negativer Befund wurde dann attestiert, wenn in keiner der untersuchten Stanzeln eine p53 Anfärbbarkeit identifiziert werden konnte. Ein homogen positiver p53 Befund wurde dann attestiert, wenn alle tumorehaltenden Stanzylinder eine entweder schwache oder starke Positivität aufwiesen. Ein heterogener Befund wurde dann attestiert, wenn ein Tumor sowohl stark positive als auch negative Stanzeln enthielt. Angesichts der Abhängigkeit von Fixationsbedingungen der immunhistochemischen Färbung wurden graduelle Färbungsunterschiede, wie sie bei immunhistochemischen Untersuchungen regelmäßig auftreten, nicht als echte Heterogenitäten bezeichnet.

2.4.3. Heterogenität in Metastasen

Auch innerhalb von Metastasen wurde die Homogenität/Heterogenität der Befunde auf Patientenebene klassifiziert. In Analogie zu der Klassifikation in Primärtumoren wurde ein homogen positiver p53-Status dann attestiert, wenn alle Metastasenstanzen entweder schwach oder stark p53 positiv waren; ein negativer p53 Status bei Negativität in allen Stanzen, sowie ein heterogener Befund bei gleichzeitigem Vorliegen von stark positiven und negativen Stanzen aus Metastasen.

3. Ergebnisse

3.1. p53-Status gesamt

In der vorliegenden Studie ist der p53-Status von 871 Patienten untersucht worden. Mindestens zwei auswertbare Stenzen lagen in allen 871 Patienten vor. Insgesamt zeigten 13,4% (117/871) der untersuchten Tumoren einen positiven p53-Status. Bei 47 der 871 beurteilbaren Patienten war mindesten in einer Stanze eine stark positive p53 Färbung (5 %) und bei 70 der Patienten mindesten in einer Stanze eine schwach positive Färbung als maximaler p53 Befund erkennbar (8%).

3.2. p53-Status in unifokalen Prostatakarzinomen

Die Analyse von Primärtumoren ergab in den besonders ausgiebig untersuchten unifokalen Tumoren einen homogen positiven p53 Status in 11 von 631 Tumoren (1,7%) und einen heterogen positiven p53 Status in 58 von 631 Tumoren (9,1%). Die übrigen 562 Patienten (89%) waren homogen p53 negativ. Die Ergebnisse dieses Untersuchungsteils sind in Tabelle1. dargestellt.

Tabelle 1: P53-Status unifokales Prostatakarzinom

Status	Tumoren		Anteil
Homogen p53 positiv (10/10)	11	631	1,7%
Heterogen p53 positiv ($\geq 1/10$)	58	631	9,1%
Homogen p53 negativ (0/10)	562	631	89%

3.3. p53-Status in multifokalen Prostatakarzinomen

Die Untersuchung von multifokalen Prostatakarzinomen ergab eine homogene p53 Positivität bei 2 von 240 untersuchbaren Patienten (0,83%) und einen heterogenen Befund bei 46 von 240 untersuchbaren Patienten (19,2%). Hier waren 192 von 240 Patienten (80%) homogen negativ. Die Ergebnisse dieses Untersuchungsteils sind in Tabelle 2. dargestellt.

Tabelle 2: P53-Status multifokales Prostatakarzinom

Status	Tumoren		Anteil
Homogen p53 positiv (10/10)	2	240	0,83%
Heterogen p53 positiv ($\geq 1/10$)	46	240	19,2%
Homogen p53 negativ (0/10)	192	240	80%

3.4. p53-Heterogenität in Metastasen

Die Befunde in Metastasen sind in Abbildung 4 b dargestellt. Bei keinem der 76 Fälle, bei dem Metastasen untersucht wurden, fand sich eine p53 Positivität in allen Metastasen. In 7 Fällen zeigte sich ein homogener p53 Status, jedoch konnten dabei nicht alle Gewebeproben analysiert werden. Deshalb wird in mindestens 11 Fällen von heterogenen p53 Befunde in Metastasen ausgegangen.

3.5. Vergleich Primärtumor versus Metastasen

Die Beziehung zwischen den immunhistochemischen p53 Befunden in Primärtumoren und ihren Metastasen ist in Abbildung 4 a und 4 b dargestellt. Grundsätzlich fand sich eine p53-Positivität in Metastasen ganz überwiegend bei Vorliegen von p53 positiven Subpopulationen im Primärtumor. Bei 12 der 18 p53-positiven Tumoren (67%), bei denen Metastasen zur Untersuchung kamen, war eine p53-Positivität zumindest in einem Teil der Metastasen darstellbar. Im Gegensatz

4. Diskussion

Die Befunde der Untersuchungen zeigen, dass p53 Mutationen beim Prostatakarzinom zwar nicht sehr häufig sind, aber durchaus in relevanter Frequenz vorkommen. Eine immunhistochemische Positivität fand sich in 14% der Patienten. Das Vorliegen einer Anfärbbarkeit für Antikörper gegen p53 Protein belegt das Vorliegen einer pathologisch erhöhten p53 Konzentration im Tumorzellkern. Andere Studien haben gezeigt, dass derartige Akkumulationen von p53 Protein praktisch ausschließlich im Falle einer p53 Mutation vorkommen (Yin et al. 1992, Lang et al. 2004, Olive et al. 2004).

Bei zumindest einem Teil der p53 Mutationen kommt es zur Bildung eines Proteins mit erhöhter Halbwertszeit, wobei sich das pathologische Protein mit gleichzeitig weitergebildetem Wildtypprotein verbindet. Die Aggregate sind in Form von Tetrameren zu finden. Diese sind nicht in der Lage, DNA zu binden oder Zielgene zu aktivieren, und werden zudem deutlich verzögert abgebaut (Bug 2010). Der immunhistochemische Nachweis von p53 Protein ist somit ein guter Surrogatmarker für das Vorliegen von p53 Mutationen.

Sequenzierstudien verweisen auf unterschiedliche Raten an p53 Mutationen. Sie beinhalten bei besonders hoher Zahl p53 positiv mutierter Fälle, insbesondere aggressive Subtypen, speziell hormonrefraktäre Tumoren.

Navone et al. haben in ihrer Studie (1993) Tumorproben mit p53 positiver IHC und positivem PCR-SSCP sequenziert und dabei TP 53 (Exon 5-8) Punktmutationen in sechs von sechs (100%) der untersuchten Tumoren gefunden. Dieses Ergebnis einer besonders hohen Häufigkeit von p53 Mutationen könnte durch technische Probleme bedingt sein, da in dieser Studie p53 Mutationen nicht durch eine Sequenzierung nach Wiederholung der PCR Amplifikation von DNA erfolgte. Es ist bekannt, dass die PCR Amplifikation von DNA zu künstlichen p53 Mutationen führen kann. Dies kann experimentell durch eine erneute PCR zur Bestätigung gefundener Mutationen korrigiert werden.

Eastham et al (1995) fanden in Ihren Untersuchungen in vier von 15 Proben (27%) mit p53 Positivität in der Immunhistochemie und abnormalen SSCP-Mustern Mutationen in Exon 7 (Probe aus Primärtumor) und Exon 5 (Proben aus

Lymphknotenmetastasen ohne Mutationen im Primärtumor). Die restlichen 11 von 15 Proben zeigten trotz p53 Positivität in der IHC normale SSCP Muster.

Auch konnte eine fast gedoppelte Rate an Mutationen in Metastasen, im Vergleich zu Primärtumoren, in einer Studie von Meyers et al. (1998) gefunden werden. Hier zeigten 12 von 17 untersuchten Metastasen (71%) Mutationen im p53 Gen. Als Methoden wurden PCR, SSCP und direkte DNA-Sequenzierung eingesetzt.

In der Analyse von klinisch lokalisierten Prostatakarzinomen (Hall et al. 1995) bestätigte sich, dass Mutationen von p53 selten vorkommen und ein spätes Ereignis in der Tumorentstehung darstellen. Von 37 untersuchten Tumoren war nur ein einziger (2,7%) mittels IHC heterogen positiv. Es folgten SSCP und PCR Untersuchungen, die wie zu erwarten war, abnormale Muster bzw. Mutationen zeigten. Sieben IHC negative Tumoren wurden auch mittels SSCP und PCR untersucht (Exon 5-8) und zeigten Wildtyp p53.

Immunhistochemische p53 Studien haben naturgemäß zu einer größeren Streuung der Häufigkeit von positiven Befunden geführt. Insgesamt sind in der Literatur Häufigkeiten der immunhistochemisch untersuchten p53 Positivität zwischen 2,5% bis 61% bekannt (Bauer 1995, Zellweger 2005, Visakopi 1992, Schlomm 2008). Die von Bauer et al. durchgeführte Studie zeigt eine heterogene, meist fokale p53 Positivität in 61%, jedoch nur eine homogene Positivität in 4% der 139 untersuchten lokalisierten Prostatakarzinome. Zellweger et al. (2005) haben ein Auftreten von p53 Mutationen in 35% der hormonrefraktären bzw. metastasierten Prostatakarzinome (n=211) und nur 4% in lokalisierten Prostatakarzinomen (n=181) festgestellt. Visakorpi et al. fanden eine p53-Positivität in 6% der untersuchten Fälle.

Da p53 ein physiologischerweise in Zellen vorkommendes Protein ist, kann durch die Sensitivität der immunhistochemischen Marker die Zahl der positiven Zellen verändert werden. In einer Studie der Arbeitsgruppe um Schlomm et al. (2008) am Universitätsklinikum Eppendorf wurde gezeigt, dass je nach Wahl der Protokollbedingungen die Häufigkeit der p53 positiven Fälle von 2,5% bis >90% variiert werden konnte. Bei einer 1:20 Verdünnung der Antikörper zeigten 90% der Proben eine mittlere bis starke p53 Positivität.

Es ist davon auszugehen, dass für ein valides Ergebnis die Protokollbedingungen und die Wahl der Reagenzien bei weitem wichtiger sind als die Menge an untersuchtem Gewebe (Sauter et al. 2003). Die in der gleichen Studie von Schlomm et al. 2008

durchgeführte vergleichende Untersuchung mit DNA-Sequenzierungen hatte die Annahme bestätigt, dass die echte Häufigkeit von p53 Mutationen in Prostatakarzinomen bei circa 5% liegen dürfte.

Hauptfragestellung dieser Untersuchung ist die Ermittlung der Häufigkeit von p53 Heterogenität. Es stellte sich die Frage, ob möglicherweise in einem Teil der Prostatakarzinome bereits früh eine p53 Mutation auftreten kann. Tatsächlich fanden sich einzelne Tumoren, die in den gewählten Stichproben durchweg einen positiven p53 Befund aufwiesen. Die an einigen dieser Fälle durchgeführten Großschnittvalidierungen haben allerdings immer außer p53 positiven Arealen auch p53 negative Areale ergeben. Ein Beispiel ist in Abbildung 6 dargestellt.

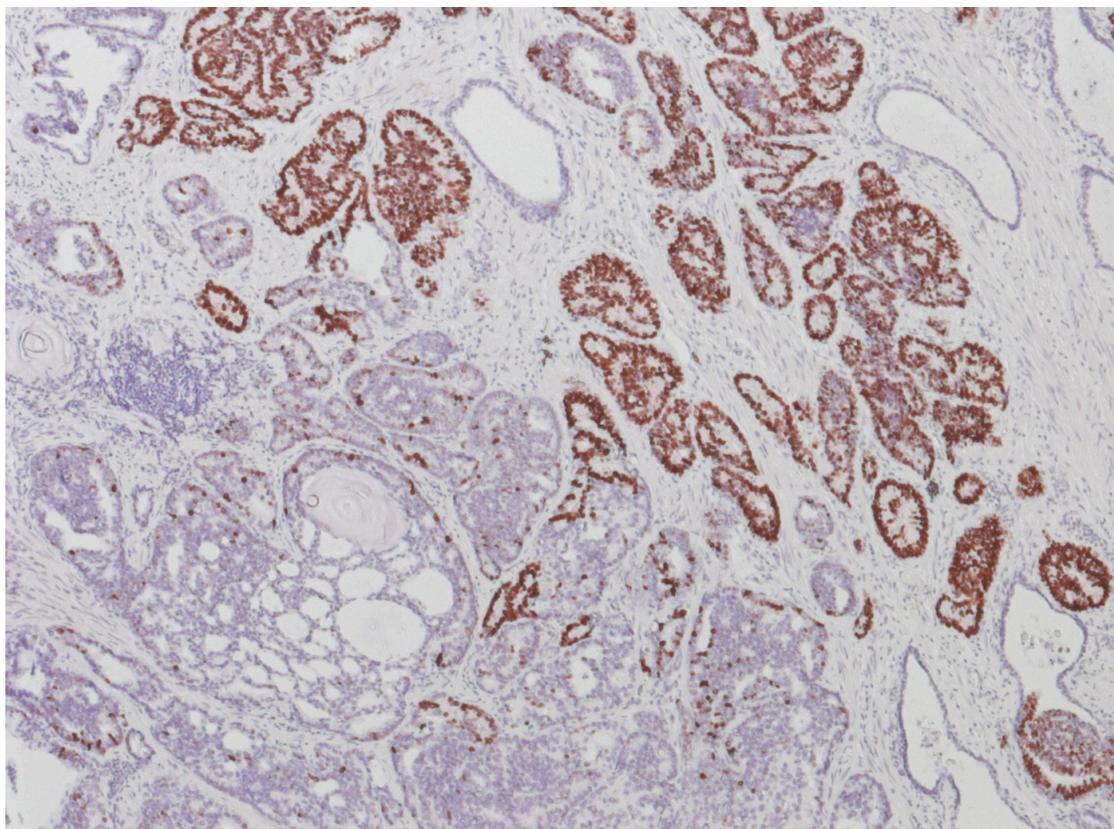


Abbildung 6: p53-positive und -negative Areale

In keinen der 10 durchgeführten Großschnittvalidierungen fand sich eine p53 Positivität in einer highgrade PIN, sodass die ermittelten Daten insgesamt keinen Anhaltspunkt dafür bieten, dass eine p53 Mutation beim Prostatakarzinom in relevanter Häufigkeit bereits in nichtinvasiven Vorstufen vorkommt. Das

unterscheidet das Prostatakarzinom von anderen relevanten malignen Tumoren, beispielsweise dem Mammakarzinom.

Beim Mammakarzinom haben Ergebnisse verschiedener Studien gezeigt, dass relevante Progressionsmarker und Prognosemarker wie z.B. Amplifikationen von HER2 oder MYC bereits in großer Häufigkeit in tumornahen duktalem Carcinoma in situ vorkommen (Ho et al. 2000, Stark et al. 2000, Nofech-Mozes et al. 2008, Burkhardt et al. 2010).

Die ausgeprägte Heterogenität des p53 Status in unseren p53 positiven Primärtumoren erklärt auch, dass bei immerhin 12% (7/58) unserer Patienten p53 positive Metastasen nachgewiesen wurden, obwohl im Primärtumor kein positiver p53 Status vorlag. Bei diesen Patienten ist davon auszugehen, dass der p53-positive Klon im Primärtumor in den zehn Stichproben nicht erfasst wurde. In der Untersuchung von Haffner et al. (2013) wurde der p53 positive Klon im Primärtumor ebenfalls als eher geringfügig (quantitativ) qualifiziert.

Naturgemäß können sehr kleine Subpopulationen mit der TMA-Methode nur in Einzelfällen gefunden werden.

Eine weitere in unserer Studie untersuchte These war die von Haffner et al. formulierte Idee, dass möglicherweise p53 Mutationen in kleinen Subpopulationen ein ganz wesentlicher Faktor für die Metastasierung beim Prostatakarzinom sein könnten. Die Untersuchung von Metastasen bei 76 Patienten hat allerdings eine p53 Positivität nur in 23,7% (18/76) ergeben. Eine Häufigkeit, die nur geringfügig über der von uns erhobenen p53 Veränderungen in Primärtumoren liegt. Dieser Befund deutet nicht darauf hin, dass p53 Veränderungen eine zentrale Rolle bei der Metastasierung einnehmen. Die bekannte Funktion von p53 als Regulator der im DNA-Schadensfall eintretenden Reparatur oder Apoptose spricht auch nicht für eine direkte Rolle bei der Metastasierung. Vielmehr ist anzunehmen, dass p53 Mutationen durch die damit assoziierte vermehrte genetische Instabilität die Entstehung weiterer sekundärer bzw. tertiärer Genomveränderungen erleichtern können, die ihrerseits die Metastasierung begünstigen.

Von besonderem Interesse ist der Befund einer hohen Heterogenität des p53 Status in Metastasen. Insgesamt zeigten 11 von 18 Patienten mit p53 positiven Metastasen auch p53 negative Metastasen (61%). Das zeigt eindeutig, dass offenbar mindestens zwei

Subpopulationen des Primärtumors Metastasen in Lymphknoten gestreut haben. Dies widerspricht der Vorstellung, dass die Lymphknotenmetastasen beim Prostatakarzinom generell das Resultat singulärer metastasierungsassoziierter genetischer Veränderungen ist (Liu et al. 2009) und es zeigt, dass offenbar mehrere Populationen gleichzeitig in Lymphknoten metastasieren. Auch in Metastasen von neuroendokrinen Tumoren (Rinner et al. 2012) und Mammakarzinomen (Ding et al. 2010) wurde Biklonalität bestätigt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen unterstreichen die hohe Nützlichkeit der TMA-Methode für die Bearbeitung und Klärung wissenschaftlicher Fragestellungen, die normalerweise große Gewebemengen bzw. Fallzahlen benötigen. In unserer Untersuchung wurden insgesamt 9490 Gewebeproben von 871 Patienten untersucht. Die Färbung der Präparate dauerte weniger als einen Tag. Die histologische Auswertung der gefärbten Präparate erforderte weniger als 24 Arbeitsstunden. Die für die Untersuchungen von 9490 verschiedenen Geweben von 871 verschiedenen Patienten benötigten Reagenzien kosteten weniger als 300 Euro und der Personalaufwand für die Erhebung der Primärdaten betrug weniger als 3.000 Euro.

Als Ergebnis wurde der Nachweis einer häufigen p53 Heterogenität und überwiegend heterogener molekularer Befunde in Metastasen erbracht. Er führte zu grundlegend neuen Erkenntnissen bezüglich des Prostatakarzinoms. Die in dieser Studie ermittelten und an großen Zahlen abgesicherten neuen Informationen zur Biologie des Prostatakarzinoms unterstreichen die Nützlichkeit von Heterogenitäts-TMAs als neue, wissenschaftlich begründete, praktikable und wirtschaftlich effiziente Methode für die molekulare Tumorforschung.

Bisherige Untersuchungen an TMAs haben überwiegend mit dem Ziel stattgefunden, eine große Zahl von Tumoren bezüglich eines Markers zu untersuchen. Entsprechende Studien hatten dabei sowohl mäßig große Fallzahlen (bis zu 50) von zahlreichen verschiedenen Tumorarten oder möglichst viele Proben einer bestimmten Tumorart untersucht. Gerade beim Prostatakarzinom haben TMA-Studien - durchgeführt von der Hamburger Gruppe - es möglich gemacht, Tausende von Prostatakarzinomen mit Verlaufsdaten in kürzester Zeit auf die prognostische Bedeutung molekularer Veränderungen hin zu untersuchen (Schlomm et al. 2008,

Minner et al. 2013, Flammiger et al. 2013, Tsourlakis et al. 2013). TMA-studien haben beim Prostatakarzinom und anderen Tumoren alle klinisch etablierten Prognosemarker wie beispielsweise Östrogenrezeptor, Progesteronrezeptor, Ki67, p53 und HER2 bei Mammakarzinom, Ki67 und p53 beim Harnblasenkarzinom oder PTEN, p53 und verschiedene Deletionen beim Prostatakarzinom mit hoher Signifikanz und in wiederholten Studien reproduzieren können. Dennoch ist immer wieder diskutiert worden, ob die Verwendung einer einzelnen Gewebeprobe pro Tumor angemessen ist und ob dieses Verfahren nicht zu einer intolerablen Unterrepräsentation heterogener Befunde führen könnte. Gerade beim Prostatakarzinom ist deswegen häufig vorgeschlagen worden, mindestens drei Gewebeproben pro Patient zu untersuchen (Rubin et al. 2002).

Das in diesem Projekt verwendete Konzept der Heterogenitäts-TMAs unterscheidet sich deshalb grundlegend von den von anderen Autoren vorgestellten Maßnahmen zur besseren Repräsentation eines Tumors. Während frühere Arbeitsgruppen mehrere Stenzen aus einem einzigen Tumorblock untersucht hatten und damit im besten Fall die Verhältnisse auf diesem spezifischen Tumorblock besser zu repräsentieren, wurde in unseren Heterogenitäts-TMAs nicht versucht, die Routineuntersuchung eines einzigen Gewebeblockes pro Patient besser in einem TMA-verfahren zu kopieren, sondern eine Untersuchung durchzuführen, die über die Möglichkeiten der traditionellen Molekularpathologie hinausgeht.

Der eigens dazu hergestellte TMA untersucht nicht eine einzelne Region eines Tumors, sondern systematisch zahlreiche, von einander möglichst weit entfernte Subregionen eines Tumors. Die Ergebnisse zeigen, dass eine ganz substantielle p53 Heterogenität vorliegt.

Ähnliche Befunde waren in einer Studie von Minner et al. 2013 zum ERG-Protein erzielt worden. Die Überexpression von ERG ist in initialen Studien als auslösende Veränderung für die Entstehung von Prostatakarzinomen vorgeschlagen worden. Die Untersuchung von Minner et al. zeigte allerdings, dass eine homogene ERG-Expression nur in 16% der Prostatakarzinome vorkommt, während die ERG-Expression in 42% der Tumoren heterogen war. Die ERG Translokation kann also nur in Ausnahmefällen ein initiales Ereignis bei der Prostatakarzinomentstehung sein.

Die Heterogenität von Tumoren war bisher ein unterrepräsentiertes Gebiet der Tumorforschung, auch wenn an molekularen Markern geforscht wird, die möglicherweise klinisch relevante Informationen liefern. So zum Beispiel ob ein bestimmter Tumor auf ein bestimmtes Medikament anspricht.

Ob derartige prädiktive Marker homogen oder heterogen im Tumorgewebe exprimiert werden, wird bislang nur ausnahmsweise untersucht. Eine der Gründe für das Fehlen von Studien zu dem Thema dürfte der substanziell hohe Arbeitsaufwand sein, der mit solchen Studien verbunden ist. Die Herstellung und Verwendung von Heterogenitäts-TMAs könnten hier zu einer Routinemethode werden.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse dieser Doktorarbeit, dass die Mutation von p53 ein seltenes Phänomen in Prostatakarzinomen ist, das typischerweise in Subpopulationen (kleineren oder grösseren) vorkommt und keine relevante Voraussetzung für die Metastasierung beim Prostatakarzinom darstellt.

Darüber hinaus zeigen die Befunde, dass Lymphknotenmetastasen von Prostatakarzinomen häufig multiklonal sind. Das widerspricht dem Konzept der Entstehung einer metastasierenden Subpopulation durch eine entscheidende Mutation im Primärtumor.

Die aktuell durchgeführten Untersuchungen bestätigen demgegenüber die hohe Leistungsfähigkeit von TMAs zur Analyse im Besonderen von Tumorgeweben, einschließlich von Heterogenitätsuntersuchungen.

5. Zusammenfassung

Das Prostatakarzinom ist die häufigste Krebserkrankung und die dritthäufigste Krebstodesursache bei Männern in Deutschland (Zentrum für Krebsregisterdaten, RKI, 2013).

Angesichts großer Unsicherheiten über die optimale Therapie bei diesem Tumor besteht ein hoher Bedarf nach Prognosefaktoren, insbesondere nach Prädiktoren für eine Metastasierung, da trotz guter Therapieoptionen die meisten Patienten mit metastasiertem Prostatakarzinom an ihrer Krebserkrankung versterben (Berger et al. 2011).

p53 ist das am häufigste mutierte Tumorsuppressorgen in menschlichen Tumoren und kommt auch beim Prostatakarzinom laut Studienlage in circa 5% der Fälle vor.

Vorausgesetzt, dass p53 Mutationen eine wichtige Ursache für die Entstehung von Lymphknotenmetastasierung sind, ist in dieser Studie untersucht worden, inwieweit p53 Mutationen mit der Metastasierung zusammenhängen. Dafür wurde eine Serie von Heterogenitätstissuemikroarrays immunhistochemisch auf p53 Proteinexpression untersucht.

Die Heterogenitäts-TMAs enthielten mindestens 10 verschiedene Gewebeproben von Primärtumoren von insgesamt 871 Patienten. Von 76 Patienten sind auch Lymphknotenmetastasen auf dem TMAs vorhanden, sodass der p53 Status im Primärtumor mit demjenigen in Lymphknotenmetastasen verglichen werden konnte.

Eine p53 Positivität fand sich in 13,4% (117/871) der Primärtumoren, wobei die Positivität in 5% stark und in 8% schwach ausgeprägt war.

Der p53 Status war in Primärtumoren bei 87% (754/871) der Patienten negativ, bei 12% (104/871) heterogen positiv und bei 1,5% (13/871) homogen positiv.

In den Metastasen fand sich bei 61 Patienten mit mindestens zwei auswertbaren Stanzungen aus Metastasen bei 30% eine Positivität aller Metastasen, bei 18% (11/61) ein heterogener Befund und bei 11,5% (7/61) ein bei unzureichendem Material schlechtes analysierbares fraglich homogener Befund.

Der Vergleich von Primärtumor und Metastasen ergab eine höhere Häufigkeit der p53 Positivität von Metastasen in p53 positiven, bzw. heterogen positiven Bewertungen (67%). Eine p53 Positivität fand sich auch in einigen Metastasen von

Patienten mit komplett p53 negativen Primärtumoren. Bei 61% der 18 Patienten mit p53 positiven Metastasen waren nicht alle p53 positiv.

Die Daten lassen erkennen, dass p53 Mutationen bei Prostatakarzinomen meistens nur in Subpopulationen vorkommen und diese keine unbedingte Voraussetzung für die Metastasierung sind.

Die meisten Metastasen bei Prostatakarzinomen sind p53 unabhängig. Von besonderem Interesse ist das häufige, gleichzeitige Vorkommen von p53 negativen und positiven Metastasen. Dieser Befund spricht gegen eine spezifische Mutation zur Auslösung der Lymphknotenmetastasierung. Vielmehr gibt es Anhalte für das parallele Auftreten von Lymphknotenmetastasen durch verschiedene Tumorsubpopulationen.

Die Daten beweisen ebenfalls die Leistungsfähigkeit von Heterogenitäts-TMAs für die systematische Untersuchung von homogenen/heterogenen molekularen Befunden in großen Tumorkollektiven.

6. Abkürzungsverzeichnis

Cmyc	Regulatorisches Gen, kodiert für Transkriptionsfaktor
CR	castrate resistant
ERG	Regulatorisches Gen, kodiert für Transkriptionsfaktor
HE	Hämatoxylin-Eosin
HER2	Protoonkogen
IHC	Immunhistochemie
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
PIN	Prostatische intraepitheliale Neoplasie
PSA	Prostata spezifisches Antigen
PTEN	Phosphatase und Tensin Homolog
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SSCP	Single stranded conformation polymorphism
TMA	Tissuemicroarray
TMPRSS2	Transmembrane protease serine 2

7. Literaturverzeichnis:

Barbieri CE, Baca SC, et al. (2012) Exome sequencing identifies recurrent SPP,FOXA1 and MED12 mutations in prostate cancer. *Nat. Genet.*2012,44:685-9 [Pub Med]

Bauer JJ, Sersterhenn IA, Mostofi KF, et al. (1995) p53 nuclear protein expression is an independent prognostic marker in clinically localized prostate cancer patients undergoing radical prostatectomy. *Clin Cancer Res* 1995; 1:1295-1300 [Pub Med]

Berger M, Lawrence M, Demichelis F, et al. (2011) The genomic complexity of primary human prostate cancer. *Nature.*2011,February10;470(7333):214-220 [Pub Med]

Brosh R, Rotter V (2009) When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. *Nat Rev Cancer* 9:701-13[Pub Med]

Bug M, (2010) The accumulation of mutant p53 in human cancer cells. PhD Thesis, Universitaet Goettingen[Pub Med]

Burkhardt L, Grob TJ, Hermann I, et al. (2010) Gene amplification in ductal carcinoma in situ of the breast. *Breast Cancer Res Treat.* 2010 Oct;123(3):757-65.[Pub Med]

Cary K, Cooperberg M (2013) Biomarkers in prostate cancer surveillance and screening: past, present and future. *Ther Adv. Urol.* 2013 December; 5(6):318-329.[Pub Med]

Chow A, Amemiya Y, et al. (2012) Whole-transcriptome analysis reveals established and novel associations with TMPRSS2:ERG fusion in prostate cancer. *Anticancer Res.*2012 Sep; 32(9):3629-41 [Pub Med]

Dahm-Daphi J (2000) P53: Biology and role for cellular radiosensitivity. Strahlentherapie und Onkologie, Urban und Vogel (2000)

Dall'Era MA, Albertsen PC, Bangma C, et al. (2012) Active surveillance for prostate cancer: a systematic review of the literature. Eur Urol. 2012;62:976-983 [Pub Med]

Ding L, Ellis M, Li S, et al. (2010) Genome Remodeling in a Basal-like Breast Cancer Metastasis and Xenograft. Nature.2010 April 15; 464 (7291):999-1005 [PubMed]

Eastham JA, Stapleton AM, Geusse AE, et al. (1995) Association of p53 mutations with metastatic prostate cancer. Clin Cancer Res. 1995 Oct;1(10:1111-8 [Pub Med]

Flammiger A, Weisback L, et al. (2013) High tissue density of FOXP3+T cells is associated with clinical outcome in prostate cancer. Eur J Cancer.2013 Apr;49(6):1273-9 [Pub Med]

Haag P, Hanhart N. Mueller M, Medizinische Verlags- und Informationsdienste Breisach (2010/2011) Gynäkologie und Urologie für Studium und Praxis, 5.Auflage, S.353-354

Haffner MC, Mosburger T, et al. (2013) Tracking the clonal origin of lethal prostate cancer. J Clin Invest. 2013 Nov 1;123(11)[Pub Med]

Hall MC, Navone NM, TroncosoP, et al. (1995) Frequency and characterization of p53 mutations in clinically localized prostate cancer. Urology.1995 Mar;45(3):470-5.[Pub Med]

Ho GH, Calvano JE, Bisogna M, et al. (2000) In microdissected ductal carcinomas in situ, HER2/neu amplification, but not p53 mutation, is associated with high nuclear grade and comedo histology. Cancer 2000,1;89(11):2153-60. [Pub Med]

<http://www.rki.de>, Zentrum für Krebsregisterdaten, 13.12.2013

Isobe M, Givol D, Oren M, Croce CM et al. (1986) Localization of gene for human p53 tumor antigen to band 17.13. *Nature* 320, 84-5 [Pub Med]

Kau Z, Jaiswal BS, et al. (2010) Diverse somatic mutation patterns and pathway alterations in human cancers. *Nature* 2010;466:869-73 [Pub Med]

Kumar-Sinha C, Tomlins S, et al. (2008) Recurrent gene fusions in prostate cancer. *Nat Rev Cancer* 8:497-511. [Pub Med]

Laibach-Kuehner, P. (2014) Oertlich begrenzter Prostatakrebs. Krebsinformationsdienst, deutsches Krebsforschungszentrum, E&B engelhardt & bauer Druck & Verlag GmbH, Karlsruhe, S.9

Lane DP, Crawford LV (1979) T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 278,261-63 [Pub Med]

Lang GA, et al. (2004) Gain of function of a p53 hot spot mutation in a mouse model of Li-Fraumeni-Syndrome. *Cell* 119:861-72 [Pub Med]

Liu W, Laitinen S, Khan S, et al. (2009) Copy number analysis indicates monoclonal origin of lethal metastatic prostate cancer. *Nat Med.* 2009 May;15(5):559-65 [Pub Med]

Lotan TL, Gurel B, Sutcliffe S, et al. (2011) PTEN protein loss by immunostaining: analytic validation and prognostic indicator for a high risk surgical cohort of prostate cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2011 Oct 15;17(20):6563-73 [Pub Med]

Malkin D, Li FP, Strong LC, et al. (1990) Germ line p53 mutation in a familial syndrom of breast cancer, sarcomas and other neoplasms. *Science* 250,12333-8. [Pub Med]

Mardis E (2008) The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Cell press, Trends in Genetics* Vol.24 No3. [Pub Med]

Meyers FJ, Gumerlock PH, Chi SG, et al.(1998) Very frequent p53 mutations in metastatic prostate carcinoma and in matched primary tumors. *Cancer* 1998.Dec 15;83(12):2534-9 [Pub Med]

Minner S, et al. (2013) Marked heterogeneity of ERG expression in large primary prostate-cancers. *Mod Pathol.*;26(1):106-116[Pub Med]

Navone N, Troncoso P, Pisters L, et al. (1993) p53 Protein Accumulation and Gene Mutation in the Progression of Human Prostate Carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 1993 Act 20;85(20):1657-69

Nofech-Mozes S, Spayne J, Rakovitch E, et al. (2008) Biological Markers Predictive of Invasive Recurrence in DCIS. *Clin Med Oncol.* 2008;2:7-18. [Pub Med]

Olive KP, et al. (2004) Mutant p53 gain of function in two mouse models of Li-Fraumeni-Syndrome. *Cell* 119:847-60[Pub Med]

Porter P, Gown A, Kramp S, et al. (1992) Widespread p53 overexpression in human malignant tumors. *American Journal of Pathology*, Vol.140,No.1.[Pub Med]

Reis-Filho J (2009) Next generation sequencing. *Breast Cancer Research* 2009,11(Suppl 3):S12 [Pub Med]

Rinner B, Galle B, Trajanoski S, Fiscer C, et al. (2012) Molecular evidence for the biclonal origin of neuroendocrine tumor derived metastases. *BMC Genomics.*2012; 13:594

Ross A, Loeb S, et al. (2010) Prostate-specific antigen kinetics during follow-up are an unreliable trigger for intervention in a prostate cancer surveillance program. *J Clin Oncol* 28:2810-2816 [Pub Med]

Rubin MA, Dunn R, Strawderman M, et al. (2002) Tissue microarray sampling strategy for prostate cancer biomarker analysis. *Am J Surg Pathol* 2002;26:312-19 [Pub Med]

Sauter G, et al. (1998) Zytogenetische Veränderungen des Prostatakarzinoms. *Der Pathologe*. 1998 Februar; Vol 19, Issue 1, pp63-68 [Pub Med]

Sauter G, Simon R, Hillau K, (2003) Tissue microarrays in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2003; 2:962-72 [Pub Med]

Schlomm T, Iwers L, Kirstein P, et al. (2008) Clinical significance of p53 alterations in surgically treated prostate cancers. *Modern Pathology* (2008) 21, 1371-78 [Pub Med]

Skinner HD, Sandulache VC, Ow TJ, et al. (2012) TP53 disruptive mutations lead to head and neck cancer treatment failure through inhibition of radiation-induced senescence. *Clin Cancer Res*. 2012 Jan 1;18(1):290-300. [Pub Med]

Stark , Hulka BS, Joens S, et al. (2000) HER-2/neu amplification in benign breast disease and the risk of subsequent breast cancer. *J Clin Oncol*. 2000 Jan;18(2):267-74 [Pub Med]

Suardi N, Briganti A, Gallina A, et al. (2010) Testing the most stringent criteria for selection of acandidates for active surveillance in patients with low-risk prostate cancer. *BJU Int*. 2010 Jun;105(11):11548-52 [Pub Med]

Thompson I, Pauler D, et al. (2004) Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level. *N Engl J Med*. 350: 2239-2246. [Pub Med]

Tomlins S (2005) Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science* 310:644-648.[Pub Med]

Tsoulakis MC, Walter E, Quaas A, et al. (2013) High Nr-CAM expression is associated with favorable phenotype and late PSA recurrence in prostate cancer treated by prostatectomy. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2013 Jun;16(2):159-64 [Pub Med]

Visakorpi T, Kllioniemi OP, Heikkinen A, et al.(1992) Small subgroup of aggressive, highly proliferative prostatic carcinomas defined by p53 accumulation. J Natl Cancer Inst 1992; 84:883-887 [Pub Med]

Wörterbuch-Redaktion des Verlages, Walter de Gruyter (2007) Klinisches Wörterbuch Pschyrembel, 261.Auflage, S.1572

Yin Y, Tainsky MA,et al. (1992) Wild-type p53 restores cell cycle control and inhibits gene amplification in cells with mutant p53 alleles. Cell 70:937-48[Pub Med]

Yoshimoto M, Cunha IW, Coudry RA, et al. (2007) FISH analysis of 107 prostate cancers shows that PTEN genomic deletion is associated with poor clinical outcome. Br J cancer.2007 Sep 3;97(5):678-85 [Pub Med]

Zellweger T, Ninck C, Block M, et al. (2005) Expression patterns of potential therapeutic targets in prostate cancer. Int J Cancer 2005;113:619-28 [Pub Med]

8. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Guido Sauter für die Bereitstellung des Themas und für die Übernahme der Betreuung während der gesamten Entstehungszeit dieser Arbeit.

Ich danke Frau Dr. Sandmann für die freundliche Einarbeitung in den experimentellen Teil der Arbeit.

Vielen Dank an Frau Dr. Minner und Herrn Dr. Simon für die Bereitstellung der Abbildungen sowie die Geduld bei der Beantwortung von Fragen.

Besonderer Dank geht an alle Mitarbeiter des Zuschnitts, des TMA-Labors und der Immunhistochemie für ihren Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit.

Vielen Dank an alle, die mich während der Anfertigung dieser Arbeit begleitet haben.

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.

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

Unterschrift: