

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Pathologie

Professor Dr. med. G. Sauter
Direktor der Einrichtung

ALY/REF als unabhängiger prognostischer Parameter im Prostatakarzinom

Dissertation

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

vorgelegt von:

Marit Bernhardt
aus Düsseldorf

Hamburg 2019

(wird von der Medizinischen Fakultät ausgefüllt)

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 24.09.2019**

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

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

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Markus Graefen

Inhaltsverzeichnis

1. Arbeitshypothese und Fragestellung.....	4
2. Einleitung.....	5
2.1 Prostatakarzinom	5
2.2 ALY/REF	9
2.3 ALY/REF bei Tumorerkrankungen.....	11
3. Material und Methoden	12
3.1 Patientenkollektiv	12
3.2 Immunhistochemie	12
3.3 Statistik	13
4. Ergebnisse.....	14
4.1 Technische Aspekte	14
4.2 ALY/REF, Phänotyp und Prognose.....	14
4.3 ALY/REF-Expression und ERG	19
4.4 ALY/REF und Tumorphänotyp/ Prognose in ERG-positiven und ERG-negativen Tumoren.....	20
4.5 Multivariate Analyse	25
4.6 ALY/REF, chromosomale Deletionen und Ki67-Labeling Index.....	28
4.7 ALY/REF und Androgenrezeptor	33
5. Diskussion	34
6. Zusammenfassung/ Summary	41
6.1 Zusammenfassung.....	41
6.2 Summary.....	42
7. Abkürzungsverzeichnis	43
8. Literaturverzeichnis.....	44
9. Danksagung	50
10. Lebenslauf	51
11. Eidesstattliche Erklärung	52

1. Arbeitshypothese und Fragestellung

Das Prostatakarzinom ist das häufigste Karzinom bei Männern der westlichen Welt und steht in der Todesursachenstatistik der malignen Neoplasien weltweit an sechster, für die westliche Welt sogar an dritter Stelle. (Jemal et al. 2011) Die deutliche Diskrepanz zwischen Erkrankungsprävalenz und Todesursachenhäufigkeit lässt sich vornehmlich durch einen klinisch gutartigen Verlauf in der Mehrheit der Patienten erklären. (Punnen und Cooperberg 2013) Aktuell basieren Therapieentscheidungen im klinischen Alltag größtenteils auf morphologischen Kriterien, welche sich im sog. Gleason-Score widerspiegeln. Auch das Prostata-spezifische Antigen (PSA), welches im Serum bestimmt wird, sowie die Tumorgröße dienen als Parameter. Dennoch ist die Vorhersage des klinischen Verlaufs anhand dieser Parameter bislang nicht, beziehungsweise nur unzureichend, möglich. Die Etablierung belastbarer Prognoseparameter zur Vermeidung von Über- und Untertherapie ist Gegenstand aktueller Forschung. (Leitlinienprogramm Onkologie [Deutsche Krebsgesellschaft] Deutsche Krebshilfe 2016, Burkhardt et al. 2013)

Das Nukleoprotein ALY/REF ist Teil des TREX-Multiproteinkomplexes welcher am Export reifer messenger RNAs (mRNA) aus dem Zellkern in das Zytoplasma beteiligt ist. Weiterhin beschrieben wurde eine Rolle in der Transkriptionsaktivierung, in der Stabilisierung von RNA sowie als Chaperone von Transkriptionsfaktoren. (Heath et al. 2016, Keys und Green 2001)

Aktuelle Forschung deutet auf eine Beziehung zwischen einer Dysregulation von Kern-Export-Proteinen und Tumorerkrankungen hin. Für ALY/REF konnte eine solche Beziehung bereits in verschiedenen Tumorentitäten wie dem Kolon-, dem Mamma- und dem Ovarialkarzinom gezeigt werden. Außerdem beschrieben ist eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für Lymphknotenmetastasen durch Plattenepithelkarzinome des Oropharynx bei assoziierter ALY/REF-Überexpression. (Domínguez-Sánchez et al. 2011, Saito et al. 2013)

Die Assoziation zwischen ALY/REF und Prostatakarzinomen wurde bislang lediglich im Rahmen kleinerer Studien untersucht, welche auf eine Überexpression des Proteins hindeuten. Die Untersuchungen wurden jedoch jeweils lediglich an einer geringen Zahl von Tumoren durchgeführt.

Ziel der vorliegenden Studie ist daher die Untersuchung von ALY/REF als prognostischem Parameter im Prostatakarzinom an einem großen Kollektiv von insgesamt 17 965 Tumoren.

2. Einleitung

2.1 Prostatakarzinom

Das Prostatakarzinom ist das häufigste Karzinom bei Männern der westlichen Welt und steht in der Todesursachenstatistik der malignen Neoplasien weltweit an sechster, für die westliche Welt sogar an dritter Stelle. (Jemal et al. 2011) In Deutschland liegt die Rate der Neudiagnosen bei derzeit ca. 60.000 Fällen im Jahr, was einer Inzidenz von ca. 115 pro 100.000 Männern entspricht. Die Inzidenz nimmt mit steigendem Lebensalter zu. Dieses stellt den wichtigsten Risikofaktor dar. Eine Prostatakarzinomdiagnose vor dem 50. Lebensjahr ist selten, ab dem 65. Lebensjahr steigt die Wahrscheinlichkeit in den folgenden zehn Jahren ein Prostatakarzinom diagnostiziert zu bekommen auf ca. 5% an. Das mittlere Diagnosealter liegt aktuell bei 69 Jahren. Das durchschnittliche Risiko im Verlauf des Lebens ein Prostatakarzinom diagnostiziert zu bekommen liegt für Männer in Deutschland bei aktuell fast 12%. (Robert Koch-Institut 2017)

Die tatsächliche Erkrankungswahrscheinlichkeit dürfte sogar noch höher liegen. Mehrere Obduktionsstudien weisen auf eine hohe Zahl latenter, klinisch symptomloser Prostatakarzinome hin. (Haas et al. 2008) Die Häufigkeit latenter Prostatakarzinome wird in der Literatur mit 14 bis 44% angegeben. (Franks 1954) In einer eigenen Untersuchung zur Prävalenz des Prostatakarzinoms in radikalen Zystoprostatektomiepräparaten konnte in 63% ein (latentes) Prostatakarzinom nachgewiesen werden. In der Altersgruppe der > 75-Jährigen lag die Prävalenz sogar bei 74%. Einschränkung bleibt jedoch, dass bei den hier untersuchten Patienten bereits eine Tumorerkrankung der Harnblase bestand und somit die Tumorsuszeptibilität möglicherweise über der der Normalbevölkerung liegt. Dennoch weisen die Daten darauf hin, dass die Zahl latenter Prostatakarzinome derzeit noch deutlich unterschätzt werden dürfte. (Professor G. Sauter, Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf, unpublizierte Daten)

Neben dem Lebensalter, das als wichtigster und am besten beschriebener Risikofaktor gilt, zählt auch eine positive Familienanamnese zu den gesicherten Risikofaktoren für das Prostatakarzinom. Etwa 80% der Patienten sind bei Diagnosestellung 65 Jahre alt oder älter. Bei Vorliegen einer positiven Familienanamnese steigt das relative Risiko, an einem Prostatakarzinom zu erkranken, im Vergleich zum Risiko eines Mannes mit negativer Familienanamnese, um den Faktor 2,03 an. (Punnen und Cooperberg 2013) Interessant ist hierbei, dass das Risiko an einem Prostatakarzinom zu erkranken, nicht nur bei positiver Familienanamnese für Prostata-, sondern auch bei Mammakarzinomen erhöht ist. (Daniyal et al. 2014; Punnen und Cooperberg 2013) Als mögliche Erklärung hierfür werden unter anderem ähnliche biologische Krankheitsmechanismen und die Beziehung der beiden Erkrankungen zu endogenen Steroidhormonen, Insulin und Insulin-like Wachstumsfaktoren sowie Entzündungsmediatoren angegeben. (Beebe-Dimmer et al. 2015) Weiterhin steigert eine Mutation im Breast cancer predisposition gene 2 (BRCA 2) das Risiko an einem Prostatakarzinom zu erkranken signifikant. (Castro und Eeles 2012) Eine positive, lineare Beziehung zwischen absolutem Testosteronspiegel und der Entwicklung von Prostatakarzinomen wurde lange diskutiert. Ausführliche Metaanalysen des vorhandenen Datenmaterials konnten diese Hypothese jedoch nicht verifizieren, sodass hier ein komplexeres Zusammenspiel von Schwankungen des Testosteronspiegels und der Förderung der Karzinomentstehung angenommen wird. Dass Testosteron einen Einfluss auf das Wachstum der Prostata und auch des

Prostatakarzinoms hat, ist jedoch unumstritten. Die seit langem als Therapie etablierte Androgendeprivation zeigt dementsprechend großen Erfolg bei metastasierten Karzinomen. (Klap et al. 2015; Wang et al. 2018)

In den USA konnte eine erhöhte Inzidenz des Prostatakarzinoms in der Gruppe der afroamerikanischen Männer im Vergleich zur Gruppe der kaukasischen Männer gezeigt werden, sodass auch die ethnische Zugehörigkeit einen Einfluss auf die Erkrankungswahrscheinlichkeit zu haben scheint. Hierbei bleibt jedoch unklar, inwiefern sozioökonomische Faktoren das Ergebnis verfälschen, da Studien, die diese Faktoren berücksichtigen eine geringere, beziehungsweise keine Differenz zwischen afroamerikanischen und kaukasischen Männern aufzeigen. (Graham-Steed et al. 2013; Punnen und Cooperberg 2013) Bei einer dennoch vorhandenen breiten Streuung der Inzidenzen weltweit mit Nachweis eines Nord-Süd-Gefälles innerhalb Europas sowie einer geringeren Prävalenz im asiatischen Raum ist eine ethnisch bedingte genetische Variationsbreite dennoch anzunehmen. Weiterhin deuten diese Daten auch auf einen Einfluss alimentärer Faktoren hin. Tatsächlich wurde in zahlreichen Studien eine Assoziation zwischen fett- und fleischreicher Ernährung sowie Übergewicht und Erkrankungswahrscheinlichkeit belegt. (Leitlinienprogramm Onkologie [Deutsche Krebsgesellschaft] Deutsche Krebshilfe 2016; Zhu et al. 2015)

Eine chronische (asymptomatische) Prostatitis stellt ebenfalls einen Risikofaktor dar. Hierbei sind sowohl bakteriell beziehungsweise mikrobiell vermittelte wie auch durch eine sogenannte „proinflammatorische Ernährungsweise“ bedingte Entzündungen eingeschlossen. Für eine (chronische) Prostatitis wird eine relative Risikoerhöhung für eine entsprechende Karzinomerkrankung mit einem Faktor von 1,3 angegeben. (Sfanos und Marzo 2012)

Die eingangs beschriebene hohe Zahl latenter Karzinome dürfte so zu erklären sein, dass eine Vielzahl der Prostatakarzinome klinisch asymptomatisch ist. Lediglich ein Teil der Patienten klagt über unspezifische Beschwerden. Hierzu zählen Miktionsbeschwerden wie Pollakisurie und Nykturie, welche jedoch nicht spezifisch für das Prostatakarzinom sind, sondern beispielsweise auch im Rahmen einer benignen Prostatahyperplasie auftreten können, welche dieselbe Altersgruppe betrifft. Ein Teil der Patienten wird erst im metastasierten Stadium symptomatisch. Fernmetastasen finden sich dabei am häufigsten im Achsenskelett und die betroffenen Patienten stellen sich mit Rückenschmerzen und/ oder pathologischen Frakturen vor. (Daniyal et al. 2014) Die Diagnosestellung erfolgt somit bei der Mehrheit der Patienten nicht in Folge einer Symptomatik sondern im Rahmen von Vorsorgeuntersuchungen. Hierbei umfasst das klassische, in Deutschland häufig angewendete Screening eine digital-rektale Untersuchung (DRU) sowie gegebenenfalls eine Messung des PSA. Das PSA ist eine Serinprotease, welche durch die prostaticen Epithelzellen gebildet wird. Ihre eigentliche Aufgabe liegt in der Verflüssigung des Prostatasekrets. Bei gesunden Männern ist das PSA nur in geringen Mengen im Blut nachweisbar, als normal gilt hier ein Wert ≤ 4 ng/ ml. Wenn in der Prostata ein epithelialer, die Basalmembran durchbrechender, Tumor wächst, ist das PSA oft in größeren Mengen im Serum nachweisbar. Begrenzend ist hierbei der Fakt, dass auch andere, beispielsweise mechanische oder entzündliche Einflüsse wie eine Prostatitis, ein Harnwegsinfekt, eine statt gehabte rektale Untersuchung oder aber eine benigne Prostatahyperplasie zu einer PSA-Erhöhung führen können, sodass das PSA letztlich nicht als karzinomspezifisch anzusehen ist und lediglich als Hinweis auf eine Pathologie unklarer Dignität der Prostata gewertet werden sollte. Zudem kann auch bei einem „normalen“ Serum-PSA ein Karzinom vorhanden sein. (Amling 2006) Auch für die DRU ist lediglich eine Sensitivität von 53,2% beschrieben. Hervorzuheben ist jedoch ihre

hohe Spezifität, die in der Literatur mit 83,6 bis 97% angegeben wird. Einschränkend ist zu bemerken, dass mit der DRU nur Karzinome erfasst werden, die in der äußeren Zone des Organs entstehen. Dies trifft zwar auf die Mehrheit Prostatakarzinome zu, Karzinome in anderen Organzonen oder aber solche mit niedrigem Tumorstadium (pT1) bleiben bei Anwendung dieser Methode allerdings unentdeckt. In Deutschland wird bei einer PSA-Bestimmung immer auch die Kombination mit einer DRU empfohlen. Da eine Screeninguntersuchung eines asymptomatischen Patienten gegebenenfalls eine Diagnose bei Patienten herbeiführt, deren Karzinome ansonsten in die Gruppe der „latenten“ Erkrankungen gezählt hätte, gibt es in Deutschland keine eindeutige Empfehlung für ein systematisches PSA-Screening. (Epstein und Netto 2008; Leitlinienprogramm Onkologie [Deutsche Krebsgesellschaft] Deutsche Krebshilfe 2016; Robert Koch-Institut 2017; Stephan et al. 2014)

Bei klinischem Verdacht auf das Vorliegen eines Karzinoms (Erhöhung des PSA-Wertes auf ≥ 4 ng/ml, Tastbefund in der DRU oder einem auffälligen Anstieg des PSAs um mindestens 0,35 bis 0,75 ng/ml pro Jahr) besteht entsprechend der deutschen Leitlinie die Indikation zur Biopsie und dem Versuch der histologischen Sicherung des etwaigen Tumors. Hierbei sollten mindestens 12 Stanzbiopsien gewonnen und der histopathologischen Begutachtung zugeführt werden. Wird in einer oder mehrerer der Biopsien ein invasives Karzinom nachgewiesen, erfolgen weitere Untersuchungen um die Ausdehnung des neoplastischen Prozesses einzugrenzen. Hierbei wird bei Annahme eines lokal begrenzten Karzinoms ohne extraprostatasche Ausbreitung eine Sonographie empfohlen. Diese erfolgt in der Regel bereits im Rahmen der unter sonographischer Kontrolle durchgeführten Biopsie. Bei Verdacht auf eine stattgehabte Metastasierung werden weitere Untersuchungen wie eine Computertomographie und eine Skelettszintigraphie, letztere zur etwaigen Detektion von Knochenmetastasen, notwendig. Nach erfolgtem Staging sowie histopathologischem Grading anhand des Gleason-Scores wird gemeinsam mit dem Patienten eine Entscheidung bezüglich weiterer therapeutischer Maßnahmen getroffen. Hierbei bleibt zu bedenken, dass trotz einer hohen Erkrankungswahrscheinlichkeit und zahlreicher, in einer breiten Mehrheit der Bevölkerung vorliegender und zudem nicht beeinflussbarer Risikofaktoren ein mit 91% sehr hohes 5-Jahresüberleben besteht. Diese Diskrepanz wird in der Literatur auch als „Paradox des Prostatakarzinoms“ bezeichnet. Bei der Entscheidung für oder gegen eine Therapie bleibt demnach zu bedenken, dass nur etwa 20% der Karzinome einen klinisch aggressiven Verlauf zeigen. Weiterhin wird, wie bereits erwähnt, durch Verbesserung und Verbreitung von Maßnahmen zur Früherkennung nun auch bei eben jenen Patienten ein Karzinom diagnostiziert, die ansonsten niemals klinisch symptomatisch geworden wären, bei denen also ein sogenanntes „latentes Karzinom“ vorliegt. (Daniyal et al. 2014; Punnen und Cooperberg 2013; Robert Koch-Institut 2017) Im Gegensatz zu anderen Tumorerkrankungen gibt es daher beim Prostatakarzinom für bestimmte Patientenkollektive die Strategie der aktiven Überwachung („active surveillance“). Hierbei wird der Patient in regelmäßigen Abständen klinisch untersucht und zudem rebiopsiert. Bei einem eventuellen Fortschreiten der Erkrankung können so rechtzeitig weitere Maßnahmen ergriffen werden.

Patienten, die sofort eine Therapie wünschen oder für die aktive Überwachung aus anderen Gründen nicht infrage kommt, werden entweder operativ mit einer radikalen Prostatektomie oder aber nichtoperativ mit einer Strahlentherapie behandelt. Beide Therapiestrategien gelten als nahezu gleichwertig. Bei einer Strahlentherapie besteht neben der transkutanen Radiatio auch die Möglichkeit einer Brachytherapie mit Einbringen radioaktiver Stifte (sog. „seeds“) in die Prostata, wo diese dann dauerhaft

verbleiben. Bei Vorliegen von Metastasen wird eine systemische Therapie erforderlich. Hierbei wird eine antihormonelle Behandlung entweder mit Antiandrogenen oder Androgenanaloga beziehungsweise Antagonisten des Luteinisierungshormon-Releasing-Hormons (LHRH) durchgeführt. Alternativ ist eine Kastration durch die chirurgische Entfernung der Hoden möglich. Bei einem Verlust der Hormonsensitivität der Tumorzellen im Verlauf der Therapie kann eine systemische Behandlung mit „klassischen“ Chemotherapeutika wie Docetaxel erforderlich werden. In den letzten Jahren wurde die Palette der medikamentösen Therapien beim kastrationsrefraktären Prostatakarzinom, also eben jenen Tumoren, welche trotz einer „klassischen“ Androgenrepression einen Progress zeigen, deutlich erweitert.

Neben Cabazitaxel, das wie Docetaxel zu den Chemotherapeutika aus der Gruppe der Taxane gehört, wurden für die Gruppe der Patienten mit kastrationsresistenten Prostatakarzinomen die Antiandrogene Arbirateron und Enzatulamid zur Therapie zugelassen. Enzatulamid inhibiert dabei kompetitiv den Signalweg des Androgenrezeptors sowohl im Sinne einer direkten Hemmung des Rezeptors, wie auch durch das Verhindern der Translokation des Rezeptors in den Zellkern. Ferner wird die Bindung des Androgenrezeptors an die DNA und die Aktivierung von Cofaktoren inhibiert. Arbirateron hingegen hemmt die extragonadale Androgensynthese und wird in Kombination mit einem Kortikosteroid wie Prednison verabreicht. (Leitlinienprogramm Onkologie [Deutsche Krebsgesellschaft] Deutsche Krebshilfe 2016)

Zudem besteht bei symptomatischen Knochenmetastasen und gleichzeitig fehlendem Nachweis einer extraossären Metastasierung, die Option einer Radionuklidtherapie mit dem alpha-Strahler Radium 223. Dieser wird innerhalb der, beim Prostatakarzinom typischerweise osteoblastischen, Knochenmetastasen anstelle von Kalzium an Hydroxylapatit gebunden, welches einer der Hauptbestandteile des Knochens ist. Hiermit wird ein lokaler zytotoxischer Effekt auf die in der Umgebung befindlichen Tumorzellen bewirkt. (Nevedomskaya et al. 2018)

Eine Immuntherapie mit Sipuleucel-T hemmt das Tumorstadium indem patienteneigene mononukleäre Zellen des peripheren Blutes extrakorporal mit einem Fusionsprotein aus Granulozyten stimulierendem Faktor (G-CSF) und rekombinanter prostaticher saurer Phosphatase (PAP) inkubiert werden. Nach Heranreifen der mononukleären Zellen zu aktivierten antigenpräsentierenden Zellen werden diese dem Patienten retransfundiert. Die verwendete rekombinante saure Phosphatase ist ein Protein, welches von den Prostatakarzinomzellen, jedoch nicht vom gesunden prostatichen Epithel, stark exprimiert wird und im Zuge der genannten Therapie vom körpereigenen Immunsystem als Zielstruktur erkannt wird. (Nevedomskaya et al. 2018) Die Therapieoption Sipuleucel-T wird allerdings in der deutschen Leitlinie nicht länger empfohlen, da das Medikament bereits seit 2015 von europäischen Markt genommen wurde. (Leitlinienprogramm Onkologie [Deutsche Krebsgesellschaft] Deutsche Krebshilfe 2016)

Eine Therapie mit sogenannten Immuncheckpointinhibitoren mit der Zielstruktur des programmed cell death proteins (PD-1) beziehungsweise des programmed cell death protein Liganden (PD-L1) ist Gegenstand aktueller Forschung und wird möglicherweise in den kommenden Jahren die Therapieoptionen erweitern. (Nevedomskaya et al. 2018) Immuncheckpointinhibitoren wie Nivolumab, Pembrolizumab oder werden bereits bei anderen Tumorerkrankungen wie dem Urothelkarzinom oder dem kleinzelligen Bronchialkarzinom erfolgreich eingesetzt. (Constantinidou et al. 2019; Rao und Patel 2019)

Für Patienten mit ernsten Begleiterkrankungen, und einer Lebenserwartung von unter zehn Jahren kann alternativ die Strategie des „watchful waiting“ angewendet werden.

Wie bei der aktiven Überwachung erfolgt hier (zunächst) keine Therapie, solange der Tumor nicht symptomatisch wird. Im Vergleich zur aktiven Überwachung werden die Patienten jedoch weniger engmaschig kontrolliert, da sich das weitere Vorgehen vor allem am Auftreten von Symptomen orientiert. (Leitlinienprogramm Onkologie [Deutsche Krebsgesellschaft] Deutsche Krebshilfe 2016; Oon et al. 2011)

Die Einführung von Früherkennungsuntersuchungen seit Beginn der 1990er Jahre hat zu einer Reduktion der prostatakarzinomassoziierten Mortalität geführt, die in der Literatur mit einer Größe von bis zu > 40% angegeben wird. (Glass et al. 2013) Gleichzeitig ist jedoch auch die Zahl der Prostatakarzinomdiagnosen deutlich gestiegen, da wie bereits erwähnt, deutlich mehr latente Karzinome erfasst werden. Die Therapiestrategie der aktiven Überwachung trägt dieser Tatsache Rechnung, da jede Therapie eines Karzinoms, welches nicht klinisch relevant geworden wäre, eine unnötige Übertherapie darstellt. Die häufigsten Nebenwirkungen/ Komplikationen einer radikalen Prostatektomie sind Harninkontinenz und erektile Dysfunktion. Diese liegen ein Jahr nach der Operation bei durchschnittlich 6% (Harninkontinenz) beziehungsweise 40% (erektile Dysfunktion) der Patienten vor. (Ramsay et al. 2012) Peri- und postoperative Komplikationen wie Infektionen oder tiefe Beinvenenthrombosen sind ebenfalls bei einigen Patienten beobachtbar, jedoch nur bei einem geringen Prozentsatz von Patienten. (European Association of Urology 2015) Bei einer Strahlentherapie kann es zu einer Reizung der Schleimhäute von Colon und Rektum kommen. Eine dauerhafte Verminderung des Harnblasenvolumens, entzündliche Veränderungen im Bestrahlungsfeld, rektale Blutungen und Funktionsstörungen von Blase und Darm sind mögliche Folgen. Weiterhin besteht ein erhöhtes Risiko für (strahleninduzierte) Zweitmalignome. In der deutschen Leitlinie wird das Risiko einer Übertherapie mit derzeit zwölf übertherapierten Patienten pro verhindertem Todesfall angegeben. Aktuell basiert die Entscheidung entweder für eine Therapie oder für eine aktive Überwachung, neben dem Patientenwillen, auf Basis der sogenannten Epstein-Kriterien für klinisch nicht signifikante Prostatakarzinome. Hierbei geht der Gleason-Score (< 7), die Zahl karzinombefallener Biopsien (< 3) und der prozentuale Anteil des Karzinoms an der Gesamtgröße der Biopsie (< 50%), das serologisch bestimmte PSA und die Frage, ob das Karzinom organbegrenzt ist, in die Bewertung ein. Für die Therapieentscheidung werden außerdem bestehende Komorbiditäten mithilfe der ASA-Klassifikation der American Society of Anesthesiologists und des Charleston-Score quantifiziert. Dabei bleibt zu erwähnen, dass der in den 1970er Jahren etablierte Gleason-Score, welcher den histologischen Differenzierungsgrad des Karzinoms beschreibt, den bislang wichtigsten prognostischen Parameter darstellt. Das Dilemma einer Übertherapie bei zwölf Patienten zur Verhinderung eines prostatakarzinomassoziierten Todesfalles ist allein mit Anwendung der Epstein-Kriterien nicht zu lösen, da diese in Metaanalysen lediglich eine Genauigkeit von 39 - 76% aufweisen. (Oon et al. 2011) Thema gegenwärtige Forschung ist somit nicht nur die stete Verbesserung von Therapien sondern auch die Etablierung prognostischer Parameter, um in Zukunft nur noch diejenigen Patienten zu behandeln, die von einer Therapie tatsächlich auch profitieren. (European Association of Urology 2015; Leitlinienprogramm Onkologie [Deutsche Krebsgesellschaft] Deutsche Krebshilfe 2016; Oon et al. 2011; Salman et al. 2015)

2.2 ALY/REF

ALY/REF(auch THO complex subunit 4 [THOC4], bZIP-enhancing factor [BEF]) ist ein

Nukleoprotein welches an einer Vielzahl nukleärer Prozesse beteiligt ist und einen Teil des TRanscription-EXport-Komplexes (TREX) im Kern eukaryotischer Zellen repräsentiert. (UniProt Consortium 2018) Der TREX-Komplex ist ein Multiproteinkomplex bestehend aus den Faktoren des THO-Komplexes (Thoc1, Thoc2, Thoc5, Thoc6, Thoc7) und den TREX-Komponenten DDX39B, DDX39A, ALY/REF, UIF, Luzp4, CHTOP, SARNP, POLDIP3, ZCH11A und ERH. Im Kern bindet der TREX-Komplex an die mRNA, während diese durch splicing, 5'-capping und Polyadenylierung am 3'-Ende von der prä-mRNA zur reifen mRNA prozessiert wird. Die Bindungsstellen des TREX an die mRNA stellen dabei der sogenannte „Cap binding complex“ (CBC) sowie der „Exon junction complex“ (EJC) dar. Für den Kernexport lagert sich der TREX-Komplex an die mRNA an. Im Folgenden bindet die TREX-Untereinheit ALY/REF an den Nuclear RNA export factor 1 (NXF1). Es kommt zu einer Konformationsänderung und DDX39B disloziert. Hierdurch vermindert sich die Bindung der mRNA an den TREX-Komplex und die mRNA wird, vermittelt durch ALY/REF, an NXF1 übergeben. Als Bestandteil des Kernporenkomplexes vermittelt NXF1 schließlich den letzten Schritt des mRNA-Exportes in das Zytoplasma. (Heath et al. 2016; Yamazaki et al. 2010)

ALY/REF wird in humanen Zellen ubiquitär exprimiert (Uhlén et al. 2015). Zudem finden sich ALY/REF/ homologe Proteine im Genom von *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* und *Saccharomyces cerevisiae* (Yeast RNA Annealing protein [Yra1]). (Chervitz et al. 1999; Stubbs und Conrad 2015) Jedoch wird der mRNA-Export nicht ausschließlich durch TREX/ALY/REF vermittelt. Bei knock-out von ALY/REF ist der Gehalt von zytoplasmatischer mRNA lediglich moderat vermindert. Daher wird angenommen, dass auch andere, in ihrer Funktion redundante, Proteine den mRNA-Export vermitteln und, dass ALY/REF nicht den Export aller, sondern spezifisch den Export bestimmter mRNAs ermöglicht. (Stubbs und Conrad 2015) Hierbei handelt es sich um mRNAs, deren Größe bei > 300 Basenpaaren liegt. (Heath et al. 2016)

Inzwischen ist bekannt, dass Transkription und mRNA-Prozessierung im Kern nicht konsekutiv, sondern vielmehr parallel ablaufen. Die verschiedenen Prozesse sind dabei bidirektional miteinander verknüpft. In diesem Zusammenhang überrascht es nicht, dass auch für ALY/REF eine Rolle bei der Transkriptionsmodulation beschrieben wurde. Diese Eigenschaft erlangt ALY/REF durch die Interaktion mit Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie wie auch acute myeloid leukemia protein 1 (AML-1) und lymphoid enhancer binding factor (LEF-1). Dabei wirkt ALY/REF auf die Letztgenannten über die Verstärkung der DNA-Bindung im Sinne einer Aktivierung. (Heath et al. 2016) Für die Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie konnte hingegen eine transkriptionsaktivierende, wie auch eine -inhibitorische Wirkung von ALY/REF gezeigt werden. (Osinalde et al. 2013)

Neben seiner Funktion in mRNA-Export und Transkriptionsmodulation wirkt ALY/REF als Chaperone und stabilisiert, beziehungsweise unterstützt die Dimerisation von Transkriptionsfaktoren vom bZIP-Typ. (Heath et al. 2016) Die Beschreibung der Funktion als Chaperone wird in der Literatur auch als Grund für die vielfältige Beteiligung von ALY/REF an unterschiedlichen nukleären Prozessen diskutiert. Hierbei fällt auf, dass ALY/REF an Prozessen beteiligt ist, welche der Ausbildung, (struktureller) Veränderung und Auflösung von Multiproteinkomplexen dienen. (Keys und Green 2001)

2.3 ALY/REF bei Tumorerkrankungen

Im Rahmen von Studien, welche systematisch dysregulierte Proteine in Tumoren suchen, zeigte sich ALY/REF in verschiedenen Tumorerkrankungen dysreguliert, bei einer gleichzeitig vorhandenen, ubiquitären Expression von ALY/REF in allen untersuchten Normalgeweben. (Saito et al. 2013; Viphakone et al. 2015) Beschrieben ist eine Dysregulation im Glioblastom, in Mamma-, Ovarial- und Kolonkarzinomen sowie im Prostatakarzinom. (Domínguez-Sánchez et al. 2011) Dabei zeigt sich ALY/REF in Tumoren sowohl über- als auch unterexprimiert. Weiterhin zeigt sich eine signifikante Erhöhung der Wahrscheinlichkeit einer Lymphknotenmetastasierung in Plattenepithelkarzinomen des Oropharynx in Zusammenhang mit einer ALY/REF-Überexpression. Allerdings handelt es sich bei allen derzeit publizierten Studien um solche mit einer geringen Fallzahl. (Domínguez-Sánchez et al. 2011; Jovčevska et al. 2017; Saito et al. 2013; Viphakone et al. 2015)

Die Expression von ALY/REF in Prostatakarzinomen ist bisher in keiner publizierten Studie gesondert untersucht worden. Verfügbare Daten stammen von einzelnen Proben aus Multitumorarrays. Hierbei wird sowohl eine Dysregulation wie auch eine Normalexpression beschrieben. Zu erwähnen bleibt, dass die Anzahl der hier untersuchten Proben zwischen 4 und 23 liegt. Um eine definitive und belastbare Aussage treffen zu können, ist daher eine Untersuchung an einem größeren Tumorkollektiv notwendig. (Domínguez-Sánchez et al. 2011; Viphakone et al. 2015)

Ziel der vorliegenden Studie war es deshalb die klinische Bedeutung des ALY/REF-Expression beim Prostatakarzinom an einem großen Tumorkollektiv zu untersuchen.

3. Material und Methoden

3.1 Patientenkollektiv

Für die Durchführung der Studie wurden radikale Prostatektomiepräparate von 17 965 Patienten untersucht, welche im Zeitraum von 1992 bis 2012 am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE), Klinik für Urologie sowie am Prostatakrebszentrum Martiniklinik am UKE prostatektomiert wurden. Verlaufsdaten waren für insgesamt 14 672 Patienten verfügbar. Das Nachsorgeintervall betrug im Median 47,9 Monate (Streuungsbreite: 1 Monat bis 275,8 Monate). Postoperativ wurde das PSA bestimmt.

Ein Wiederanstieg des PSA auf einen Wert $> 0,2$ ng/ ml mit einem kontinuierlichen Anstieg in nachfolgenden Messungen wurde als Rezidiv gewertet.

Alle Prostatektomiepräparate wurden entsprechend eines Standardisierten Protokolls verarbeitet, wobei eine vollständige Paraffineinbettung des Gewebes erfolgte (für eine ausführliche Darstellung vgl. Erbersdobler et al. 2002).

Für die Erstellung des Tissue Microarray (TMA) wurde pro Patient aus je einem Paraffinblock eines repräsentativen Tumorareals ein Zylinder von 0,6 mm Durchmesser ausgestanzt. Die gewonnenen Stanzzyylinder wurden nachfolgend auf insgesamt 27 TMA-Blöcke, mit je zwischen 144 und 522 Tumorseiten, verteilt. Für eine ausführliche Beschreibung der TMA-Erstellung vgl. Kononen et al. 1998; Mirlacher und Simon 2010. Alle erstellten TMA-Blöcke enthielten zudem Kontrollgewebe, darunter auch normales Prostatagewebe.

Für einen Teil der im vorliegenden TMA untersuchten Prostatakarzinome lagen zudem ergänzende Daten molekularpathologischer Untersuchungen vor. Dabei war der Status der ERG-Expression bei 10 678 bekannt. (Weischenfeldt et al. 2013) Daten einer ERG break-apart Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)-Analyse waren in 7099 Fällen vorhanden. (Minner et al. 2011) Der Deletionsstatus von 5q21 (CHD1) lag bei 8074 (ergänzende Untersuchung zu Burkhardt et al. 2013), der Deletionsstatus von 6q15 (MAP3K7) in 6171 Fällen (Kluth et al. 2013) vor. Weiterhin vorliegend waren Daten zum Deletionsstatus von 10q23 (PTEN) bei 6803 (Krohn et al. 2012) und von 3p13 (FOXP1) bei 7201 (ergänzend zu (Krohn et al. 2013) Fällen. In 4426 Fällen war zudem der Ki-67 Labeling Index (LI) bekannt. (Tennstedt et al. 2012)

Die Studie wurde gemäß den Richtlinien der Deklaration von Helsinki sowie des Hamburger Krankenhausgesetzes (HmbKHG, §12.1) durchgeführt. Die Nutzung von archiviertem Gewebe aus der Routinediagnostik für die Erstellung der TMAs zu Forschungszwecken wie auch die Analyse der Daten der entsprechenden Patienten wurde durch die Ethikkommission Hamburg genehmigt (Ethikkommission Hamburg, WF-049/09).

3.2 Immunhistochemie

Alle Schnittpräparate der verwendeten TMA-Blöcke wurden an einem Tag angefertigt und in einem Versuchsablauf gemeinsam gefärbt. Dazu wurden die Schnitte zunächst entparaffiniert und rehydriert. Im Anschluss erfolgte eine hitzeinduzierte Epitopendemaskierung. Hierzu wurde das Gewebe für fünf Minuten bei 121 °C und

bei einem pH-Wert von 7,8 autoklaviert. Die immunhistochemische Färbung von ALY/REF erfolgte mit dem handelsüblichen polyklonalen Kaninchen-Anti-ALY/REF-Antikörper HPA019799 (#HPA019799, Verdünnung 1:600, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Alle Schnittpräparate wurden bei 37 °C für eine Stunde mit dem ALY/REF-Antikörper inkubiert. Für die anschließende Detektion der gebundenen Antikörper erfolgte eine zweite Inkubation für 30 Minuten bei ebenfalls 37 °C mit dem Anti-Rabbit/Mouse-Sekundärantikörper des handelsüblichen DAKO-EnVision-Kits (K5007, DAKO Envision Kit, DAKO REAL TM EnVision Detection System, DAKO, Glostrup, Dänemark). Die anschließende Sichtbarmachung des gebundenen Antikörpers erfolgte mit dem im genannten Kit enthaltenen DAB+-Chromogen entsprechend der Anweisung des Herstellers.

Typischerweise zeigte sich eine nukleäre Färbung, welche als positiv gewertet wurde. Eine in Einzelfällen vorkommende zytoplasmatische Färbung wurde im Sinne einer negativen Färbung interpretiert. Zudem wurde die Intensität der nukleären Färbung (0, 1+, 2+, 3+) sowie der Anteil positiver Tumorzellen (in%) für jede der Gewebeproben erhoben. Der abschließenden Score für die jeweilige Probe ergab sich aus der Kombination von Intensität und Anteil positiver Tumorzellen. Hierbei wurden solche Proben als negativ gewertet, bei denen keine Färbung vorlag. Ferner wurde auch eine Färbeintensität von 1+ in $\leq 70\%$ der Tumorzellen oder eine Färbeintensität von 2+ in $> 30\%$ jedoch $\leq 70\%$ als negativ gewertet. Dieses Szenario traf jedoch nur für eine geringe Anzahl der ausgewerteten Proben ein. Eine Färbeintensität von 1+ in $> 70\%$ oder 2+ in $> 30\%$ aber $\leq 70\%$ wurde als „schwach“, eine Färbeintensität von 2+ in $> 70\%$ oder 3+ in $> 30\%$ als „stark“ gewertet (Vgl. auch Minner et al. 2010; Minner et al. 2011).

3.3 Statistik

Die statistische Datenauswertung erfolgte unter Anwendung der Software JMP® 10.0.2 (SAS Institute Inc., NC, USA). Für die Untersuchung möglicher Assoziationen zwischen molekularen Parametern sowie dem Tumorphänotyp wurden der Chi²-Test wie auch Kontingenztabellen angewendet. Die Berechnung von Überlebenskurven erfolgte anhand der Kaplan-Meier-Methode. Um signifikante Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen zu finden, wurden die Gruppen mittels des Log-Rank-Tests verglichen. Zur Überprüfung der statistischen Unabhängigkeit sowie der Signifikanz der gefundenen Unterschiede zwischen klinischen, pathologischen und molekularen Variablen wurde schließlich eine Cox-Regression mit proportionalen Hazards angewendet.

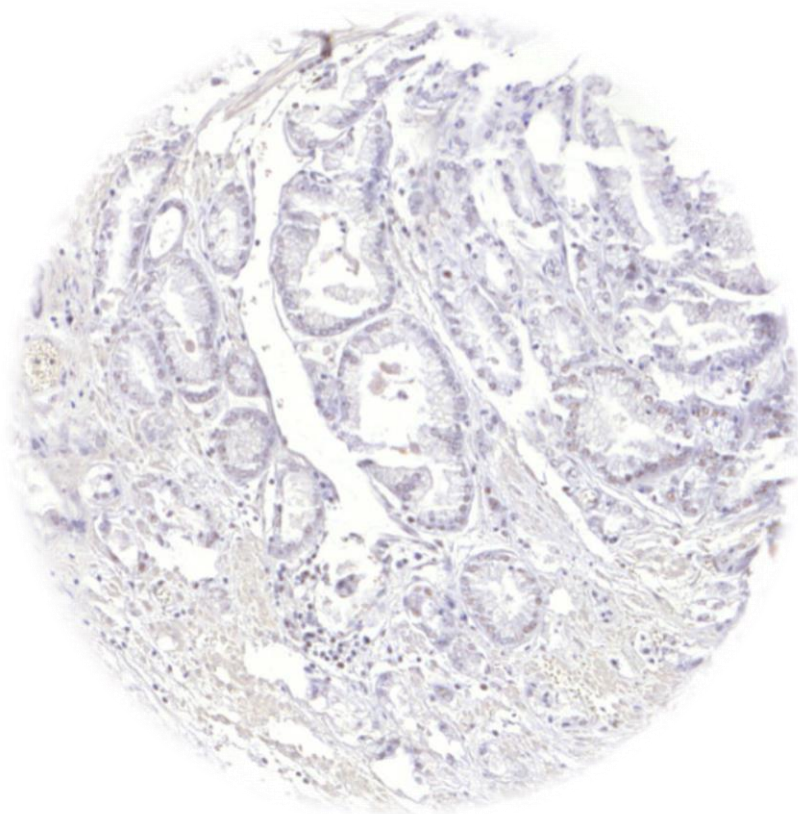
4. Ergebnisse

4.1 Technische Aspekte

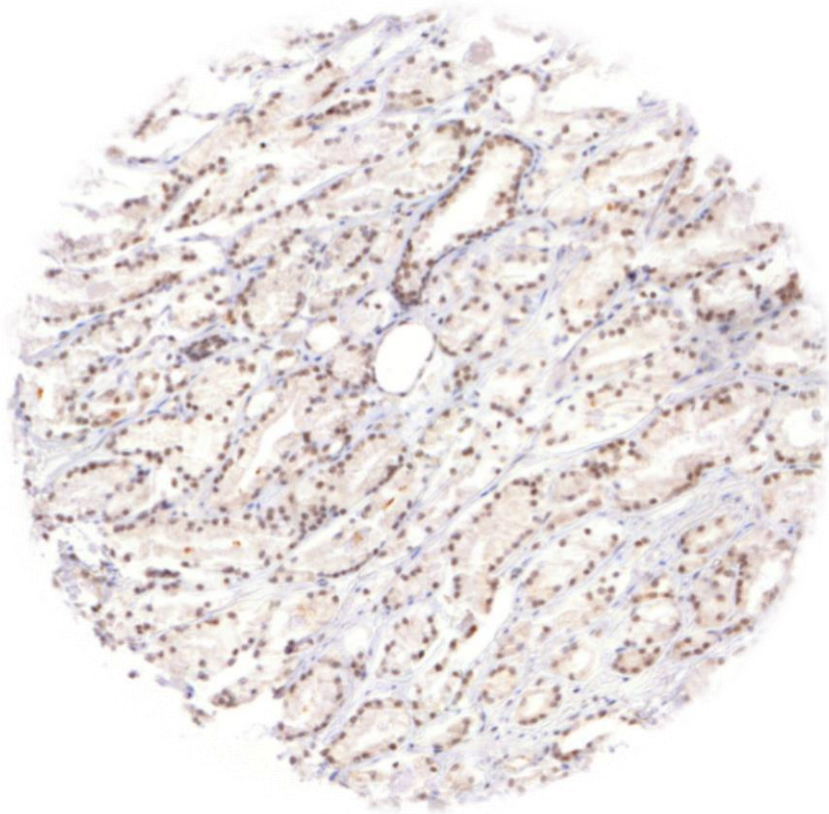
Von insgesamt 17 965 untersuchten Gewebeproben waren 15 136 auswertbar. Gründe für nicht auswertbare Gewebesots waren das Fehlen von eindeutig identifizierbaren Tumorzellen oder aber das vollständige Fehlen von Gewebematerial an den entsprechenden TMA-Koordinaten. Ein möglicher Grund hierfür ist beispielsweise das Abschwimmen von Gewebe während der Färbeprozedur.

4.2 ALY/REF, Phänotyp und Prognose

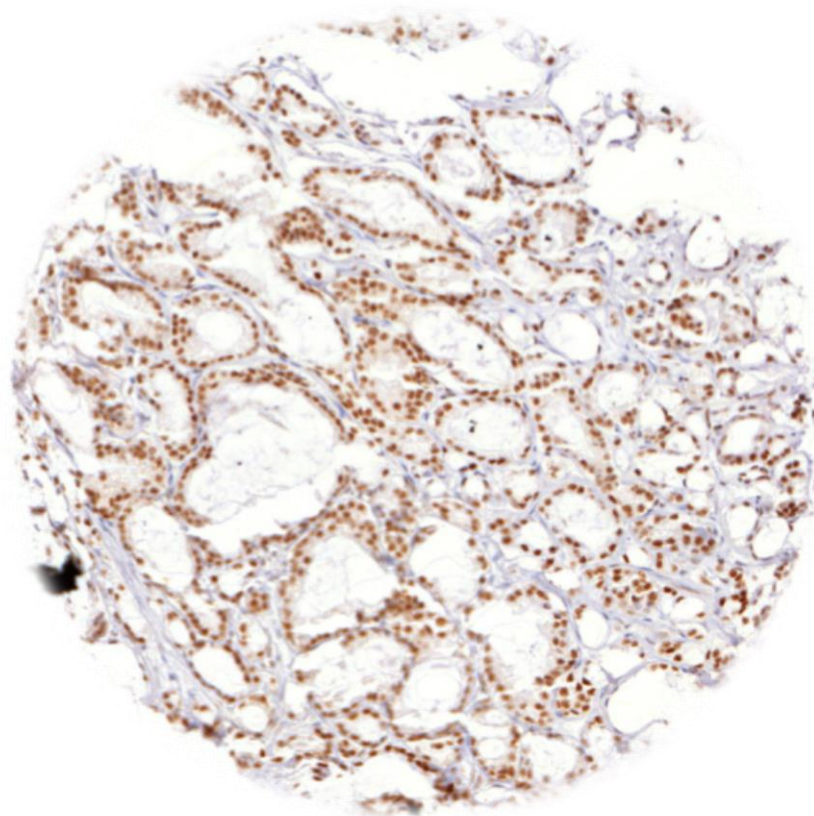
Von den 15 136 auswertbaren tumorhaltigen Gewebeproben zeigten 24,4% eine starke Färbung, 33,4% eine geringe Färbung und 42,2% keine ALY/REF-Anfärbung in Tumorzellen. Normales Prostataepithel zeigte eine unterschiedlich starke Anfärbung im Zellkern, von gering bis stark reichend. Bei Tumoren war die ALY/REF-Färbung somit oft geringer als im umliegenden Normalgewebe. Beispiele von Tumoren mit schwacher und starker Anfärbung sowie von ALY/REF-negativen Tumoren sind in den Abbildungen 1 a-f dargestellt.



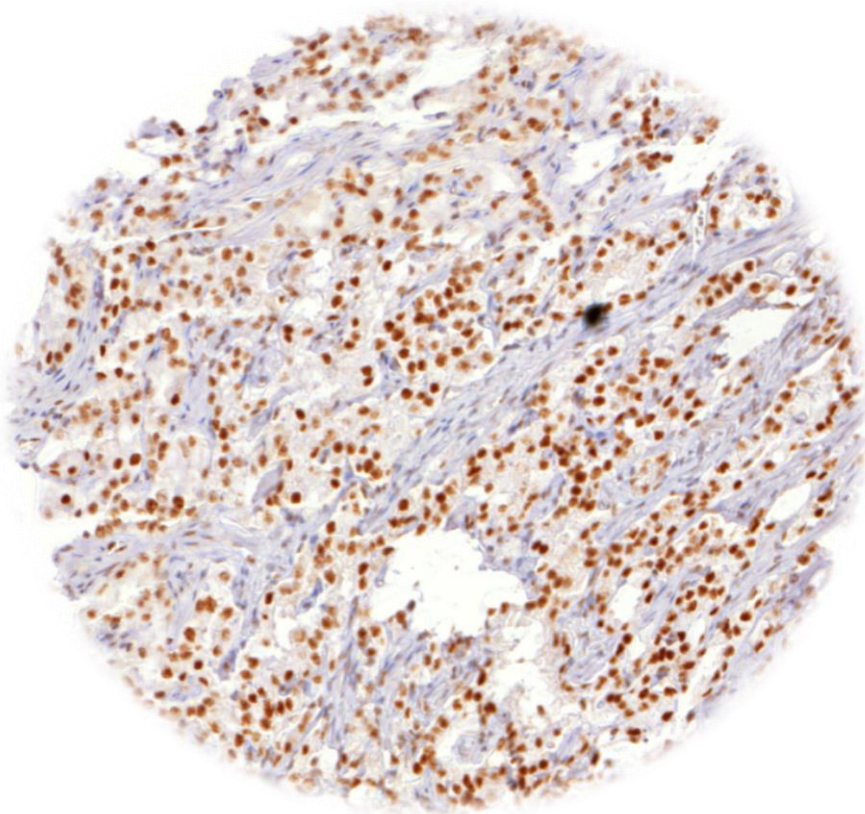
1a Beispiel eines Prostatakarzinoms mit niedrigem Gleason-Grad (3+3) und negativer ALY/REF-Färbung



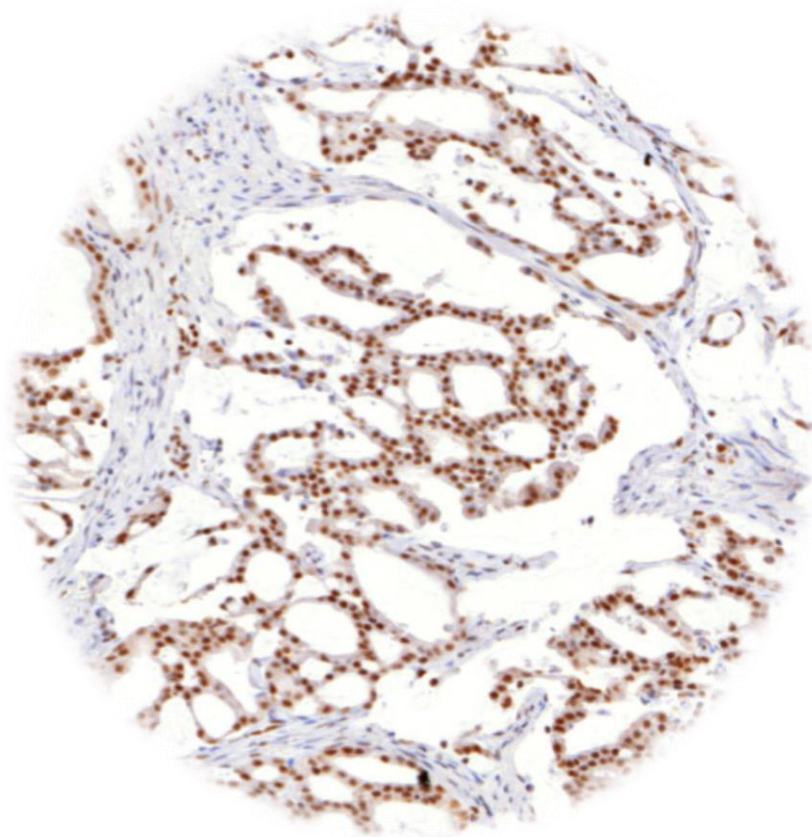
1b Beispiel eines Prostatakarzinoms mit niedrigem Gleason-Grad (3+3) und schwacher ALY/REF-Färbung



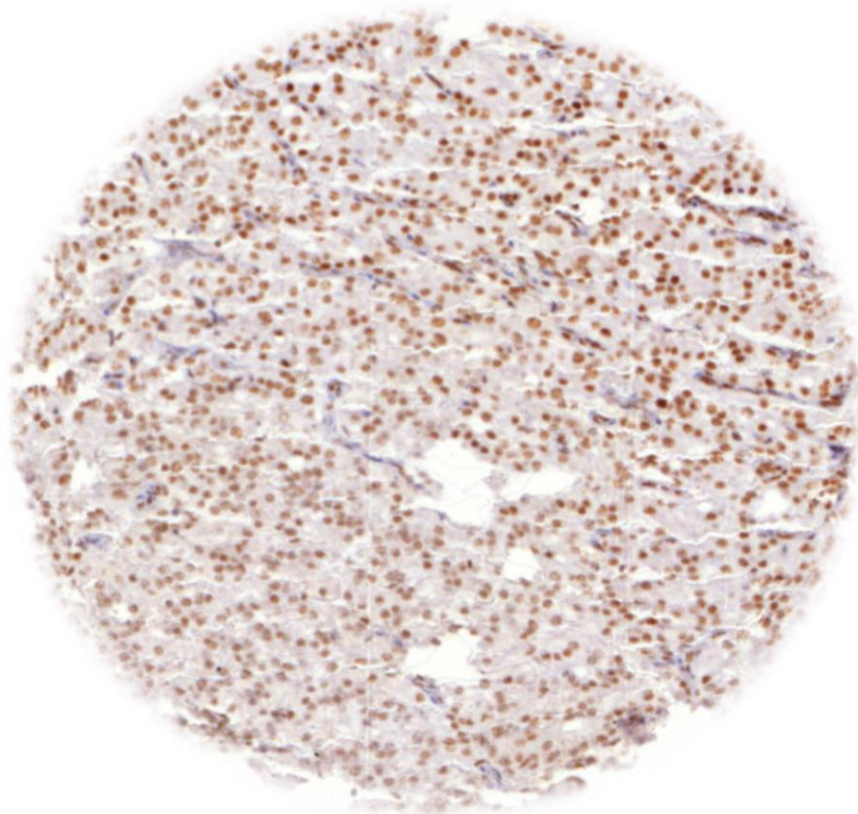
1c Beispiel eines Prostatakarzinoms mit mäßigem Gleason-Grad (3+4) und starker nukleärer ALY/REF-Färbung



1d Beispiel eines Prostatakarzinoms mit mäßigem Gleason-Grad (4+3) und starker nukleärer ALY/REF-Färbung



1e Beispiel eines Prostatakarzinoms mit hohem Gleason-Grad (4+4) und starker nukleärer ALY/REF-Färbung



1f Beispiel eines Prostatakarzinoms mit hohem Gleason-Grad (5+5) und starker nukleärer ALY/REF-Färbung

Abbildung 1 Beispiele von Tumoren mit niedrigem/mäßigem (a-d) und hohem (e+f) Gleason-Grad und unterschiedlicher Anfärbbarkeit gegenüber ALY/REF

Die ALY/REF-Expression war statistisch hochsignifikant mit dem Tumorstadium, dem Gleason-Grad, dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen, dem präoperativen Serum-PSA und dem R-Status assoziiert (p jeweils $< 0,0001$, Tabelle 1). Die Beziehung zwischen den genannten Parametern war jedoch nicht linear. Die statistisch signifikante Beziehung zwischen pT-Stadium und der ALY/REF-Expression war bedingt durch eine Zunahme der geringgradig positiven von 31,0% bei pT2-Tumoren auf 35,4% bei pT3a-Tumoren, bis zu 41,8% bei pT3b/pT4-Karzinomen. Hingegen sank der Anteil von ALY/REF-negativen wie auch der stark ALY/REF-positiven Tumoren von pT2 zu pT3/4 ab. Ähnlich war die Beziehung zwischen dem Gleason-Grad und ALY/REF. Eine signifikante und kontinuierliche Zunahme fand sich von Gleason 3+3 zu Gleason $\geq 4+4$ in der Zahl der geringgradig ALY/REF-positiven, welche von 28,2% bei Gleason 3+3 auf 42,3% bei Gleason $\geq 4+4$ anstieg. Im Gegensatz dazu kam es zu einem Absinken der Zahl der ALY/REF-negativen Tumoren von Gleason 3+3 (50,3% ALY/REF-negativ) zu Gleason $\geq 4+4$ (36,8% ALY/REF-negativ) und auch einem Absinken der stark positiven von 21,5% in Gleason 3+3 auf 20,8% in Gleason $\geq 4+4$.

Auch bei der Beziehung zu Lymphknotenmetastasierung fand sich ein ähnliches Bild. Die Zahl der ALY/REF-negativen Tumoren sank von N0 zu N+ von 40,3% auf 33,1% und die Zahl der stark positiven sank von 26,2% in N0 zu 24,0% in N+. Dementsprechend kam es zu einem Anstieg der geringgradig positiven von 33,6% auf 42,9%.

	ALYREF				
Parameter	n auswertbar	negativ (%)	gering (%)	hoch (%)	p-Wert
Alle Tumoren	15,136	42.2	33.4	24.4	
Tumorstadium					<0.0001
pT2	9,641	44.6	31.0	24.5	
pT3a	3,399	39.2	35.4	25.5	
pT3b-pT4	2,034	36.0	41.8	22.2	
Gleason-Grad					<0.0001
≤3+3	2,880	50.3	28.2	21.5	
3+4	7,992	41.9	32.3	25.8	
3+4 Tert.5	720	39.3	33.5	27.2	
4+3	1,484	35.9	40.0	24.1	
4+3 Tert.5	1,051	35.9	40.3	23.8	
≥4+4	869	36.8	42.3	20.8	
Lymphknoten- metastasen					<0.0001
N0	9,120	40.2	33.6	26.2	
N+	1,118	33.1	42.9	24.0	
Präop. PSA level (ng/ml)					<0.0001
<4	1,827	32.5	37.3	30.2	
4-10	8,934	41.9	32.5	25.6	
10-20	3,189	45.5	33.5	20.9	
>20	1,088	51.2	33.5	15.3	
Resektionsrand					<0.0001
negativ	12,065	42.2	32.6	25.2	
positiv	3,015	42.4	36.6	21.0	

Tabelle 1 ALY/REF-Expression und Tumorphänotyp

Eine lineare Beziehung fand sich lediglich für das präoperative Serum-PSA. Hier sank die Zahl der stark ALY/REF-positiven von 30,2% bei Tumoren mit einem präoperativen

Serum-PSA von < 4 ng/ml auf 15,3% bei Tumoren mit einem präoperativen Serum-PSA von > 20 ng/ml. Reziprok dazu kam es zu einem Anstieg der ALY/REF-negativen Tumoren von 32,5% bei Tumoren mit einem präoperativen PSA < 4 ng/ml auf bis zu 51,2% bei Tumoren mit einem präoperativen Serum-PSA von > 20 ng/ml.

Analog zu der in dieser Art nicht erwarteten Beziehung mit dem Tumorphänotyp zeigte auch die Beziehung zwischen der ALY/REF-Expression und der Patientenprognose einen ungewöhnlichen Befund (Abbildung 2). Die schlechteste Prognose fand sich bei 4122 Tumoren mit einer geringgradigen ALY/REF-Expression, während die Prognose bei 2889 Tumoren mit ALY/REF-Negativität signifikant besser war als in der geringgradig exprimierenden Gruppe ($p < 0,0001$).

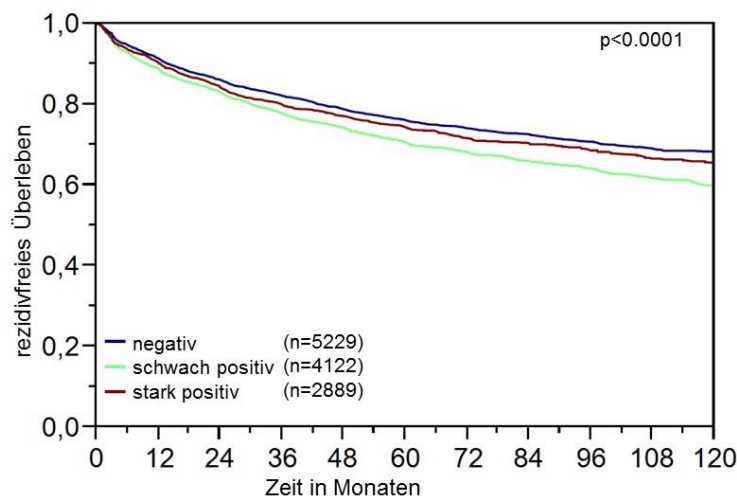


Abbildung 2 ALY/REF-Expression und Patientenprognose

4.3 ALY/REF-Expression und ERG

Die Beziehung zwischen der ALY/REF-Expression und dem mittels Immunhistochemie, beziehungsweise FISH ermittelten ERG-Status ist in Abbildung 3 dargestellt. Dabei ergab sich für die mittels FISH und mittels Immunhistochemie ermittelten Daten zu ERG das gleiche Bild.

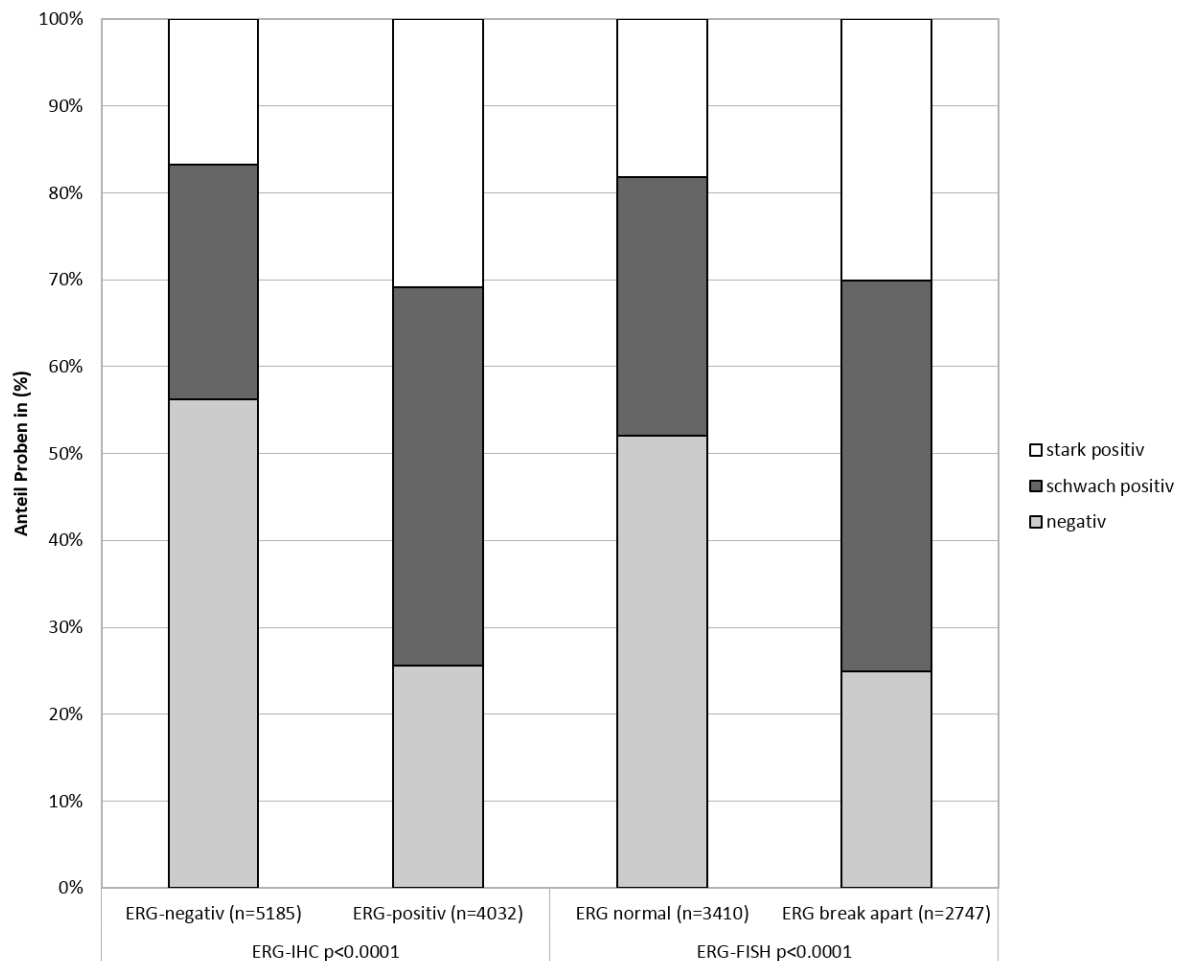


Abbildung 3 ALY/REF-Expression und ERG (Immunhistochemie/ FISH)

Tumoren mit entweder immunhistochemisch nachgewiesener ERG-Positivität oder mit einer mittels FISH nachgewiesener ERG-Translokation zeigten eine deutlich höhere ALY/REF-Expression als Tumoren welche ERG-negativ beziehungsweise nicht ERG-transloziert waren. 4032 immunhistochemisch ERG-positive Tumoren zeigen immunhistochemisch in mehr als 70% eine geringe oder starke ALY/REF-Expression, während nur weniger als 45% von 5185 immunhistochemisch ERG-negativen Tumoren eine nachweisbare ALY/REF-Expression zeigten ($p < 0,0001$). Bei Tumoren mit einer, mittels FISH nachgewiesenen, ERG-Translokation war die Rate der nachgewiesenen ALY/REF-Expression 75,1%. Bei Tumoren mit einem ERG-Wildtyp war ALY/REF jedoch nur in 47,9% nachweisbar exprimiert ($p < 0,0001$).

4.4 ALY/REF und Tumorphänotyp/ Prognose in ERG-positiven und ERG-negativen Tumoren

Angeichts der starken Abhängigkeit der ALY/REF-Expression vom ERG-Status der hier untersuchten Tumoren wurde die Beziehung zwischen der ALY/REF-Expression und dem Tumorphänotyp und der Patientenprognose für ERG-negative und ERG-positive Tumoren separat berechnet.

	ALYREF				
Parameter	n auswertbar	negativ (%)	gering (%)	stark(%)	p-Wert
Alle Tumoren	5,185	56.3	27.0	16.7	
Tumorstadium					<0.0001
pT2	3,485	58.5	24.8	16.7	
pT3a	1,036	56.5	28.4	15.2	
pT3b-pT4	649	44.2	36.2	19.6	
Gleason-Grad					<0.0001
≤3+3	1,041	65.3	20.1	14.6	
3+4	2,767	57.1	25.8	17.1	
3+4 Tert.5	228	55.3	27.6	17.1	
4+3	547	47.9	35.6	16.5	
4+3 Tert.5	306	47.4	33.3	19.3	
≥4+4	292	43.5	39.0	17.5	
Lymphknoten- metastasen					<0.0001
N0	3,008	53.7	28.6	17.8	
N+	288	39.9	40.3	19.8	
Präop. PSA level (ng/ml)					<0.0001
<4	544	47.8	31.6	20.6	
4-10	3,086	56.2	26.4	17.3	
10-20	1,118	58.9	26.4	14.8	
>20	411	61.6	25.8	12.7	
Resektionsrand					0.843
negativ	4,138	56.4	26.8	16.8	
positiv	1,034	55.9	27.7	16.4	

Tabelle 2 ALY/REF-Expression und Tumorphänotyp in ERG-negativen Tumoren

Die Beziehung zwischen der ALY/REF-Expression und pT, Gleason-Grad, pN, präoperativem Serum-PSA und R-Status ist für die ERG-negativen Tumoren in

Tabelle 2 dargestellt. Auch in dieser Untergruppe fand sich eine hochsignifikante statistische Assoziation zwischen der ALY/REF-Expression und den genannten histopathologischen Malignitätsparametern. Im Gegensatz zur Analyse des Gesamtkollektivs (Tabelle 1) fand sich nun eine lineare Beziehung zwischen den Malignitätsparametern und der ALY/REF-Expression. Mit zunehmender Tumoraggressivität kam es zu einer Reduktion der ALY/REF-negativen und zu einer Zunahme von Tumoren mit entweder geringgradiger oder hochgradiger ALY/REF-Expression. Dies galt für pT-Stadium, pN-Stadium und den Gleason-Grad (p jeweils $< 0,0001$). Ferner fand sich mit zunehmendem präoperativen Serum-PSA eine zunehmende Zahl der ALY/REF-negativen Tumoren, während die Zahl der geringgradig positiven oder stark positiven Tumoren abnahm. Auch diese Beziehung war statistisch hochsignifikant ($p < 0,0001$).

Die Beziehung zwischen der immunhistochemisch nachgewiesenen ALY/REF-Expression und den histopathologischen und serologischen Malignitätsparametern des Prostatakarzinoms ist für die ERG-positiven Tumoren in Tabelle 3 dargestellt.

Hier zeigt sich eine hochsignifikante statistische Beziehung zwischen ALY/REF und Gleason-Grad und dem präoperativen Serum-PSA und eine weniger stark ausgeprägte statistisch signifikante Assoziation zwischen der ALY/REF-Expression und dem pT-Stadium ($p = 0,0064$) sowie dem Vorliegen von Lymphknotenmetastasen ($p = 0,008$). Die genaue Betrachtung der Daten zeigte, dass die signifikante Beziehung zwischen der ALY/REF-Expression und dem Gleason-Grad durch eine, mit zunehmendem Gleason-Grad abnehmende, Zahl der ALY/REF-negativen Tumoren bei gleichzeitigem Anstieg der geringgradig ALY/REF-positiven Tumoren bedingt war. Demgegenüber änderte sich die Zahl der hochgradig ALY/REF-positiven Tumoren zwischen Tumoren mit unterschiedlichem Gleason-Score nur wenig.

Für die Beziehung zwischen dem präoperativen Serum-PSA und der ALY/REF-Expression war eine Zunahme der ALY/REF-negativen Tumoren von der Gruppe der Patienten mit geringgradigem Serum-PSA-Level (< 4 ng/ml) zur Gruppe der Patienten mit hohem präoperativen Serum-PSA-Level (> 20 ng/ml) verantwortlich, welche von 20,3% auf 33,1% anstieg. Während die Gruppe der geringgradig positiven Tumoren mehr oder weniger unabhängig vom präoperativen Serum-PSA war (42,1% bis 49,4%), nahmen die stark ALY/REF-positiven Tumoren mit dem präoperativen Serum-PSA stark ab (von 35,6% auf 17,6%; $p < 0,001$).

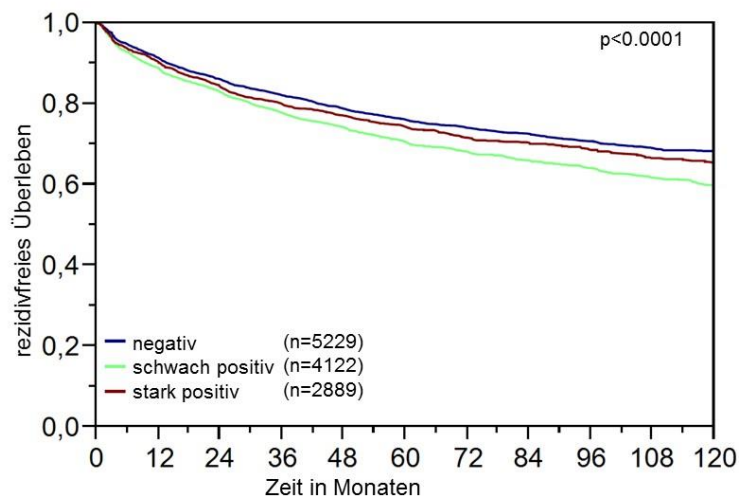
	ALYREF				
Parameter	n auswertbar	negativ (%)	gering (%)	stark (%)	p-Wert
Alle Tumoren	4,032	25.6	43.6	30.8	
Tumorstadium					0.0064
pT2	2,386	25.2	42.4	32.4	
pT3a	1,081	25.8	43.4	30.8	
pT3b-pT4	548	25.9	49.5	24.6	
Gleason-Grad					<0.0001
≤3+3	833	33.1	41.4	25.5	
3+4	2,288	23.7	42.5	33.7	
3+4 Tert.5	127	21.3	44.9	33.9	
4+3	394	21.6	50.8	27.7	
4+3 Tert.5	223	26.9	46.2	26.9	
≥4+4	165	24.8	47.3	27.9	
Lymphknoten- metastasen					0.0008
N0	2,293	23.5	42.7	33.7	
N+	262	27.9	49.6	22.5	
Präop. PSA level (ng/ml)					<0.0001
<4	553	20.3	44.1	35.6	
4-10	2,477	25.6	42.1	32.3	
10-20	731	26.5	46.6	26.8	
>20	239	33.1	49.4	17.6	
Resektionsrand					0.1165
negativ	3,165	25.9	42.8	31.3	
positiv	849	24.0	46.8	29.2	

Tabelle 3 ALY/REF-Expression und Tumorphänotyp in ERG-positiven Tumoren

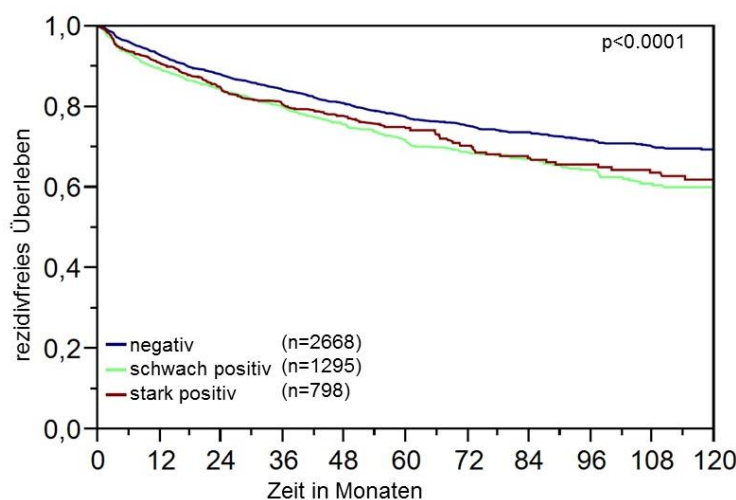
Die statistisch signifikanten Unterschiede in der ALY/REF-Expression zwischen Tumoren unterschiedlicher pT-Stadien war unabhängig von der Gruppe der ALY/REF-

negativen Tumoren, welche in allen pT-Stadien mehr oder weniger identisch waren (25,2% bis 25,9%). Es fand sich hingegen eine signifikante Zunahme der geringgradig ALY/REF-positiven Tumoren auf Kosten der hochgradig positiven Tumoren ($p = 0,0064$). Die Beziehung zwischen ALY/REF-Expression und der Lymphknotenmetastasierung wurde vorwiegend deswegen signifikant, weil die Zahl der hochgradig positiven von 33,7% in pN0 auf 22,5% in pN+-Tumoren zurückging.

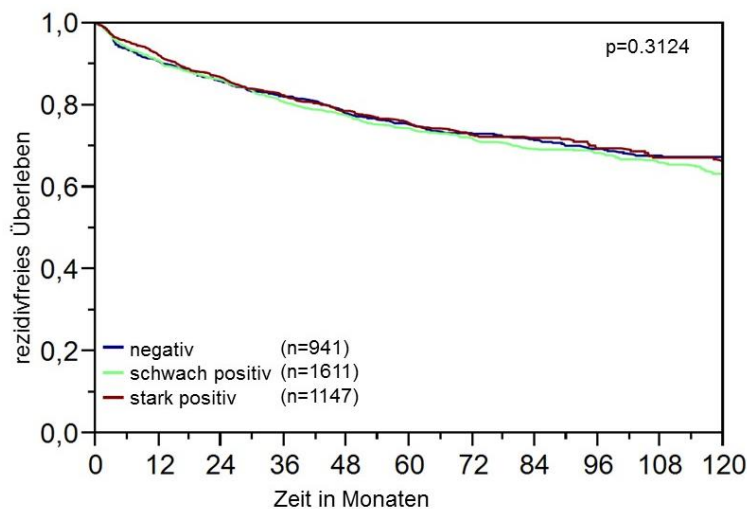
Die differenzierte Betrachtung der Patientenprognose in den Untergruppen ERG-positiver und ERG-negativer Tumoren ergab nur für die ERG-negativen Tumoren einen signifikanten statistischen Zusammenhang (Abbildung 4 b; $p < 0,0001$). In dieser Untergruppe fand sich eine weitgehend identische Prognose von Tumoren mit geringgradiger und hochgradiger ALY/REF-Expression. Die Prognose von Tumoren mit ALY/REF-Negativität war allerdings signifikant besser ($p < 0,0001$). In ERG-positiven Tumoren fand sich keine prognostische Bedeutung der ALY/REF-Expression (Abbildung 4c).



4a Alle Tumoren



4b ERG-negative Tumoren



4c ERG-positive Tumoren

Abbildung 4 ALY/REF-Expression und Patientenprognose in a) allen Tumoren, b) ERG-negativen Tumoren und c) ERG-positiven Tumoren

4.5 Multivariate Analyse

Für die multivariate Analyse wurden mehrere Szenarien berechnet (Tabelle 4). Dies geschah aus dem Grund, dass die prognostische Bedeutung von Biomarkern insbesondere im präoperativen Setting interessant ist, nämlich unmittelbar nach der Erstdiagnose eines Prostatakarzinoms. In dieser klinischen Situation, wo als prognostischer Parameter nur das Serum-PSA, das klinische Tumorstadium und der Gleason-Grad in den Biopsien zur Verfügung steht, wird die Entscheidung getroffen, ob der Patient eine Therapie benötigt oder nicht. Die postoperativ verfügbaren, statistisch sehr relevanten Prognoseparameter wie pT-Stadium, das pN-Stadium oder der Zustand des Resektionsrandes sind zu diesem Zeitpunkt nicht verfügbar.

Tumor-Subgruppe	Szenario	n auswert- bar	p -value							ALYREF- Expressio n
			präoperative s PSA-Level	pT-Stadium	cT-Stadium	Gleason- Grad Prostatekto mie	Gleason- Grad Biopsie	pN- Stadium	R- Stadiu m	
a) Alle Tumoren	1	7,865	<0.0001	<0.0001	-	<0.0001	-	<0.0001	<0.0001	0.0032
	2	12,071	<0.0001	<0.0001	-	<0.0001	-	-	<0.0001	0.0075
	3	11,871	<0.0001	-	<0.0001	<0.0001	-	-	-	0.0033
	4	10,073	<0.0001	-	<0.0001	-	<0.0001	-	-	0.0002
b) ERG-negative Tumoren	1	3,027	0.0009	<0.0001	-	<0.0001	-	<0.0001	0.1056	0.0483
	2	4,746	<0.0001	<0.0001	-	<0.0001	-	-	0.0003	0.1967
	3	4,703	<0.0001	-	<0.0001	<0.0001	-	-	-	0.0884
	4	4,628	<0.0001	-	<0.0001	-	<0.0001	-	-	0.0062
c) ERG-positive Tumoren	1	2,341	0.0049	<0.0001	-	<0.0001	-	0.0637	<0.0001	0.1685
	2	3,683	<0.0001	<0.0001	-	<0.0001	-	-	<0.0001	0.3385
	3	3,616	<0.0001	-	<0.0001	<0.0001	-	-	-	0.5214
	4	3,559	<0.0001	-	<0.0001	-	<0.0001	-	-	0.6938

Tabelle 4 Multivariate Analyse unter Berücksichtigung von ALY/REF-Expression in a) allen Tumoren, b) ERG-negativen und c) ERG-positiven Tumoren

Die angewendeten Szenarien 1 und 2 berücksichtigten die postoperative Situation mit allen zur Verfügung stehenden Prognoseparametern. In Szenario 1 wurde der präoperative Serum-PSA-Wert, das pT-Stadium, der Gleason-Grad der Prostatektomiepräparate, das pN-Stadium und der R-Status mit der ALY/REF-Expression verglichen. In dieser Situation ergab sich eine unabhängige prognostische Bedeutung der ALY/REF-Expression bei gleichzeitiger Betrachtung aller Tumoren und auch im Unterkollektiv der ERG-negativen Tumoren. Das zweite verwendete, postoperative Szenario verwendete alle Parameter aus Szenario 1 mit Ausnahme des pN-Status. Diese Analyse wurde vorgenommen, weil der pN-Status vorwiegend bei Tumoren mit höherer Malignität vorliegt, denn vor allem bei diesen Tumoren wird eine Lymphadenektomie vorgenommen. Bei Tumoren, bei denen ein verhältnismäßig günstiger Gleason-Grad erwartet wird, wird häufiger auf eine Lymphadenektomie verzichtet. Die Analyse von Tumoren mit vorhandenen pN-Daten könnte somit zu einer Selektion von Tumoren mit ungünstiger Prognose führen. Die separate Analyse der prognostischen Bedeutung des präoperativen Serum-PSA, des pT-Stadiums, des Gleason-Grades, des R-Status und der ALY/REF-Expression (Szenario 2) ergab bei gleichzeitiger Untersuchung aller Tumoren eine signifikante unabhängige prognostische Bedeutung der ALY/REF-Expression ($p = 0,0075$). Eine derartige Beziehung konnte sich aber in den Untergruppen der ERG-positiven und ERG-negativen Tumoren nicht nachweisen lassen.

Die weiter angewendeten Szenarien 3 und 4 beschränkten sich auf die Verwendung von präoperativ verfügbaren Parametern. Beide Szenarien beinhalteten somit das präoperative Serum-PSA wie auch das klinische Stadium. Problematisch ist in der präoperativen Situation jedoch das Gleason-Grading, da die meisten initialen Karzinomdiagnosen nicht am UKE selbst gestellt wurden, sondern in einer Vielzahl von urologischen Praxen, deren Biopsien wiederum in einer Vielzahl verschiedener pathologischer Institute zur Untersuchung gelangten. Die Original-Gleasonwerte der initialen Untersuchungen standen für die statistische Auswertung zwar zur Verfügung, doch muss aufgrund der bekannten Interobserver-Variabilität des Gleason-Grades davon ausgegangen werden, dass diesen Befunden eine hohe Variabilität innewohnt, was insgesamt die Qualität dieser Daten limitiert. Das in Szenario 4 verwendete Gleason-Grading der initialen Biopsie durch das initiale pathologische Institut dürfte somit von der Qualität etwas geringer sein, als man von einer Gleason-Beurteilung an einem spezialisierten Zentrum erwarten könnte.

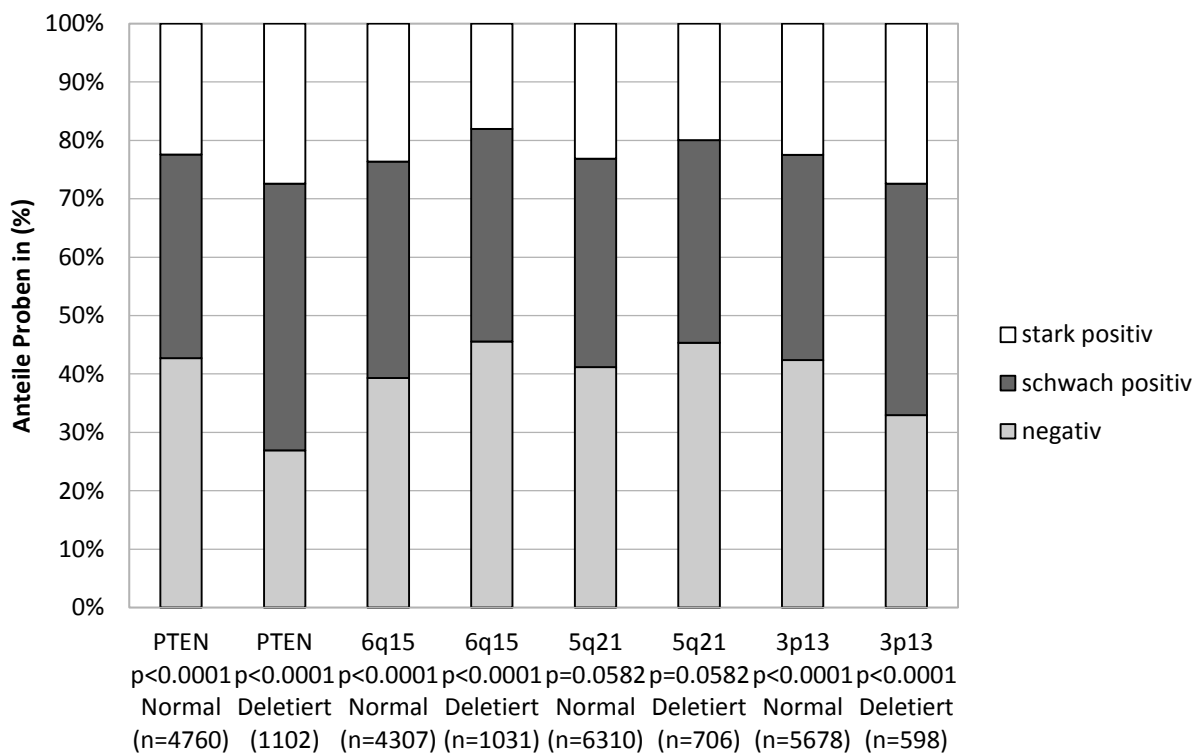
Immerhin ergab Szenario 4 unter Verwendung der Prognoseparameter präoperatives PSA, klinisches Stadium (cT) und des initialen Gleason-Grades an der Biopsie für die ALY/REF-Expression bei gleichzeitiger Analyse aller Tumoren ($p = 0,0002$) und bei separater Untersuchung der ERG-negativen ($p = 0,0062$) eine unabhängige Prognoserelevanz für ALY/REF.

Szenario 3 suchte die Variabilität der Gleason-Graduierung durch ein externes pathologisches Institut zu kompensieren. Zu diesem Zweck wurde anstelle des initialen Gleason-Grades der Prostatektomie-Gleason-Grad für die statistische Analyse verwendet. Dieses Verfahren hat den Nachteil, dass ein „besserer“ Gleason-Grad verwendet wurde, als aufgrund einer bioptischen Untersuchung zu erwarten gewesen wäre. Die Gleason-Graduierung eines Tumors an einer oder mehrerer Stanzbiopsien hat den Nachteil eines möglichen sampling errors, das heißt die relevanten Tumoreareale sind nicht immer in den Biopsien erfasst. Aber auch unter Verwendung eines optimierten Gleason-Grades fand sich in Szenario 3 bei Verwendung der Parameter präoperatives PSA, klinisches Stadium, Gleason-Grad (aus der Prostatektomie) und ALY/REF eine unabhängige Prognoserelevanz für ALY/REF bei Untersuchung des gesamten Tumorkollektivs ($p = 0,0033$). Bei separater

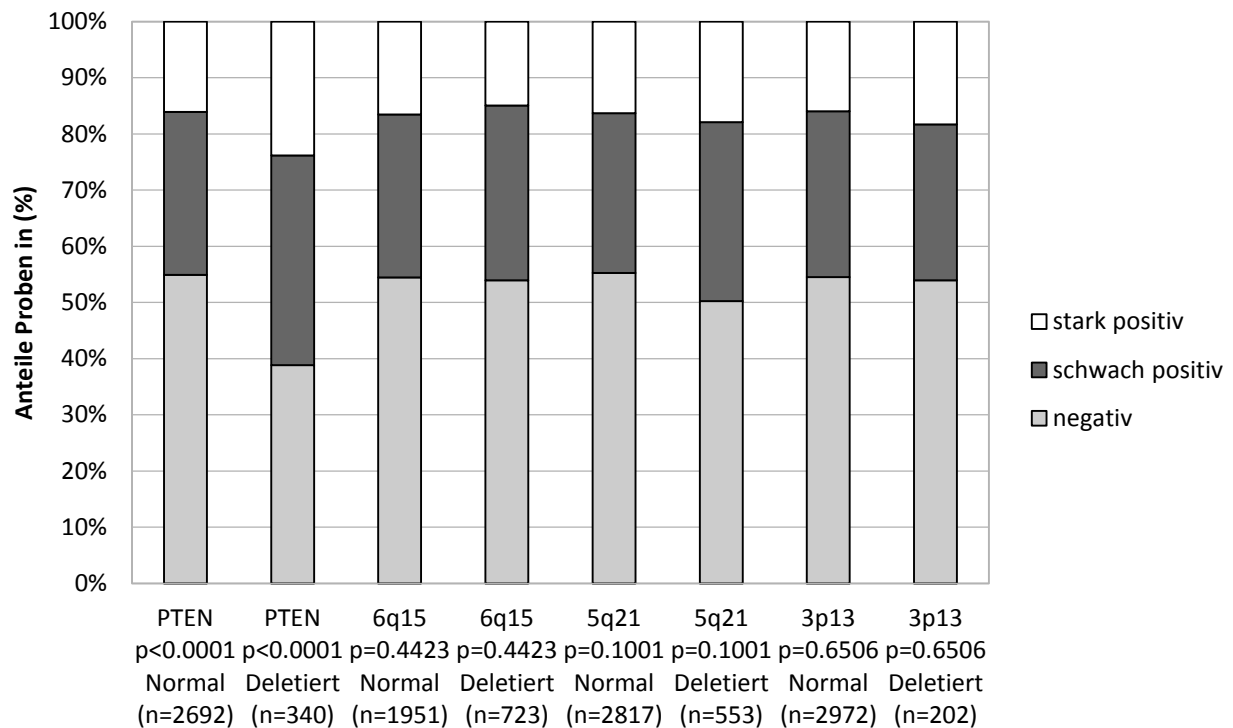
Untersuchung der ERG-negativen Tumoren verfehlte ALY/REF die unabhängige Prognoserelevanz nur knapp ($p = 0,0884$). Jedoch ist festzuhalten: In keinem der Szenarien fand sich eine unabhängige Prognoserelevanz der ALY/REF-Expression in ERG-positiven Tumoren.

4.6 ALY/REF, chromosomale Deletionen und Ki67-Labeling Index

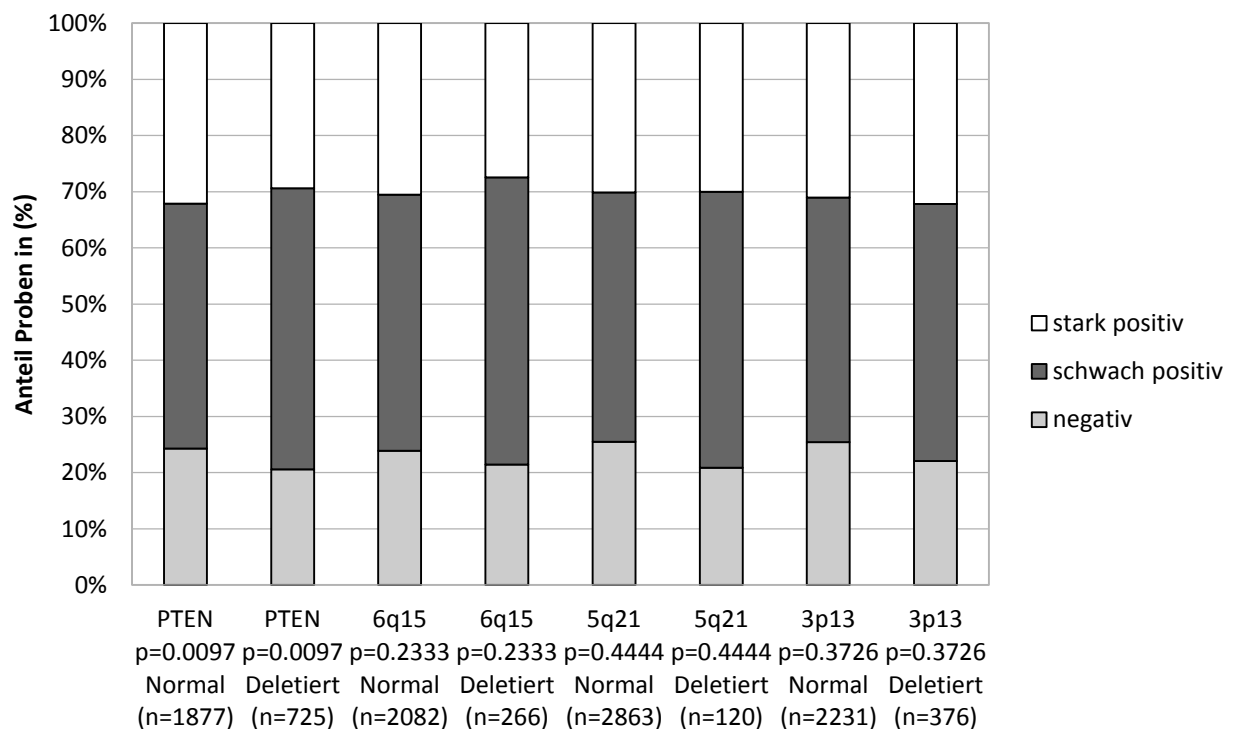
Die Beziehung zwischen der ALY/REF-Expression und chromosomalen Deletionen für PTEN, 6q15, 5q21 und 3p13 ist in Abbildung 5 a-c für alle Karzinome und die Subgruppen der ERG-negativen und ERG-positiven Tumoren dargestellt.



5a Alle Tumoren



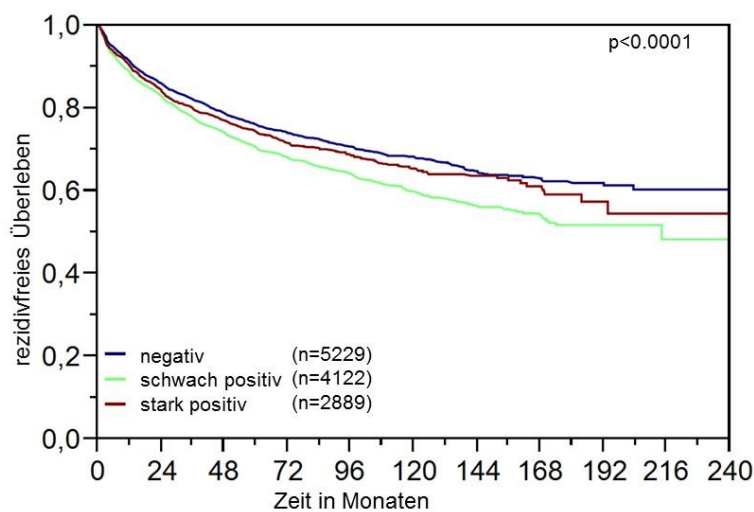
5b ERG-negative Tumoren



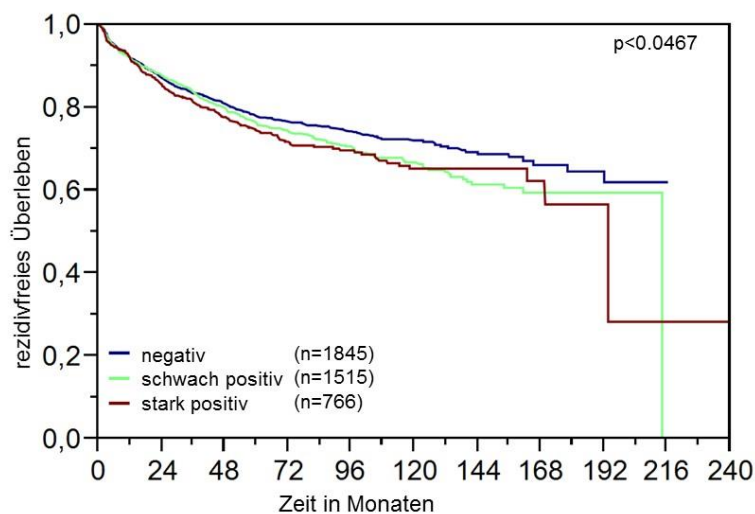
5c ERG-positive Tumoren

Abbildung 5 ALY/REF-Expression und Deletionen von 10q23 (PTEN), 5q21 (CHD1), 6q15 (MAP3K7), 3p13 (FOXP1) in a) allen Tumoren, b) ERG-negativen Tumoren und c) ERG-positiven Tumoren

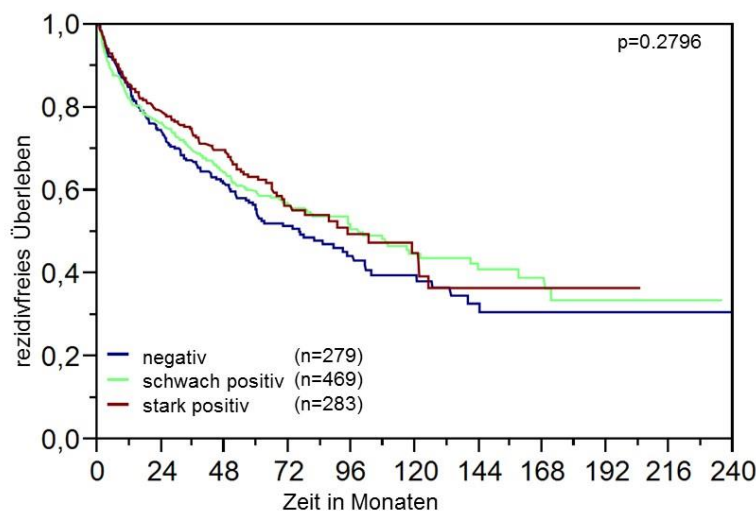
Im Gesamtkollektiv (Abbildung 6a) findet sich eine erhöhte ALY/REF-Expression in Tumoren mit PTEN-Deletionen ($p < 0,0001$) und in Tumoren mit 3p13-Deletionen ($p < 0,0001$) während Tumoren mit 6q15- und 5q21-Deletionen im Vergleich zu nicht deletierten Tumoren geringere ALY/REF-Expressionen aufweisen. Dieser Unterschied ist für 6q15 statistisch signifikant ($p < 0,0001$) und verfehlt für 5q21 das statistische Signifikanzniveau nur knapp ($p = 0,00582$). Bei separater Betrachtung der ERG-negativen (Abbildung 6b) und ERG-positiven (Abbildung 6c) Tumoren sind lediglich zwischen PTEN-normalen und PTEN-deletierten Tumoren Unterschiede zu erkennen. Deletierte Tumoren exprimieren dabei mehr ALY/REF. Dies ist besonders in ERG-negativen Tumoren deutlich ($p < 0,0001$) erreicht aber auch in ERG-positiven Karzinomen das Signifikanzniveau ($p = 0,0097$).



6a Alle Tumoren



6b Tumoren ohne PTEN-Deletion



6c Tumoren mit PTEN-Deletion

Abbildung 6 ALY/REF-Expression und Patientenprognose in a) allen Tumoren, b) Tumoren ohne PTEN-Deletion und c) Tumoren mit PTEN-Deletion

Die Beziehung zwischen ALY/REF-Expression und der Tumorzellproliferation ist in Tabelle 5 dargestellt. Hier findet sich eine signifikante Zunahme der Proliferation von ALY/REF-negativen zu Tumoren mit geringer oder hochgradiger ALY/REF-Expression. Dieser Unterschied ist nicht nur bei gleichzeitiger Betrachtung aller Tumoren sichtbar ($p < 0,0001$) sondern auch in den Subgruppen der Gleason 3+3-Karzinome ($p < 0,0001$), der Gleason 3+4-Karzinome ($p < 0,0001$), der Gleason 3+4-(Tertiärgrad 5)-Karzinome ($p = 0,0352$), der Gleason 4+3-Karzinome ($p = 0,0026$), der Gleason 4+3-(Tertiärgrad 5)-Karzinome ($p = 0,0059$) und auch der Karzinome mit einem Gleason ≥ 8 ($p=0,0062$).

ki67	ALYREF	n=	Ki67 LI (Durchschn.)	Std.abweichung
alle p<0.0001	negativ	2,827	2.24	0.05
	schwach	2,120	3.17	0.06
	stark	1,238	3.38	0.08
pGleason ≤3+3 p<0.0001	negativ	714	1.75	0.08
	schwach	390	2.58	0.10
	stark	224	2.79	0.14
pGleason 3+4 p<0.0001	negativ	1,507	2.13	0.06
	schwach	1,161	2.94	0.07
	stark	769	3.23	0.08
pGleason 3+4 Tert.5 p=0.0352	negativ	111	2.83	0.25
	schwach	84	3.51	0.29
	stark	52	3.92	0.37
pGleason 4+3 p=0.0026	negativ	246	2.82	0.21
	schwach	254	3.85	0.21
	stark	94	3.36	0.34
pGleason 4+3 Tert. 5 p=0.0059	negativ	137	3.07	0.32
	schwach	126	4.20	0.33
	stark	53	4.77	0.51
pGleason ≥4+4 p=0.0062	negativ	112	3.99	0.45
	schwach	103	4.76	0.47
	stark	45	6.69	0.71

Tabelle 5 ALY/REF-Expression und Ki67-LI in a) allen Tumoren, b) Gleason-Grad ≤3+3, c) Gleason-Grad 3+4, d) Gleason-Grad 3+4 Tert. 5, e) Gleason-Grad 4+3, f) Gleason-Grad 4+3 Tert. 5 und g) Gleason-Grad ≥4+4

4.7 ALY/REF und Androgenrezeptor

Die Beziehung zwischen der ALY/REF-Expression und Androgenrezeptor ist in Abbildung 7 dargestellt. Die Beziehung zeigt sich dabei linear. Für Tumoren mit fehlender oder schwacher Androgenrezeptor-Expression fand sich dabei in lediglich 10,7% beziehungsweise 32,9% eine schwache oder starke Anfärbbarkeit für ALY/REF. Demgegenüber fand sich bei stark Androgenrezeptor-positiven Karzinomen in 80,5% eine ALY/REF-Expression ($p < 0,0001$).

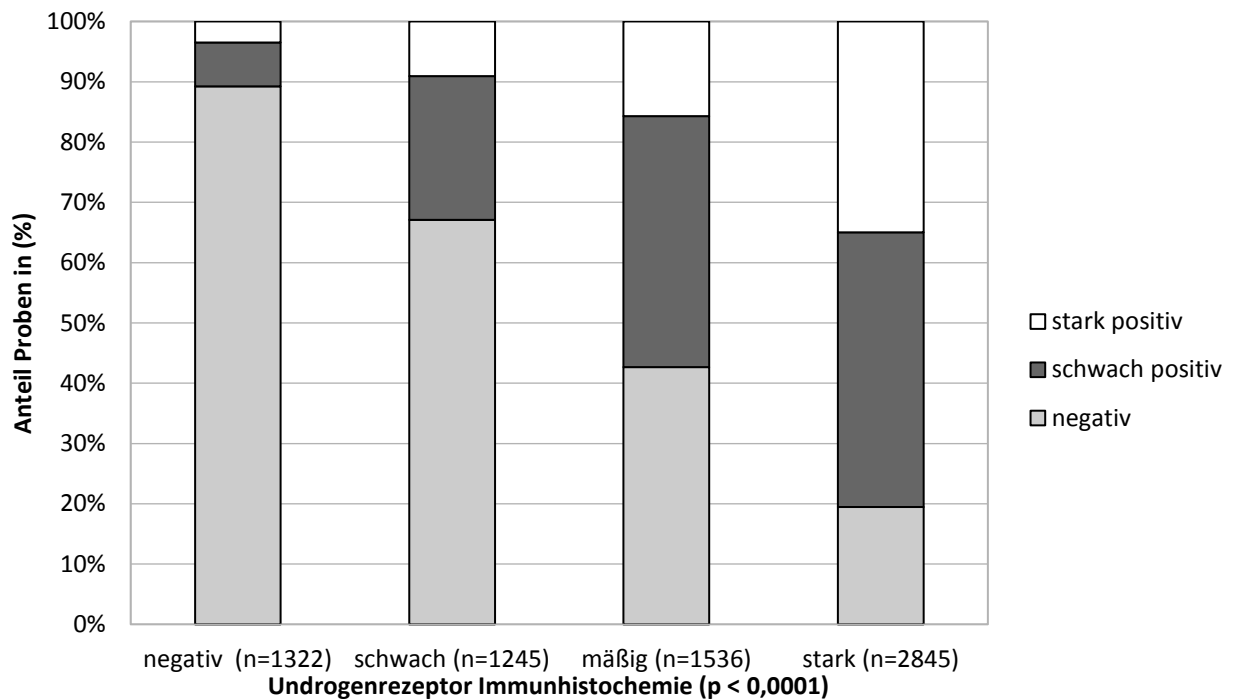


Abbildung 7 ALY/REF- und Androgenrezeptorexpression in allen Tumoren

5. Diskussion

Die bestbekannte Funktion von ALY/REF ist diejenige beim Export von mRNA aus dem Zellkern, wobei ALY/REF eine Komponente des sogenannten TREX-Komplexes ist. (Stubbs und Conrad 2015; Yamazaki et al. 2010) ALY/REF ein ubiquitäres Protein, welches grundsätzlich in allen humanen Zellen vorkommt, was angesichts der zentralen Bedeutung dieses zellulären Vorgangs nicht überrascht. (Uhlén et al. 2015) Dementsprechend entspricht es den Erwartungen, dass ALY/REF immunhistochemisch sowohl in Normalgewebe wie auch im Tumorgewebe nachweisbar war. Für die Interpretation immunhistochemischer Befunde ist es bedeutend, dass Proteine nur dann nachweisbar werden, wenn eine bestimmte Schwellenmenge überschritten wird. Die Menge, ab der ein Protein am Schnittpräparat nachweisbar wird hängt von der Auswahl der verwendeten Reagenzien und dem jeweiligen Immunhistochemieprotokoll ab. (Leong 2004a; Leong 2004b) Für die vorliegende Studie war das Immunhistochemieprotokoll so ausgewählt worden, dass Gewebe und Zellen mit hoher und geringer ALY/REF-Expression unterschieden werden konnten. Die Bedingungen wurden also so gewählt, dass in Prostatakarzinomen ein Teil der Fälle keine nachweisbare ALY/REF-Expression aufwies, während ein anderer Teil der Tumoren eine deutlich bis sehr deutlich erkennbare nukleäre ALY/REF-Positivität aufwies. Unter den gewählten Bedingungen fand sich in Normalgeweben meist eine gering- bis mäßiggradige, teilweise auch eine recht starke nukleäre Anfärbung. Tumoren unterschieden sich darin insofern von den untersuchten Normalgeweben, dass hier ein größerer Teil der Fälle komplett ALY/REF-negativ war. Ein weiterer Unterschied bestand zudem darin, dass einzelne Tumoren eine auffällig kräftige ALY/REF-Expression zeigten, und zwar in einem Ausmaß, wie es bei Normalgewebe nicht zu beobachten war.

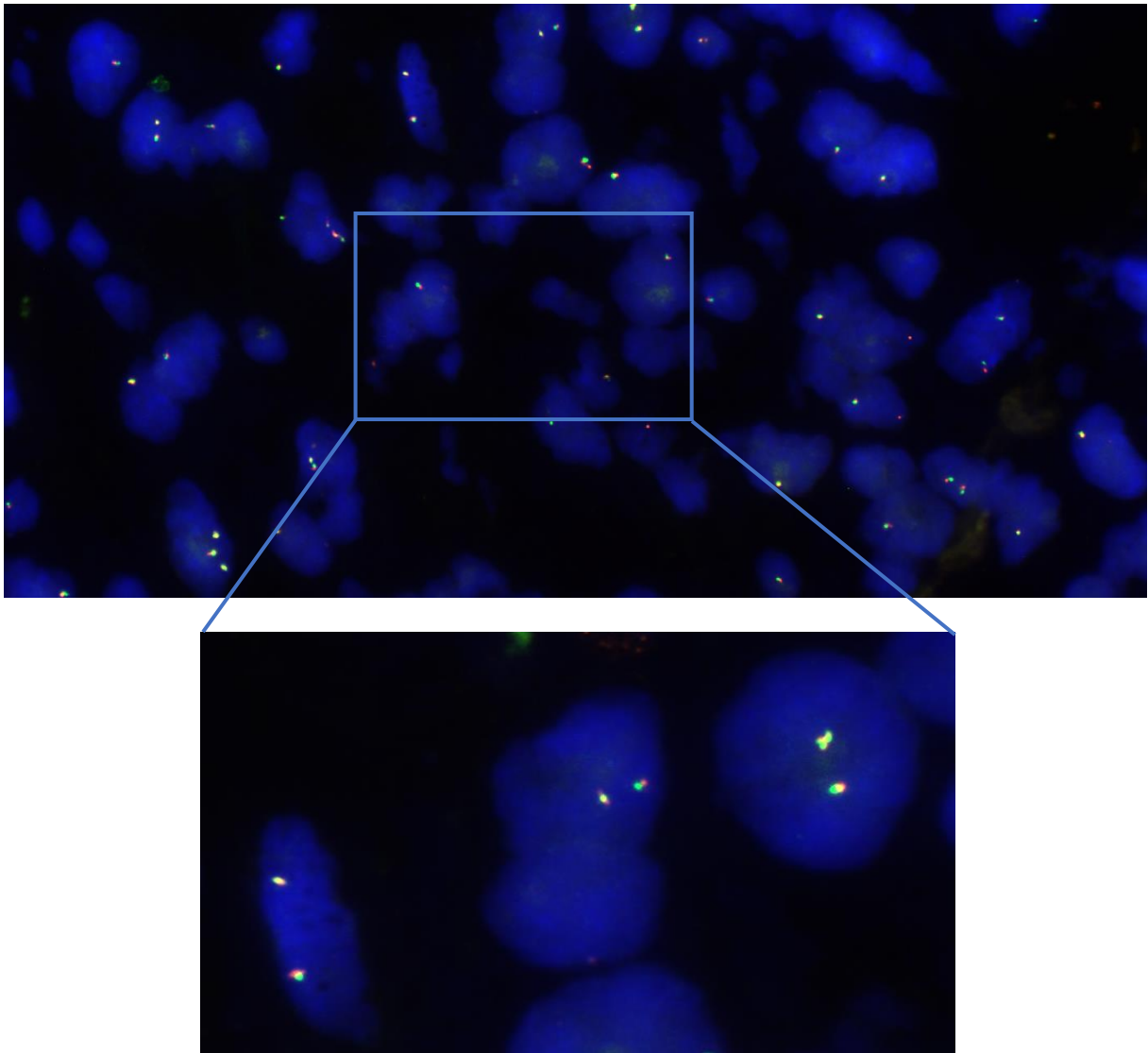
ALY/REF ist ein bisher insgesamt und vor allem in Tumoren relativ wenig untersuchtes Protein. In der Datenbank PubMed finden sich für den Suchbegriff „ALY/REF“ 78 Einträge, für „ALY/REF AND Cancer“ lediglich 15 (Stand 15.12.2018). Es ist davon auszugehen, dass der nukleäre Export von mRNA die Hauptfunktion von ALY/REF darstellt. Darüber hinaus wurde beobachtet, dass eine verminderte ALY/REF-Expression dazu führt, dass RNAs im Zellkern in geringeren Ausmaß vorhanden sind. Dieses Phänomen wurde teilweise so interpretiert, dass ALY/REF eine Funktion bei der Aufrechterhaltung der Stabilität von RNA im Zellkern spielt. Mittlerweile ist aber bekannt, dass ALY/REF auch eine transkriptionsregulierende Rolle im Zellkern spielt, sodass die ALY/REF-abhängigen quantitativen Unterschiede von RNAs im Zellkern möglicherweise durch die ALY/REF-regulierte Transkription bedingt sind. (Heath et al. 2016; Osinalde et al. 2013; Stubbs und Conrad 2015) Insgesamt ist die Rolle von ALY/REF bei Karzinomen wenig verstanden. In der vorliegenden Untersuchung wurden 17 965 Prostatakarzinome auf die Expression von ALY/REF untersucht. Die daraus entstandenen Daten erlauben auf zwei unterschiedliche Weisen Rückschlüsse auf die Rolle von ALY/REF in Karzinomen: zum einen durch die Untersuchung der Beziehung zu anderen bekannten, tumorrelevanten Parametern und zum anderen auch durch den Vergleich der Expressionslevels mit klinischen Verlaufsdaten. Der Vergleich der ALY/REF-Expression mit anderen molekularen Parametern wurde durch eine Vielzahl von früheren Studien ermöglicht, welche am Hamburger Prognose-TMA durchgeführt worden sind. Mitglieder der Prostatakrebsforschungsgruppe am UKE haben in den letzten zehn Jahren mehr als 100 verschiedene molekulare Parameter am Prostatakarzinom-TMA untersucht und dabei insbesondere die wichtigsten genomischen Veränderungen wie die TMPRSS2:ERG-Fusion und Chromosomale Deletionen untersucht. Außerdem haben

sie auch die Expression von Schlüsselproteinen wie beispielsweise Androgenrezeptor, Ki67, ERG und vielen anderen mehr analysiert. Für die vorliegende Untersuchung der Beziehung von ALY/REF mit anderen Parametern wurden die folgenden Parameter ausgesucht:

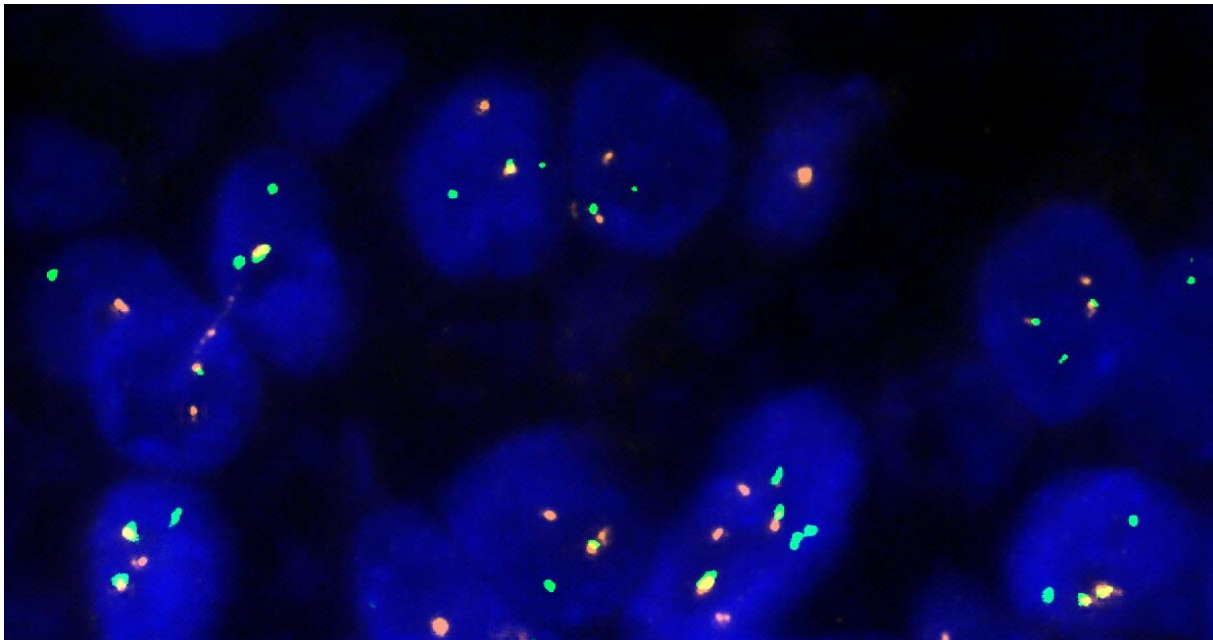
1. TMPRSS2:ERG-Fusionen, weil diese molekulare Veränderung die häufigste genomische Alteration in Prostatakarzinomen darstellt. (Park et al. 2010)
2. Chromosomale Deletionen (PTEN, 3p, 6q, 5q), weil diese nach der TMPRSS2:ERG-Fusion die am häufigsten vorkommenden rekurrenten genomischen Veränderungen beim Prostatakarzinom darstellen. (Liu et al. 2012; Sun et al. 2007; Taylor et al. 2010; Williams et al. 2014).
3. Androgenrezeptor-Expression, weil der Androgenrezeptor das möglicherweise wichtigste, sicherlich aber das am besten untersuchte Protein in Prostatakarzinomzellen ist und auch einen wichtigen therapeutischen Ansatz darstellt. (Klap et al. 2015; Wang et al. 2018)
4. Ki67-Protein, weil die Tumorstadiumsgeschwindigkeit (gemessen durch den sogenannten Ki67-LI) für alle Tumoren ein zentraler biologischer und klinisch/ prognostischer Parameter ist. (Brown und Gatter 2002; Bubendorf et al. 1996; Cher et al. 1995)

Die vergleichende Untersuchung von ALY/REF und ERG-Alterationen ergab einen hochsignifikanten Zusammenhang zwischen einem positiven ERG-Status und einem hohen ALY/REF-Expressionslevel. Aus experimenteller Sicht ist hierbei hervorzuheben, dass diese Beziehung unter Verwendung von zwei unterschiedlichen Methoden identifiziert wurde, nämlich mittels Immunhistochemie und mittels FISH. Die Verwendung zweier unterschiedlicher Methoden ist deswegen möglich, weil die in normalem Prostataepithel nicht zu beobachtende ERG-Expression in praktisch allen Fällen durch eine genomische Veränderung, die TMPRSS2:ERG-Fusion, ausgelöst wird. Bei dieser Läsion, die vor allem bei jüngeren Prostatakarzinompatienten auftritt kommt es zu einer Deletion auf Chromosom 21, wobei der in Prostataepithel nicht aktive Transkriptionsfaktor ERG in den Einflussbereich des Promotors des androgenabhängigen Gens TMPRSS2 (transmembrane serine protease 2) gelangt. Alternativ kann eine Translokation mit Rearrangement des ERG-Genlocus eine TMPRSS2:ERG-Fusion verursachen (Minner et al. 2011) Dadurch kommt es zu einer konstitutiven Überexpression von ERG welche immunhistochemisch nachgewiesen werden kann. Die Deletion kann durch eine FISH nachgewiesen werden, wobei die TMPRSS2- und ERG-Signale im Falle einer Fusion zusammen rücken. Alternativ ist der Nachweis einer Translokation auch im Sinne eines indirekten Verfahrens mittels break apart-assay möglich. (Fernández-Serra et al. 2013) Hierbei wird der Genlocus des ERG-Gens am 3' wie auch am 5' –Ende mittels FISH markiert. Im Falle eines TMPRSS2:ERG-Normalbefundes liegen die Signale nebeneinander. Bei Vorliegen einer Deletion bleibt lediglich ein Signal erhalten. Bei Vorliegen einer Translokation rücken die Signale auseinander. (Minner et al. 2011)

Ein Beispiel eines TMPRSS2:ERG-FISH Normalbefundes und eines TMPRSS2:ERG-Fusion ist in Abbildung 8a und 8b dargestellt.



8a) TMPRSS2:ERG Normalbefund: Je ein grünes und ein rotes Signal liegen nebeneinander. Eine Deletion oder Translokation mit Rearrangement des ERG-Genlocus hat nicht stattgefunden.



8b) TMPRSS2:ERG-Fusion, indirekte Darstellung mittels break apart-assay: Das grüne und das rote Signal sind auseinander gerückt.

Abbildung 8 Beispiele eines a) TMPRSS2:ERG-FISH Normalbefundes und einer b) TMPRSS2:ERG Fusion, indirekter Nachweis mittels break apart-assay

Dass die ALY/REF-Expression mit den FISH-Befunden und den Immunhistochemie-Befunden gleichermaßen korreliert, schließt ein methodisches Problem der Immunhistochemie als Ursache der positiven Beziehung aus. Positive Beziehungen zwischen immunhistochemisch gemessenen Proteinen könnten nämlich auch dadurch entstehen, dass ein Teil der untersuchten Fälle „Immunhistochemie-areaktiv“ sind und somit mit keinem der verwendeten Antikörper reagieren beziehungsweise eine Färbung zeigen. Sind genügend viele „Immunhistochemie-areaktive“ Fälle in einem TMA können sie durch Doppelnegativität für die untersuchten Parameter zu einer „falschen“ statistischen Signifikanz führen.

Die vorliegenden Befunde beweisen einen positiven Zusammenhang zwischen der ALY/REF- und ERG-Expression. Der Mechanismus für diesen Zusammenhang ist allerdings unklar. ERG ist ein Transkriptionsfaktor, dessen Aktivierung in Prostataepithelzellen zu einer veränderten Expression von ca. 1600 Genen führt. (Brase et al. 2011) Das ALY/REF-Gen verfügt hingegen nicht über eine ERG-Bindungsdomäne, sodass nicht von einer direkten Regulierung von ALY/REF durch ERG ausgegangen werden kann. Alternativ ist davon auszugehen, dass eines oder mehrere der ERG-abhängig dysregulierten Gene die ALY/REF-Expression indirekt beeinflussen. Auch die hochsignifikante Beziehung der TMPRSS2:ERG-Fusion mit der Androgenrezeptor-Expression wäre gut mit einer derartigen funktionellen Interaktion zu erklären. Anhaltspunkte für eine direkte Regulation von ALY/REF durch ERG sind auf der molekularen Ebene auch nicht bekannt.

Chromosomale Deletionen sind beim Prostatakarzinom von besonderem Interesse. Nach der TMPRSS2:ERG-Fusion nehmen Deletionen die Plätze zwei bis elf in der Rangliste genomischer Veränderungen beim Prostatakarzinom ein. Viele Deletionen sind in ihrer Häufigkeit vom ERG-Status abhängig. Dazu gehören auch die vier in

dieser Studie untersuchten Deletionen. Deletionen von PTEN und 3p kommen besonders häufig bei ERG-positiven Karzinomen vor, während Deletionen von 5q und 6q vor allem bei ERG-negativen Karzinomen vorkommen. (Burkhardt et al. 2013; Kluth et al. 2013; Krohn et al. 2012; Krohn et al. 2013) Die Zielgene der Deletionen auf 10q (PTEN) und 3p13 sind weitestgehend bekannt. Die Identifikation der relevanten Zielgene dieser Deletionen wurde durch die geringe Größe dieser Deletionen vereinfacht, welche im Falle von PTEN häufig nur ein Gen, im Falle von 3p13 maximal sieben Gene beinhaltet. Aufgrund der zentralen Rolle von PTEN in der Tumorbilogie gilt PTEN als das alleinige relevante Zielgen der 10q23 Deletion. (Li et al. 1997; Liu et al. 2012) Für die 3p13-Deletion wurde für drei Gene, nämlich FOXP1, RYBP, SHQ1, eine tumorsuppressive Rolle bewiesen, welche in betroffenen Tumoren möglicherweise gemeinsam zum Tragen kommt. (Krohn et al. 2013) Die 5q- und die 6q-Deletion unterscheiden sich markant von den 3p- und PTEN-Deletionen, da sie wesentlich ausgedehnter sind und meistens hunderte von Genen beinhalten. Tatsächlich wurde weder für die 5q- noch für die 6q-Deletion ein Zielgen gefunden, welches allein den biologischen Effekt der Deletion erklärt. Zwar ist inzwischen bekannt, dass eine Dysfunktion von CHD1 bei 5q-deletierten Tumoren eine wichtige Rolle spielt und die Ursache für die verminderte Häufigkeit von ERG-Fusionen in diesen Tumoren darstellt, doch wurde für kein einziges 5q- und 6q-Gen im Rahmen von großen Sequenzierstudien rekurrente Inaktivierungen des erhaltenen Allels eines bestimmten Gen gefunden. (Burkhardt et al. 2013; Liu et al. 2007; Sun et al. 2007; Taylor et al. 2010; Weischenfeldt et al. 2013) So wird derzeit davon ausgegangen, dass die 5q- und 6q-Deletionen beim Prostatakarzinom ihren biologischen Effekt durch die gleichzeitige reduzierte Expression mehrerer, für das Prostatakarzinom relevanter Gene erzeugen. (Kluth et al. 2017) Der Vergleich dieser chromosomalen Veränderungen mit solchen, welche beim Prostatakarzinom eine Rolle spielen, bietet die Chance, eine biologische Funktion der 6q- oder 5q-Deletion zu identifizieren. (Burkhardt et al. 2013; Kluth et al. 2013) Die vorliegende Studie ergibt aber für die 5q- und 6q-Deletion keine neuen Erkenntnisse. Zwar sind die beiden Deletionen bei gleichzeitiger Betrachtung aller Tumoren mit der ALY/REF-Expression signifikant assoziiert, doch ist dies offenbar durch die signifikante Beziehung von 6q- und 5q-Deletion und auch der ALY/REF-Expression mit dem ERG-Status assoziiert. In den Untergruppen von ERG-positiven und ERG-negativen Tumoren sind die genannten Deletionen nicht mit einer verminderten oder erhöhten ALY/REF-Expression verbunden. Der Vergleich von ALY/REF-Expression und Deletionen ergibt aber ein herausstechendes Ergebnis in der signifikanten Beziehung zwischen einer vermehrten ALY/REF-Expression und dem Vorliegen einer PTEN-Deletion. Diese Beziehung ist insbesondere in ERG-negativen Tumoren deutlich, aber auch in ERG-positiven Karzinomen statistisch noch signifikant. Diese Befunde deuten auf eine funktionelle Interaktion zwischen der ALY/REF-Expression und dem PTEN/AKT-Regelsystem hin. Die Gründe und Mechanismen für diese Interaktion sind nicht klar und bieten Ansatzpunkte für die Durchführung weiterer funktioneller Analysen.

Die signifikante Beziehung zwischen einer erhöhten ALY/REF-Expression und einer gesteigerten Zellproliferation spricht für eine Bedeutung des ALY/REF-Proteins für eine effiziente Zellteilung. Hervorzuheben ist, dass die signifikante Assoziation zwischen ALY/REF und Ki67-LI nicht nur bei gleichzeitiger Betrachtung aller Tumoren, sondern auch in allen untersuchten Subgruppen mit identischem Gleason-Grad identifiziert wurde. Dies spricht für eine hohe Relevanz des ALY/REF-Proteins für die Zellproliferation. Die genannte Beziehung wurde in früheren Studien nie thematisiert, doch erstaunt der Befund nicht, denn alle beschriebenen ALY/REF-Funktionen sind bei schnell wachsenden Geweben wichtig. Angesichts der Notwendigkeit zur

Produktion von Biomasse in wachsenden Tumoren wäre davon auszugehen, dass vermehrt mRNAs aus den Zellkernen exportiert werden müssen. Schließlich müssen auch die zentralen Elemente des TREX-Komplexes für die aus den Zellteilungen entstehenden neuen Zellen bereitgestellt werden. Alternativ wäre es denkbar, dass die transkriptionsregulierende Rolle von ALY/REF direkt oder indirekt in den Zellzyklus eingreift. Eine solche Funktion von ALY/REF wurde bisher jedoch nicht beschrieben.

Während die Funktion von ALY/REF auch durch funktionelle Analysen in Zelllinien oder Tiermodellen erforscht werden kann, erlaubt unsere Studie einen einzigartigen zusätzlichen Ansatz, nämlich den Vergleich der ALY/REF-Expression mit klinischen Verlaufsdaten. Diese Untersuchung ergab ungewöhnliche Befunde, welche mit hoher Sicherheit an deutlich kleineren Patientenkollektiven nicht so hätten identifiziert werden können. Die Untersuchung des gesamten Patientenkollektivs zeigte, dass Patienten mit einer geringgradigen ALY/REF-Expression einen signifikant ungünstigeren klinischen Verlauf aufwiesen als Patienten mit hoher oder negativer Expression. Für sich allein genommen würden diese Daten suggerieren, dass ALY/REF normalerweise in Prostataepithel geringgradig exprimiert wird und, dass sowohl eine Verminderung wie auch eine Steigerung dieser Expression eine tumorprotektive Wirkung hätte. Ein solcher Mechanismus wäre biologisch jedoch nur schwer zu erklären. Die gesonderte Betrachtung ERG-positiver und ERG-negativer Tumoren löst dieses Problem allerdings auf. Die signifikant schlechtere Prognose bei Patienten mit geringer oder hoher ALY/REF-Expression im Vergleich zu ALY/REF-negativen Tumoren in der ERG-negativen Tumorgruppe suggeriert, dass eine gesteigerte ALY/REF-Expression in diesem Tumorsubset eine ungünstige Prognose und ein somit aggressiveres biologisches Verhalten der Tumorzellen induziert. Dieser Befund ist mit der bekannten Funktion von ALY/REF vereinbar. Dass in ERG-positiven Tumoren kein klinisch relevanter Effekt der ALY/REF-Expression auftritt könnte mit dem geänderten zellulären „Microenvironment“ in ERG-positiven Tumoren zusammen hängen. Die Dysregulation von 1600 Genen in ERG-positiven Tumoren führt offenbar direkt oder indirekt zu einer Abschwächung des aggressivitätssteigernden Effekts der ALY/REF-Überexpression. Zahlreiche Studien der UKE-Prostatakrebsarbeitsgruppe haben bereits zuvor gezeigt, dass viele Prognoseparameter in ERG-positiven und in ERG-negativen Tumoren eine unterschiedliche klinische Bedeutung aufweisen. Beispielsweise wurde für p16, das Y-box binding protein 1 (YB-1) und die γ -Glutamyl-Hydrolase (GGH) eine prognostische Bedeutung in ERG-negativen aber nicht ERG-positiven Tumoren gefunden. (Burdelski et al. 2016; Heumann et al. 2017; Melling et al. 2017). Für SOX9, CD147, SUMO1/Sentrin specific peptidase 1 und pSer2448-mTOR wurde eine prognostische Bedeutung in ERG-positiven, aber nicht in ERG-negativen Karzinomen gefunden. (Burdelski et al. 2015; Burdelski et al. 2015; Grupp, Höhne et al. 2013; Müller et al. 2013) Insgesamt zeigen diese Daten, dass es eine Herausforderung ist, einen molekularen Prognosetest für Prostatakarzinome zu entwickeln, der für ERG-positive und ERG-negative Tumoren gleichermaßen anwendbar ist.

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden wie bei Prognosemarkerstudien üblich auch eine Multivariate Analyse durchgeführt, wobei verschiedene Szenarien zur Anwendung kamen, welche entweder die präoperativ verfügbaren oder sämtliche auch postoperativ verfügbaren klassischen Prognoseparameter beinhalteten. Bemerkenswerterweise ergab diese Untersuchung bei Verwendung des Gesamtkollektivs von > 10 000 Patienten für alle Szenarien den Befund einer unabhängigen Prognoserelevanz der ALY/REF-Expression. Trotz dieses statistischen

Befundes ist davon auszugehen, dass angesichts der nur minimalen Prognoseunterschiede zwischen Tumoren mit unterschiedlicher ALY/REF-Expression die immunhistochemische Untersuchung dieses Parameters in der Routinediagnostik keinen Platz bekommen wird. Dies wird auch deswegen angenommen, weil eine subtile immunhistochemische Quantifizierung von ubiquitären Proteinen eine große Herausforderung darstellt. Eine Quantifizierung von Proteinen mit nur geringer Expressionsschwankung ist an TMAs wesentlich erleichtert weil von jedem Tumor eine identische Gewebemenge zur Verfügung steht, welche unter absolut identischen Bedingungen gefärbt wird und vom Pathologen in kurzer Zeit untersucht werden kann, wobei die Intensitätsklassifizierung durch permanenten Vergleich mit vorher untersuchten Proben viel einfacher möglich ist als in der Routinediagnostik.

Zusammengefasst ergeben die Daten dieser Befunde einen Einblick in die Rolle von ALY/REF beim Prostatakarzinom. Der Vergleich mit bereits vorhandenen molekularen Parametern der untersuchten Karzinome zeigt, dass ALY/REF direkt oder indirekt mit ERG und dem Androgenrezeptor interagiert, mit einer erhöhten Zellproliferation assoziiert ist und in einer nicht bekannten Weise funktionell mit dem PTEN/AKT-Regelsystem liiert ist. Eine Annahme einer Rolle in der Kontrolle der genetischen Stabilität wird aufgrund der fehlenden Beziehung zu den meisten chromosomalen Deletionen nicht unterstützt. Obwohl die ALY/REF-Proteinexpression statistisch gesehen einen unabhängigen Prognosemarker beim Prostatakarzinom darstellt sind ist nicht davon auszugehen, dass die Bestimmung von ALY/REF eine klinische Relevanz erlangen wird.

6. Zusammenfassung/ Summary

6.1 Zusammenfassung

ALY/REF ist ein ubiquitäres Protein, dessen bedeutendste Rolle im Export von nukleären mRNAs als Teil des TREX-Protein-Komplexes liegt. Darüber hinaus wird eine Funktion als Transkriptionsfaktor oder in der Aufrechterhaltung der Stabilität nukleärer messenger RNAs diskutiert. Verschiedene Untersuchungen haben auf eine mögliche Rolle von ALY/REF in der Tumorbilogie hingewiesen. Um zu klären inwieweit die ALY/REF-Proteinexpression beim Prostatakarzinom eine Rolle spielt wurden in der vorliegenden Studie 17 965 Prostatakarzinome in einem TMA-Format immunhistochemisch untersucht. Unter den gewählten experimentellen Bedingungen war die ALY/REF-Expression in normalem Prostataepithel meist gering bis mäßig stark ausgeprägt. In Tumoren fand sich eine starke Expression in 24,4%, eine geringe Expression in 33,4% und keine Expression in 42,2% der Tumoren. Die Untersuchung mit bekannten molekularen Parametern ergab eine hochsignifikante Assoziation einer erhöhten ALY/REF-Expression mit dem ERG-Status, dem Vorliegen von PTEN-Deletionen, einer erhöhten Expression des Androgenrezeptors und einer erhöhten Zellproliferation (Ki67-LI). Der Vergleich der ALY/REF-Expression mit Tumorphänotyp und Prognose ergab bei Untersuchung des Gesamtkollektivs eine signifikante Assoziation mit pT ($p < 0,0001$), pN ($p < 0,0001$), Serum-PSA ($p < 0,0001$), dem R-Status ($p < 0,0001$) und mit der Patientenprognose ($p < 0,0001$). In der Multivariaten Analyse erwies sich die Beziehung zur Prognose als unabhängig von sämtlichen präoperativ und postoperativ verfügbaren etablierten Prognoseparametern. Diese statistischen Parameter erwiesen sich aber als trügerisch, denn die prognostischen Unterschiede waren nur äußerst gering. Ein PSA-Rezidiv fand sich nach fünf Jahren bei 23,8% der ALY/REF-negativen, 29,5% der ALY/REF schwach positiven und 25,6% der stark ALY/REF-positiven Tumoren. Auch ist der Befund, dass die ungünstigste Prognose bei der mittleren Gruppe der Tumoren mit geringer Expression vorgefunden wurde ungewöhnlich. Die separate Untersuchung von ERG-positiven und ERG-negativen Tumoren ergab, dass die ALY/REF-Expression lediglich in ERG-negativen, aber nicht in ERG-positiven Tumoren prognoserelevant war ($p < 0,0001$). Insgesamt wird aus den Daten gefolgert, dass das ALY/REF-Protein mit ERG, dem Androgenrezeptor und dem PTEN/AKT-Pathway direkt oder indirekt interagiert und, dass ALY/REF bei hoch proliferierenden Tumoren in besonders großer Menge benötigt wird. Angesichts der nur kleinen Unterschiede in der Prognose bei Tumoren mit unterschiedlicher ALY/REF-Expression und der Beschränkung der (geringen) prognostischen Bedeutung auf die ERG-negativen Tumoren ist von einer klinischen Bedeutung der ALY/REF-Proteinbestimmung im klinischen Alltag nicht auszugehen.

6.2 Summary

ALY/REF is an ubiquitously expressed protein whose most important role is, as part of the TREX-complex, the export of mRNA from nucleus to cytoplasm. In addition, ALY/REF is thought to function as a transcription factor and to be involved in stability of nuclear mRNA. Several studies have investigated the role of ALY/REF in tumor biology. In order to explain whether ALY/REF protein expression is important in prostate cancer, the present study immunohistochemically investigated 17 965 prostate cancers in a tissue micro-array based research approach. Under the selected conditions ALY/REF expression was low to moderate in normal prostate epithelium. ALY/REF expression in tumors was strong in 24,4%, low in 33,4% and negative in 42,2%. When analyzing known molecular parameters, there was a highly significant association between ALY/REF expression and ERG-status, presence of PTEN-deletions, an increased expression of androgen receptor and an increased cell proliferation (ki67-LI). The comparison of ALY/REF expression with tumor phenotype and prognosis was significantly associated with pT ($p < 0,001$), pN ($p < 0,001$), serum PSA level ($p < 0,001$), R status ($p < 0,001$) and patient prognosis when investigating the overall collective. The relationship between prognosis and all established pre- and postoperatively accessible prognostic factors was shown to be independent in multivariate analysis. Those statistically significant parameters were though deceptive as the prognostic difference was marginal. PSA recurrence occurred after five years in 23,8% of ALY/REF negative, 29,5% of ALY/REF weak positive and 25,6% of ALY/REF strong positive tumors. Additionally it is an uncommon finding that the most unfavorable prognosis is found in the middle group of those tumors that only weakly express ALY/REF. Separate investigation of ERG positive and ERG negative tumors showed that ALY/REF expression is prognostically relevant in ERG positive but not ERG negative tumors. Taking all these aspects into consideration one can conclude from the present data that the ALY/REF protein directly or indirectly interacts with ERG, the androgen receptor and the PTEN/AKT-pathway and, that ALY/REF is needed in a particularly high level in highly proliferative tumors. Given the only slight difference in prognosis in tumors with different ALY/REF expression and the limitation of the minor prognostic importance in ERG negative tumors, a significance of ALY/REF protein determination in clinical contexts is not assumed.

7. Abkürzungsverzeichnis

AML-1	Acute myeloid leukemia protein
ASA	American Society of Anesthesiologists
BEF	bZip enhancing factor
BRCA2	Breast Cancer predisposition gene 2
CBC	Cap binding complex
DRU	Digital-Rektale-Untersuchung
EJC	Exon junction complex
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
G-CSF	Granulozyten stimulierender Faktor
GGH	Γ -Glutamyl-Hydrolase
LEF-1	Lymphoid enhancer binding factor 1
LHRH	Luteinisierungshormon-Releasing-Hormon
LI	Labeling Index
mRNA	Messenger RNA
NXF1	Nuclear RNA export factor 1
PAP	Prostatische Saure Phosphatase
PD-1	Programmed Cell Death Protein 1
PD-L1	Programmed Cell Death Protein Ligand 1
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
THOC4	Tho complex subunit 4
TMA	Tissue micro-Array
TMPRSS2	Transmembrane Serine Protease 2
TREX	Transcription Export Complex
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
YB-1	Y-box binding protein 1
Yra1	Yeast RNA annealing protein 1

8. Literaturverzeichnis

- Amling, C. L. (2006) 'Prostate-specific antigen and detection of prostate cancer: What have we learned and what should we recommend for screening?', *Curr Treat Opti Onc*, 7/5: 337–45.
- Beebe-Dimmer, J. L., Yee, C., Cote, M. L. und Petrucelli, N. *et al.* (2015) 'Familial clustering of breast and prostate cancer and risk of postmenopausal breast cancer in the Women's Health Initiative Study', *Cancer*, 121/8: 1265–72.
- Brase, J. C., Johannes, M., Mannsperger, H. und Fälth, M. *et al.* (2011) 'TMPRSS2-ERG -specific transcriptional modulation is associated with prostate cancer biomarkers and TGF- β signaling', *BMC cancer*, 11: 507.
- Brown, D. C. und Gatter, K. C. (2002) 'Ki67 protein: The immaculate deception?', *Histopathology*, 40/1: 2–11.
- Bubendorf, L., Sauter, G., Moch, H. und Schmid, H.-P. *et al.* (1996) 'Ki67 labelling index: An independent predictor of progression in prostate cancer treated by radical prostatectomy', *Jour Path*, 178/4: 437–41.
- Burdelski, C., Bujupi, E., Tsourlakis, M. C. und Hube-Magg, C. *et al.* (2015) 'Loss of SOX9 Expression Is Associated with PSA Recurrence in ERG-Positive and PTEN Deleted Prostate Cancers', *PloS one*, 10/6: e0128525.
- Burdelski, C., Dieckmann, T., Heumann, A. und Hube-Magg, C. *et al.* (2016) 'p16 upregulation is linked to poor prognosis in ERG negative prostate cancer', *Tumour biology*, 37/9: 12655–63.
- Burdelski, C., Menan, D., Tsourlakis, M. C. und Kluth, M. *et al.* (2015) 'The prognostic value of SUMO1/Sentrin specific peptidase 1 (SEN1P1) in prostate cancer is limited to ERG-fusion positive tumors lacking PTEN deletion', *BMC cancer*, 15: 538.
- Burkhardt, L., Fuchs, S., Krohn, A. und Masser, S. *et al.* (2013) 'CHD1 is a 5q21 tumor suppressor required for ERG rearrangement in prostate cancer', *Cancer Res*, 73/9: 2795–805.
- Castro, E. und Eeles, R. (2012) 'The role of BRCA1 and BRCA2 in prostate cancer', *Asian Jour Andr*, 14/3: 409–14.
- Cher, M. L., Carroll, P. R., Chew, K. und Rosenau, W. (1995) 'Cellular proliferation in prostatic adenocarcinoma as assessed by bromodeoxyuridine uptake and Ki-67 and PCNA expression', *The Prostate*, 26/2: 87–93.
- Chervitz, S. A., Hester, E. T., Ball, C. A. und Dolinski, K. *et al.* (1999) 'Using the Saccharomyces Genome Database (SGD) for analysis of protein similarities and structure', *Nucleic Acids Res*, 27/1: 74–8.
- Constantinidou, A., Alifieris, C. und Trafalis, D. T. (2019) 'Targeting Programmed Cell Death -1 (PD-1) and Ligand (PD-L1): A new era in cancer active immunotherapy', *Pharmacol Ther*, 194: 84–106.

- Daniyal, M., Siddiqui, Z. A., Akram, M. und Asif, H. M. *et al.* (2014) 'Epidemiology, Etiology, Diagnosis and Treatment of Prostate Cancer', *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15/22: 9575–8.
- Domínguez-Sánchez, M. S., Sáez, C., Japón, M. A. und Aguilera, A. *et al.* (2011) 'Differential expression of THOC1 and ALY mRNP biogenesis/export factors in human cancers', *BMC cancer*, 11: 77.
- Epstein, J. I. und Netto, G. J. (2008) *Biopsy interpretation of the prostate*: 4th Edition ISBN 0-7817-6696-6 Wolters Kluwer, Philadelphia: 2-5, 13-22, 330-340
- Erbersdobler, A., Fritz, H., Schnöger, S. und Graefen, M. *et al.* (2002) 'Tumour Grade, Proliferation, Apoptosis, Microvessel Density, p53, and bcl-2 in Prostate Cancers: Differences Between Tumours Located in the Transition Zone and in the Peripheral Zone', *Eur Urol*, 41/1: 40–6.
- European Association of Urology (2015) *EAU Guidelines Edn. presented at the annual Congress Madrid 2015*: ISBN 978-90-79754-80-9. Arnhem, Niederlande.
- Fernández-Serra, A., Rubio, L., Calatrava, A und Rubio-Briones, J. *et al.* (2013) 'Molecular characterization and clinical impact of TMPRSS2-ERG rearrangement on prostate cancer: Comparison between FISH and RT-PCR', *Biomed Res Int*, 2013: 465179
- Franks, L. M. (1954) *Latent Carcinoma: Imperial Cancer Research Fund Lecture delivered at the Royal College of Surgeons of England on 11th May 1954* (1954), <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2377802/?page=5>, Stand 31.08.2018, 15:00
- Glass, A.S., Cary, K. C. und Cooperberg, M. R. (2013) 'Risk-based prostate cancer screening: Who and how?', *Curr Onc Rep*, 14/3: 192-8.
- Graham-Steed, T., Uchio, E., Wells, C. K. und Aslan, M. *et al.* (2013) 'Race' and prostate cancer mortality in equal-access healthcare systems', *AJM*, 126/12: 1084–8.
- Grupp, K., Diebel, F., Sirma, H. und Simon, R. *et al.* (2013) 'SPINK1 expression is tightly linked to 6q15- and 5q21-deleted ERG-fusion negative prostate cancers but unrelated to PSA recurrence', *The Prostate*, 73/15: 1690–8.
- Grupp, K., Höhne, T. S., Prien, K. und Hube-Magg, C. *et al.* (2013) 'Reduced CD147 expression is linked to ERG fusion-positive prostate cancers but lacks substantial impact on PSA recurrence in patients treated by radical prostatectomy', *Exp Mol Pathol*, 95/2: 227–34.
- Haas, G. P., Delongchamps, N., Brawley, O. W. und Wang, C. Y. *et al.* (2008) 'The worldwide epidemiology of prostate cancer: Perspectives from autopsy studies', *Can J Urol* 15: 3866-3871
- Heath, C. G., Viphakone, N. und Wilson, S. A. (2016) 'The role of TREX in gene expression and disease', *Biochem J*, 473/19: 2911–35.

- Heumann, A., Kaya, Ö., Burdelski, C. und Hube-Magg, C. *et al.* (2017) 'Up regulation and nuclear translocation of Y-box binding protein 1 (YB-1) is linked to poor prognosis in ERG-negative prostate cancer', *Sci Rep*, 7/1: 2056.
- Jemal, A., Bray, F., Center, M. M. und Ferlay, J. *et al.* (2011) 'Global cancer statistics', *CA Cancer J Clin*, 61/2: 69–90.
- Jovčevska, I., Zupanec, N., Urlep, Ž. und Vranič, A. *et al.* (2017) 'Differentially expressed proteins in glioblastoma multiforme identified with a nanobody-based anti-proteome approach and confirmed by OncoFinder as possible tumor-class predictive biomarker candidates', *Oncotarget*, 8/27: 44141–58.
- Keys, R. A. und Green, M. R. (2001) 'Gene expression: The odd coupling', *Nature*, 413/6856: 583.
- Klap, J., Schmid, M. und Loughlin, K. R. (2015) 'The relationship between total testosterone levels and prostate cancer: A review of the continuing controversy', *J Urol*, 193/2: 403–13.
- Kluth, M., Hesse, J., Heini, A. und Krohn, A. *et al.* (2013) 'Genomic deletion of MAP3K7 at 6q12-22 is associated with early PSA recurrence in prostate cancer and absence of TMPRSS2:ERG fusions', *Mod Pathol*, 26/7: 975–83.
- Kluth, M., Jung, S., Habib, O. und Eshagzaei, M. *et al.* (2017) 'Deletion lengthening at chromosomes 6q and 16q targets multiple tumor suppressor genes and is associated with an increasingly poor prognosis in prostate cancer', *Oncotarget*, 8/65: 108923–35.
- Kononen, J., Bubendorf, L., Kallioniemi, A. und Bärnlund, M. *et al.* (1998) 'Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens', *Nat Med*, 4/7: 844–7.
- Krohn, A., Diedler, T., Burkhardt, L. und Mayer, P.-S. *et al.* (2012) 'Genomic deletion of PTEN is associated with tumor progression and early PSA recurrence in ERG fusion-positive and fusion-negative prostate cancer', *AJP*, 181/2: 401–12.
- Krohn, A., Seidel, A., Burkhardt, L. und Bachmann, F. *et al.* (2013) 'Recurrent deletion of 3p13 targets multiple tumor suppressor genes and defines a distinct subgroup of aggressive ERG fusion-positive prostate cancers', *J Pathol*, 231/1: 130–41.
- Leitlinienprogramm Onkologie [Deutsche Krebsgesellschaft] Deutsche Krebshilfe (2016) *Konsultationsfassung: Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Konsultationsfassung: Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms, Langversion 4.0*, <http://leitlinienprogramm.onkologie.de/Prostatakarzinom.58.0.html>
Stand 01.09.2018, 15:00
- Leong, A. S. Y. (2004a) 'Quantitation in immunohistology: Fact or fiction? A discussion of variables that influence results', *AIMM*, 12/1: 1–7.

- Leong, A. S.-Y. (2004b) 'Pitfalls in diagnostic immunohistology', *Adv Anat Pathol*, 11/2: 86–93.
- Li, J., Yen, C., Liaw, D. und Podsypanina, K. *et al.* (1997) 'PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer', *Science (New York, N.Y.)*, 275/5308: 1943–7.
- Liu, W., Chang, B.-L., Cramer, S. und Koty, P. P. *et al.* (2007) 'Deletion of a small consensus region at 6q15, including the MAP3K7 gene, is significantly associated with high-grade prostate cancers', *Clin Cancer Res*, 13/17: 5028–33.
- Liu, W., Lindberg, J., Sui, G. und Luo, J. *et al.* (2012) 'Identification of novel CHD1-associated collaborative alterations of genomic structure and functional assessment of CHD1 in prostate cancer', *Oncogene*, 31/35: 3939–48.
- Melling, N., Rashed, M., Schroeder, C. und Hube-Magg, C. *et al.* (2017) 'High-Level γ -Glutamyl-Hydrolase (GGH) Expression is Linked to Poor Prognosis in ERG Negative Prostate Cancer', *Int J Mol Sci*, 18/2.
- Minner, S., Enodien, M., Sirma, H. und Luebke, A. M. *et al.* (2011) 'ERG status is unrelated to PSA recurrence in radically operated prostate cancer in the absence of antihormonal therapy', *Clin Cancer Res*, 17/18: 5878–88.
- Minner, S., Jessen, B., Stiedenroth, L. und Burundt, E. *et al.* (2010) 'Low level HER2 overexpression is associated with rapid tumor cell proliferation and poor prognosis in prostate cancer', *Clin Cancer Res*, 16/5: 1553–60.
- Mirlacher, M. und Simon, R. (2010) 'Recipient block TMA technique', *Methods Mol Biol*, 664: 37–44.
- Müller, J., Ehlers, A., Burkhardt, L. und Sirma, H. *et al.* (2013) 'Loss of pSer2448-mTOR expression is linked to adverse prognosis and tumor progression in ERG-fusion-positive cancers', *Int J Cancer*, 132/6: 1333–40.
- Nevedomskaya, E., Baumgart, S. J. und Haendler, B. (2018) 'Recent Advances in Prostate Cancer Treatment and Drug Discovery', *Int J Mol Sci*, 19/5.
- Oon, S. F., Watson, R. W., O'Leary, J. J. und Fitzpatrick, J. M. (2011) 'Epstein criteria for insignificant prostate cancer', *BJU*, 108/4: 518–25.
- Osinalde, N., Olea, M., Mitxelena, J. und Aloria, K. *et al.* (2013) 'The nuclear protein ALY binds to and modulates the activity of transcription factor E2F2', *MCP*, 12/5: 1087–98.
- Park, K., Tomlins, S. A., Mudaliar, K. M. und Chiu, Y.-L. *et al.* (2010) 'Antibody-based detection of ERG rearrangement-positive prostate cancer', *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 12/7: 590–8.
- Punnen, S. und Cooperberg, M. R. (2013) 'The epidemiology of high-risk prostate cancer', *Curr Op Urol*, 23/4: 331–6.

- Ramsay, C., Pickard, R., Robertson, C. und Close, A. *et al.* (2012) 'Systematic review and economic modelling of the relative clinical benefit and cost-effectiveness of laparoscopic surgery and robotic surgery for removal of the prostate in men with localised prostate cancer', *Health Technol Assess*, 16/41: 1–313.
- Rao, A. und Patel, M. R. (2019) 'A review of avelumab in locally advanced and metastatic bladder cancer', *Therapeutic Adv Urol*, 11: 1756287218823485.
- Robert Koch-Institut (2017) 'Krebs in Deutschland für 2013/2014'.
https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/krebs_in_deutschland_node.html
 Stand 01.09.2018.
- Saito, Y., Kasamatsu, A., Yamamoto, A. und Shimizu, T. *et al.* (2013) 'ALY as a potential contributor to metastasis in human oral squamous cell carcinoma', *J Cancer Res Clin Oncol*, 139/4: 585–94.
- Salman, J. W., Schoots, I. G., Carlsson, S. V. und Jenster, G. *et al.* (2015) 'Prostate Specific Antigen as a Tumor Marker in Prostate Cancer: Biochemical and Clinical Aspects', *Adv Exp Med Biol*, 867: 93–114.
- Sfanos, K. S. und Marzo, A. M. de (2012) 'Prostate cancer and inflammation: The evidence', *Histopathology*, 60/1: 199–215.
- Stephan, C., Ralla, B. und Jung, K. (2014) 'Prostate-specific antigen and other serum and urine markers in prostate cancer', *BBA*, 1846/1: 99–112.
- Stubbs, S. H. und Conrad, N. K. (2015) 'Depletion of REF/Aly alters gene expression and reduces RNA polymerase II occupancy', *Nucleic acids research*, 43/1: 504–19.
- Sun, J., Liu, W., Adams, T. S. und Sun, J. *et al.* (2007) 'DNA copy number alterations in prostate cancers: A combined analysis of published CGH studies', *The Prostate*, 67/7: 692–700.
- Taylor, B. S., Schultz, N., Hieronymus, H. und Gopalan, A. *et al.* (2010) 'Integrative genomic profiling of human prostate cancer', *Cancer cell*, 18/1: 11–22.
- Tennstedt, P., Köster, P., Brüchmann, A. und Mirlacher, M. *et al.* (2012) 'The impact of the number of cores on tissue microarray studies investigating prostate cancer biomarkers', *International journal of oncology*, 40/1: 261–8.
- Tsourlakis, M.-C., Stender, A., Quaas, A., und Kluth, M. *et al.* (2016) 'Heterogeneity of ERG expression in prostate cancer: A large section mapping study of entire prostatectomy specimens from 125 patients', *BMC cancer*, 16: 641
- Uhlén, M., Fagerberg, L., Hallström, B. M. und Lindskog, C. *et al.* (2015) 'Proteomics. Tissue-based map of the human proteome', *Science (New York, N.Y.)*, 347/6220: 1260419.
- UniProt Consortium, T. (2018) 'UniProt: The universal protein knowledgebase', *Nucleic Acids Res*, 46/5: 2699.

- Viphakone, N., Cumberbatch, M. G., Livingstone, M. J. und Heath, P. R. *et al.* (2015) 'Luzp4 defines a new mRNA export pathway in cancer cells', *Nucleic Acids Res*, 43/4: 2353–66.
- Wang, G., Di Zhao, Spring, D. J. und DePinho, R. A. (2018) 'Genetics and biology of prostate cancer', *Genes Dev*, 32/17-18: 1105–40.
- Weischenfeldt, J., Simon, R., Feuerbach, L. und Schlangen, K. *et al.* (2013) 'Integrative genomic analyses reveal an androgen-driven somatic alteration landscape in early-onset prostate cancer', *Cancer Cell*, 23/2: 159–70.
- Williams, J. L., Greer, P. A. und Squire, J. A. (2014) 'Recurrent copy number alterations in prostate cancer: An in silico meta-analysis of publicly available genomic data', *Cancer Gen*, 207/10-12: 474–88.
- Yamazaki, T., Fujiwara, N., Yukinaga, H. und Ebisuya, M. *et al.* (2010) 'The closely related RNA helicases, UAP56 and URH49, preferentially form distinct mRNA export machineries and coordinately regulate mitotic progression', *MBCI*, 21/16: 2953–65.
- Zhu, Y., Wang, H.-K., Qu, Y.-Y. und Ye, D.-W. (2015) 'Prostate cancer in East Asia: Evolving trend over the last decade', *Asian J Androl*, 17/1: 48–57.

9. Danksagung

Danksagung wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

10. Lebenslauf

Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

11. 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: