

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Institut für Pathologie

Direktor: Prof. Dr. med. Guido Sauter

A nuclear shift of GSK3 β protein is a strong and independent prognostic feature in prostate cancer

Dissertation

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

vorgelegt von:

Mohammad Hussein

Al Hasaka- Syrien

Hamburg 2019

Angenommen von der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 24.09.2019

Veröffentlicht mit Genehmigung der

Medizinische Fakultät der Universität Hamburg.

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

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Derya Tilki

Inhaltsverzeichnis

1 Originalpublikation: A nuclear shift of GSK3β protein is a strong and independent prognostic feature in prostate cancer	Seite 3
2 Darstellung der Publikation	Seite 20
2.1 Einleitung	Seite 20
2.2 Material und Methoden	Seite 22
2.3 Ergebnisse	Seite 23
2.4 Diskussion	Seite 23
2.5 Zusammenfassung	Seite 27
2.6 Abstract	Seite 28
2.7 Literaturverzeichnis	Seite 29
3 Erklärung des Eigenanteiles an der Publikation	Seite 34
4 Danksagung	Seite 35
5 Eidesstattliche Versicherung	Seite 36
6 Lebenslauf	Seite 37

1 Originalpublikation: A nuclear shift of GSK3 β protein is a strong and independent prognostic feature in prostate cancer

www.oncotarget.com

Oncotarget, 2019, Vol. 10, (No. 18), pp: 1729-1744

Research Paper

A nuclear shift of GSK3 β protein is an independent prognostic factor in prostate cancer

Till Eichenauer^{1,2,*}, Mohammad Hussein^{1,*}, Claudia Hube-Magg¹, Martina Kluth¹, Franziska Büscheck¹, Doris Höflmayer¹, Maria Christina Tsourlakis¹, Stefan Steurer¹, Till S. Clauditz¹, Andreas M. Luebke¹, Eike Burandt¹, Waldemar Wilczak¹, Andrea Hinsch¹, David Dum¹, Burkhard Beyer³, Thomas Steuber³, Hartwig Huland³, Markus Graefen³, Ronald Simon¹, Guido Sauter¹, Nathaniel Melling⁴, Thorsten Schlomm⁵ and Sarah Minner¹

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

²Department of Urology, University Medical Center, Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

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

⁴Department of General, Visceral and Thoracic Surgery, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

⁵Department of Urology, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany

* These authors contributed equally to this work

Correspondence to: Ronald Simon, email: R.Simon@uke.de

Keywords: GSK3 β ; prostate cancer; prognosis; immunohistochemistry

Received: January 16, 2019

Accepted: February 15, 2019

Published: March 01, 2019

Copyright: Eichenauer et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License

3.0 (CC BY 3.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ABSTRACT

Glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) regulates many cancer relevant cellular processes and represents a potential therapeutic target. GSK3 β overexpression has been linked to adverse tumor features in many cancers, but its role in prostate cancer remains uncertain. We employed immunohistochemical GSK3 β expression analysis on a tissue microarray with 12,427 prostate cancers. Cytoplasmic and nuclear GSK3 β staining was separately analyzed. GSK3 β staining was absent in normal prostate epithelium, whereas 57% of 9,164 interpretable cancers showed detectable GSK3 β expression. Cytoplasmic staining was considered weak, moderate, and strong in 36%, 19.5% and 1.5% of tumors and was accompanied by nuclear GSK3 β staining in 47% of cases. Cytoplasmic GSK3 β staining as well as nuclear GSK3 β accumulation was associated with advanced tumor stage, high Gleason grade, presence of lymph node metastasis and early biochemical recurrence ($p < 0.0001$ each for cytoplasmic staining and nuclear accumulation). Prognosis of GSK3 β positive cancers became particularly poor if nuclear GSK3 β staining was also seen ($p < 0.0001$). The prognostic impact of nuclear GSK3 β accumulation was independent of established preoperative and postoperative parameters in multivariate analyses ($p < 0.0001$). The significant association of GSK3 β expression with deletions of *PTEN*, 3p13 ($p < 0.0001$ each), 5q21 ($p = 0.0014$) and 6q15 ($p = 0.0026$) suggest a role of GSK3 β in the development of genomic instability. In summary, the results of our study identify GSK3 β as an independent prognostic marker in prostate cancer

INTRODUCTION

Prostate cancer is the 2nd most prevalent cancer in men in Western societies [1], but only a small subset is highly aggressive and requires extensive treatment [2, 3]. Presently Gleason grade, tumor extent on biopsies, prostate-specific antigen (PSA), and clinical stage are recognized prognostic parameters. These factors are statistically powerful, but not always sufficient for individual treatment decisions. Thus it is hoped that new biomarkers will enable a more reliable prediction of prostate cancer aggressiveness.

Glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) is a ubiquitously expressed multifunctional serine/threonine kinase that was originally named after its function as an enzyme in glycogen biosynthesis. It also plays a key role in regulating a multitude of other pathways affecting metabolism, proliferation, survival and cell motility [4]. GSK3 β shuttles between the cytoplasm and the nucleus where it is believed to exert distinct functions [5]. Deregulation of GSK3 β has been implicated in the development of many human diseases, including diabetes, cardiovascular diseases, Alzheimer's, Parkinson's, and cancer [4]. Overexpression of GSK3 β has been linked to adverse tumor phenotype and poor prognosis in several cancer types, including breast [6, 7], ovarian [8], oral cavity [9], urinary bladder [10], non-small cell lung [11], gastric [12], and pancreatic cancers [13]. Based on these findings, GSK3 β has gained considerable interest as a target for novel therapies. At present, more than 50 GSK3 β inhibitors have been described [4] and clinical phase 1/2 trials have been initiated in pancreatic cancer (NCT01632306) and leukemia (NCT01214603). Accumulating evidence suggests that GSK3 β may also be clinically relevant in prostate cancer [14, 15]. Here, GSK3 β is known to be involved in the regulation of androgen receptor (AR) stability, localization, and androgen-stimulated gene expression [16–22]. Two studies analyzing GSK3 β expression on clinical samples from 79 and 499 prostate cancer patients suggested associations between GSK3 β overexpression and high Gleason score [22] and potentially also poor patient prognosis [15].

To study the impact of GSK3 β expression on prostate cancer phenotype and patient prognosis, we analyzed cytoplasmic and nuclear GSK3 β expression in more than 12,400 prostate cancer specimens using a preexisting tissue microarray (TMA).

RESULTS

Technical issues

A total of 9,164 of 12,427 tumor samples (74%) were interpretable in our TMA analysis. Reasons for non-informative cases ($n = 3,263$; 26%) included lack of tissue samples or absence of unequivocal cancer tissue in the TMA spot.

GSK3 β expression in normal and cancerous prostate tissues

Normal prostate tissue was negative for GSK3 β . In cancers, GSK3 β staining was localized in the cytoplasm and/or in the nucleus. Representative images of cytoplasmic and nuclear GSK3 β staining are given in Figure 1. Cytoplasmic staining (irrespective of nuclear staining) was seen in 5,223 of our 9,164 (57%) interpretable prostate cancers and was considered weak in 36%, moderate in 19.5% and strong in 1.5% of cases. Cytoplasmic and nuclear staining was tightly linked: Cytoplasmic staining was accompanied by nuclear staining in 2,465 (47%) of 5,223 cases and the likelihood for nuclear tumor cell staining rose with increasing levels of cytoplasmic staining (Figure 2; $p < 0.0001$). Nuclear staining without cytoplasmic staining was seen in only 95 cases (1%). To better understand the individual impact of cytoplasmic and nuclear staining, we re-grouped all cancers for the subsequent analyses according to the following criteria: no staining at all (negative, $n = 3,846$), cytoplasmic staining without nuclear co-staining (cytoplasmic only, $n = 2,758$), and cytoplasmic staining with nuclear co-staining (nuclear accumulation, $n = 2,560$, including the 95 cancers with isolated nuclear staining).

Association with androgen receptor (AR)

As GSK3 β is an AR regulated gene, we compared data on AR expression from a previous study [23] with GSK3 β expression patterns. IHC data on both GSK3 β and AR were available from 6,253 cancers. As expected, there was a strong positive association between AR expression and presence of both cytoplasmic and nuclear GSK3 β protein ($p < 0.0001$ each; Figure 3). Also nuclear GSK3 β and nuclear AR expression correlated as well (Supplementary Figure 1).

Association with *TMPRSS2:ERG* fusion status and ERG protein expression

Data on *TMPRSS2:ERG* fusion status obtained by FISH were available from 5,556 and by IHC from 8,171 tumors with evaluable GSK3 β staining. Data on both ERG FISH and IHC were available from 5,365 of these cancers, and an identical result (ERG IHC positive and break by FISH or ERG IHC negative and missing break by FISH) was found in 5,137 of 5,365 (95.8%) cancers. Both cytoplasmic expression and nuclear accumulation GSK3 β were strongly linked to *TMPRSS2:ERG* rearrangement and ERG expression ($p < 0.0001$ each, Figure 4). For example, GSK3 β staining was seen in 44.5% of ERG-IHC negative but in 78.3% of ERG-IHC positive cancers.

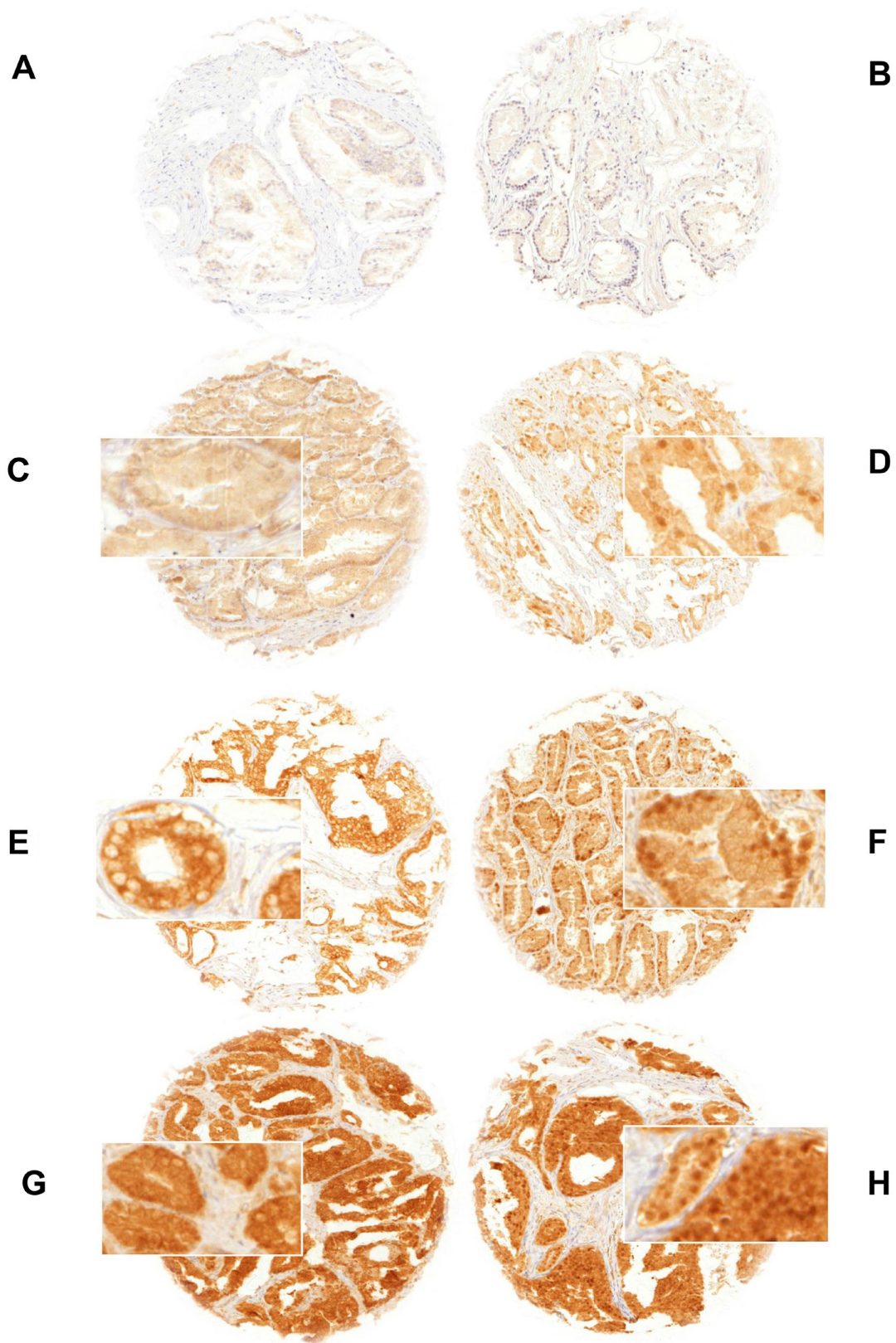


Figure 1: GSK3 β staining of (A) negative normal prostate tissue, (B) negative prostate cancer, (C) weak cytoplasmic only (D) weak cytoplasmic and nuclear accumulation, (E) moderate cytoplasmic only (F) moderate cytoplasmic and nuclear accumulation, (G) strong cytoplasmic only and (H) strong cytoplasmic and nuclear accumulation. Spot size is 0.6 mm at 100 $\times$ (inset 400 $\times$) magnification. Nuclear accumulation denotes nuclear staining with/without cytoplasmic staining.

Associations with tumor phenotype

Both the intensity of cytoplasmic GSK3β staining and the presence of nuclear GSK3β accumulation showed significant associations with adverse tumor features. This was particularly true for nuclear GSK3β accumulation, which was associated with advanced tumor stage ($p < 0.0001$), high Gleason grade ($p < 0.0001$), lymph node metastasis ($p < 0.0001$), positive surgical margin ($p < 0.0001$) and high preoperative PSA level ($p = 0.0002$, Table 1). Cytoplasmic GSK3β expression levels showed comparable but somewhat weaker associations (Table 1). All these associations held true in the subset of ERG negative and ERG positive cancers (Supplementary Tables 1 and 2).

Association to other key genomic deletions

Comparison of GSK3β expression with several of the most frequent genomic deletions in prostate cancer (*PTEN*, 3p13, 6q15 and 5q21) revealed that GSK3β staining was strikingly linked to *PTEN* deletions ($p < 0.0001$, Figure 5). Weaker associations were also found with deletions of 6q15 ($p = 0.0026$), 5q21 ($p = 0.0014$) and 3p13 ($p < 0.0001$). However, subset analysis

of ERG positive and ERG negative cancers revealed that the associations, with the exception of *PTEN*, were solely driven by ERG negative cancers ($p \leq 0.002$ each).

Association to tumor cell proliferation (Ki67LI)

Presence of GSK3β staining was significantly linked to increased cell proliferation as measured by Ki67LI. This held true for purely cytoplasmatic but all the more for combined cytoplasmatic and nuclear staining (nuclear accumulation) ($p < 0.0001$; Table 2). These associations were independent from the Gleason grade as they also held true in subgroups of tumors with identical Gleason score ($\leq 3+3$, $3+4$, $4+3$ $p < 0.0001$ each and $\geq 4+4$; $p = 0.0101$).

Association with PSA recurrence

Follow-up data were available from 8,598 patients with interpretable GSK3β staining on the TMA. The intensity of cytoplasmic GSK3β staining was strongly linked to early biochemical recurrence ($p = 0.0001$, Figure 6A). Factoring in the staining localization revealed that the prognosis of GSK3β positive cancers deteriorated if the protein accumulated in the nucleus ($p < 0.0001$, Figure 6B). These findings were independent of the ERG

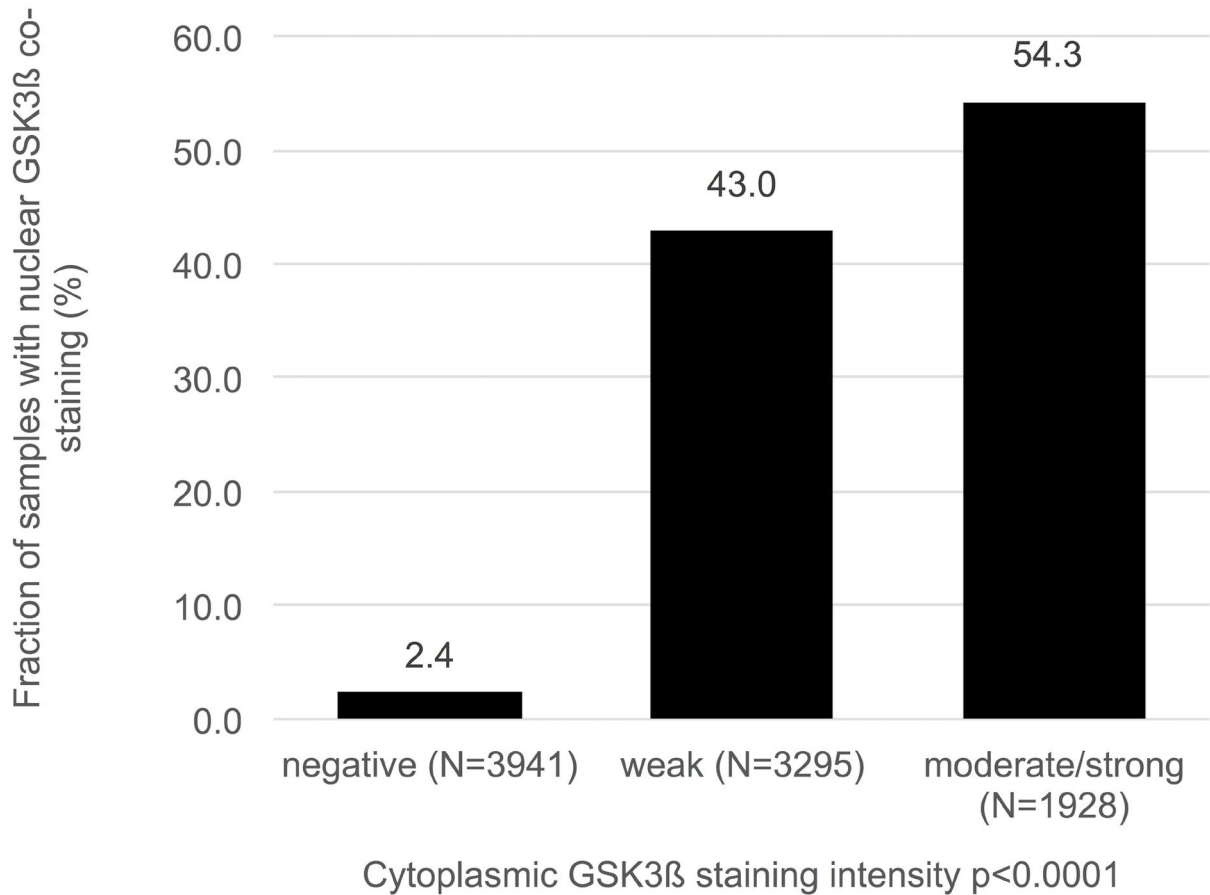


Figure 2: Association between cytoplasmic and nuclear GSK3β staining.

status (Figure 6B, 6C and 6E, 6F). To better understand the prognostic impact of nuclear GSK3 β accumulation, we performed subset analyses in tumors with comparable classical and quantitative Gleason grades. These analyses revealed that nuclear GSK3 β expression measurement did provide additional prognostic impact in morphologically well-characterized tumors with Gleason 3+4 ($p < 0.0001$) and Gleason 4+3 ($p = 0.0002$, Figure 7A). Expansion of the subgroup analysis to the quantitative Gleason grade showed that nuclear GSK3 β accumulation even had a prognostic impact in several subsets of tumors with comparable fractions of Gleason 4 (Figure 7B–7H).

Multivariate analysis

Four different models of multivariate analyses were evaluated (Table 3, Supplementary Table 3). Scenario 1 evaluated the postoperatively available parameters (pathological tumor stage, pathological lymph node status (pN), surgical margin status, preoperative PSA value and pathological Gleason grade obtained after the evaluation of the entire resected prostate and nuclear GSK3 β expression). In scenario 2 pN was excluded. This approach can markedly increase case numbers and power of the test. Two additional scenarios 3 and 4 model the preoperative situation as much as possible. Since postoperative determination of a tumor’s Gleason grade is “better” than the preoperatively determined Gleason grade

(subjected to sampling errors and consequently undergrading in more than one third of cases [24]), scenario 3 included the postoperative Gleason grade instead of the Gleason grade originally obtained at biopsy in scenario 4. Nuclear GSK3 β accumulation provided highly significant prognostic value beyond the established pre- and postoperative parameters in all scenarios irrespective of the ERG status ($p < 0.0001$ for all scenarios). The univariate hazard ratio of nuclear GSK3 β accumulation for PSA recurrence-free survival was a moderate 2.06 (95% CI 1.86-2.29, $p \leq 0.0001$). The multivariate hazard ratio varied from 1.72 to 1.37 depending on the model used (Supplementary Table 3).

DISCUSSION

The results of our study demonstrate that nuclear GSK3 β protein accumulation is a moderate and independent predictor of poor prognosis in prostate cancer. Cytoplasmic GSK3 β staining - with or without additional nuclear staining - was seen in 57% of 9,164 interpretable prostate cancers, while normal prostatic epithelial tissue was negative under the selected experimental conditions. Our results fit well to earlier work. Li *et al.* described higher cytoplasmic GSK3 β expression in 499 cancers as compared to 491 normal prostate samples using a customized IHC score [15]. Darrington *et al.* found cytoplasmic and nuclear GSK3 β

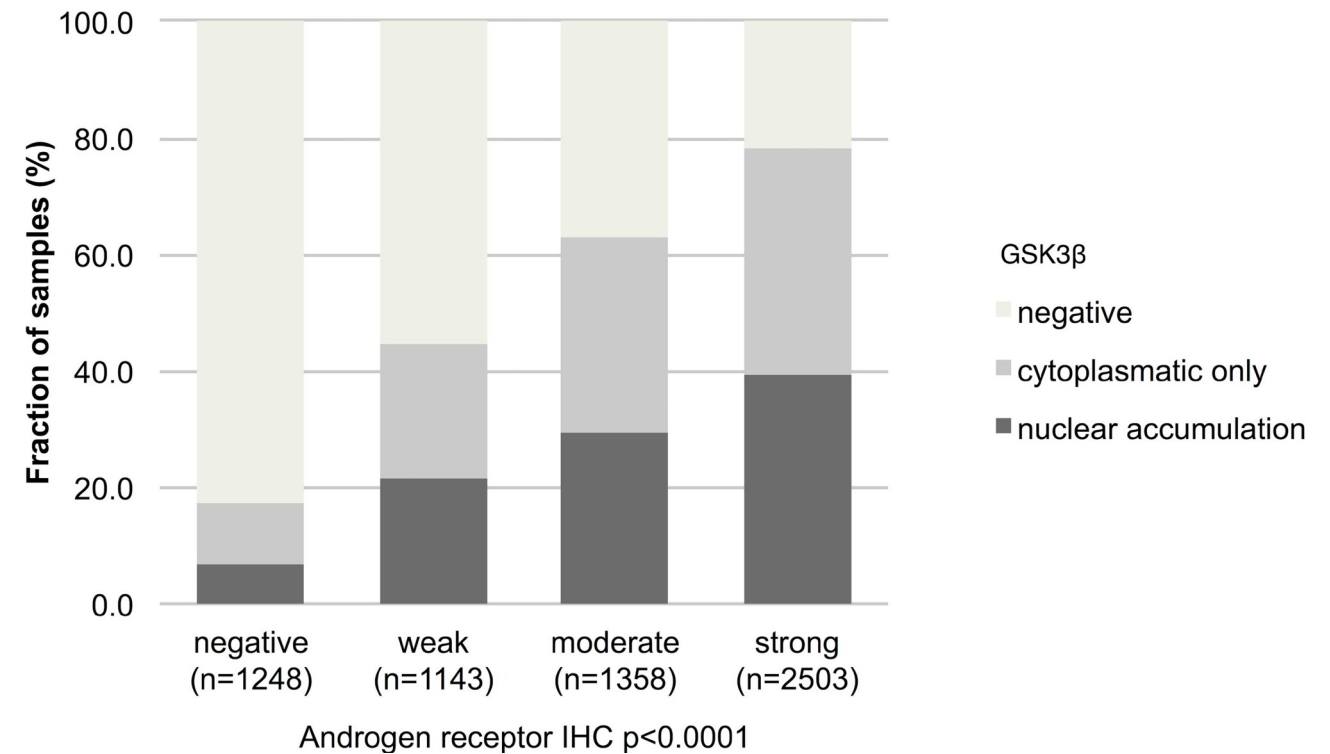


Figure 3: Association between GSK3 β staining pattern and expression of androgen receptor. Nuclear accumulation denotes nuclear staining with/without cytoplasmic staining.

expression in 30% of 79 cancers but no GSK3 β staining in normal prostate epithelium [22]. The somewhat lower rate of GSK3 β positivity in the latter study as compared to our analysis has most likely technical reasons, including different antibodies (our study: Cell Signaling Technology #12456 1:900; Darrington *et al.*: New England Biolabs #27C10 1:20) and different IHC protocols (our study: autoclave pretreatment in pH7.8 TRIS-EDTA buffer, Darrington *et al.*: microwave pretreatment in pH6 citrate buffer). Others and we have demonstrated earlier that protocol modifications can dramatically impact the fraction of positive tissues in IHC experiments [25–28].

The most important finding of our study was a massive link between prostate cancer aggressiveness and translocation of the GSK3 β protein from the cytoplasm to the nucleus. In particular, nuclear GSK3 β accumulation was associated with adverse tumor features, including advanced pathological tumor stage, high Gleason grade, lymph node metastasis, elevated tumor cell proliferation and early PSA recurrence. It was not surprising to find the same associations (although weaker) for cytoplasmic staining, since nuclear accumulation was generally paralleled by a higher level of cytoplasmic GSK3 β staining. It is, thus, in line with our results that earlier

studies focusing on cytoplasmic staining reported comparable associations with high Gleason score [22], advanced clinical stage, lymph node metastasis, extra-capsular extension, high Gleason score and an increased risk of biochemical recurrence [15]. However, the particular strong prognostic impact of nuclear staining suggests, that tumor relevant functions of GSK3 β exist which are specifically linked to its nuclear localization. This is supported by earlier work on the nuclear functions of GSK3 β . Several studies showed that GSK3 β forms complexes with various cancer-relevant proteins specifically in the nucleus, including cyclin D1 [29], STAT [30], GATA-4 [31], c-myc [32], NRF2 [33], Snail [34] and p53 [35]. Schütz *et al* [17] showed that inhibition of GSK3 β induces nuclear export of the AR in prostate cancer cells. Thus nuclear GSK3 β increases nuclear AR even in the absence of androgens supporting the growth of prostate cancer cells. Accordingly, data are accumulating which suggest a general role of nuclear GSK3 β accumulation for cancer aggressiveness. For example, a shift from cytoplasmic to nuclear expression also paralleled progression of pancreatic cancer [13]. Studies describing a relationship between GSK3 β overexpression and poor patient outcome in breast [6, 7],

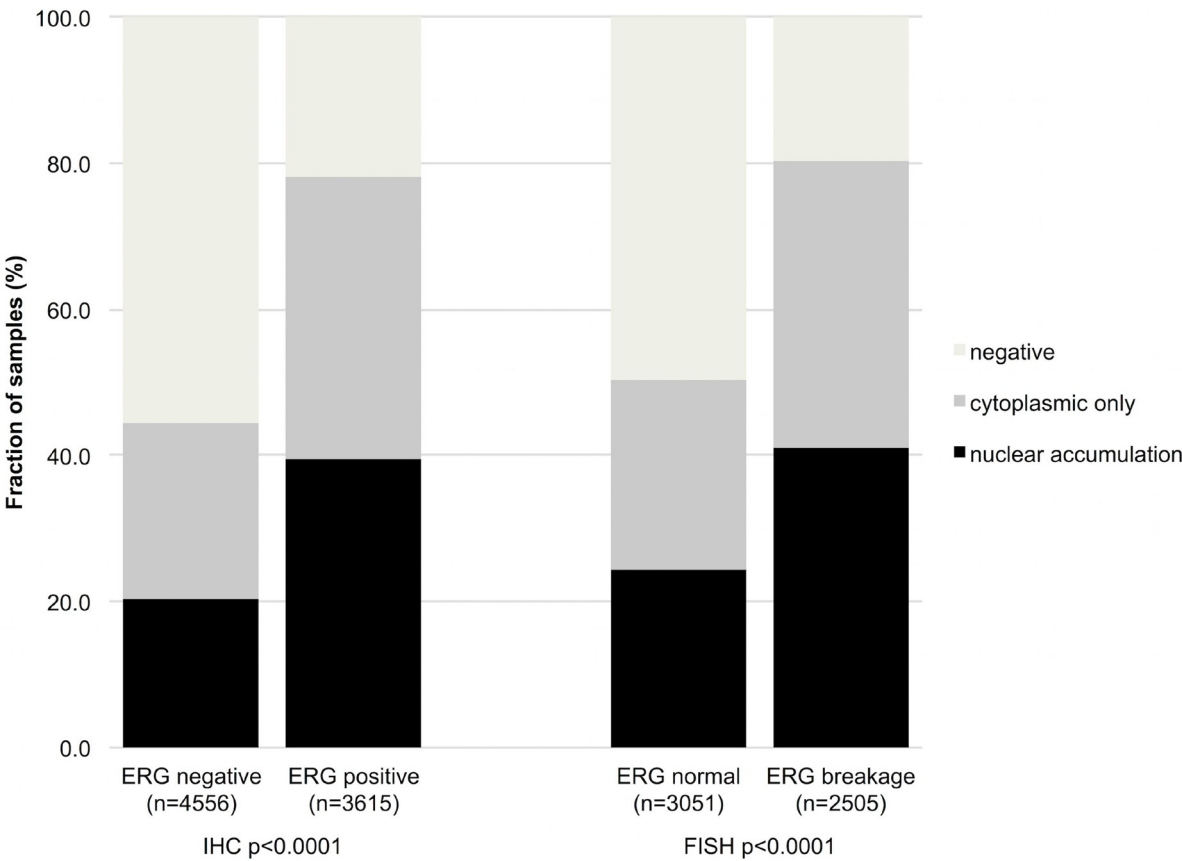


Figure 4: Association between increasing GSK3 β staining and ERG status determined by IHC and FISH. Breakage indicates rearrangement of the *ERG* gene by FISH.

Table 1: Association between cytoplasmic and nuclear GSK3 β immunostaining and prostate cancer phenotype

Parameter	N	Cytoplasmic GSK3 β (%)				P	Cytoplasmic and nuclear GSK3 β (%)		
		Negative	Weak	Moderate	Strong		Cytoplasmic only	Nuclear accumulation	P
All cancers	9,164	43.0	36.0	19.5	1.5		29.6	27.4	
Tumor stage									
pT2	5,596	46.8	35.1	16.9	1.2		30.4	22.8	
pT3a	2,121	36.7	37.9	23.4	2.0	< 0.0001	29.0	34.3	< 0.0001
pT3b-pT4	1,140	34.9	36.9	25.8	2.5		25.4	39.7	
Gleason grade									
$\leq 3+3$	1,922	58.3	32.8	8.8	0.2		27.7	14.0	
3+4	5,030	41.9	36.7	19.9	1.6		32.1	26.0	
3+4 Tert.5	337	38.3	39.8	20.2	1.8		27.7	34.0	
4+3	903	30.8	40.1	26.0	3.1	< 0.0001	30.1	39.1	< 0.0001
4+3 Tert.5	500	29.4	33.0	34.8	2.8		22.5	48.1	
$\geq 4+4$	466	34.6	33.3	29.6	2.6		21.3	44.1	
Lymph node metastasis									
N0	5,250	40.1	36.9	21.0	2.0		29.6	30.3	
N+	524	32.8	34.7	30.0	2.5	< 0.0001	24.2	43.0	< 0.0001
Preoperative PSA level (ng/ml)									
< 4	1,319	41.8	37.9	18.7	1.6		33.1	25.2	
4-10	5,319	42.4	36.2	19.8	1.7		30.1	27.5	
10-20	1,827	45.1	34.7	19.2	1.0	0.0731	27.1	27.8	< 0.0001
>20	653	45.2	33.4	19.9	1.5		21.2	33.7	
Surgical margin									
Negative	7,253	43.8	36.3	18.4	1.5		30.1	26.1	
Positive	1,802	40.3	34.4	23.4	1.9	< 0.0001	27.0	32.7	< 0.0001

Nuclear accumulation: nuclear staining with or without cytoplasmic co-staining.

ovarian [8], oral cavity [9], urinary bladder [10], lung [11] and gastric cancer [12] also regularly found nuclear GSK3 localization to be decisive for prognosis.

To learn more about the molecular events associated to GSK3 β up-regulation in prostate cancer, we made use of the molecular database attached to our TMA. The *TMPSR2:ERG* gene fusion occurs in 40–60% of prostate cancers, and results in deregulation of more than 1,600 genes [23, 36, 37]. Activation of Wnt signaling belongs to the best-known consequences of *ERG* fusion [36, 38, 39]. Wnt signaling stabilizes the transcription co-factor β -catenin in the cytoplasm and triggers its translocation into the cell nucleus [40]. That GSK3 β controls Wnt signaling by inactivation of β -catenin both in the cytoplasm [41, 42] and in the nucleus [43] might, thus, explain the predominance of nuclear GSK3 β in ERG positive cancers in our study. This assumption is further supported by earlier work showing that GSK3 β is up-regulated and translocated to the nucleus in response to activation of Wnt

signaling [44, 45]. Other genes of interest with respect to GSK3 β include the *AR* and the *PTEN* tumor suppressor. The strong association between GSK3 β up-regulation and AR expression as well as *PTEN* loss in our study is in line with earlier work. For example, Mulholland *et al.* suggested a promiscuous growth signaling network governed by PTEN, AR, and GSK3 β , in which GSK3 β and *PTEN* loss cooperate for the progression to androgen-independent prostate cancer [19]. In this network, PTEN/GSK3 β signaling is believed to be at least partly functionally interchangeable with Wnt/ β -catenin signaling [19]. Moreover, GSK3 β has been shown to stabilize the AR protein and to enhance AR dependent transcription in some studies [46, 47], which fits well to the almost linear association between AR expression and both cytoplasmic and nuclear levels of GSK3 β in our study.

Besides deletions of PTEN, loss of certain small and large chromosomal regions is another hallmark of prostate cancer. Data from next generation sequencing studies

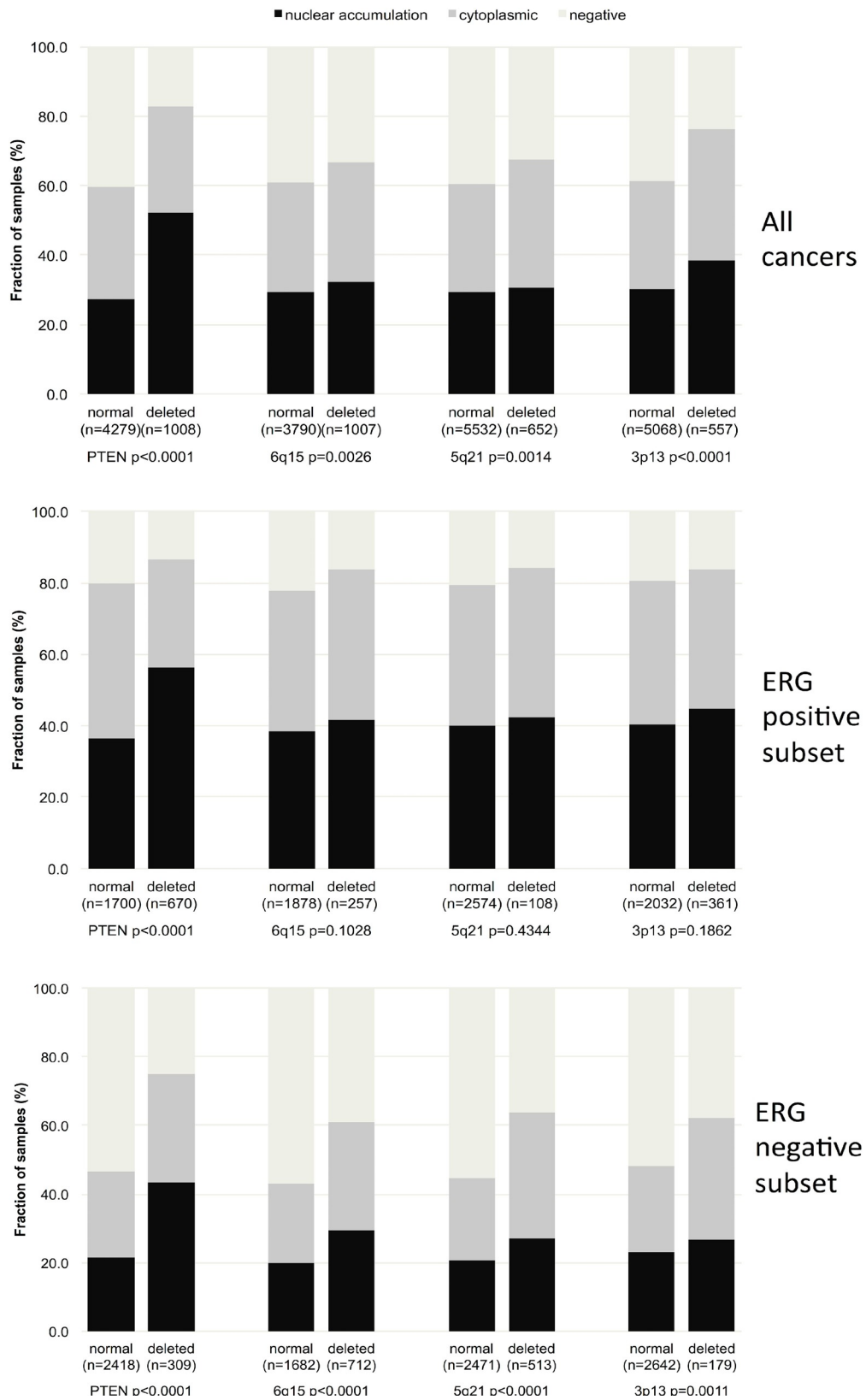


Figure 5: Association between GSK3β localization and 10q23 (*PTEN*), 5q21 (*CHD1*), 6q15 (*MAP3K7*), 3p13 (*FOXPI*) deletion in all cancers, the ERG positive and the ERG negative subset.

Table 2: Association between GSK3 β staining and Ki67 labeling index in all cancers and Gleason categories

Gleason	GSK3 β	N	Ki67-LI (Mean $\pm$ SEM)		P
All	Negative	2,416	2.0	0.05	<0.0001
	Cytoplasmic only	1,741	3.1	0.06	
	Nuclear accumulation	1,467	3.6	0.07	
$\leq 3+3$	Negative	678	1.8	0.08	<0.0001
	Cytoplasmic only	341	2.6	0.11	
	Nuclear accumulation	175	3.0	0.15	
3+4	Negative	1,297	2.0	0.06	<0.0001
	Cytoplasmic only	1,039	3.0	0.07	
	Nuclear accumulation	795	3.2	0.08	
3+4 Tertiary 5	Negative	94	2.3	0.24	<0.0001
	Cytoplasmic only	61	3.5	0.30	
	Nuclear accumulation	73	3.5	0.27	
4+3	Negative	169	2.1	0.23	<0.0001
	Cytoplasmic only	183	3.5	0.22	
	Nuclear accumulation	185	4.2	0.22	
4+3 Tertiary 5	Negative	91	2.2	0.39	<0.0001
	Cytoplasmic only	63	3.9	0.47	
	Nuclear accumulation	127	4.7	0.33	
$\geq 4+4$	Negative	86	3.5	0.52	0.0101
	Cytoplasmic only	53	4.8	0.67	
	Nuclear accumulation	109	5.5	0.47	

SEM, standard error of the mean.

demonstrate that such deletions are more prevalent than mutations of coding genes and many of these deletions have been linked to either ERG positive (i.e. PTEN and 3p13) or ERG negative cancers (i.e. 6q15 and 5q23) [48–52]. Finding a link between all of these deletions and GSK3 β up-regulation – exclusively in the subset of ERG negative cancers – suggests that GSK3 β might contribute to genomic instability at least in the absence of ERG. Several specific functions of GSK3 β and clinical observations are compatible with this assumption. GSK3 β is critically involved in microtubule remodeling [53], and it was shown to localize to the spindle pole in mitosis [54]. That many GSK3-inhibitors have been shown to cause chromosome misalignment and miss-segregation [55] strongly supports a functional link between disturbed GSK3 β homeostasis, failure of the spindle apparatus, and loss of genome integrity. We can only speculate why relevant associations between GSK3 β and genomic deletions were absented in ERG fusion positive cancers. However, it cannot be excluded that one or more target genes of ERG interfere with mechanisms linking GSK3 β to microtubule functionality. One example is the microtubule-associated protein Tau [56]. We have earlier shown that critical components of microtubules or their turnover, such as β III-tubulin [57] or Tau protein

(Schroeder *et al.*, submitted), are strongly up-regulated in ERG positive as compared to ERG negative cancers.

That GSK3 β analysis provided additional prognostic information beyond the established preoperative and postoperative prognostic parameters in prostate cancer makes it a promising candidate for potential routine diagnostic applications. Remarkably, the analysis of the prognostic role of nuclear GSK3 β up-regulation in subgroups of prostate cancers that were narrowly defined by identical classical and quantitative Gleason grades suggest a limitation of the prognostic value of GSK3 β measurement to cancers with Gleason grade 3+4 and 4+3. This limitation of the prognostic impact to these subgroups is not disappointing as these tumors are subject to the most difficult therapeutic decision making with options ranging from active surveillance to prostatectomy. The Gleason grading system is purely based on the simple distinction of architectural features, neglects any cytological criteria, but is statistically extremely powerful. The prognostic power of the Gleason grade is much higher than the histologic grading in various other cancer types, such as for example kidney cancer [58] or invasive bladder cancer [59]. This holds true if the Gleason grading method is limited to 5 prognostic subgroups [60]. Based on the analysis of a cohort of more than 10,000 prostate cancers available at

our institution, we had earlier shown that Gleason Grade information can be refined by using the percentage of Gleason 4 grades as a continuous variable. Both in biopsies and in prostatectomy samples, prostate cancer prognosis deteriorates gradually with increasing percentage of Gleason 4 pattern (quantitative Gleason Grade) [61]. That nuclear accumulation of GSK3 β is even prognostically relevant in some prostate cancer subgroups defined by a comparable Gleason 4 fraction provides further arguments for a possible clinical application of GSK3 β analysis for assessing prostate cancer aggressiveness.

The therapeutic potential of GSK3 β inhibition has become an important area of investigation. More than 50 compounds targeting GSK3 β have been described as to

yet [4]. Evidence for a possible therapeutic application of some of these drugs in cancer comes from *in-vitro* and *in-vivo* xenograft models. For example, GSK3 β inhibition reduces cell proliferation, increases apoptosis, and sensitizes to gemcitabine in pancreatic cancer cells [62], reduces viability of ovarian cancer cells [8], increases apoptosis in colon cancer cells [63], and reduces cell proliferation and survival in lung cancer cells [11]. Clinical phase I/II trials have been completed in patients with acute leukemia (NCT01214603) and advanced or metastatic solid cancers (NCT01287520) using the GSK3 β inhibitor LY2090314, and another phase II study on metastatic pancreatic cancer (NCT01632306) is currently recruiting participants. Should these studies provide evidence for a

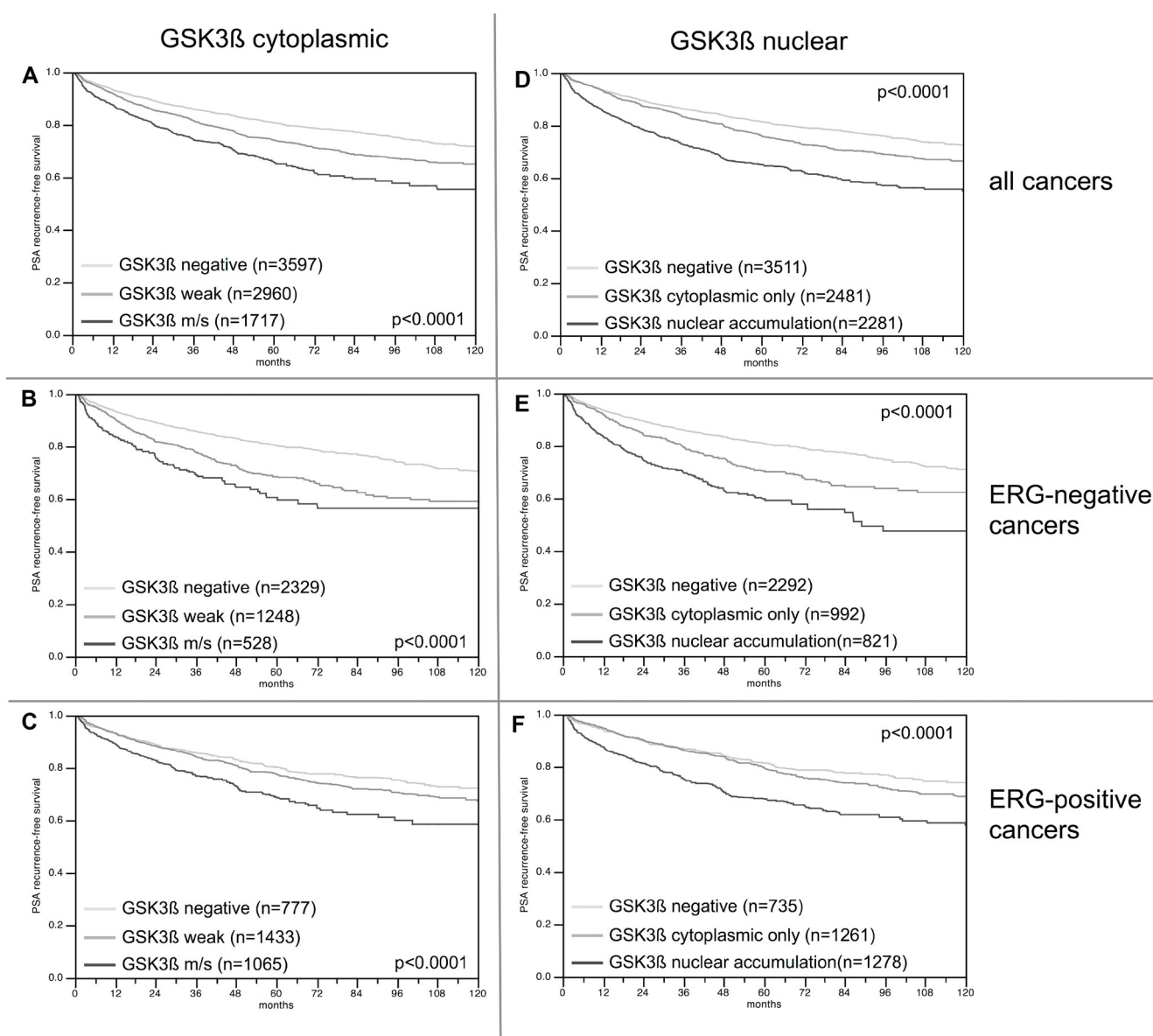


Figure 6: Kaplan–Meier analysis of PSA recurrence-free survival after radical prostatectomy and (A–C) cytoplasmic GSK3 β expression, and (D–F) nuclear GSK3 β accumulation in all cancers and the ERG negative and positive subset; m/s: moderate or strong cytoplasmic GSK3 β staining.

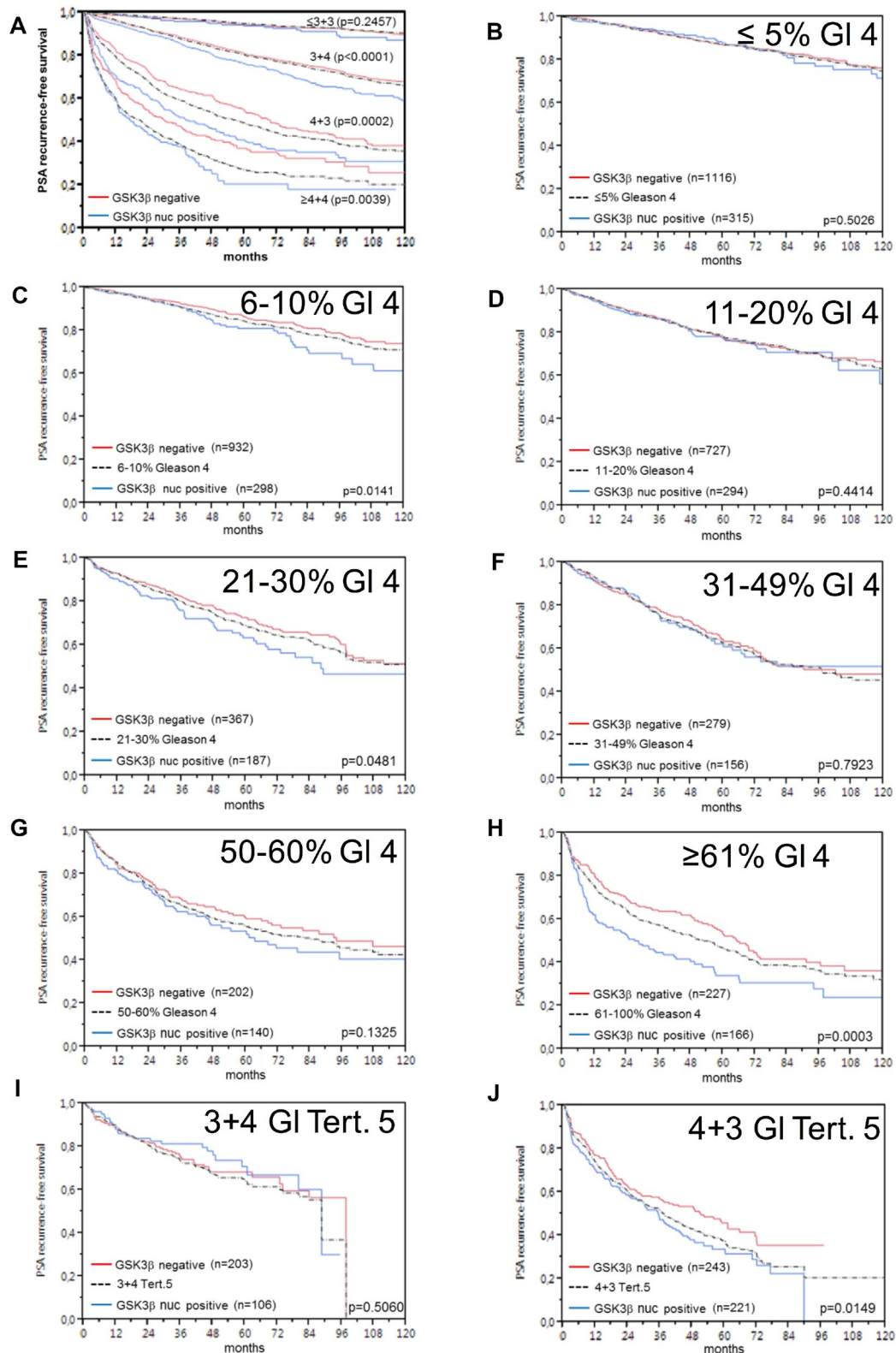


Figure 7: Prognostic impact of GSK3 β expression in subsets of cancers defined by the Gleason score. (A) Impact of negative (red line) and nuclear positive (blue line) GSK3 β expression as compared to the classical Gleason score categories (indicated by black dotted lines). (B–H) Impact of negative (red line) and nuclear positive (blue line) GSK3 β expression in the quantitative Gleason score categories (black dotted lines) defined by the percentage of (B) $\leq 5\%$, (C) 6–10%, (D) 11–20%, (E) 21–30%, (F) 31–49%, (G) 50–60%,

(H) $\geq 61\%$ Gleason 4 patterns. (I–J) Impact of Gleason score categories (I) 3+4 and (J) 4+3 with tertiary (tert.) Gleason 5 patterns.

Table 3: Multivariate analysis with established prognostic parameters and the GSK3 β localization in all cancers, the ERG negative and positive subset

Subset	Scenario	N	P							
			Preoperative PSA-Level	pT stage	cT stage	Gleason grade prostatectomy	Gleason grade biopsy	pN stage	R status	GSK3 β -localisation
All cancers	1	5,057	<0.0001	<0.0001	-	<0.0001	-	<0.0001	0.0026	<0.0001
	2	8,086	<0.0001	<0.0001	-	<0.0001	-	-	<0.0001	<0.0001
	3	7,987	<0.0001	-	<0.0001	<0.0001	-	-	-	<0.0001
	4	7,884	<0.0001	-	<0.0001	-	<0.0001	-	-	<0.0001
ERG-negative	1	2,575	0.0003	<0.0001	-	<0.0001	-	0.0131	0.1651	<0.0001
	2	4,020	<0.0001	<0.0001	-	<0.0001	-	-	0.0005	<0.0001
	3	3,988	<0.0001	-	<0.0001	<0.0001	-	-	-	<0.0001
	4	3,934	<0.0001	-	<0.0001	-	<0.0001	-	-	<0.0001
ERG-positive	1	2,037	0.0001	<0.0001	-	<0.0001	-	0.0164	0.0075	<0.0001
	2	3,199	<0.0001	<0.0001	-	<0.0001	-	-	<0.0001	0.0001
	3	3,138	<0.0001	-	<0.0001	<0.0001	-	-	-	0.0002
	4	3,099	<0.0001	-	<0.0001	-	<0.0001	-	-	<0.0001

Scenario 1 includes all postoperatively available parameters (pathological tumor (pT) stage, lymph node status (pN), surgical margin (R) status, preoperative PSA value and Gleason grade obtained after the morphological evaluation of the entire resected prostate. Scenario 2 excluded the nodal status from analysis. Scenario 3 included preoperative PSA, clinical tumor (cT) stage and Gleason grade obtained on the prostatectomy specimen. In scenario 4, the preoperative Gleason grade obtained on the original biopsy was combined with preoperative PSA, and cT stage.

clinical benefit of GSK3 β inhibition in cancer therapy, the results of our study would justify evaluating prostate cancer in future GSK3 β inhibition trials.

In summary, the results of our study identify nuclear GSK3 β accumulation as a moderate and independent prognosticator in prostate cancer. GSK3 β expression analysis has the potential for a clinical routine application – either alone, or more likely, in combination with other biomarkers.

MATERIALS AND METHODS

Patients

Radical prostatectomy specimens were used from 12,427 patients, who had surgery between 1992 and 2012 (Department of Urology and the Martini Clinic at the University Medical Center Hamburg-Eppendorf). Specimens were analyzed by a standard procedure with embedding of the entire prostate for histological analysis [25]. In addition to the classical Gleason categories, “quantitative” Gleason grading was performed as

described before [61]. Median follow-up was 48.9 months (range: 1 to 275 months; Table 4). PSA recurrence was defined as the time point when the postoperative PSA level was at least 0.2 ng/ml and increasing at subsequent measurements. Tissue microarrays (TMA) were produced as described earlier in detail [64]. Each TMA block contained various control tissues and normal prostate. The TMA was annotated with results on ERG expression, *ERG* break apart FISH analysis [65] and deletion status of 5q21 (*CHD1*) [48], 6q15 (*MAP3K7*) [48], *PTEN* (10q23) [49], 3p13 (*FOXP1*) [50], KI67 labeling Index (Ki67LI) [66] and androgen receptor (AR) expression [23]. The usage of archived diagnostic leftover tissues for TMAs and their analysis for research purposes has been approved by local laws (HmbKHG, §12a) and by the Ärztekammer Hamburg (WF-049/09). The work has been carried out in compliance with the Helsinki Declaration.

Immunohistochemistry (IHC)

Freshly cut TMA sections were immunostained on the same day and in one experiment. Slides were

Table 4: Composition of the prognosis tissue microarray containing 12 427 prostate cancer specimens

	No. of patients	
	Study cohort on tissue microarray	Biochemical relapse among categories
Follow-up		
<i>n</i>	11 665	2 769 (23.7%)
Mean/Median (month)	56.3/48.9	
Age (y)		
≤50	334	81 (24.3%)
51–59	3 061	705 (23%)
60–69	7 188	1 610 (22.4%)
≥70	1 761	370 (21%)
Pretreatment PSA (ng/ml)		
<4	1 585	242 (15.3%)
4–10	7 480	1 355 (18.1%)
10–20	2 412	737 (30.6%)
>20	812	397 (48.9%)
pT stage (AJCC 2002)		
pT2	8 187	1 095 (13.4%)
pT3a	2,660	817 (30.7%)
pT3b	1 465	796 (54.3%)
pT4	63	51 (81%)
Gleason grade		
≤3+3	2 848	234 (8.2%)
3+4	6 679	1 240 (18.6%)
3+4 Tertiary 5	433	115 (26.6%)
4+3	1 210	576 (47.6%)
4+3 Tertiary 5	646	317 (49.1%)
≥4+4	596	348 (58.4%)
pN stage		
pN0	6 970	1 636 (23.5%)
pN+	693	393 (56.7%)
Surgical margin		
Negative	9 990	1 848 (18.5%)
Positive	2 211	853 (38.6%)

In the column “Study cohort on tissue microarray” numbers do not always add up to 12 427 in different categories because of cases with missing data. Percent in column “Biochemical relapse among categories” refers to the fraction of samples with biochemical relapse within each parameter in the different categories. Abbreviation: AJCC, American Joint Committee on Cancer.

deparaffinized and exposed to antigen retrieval for 5 minutes at 121° C in pH 7.8 Tris-EDTA buffer. Primary antibody specific for total GSK3β (rabbit monoclonal antibody, Cell Signaling Technology, USA; cat#12456; dilution 1:900) was applied at 37° C for 60 minutes. Bound antibody was then visualized using the EnVision Kit (Dako, Glostrup, Denmark) according to the manufacturer’s directions. GSK3β staining of variable

intensity was seen in the cytoplasm, which was often accompanied by nuclear co-staining of similar intensity. Since GSK3β positive cancers typically showed staining of all (100%) tumor cells, we recorded the cytoplasmic staining intensity (0 (negative), 1+ (weak), 2+ (moderate), and 3+ (strong) as well as the presence or absence of nuclear co-staining for each tissue spot, but not the percentage of stained tumor cells.

Statistics

Statistical calculations were done with JMP® 10 (SAS Institute Inc., NC, USA). Contingency tables and chi²-test were performed to look for associations between molecular parameters and tumor phenotype. Kaplan–Meier survival curves were calculated and tested with the log-rank test for significant differences between groups. Cox proportional hazards regression analysis tested the statistical independence and significance between pathological, molecular and clinical variables in various clinical models.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Christina Koop, Janett Lütgens, Sünje Seekamp, and Inge Brandt for excellent technical assistance.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no financial conflicts of interest.

FUNDING

Not applicable.

REFERENCES

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018; 68:394–424.
2. Wilt TJ, Brawer MK, Jones KM, Barry MJ, Aronson WJ, Fox S, Gingrich JR, Wei JT, Gilhooly P, Grob BM, Nsouli I, Iyer P, Cartagena R, et al. Radical prostatectomy versus observation for localized prostate cancer. *N Engl J Med.* 2012; 367:203–13.
3. Thompson IM Jr, Tangen CM. Prostate cancer--uncertainty and a way forward. *N Engl J Med.* 2012; 367:270–1.
4. McCubrey JA, Steelman LS, Bertrand FE, Davis NM, Sokolosky M, Abrams SL, Montalto G, D'Assoro AB, Libra M, Nicoletti F, Maestro R, Basecke J, Rakus D, et al. GSK-3 as potential target for therapeutic intervention in cancer. *Oncotarget.* 2014; 5:2881–911. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2037>.
5. Bechard M, Trost R, Singh AM, Dalton S. Frat is a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-regulated determinant of glycogen synthase kinase 3beta subcellular localization in pluripotent cells. *Mol Cell Biol.* 2012; 32:288–96.
6. Quintayo MA, Munro AF, Thomas J, Kunkler IH, Jack W, Kerr GR, Dixon JM, Chetty U, Bartlett JM. GSK3beta and cyclin D1 expression predicts outcome in early breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2012; 136:161–8.
7. Mylona E, Vamvakaris I, Giannopoulou I, Theohari I, Papadimitriou C, Keramopoulos A, Nakopoulou L. An immunohistochemical evaluation of the proteins Wnt1 and glycogen synthase kinase (GSK)-3beta in invasive breast carcinomas. *Histopathology.* 2013; 62:899–907.
8. Fu Y, Wang X, Cheng X, Ye F, Xie X, Lu W. Clinicopathological and biological significance of aberrant activation of glycogen synthase kinase-3 in ovarian cancer. *Onco Targets Ther.* 2014; 7:1159–68.
9. Mishra R, Nagini S, Rana A. Expression and inactivation of glycogen synthase kinase 3 alpha/ beta and their association with the expression of cyclin D1 and p53 in oral squamous cell carcinoma progression. *Mol Cancer.* 2015; 14:20.
10. Naito S, Bilim V, Yuuki K, Ugolkov A, Motoyama T, Nagaoka A, Kato T, Tomita Y. Glycogen synthase kinase-3beta: a prognostic marker and a potential therapeutic target in human bladder cancer. *Clin Cancer Res.* 2010; 16:5124–32.
11. Zeng J, Liu D, Qiu Z, Huang Y, Chen B, Wang L, Xu H, Huang N, Liu L, Li W. GSK3beta overexpression indicates poor prognosis and its inhibition reduces cell proliferation and survival of non-small cell lung cancer cells. *PLoS One.* 2014; 9:e91231.
12. Zheng HC, Xu XY, Xia P, Yu M, Takahashi H, Takano

- Y. Involvement of inactive GSK3 β overexpression in tumorigenesis and progression of gastric carcinomas. *Hum Pathol.* 2010; 41:1255–64.
13. Ougolkov AV, Fernandez-Zapico ME, Bilim VN, Smyrk TC, Chari ST, Billadeau DD. Aberrant nuclear accumulation of glycogen synthase kinase-3 β in human pancreatic cancer: association with kinase activity and tumor dedifferentiation. *Clin Cancer Res.* 2006; 12:5074–81.
 14. Walz A, Ugolkov A, Chandra S, Kozikowski A, Carneiro BA, O'Halloran TV, Giles FJ, Billadeau DD, Mazar AP. Molecular Pathways: Revisiting Glycogen Synthase Kinase-3 β as a Target for the Treatment of Cancer. *Clin Cancer Res.* 2017; 23:1891–1897.
 15. Li R, Erdamar S, Dai H, Sayeeduddin M, Frolov A, Wheeler TM, Ayala GE. Cytoplasmic accumulation of glycogen synthase kinase-3 β is associated with aggressive clinicopathological features in human prostate cancer. *Anticancer Res.* 2009; 29:2077–81.
 16. Millet JP, Orcau A, Rius C, Casals M, de Olalla PG, Moreno A, Nelson JL, Cayla JA, Barcelona Tuberculosis Working Group. Predictors of death among patients who completed tuberculosis treatment: a population-based cohort study. *PLoS One.* 2011; 6:e25315.
 17. Schutz SV, Cronauer MV, Rinnab L. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 β promotes nuclear export of the androgen receptor through a CRM1-dependent mechanism in prostate cancer cell lines. *J Cell Biochem.* 2010; 109:1192–200.
 18. Liao X, Thrasher JB, Holzbeierlein J, Stanley S, Li B. Glycogen synthase kinase-3 β activity is required for androgen-stimulated gene expression in prostate cancer. *Endocrinology.* 2004; 145:2941–9.
 19. Mulholland DJ, Dedhar S, Wu H, Nelson CC. PTEN and GSK3 β : key regulators of progression to androgen-independent prostate cancer. *Oncogene.* 2006; 25:329–37.
 20. Campa VM, Baltziskueta E, Bengoa-Vergniory N, Gorrion- Etzebarria I, Wesolowski R, Waxman J, Kypta RM. A screen for transcription factor targets of glycogen synthase kinase-3 highlights an inverse correlation of NF κ B and androgen receptor signaling in prostate cancer. *Oncotarget.* 2014; 5:8173–87. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2303>.
 21. Wang L, Lin HK, Hu YC, Xie S, Yang L, Chang C. Suppression of androgen receptor-mediated transactivation and cell growth by the glycogen synthase kinase 3 β in prostate cells. *J Biol Chem.* 2004; 279:32444–52.
 22. Darrington RS, Campa VM, Walker MM, Bengoa- Vergniory N, Gorrion-Etzebarria I, Uysal-Onganer P, Kawano Y, Waxman J, Kypta RM. Distinct expression and activity of GSK-3 α and GSK-3 β in prostate cancer. *Int J Cancer.* 2012; 131:E872–83.
 23. Weischenfeldt J, Simon R, Feuerbach L, Schlangen K, Weichenhan D, Minner S, Wuttig D, Warnatz HJ, Stehr H, Rausch T, Jager N, Gu L, Bogatyrova O, et al. Integrative genomic analyses reveal an androgen-driven somatic alteration landscape in early-onset prostate cancer. *Cancer Cell.* 2013; 23:159–70.
 24. Epstein JI, Feng Z, Trock BJ, Pierorazio PM. Upgrading and downgrading of prostate cancer from biopsy to radical prostatectomy: incidence and predictive factors using the modified Gleason grading system and factoring in tertiary grades. *Eur Urol.* 2012; 61:1019–24.
 25. Schlomm T, Iwers L, Kirstein P, Jessen B, Kollermann J, Minner S, Passow-Drolet A, Mirlacher M, Milde-Langosch K, Graefen M, Haese A, Steuber T, Simon R, et al. Clinical significance of p53 alterations in surgically treated prostate cancers. *Mod Pathol.* 2008; 21:1371–9.
 26. Bertheau P, Cazals-Hatem D, Meignin V, de Roquancourt A, Verola O, Lesourd A, Sene C, Brocheriou C, Janin A. Variability of immunohistochemical reactivity on stored paraffin slides. *J Clin Pathol.* 1998; 51:370–4.
 27. Yaziji H, Barry T. Diagnostic immunohistochemistry: what can go wrong? *Adv Anat Pathol.* 2006; 13:238–46.
 28. Kim SW, Roh J, Park CS. Immunohistochemistry for pathologists: Protocols, pitfalls, and tips. *J Pathol Transl Med.* 2016; 50:411–8.
 29. Diehl JA, Cheng M, Roussel MF, Sherr CJ. Glycogen synthase kinase-3 β regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev.* 1998; 12:3499–511.
 30. Ginger RS, Dalton EC, Ryves WJ, Fukuzawa M, Williams JG, Harwood AJ. Glycogen synthase kinase-3 enhances nuclear export of a Dictyostelium STAT protein. *EMBO J.* 2000; 19:5483–91.
 31. Morisco C, Seta K, Hardt SE, Lee Y, Vatner SF, Sadoshima J. Glycogen synthase kinase 3 β regulates GATA4 in cardiac myocytes. *J Biol Chem.* 2001; 276:28586–97.

32. Gregory MA, Qi Y, Hann SR. Phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 controls c-myc proteolysis and subnuclear localization. *J Biol Chem.* 2003; 278:51606–12.
33. Salazar M, Rojo AI, Velasco D, de Sagarra RM, Cuadrado A. Glycogen synthase kinase-3 β inhibits the xenobiotic and antioxidant cell response by direct phosphorylation and nuclear exclusion of the transcription factor Nrf2. *J Biol Chem.* 2006; 281:14841–51.
34. Yook JI, Li XY, Ota I, Fearon ER, Weiss SJ. Wnt-dependent regulation of the E-cadherin repressor snail. *J Biol Chem.* 2005; 280:11740–8.
35. Watcharasit P, Bijur GN, Zmijewski JW, Song L, Zmijewska A, Chen X, Johnson GV, Jope RS. Direct, activating interaction between glycogen synthase kinase-3 β and p53 after DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99:7951–5.
36. Brase JC, Johannes M, Mannsperger H, Falth M, Metzger J, Kacprzyk LA, Andrasiuk T, Gade S, Meister M, Sirma H, Sauter G, Simon R, Schlomm T, et al. TMPRSS2-ERG -specific transcriptional modulation is associated with prostate cancer biomarkers and TGF- β signaling. *BMC Cancer.* 2011; 11:507.
37. Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, Dhanasekaran SM, Mehra R, Sun XW, Varambally S, Cao X, Tchinda J, Kuefer R, Lee C, Montie JE, Shah RB, et al. Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science.* 2005; 310:644–8.
38. Wu L, Zhao JC, Kim J, Jin HJ, Wang CY, Yu J. ERG is a critical regulator of Wnt/LEF1 signaling in prostate cancer. *Cancer Res.* 2013; 73:6068–79.
39. Li Y, Kong D, Wang Z, Ahmad A, Bao B, Padhye S, Sarkar FH. Inactivation of AR/TMPRSS2-ERG/Wnt signaling networks attenuates the aggressive behavior of prostate cancer cells. *Cancer Prev Res (Phila).* 2011; 4:1495–506.
40. Shang S, Hua F, Hu ZW. The regulation of β -catenin activity and function in cancer: therapeutic opportunities. *Oncotarget.* 2017; 8:33972–89. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15687>.
41. Giles RH, van Es JH, Clevers H. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2003; 1653:1–24.
42. Kikuchi A, Kishida S, Yamamoto H. Regulation of Wnt signaling by protein-protein interaction and post-translational modifications. *Exp Mol Med.* 2006; 38:1–10.
43. Caspi M, Zilberberg A, Eldar-Finkelman H, Rosin- Arbesfeld R. Nuclear GSK-3 β inhibits the canonical Wnt signalling pathway in a β -catenin phosphorylation- independent manner. *Oncogene.* 2008; 27:3546–55.
44. Shin SH, Lee EJ, Chun J, Hyun S, Kim YI, Kang SS. The nuclear localization of glycogen synthase kinase 3 β is required its putative PY-nuclear localization sequences. *Mol Cells.* 2012; 34:375–82.
45. Patel S, Doble B, Woodgett JR. Glycogen synthase kinase-3 in insulin and Wnt signalling: a double-edged sword? *Biochem Soc Trans.* 2004; 32:803–8.
46. Mazor M, Kawano Y, Zhu H, Waxman J, Kypta RM. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 represses androgen receptor activity and prostate cancer cell growth. *Oncogene.* 2004; 23:7882–92.
47. Rinnab L, Schutz SV, Diesch J, Schmid E, Kufer R, Hautmann RE, Spindler KD, Cronauer MV. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 in androgen-responsive prostate cancer cell lines: are GSK inhibitors therapeutically useful? *Neoplasia.* 2008; 10:624–34.
48. Burkhardt L, Fuchs S, Krohn A, Masser S, Mader M, Kluth M, Bachmann F, Huland H, Steuber T, Graefen M, Schlomm T, Minner S, Sauter G, et al. CHD1 is a 5q21 tumor suppressor required for ERG rearrangement in prostate cancer. *Cancer Res.* 2013; 73:2795–805.
49. Krohn A, Diedler T, Burkhardt L, Mayer PS, De Silva C, Meyer-Kornblum M, Kotschau D, Tennstedt P, Huang J, Gerhauser C, Mader M, Kurtz S, Sirma H, et al. Genomic deletion of PTEN is associated with tumor progression and early PSA recurrence in ERG fusion-positive and fusion- negative prostate cancer. *Am J Pathol.* 2012; 181:401–12.
50. Krohn A, Seidel A, Burkhardt L, Bachmann F, Mader M, Grupp K, Eichenauer T, Becker A, Adam M, Graefen M, Huland H, Kurtz S, Steurer S, et al. Recurrent deletion of 3p13 targets multiple tumour suppressor genes and defines a distinct subgroup of aggressive ERG fusion-positive prostate cancers. *J Pathol.* 2013; 231:130–41.
51. Taylor BS, Schultz N, Hieronymus H, Gopalan A, Xiao Y, Carver BS, Arora VK, Kaushik P, Cerami E, Reva B, Antipin Y, Mitsiades N, Landers T, et al. Integrative genomic profiling of human prostate cancer. *Cancer Cell.* 2010;

18:11–22.

52. Lapointe J, Li C, Giacomini CP, Salari K, Huang S, Wang P, Ferrari M, Hernandez-Boussard T, Brooks JD, Pollack JR. Genomic profiling reveals alternative genetic pathways of prostate tumorigenesis. *Cancer Res.* 2007; 67:8504–10.
53. Xu W, Ge Y, Liu Z, Gong R. Glycogen synthase kinase 3 β orchestrates microtubule remodeling in compensatory glomerular adaptation to podocyte depletion. *J Biol Chem.* 2015; 290:1348–63.
54. Wakefield JG, Stephens DJ, Tavaré JM. A role for glycogen synthase kinase-3 in mitotic spindle dynamics and chromosome alignment. *J Cell Sci.* 2003; 116:637–46.
55. Tighe A, Ray-Sinha A, Staples OD, Taylor SS. GSK-3 inhibitors induce chromosome instability. *BMC Cell Biol.* 2007; 8:34.
56. Hooper C, Killick R, Lovestone S. The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 2008; 104:1433–9.
57. Grupp K, Wilking J, Prien K, Hube-Magg C, Sirma H, Simon R, Steurer S, Budaus L, Haese A, Izbicki J, Sauter G, Minner S, Schlomm T, et al. High RNA-binding motif protein 3 expression is an independent prognostic marker in operated prostate cancer and tightly linked to ERG activation and PTEN deletions. *Eur J Cancer.* 2014; 50:852–61.
58. Ficarra V, Martignoni G, Maffei N, Brunelli M, Novara G, Zanolla L, Pea M, Artibani W. Original and reviewed nuclear grading according to the Fuhrman system: a multivariate analysis of 388 patients with conventional renal cell carcinoma. *Cancer.* 2005; 103:68–75.
59. Grignon DJ. The current classification of urothelial neoplasms. *Mod Pathol.* 2009; 22:S60–9.
60. Pierorazio PM, Walsh PC, Partin AW, Epstein JI. Prognostic Gleason grade grouping: data based on the modified Gleason scoring system. *BJU Int.* 2013; 111:753–60.
61. Sauter G, Steurer S, Clauditz TS, Krech T, Wittmer C, Lutz F, Lennartz M, Janssen T, Hakimi N, Simon R, von Petersdorff-Campen M, Jacobsen F, von Loga K, et al. Clinical utility of quantitative gleason grading in prostate biopsies and prostatectomy specimens. *Eur Urol.* 2016; 69:592–8.
62. Zhang Q, Bhojani MS, Ben-Josef E, Spalding AC, Kuick R, Sun Y, Morgan MA. Glycogen Synthase Kinase 3 β in pancreatic cancer and its implications in chemotherapy and radiation therapy. *J Carcinog Mutagen.* 2013; 4:147.
63. Li H, Huang K, Liu X, Liu J, Lu X, Tao K, Wang G, Wang J. Lithium chloride suppresses colorectal cancer cell survival and proliferation through ROS/GSK-3 β / NF- κ B signaling pathway. *Oxid Med Cell Longev.* 2014; 2014:241864.
64. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med.* 1998; 4:844–7.
65. Minner S, Enodien M, Sirma H, Luebke AM, Krohn A, Mayer PS, Simon R, Tennstedt P, Müller J, Scholz L, Brase JC, Liu AY, Schluter H, et al. ERG status is unrelated to psa recurrence in radically operated prostate cancer in the absence of antihormonal therapy. *Clin Cancer Res.* 2011; 17:5878–88.
66. Minner S, Jessen B, Stiedenroth L, Burandt E, Kollermann J, Mirlacher M, Erbersdobler A, Eichelberg C, Fisch M, Brummendorf TH, Bokemeyer C, Simon R, Steuber T, et al. Low level HER2 overexpression is associated with rapid tumor cell proliferation and poor prognosis in prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2010; 16:1553–60.

2. Darstellung der Publikation

2.1 Einleitung

Das Prostatakarzinom ist mit circa 26% die häufigste maligne Tumorerkrankung des Mannes in Deutschland. Pro Jahr werden bundesweit etwa 63.400 Neuerkrankungen diagnostiziert. Zusätzlich dazu steht das Prostatakarzinom mit etwa 11 Prozent nach Lungen- und Darmkrebs an dritter Stelle der insgesamt tödlich verlaufenden Tumorerkrankung (1). In Deutschland sterben pro Jahr etwa 12.000 Patienten an den Folgen eines Prostatakarzinoms (1). Das mittlere Diagnosealter liegt bei circa 69 Jahren (2). Demographischen Schätzungen nach, wird sich der Anteil der über 60-jährigen Männer in der Bevölkerung bis zum Jahr 2050 voraussichtlich auf circa 28 Millionen (37 %) verdoppeln (1; 3). Dementsprechend ist mit einer Verdopplung der Prävalenz des Prostatakarzinoms zu rechnen. Die demographische Entwicklung ist einer der Gründe warum eine Verbesserung der Diagnostik und Therapie des Prostatakarzinoms zwingend notwendig ist. Die Ursachen eines Prostatakarzinoms sind weitgehend unbekannt. Neben dem Alter, als wichtigster Risikofaktor, werden weitere Faktoren wie zum Beispiel die familiäre Veranlagung, die Androgenexpression, Umwelteinflüsse, Ernährung und Lebensbedingungen diskutiert (2). Die diagnostischen Methoden zur Früherkennung von Prostatakarzinomen beinhalten die Bestimmung des Prostata-spezifischen Antigens (PSA) im Serum und eine digitale rektale Untersuchung (DRU). Bei einem auffälligen Tastbefund und/oder PSA-Werten $\geq 4\text{ng/ml}$ wird zur Überprüfung des Karzinomverdachtes eine Stanzbiopsie durchgeführt (2). Dieses Screening hat dazu geführt, dass heute vermehrt Tumoren in sehr frühen Stadien entdeckt werden, in denen eine kurative Behandlung möglich ist. Allerdings werden durch das Screening auch zahlreiche Karzinome entdeckt, die keiner Behandlung bedürfen, da sie zu Lebzeiten vermutlich keinerlei Symptomatik entwickeln würden (2). Grund dafür ist, dass die Mehrheit der Prostatakarzinome sehr langsam wachsen und daher ein asymptomatisches Verhalten aufweisen. Ein kleiner Anteil der Karzinome ist jedoch sehr aggressiv und erfordert eine umfangreiche in der Regel invasive Behandlung. Für Tumoren, deren Wachstum auf die Prostata beschränkt ist, stehen als Therapieoptionen die aktive Überwachung („Active Surveillance“) bis zur Progression des Tumors, die Bestrahlung oder die Ektomie zur Verfügung. Um die optimale Therapie für den Patienten zu finden werden heute die etablierten präoperativen prognostischen Parameter, wie der Gleason Grad in der Biopsie, der Tumorgehalt in den Biopsien, der PSA-Wert und das klinische Stadium herangezogen (2). Anhand dieser Parameter können die deutlich hoch aggressiven (Gleason $\geq 4+4$) von den deutlich „gutartigen“ Karzinomen ($\leq 3+3$) unterschieden werden. Es verbleibt allerdings eine große Gruppe von Tumoren (Gleason 3+4 und 4+3), deren Aggressivität nicht sicher eingeschätzt werden kann. Darum entscheiden sich die Patienten häufig für eine invasive Therapie und damit häufig für eine Übertherapie des Karzinoms, obwohl die Wahrscheinlichkeit eines tatsächlich lebensbedrohlichen Karzinoms eher gering ist.

Ein weiteres Problem stellen die bei Diagnose bereits fortgeschrittenen Karzinome dar. Hier bleibt als Therapieoption nur die Prostatektomie oder Bestrahlung plus Hormontherapie (2). Wünschenswert wären zielgerichtete Therapien, wie sie bei anderen Tumorentitäten bereits möglich sind. Ein klassisches Beispiel ist hier die Anti-Gen-Therapie des HER2 Thyrosinrezeptors an der Zellmembran von HER2-positiven Mammakarzinomen (4). Diese

Karzinome zählten früher zu den aggressivsten Formen der Mammakarzinome mit einer sehr schlechten Prognose. Heute sind diese Karzinome jedoch auf Grund der Anti-HER2-Therapie sehr gut therapierbar (4). Es besteht die begründete Hoffnung, dass ein besseres Verständnis der Biologie von Prostatakarzinomen schließlich zur Bestimmung klinisch-relevanter molekularer Marker führt, die gemeinsam mit den etablierten Prognoseparametern eine zuverlässigere Vorhersage der Aggressivität der Prostatakarzinome ermöglichen und / oder als Therapieziele für eine gezielte Therapie geeignet sind.

Glykogensynthase-Kinase 3 beta (GSK3 β) ist eine ubiquitär vorkommende, multifunktionale Serin/Threonin-Protein-Kinase. Sie wurde ursprünglich nach ihrer zentralen Rolle als Enzym in der Glykogenbiosynthese benannt. Mittlerweile ist bekannt, dass GSK3 β ebenso eine wichtige Schlüsselrolle in der Regulation und Beeinflussung anderer zellulärer Prozesse spielt, wie beispielsweise der Proliferation, dem Zelltod und der Zellmotilität (5). GSK3 β pendelt zwischen dem Zytoplasma und dem Zellkern und übernimmt in den beiden Kompartimenten vermutlich unterschiedliche Funktionen (6). Die Deregulierung von GSK3 β wird mit der Entstehung vieler Erkrankungen in Verbindung gebracht, wie beispielsweise von Diabetes mellitus, Gefäßerkrankungen, Alzheimer, Parkinson, sowie Karzinomen (5). Eine Überexpression von GSK3 β konnte assoziiert werden mit adversen Tumoreigenschaften und einer ungünstigen Prognose bei Karzinomen der Brust (7;8), der Ovarien (9), der Mundhöhle (10), der Harnblase (11), der Lunge (12), des Magens (13) und der Pankreas (14). Auf der Grundlage dieser Erkenntnisse, hat die Bedeutung von GSK3 β als möglicher Therapieansatz an Relevanz gewonnen. Bis jetzt wurden mehr als 50 GSK3 β -Inhibitoren beschrieben und die klinische Phase der Medikamentenentwicklung wurde für einige von ihnen beim Pankreaskarzinom (NCT01632306) und Leukämien (NCT01214603) initiiert. Es gibt außerdem erste Hinweise, dass GSK3 β auch beim Prostatakarzinom klinisch relevant sein könnte (15;16). Hier scheint GSK3 β an der Regulation der Androgenrezeptorstabilität und -lokalisation sowie der Androgen-stimulierten Genexpression beteiligt zu sein (17-23). In zwei Studien, in denen 79 und 499 Prostatakarzinome untersucht wurden, konnte eine Assoziation zwischen der GSK3 β Überexpression und einem hohen Gleason Score (23) sowie einer schlechten Prognose für den Patienten nachgewiesen werden (16).

Ziel der vorliegenden Studie war es daher, die klinische Relevanz der GSK3 β -Expression beim Prostatakarzinom zu klären. Dazu wurde in einer immunhistochemischen Analyse der zytoplasmatische und nukleäre GSK3 β -Expressionsstatus an mehr als 12.000 Prostatakarzinomen im Gewebemikroarray-Format (tissue microarray, TMA) bestimmt.

2.2 Material und Methoden

Patientenkollektiv

Für unsere Studie untersuchten wir Prostatakarzinomproben von 12.427 Patienten, welche sich im Zeitraum zwischen 1992 und 2012 am Institut für Urologie und in der Martiniklinik am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf einer radikalen Prostatektomie unterzogen haben.

Klinische Verlaufsdaten waren für 12.344 Patienten vorhanden. Ein PSA-Rezidiv war definiert als der Zeitpunkt zu dem ein kontinuierlicher Anstieg des PSA-Wertes auf $\geq 0,2$ ng/ml in wiederholten Messungen nachweisbar war. Neben dem pathologischen Tumorstadium, dem klassischen Gleason Score, dem Lymphknotenstadium und Stadium des Resektionsrandes stand außerdem die "quantitative" Gleason-Einstufung zur Verfügung.

Alle Proben lagen in Form eines Gewebemikroarray (tissue microarray, TMA) für die Untersuchung vor. Für die Herstellung der TMAs wurde pro Patienten ein Tumorgewebeblock ausgewählt und eine 0,6 mm durchmessende Stanze entnommen. Die Gewebsstanzen wurden auf 27 TMA-Blöcke verteilt. Sodass jeder TMA-Block 144 bis 522 Tumorgewebestanzen enthielt. In der zum TMA zugehörigen molekularen Datenbank waren Ergebnisse zum Status der ERG-Expression (24; 25), der ERG-Translokation (24; 25), der Deletionen von 5q21 (26), 6q15 (27), PTEN (28) und 3p13 (29) sowie der K167LI (30) und der Status der Expression des Androgenrezeptors (AR) (25) aus früheren Studien vorhanden.

Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ist eine molekularbiologische Methode die es ermöglicht ein Protein mit Hilfe eines Antikörpers spezifisch direkt im Gewebe nachzuweisen (31). Für die GSK3 β -Analyse wurde ein monoklonaler Antikörper (rabbit monoclonal antibody, Cell Signaling Technology) in einer 1:900 Verdünnung verwendet. Die frisch angefertigten TMA-Schnitte wurden an einem Tag in einer Analyse immunhistochemisch gefärbt. Eine GSK3 β Färbung war typischerweise im Zytoplasma aller Tumorzellen eines Gewebesots sichtbar und wurde teilweise von einer nukleären Färbung begleitet. Da in der Regel 100 % der Tumorzellen eine GSK3 β -Färbung zeigten, wurde die zytoplasmatische Färbung ausschließlich nach ihrer Intensität in negativ (keine Färbung), schwach, moderat und stark beurteilt. Zusätzlich wurde das Vorhandensein bzw. das Fehlen einer begleitenden nukleären Färbung für jeden Gewebespot bestimmt. Für die Analysen wurde 1. nur die zytoplasmatische GSK3 β -Färbung ohne Berücksichtigung der nukleären Färbung verwendet und 2. Eine Unterscheidung in zytoplasmatische Färbung ohne begleitende nukleäre Färbung (nur zytoplasmatisch) und eine zytoplasmatische Färbung mit begleitender nukleärer Färbung (nukleäre Akkumulation) durchgeführt.

2.3 Ergebnisse

Insgesamt waren in unserer TMA-Analyse 9.164 (74.0%) der 12.427 Tumorproben mittels IHC analysierbar. Im normalen Prostatagewebe konnte keine GSK3 β Färbung nachgewiesen werden. In den Prostatakarzinomen zeigte sich eine GSK3 β -Färbung im Zytoplasma und / oder Nukleus. Von den 9.164 auswertbaren Tumoren waren 3.846 (42%) GSK3 β negativ, 2.758 (30%) nur im Zytoplasma positiv (zytoplasmatische Färbung) und 2.560 (28%) sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus positiv (nukleäre Akkumulation). Eine detaillierte Beschreibung aller Studienergebnisse ist in der beigefügten Originalpublikation zu finden.

Die wesentlichen Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung sind:

1. Die GSK3 β -Expression ist mit allen untersuchten Deletionen (3p13, 10q23, 6q und 5q) assoziiert (jeweils $p \leq 0,002$). Dies deutet auf eine generelle Rolle von GSK3 β bei der Entstehung einer genomischer Instabilität hin.
2. Die GSK3 β -Färbung war zweifach höher in den ERG-positiven als in den ERG-negativen Tumoren ($p < 0,0001$).
3. Die GSK3 β -Färbung nahm mit zunehmender Expression des Androgenrezeptors (AR) zu (von 20% in den AR-negativen bis 80% in den stark AR-positiven Tumoren, $p < 0,0001$).
4. Der Eintritt von GSK3 β in den Zellkern ist mit einem aggressiven Tumorphentyp assoziiert. Die nukleäre GSK3 β -Akkumulation ist mit einem fortgeschrittenem Tumorstadium (pT2: 23%, pT4: 40%), einem hohen Gleason Score ($\leq 3+3$: 14%, $\geq 4+4$: 44%), dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen (N0: 30%, N+: 43%) und einer schlechten Prognose ($\approx 15\%$ der GSK3 β -negativen und $\approx 40\%$ der GSK3 β positiven erlitten 5 Jahre postoperativ ein PSA-Rezidiv) assoziiert.
5. Die prognostische Aussagekraft der nukleären GSK3 β -Akkumulation ist unabhängig von den prä- und postoperativen etablierten Prognosemarkern, wie dem Gleason Score in der Biopsie und der Ektomie und dem klinischen bzw. pathologischen Tumorstadium ($p \leq 0,0002$).

2.4 Diskussion

Die Resultate unserer Studie demonstrieren, dass die nukleäre GSK3 β Akkumulation ein starker und unabhängiger Prädiktor einer schlechten Prognose des Prostatakarzinoms ist.

Eine zytoplasmatische GSK3 β Färbung – mit und ohne nukleärer Färbung – wurde in 57% der 9.164 interpretierbaren Prostatakarzinome nachgewiesen, während das normale Prostatagewebe unter den gewählten experimentellen Bedingungen negativ war. Unsere Ergebnisse stehen in Einklang mit zwei früheren Studien. Li et al. beschrieben eine höhere zytoplasmatische GSK3 β Expression in 499 Karzinomen im Vergleich zu 491 normalen Prostataproben unter Benutzung eines eigens angepassten IHC Scores (16). Darrington et al. konnten eine zytoplasmatische und nukleäre GSK3 β Expression in 30% von 79 untersuchten Karzinomen finden, aber keine GSK3 β Färbung im normalen Prostataepithel nachweisen

(33). Die etwas niedrigere Rate der GSK3 β Positivität in der letzteren Studie im Vergleich zu unserer Arbeit hat vermutlich vor allem technische Gründe, wie die Verwendung verschiedener Antikörper (unsere Studie: Cell Signaling Technology #12456 1:900; Darrington et al.: New England Biolabs #27C10 1:20) und unterschiedlicher IHC Färbungskonditionen (34).

Die wichtigste Erkenntnis unserer Studie war, dass es einen starken Zusammenhang zwischen aggressiven Prostatakarzinomen und dem Shift zwischen der zytoplasmatischen und nukleären GSK3 β -Lokalisation gibt. Insbesondere die nukleäre GSK3 β Akkumulation war assoziiert mit adversen Tumormerkmalen, wie einem fortgeschrittenen pathologischen Tumorstadium, einem hohen Gleason Grad, Lymphknotenmetastasen, gesteigerter Tumorphilisation und einem PSA-Rezidiv. Da die nukleäre GSK3 β Akkumulation im Allgemeinen mit höheren GSK3 β Konzentrationen im Zytoplasma einherging, war es nicht überraschend, die gleiche Assoziation (wenn auch schwächer) für die zytoplasmatische Färbung zu finden. Die Resultate stehen im Einklang mit vorherigen Arbeiten, die über eine Assoziationen zwischen der zytoplasmatischen Überexpressionen und einem hohen Gleason Grad (33; 16), fortgeschrittenem klinischen Stadium, Lymphknotenmetastasen, extrakapsulärer Extension und einem erhöhten Risiko eines biochemischen Rezidivs berichteten (16). Der besonders starke prognostische Einfluss der Zellkernfärbung legt nahe, dass tumorrelevante GSK3 β Funktionen existieren, die spezifisch mit seiner nukleären Lokalisation verbunden sind. Dies wird durch frühere Studien unterstützt, welche die GSK3 β Funktion im Zellkern untersuchten. Mehrere Studien zeigten, dass GSK3 β Komplexe mit verschiedenen Karzinom-relevanten Proteinen, wie Cyclin D1 (35), STAT (36), GATA-4 (37), c-myc (38), NRF2 (39), Schnecke (40) und p53 (41) im Zellkern bildet. Schutz et al. zeigten außerdem, dass eine GSK3 β -Inhibierung einen nukleären AR-Export induziert und dass die Anwesenheit von GSK3 β im Zellkern zu einer Androgen-unabhängigen Erhöhung der nukleären AR-Konzentration und damit zum Wachstum von Prostatakarzinomzellen führt (18). Dementsprechend ist es wahrscheinlich, dass die nukleäre GSK3 β -Akkumulation eine generelle Rolle bei der Aggressivität von Tumoren hat. So geht zum Beispiel der Shift vom Zytoplasma in den Zellkern ebenfalls mit der Progression von Pankreaskarzinomen einher (14). Studien, die eine Beziehung zwischen der GSK3 β Überexpression und einem ungünstigen klinischen Verlauf bei Karzinomen der Brust (7;8), der Ovarien (9), der Mundhöhle (10), des Urothels (11), der Lunge (12) und des Magens (13) beschreiben, fanden außerdem heraus, dass die nukleäre GSK3 β Lokalisation entscheidend für die Prognose war.

Um ein besseres Verständnis über die mit einer GSK3 β Hochregulierung assoziierten molekularen Mechanismen zu erlangen, machten wir uns die unserem TMA zugehörige molekulare Datenbank zu nutze. Die TMPRSS2:ERG Fusion kommt in 40%-60% aller Prostatakarzinome vor (24;25) und führt in den betroffenen Zellen zu einer Deregulierung von über 1.600 Genen (24;25;42). Die Aktivierung des Wnt-Signals gehört zu den bekanntesten Folgen der ERG-Fusion (42,43,44). Der Wnt-Signalweg stabilisiert beispielsweise den Transkriptions-Co-Faktor β -Catenin im Zytoplasma und löst dessen Translokation in den Zellkern aus (45). Das GSK3 β die Wnt-Signaltransduktion kontrolliert, indem es β -Catenin sowohl im Zytoplasma (46, 47) als auch im Nukleus (48) inaktiviert, könnte somit die gesteigerte Häufigkeit der nukleären GSK3 β Akkumulation in den ERG-positiven Karzinomen in unserer Studie erklären. Diese Annahme ist außerdem vereinbar mit bisherigen Arbeiten, die aufzeigen konnten, dass GSK3 β als Reaktion auf eine Wnt-

Aktivierung in den Zellkern transloziert (49, 50). Andere Gene, die in Bezug auf GSK3 β von Interesse sind, umfassen den AR und den PTEN-Tumorsuppressor. Die starke Assoziation zwischen der GSK3 β -Hochregulierung und der AR-Expression sowie dem PTEN-Verlust in unserer Studie steht im Einklang mit früheren Arbeiten. So konnten Mulholland et al. beispielsweise nachweisen, dass ein Signalnetzwerk aus PTEN, AR und GSK3 β existiert, in dem ein gemeinsamer GSK3 β - und PTEN-Verlust zur Entstehung von androgenunabhängigen Prostatakarzinomen führt (20). Die Autoren vermuten außerdem, dass der PTEN / GSK3 β Signalweg zumindest teilweise funktionell gegen den Wnt / β -Catenin Signalweg ausgetauscht werden kann (20). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass GSK3 β das AR-Protein stabilisiert und die AR-abhängige Transkription verstärkt (51, 52). Dies ist gut mit unserer Studie vereinbar, da wir einen Zusammenhang zwischen der AR-Expression und der zytoplasmatischen als auch nukleären GSK3 β -Färbung zeigen konnten.

Neben der PTEN Deletion sind zahlreiche Verluste von bestimmten kleinen und größeren chromosomalen Regionen ein weiteres Charakteristikum von Prostatakarzinomen. Daten von "Next Generation Sequencing"-Studien zeigten, dass solche Deletionen häufiger vorkommen als Mutationen von codierenden Genen und dass viele dieser Deletionen entweder mit ERG positiven (z.B. PTEN und 3p13) oder ERG negativen Karzinomen (z.B. 6q15 und 5q21) assoziiert sind (26-29,53,54). Die Entdeckung, dass eine starke Assoziation zwischen all diesen Deletionen und der GSK3 β Hochregulierung zumindest in der Gruppe der ERG negativen Tumoren besteht, suggeriert eine Beziehung zwischen der GSK3 β Expression und der Entwicklung einer genomischen Instabilität zumindest in der Untergruppe von ERG negativen Tumoren. Einige spezifische GSK3 β Funktionen und klinische Untersuchungen sind mit dieser Annahme vereinbar. Beispielsweise ist GSK3 β maßgeblich an der Remodellierung der Mikrotubuli beteiligt (55) und während der Mitose ist GSK3 β am Spindelpol lokalisiert (56). Eine weitere Studie zeigte, dass viele GSK3 β -Inhibitoren Chromosomenfehlstellungen und Fehlsegregationen verursachen (57). Diese Studie unterstützt damit eine funktionelle Verbindung zwischen einer gestörten GSK3 β -Homöostase, und dem Versagen des Spindelapparates sowie dem Verlust der Genomintegrität. Wir können nur spekulieren, warum kein relevanter Zusammenhang zwischen der GSK3 β -Expression und den genomischen Deletionen bei ERG-Fusions-positiven Tumoren vorhanden war. Es kann zum Beispiel nicht ausgeschlossen werden, dass ein oder mehrere Zielgene von ERG an den gleichen Mechanismen zur Mikrotubuli-Funktion beteiligt sind wie GSK3 β . Ein Beispiel wäre hier das Mikrotubuli-assoziierte Protein Tau (58). In vorherigen Studien zeigten wir, dass wichtige Komponenten der Mikrotubuli, wie β III-Tubulin (59) oder Tau-Protein (Schroeder et al. submitted) in den ERG-positiven im Vergleich zu den ERG-negativen Tumoren stark hochreguliert sind.

Dass die GSK3 β Analyse zusätzliche prognostische Informationen über die etablierten prä- und postoperativen Prognosemarkern hinaus zur Verfügung stellen kann, macht GSK3 β zu einem vielversprechenden Kandidaten für die Routinediagnostik. Es ist allerdings anzumerken, dass die Analyse der prognostischen Relevanz der nukleären GSK3 β Akkumulation in den Untergruppen von Prostatakarzinomen mit einem identischen klassischen bzw. quantitativen Gleason Grading gezeigt hat, dass die prognostische

Aussagekraft der GSK3 β Messungen auf Karzinome mit einem Gleason Score von 3+4 und 4+3 limitiert ist. Diese Limitierung der Prognosebedeutung in diesen Subgruppen ist jedoch nicht enttäuschend, da gerade diese Tumoren in dem Therapieentscheidungsprozess am schwierigsten sind und theoretisch sowohl das Aktive Surveillance als auch die Prostatektomie in Frage kämen. Das Gleason Gradingssystem basiert nur auf der simplen Unterscheidung von histologisch-architektonischen Merkmalen. Zytologische Kriterien werden nicht berücksichtigt. Die Prognoseeinschätzung mittels Gleason Grading ist jedoch viel genauer als es durch die histologischen Bewertungen in vielen anderen Karzinomtypen, wie zum Beispiel bei Nierenkarzinomen (60) oder invasiven Harnblasenkarzinomen möglich ist (61). Dies trifft bereits zu, wenn das Gleason Grading auf 5 prognostische Subgruppen limitiert ist (62). Basierend auf der Analyse einer Kohorte von mehr als 10.000 Prostatakarzinomen konnten die Prostataforscher des UKE's kürzlich zeigen, dass die Information aus dem Gleason Grad präzisiert werden kann, wenn der Prozentsatz des Gleason 4 Grades als kontinuierliche Variable genutzt wird. In beiden, den Biopsien als auch den Prostatektomieproben, verschlechtert sich die Prognose schrittweise mit der Erhöhung des Prozentsatzes an Gleason 4 Mustern (quantitatives Gleason Grading) (63). Dass die nukleäre GSK3 β Akkumulation selbst in einigen Untergruppen von Prostatakarzinomen mit einem ähnlichen Prozentanteil an Gleason 4 relevant ist, spricht ebenfalls für eine mögliche Verwendung der GSK3 β Expression in der Routinediagnostik zur Bestimmung der Aggressivität von Prostatakarzinomen.

Desweiteren ist das therapeutische Potential von GSK3 β Inhibitoren ein wichtiges Feld der Untersuchungen geworden. Über 50 Komponenten, die gegen GSK3 β gerichtet sind, wurden bis jetzt beschrieben (5). In vitro sowie in vivo Xenograft Modelle zeigen eine klare Evidenz für eine mögliche therapeutische Applikation mancher dieser Medikamente bei Tumoren. Beispielsweise führt eine GSK3 β Inhibition in Pankreaskarzinomzellen zu reduzierter Zellproliferation, verstärkter Apoptose und Sensibilisierung gegenüber Gemcitabin, in ovariellen Tumorzellen zu reduzierter Lebensfähigkeit (9), in Kolonkarzinomzellen zu verstärkter Apoptose (64) und in Lungenkarzinomzellen zu reduzierter Zellproliferation und verkürztem Zellüberleben (12). Der GSK3 β Inhibitor LY2090314 wird bereits in klinischen Phase I/II Studien an Patienten mit akuter Leukämie (NCT01214603) und fortgeschrittenen bzw. metastasierenden soliden Tumoren (NCT01287520) getestet. Eine weitere Phase II Studie zur Wirkung bei metastasierten Pankreaskarzinomen (NCT01632306) ist im Aufbau. Sollten diese Studien Evidenzen für einen klinischen Nutzen der GSK3 β Inhibition bei der Behandlung von Karzinomen zeigen, würden die Resultate unserer Studie die Evaluation der GSK3 β Inhibierung beim Prostatakarzinom rechtfertigen.

Zusammengefasst zeigen die Resultate unserer Studie, dass die nukleäre GSK3 β Akkumulation ein starker unabhängiger Prognosefaktor beim Prostatakarzinom ist. Die GSK3 β Expressionsanalyse hat das Potential für eine klinische Routineapplikation – entweder alleine oder in Kombination mit anderen Biomarkern.

2.5 Zusammenfassung

Glycogensynthase-Kinase 3 β (GSK3 β) reguliert mehrere tumorrelevante zelluläre Prozesse und ist ein wichtiges potenziell therapeutisches Ziel in der Tumorthherapie. Eine Überexpression von GSK3 β konnte mit adversen Tumoreigenschaften in verschiedenen Karzinomentitäten assoziiert werden, allerdings bleibt ihre Rolle beim Prostatakarzinom unklar. Wir haben die GSK3 β Expression mittels Immunhistochemie an 12.427 Prostatakarzinomproben im Gewebemikroarray-Format untersucht. Die zytoplasmatische und nukleäre GSK3 β -Immunfärbung wurde getrennt analysiert.

Im normalen Prostataepithel fehlte die GSK3 β -Färbung, wohingegen eine GSK3 β -Färbung in 5.224 von 9.164 (57%) unserer interpretierbaren Prostatatumoren gesehen wurde. Die zytoplasmatische GSK3 β -Färbung war in 36,0% der Tumoren schwach, in 19,5% moderat und in 1,5% stark und in 47% zeigte sich außerdem eine begleitende Kernfärbung. Die zytoplasmatische GSK3 β -Färbung sowie die nukleäre GSK3 β -Akkumulation waren mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium, einem hohen Gleason-Grad, dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen und einem frühen biochemischen Rezidiv assoziiert (jeweils $p < 0,0001$ für zytoplasmatische Färbung und Kernakkumulation). Die Prognose von GSK3 β positiven Karzinomen war besonders schlecht, wenn zusätzlich eine nukleäre Färbung gesehen wurde ($p < 0,0001$). Der prognostische Einfluss der nukleären GSK3 β -Akkumulation war in den multivariaten Analysen unabhängig von den etablierten präoperativen und postoperativen Parametern vorhanden ($p < 0,0001$). Die signifikante Assoziation der GSK3 β Expression mit den Deletionen von PTEN ($p < 0,0001$), 6q15 ($p = 0,0026$), 5q21 ($p = 0,0014$) und 3p13 ($p < 0,0001$) deutet auf eine Rolle von GSK3 β bei der Entwicklung einer genomischen Instabilität hin.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Resultate unserer Studie GSK3 β als einen starken unabhängigen Prognosefaktor beim Prostatakarzinom identifizieren.

2.6 Abstract

Glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) regulates many cancer relevant cellular processes and represents a potential therapeutic target. GSK3 β overexpression has been linked to adverse tumor features in many cancers, but its role in prostate cancer remains uncertain. We employed immunohistochemical GSK3 β expression analysis on a tissue microarray with 12,427 prostate cancers. Cytoplasmic and nuclear GSK3 β staining was separately analyzed. GSK3 β staining was absent in normal prostate epithelium, whereas 57% of 9,165 interpretable cancers showed detectable GSK3 β expression. Cytoplasmic staining was considered weak, moderate, and strong in 36.0%, 19.5% and 1.5% of tumors and was accompanied by nuclear GSK3 β staining in 47% of cases. Cytoplasmic GSK3 β staining as well as nuclear GSK3 β accumulation was associated with advanced tumor stage, high Gleason grade, presence of lymph node metastasis and early biochemical recurrence ($p < 0.0001$ each for cytoplasmic staining and nuclear accumulation). Prognosis of GSK3 β positive cancers became particularly poor if nuclear GSK3 β staining was also seen ($p < 0.0001$). The prognostic impact of nuclear GSK3 β accumulation was independent of established preoperative and postoperative parameters in multivariate analyses ($p < 0.0001$). The significant association of GSK3 β expression with deletions of *PTEN*, 3p13 ($p < 0.0001$ each), 5q21 ($p = 0.0014$) and 6q15 ($p = 0.0026$) suggest a role of GSK3 β in the development of genomic instability. In summary, the results of our study identify GSK3 β as an independent prognostic marker in prostate cancer.

2.7 Literaturverzeichnis

1. Robert Koch Institut (RKI), Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland (GEKID). Krebs in Deutschland 2003-2004. Häufigkeiten und Trends. 6th ed. Berlin: RKI; 2008
2. Leitlinienprogramm Onkologie (Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms, Langfassung Langversion 3.1 – 2. Aktualisierung – Oktober 2014 AWMF-Register-Nummer 043/022OL(http://leitlinienprogramm-onkologie.de/uploads/tx_sbdownloader/LL_Prostata_Langversion_3.1.pdf)
3. Beske F, Becker E, Katalinic A, Krauss C, Pritzkeleit R. Gesundheitsversorgung 2050 Prognose für Deutschland und Schleswig-Holstein. Kiel: IGSF; 2007.
4. Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms Langversion 4.1 – September 2018 AWMF-Registernummer: 032-045OL
5. McCubrey JA, Steelman LS, Bertrand FE, *et al.* GSK-3 as potential target for therapeutic intervention in cancer. *Oncotarget* 2014;5:2881-911.
6. Bechard M, Trost R, Singh AM, Dalton S. Frat is a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-regulated determinant of glycogen synthase kinase 3beta subcellular localization in pluripotent cells. *Molecular and cellular biology* 2012;32:288-96.
7. Quintayo MA, Munro AF, Thomas J, *et al.* GSK3beta and cyclin D1 expression predicts outcome in early breast cancer patients. *Breast cancer research and treatment* 2012;136:161-8.
8. Mylona E, Vamvakaris I, Giannopoulou I, *et al.* An immunohistochemical evaluation of the proteins Wnt1 and glycogen synthase kinase (GSK)-3beta in invasive breast carcinomas. *Histopathology* 2013;62:899-907.
9. Fu Y, Wang X, Cheng X, *et al.* Clinicopathological and biological significance of aberrant activation of glycogen synthase kinase-3 in ovarian cancer. *OncoTargets and therapy* 2014;7:1159-68.
10. Mishra R, Nagini S, Rana A. Expression and inactivation of glycogen synthase kinase 3 alpha/ beta and their association with the expression of cyclin D1 and p53 in oral squamous cell carcinoma progression. *Molecular cancer* 2015;14:20.
11. Naito S, Bilim V, Yuuki K, *et al.* Glycogen synthase kinase-3beta: a prognostic marker and a potential therapeutic target in human bladder cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2010;16:5124-32.

12. Zeng J, Liu D, Qiu Z, *et al.* GSK3beta overexpression indicates poor prognosis and its inhibition reduces cell proliferation and survival of non-small cell lung cancer cells. *PloS one* 2014;9:e91231.
13. Zheng HC, Xu XY, Xia P, *et al.* Involvement of inactive GSK3beta overexpression in tumorigenesis and progression of gastric carcinomas. *Human pathology* 2010;41:1255-64.
14. Ougolkov AV, Fernandez-Zapico ME, Bilim VN, *et al.* Aberrant nuclear accumulation of glycogen synthase kinase-3beta in human pancreatic cancer: association with kinase activity and tumor dedifferentiation. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2006;12:5074-81.
15. Walz A, Ugolkov A, Chandra S, *et al.* Molecular Pathways: Revisiting Glycogen Synthase Kinase-3beta as a Target for the Treatment of Cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2017;23:1891-7.
16. Li R, Erdamar S, Dai H, *et al.* Cytoplasmic accumulation of glycogen synthase kinase-3beta is associated with aggressive clinicopathological features in human prostate cancer. *Anticancer Res* 2009;29:2077-81.
17. Millet JP, Orcau A, Rius C, *et al.* Predictors of death among patients who completed tuberculosis treatment: a population-based cohort study. *PloS one* 2011;6:e25315.
18. Schutz SV, Cronauer MV, Rinnab L. Inhibition of glycogen synthase kinase-3beta promotes nuclear export of the androgen receptor through a CRM1-dependent mechanism in prostate cancer cell lines. *Journal of cellular biochemistry* 2010;109:1192-200.
19. Liao X, Thrasher JB, Holzbeierlein J, Stanley S, Li B. Glycogen synthase kinase-3beta activity is required for androgen-stimulated gene expression in prostate cancer. *Endocrinology* 2004;145:2941-9.
20. Mulholland DJ, Dedhar S, Wu H, Nelson CC. PTEN and GSK3beta: key regulators of progression to androgen-independent prostate cancer. *Oncogene* 2006;25:329-37.
21. Campa VM, Baltziskueta E, Bengoa-Vergniory N, *et al.* A screen for transcription factor targets of glycogen synthase kinase-3 highlights an inverse correlation of NFkappaB and androgen receptor signaling in prostate cancer. *Oncotarget* 2014;5:8173-87.
22. Wang L, Lin HK, Hu YC, *et al.* Suppression of androgen receptor-mediated transactivation and cell growth by the glycogen synthase kinase 3 beta in prostate cells. *The Journal of biological chemistry* 2004;279:32444-52.
23. Darrington RS, Campa VM, Walker MM, *et al.* Distinct expression and activity of GSK-3alpha and GSK-3beta in prostate cancer. *International journal of cancer Journal international du cancer* 2012;131:E872-83.

24. Minner S, Enodien M, Sirma H, *et al.* ERG Status Is Unrelated to PSA Recurrence in Radically Operated Prostate Cancer in the Absence of Antihormonal Therapy. *Clinical cancer research* 2011;17:5878-88.
25. Weischenfeldt J, Simon R, Feuerbach L, *et al.* Integrative genomic analyses reveal an androgen-driven somatic alteration landscape in early-onset prostate cancer. *Cancer cell* 2013;23:159-70.
26. Burkhardt L, Fuchs S, Krohn A, *et al.* CHD1 Is a 5q21 Tumor Suppressor Required for ERG Rearrangement in Prostate Cancer. *Cancer Res* 2013;73:2795-805.
27. Kluth M1, Hesse J, Heini A, *et al.* Genomic deletion of MAP3K7 at 6q12-22 is associated with early PSA recurrence in prostate cancer and absence of TMPRSS2:ERG fusions. *Mod Pathol.* 2013; 26:975-83.
28. Krohn A, Diedler T, Burkhardt L, *et al.* Genomic deletion of PTEN is associated with tumor progression and early PSA recurrence in ERG fusion-positive and fusion-negative prostate cancer. *Am J Pathol* 2012;181:401-12.
29. Krohn A, Seidel A, Burkhardt L, *et al.* Recurrent deletion of 3p13 targets multiple tumour suppressor genes and defines a distinct subgroup of aggressive ERG fusion-positive prostate cancers. *The Journal of pathology* 2013;231:130-41.
30. Minner S, Jessen B, Stiedenroth L, *et al.* Low level HER2 overexpression is associated with rapid tumor cell proliferation and poor prognosis in prostate cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2010;16:1553-60.
31. Gudrun Lang: *Histotechnik*. Springer-Verlag, 2013. [ISBN 9783709111901](#). S. 271
32. Wang L, Lin HK, Hu YC, *et al.* Suppression of androgen receptor-mediated transactivation and cell growth by the glycogen synthase kinase 3 beta in prostate cells. *The Journal of biological chemistry* 2004;279:32444-52.
33. Darrington RS, Campa VM, Walker MM, *et al.* Distinct expression and activity of GSK-3alpha and GSK-3beta in prostate cancer. *International journal of cancer Journal international du cancer* 2012;131:E872-83.
34. Schlomm T, Iwers L, Kirstein P, *et al.* Clinical significance of p53 alterations in surgically treated prostate cancers. *Mod Pathol* 2008;21:1371-9.
35. Diehl JA, Cheng M, Roussel MF, Sherr CJ. Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev* 1998;12:3499-511.
36. Ginger RS, Dalton EC, Ryves WJ, *et al.* Glycogen synthase kinase-3 enhances nuclear export of a Dictyostelium STAT protein. *EMBO J* 2000;19:5483-91.
37. Morisco C, Seta K, Hardt SE, *et al.* Glycogen synthase kinase 3beta regulates GATA4 in cardiac myocytes. *The Journal of biological chemistry* 2001;276:28586-97.

38. Gregory MA, Qi Y, Hann SR. Phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 controls c-myc proteolysis and subnuclear localization. *The Journal of biological chemistry* 2003;278:51606-12.
39. Salazar M, Rojo AI, Velasco D, de Sagarra RM, Cuadrado A. Glycogen synthase kinase-3 β inhibits the xenobiotic and antioxidant cell response by direct phosphorylation and nuclear exclusion of the transcription factor Nrf2. *The Journal of biological chemistry* 2006;281:14841-51.
40. Yook JI, Li XY, Ota I, Fearon ER, Weiss SJ. Wnt-dependent regulation of the E-cadherin repressor snail. *The Journal of biological chemistry* 2005;280:11740-8.
41. Watcharasit P, Bijur GN, Zmijewski JW, *et al.* Direct, activating interaction between glycogen synthase kinase-3 β and p53 after DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:7951-5.
42. Brase JC, Johannes M, Mannsperger H, *et al.* TMPRSS2-ERG -specific transcriptional modulation is associated with prostate cancer biomarkers and TGF- β signaling. *BMC Cancer* 2011;11:507.
43. Wu L, Zhao JC, Kim J, *et al.* ERG is a critical regulator of Wnt/LEF1 signaling in prostate cancer. *Cancer Res* 2013;73:6068-79.
44. Li Y, Kong D, Wang Z, *et al.* Inactivation of AR/TMPRSS2-ERG/Wnt signaling networks attenuates the aggressive behavior of prostate cancer cells. *Cancer Prev Res (Phila)* 2011;4:1495-506.
45. Shang S, Hua F, Hu ZW. The regulation of beta-catenin activity and function in cancer: therapeutic opportunities. *Oncotarget* 2017;8:33972-89.
46. Giles RH, van Es JH, Clevers H. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim Biophys Acta* 2003;1653:1-24.
47. Kikuchi A, Kishida S, Yamamoto H. Regulation of Wnt signaling by protein-protein interaction and post-translational modifications. *Exp Mol Med* 2006;38:1-10.
48. Caspi M, Zilberberg A, Eldar-Finkelman H, Rosin-Arbesfeld R. Nuclear GSK-3 β inhibits the canonical Wnt signalling pathway in a beta-catenin phosphorylation-independent manner. *Oncogene* 2008;27:3546-55.
49. Shin SH, Lee EJ, Chun J, *et al.* The nuclear localization of glycogen synthase kinase 3 β is required its putative PY-nuclear localization sequences. *Mol Cells* 2012;34:375-82.
50. Patel S, Doble B, Woodgett JR. Glycogen synthase kinase-3 in insulin and Wnt signalling: a double-edged sword? *Biochem Soc Trans* 2004;32:803-8.
51. Mazor M, Kawano Y, Zhu H, Waxman J, Kypta RM. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 represses androgen receptor activity and prostate cancer cell growth. *Oncogene* 2004;23:7882-92.

52. Rinnab L, Schutz SV, Diesch J, *et al.* Inhibition of glycogen synthase kinase-3 in androgen-responsive prostate cancer cell lines: are GSK inhibitors therapeutically useful? *Neoplasia* 2008;10:624-34.
53. Taylor BS, Schultz N, Hieronymus H, *et al.* Integrative genomic profiling of human prostate cancer. *Cancer cell* 2010;18:11-22.
54. Lapointe J, Li C, Giacomini CP, *et al.* Genomic profiling reveals alternative genetic pathways of prostate tumorigenesis. *Cancer Res* 2007;67:8504-10.
55. Xu W, Ge Y, Liu Z, Gong R. Glycogen synthase kinase 3beta orchestrates microtubule remodeling in compensatory glomerular adaptation to podocyte depletion. *The Journal of biological chemistry* 2015;290:1348-63.
56. Wakefield JG, Stephens DJ, Tavaré JM. A role for glycogen synthase kinase-3 in mitotic spindle dynamics and chromosome alignment. *J Cell Sci* 2003;116:637-46.
57. Tighe A, Ray-Sinha A, Staples OD, Taylor SS. GSK-3 inhibitors induce chromosome instability. *BMC Cell Biol* 2007;8:34.
58. Hooper C, Killick R, Lovestone S. The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 2008;104:1433-9.
59. Grupp K, Wilking J, Prien K, *et al.* High RNA-binding motif protein 3 expression is an independent prognostic marker in operated prostate cancer and tightly linked to ERG activation and PTEN deletions. *Eur J Cancer* 2014;50:852-61.
60. Ficarra V, Martignoni G, Maffei N, *et al.* Original and reviewed nuclear grading according to the Fuhrman system: a multivariate analysis of 388 patients with conventional renal cell carcinoma. *Cancer* 2005;103:68-75.
61. Grignon DJ. The current classification of urothelial neoplasms. *Mod Pathol* 2009;22 Suppl 2:S60-9.
62. Pierorazio PM, Walsh PC, Partin AW, Epstein JI. Prognostic Gleason grade grouping: data based on the modified Gleason scoring system. *BJU Int* 2013;111:753-60.
63. Sauter G, Steurer S, Clauditz TS, *et al.* Clinical Utility of Quantitative Gleason Grading in Prostate Biopsies and Prostatectomy Specimens. *Eur Urol* 2016;69:592-8.
64. Li H, Huang K, Liu X, *et al.* Lithium chloride suppresses colorectal cancer cell survival and proliferation through ROS/GSK-3beta/NF-kappaB signaling pathway. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2014;2014:241864

3 Erklärung des Eigenanteiles an der Publikation

- Auswahl des Proteins GSK3 β für die Studie
- Literaturrecherche zu GSK3 β bei Karzinomen allgemein und beim Prostatakarzinom
- Immunhistochemische Analyse unter Anleitung
- Statistische Auswertung der immunhistochemischen Ergebnisse unter Anleitung
- Analyse von verschiedenen Deletionsregionen mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung zur Erstellung einer molekularen Datenbank
- Erstellen einer ersten Version des Manuskriptes unter Anleitung

Anteil der Co-Autoren

- IHC Analyse und pathologische Beurteilung der Tumoren: Till Eichenauer, Franziska Büscheck, Doris Höflmeyer, Maria Christian Tsourlakis, Stefan Steurer, Till S Clauditz, Andreas M Luebke, Eike Burandt, Waldemar Wilczak, Andrea Hinsch, David Dum und Nathaniel Melling
- Datenakquisition, Datenbankgenerierung und statistische Analyse: Claudia Hube-Magg, Martina Kluth, Burkhard Beyer, Hartwig Hulan, Markus Graefen und Nathaniel Melling
- Erstellen des Manuskriptes: Till Eichenauer, Ronald Simon und Sarah Minner
- Studiendesign, Studienkoordination und fachliche Revision: Ronald Simon, Thorsten Schlomm, Guido Sauter und Sarah Minner

4. Danksagung

Ich möchte mich zunächst ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Guido Sauter für die Vergabe des Dissertationsthemas und die Möglichkeit, meine Arbeit in seinem Institut durchzuführen, bedanken.

Des Weiteren gilt mein Dank PD. Dr. Ronald Simon sowie allen Kollegen des Instituts für Pathologie.

Meinen ganz persönlichen Dank möchte ich Dr. rer. nat. Martina Kluth aussprechen, die mich während meiner Promotionszeit stets mit viel Geduld und Fürsorge unterstützt hat. Ihr außerordentliches Engagement, ihre ständige Motivation und die vielen fruchtbaren Diskussionen haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Natürlich möchte ich auch meinen Eltern und meiner Familie danken, die mich während meines Studiums und der Promotion stets unterstützt haben. Sie weckten in mir diesen Traum und unterstützen mich bis dieser Traum wahrgeworden ist.

LEBENS LAUF

„Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt“

5. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig 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