

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Pathologie: Molekularpathologie

Direktor: Professor Dr. med. Guido Sauter

Bedeutung der PTEN-Deletion zur Stratifizierung von Prostatakarzinomen in klinisch relevanten Subgruppen

Dissertation

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

vorgelegt von:
Jovisa Harendza
aus Tirana

Hamburg 2015

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 02.11.2015**

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

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Guido Sauter

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. Thorsten Schlomm

Prüfungsausschuss, dritte Gutachterin: Prof. Dr. Margit Fisch

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abbildungsverzeichnis	5
Tabellenverzeichnis	6
Abkürzungsverzeichnis	7
1 Einleitung	9
2 Material und Methoden	13
2.1 Gewebekollektiv	13
2.2 Prostata-Prognose-Array (Gewebemikroarray / TMA)	13
2.3 Escherichia Coli Plasmide	14
2.4 Reagenzien und Kits	15
2.5 Geräte	15
2.6 Verbrauchsmaterialien.....	16
2.7 Software und Datenbanken	16
2.8 Plasmid-Isolierung aus DH10B E. Coli	16
2.9 Bestimmung der DNA-Konzentration.....	17
2.10 Nick Translation.....	17
2.11 Sondenaufreinigung	18
2.12 Fluoreszenz-in-situ Hybridisierung (FISH)	18
2.13 Mikroskopische Auswertung.....	19
2.14 Statistische Auswertung	20
3 Ergebnisse	21
3.1 Auswertbarkeit des TMAs mittels FISH	21
3.2 Häufigkeit und Korrelation der PTEN-Deletion mit klinisch-pathologischen Parametern	21
3.3 Prognostische Relevanz der PTEN-Deletion beim Prostatakarzinom	22
3.4 Korrelation des PTEN-Deletionsstatus mit dem ERG-Fusionsstatus	24
3.5 Assoziation der PTEN-Deletion mit den sechs alternativen biologischen Endpunkten.....	24
4 Diskussion	27
Zusammenfassung	32
Literaturverzeichnis	33
Danksagung	36

Lebenslauf.....	37
Eidesstattliche Versicherung.....	39

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Exemplarische Darstellung der FISH-Auswertung. a) PTEN Deletion mit einem orangen PTEN-Signal und zwei grünen Zentromer 10 Signalen, b) PTEN Normal mit zwei orangen PTEN-Signalen und zwei grünen Zentromer 10 Signalen.	19
Abbildung 2:	Prognostische Relevanz der PTEN-Deletion gemessen an dem Auftreten eines PSA-Rezidivs. normal: keine Kopiezahlveränderung von PTEN, del: Homozygote oder heterozygote PTEN-Deletion konnte mittels FISH ermittelt werden. ...	23
Abbildung 3:	Prognostische Relevanz der PTEN-Deletion gemessen an dem Auftreten eines PSA-Rezidivs. normal: keine Kopiezahlveränderung von PTEN, het del: heterozygote PTEN-Deletion, homo del: homozygote PTEN-Deletion.....	23
Abbildung 4:	Assoziation der PTEN-Deletion (FISH) mit der ERG-Expression (IHC). PTEN-Deletion: heterozygote und homozygote PTEN-Deletion.....	24
Abbildung 5:	Assoziation der PTEN-Deletion mit den neuen alternativen Endpunkten in allen Prostatatumoren. Gruppe 1: Organbegrenzte Tumore ohne Progression, Gruppe 2: pT3a Tumore ohne PSA-Rezidiv, Gruppe 3: PSA-Rezidiv ohne Metastasen, Gruppe 4: PSA-Rezidiv ohne Metastasen, reversibel nach Bestrahlung, Gruppe 5: Metastasen in den Lymphknoten bei Prostatektomie, Gruppe 6: Hämatogene Metastasen nach Prostatektomie.....	25
Abbildung 6:	Assoziation der PTEN-Deletion mit den neuen alternativen Endpunkten in Tumoren mit einem Gleason Grad $\leq 3+4$. Gruppe 1: Organbegrenzte Tumore ohne Progression, Gruppe 2: pT3a Tumore ohne PSA-Rezidiv, Gruppe 3: PSA-Rezidiv ohne Metastasen, Gruppe 4: PSA- Rezidiv ohne Metastasen, reversibel nach Bestrahlung, Gruppe 5: Metastasen in den Lymphknoten bei Prostatektomie, Gruppe 6: Hämatogene Metastasen nach Prostatektomie.	26
Abbildung 7:	Assoziation der PTEN-Deletion mit den neuen alternativen Endpunkten in Tumoren mit einem Gleason Grad $\geq 4+3$. Gruppe 1: Organbegrenzte Tumore ohne Progression, Gruppe 2: pT3a Tumore ohne PSA-Rezidiv, Gruppe 3: PSA-Rezidiv ohne Metastasen, Gruppe 4: PSA- Rezidiv ohne Metastasen, reversibel nach Bestrahlung, Gruppe 5: Metastasen in den Lymphknoten bei Prostatektomie, Gruppe 6: Hämatogene Metastasen nach Prostatektomie.	26

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Zusammensetzung des Prostata-Prognose-Array (TMA)	14
Tabelle 2:	Verwendete Arbeitsmaterialien und Herkunft.....	15
Tabelle 3:	Verwendete Geräte mit Herkunft	15
Tabelle 4:	Verwendete Materialien mit Herkunft.....	16
Tabelle 5:	Häufigkeit und Assoziation der PTEN-Deletion mit klinisch- pathologischen Parametern beim Prostatakarzinom.....	22

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
<	kleiner
=	gleich
>	größer
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
AJCC	American Joint Committee on Cancer, Chicago/USA
BAC	künstliches bakterielles Chromosom (bacterial artificial chromosome)
bspw	beispielsweise
CHD1	(chromodomain helicase DNA binding protein 1)
dH2O	destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Deoxyribonucleic acid)
DRU	digital rektale Untersuchung
E.coli	Escherichia Coli
et al.	und andere (et alii/aliae)
FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
g	Gramm
het del	heterozygot deletiert
homo del	homozygot deletiert
M	Metastasen
mg	Milligramm
mm	Millimeter
n	Anzahl
N	Lymphknoten (nodes)
N2	Stickstoff (Nitrogenium)
ng	Nanogramm
nm	Nanometer

p	Wahrscheinlichkeit (probability)
pH	pH-Wert (potentia hydrogenii)
PIN	Prostatische intraepitheliale Neoplasie
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
PTEN	eine Phosphatase (Phosphatase and Tensin homolog)
RNA	Ribonukleinsäure (Ribonucleic Acid)
RNase	Ribonuklease
rpm	Runde pro Minute (rounds per minute)
T	Tumor
TMA	Prostata-Prognose-Array (tissue micro array)
TNM	Stadieneinteilung von malignen Tumoren (Classification of Malignant Tumours)
UICC	Internationale Vereinigung gegen Krebs (Union internationale contre le cancer), Genf/Schweiz
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

1 Einleitung

Weltweit wird pro Jahr bei über 900.000 Männern ein Prostatakarzinom diagnostiziert und über 250.000 Männer sterben an dieser Tumorentität ¹. In Deutschland ist das Prostatakarzinom mit 63.400 Neuerkrankungen pro Jahr die häufigste Tumorerkrankung des Mannes und mit einer Mortalitätsrate von 10,5 % die dritthäufigste tumorbedingte Todesursache ². Das Prostatakarzinom ist außerdem mit einem mittleren Erkrankungsalter von 70 Jahren eine Erkrankung des älteren Mannes. Im Vergleich zur Inzidenz ist die Mortalität beim Prostatakarzinom jedoch eher gering. Die relative 5 Jahres Überlebensrate für Patienten mit einem Prostatatumor beträgt 92 % und ist damit hinter Hodenkrebs mit 96 % die zweithöchste in Deutschland ². Die hohe Überlebensrate ist zurückzuführen auf eine erhebliche Verbesserung der Tumordiagnostik, bspw. durch das Prostata spezifische Antigen (PSA)-Screening. Ein Problem bei der Behandlung des Prostatakarzinoms ist jedoch, dass - unter Berücksichtigung der hohen Inzidenz - die meisten Tumore im Verlauf symptomlos bleiben und der Patient eher „mit“ als „an“ einem Prostatakarzinom verstirbt. Daraus ergibt sich als wesentliches Ziel der Prostatakrebsforschung die Identifizierung von asymptomatischen aggressiven Tumoren, um diese frühzeitig einer geeigneten Behandlung zu unterziehen.

Im Rahmen der Früherkennung von Prostatakarzinomen werden zunächst eine Bestimmung des PSA-Wertes und eine digital rektale Untersuchung (DRU) empfohlen. Bei einem erstmalig gemessenem PSA-Wert ≥ 4 ng/ml, einem auffälligen Anstieg des PSA-Wertes bei mehrmaliger Messung in regelmäßigen Zeitabständen oder einer tastbaren karzinomverdächtigen Veränderung innerhalb der DRU wird dann zur Primärdiagnostik eine Prostatastanzbiopsie durchgeführt. Bei Vorliegen eines Prostatakarzinoms wird anhand verschiedener Parameter eine Therapiestrategie in Einklang mit den Wünschen des Patienten entwickelt ³. Als klassische prognostische Faktoren werden das Gleason-Grading, das TNM-Stadium und die Begutachtung der chirurgischen Resektionsränder des Karzinoms herangezogen ³. Beim Gleason-Grading erfolgt eine histologische Beurteilung der Drüsenarchitektur, die von einer sehr gut differenzierten Drüsenstruktur (Gleason-Grad 1) bis zu einer sehr niedrig differenzierten Drüsenstruktur (Gleason-Grad 5) reicht ⁴. Die Einteilung in die TNM-Stadien wird anhand der aktuellen UICC-Klassifikation durchgeführt. Beurteilt wird die Ausdehnung des Tumors (T), das Vorhandensein von Metastasen in den Lymphknoten (N) sowie das Vorhandensein von Fernmetastasen (M) ⁵. Hierzu werden sowohl pathohistologische als auch klinische Parameter herangezogen. Die Beurteilung des chirurgischen Resektionsrandes (R-Status) erfolgt nach der Prostataektomie, um das Vorhandensein von Residualtumoren zu prüfen ³. Neben den klassischen Prognosefaktoren werden in der Literatur außerdem verschiedene molekulare Parameter wie zum Beispiel PTEN (10q23) ⁶,

CHD1 (5q21) ⁷ oder MAP3K7 (6q15) ⁸ als mögliche prognostische Parameter diskutiert.

Ein wesentlicher Nachteil der heute verwendeten Prognosefaktoren (pT-Stadium, Gleason-Grad, pN-Status) und der in der Literatur diskutierten molekularen Parameter ist, dass sie zuverlässig entweder erst postoperativ beurteilt werden können (pT-Stadium, pN-Status) oder deren prognostischer Wert anhand von Endpunkten ermittelt wurde, welche für den Patienten nur eine geringe oder keine klinische Relevanz aufzeigen (PSA-Rezidiv). Die meisten publizierten Studien, die potentiell prognostische Parameter beim Prostatakarzinom untersuchen, vergleichen den Verlust eines Chromosomenabschnittes (Deletion) oder die Veränderung der Expression eines bestimmten Genes mit dem Risiko im Verlauf der Erkrankung ein PSA-Rezidiv zu erleiden ⁶⁻¹². Ein PSA-Rezidiv tritt bei circa 30 % der Patienten nach Durchführung einer Prostataektomie auf. Allerdings kommt es bei den meisten Patienten mit einem PSA-Rezidiv nicht zu einer messbaren Progression des Tumors und der größte Teil dieser Patienten verstirbt nicht an den Folgen eines Prostatakarzinoms ¹³⁻¹⁵. Ein weiterer Nachteil der publizierten Studien zur Analyse potentieller Prognoseparameter ist, dass diese häufig an Material aus Prostataektomiepräparaten durchgeführt wurden. Dies bedeutet, dass die molekularen Parameter zu einem Zeitpunkt validiert wurden, zu dem keine relevanten therapeutischen Entscheidungen mehr getroffen werden können. Daher wäre es grundsätzlich sinnvoll die Untersuchung und Validierung von potentiell prognostischen Parametern an präoperativ entnommenen Stanzbiopsien durchzuführen. Diese haben allerdings den Nachteil, dass in der Regel klinische Verlaufsdaten fehlen und dass die geringe Gewebemenge die Möglichkeit zur Durchführung verschiedener Studien stark limitiert. Aus diesen Gründen ist die Verwendung von Prostataektomiepräparaten zur Evaluierung von molekularen prognostisch relevanten Parametern in der Praxis unabdingbar. Allerdings sollten zur Beurteilung des prognostischen Wertes eines Parameters neben dem verwendeten PSA-Rezidiv neue Endpunkte etabliert werden.

In der Arbeitsgruppe am UKE wurde kürzlich ein neues System von alternativen biologischen Endpunkten vorgeschlagen. Dieses basiert auf einer Datenbank aus gut 20.000 Patienten, bei denen eine Prostataektomie nach Diagnose eines Prostatakarzinoms durchgeführt wurde. Im Anschluss an die Prostataektomie wurden die Patienten zur Definition der neuen Endpunkte in die sechs folgenden Gruppen eingeteilt.

- Gruppe 1: Organbegrenzte Prostatakarzinome ohne Progression

In dieser Gruppe sind alle Patienten mit einem pT2-Karzinom, bei denen 5 Jahre postoperativ kein PSA-Rezidiv festgestellt wurde. Ein PSA-Rezidiv gilt 2,5 Jahre nach der Prostataektomie als absolute Ausnahme und kommt 5 Jahre postoperativ nicht mehr vor. Daher werden Patienten mit einem pT2-Karzinom ohne PSA-Rezidiv innerhalb der nächsten 5 Jahre als geheilt bewertet.

- Gruppe 2: pT3a-Karzinome ohne postoperatives PSA-Rezidiv nach 5 Jahren

In dieser Gruppe sind alle Patienten mit einem ins periprostatische Fettgewebe ausgedehnten Prostatakarzinom, bei denen 5 Jahre postoperativ kein PSA-Rezidiv aufgetreten ist. Diese Patienten gelten ebenfalls als geheilt.

- Gruppe 3: PSA-Rezidiv innerhalb der ersten 5 Jahre nach Ektomie ohne Metastasen Nachweis

In dieser Gruppe sind alle Patienten, bei denen zum Zeitpunkt der Prostataektomie keine Metastasen diagnostiziert wurden, die aber postoperativ innerhalb der nächsten 5 Jahre ein PSA-Rezidiv erlitten ohne dass Metastasen diagnostiziert werden konnten. Bei diesen Patienten wird angenommen, dass ein nicht klinisch relevantes Lokalrezidiv oder eine okkulte Metastasierung vorliegt.

- Gruppe 4: PSA-Rezidiv innerhalb der ersten 5 Jahre nach Ektomie ohne Metastasen zum Zeitpunkt der Operation, PSA-Rezidiv durch lokale Bestrahlung reversibel

In dieser Gruppe sind alle Patienten, die zum Zeitpunkt der Prostataektomie keine Metastasen aufwiesen, aber im weiteren Verlauf der Erkrankung ein PSA-Rezidiv erlitten. Das PSA-Rezidiv konnte allerdings durch lokale Bestrahlung rückgängig gemacht werden. Bei diesen Patienten wird angenommen, dass ein radiosensibles Lokalrezidiv vorlag ohne vorhandene Metastasierung.

- Gruppe 5: Metastasen in den Lymphknoten zum Zeitpunkt der Prostataektomie

In dieser Gruppe sind alle Patienten, die zum Zeitpunkt der Prostataektomie bereits Metastasen in den Lymphknoten aufwiesen.

- Gruppe 6: Manifestierung hämatogener Metastasen im Verlauf der Erkrankung

In dieser Gruppe sind alle Patienten, die nach der Prostataektomie im weiteren Verlauf der Erkrankung hämatogene Metastasen aufwiesen.

Ein relevanter Beitrag zur Verbesserung der individuellen Therapie von Prostatakarzinompatienten wäre nun die zuverlässige Zuteilung der Patienten zum Zeitpunkt der ersten Stanzbiopsie in diese sechs Gruppen.

Zu den potentiell interessanten prognostischen Parametern beim Prostatakarzinom zählen insbesondere Deletionen von tumorbiologisch relevanten Chromosomenabschnitten. Die Arbeitsgruppe am UKE konnte in früheren Arbeiten bereits einem Zusammenhang zwischen Deletionen im Bereich 5q21⁷, 6q15⁸, 3p13¹⁶ und 10q23⁶ und einem erhöhten Risiko eines PSA-Rezidivs ermitteln. Ein vergleichbarer Zusammenhang zwischen chromosomalen Verlusten und einem PSA-Rezidiv ist außerdem für die

Bereiche 8p und 17p publiziert^{10,17}. Des Weiteren konnten Zugewinne auf Chromosom 8q mit einem erhöhten Risiko des PSA-Rezidivs in Verbindung gebracht werden¹⁷.

Bei der Evaluierung neuer prognostischer Parameter stehen Deletionen im Bereich von 10q23 in einem besonderen Fokus, da in diesem Bereich das bekannte tumorsuppressive Gen PTEN lokalisiert ist¹⁸. PTEN (Phosphatase and Tensin homolog) kodiert für eine Phosphatase, die als direkter Antagonist der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K), einem Schlüsselenzym der Protein Kinase B (AKT)-Aktivierung, agiert^{19,20}. Inaktivierungen von PTEN führen zu einer deutlichen Erhöhung der AKT-Aktivierung und damit zu einer Begünstigung von Zellwachstum, Proliferation und Migration²¹. Sowohl in publizierten *in-vitro* als auch in *in-vivo* Studien konnte bereits nachgewiesen werden, dass verschiedene Aberrationen und die damit verbundene herabregulierte PTEN Expression eine Rolle bei der Entwicklung, Invasivität und Metastasierung des Prostatakarzinoms spielt²²⁻³¹.

In einer vorherigen Studie der Arbeitsgruppe am UKE konnte außerdem bereits gezeigt werden, dass PTEN-Deletionen mit einem erhöhten Risiko eines PSA-Rezidivs assoziiert sind⁶. Allerdings war die in dieser Studie untersuchte Fallzahl an Prostataektomiepräparaten zu gering, um einen Vergleich mit den neudefinierten biologischen Endpunkten durchzuführen. Ziel der vorliegenden Doktorarbeit war aus diesem Grund die Erhöhung der bisherigen Fallzahl durch die Untersuchung der PTEN-Deletion mittels Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung an einer möglichst großen Anzahl zusätzlicher Patienten. Durch die Erhöhung der untersuchten Fallzahl soll dann geklärt werden, ob der Nachweis einer PTEN-Deletion dazu beiträgt, Patienten in Bezug auf die oben genannten Risikogruppen zu stratifizieren.

2 Material und Methoden

2.1 Gewebekollektiv

Für die Analyse des PTEN-Aberrationsstatus mittels Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) wurde ein am Institut für Pathologie etablierter Prostata-Prognose-Array (TMA) bestehend aus 11.152 Prostatakarzinomgewebestanden verwendet. Ein Subset dieses TMA aus 4.699 Gewebestanden wurde bereits in einer vorherigen PTEN-Deletions-Studie am Institut für Pathologie untersucht⁶. Die dort erhobenen Daten wurden durch die Analyse der restlichen 6.453 Gewebespots in der vorliegenden Studie ergänzt.

2.2 Prostata-Prognose-Array (Gewebemikroarray / TMA)

Der am Institut für Pathologie etablierte Prostata-Prognose-Array (TMA) wurde aus 11.152 Prostataektomiepräparaten zusammengestellt. Die Prostataektomien wurden in der Zeit von 1992 bis 2011 am Institut für Urologie und in der Martiniklinik am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf durchgeführt. Für die Herstellung des TMA wurde pro Patient ein repräsentativer formalin-fixierter und in parafin-eingebetteter Tumorgewebeblock ausgewählt und eine im Durchmesser 0,6mm breite Prostatatumorstanz entnommen. Die Gewebestanden wurden auf 24 TMA-Blöcke verteilt. Jeder TMA-Block enthält damit zwischen 144 und 522 Prostatatumorgewebebestanden. Die klinischen Follow-up Daten waren für 9.695 der 11.152 Patienten vorhanden. Der PSA-Wert wurde nach der Prostataektomie gemessen und von einem PSA-Rezidiv wurde bei einem Wert ab 0,2ng/ml ausgegangen. Die genaue Zusammensetzung des TMA bezüglich Alter der Patienten bei Prostataektomie und klinisch-pathologischen Parametern ist in der Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Zusammensetzung des Prostata-Prognose-Array (TMA)

	Prostataektomie- präparate (n=11.152)	Prostataektomie- präparate (%)	PSA-Rezidiv (n=1.824)	PSA-Rezidiv (%)
Follow-up (mo)				
Durchschnittliches Lebensalter	53.4	-	-	-
Medianes Lebensalter	36.8	-	-	-
Alter (y)				
<50	318	2.9%	49	15.4%
50-60	2 768	25.0%	460	16.6%
60-70	6 548	59.1%	1 081	16.5%
>70	1 439	13.0%	232	16.1%
Gesamt	11 073	100%	1 822	16.5%
PSA Ausgangswert (ng/ml)				
<4	1 407	12.8%	142	10.1%
4-10	6 735	61.1%	827	12.3%
10-20	2 159	19.6%	521	24.1%
>20	720	6.5%	309	42.9%
Gesamt	11 021	100%	1 799	16.3%
pT Einteilung (AJCC 2002)				
pT2	1.370	0.0%	570	41605.8%
pT3a	2 409	64.5%	587	24.4%
pT3b	1 262	33.8%	618	49.0%
pT4	63	1.7%	49	77.8%
Gesamt	3 734	100%	1 824	48.8%
Gleason Grad				
≤3+3	2 859	25.8%	193	6.8%
3+4	1 565	14.1%	573	36.6%
4+3	6 183	55.8%	849	13.7%
≥4+4	482	4.3%	208	43.2%
Gesamt	11 089	100%	1 823	16.4%
pN Einteilung				
pN0	6 117	91.6%	1 126	18.4%
pN+	561	8.4%	291	51.9%
Gesamt	6 678	100%	1 417	21.2%
Chirurgischer Geweberand				
negativ	8 984	20.2%	1 146	12.8%
positiv	35 431	79.8%	642	1.8%
Gesamt	44 415	100%	1 788	4.0%

Bemerkung: Aufgrund von Fällen mit fehlenden Daten ergibt sich in den einzelnen Kategorien nicht immer die Totalsumme von 11.152.

2.3 Escherichia Coli Plasmide

Zur Herstellung der FISH-Sonden wurden mit BACs (bacterial artificial chromosome) transformierte DH10B Escherichia Coli (E.Coli) von der Firma Source Bioscience (Cambridge, UK) verwendet. Für die PTEN-Deletionssonden wurden die Clone RP11-380G5 und RP11-813O3 ausgewählt. Damit wurde das Gen PTEN und die Region links und rechts neben dem Gen mit der hergestellten FISH-Sonde markiert.

2.4 Reagenzien und Kits

In der Tabelle 2 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Reagenzien und Kits aufgelistet.

Tabelle 2: Verwendete Arbeitsmaterialien und Herkunft

Reagenzien / Kits	Firma	Sitz
20x SSC	Abbot	Ludwigshafen
CEP 10 Spectrum Green	Abbot	Ludwigshafen
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich	München
COT Human DNA	Roche	Grenzach-Wyhlen
Dextransulfat (Natriumsalz)	Roth	Karlsruhe
Ethanol 80% (vergällt)	VWR	Darmstadt
Ethanol 96% (vergällt)	VWR	Darmstadt
Ethanol Ph Eur (1 Liter)	VWR	Darmstadt
Formamid pro analysi	Merck	Darmstadt
Immersol	Zeiss	Oberkochen
Isopropanol 100%	Merck	Darmstadt
LB broth, Miller	Sigma-Aldrich	München
Mounting Medium with DAPI (VECTASHIELD)	Vector Laboratories	Vector Laboratories
Nick Translations Reagent Kit	Abbot	Ludwigshafen
NP-40	Abbot	Ludwigshafen
NucleoBond® BAC 100	Macherey-Nagel	Düren
nukleasefreies Wasser	Sigma-Aldrich	München
Orange dUTP (50 nmol, lyophilisiert)	Abbot	Ludwigshafen
Pretreatment Reagent 500 ml	Abbot	Ludwigshafen
Protease Buffer 500 ml	Abbot	Ludwigshafen
Protease I 500 mg	Abbot	Ludwigshafen
QIAquick Nucleotide Removal Kit (50)	Qiagen	Niederlande
Reinigungsbenzin	Biesterfeld Chemiedistribution GmbH	Biesterfeld Chemiedistribution GmbH
Xylol	J. T. Baker	Center Valley, USA

2.5 Geräte

In der Tabelle 3 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Geräte aufgelistet.

Tabelle 3: Verwendete Geräte mit Herkunft

Gerät	Firma	Sitz
Bunsenbrenner, Fireboy	Tecnomara	Zürich, Schweiz
Concentrator Plus	Eppendorf	Hamburg
Heizplatte	MEDAX GmbH & Co.KG	Neumünster
Heizrührer RCT basic	IKA® Labortechnik	Staufen
Inkubator	GFL (Gesellschaft für Labortechnik GmbH)	Burgwedel
Lab Thermometer IP65LT-101	TFA Dostmann GmbH + Co. KG	Wertheim-Reicholzheim
Lichtmikroskop, Axio Imager.A1	Zeiss	Oberkochen
MS1 Minishaker	IKA® Labortechnik	Staufen
Nanodrop ND 1000	Peqlab Biotechnologie GmbH	Erlangen
ph-Meter 766 Calimatic	Knick	Berlin
Primus	ALS	Jena
Rotor- JA-14	Beckmann	Krefeld
Rotor- JA-20	Beckmann	Krefeld
Thermobrite™	Abbot	Ludwigshafen
Wasserbäder	GFL (Gesellschaft für Labortechnik GmbH)	Burgwedel
Zentrifuge, Beckmann J2-21M/E	Beckmann	Krefeld
Zentrifuge, Biofuge 13	Heraeus Thermo Scientific	Hanau

2.6 Verbrauchsmaterialien

In der Tabelle 4 sind alle in dieser Arbeit verwendeten und über den normalen Laborbedarf hinausgehenden Verbrauchsmaterialien aufgelistet.

Tabelle 4: Verwendete Materialien mit Herkunft

Material	Firma	Sitz
Deckgläser No.1 24 x 60 mm	Marienfeld	Lauda Königshofen
Fixogum	Marabu	Tamm
Safe-Lock Reaktionsgefäße, amber	Eppendorf	Hamburg
Safe-Lock Reaktionsgefäße, amber, 0,5 ml	Eppendorf	Hamburg
SafeSeal Reagiergefäß 1,5 ml aus PP	Sarstedt	Nümbrecht-Rommelsdorf
SafeSeal Reagiergefäß 2 ml	Sarstedt	Nümbrecht-Rommelsdorf

2.7 Software und Datenbanken

Die Auswahl der DH10B E.Coli Clone erfolgte mit Hilfe von Ensembl. Die statistische Datenauswertung wurde mit JMP 9.0.2 durchgeführt. Für die Darstellung der Ergebnisse wurden Excel 2007 und PowerPoint 2007 verwendet.

2.8 Plasmid-Isolierung aus DH10B E. Coli

Die Isolierung von reiner Plasmid-DNA aus den DH10B E.Coli Bakterien ist Voraussetzung für die Nick Translation zur Herstellung der Sonden für die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH). Die Isolierung der Plasmid-DNA wurde mit dem NucleoBond® BAC 100 Kit von der Firma Machery-Nagel (Düren, Deutschland) durchgeführt.

Vor der Isolierung der Plasmid-DNA wurden die DH10B E.Coli Bakterien vermehrt. Dazu wurde als erstes eine Vorkultur aus 10ml LB-Medium, 30µl Chloramphenicol und mit einer Pipettenspitze aufgenommener Bakterien in einem 100ml Erlenmeyerkolben angesetzt. Die Vorkultur wurde für 8 Stunden bei 37°C und 190 rpm inkubiert. Dann wurden 2ml der Vorkultur in 250ml chloramphenicolhaltigen LB-Medium überführt und für 16 Stunden über Nacht bei 37°C und 190 rpm inkubiert. Anschließend wurde die Hauptkultur in einen Zentrifugenbecher gegeben und bei 4°C und 6.000g für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Bakterienpellet mit 24ml Buffer-S1 resuspendiert. Vor der Zugabe des Buffer-S1 wurde dieser mit RNase A versetzt. Dann wurden 24ml Buffer-S2 zu der Bakteriensuspension pipettiert und für 4 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Ausfällung unerwünschter Zellbestandteile wurden dann 24ml Buffer-S3 zu der Suspension gegeben, die Mischung durch 10 bis 15 Handumdrehungen homogenisiert und für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurde ein Filter mit dH2O befeuchtet und der Überstand filtriert. Zur Vorbereitung der Anionenaustauscher Säule für die Isolierung der Plasmid-DNA wurden 6ml Buffer-N2 auf die Säule pipettiert. Dann wurde das Filtrat auf die Säule gegeben. Die

Plasmid-DNA verblieb in der Säule und das Eluat konnte verworfen werden. Nachdem die Säule zweimal mit 18ml Buffer-N3 gewaschen war, wurde die Plasmid-DNA mit 15ml Buffer-N5 (50°C) aus der Säule in ein Zentrifugenröhrchen eluiert. Das Eluat wurde mit 11ml 100%igem Isopropanol gemischt und bei 4°C und 16.500g für 30 Minuten zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen war, wurde das DNA-Pellet mit 5ml 70%igem Ethanol bei 4°C und 16.500g für 10 Minuten gewaschen. Das Ethanol wurde verworfen und das DNA-Pellet unter dem Abzug für 15 Minuten getrocknet. Anschließend wurde die DNA in 150µl Nuklease-freiem Wasser über Nacht bei 4°C gelöst, in ein Eppendorf-Tube pipettiert und die DNA-Konzentration wie unter Punkt 2.9 beschrieben bestimmt. Bis zur Durchführung der Nick Translation wurde die DNA-Probe bei 4°C gelagert.

2.9 Bestimmung der DNA-Konzentration

Zur Bestimmung der Konzentrationen der isolierten Plasmide wurde das Peqlab NanoDrop® ND-1000 UV/Vis-Spektralphotometer verwendet.

Als Erstes wurde der Leerwert mit 1µl RNase freiem Wasser bei einer Wellenlänge von 260nm bestimmt. Anschließend wurde 1µl der Proben bei 260nm gemessen. Bei dieser Wellenlänge wird davon ausgegangen, dass eine Absorption von 1 einem DNA-Gehalt von 50µg/ml entspricht ³².

2.10 Nick Translation

Mit Hilfe der Nick Translation können für die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) fluoreszenz-markierte DNA-Einzelstränge zur Detektion spezifischer DNA-Abschnitte hergestellt werden.

Zur Durchführung der Nick Translation wurde das Nick Translation Reagent Kit (Abbott, Illinois, USA) verwendet. Auf Grund der hohen Temperaturempfindlichkeit der Reaktion wurden alle Arbeiten auf Eis durchgeführt. Zunächst wurde die unter Punkt 2.8 isolierte Plasmid-DNA mit Nuklease-freiem Wasser auf eine Konzentration von 1µg in 17,5µl in einer braunen Eppendorf-Tube verdünnt. Dann wurde ein Mastermix aus 5µl Nick Translation Buffer, 10µl 0,1mM dNTPs, 5µl 0,1mM dTTPs, 2,5µl 0,2mM Orange dUTPs und 10µl Nick Translation Enzym (DNA-Polymerase I, DNase I) angesetzt, gevortext und zu der verdünnten DNA pipettiert. Diese Lösung wurde nochmals gevortext und anschließend bei 2.000g für 1 Minute zentrifugiert. Danach wurden die Proben für 8 Stunden bei 15°C inkubiert und die Reaktion dann bei 72°C für 10 Minuten gestoppt. Die Proben wurden dann bis zu ihrer weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

2.11 Sondenaufreinigung

Zur Aufreinigung der unter Punkt 2.10 hergestellten FISH-Sonden wurde das QIAquick® Nucleotide Removal Kit (Qiagen, Venlo, Niederlande) verwendet. Die Aufreinigung der FISH-Sonden ist notwendig, um unerwünschte Bestandteile wie ungebundene Nukleotide oder Salze zu entfernen.

Als erstes wurden zum PNI Buffer 19ml 100%iger Isopropanol und zum PE Buffer 30ml absoluter Ethanol gegeben. Vom PNI Buffer wurden 500µl zu der unter Punkt 2.10 synthetisierten Probe gegeben. Diese Lösung wurde auf die Membran des QIAquick spin column pipettiert und für 1 Minute bei Raumtemperatur und 3.800g zentrifugiert. Das entstandene Eluat wurde verworfen. Dann wurden 750µl PE Buffer auf die Membran gegeben und die Probe nochmals für 1 Minute bei Raumtemperatur und 3.800g zentrifugiert. Nach der Entsorgung des Eluats erfolgte eine Trockenzentrifugation der Membran für 1 Minute bei Raumtemperatur und 17.900g. Anschließend wurde das QIAquick spin column auf ein braunes Eppendorf-Tube gesteckt und 60µl DNase-freies Wasser direkt auf die Membran pipettiert. Nach einer Inkubation von 1 Minute wurde die Probe für 1 Minute bei Raumtemperatur und 17.900g zentrifugiert und die Sonde eluiert. Im Anschluss wurden die Proben zusammenpipettiert und in einer Vakuumzentrifuge für 20 Minuten bei 45°C aufkonzentriert. Die hergestellte PTEN-Deletionssonde wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.12 Fluoreszenz-in-situ Hybridisierung (FISH)

Mit Hilfe der FISH können gezielt DNA-Abschnitte direkt im Gewebe nachgewiesen werden. Die FISH-Technik wird zum Beispiel in der Tumorforschung verwendet, um unter anderem das Fehlen von bestimmten DNA-Abschnitten (Deletion) zu detektieren.

Für die Durchführung der FISH an formalin-fixierten, paraffin-eingebetteten TMAs muss zunächst eine Vorbehandlung des Gewebes erfolgen. Dazu wurden die TMAs zunächst dreimal für 10 Minuten in Xylol gegeben, zweimal für 5 Minuten in Ethanol 96% gestellt und dann auf einer Heizplatte für 3 Minuten bei 48°C getrocknet. Danach wurden die TMAs für 15 Minuten in eine 80°C heiße Pretreatment-Lösung gestellt. Nachdem die TMAs zweimal für 1 Minute in dH₂O gewaschen waren, wurden diese für 2 Stunden und 30 Minuten bei 37°C in einer Proteaselösung inkubiert. Dann wurden die TMAs zweimal für 1 Minute in dH₂O gewaschen, für je 3 Minuten in Ethanol 70%, Ethanol 80% und Ethanol 96% dehydriert und auf einer Heizplatte für 3 Minuten bei 48°C getrocknet. Im Anschluss an die Vorbehandlung des Gewebes wurde die Hybridisierung der TMAs durchgeführt. Dazu wurde zunächst pro TMA ein Hybridisierungsmix aus 14µl Basismix (15,0ml Formamid, 4,5ml 20xSSC, 3,0g Dextransulfat), 2µl COT-DNA, 4µl PTEN-Sonde und 0,5µl grünfluoreszierender Centromer 10 Sonde hergestellt, kurz gevortext und bei 2.500g für 10 Sekunden zentrifugiert. Dann wurde der Hybridisierungsmix auf die TMAs pipettiert, ein Deckgläschen auf die TMAs gelegt, die Luftblasen rausgestrichen, das Deckgläschen mit Fixogum fixiert und das Fixogum für 10 Minuten getrocknet. Anschließend wurden die TMAs in einem Hybrit bei 72°C für 10

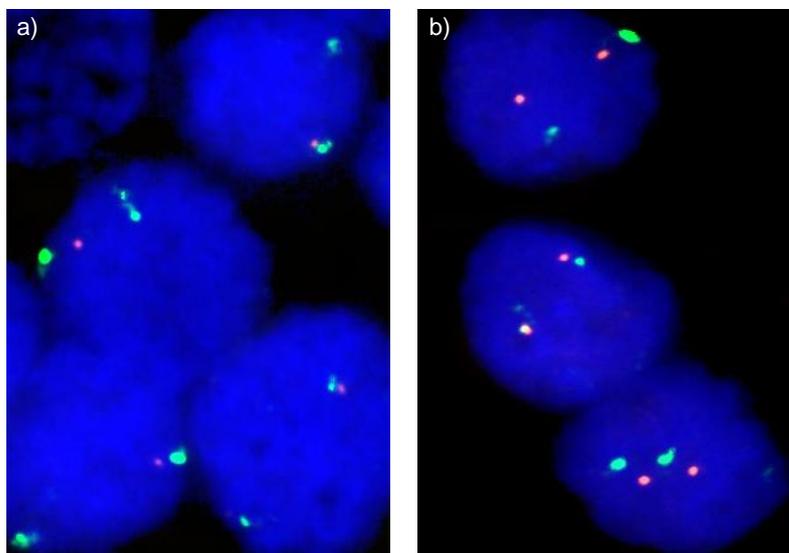
Minuten denaturiert und die PTEN-Sonde über Nacht bei 37°C hybridisiert. Am nächsten Tag wurden die TMAs gewaschen. Dazu wurde der Hybridisierungswaschpuffer (100ml 20xSSC, 3ml NP40, ad 1.000ml dH₂O) mit einem pH-Meter auf einen pH-Wert von 7,25 eingestellt. Danach wurde das Fixogum von den Deckgläschen entfernt und die TMAs bei Raumtemperatur im Dunkeln in den Hybridisierungswaschpuffer bis zum Ablösen der Deckgläschen gestellt. Anschließend wurden die TMAs für 2 Minuten in 72°C warmen Hybridisierungswaschpuffer gestellt und dann kurz in dH₂O gewaschen. Nach einer Trocknungszeit der TMAs von 10 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln wurde 1 Tropfen DAPI auf die TMAs gegeben und die TMAs mit einem Deckgläschen eingedeckelt. Vorhandene Luftblasen wurden mit einer Pipettenspitze rausgestrichen. Die hybridisierten TMAs wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.13 Mikroskopische Auswertung

Für die FISH-Analyse wurde ein Lichtmikroskop der Firma Zeiss mit den entsprechenden Filtern (AHF) verwendet. Aus der Analyse ausgeschlossen wurden alle Gewebespots, die auf Grund einer mangelhaften Hybridisierung nur ein schwaches oder gar kein PTEN-Signal in den Tumorzellen und Normalzellen aufwiesen.

Eine homozygote PTEN-Deletion wurde definiert durch das komplette Fehlen von PTEN-Signalen in $\geq 60\%$ der Tumorzellkerne bei Vorhandensein von Centromer 10 Signalen. Als zusätzliche Kontrollen wurden PTEN-Signale in angrenzenden Stromazellkernen verwendet. Eine heterozygote PTEN-Deletion wurde definiert durch das Vorhandensein von weniger PTEN-Signalen als Centromer 10 Signalen in $\geq 60\%$ der Tumorzellkerne (siehe Abbildung 1).

Abbildung 1: Exemplarische Darstellung der FISH-Auswertung. a) PTEN Deletion mit einem orangen PTEN-Signal und zwei grünen Zentromer 10 Signalen, b) PTEN Normal mit zwei orangen PTEN-Signalen und zwei grünen Zentromer 10 Signalen.



2.14 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung der PTEN FISH Analyse wurde die Software JMP 9.0.2. verwendet. Die prognostische Relevanz der PTEN-Deletion mittels eines Log-Rank-Tests geprüft und in einer Kaplan-Meier-Kurve dargestellt. Um den Zusammenhang der PTEN-Deletion mit den vorhandenen klinischen-pathologischen Parametern zu prüfen wurde ein Chi-Quadrat-Test durchgeführt. Dieser wurde ebenfalls verwendet um eine mögliche Assoziation der PTEN-Deletion mit den neuen alternativen Endpunkten beim Prostatakarzinom aufzuzeigen.

3 Ergebnisse

3.1 Auswertbarkeit des TMAs mittels FISH

Es konnten 4.377 der 6.453 Prostatagewebestanzes unter Verwendung der PTEN-Deletionssonde erfolgreich mittels FISH untersucht werden. Auf Grund einer unzureichenden Hybridisierung oder dem Fehlen von Tumorgewebe in der Stanze mussten 2.080 Gewebeprobe aus der abschließenden Analyse ausgeschlossen werden. Insgesamt konnten die aus der vorherigen Studie von Krohn et al.⁶ analysierbaren 2.217 Gewebespot auf 6.594 auswertbare Prostatakarzinomgewebespot erhöht werden.

3.2 Häufigkeit und Korrelation der PTEN-Deletion mit klinisch-pathologischen Parametern

Mit Hilfe der FISH Analyse konnte in 1.245 (18,88 %) der 6.594 auswertbaren Prostatakarzinome eine PTEN-Deletion nachgewiesen werden. Etwas häufiger wurden homozygote PTEN-Deletionen (12,04 %) gefunden im Vergleich zum Vorhandensein von heterozygoten PTEN-Deletionen (6,84 %). Der Zusammenhang zwischen der PTEN-Deletion und den klinisch-pathologischen Parametern wurde mit Hilfe eines Chi-Quadrat-Tests untersucht. Sowohl die heterozygoten als auch die homozygoten PTEN-Deletionen waren signifikant assoziiert mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium ($p < 0,0001$), einem hohen Gleason Grad ($p < 0,0001$), dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen ($p < 0,0001$) und einem positiven Befund des chirurgischen Resektionsrandes ($p < 0,0001$). Des Weiteren konnte eine signifikante Korrelation bei der PTEN-Deletionstypen mit einem erhöhten präoperativen PSA-Wert ermittelt werden ($p < 0,0001$). Weitere Daten zur Assoziation der PTEN-Deletion mit den klinisch-pathologischen Parametern beim Prostatakarzinom sind in Tabelle 5 zu finden.

Tabelle 5: Häufigkeit und Assoziation der PTEN-Deletion mit klinisch-pathologischen Parametern beim Prostatakarzinom

		n	auswertbar	normal (%)	hetero (%)	homo (%)	p-Wert
Alle Tumore		6594		5349 (81,11)	451 (6,84)	794 (12,04)	
Tumorgrad	pT2	3882		3441 (88,64)	202 (5,2)	239 (6,16)	<0,0001
	pT3a	1397		1035 (74,09)	157 (11,24)	205 (14,67)	
	pT3b	782		505 (64,58)	110 (14,07)	167 (21,36)	
	pT4	32		19 (59,38)	5 (15,63)	8 (25)	
Gleasongrad	≤3+3	1303		1194 (91,63)	53 (4,07)	56 (4,3)	<0,0001
	3+4	3505		2927 (83,51)	263 (7,5)	315 (8,99)	
	4+3	953		651 (68,31)	115 (12,07)	187 (19,62)	
	≥4+4	322		223 (69,25)	42 (13,04)	57 (17,7)	
Lymphknoten-Metastasen	N0	3399		2722 (80,08)	301 (8,86)	376 (11,06)	<0,0001
	N+	366		225 (61,48)	52 (14,21)	89 (24,32)	
PSA Level (ng/μl)	<4	736		587 (79,76)	62 (8,42)	87 (11,82)	<0,0001
	4-10	3662		3067 (83,75)	254 (6,94)	341 (9,31)	
	10-20	1240		1005 (81,05)	112 (9,03)	123 (9,92)	
	>20	412		308 (74,76)	42 (10,19)	62 (15,05)	
Chirurgischer Rand	negativ	4834		4048 (83,74)	339 (7,01)	447 (9,25)	<0,0001
	positiv	1162		886 (76,25)	116 (9,98)	160 (13,77)	

3.3 Prognostische Relevanz der PTEN-Deletion beim Prostatakarzinom

Zur Bestimmung der prognostischen Relevanz der PTEN Deletion konnten insgesamt 5.177 Prostatagewebestanzes verwendet werden, da für diese Patienten Follow up Daten nach der Prostataektomie erhoben werden konnten. Die prognostische Relevanz wurde anhand eines Log-Rank-Tests geprüft und in einer Kaplan-Meier-Kurve dargestellt. Die PTEN Deletion zeigte eine signifikante Assoziation mit dem Vorliegen eines frühen PSA-Rezidivs und damit mit einer deutlich schlechteren Prognose im Vergleich zu Patienten mit einem normalen PTEN-Kopiezahlstatus ($p < 0,0001$, siehe Abbildung 2). Zwischen dem Vorhandensein einer homozygoten und einer heterozygoten PTEN-Deletion konnte kein Unterschied in der Prognose festgestellt werden ($p = 0,2565$) (siehe Abbildung 3).

Abbildung 2: Prognostische Relevanz der PTEN-Deletion gemessen an dem Auftreten eines PSA-Rezidivs. normal: keine Kopiezahlveränderung von PTEN, del: Homozygote oder heterozygote PTEN-Deletion konnte mittels FISH ermittelt werden.

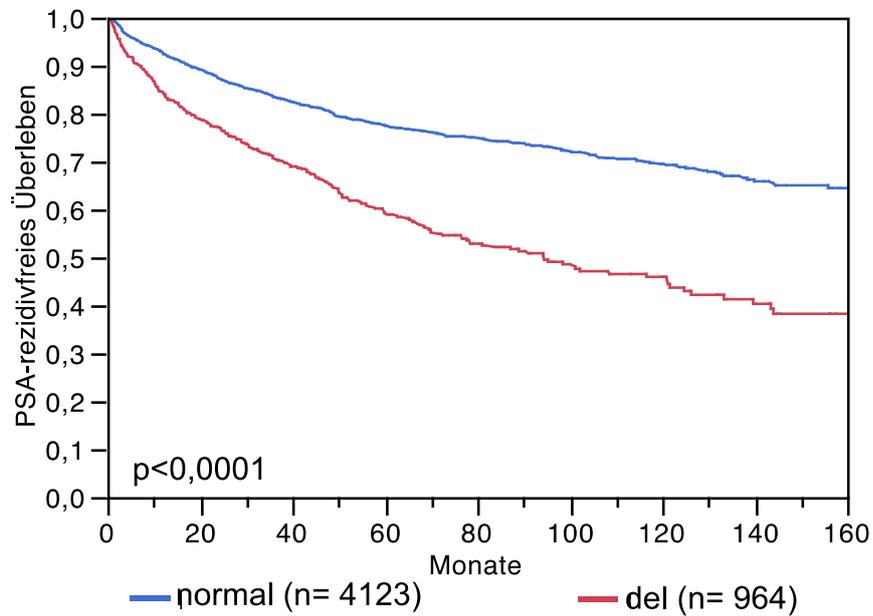
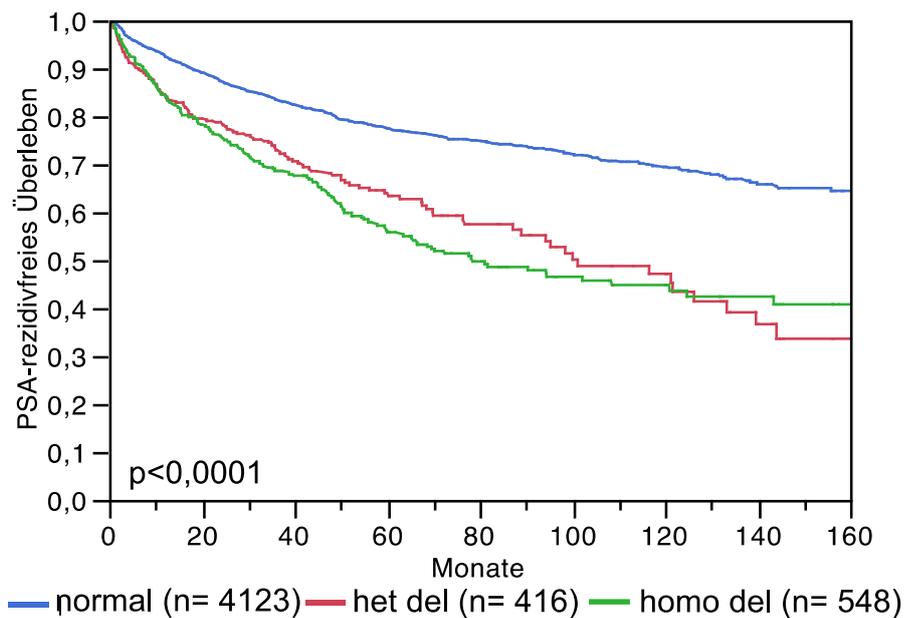


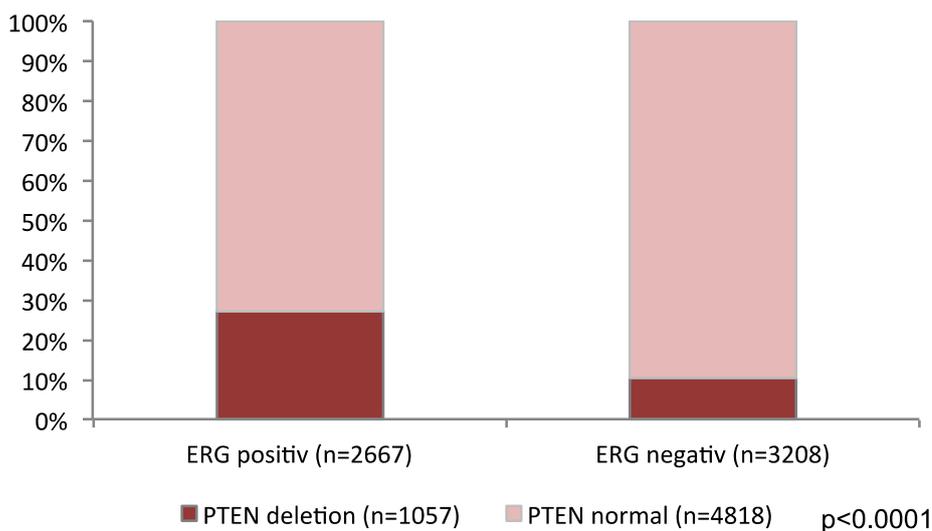
Abbildung 3: Prognostische Relevanz der PTEN-Deletion gemessen an dem Auftreten eines PSA-Rezidivs. normal: keine Kopiezahlveränderung von PTEN, het del: heterozygote PTEN-Deletion, homo del: homozygote PTEN-Deletion



3.4 Korrelation des PTEN-Deletionsstatus mit dem ERG-Fusionsstatus

Für die Assoziation des PTEN-Deletionsstatus mit dem ERG-Fusionsstatus wurden aus einer vorherigen Studie der Arbeitsgruppe immunohistochemisch erhobene ERG-Daten verwendet^{33,34}. Insgesamt war für 5.872 der auswertbaren PTEN Fälle ebenfalls der ERG-Fusionsstatus verfügbar. Zur Bestimmung der Assoziation der PTEN-Deletion mit dem ERG-Status wurde ein Chi-Quadrat-Test durchgeführt. Dabei konnte eine signifikante Korrelation der PTEN-Deletion mit einer ERG Expression gezeigt werden ($p < 0,0001$). Von den 1.057 homozygot und heterozygot PTEN deletierten Fällen waren 721 (68,21 %) ERG positiv und nur 336 (31,79 %) Fälle ERG negativ. Im Vergleich dazu waren von den 4.818 Fällen ohne PTEN-Deletion nur 1.946 (40,39 %) Tumore ERG negativ und 2.872 (59,61 %) ERG positiv (siehe Abbildung 4).

Abbildung 4: Assoziation der PTEN-Deletion (FISH) mit der ERG-Expression (IHC). PTEN-Deletion: heterozygote und homozygote PTEN-Deletion.



3.5 Assoziation der PTEN-Deletion mit den sechs alternativen biologischen Endpunkten

Um die Assoziation der PTEN Deletion mit den sechs alternativen Endpunkten zu untersuchen, wurde ein Chi-Quadrat-Test durchgeführt. Daten für den PTEN-Deletionsstatus lagen für 2.649 der Tumore vor, für die ein alternativer Endpunkt bestimmt werden konnte. Der Nachweis einer PTEN Deletion zeigte eine signifikante Assoziation zu der Verteilung der neuen alternativen Endpunkten bei der Analyse von allen Tumoren ($p < 0,0001$). Bei den PTEN deletierten Tumoren war das Risiko für ein Lokalrezidiv (Gruppe 4), lymphogene (Gruppe 5) oder hämatogene Metastasierung (Gruppe 6) jeweils um das circa 2-fache gegenüber Tumoren ohne PTEN Deletion erhöht (jeweils $p < 0,0001$). Tumore ohne PTEN Deletion zeigten etwa doppelt so oft lo-

kalbegrenztes Wachstum (Gruppe 1) im Vergleich zu Tumoren mit PTEN Deletion ($p < 0.0001$, Abbildung 5).

Eine weitere Analyse in den Untergruppen der Tumore mit einem geringen Gleason Grad ($\leq 3+4$) und einem hohem Gleason Grad ($\geq 4+3$) zeigte, dass die Assoziation der PTEN Deletion mit den klinischen Endgruppen abhängig vom Gleason Grad ist. In der Gruppe der PTEN deletierten Tumoren mit einem geringen Gleason Grad ($\leq 3+4$) war die Wahrscheinlichkeit eines Tumors mit einem ungünstigen Tumorphänotyp (Gruppe 4 bis 6) um mehr als das Zweifache höher als in der Gruppe der Tumore mit einer normalen PTEN Kopiezahl ($p \leq 0.0100$). Damit ist die Gruppe der PTEN deletierten Tumore insbesondere gekennzeichnet durch das Vorhandensein von Tumoren mit einem Lokalrezidiv oder einer lymphogenen/hämatogenen Metastasierung. Im Vergleich dazu war der Anteil an pT2 Tumoren ohne einer Progression 5 Jahre postoperativ in der Gruppe der PTEN deletierten Tumoren zweifach geringer als in der Gruppe der Tumore mit einem normalen PTEN Kopiezahlstatus ($p < 0.0001$). Diese Ergebnisse sind in Abbildung 6 dargestellt. Tumore mit einem hohen Gleason Grad zeigten demgegenüber nur marginale Unterschiede in der Verteilung der klinischen Endgruppen. Hier war lediglich der Anteil lymphogen metastasierter Tumore (Gruppe 5) um das 1,4 fache erhöht, wenn eine PTEN Deletion vorlag ($p < 0.0001$, Abbildung 7).

Abbildung 5: Assoziation der PTEN-Deletion mit den neuen alternativen Endpunkten in allen Prostatatumoren. Gruppe 1: Organbegrenzte Tumore ohne Progression, Gruppe 2: pT3a Tumore ohne PSA-Rezidiv, Gruppe 3: PSA-Rezidiv ohne Metastasen, Gruppe 4: PSA-Rezidiv ohne Metastasen, reversibel nach Bestrahlung, Gruppe 5: Metastasen in den Lymphknoten bei Prostatektomie, Gruppe 6: Hämatogene Metastasen nach Prostatektomie.

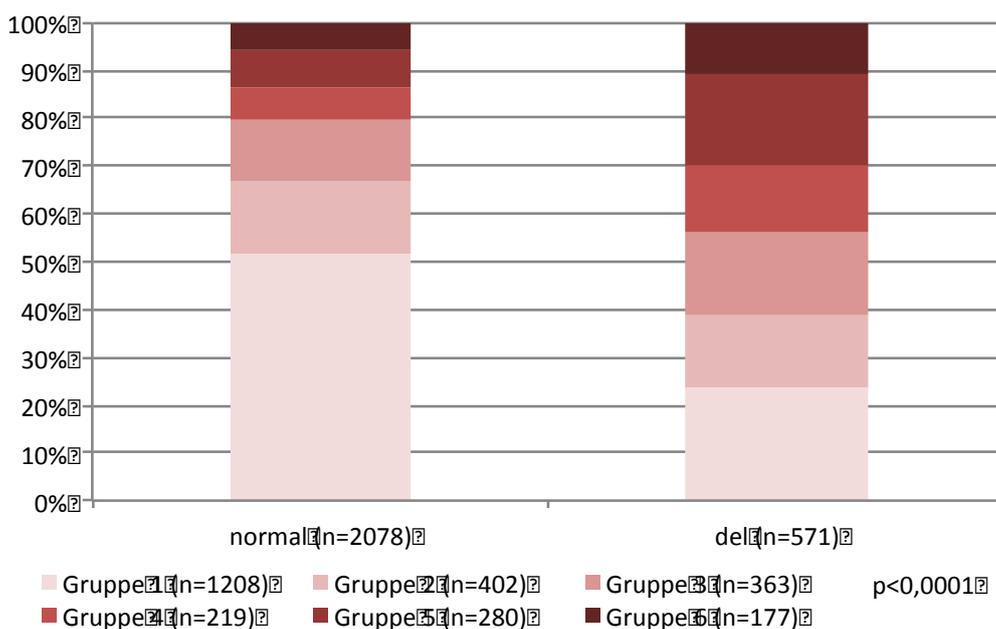


Abbildung 6: Assoziation der PTEN-Deletion mit den neuen alternativen Endpunkten in Tumoren mit einem Gleason Grad $\leq 3+4$. Gruppe 1: Organbegrenzte Tumore ohne Progression, Gruppe 2: pT3a Tumore ohne PSA-Rezidiv, Gruppe 3: PSA-Rezidiv ohne Metastasen, Gruppe 4: PSA- Rezidiv ohne Metastasen, reversibel nach Bestrahlung, Gruppe 5: Metastasen in den Lymphknoten bei Prostatektomie, Gruppe 6: Hämatogene Metastasen nach Prostatektomie.

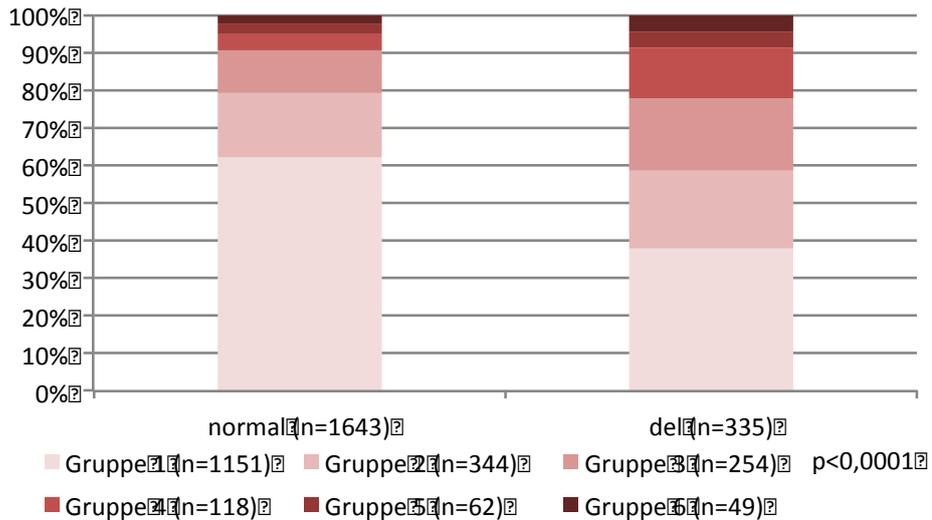
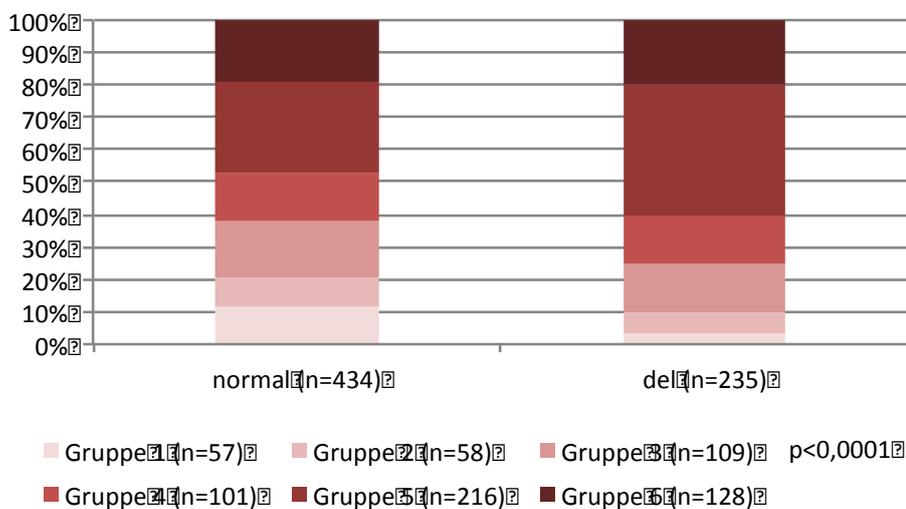


Abbildung 7: Assoziation der PTEN-Deletion mit den neuen alternativen Endpunkten in Tumoren mit einem Gleason Grad $\geq 4+3$. Gruppe 1: Organbegrenzte Tumore ohne Progression, Gruppe 2: pT3a Tumore ohne PSA-Rezidiv, Gruppe 3: PSA-Rezidiv ohne Metastasen, Gruppe 4: PSA- Rezidiv ohne Metastasen, reversibel nach Bestrahlung, Gruppe 5: Metastasen in den Lymphknoten bei Prostatektomie, Gruppe 6: Hämatogene Metastasen nach Prostatektomie.



4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die prognostische Aussagekraft der PTEN Deletion anhand sechs neu definierter klinischer Endpunkte, die wesentliche biologische Charakteristika des Prostatakarzinoms einbeziehen, mittels Fluoreszenz in-situ Hybridisierung beim Prostatakarzinom untersucht.

Dazu wurde der PTEN Deletionsstatus mittels Fluoreszenz in-situ Hybridisierung an einem Subset des Gewebemikroarrays (TMA) des Instituts für Pathologie mit mehr als 6.400 Prostatatumoren untersucht. Zur Erhöhung der Fallzahl wurden die 4.377 analysierbaren Tumore durch 2.217 Tumore ergänzt, die bereits in einer vorherigen PTEN Deletionsstudie von Krohn et al. an einem weiteren Subset des TMAs durch die Arbeitsgruppe untersucht wurden⁶. Insgesamt konnte eine PTEN Deletion in 18,8 % aller Prostatatumore identifiziert werden. Dabei war der Anteil der homozygoten PTEN Deletionen mit 12,0 % fast doppelt so hoch wie der Anteil an heterozygoten PTEN Deletionen mit 6,8 %. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit der PTEN Deletionsrate in der Studie von Krohn et al., in der 12,1 % homozygote und 8,1 % heterozygote PTEN Deletionen gefunden wurden⁶. Die in der vorliegenden Studie nachgewiesene PTEN Deletionsrate liegt im unteren Bereich vorheriger PTEN Studien, die eine PTEN Deletionsrate von 17 % bis 68 % messen konnten³⁵⁻⁴². Vermutlich beruht die eher geringe Deletionsrate auf den in der Arbeitsgruppe entwickelten stringenten Kriterien zur Definition einer PTEN Deletion. Von einer PTEN Deletion wurde ausgegangen, wenn mindestens 60 % der Tumorzellkerne einen Verlust im PTEN Signal aufzeigten. Dieser Grenzwert wurde innerhalb der PTEN Studie von Krohn et al. definiert, indem mittels SNP Array Analyse 7 Tumore mit einer heterozygoten oder homozygoten PTEN Deletion ausgewählt und dann mittels FISH untersucht wurden. Diese Analyse zeigte eine Übereinstimmung der SNP- und FISH-Analyse von 100 %, sofern mindestens 60% der Tumorzellkerne einen Verlust im PTEN Signal aufwiesen⁶. Der von der Arbeitsgruppe verwendete Grenzwert zur Bestimmung einer Deletion ist wesentlich stringenter als die definierten Grenzwerte in anderen publizierten FISH Studien. In den meisten Studien wurde zunächst die Häufigkeit von Signalverlusten, die durch Schnittartefakte bedingt sind, an normalen Prostataepithelzellkernen bestimmt und der ermittelte Grenzwert dann zur Bestimmung der PTEN Deletionen verwendet^{35,39,41,42}. Da ein Tumorzellkern wesentlich größer ist als ein normaler Epithelzellkern, kann es bei Tumorzellkernen wesentlich häufiger zu fehlenden PTEN Signalen durch Schnittartefakte kommen. Aus diesem Grund kommt es vermutlich verstärkt zum Nachweis falsch positiver PTEN Deletionen bei der Verwendung solcher (zu niedriger) Grenzwerte, die an Normalgewebe ermittelt wurden. Die in der Arbeitsgruppe durchgeführte SNP (single nucleotide polymorphism) Array Analyse zeigte, dass die gemeinsam minimal deletierte Region auf 10q23 beim Prostatakarzinom nur die beiden Gene Killin (KLN) und PTEN umfasst, jedoch oft auch angrenzende intergenomische DNA-Bereiche betrifft. Aus diesem Grund wurde in der Arbeitsgruppe eine 360 Kilobasen große PTEN FISH Sonde her-

gestellt, die auch die PTEN flankierenden Regionen umfasst. Dies garantiert ein breites und gut sichtbares PTEN Signal, dass zu einer hohen und sehr guten Auswertbarkeit führt.

Sowohl in der vorliegenden Studie als auch in der Studie von Krohn et al war die Rate der heterozygoten Deletionen mit 7 % bzw. 8% etwas geringer als die der homozygoten PTEN Deletionen mit 12%. Diese Ergebnisse unterscheiden sich von den meisten anderen Studien, in denen eine wesentlich höhere Rate an heterozygoten PTEN Deletionen (12 % bis 62 %) im Vergleich zu homozygoten PTEN Deletionen (5 % bis 25 %) gefunden wurde^{35,36,39-41,43}. Allerdings weichen diese Studien in Bezug auf das Verhältnis von detektierten heterozygoten und homozygoten PTEN Deletionen bereits erheblich voneinander ab. In einigen Studien wird ein wesentlich höherer Anteil an heterozygoten Deletionen (39%-62%) als an homozygoten Deletionen (5% bis 6%) gemessen^{36,41}, während wiederum andere Studien vergleichbar häufig heterozygote (12%-34%) und homozygote (9% bis 25%) PTEN Deletionen nachweisen konnten^{35,39,40}. Diese Differenzen entstehen zum einen auf Grund der unterschiedlichen Kriterien zur Definition einer PTEN Deletion und zum anderen durch die Anzahl und die Zusammensetzung der untersuchten Prostatakarzinome. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind am besten vergleichbar mit der Studie von Han et al., in der ein ähnlicher Grenzwert zur Definition einer PTEN Deletion verwendet wurde. Hier mussten mindestens 50 % der Tumorzellkerne einen Verlust im PTEN Signal aufzeigen. In dieser Studie wurden 12,6 % heterozygote und 9,2 % homozygote PTEN Deletionen in 251 hormonsensitiven und 41 hormonrefraktären Prostatatumoren gefunden³⁵.

Sowohl heterozygote als auch homozygote PTEN Deletionen waren deutlich assoziiert mit einem hohen Gleason Grad, einem fortgeschrittenen Tumorstadium, einem erhöhten präoperativen PSA-Wert, dem Vorhandensein von Metastasen in den Lymphknoten, Tumorbefall des Resektionsrandes und der Wahrscheinlichkeit eines frühen biochemischen Rezidivs (PSA-Rezidiv). Dies lässt vermuten, dass chromosomale Veränderungen des Gens PTEN substantiell zu der Malignität von Prostatatumorzellen beitragen. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie stimmen überein mit der PTEN Studie von Krohn et al.⁶ und Studien anderer Arbeitsgruppen, in denen die PTEN Deletionen mittels FISH an 59 bis 322 Tumoren untersucht wurde. In diesen Studien war die PTEN Deletion mit dem Vorhandensein von Metastasen, einem frühen PSA-Rezidiv, dem allgemeinen Überleben und der tumorbedingten Mortalität bei hormonrefraktären Tumoren assoziiert^{35,38,39,41,42}. Studien, die chromosomale Verluste im Bereich 10q23 (PTEN) mittels loss of heterozygosity (LOH) untersuchten, fanden ebenfalls die höchsten 10q23 Verlustraten in fortgeschrittenen oder metastasierten Prostatakarzinomen⁴⁴⁻⁴⁶. Studien an transgenen Mäusen zeigten außerdem, dass eine verringerte PTEN Expression, verursacht durch den Verlust eines PTEN Allels, ausreicht für die Entstehung einer PIN²⁵ und dass eine weiter verminderte PTEN Expression (25 % Expression im Vergleich zum Wildtyp) mit der Entwicklung von invasiven Karzinomen assoziiert ist²³. Insgesamt zeigen die Daten damit eine starke Assoziation der PTEN Deletion mit einem schlechten bzw. ungünstigen Tumorphänotyp.

Neben dem Zusammenhang zwischen der PTEN Deletion und dem Tumorphänotyp wurde in der vorliegenden Arbeit zudem die Assoziation der PTEN Deletion mit dem Status der TMPRSS2:ERG Fusion untersucht. Die TMPRSS2:ERG Fusion, die durch eine Deletion auf Chromosom 21 entsteht, ist mit einer Häufigkeit von 50 % die häufigste Translokation beim Prostatakarzinom. Durch die Fusion des Transkriptionsfaktors ERG mit dem androgen-regulierten Gen TMPRSS2 kommt es zur Expression von ERG in den Tumorzellen, die immunohistochemisch nachweisbar ist. Der Nachweis der ERG Expression ermöglicht die Einteilung der Prostatakarzinome in ERG positive und ERG negative Tumore. In vorherigen Studien der Arbeitsgruppe konnten bereits einige der häufigsten Deletionen beim Prostatakarzinom der Untergruppe der ERG negativen (6q15⁸ und 5q21⁷) sowie der Untergruppe der ERG positiven (3p13¹⁶ und TP53¹⁰) Tumore zugeordnet werden. In der vorliegenden Studie konnte die PTEN Deletion mehr als doppelt so häufig in den ERG positiven Tumoren im Vergleich zu den ERG negativen Tumoren nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der früheren Studie von Krohn et al., in der die PTEN Deletion circa dreimal häufiger in ERG positiven als in ERG negativen Tumoren detektiert wurde⁶. Des Weiteren kann ausgeschlossen werden, dass die Assoziation der PTEN Deletion zu den ERG positiven Tumoren durch einen höheren Anteil an fortgeschrittenen Tumoren in dieser Gruppe hervorgerufen wurde, da die Verteilung von Tumorgrad und Tumorstadium in der Gruppe der ERG positiven und in der Gruppe der ERG negativen Tumore vergleichbar war. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie werden darüber hinaus durch einige frühere Studien bestätigt, die ebenfalls eine Korrelation der PTEN Deletion und der TMPRSS2:ERG Fusion zeigen konnten^{35,37,47,48}. Es ist anzunehmen, dass Tumorzellen, die zusätzlich zur TMPRSS2:ERG Fusion auch eine PTEN Deletion aufweisen, einen Selektionsvorteil gegenüber Tumorzellen ohne PTEN Deletion besitzen. Es gibt bereits Studien, die an transgenen Mäusen zeigen konnten, dass ein kooperativer Effekt der PTEN Inaktivierung und der ERG Expression während der Entstehung und Progression von Prostata Tumoren besteht^{47,48}. So konnten King et al. die Entstehung einer PIN nur bei einer bestehenden ERG Überexpression in Verbindung mit einem PTEN Mangel bzw. einer erhöhten AKT Aktivität im Mausmodell nachweisen⁴⁷. In einer weiteren Studie von Carver et al. führt die ERG Überexpression in PTEN defizienten Mäusen ebenfalls zur Entstehung einer PIN⁴⁸. Allerdings steht dem gegenüber die Studie von Trotmann et al., in der eine Reduktion der PTEN-Expression in Zelllinien bereits ausreichend ist, um einen invasiven Tumor zu entwickeln²³. Die möglichen kooperativen Effekte für die Tumorentstehung sind somit noch nicht geklärt. Obwohl auch in der vorliegenden Arbeit eine starke Assoziation zwischen der PTEN Deletion und der TMPRSS2:ERG Fusion gefunden wurde, die auf einen kooperativen Effekt der beiden Veränderungen hindeutet, schließt das Fehlen einer TMPRSS2:ERG Fusion eine PTEN Deletion nicht aus. Krohn et al. zeigten sogar, dass eine ERG-Fusion nicht zwingend ist für die Entwicklung von PTEN deletionsbedingten aggressiven Tumoren, da die PTEN-Deletion unabhängig vom Fusionsstatus in ERG-Fusions negativen und ERG-Fusions positiven Tumoren zu einer schlechten Prognose führte⁶. Damit wird deutlich, dass die PTEN Deletion unabhängig vom ERG Status einen starken Einfluss

auf die Patientenprognose besitzt. Des Weiteren wurde in der Studie von Krohn et al. eine starke Assoziation zwischen der PTEN Deletion und einer gesteigerten Zellproliferation festgestellt ⁶. Dies lässt darauf schließen, dass die durch eine PTEN Deletion bedingte Steigerung der Tumoraggressivität, ursächlich auf eine gesteigerte Zellproliferation zurückzuführen ist. Diese Vermutung steht in Einklang mit der bekannten Funktion von PTEN als Schlüsselement innerhalb der AKT Wachstumssignalkaskade ⁴⁹. Bemerkenswerterweise zeigen in der Studie von Krohn et al. ERG negative Tumore ohne PTEN Deletion ein früheres PSA-Rezidiv als ERG positive Tumore ohne PTEN Deletion, während der ERG-Status bei einer Analyse über alle Tumore keinen Einfluss auf die Patientenprognose hatte ⁶. Vermutlich ist die - unter Berücksichtigung von PTEN – relativ schlechte Prognose durch den hohen Anteil an PTEN Deletionen in den ERG-Fusions positiven Tumoren zu erklären.

Die potentiell hohe klinische Relevanz der PTEN Deletion beim Prostatakarzinom wird insbesondere durch die starke Assoziation dieser Deletion mit der erhöhten Wahrscheinlichkeit eines frühen PSA-Rezidivs unterstützt. Die Auswahl von klinischen Endpunkten in Studien zum Prostatakarzinom ist jedoch nicht einfach. Obwohl das PSA-Rezidiv in den meisten Studien als klinischer Endpunkt verwendet wird, ist bereits bekannt, dass die Verwendung eines biochemischen Rezidivs als alleiniger Endpunkt nicht optimal ist. Grund dafür ist die Diskrepanz zwischen dem Auftreten eines PSA-Rezidivs und einem tatsächlich lebensbedrohenden Krankheitsverlauf. Bei mehr als 30 % der Prostatakrebspatienten steigt der PSA-Wert innerhalb der ersten 10 Jahre nach Entnahme der Prostata auf Werte über 0,2 ng/ml an (PSA-Rezidiv). Von diesen Patienten entwickeln jedoch weniger als 10 % einen lebensbedrohenden Krankheitsverlauf ¹³⁻¹⁵. Aus diesem Grund wäre der tumorspezifische Tod des Patienten der „optimale“ klinische Endpunkt. Die Verwendung dieses Endpunktes ist bei Prostatakarzinom-Patienten jedoch mindestens genau so problematisch wie das PSA-Rezidiv. Dies liegt daran, dass Prostatakarzinome typischerweise erst nach dem 60. Lebensjahr auftreten und die Zeit bis zum Tod meistens 10 oder mehr Jahre beträgt ². Es ist daher kaum zu entscheiden, ob die Todesursache tatsächlich tumorbedingt war oder lediglich dem hohen Lebensalter der Patienten geschuldet ist.

Ein wesentliches Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, neue klinische Endpunkte zu testen, welche zu einer adäquaten Therapieentscheidung bereits zum Zeitpunkt der Diagnose eines Prostata Tumors beitragen können. Diese Endpunkte berücksichtigen insbesondere zwei wesentliche Charakteristika der Prostata Tumore, die erst im Prostatatektomiepräparat sicher diagnostiziert werden können: 1) das auf die Prostata lokal begrenzte Tumorstadium und 2) das Ausmaß der systemischen Ausbreitung bei nicht lokal begrenzten Tumoren. Zur Definition der neuen klinischen Endpunkte wurden die Patienten in sechs klinische Gruppen eingeteilt, welche die biologisch relevanten Eckpfeiler der Tumorstadien darstellen. Die Gruppen setzen sich wie folgt zusammen: Gruppe 1: Organbegrenzte Tumoren ohne PSA-Rezidiv innerhalb von 5 Jahren post-operativ (pT2), Gruppe 2: Tumoren mit Ausdehnung in das periprostatatische Fettgewebe (pT3a) ohne PSA-Rezidiv innerhalb von 5 Jahren post-operativ, Gruppe 3:

Organbegrenzte Tumoren (pT2) mit PSA-Rezidiv innerhalb von 5 Jahren postoperativ, Gruppe 4: PSA-Rezidiv innerhalb von 5 Jahren ohne diagnostizierte Metastasierung, Rezidiv ist durch lokale Bestrahlung reversibel (Lokalrezidiv), Gruppe 5: Metastasierung der Lymphknoten zum Zeitpunkt der Ektomie und Gruppe 6: Postoperative Entwicklung hämatogener Metastasen. Der Nachweis einer PTEN Deletion deutete in unserer Studie auf ein etwa zweifach erhöhtes Risiko für das Vorliegen einer systemischen Tumorausbreitung oder eines Lokalrezidivs. Eine separate Analyse von Tumoren mit geringem bis mäßigem Progressions-Risiko (Gleason $\leq 3+4$) und solchen mit hohem Progressions-Risiko (Gleason $\geq 4+3$) zeigt jedoch, dass die prognostische Aussagekraft einer PTEN Deletion hinsichtlich der neuen klinischen Endpunkte auf die Tumore mit einem geringen bis mäßigen Progressions-Risiko beschränkt ist. Dies ist jedoch kein Nachteil, da insbesondere in dieser Gruppe ein besonderer Bedarf an neuen molekularen Prognoseparametern besteht, die zusammen mit den etablierten prognostischen Parametern zu einer verbesserten Vorhersage des Krankheitsverlaufs führen können. So könnte zum Beispiel die Untersuchung einer PTEN Deletion bereits an der Stanzbiopsie von Tumoren mit eher günstigen klinisch-pathologischen Charakteristika (geringer Gleason Grad, geringer Score in klinischen Nomogrammen) den Ausschlag geben, dem Patienten entweder eine Operation oder aber eine engmaschige Überwachung (Active Surveillance) anzuraten. Bei Tumoren mit ungünstigen klinisch-pathologischen Parametern ist eine solche Untersuchung ohne hin nicht nötig, da unabhängig von solchen Untersuchungen eine chirurgische Entfernung der Prostata angeraten ist.

Insgesamt zeigen die Daten der vorliegenden Arbeit, dass PTEN Deletionen massiv mit lokalinvasiven und metastasierten Tumoren assoziiert sind. Die Verwendung von „neuen“ klinischen Endpunkten, die besser als das biochemische Rezidiv die tumorbiologisch relevanten Verhaltensmuster des Prostatakarzinoms, nämlich organüberschreitendes sowie systemisches Tumorwachstum, widerspiegeln, zeigt, dass Patienten mit PTEN deletierten Tumoren ein etwa doppelt so hohes Risiko für ein lebensbedrohliches Prostatakarzinom haben als Patienten ohne PTEN Veränderung. Die prädiktive Aussagekraft der PTEN Deletion ist besonders hoch bei Patienten mit Tumoren mit geringem Gleason Grad, welche vor der oft schwierigen Entscheidung zwischen der aktiven Überwachung oder der Prostataektomie stehen. Der Nachweis einer PTEN Deletion kann vor allem in dieser Patientengruppe, zusammen mit klinischen (und vielleicht anderen molekularen) Parametern zu einer optimierten Therapieentscheidung beitragen.

Zusammenfassung

Prostatakrebs ist die häufigste Tumorerkrankung des Mannes. Die heute etablierten Diagnose- und Prognosemarker reichen jedoch nicht aus, um Aussagen über den individuellen Krankheitsverlauf zu treffen. Es besteht die Hoffnung, dass molekulare Marker diese Situation massiv verbessern können. Die meisten Studien verwenden zur Identifizierung von potentiell prognostischen Markern das biochemische Rezidiv (PSA-Rezidiv) als klinischen Endpunkt, obwohl nur 10% der Patienten mit einem PSA-Rezidiv tatsächlich einen lebensbedrohlichen Krankheitsverlauf haben. An einem Kollektiv von über 11.000 Prostatakarzinomen wurden sechs neue Endpunkte definiert. Diese sechs Endgruppen berücksichtigen neben dem PSA-Rezidiv außerdem wesentliche biologische Charakteristika des Prostatakarzinoms, die erst nach der Entnahme der Prostata bestimmt werden können. Dazu zählen das auf die Prostata lokal begrenzte Tumorstadium und die systemischen Auswirkungen bei einem Tumorstadium, das über die Prostata hinausgeht.

Ziel der vorliegenden Studie war es zu untersuchen, ob die PTEN Deletion, die bekannter Weise mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit eines PSA-Rezidivs assoziiert ist, außerdem geeignet ist zur Stratifizierung der Tumore in diese sechs neuen klinisch-relevanten Endgruppen. Eine PTEN Deletion wurde in 1.245 (18,9%) der 6.594 analysierbaren Tumore nachgewiesen. Von diesen Tumoren zeigten 63,8% eine homozygote PTEN Deletion und 36,2% eine heterozygote PTEN Deletion. PTEN Deletionen waren signifikant mit positivem ERG Status ($p < 0,0001$) und einem schlechten Tumorphänotyp, wie fortgeschrittenem Tumorstadium, hohem Gleason Grad, lymphogener Metastasierung, Tumorbefall des Resektionsrandes und der Wahrscheinlichkeit eines frühen PSA-Rezidivs assoziiert ($p < 0,0001$ für alle Parameter). Die Analyse der neuen klinischen Endgruppen zeigte, dass Tumore mit PTEN Deletion ein circa 2-fach erhöhtes Risiko für ein Lokalrezidiv und eine lymphogene oder hämatogene Metastasierung gegenüber Tumoren ohne PTEN Deletion hatten (jeweils $p < 0,0001$). Dies galt vor allem für Tumore mit einem geringen Gleason Score ($\leq 3+4$). Bei Tumoren mit einem hohen Gleason Score ($\geq 4+3$) lagen nur geringfügige Unterschiede in der Verteilung der klinischen Endgruppen vor. Hier war das Risiko für eine lymphogene Metastasierung um das 1,4 fache erhöht, wenn eine PTEN Deletion vorlag ($p < 0,0001$).

Die vorliegende Studie zeigt, dass die PTEN Deletion ein solider prognostischer Marker ist, der sowohl mit klinischen als auch biologisch definierten Endpunkten assoziiert ist. Ein PTEN Deletions-Test könnte insbesondere bei Tumoren mit einem günstigen klinisch-pathologischen Phänotyp zu einer verbesserten Therapieentscheidung beitragen.

Literaturverzeichnis

1. Jemal, A. *et al.* Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* **61**, 69-90 (2011).
2. Rohde, V., Katalinic, A., Wasem, J. & Aidelsburger, P. *Gesundheitsberichterstattung des Bundes; Heft 36: Prostataerkrankungen*, (2007).
3. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, D.K., AWMF). Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms. Vol. Kurzversion 3.0, 2014 AWMF Registernummer: 043/022OL (<http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Leitlinien.7.0.html>).
4. Gleason, D.F. Histologic grading of prostate cancer: a perspective. *Hum Pathol* **23**, 273-9 (1992).
5. Sobin L., G.M., Wittekind C. *TNM classification of malignant tumours* (International Union Against Cancer (UICC), 2009).
6. Krohn, A. *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* **181**, 401-12 (2012).
7. Burkhardt, L. *et al.* CHD1 is a 5q21 tumor suppressor required for ERG rearrangement in prostate cancer. *Cancer Res* **73**, 2795-805 (2013).
8. Kluth, M. *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* **26**, 975-83 (2013).
9. Schlomm, T., Erbersdobler, A., Mirlacher, M. & Sauter, G. Molecular staging of prostate cancer in the year 2007. *World J Urol* **25**, 19-30 (2007).
10. Kluth, M. *et al.* Clinical significance of different types of p53 gene alteration in surgically treated prostate cancer. *Int J Cancer* **135**, 1369-80 (2014).
11. Wang, L., Xie, P.G., Lin, Y.L., Ma, J.G. & Li, W.P. Aberrant methylation of PCDH10 predicts worse biochemical recurrence-free survival in patients with prostate cancer after radical prostatectomy. *Med Sci Monit* **20**, 1363-8 (2014).
12. Grupp, K. *et al.* NY-ESO-1 expression is tightly linked to TMPRSS2-ERG fusion in prostate cancer. *Prostate* **74**, 1012-22 (2014).
13. Rosenbaum, E., Partin, A. & Eisenberger, M.A. Biochemical relapse after primary treatment for prostate cancer: studies on natural history and therapeutic considerations. *J Natl Compr Canc Netw* **2**, 249-56 (2004).
14. Simmons, M.N., Stephenson, A.J. & Klein, E.A. Natural history of biochemical recurrence after radical prostatectomy: risk assessment for secondary therapy. *Eur Urol* **51**, 1175-84 (2007).
15. Punnen, S. *et al.* Management of biochemical recurrence after primary treatment of prostate cancer: a systematic review of the literature. *Eur Urol* **64**, 905-15 (2013).
16. Krohn, A. *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* **231**, 130-41 (2013).

17. El Gammal, A.T. *et al.* Chromosome 8p deletions and 8q gains are associated with tumor progression and poor prognosis in prostate cancer. *Clin Cancer Res* **16**, 56-64 (2010).
18. Li, J. *et al.* PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* **275**, 1943-7 (1997).
19. Myers, M.P. *et al.* P-TEN, the tumor suppressor from human chromosome 10q23, is a dual-specificity phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 9052-7 (1997).
20. Majumder, P.K. & Sellers, W.R. Akt-regulated pathways in prostate cancer. *Oncogene* **24**, 7465-74 (2005).
21. Carnero, A., Blanco-Aparicio, C., Renner, O., Link, W. & Leal, J.F. The PTEN/PI3K/AKT signalling pathway in cancer, therapeutic implications. *Curr Cancer Drug Targets* **8**, 187-98 (2008).
22. Wang, S. *et al.* Prostate-specific deletion of the murine Pten tumor suppressor gene leads to metastatic prostate cancer. *Cancer Cell* **4**, 209-21 (2003).
23. Trotman, L.C. *et al.* Pten dose dictates cancer progression in the prostate. *PLoS Biol* **1**, E59 (2003).
24. Podsypanina, K. *et al.* Mutation of Pten/Mmac1 in mice causes neoplasia in multiple organ systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 1563-8 (1999).
25. Kwabi-Addo, B. *et al.* Haploinsufficiency of the Pten tumor suppressor gene promotes prostate cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 11563-8 (2001).
26. Di Cristofano, A., Pesce, B., Cordon-Cardo, C. & Pandolfi, P.P. Pten is essential for embryonic development and tumour suppression. *Nat Genet* **19**, 348-55 (1998).
27. Di Cristofano, A., De Acetis, M., Koff, A., Cordon-Cardo, C. & Pandolfi, P.P. Pten and p27KIP1 cooperate in prostate cancer tumor suppression in the mouse. *Nat Genet* **27**, 222-4 (2001).
28. Couto, S.S. *et al.* Simultaneous haploinsufficiency of Pten and Trp53 tumor suppressor genes accelerates tumorigenesis in a mouse model of prostate cancer. *Differentiation* **77**, 103-11 (2009).
29. Wu, Z., McRoberts, K.S. & Theodorescu, D. The role of PTEN in prostate cancer cell tropism to the bone micro-environment. *Carcinogenesis* **28**, 1393-400 (2007).
30. Wu, Z., Cho, H., Hampton, G.M. & Theodorescu, D. Cdc6 and cyclin E2 are PTEN-regulated genes associated with human prostate cancer metastasis. *Neoplasia* **11**, 66-76 (2009).
31. Kotelevets, L. *et al.* The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for stabilizing intercellular junctions and reverting invasiveness. *J Cell Biol* **155**, 1129-35 (2001).
32. Holtzhauer, M. *Biochemische Labormethoden*, (Springer-Verlag/Berlin Heidelberg, 3. Auflage, 1997).
33. Minner, S. *et al.* ERG status is unrelated to PSA recurrence in radically operated prostate cancer in the absence of antihormonal therapy. *Clin Cancer Res* **17**, 5878-88 (2011).
34. Weischenfeldt, J. *et al.* Integrative genomic analyses reveal an androgen-driven somatic alteration landscape in early-onset prostate cancer. *Cancer Cell* **23**, 159-70 (2013).

35. Han, B. *et al.* Fluorescence in situ hybridization study shows association of PTEN deletion with ERG rearrangement during prostate cancer progression. *Mod Pathol* **22**, 1083-93 (2009).
36. Yoshimoto, M. *et al.* Interphase FISH analysis of PTEN in histologic sections shows genomic deletions in 68% of primary prostate cancer and 23% of high-grade prostatic intra-epithelial neoplasias. *Cancer Genet Cytogenet* **169**, 128-37 (2006).
37. Yoshimoto, M. *et al.* Absence of TMPRSS2:ERG fusions and PTEN losses in prostate cancer is associated with a favorable outcome. *Mod Pathol* **21**, 1451-60 (2008).
38. McCall, P., Witton, C.J., Grimsley, S., Nielsen, K.V. & Edwards, J. Is PTEN loss associated with clinical outcome measures in human prostate cancer? *Br J Cancer* **99**, 1296-301 (2008).
39. Sircar, K. *et al.* PTEN genomic deletion is associated with p-Akt and AR signalling in poorer outcome, hormone refractory prostate cancer. *J Pathol* **218**, 505-13 (2009).
40. Verhagen, P.C. *et al.* The PTEN gene in locally progressive prostate cancer is preferentially inactivated by bi-allelic gene deletion. *J Pathol* **208**, 699-707 (2006).
41. Yoshimoto, M. *et al.* FISH analysis of 107 prostate cancers shows that PTEN genomic deletion is associated with poor clinical outcome. *Br J Cancer* **97**, 678-85 (2007).
42. Reid, A.H. *et al.* Molecular characterisation of ERG, ETV1 and PTEN gene loci identifies patients at low and high risk of death from prostate cancer. *Br J Cancer* **102**, 678-84 (2010).
43. Bismar, T.A. *et al.* PTEN genomic deletion is an early event associated with ERG gene rearrangements in prostate cancer. *BJU Int* **107**, 477-85 (2011).
44. Cairns, P. *et al.* Frequent inactivation of PTEN/MMAC1 in primary prostate cancer. *Cancer Res* **57**, 4997-5000 (1997).
45. Komiya, A. *et al.* Allelic losses at loci on chromosome 10 are associated with metastasis and progression of human prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer* **17**, 245-53 (1996).
46. Trybus, T.M., Burgess, A.C., Wojno, K.J., Glover, T.W. & Macoska, J.A. Distinct areas of allelic loss on chromosomal regions 10p and 10q in human prostate cancer. *Cancer Res* **56**, 2263-7 (1996).
47. King, J.C. *et al.* Cooperativity of TMPRSS2-ERG with PI3-kinase pathway activation in prostate oncogenesis. *Nat Genet* **41**, 524-6 (2009).
48. Carver, B.S. *et al.* Aberrant ERG expression cooperates with loss of PTEN to promote cancer progression in the prostate. *Nat Genet* **41**, 619-24 (2009).
49. Stambolic, V. *et al.* Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell* **95**, 29-39 (1998).

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Guido Sauter für die Vergabe des Dissertationsthemas und die Möglichkeit, meine Arbeit in seinem Institut durchzuführen.

Meinen ganz besonderen und persönlichen Dank möchte ich Martina Kluth aussprechen, die mich während meiner Promotionszeit stets mit viel Geduld und Fürsorge unterstützt hat. Danke für eine außergewöhnlich herzliche Betreuung und besondere Förderung meiner Arbeit.

Lebenslauf

entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

Eidesstattliche Versicherung

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