

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Pathologie mit den Sektionen
Molekular- und Zytopathologie

Direktor der Einrichtung
Prof. Dr. med. G. Sauter

Die prognostische Bedeutung der MSH6-Expression und Assoziation mit bekannten
Biomarkern beim Prostatakarzinom

Dissertation

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

vorgelegt von:

María de las Mercedes Noriega
Buenos Aires, Argentinien

Hamburg 2015

(wird von der Medizinischen Fakultät ausgefüllt)

Angenommen von der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 02.11.2015

Veröffentlicht mit Genehmigung der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

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

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

Inhaltsverzeichnis

Einleitung.....	4
Material und Methoden.....	7
Patienten.....	7
TMA-Herstellung.....	9
Immunhistochemie.....	9
Statistische Auswertung.....	9
Ergebnisse.....	10
MSH6-Expression beim Prostatakarzinom.....	10
Assoziation der MSH6 Expression mit dem ERG-Fusionsstatus.....	12
MSH6-Expression und andere genetische Defekte	15
Prognostische Relevanz.....	20
Multivariate Analyse.....	20
Diskussion.....	23
Zusammenfassung.....	26
Literaturverzeichnis.....	27
Danksagung.....	32
Lebenslauf.....	33
Veröffentlichte Publikationen.....	34
Eidesstattliche Versicherung.....	35

Einleitung

Die Prostata entsteht aus dem entodermalen Sinus urogenitalis in Höhe der Mündung des Wolff'schen Gang. Das spezielle Mesenchym dort vermittelt die Androgenwirkung auf das Epithel, welches Drüenschläuche bildet die sich in einen inneren und äußeren Lappen gliedern (insgesamt ca. 40 tubuloalveolären Drüsenläppchen). Aus dem speziellen Mesenchym entsteht das bindegewebige und muskuläre Stroma. Das Epithel der Drüsen ist zweireihig und kann aber auch mehrreihig und von unterschiedlicher Höhe sein. Die Drüsenläppchen werden von einem stark ausgeprägten Bindegewebe mit zahlreichen glatten Muskelzellen umgeben (fibromuskuläres Stroma). Die Prostata lässt sich in 3 Hauptzonen unterteilen, die embryologisch sowie klinisch/pathologisch wichtig sind. Die Transitionalzone ist ein kleiner Bereich, besonders anterior und lateral des Anfangsteils der Harnröhre. Hier entstehen etwa 15 – 22% der Prostatakarzinome. Etwa ein Viertel des Organs gehört zu der Zentralzone (eher posterior und kranial). Der größte Teil der Prostata ist von der peripheren Zone repräsentiert, die eher posterior und lateral sowie auch cranial liegt. Die periphere Zone ist Sitz der Mehrheit der Prostatakarzinome, die auch zum Teil transrektal zu tasten sind. Eine vordere Zone und die Zone um die Harnröhre sind kleinere Bereiche der Prostata. Die Prostata gehört zu den akzessorischen Geschlechtsdrüsen und hier produziert das Drüsenepithel das Prostatasekret. Ein wichtiger Bestandteil des Prostatasekrets ist das PSA (prostataspezifisches Antigen), das nicht nur beim Prostatakarzinom, sondern auch bei anderen Prostataerkrankungen pathologisch produziert wird und im Blut zu messen ist.

Das Prostatakarzinom, so wie es in der Berufssprache, und in der Literatur am häufigsten benannt wird, bildet sich aus den sekretorischen Zellen (Drüsenzellen) des Organs und hat invasive, bösartige Eigenschaften. Es handelt sich also um ein Adenokarzinom.

Das Prostatakarzinom ist die häufigste Krebserkrankung und die dritthäufigste Krebstodesursache bei Männern in Deutschland (Jemal et al. 2011). Die Prognose für 2014 liegt bei 70.100 Neuerkrankungen mit einem stetigen Anstieg seit den letzten Jahren. Das Risiko ein Prostatakarzinom zu entwickeln steigt mit zunehmendem Alter. Das durchschnittliche Erkrankungsalter variiert zwischen 60 und 70 Jahren alt. (Robert Koch Institut, 2013)

Über die Entstehung des Prostatakarzinoms ist bisher nicht viel bekannt. Eine familiäre Belastung (5 – 11 fache erhöhtes Risiko bei Männern mit 2 oder mehr erstgradigen Verwandten mit Prostatakarzinom) ist bekannt (Eble et al. 2004). Auch eine geographische Verteilung ist zu beobachten. Durch Migranten aus den „low-risk areas“ in die „high risk areas“ steigt die Inzidenz des Prostatakarzinoms. Dies bedeutet dass, umweltbedingte Faktoren bzw. Ernährungsgewohnheiten auch eine Rolle spielen. Fett-Restriktion habe einen Effekt auf PSA und Testosterone-Spiegel im Blut von Patienten mit Prostatakarzinom (Demark-Wahnefried et al. 2001). Testosteron wird in die Drüse aufgenommen und dort durch die Steroid-5-alpha-Reduktase-Enzym (SRD5A2) in den aktiveren Metabolit Dihydrotestosterone (DHT) umgewandelt. DHT und Testosterone binden an den Androgenrezeptor (AR). Der Rezeptor/Ligand-Komplex verlagert sich in den Zellkern und bindet dort an androgenabhängige Elemente. Letztere haben zum Teil auch eine Zellzyklus-Kontroll-Funktion.

Die Sterberate ist seit Mitte der 1990er Jahre rückläufig. Viele Tumoren werden in frühen Stadien entdeckt und wachsen langsam. Einige schreiten allerdings fort und führen früher

oder später zum Tod. Um eine biologische Aggressivität einschätzen zu können, werden die bioptisch diagnostizierten Tumoren in verschiedenen Risikogruppen eingeteilt. Die D'Amico-Risikostratifizierung unterscheidet zwischen 3 Risikogruppen: niedrig, mittel und hoch, je nach klinischem Tumorstadium (cT), PSA-Wert und Gleason-Score (D'Amico et al. 2001). Die Therapientscheidung erfolgt für jeden Patienten in Abhängigkeit der individuellen Risikogruppe. Seit Einführung des PSA-Tests ist der Anteil an Tumoren der niedrigen Risikogruppe in konsekutiven Prostatakarzinom-Serien angestiegen (Robert Koch Institut, 2013). Die Früherkennung eines Prostatakarzinoms ist wichtig um eine rechtzeitige Therapie einsetzen zu können. Allerdings kann eine Übertherapie bei langsam wachsenden Tumoren (die ohne Früherkennung nicht auffällig geworden wären und keine Behandlung bedürft hätten) nachteilig sein, nicht nur für den Patienten sondern auch im Sinne von Kosten für das Gesundheitssystem.

Die vorhanden und etablierten pathologischen und klinischen Prognoseparameter sind statistisch gesehen hervorragend (Gleasonscore, PSA, cT) im Einzelfall aber oft ungenügend um eine Überbehandlung zu verhindern. Die letzten Jahre haben aber zu einem massiven Gewinn über die molekularen Hintergründe der Entstehung und Progression des Prostatakarzinoms geführt. Es darf gehofft werden, dass sich dieses Wissen in absehbarer Zukunft in bessere Prognosetests ansehen lässt.

Die häufigste genetische Alteration beim Prostatakarzinom, (etwa 50% der Fälle) ist die Fusion des Androgen-abhängigen-Serin-Protease-Gens *TMPRSS2* (21q22.2) mit einem Mitglied der ETS-Transkriptionaktor-Familie (Tomlins et al. 2005). Zu der letzteren gehören *ERG* (21q22.2), *ETV1* (7p21.2), *ETV4* (17q21) und *ETV5* (3q27), wobei *ERG* in über 90% der Fälle mit *TMPRSS2* fusioniert (Tomlins et al. 2005, Tomlins et al. 2008). Dieses molekulare Ereignis scheint früh in der Entstehung des Prostatakarzinoms zustande zu kommen, denn die entsprechende Fusion ist auch in high-grade PIN-Läsionen nachweisbar (Perner et al. 2007).

Neben der *TMPRSS2-ERG* Fusion sind Deletionen, die beim Prostatakarzinom häufigsten Aberrationen. Dies betrifft u.a die Region 10q23. *PTEN* (Phosphatase and Tensin Homolog) ist ein Tumorsuppressor-Gen auf Chromosome 10q23 und kodiert für eine multifunktionelle Phosphatase. *PTEN* fungiert als Antagonist der Phosphatidylinositol 3-Kinase, ein Schlüsselmolekül bei der Aktivierung von *AKT* (Protein Kinase B) (Myers et al. 1997). Inaktivierungen von *PTEN* führen zu einer konstitutiv erhöhten Konzentration von *AKT* und somit zu gesteigertem Zell-Wachstum, Proliferation, Überleben und Migration. *PTEN*-Deletionen sind an der Entstehung und Progression des Prostatakarzinoms beteiligt (King et al. 2009, Carver et al. 2009) und mit einem frühen PSA-Rezidiv assoziiert (Krohn et al. 2012). Neben *PTEN*- sind auch *TP53*-, *3q13*-, *5q21*-, und *6q15*-Deletionen beim Prostatakarzinom häufig und mit einer schlechten Prognose beim Prostatakarzinom assoziiert (Kluth et al. 2014, Krohn et al. 2013, Burkhardt et al. 2013, Kluth et al. 2013).

Die DNA-Replikation ist ein ziemlich präziser Prozess, aber in einigen Fällen können Mutationen entstehen (etwa eine Mutation in 10^9 bis 10^{10} Basen je Zellteilung) (Hsieh und Yamane 2008). Diese DNA-Basenfehlpaarung in der Replikation wird vom Mismatch Repair System (MMR) repariert. Das MMR System wurde in *Escherichia coli* weitgehend untersucht. In Prokaryonten sind die MMR Proteine *MutS*, *MutL* und *MutH*. In Eukaryoten sind „homologe“ Proteine bekannt. (Hsieh et al. 2008). Das entsprechende Reparatursystem

besteht aus verschiedenen Proteinen: MLH1, MLH3, MSH2, MSH3, MSH4, MSH5, MSH6, PMS1 und PMS2 gehören dazu. Ein Defekt im MMR-System kann über Mikrosatelliten überprüft werden. Sollten die Mikrosatelliten bei einem Patienten, gehäuft Aberrationen aufweisen (Mikrosatelliteninstabilität - MSI), so kann man davon ausgehen, dass ein Gendefekt in diesem DNA-Reparatursystem vorliegt. Die Mikrosatelliteninstabilität wurde in der Karzinogenese verschiedener Tumoren beschrieben (Ionov et al. 1993, Thibodeau and Schaid 1993, Murata et al. 2002, Murphy et al. 2011, Aysal et al. 2012, Pande et al. 2012, Rodriguez-Hernandez et al. 2013, Segev et al. 2014, Shen et al. 2014). Eine Mutation in einem der Mismatch-Reparatur-Gene charakterisiert das hereditäre non-polypöse Kolonkarzinom (HNPCC) oder Lynch Syndrom. (Aaltonen et al. 1993, Ionov et al. 1993, Peltomäki et al. 1993, Thibodeau and Schaid 1993, Lynch und de la Chapelle 1999).

Patienten mit einer vererbten MMR-Gen-Mutation und mit einem kolorektalen Karzinom haben ein erhöhtes Risiko nicht nur eine der klassisch zum Lynch-Syndrom gehörenden Neoplasien (Endometrium, Magen, Dünndarm, Ovar, Pankreas, Ureter, Nierenbecken und Gallenwege) (Lynch et al. 2009, Win et al. 2012) sondern auch ein Mamma- oder Prostatakarzinom zu entwickeln (Soravia et al. 2003, Bauer et al. 2011, Engel et al. 2012). Tatsächlich sprechen viele Befunde für eine wichtige Rolle der DNA-Reparatur-Systeme beim Prostatakarzinom (Leach 2002, Jarzen et al. 2013), Mikrosatelliteninstabilität (Egawa et al. 1995), MMR-Gen-Mutationen (Fredriksson et al. 2006), Einzel-Nukeotid-Polymorphismen bei MMR-Genen (Tanaka et al. 2009, Langeberg et al. 2010), eine fehlende Expression des MMR-Gen-Produkts (Chen et al. 2001, Soravia et al. 2003, Grindedal et al. 2009) sowie auch eine erhöhte Expression der MMR-Proteine (Norris et al. 2009) wurden bisher beschrieben.

Das Tissue-Microarray-Verfahren (TMA) ist ein etabliertes Verfahren welches es ermöglicht, gleichzeitig eine Vielzahl von Gewebeproben auf nur einem Objektträger auf einen bestimmten Marker zu analysieren. Die maximale Standardisierung der TMA-Verarbeitung, inklusive der exakt gleichen Bearbeitung (identische Reagenzien, Konzentrationen, Expositionszeiten) wie auch das große Patientekollektiv erlauben eine sehr distinkte Proteinexpressionsanalyse, so dass auch geringste quantitative Unterschiede detektiert werden können (Simon 2002, Mirlacher und Simon 2010).

Das Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf besitzt, dank der Zusammenarbeit des Institutes für Pathologie und der Martiniklinik, ein Patientekollektiv von ca. 12.500 Prostata-Gewebeproben. Aus diesem Kollektiv, das sich stetig vergrößert, wurden zahlreiche TMAs erstellt. Die klinischen Informationen, wie Verlaufsdaten werden ständig aktualisiert.

Das Ziel dieser Arbeit ist die Klärung einer möglichen prognostischen Bedeutung der MSH6-Expression beim Prostatakarzinom. Darüber hinaus sollte die Beziehung zu molekularen Subtypen definiert durch dem ERG-Status und die wichtigsten chromosomalen Deletionen geklärt werden.

Material und Methoden

Patienten

Für dieses Projekt haben wir uns unseres Hamburger-Prostatakarzinom Tissue Microarray (TMA) bedient. Seit 1992 werden radikale Prostatektomien der am UKE operierten Patienten standardisiert aufgearbeitet. Unser Kollektiv besteht aus 11.152 Patienten, davon 9695 mit Verlaufsdaten (medianer postoperativer Verlaufsbeobachtungszeitraum von 36,8 Monate). Die Tabelle 1 zeigt klinische Angaben (Alter und präoperatives PSA) und Informationen über das Prostatakarzinom der Patienten (pT Stadium, Gleason Grad, pN Status und chirurgische Resektionslinien) unseres Kollektivs. An diesem TMA wurde per Immunhistochemie der ERG-Expressionsstatus bei 9628 Patienten und bereits früher per Fluoreszenz-in situ Hybridisierung (FISH) der ERG-Break apart-Status bei 6106 Patienten (erweitert von Minner et al. 2013) erhoben. Außerdem wurde der Deletionsstatus von 5q21 bei 3057 (erweitert von Burkhardt et al. 2013), 6q15 bei 3528 (erweitert von Kluth et al. 2013), und PTEN bei 6130 (erweitert von Krohn et al. 2012), sowie 3p13 bei 7081 Patienten erhoben (erweitert von Krohn et al. 2013).

Tabelle 1 : Zusammensetzung des Tissue Micro Arrays mit 11.152 Prostatakarzinomproben

	Anzahl der Patienten	
	Patientenkohorte des TMA (n=11.152)	Biochemisches Rezidiv (n=1.824)
Follow-up (Monate)		
Mittelwert	53,4	-
Median	36,8	-
Alter (Jahre)		
<50	318	49
50-60	2.768	460
60-70	6.548	1.081
>70	1.439	232
Präoperatives PSA (ng/ml)		
<4	1.407	142
4-10	6.735	827
10-20	2.159	521
>20	720	309
pT Stadium (AJCC 2002)		
pT2	7.370	570
pT3a	2.409	587
pT3b	1.262	618
pT4	63	49
Gleason Grad		
≤3+3	2.859	193
3+4	1.565	573
4+3	6.183	849
≥4+4	482	208
pN Status		
pN0	6.117	1.126
pN+	561	291
Chirurgische Resektionslinien		
Negativ	8.984	1.146
Positiv	137	642

Aufgrund teilweise nicht vorhandener Daten ergibt die Summe der Einzelpositionen nicht immer 11.152 Patienten.

Abkürzung: AJCC, American Joint Committee on Cancer

TMA-Herstellung

Die TMA-Herstellung wurde durchgeführt wie beschrieben (Mirlacher and Simon 2010). Im Einzelnen wurde hierfür ein 0,6 µm Durchmesser große Nadel benutzt um tumorrepräsentatives Gewebe zu gewinnen. Diese Gewebeproben wurden dann auf 24 Objektträger verteilt, welche dann 144-522 Gewebeproben beinhalten. AMACR und 24BE12-Antikörper wurden an den Tumorgewebeproben zur Sicherung der Karzinomdiagnose immunhistologisch untersucht. Normales Prostatagewebe wurde in jedem TMA-Block für interne Kontrolluntersuchungen eingebettet. Die TMA Sammlung ist in Abbildung 1 dargestellt.

Immunhistochemie

Die verschiedene TMA-Schnitte wurden immunhistochemisch gefärbt. Als primärer Antikörper wurde ein MSH6-spezifischer Antikörper der Firma Abcam in einer 1/100 Dilution verwendet. Eine Deparafinisierung der Objektträger und eine Vorbehandlung für 5 Minuten bei 121 °C erfolgten in einem pH 6 Citrat-Puffer im Autoklav. Mit dem EnVision-Kit der Firma DAKO konnte die Reaktion des primären Antikörpers visualisiert werden. Die Auswertung für die Bestimmung der MSH6-Expression erfolgte semiquantitativ und wurde nach Färbintensität in vier Kategorien (negativ, schwach, moderat und stark) unterteilt.

Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit der JPM9 Software (SAS Institute INC., NC, USA). Kontingenztafeln und Chi-Quadrat-Tests wurden durchgeführt um Assoziationen zwischen molekularen Parametern und dem Tumorphänotyp nachzuweisen. Überlebensanalysen wurden graphisch durch Kaplan-Meier-Kurve untersucht, der Log-Rank-Test wurde angewendet um signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen aufzuzeigen. Zum Nachweis der statistischen Unabhängigkeit multipler pathologischer, molekularer und klinischer Variablen erfolgte eine COX-Regressions-Analyse. Als signifikant wurden p-Werte <0,05 gewertet.

Ergebnisse

MSH6-Expression beim Prostatakarzinom

Aufgrund eines kompletten Fehlens des Gewebes oder wegen nicht vorhandener oder nicht eindeutiger Tumorzellen im entsprechenden Probenareal, waren 4328 der Gewebeproben nicht auswertbar.

Es zeigte sich bei 89,5% der 6824 auswertbaren Prostatakarzinome ein positiver MSH6-Nachweis. Davon zeigten 15,4% eine schwache, 27,1% eine moderate und 47,0% eine starke MSH6-Expression (Tabelle 2). Normales Prostataepithel zeigt eine geringere Anfärbung mit meist geringe bis moderate immunhistochemische Anfärbung. Representative Befunde sind in Abbildung 1 dargestellt. Der Vergleich der MSH6-Expression mit klinisch-pathologischen Parametern zeigte Assoziationen eines hohen Expressionsniveaus mit einem fortgeschrittenem Tumorstadium ($p < 0,0001$), hohem Gleason-Grad ($p < 0,0001$) und positivem Lymphknotenstatus ($p < 0,0001$). Darüber hinaus war eine hohe MSH6-Expression auch grenzwertig mit einem positiven Resektionsrand assoziiert ($p = 0,0365$).

Tabelle 2 : MSH6-Expression und Tumorphänotyp.

	analysierbar (n)	negativ (%)	schwach (%)	moderat (%)	stark (%)	p-Wert
alle Tumore	6824	10,5	15,4	27,1	47,0	
Tumorstadium						
pT2	4224	12,12	17,05	27,46	43,37	<0.0001
pT3a	1649	8,98	13,1	26,93	51	
pT3b	872	5,85	11,58	25,57	57	
pT4	47	4,26	17,02	25,53	53,19	
Gleason Grad						
≤3+3	1395	17,06	18,85	26,59	37,49	<0.0001
3+4	3951	9,82	15,29	27,51	47,38	
4+3	1097	6,11	12,76	26,71	54,42	
≥4+4	342	5,85	10,53	24,85	58,77	
Lymphknoten						
N0	4063	9,87	14,62	26,9	48,61	<0.0001
N+	409	4,16	12,96	23,96	58,92	
Resektionsrand						
negative	5398	10,65	15,69	27,57	46,09	0.0365
positive	1292	9,44	14,24	25,77	50,54	

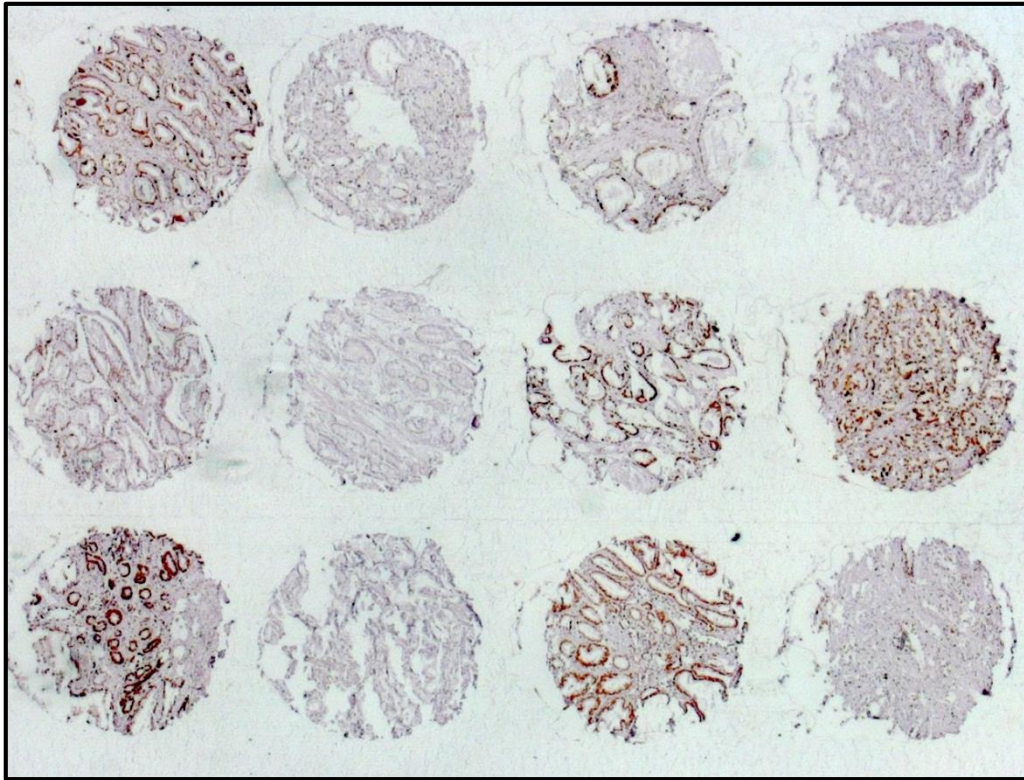


Abbildung 1: Übersicht der TMA Sammlung.

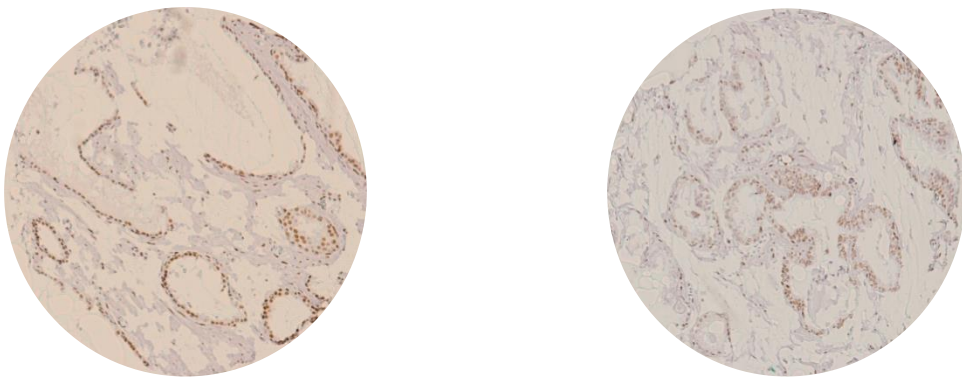


Abbildung 2: Immunhistochemische MSH6 Färbungen im normalen Prostatagewebe.

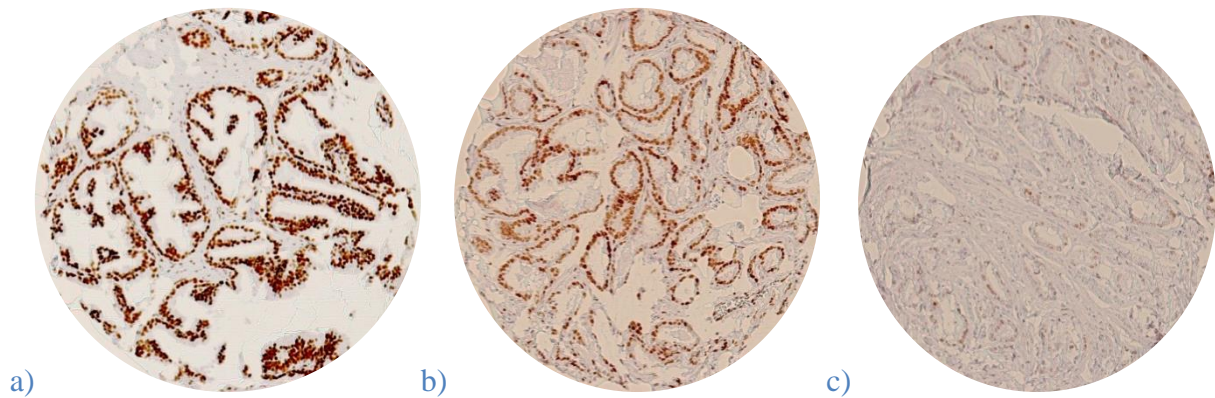


Abbildung 3: Immunhistochemische MSH6 Färbungen im Prostatakarzinom. a) stark
b) moderat und c) schwach.

Assoziation der MSH6 Expression mit dem ERG-Fusionsstatus

Um eine eventuelle Assoziation der MSH6-Expression mit dem ERG-Fusionsstatus zu erkennen, erfolgte die komparative Analyse des früher durch IHC und FISH –Analysen erhobenen ERG-Fusionsstatus mit der MSH6-Expression. Eine starke MSH6-Expression zeigte sich signifikant mit einer ERG-Fusion (FISH) und ERG-Expression (IHC) assoziiert ($p < 0,0001$). Eine starke MSH6-Expression war bei 66,5% der Fälle mit positiver ERG-Fusion nachweisbar, im Gegensatz dazu war lediglich bei 35% der Fälle ohne ERG-Fusion eine starke MSH6-Expression nachweisbar (Abbildung 4). Auch auf Proteinebene konnte diese Assoziation nachvollzogen werden. So zeigte sich, eine starke MSH6-Expression in 66,8% der Fälle mit positivem ERG-Nachweis aber nur bei 32,6% der ERG-negativen Tumoren (Abbildung 4). Aufgrund dieser erheblichen Expressionsunterschiede zwischen ERG-negativen und ERG-positiven Prostatakarzinomen wurden alle Beziehungen der MSH6 Expression mit dem Tumorphänotyp für ERG-positiven und ERG-negativen Tumoren separat berechnet. Dabei erwiesen sich die hochsignifikante Assoziation mit fortgeschrittenem pT-Stadium, hohem Gleason-Grad und dem Nachweis von Lymphknotenmetastasen (p jeweils $< 0,0001$) als weitgehend spezifisch für das ERG-negative Prostatakarzinom (Tabelle 3). Bei ERG-positiven Tumoren war die MSH6-Expression lediglich geringgradig mit einem hohen Gleason-Grad assoziiert ($p < 0,0017$, Tabelle 4).

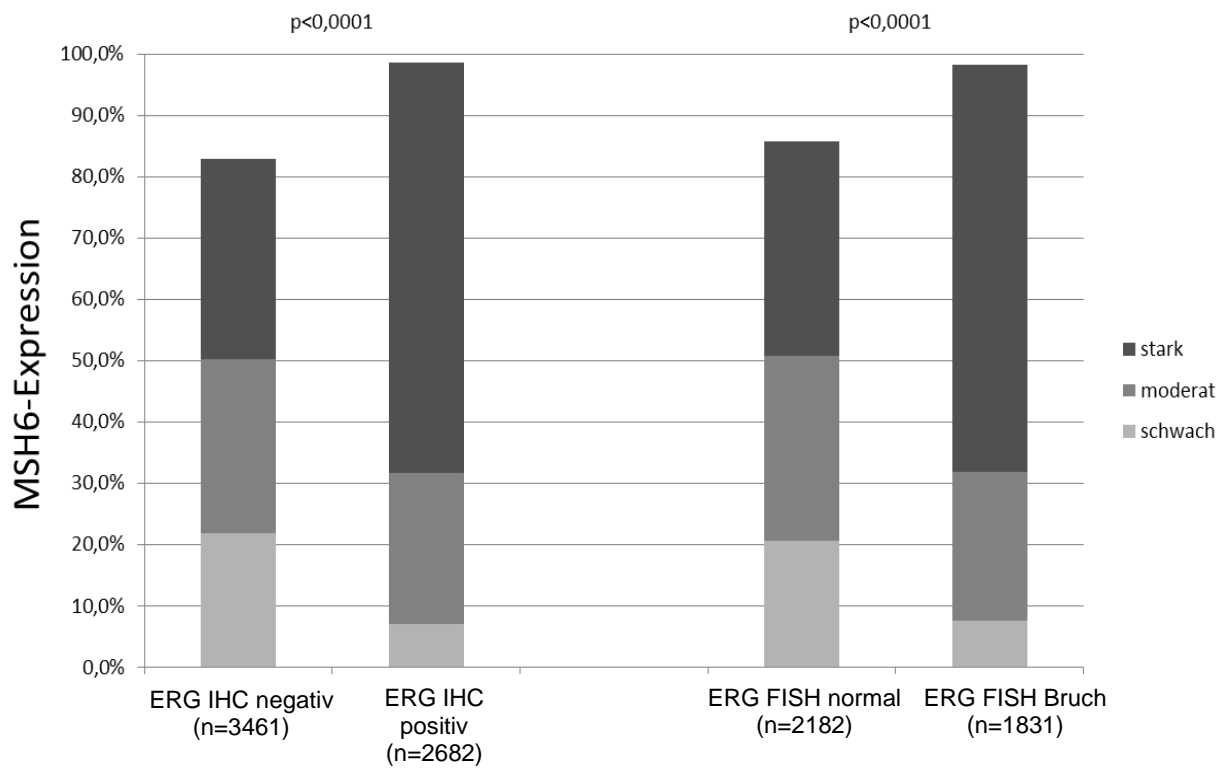


Abbildung 4: ERG-Fusionsstatus (IHC/FISH) und MSH6 Expression.

Tabelle 3: MSH6-Expression und Tumorphänotyp (ERG-negative Tumoren).

MSH-6	analysierbar (n)	negativ (%)	schwach (%)	moderat (%)	stark (%)	p-Wert
alle Tumore	3461	17,1	21,8	28,5	32,6	
Tumorstadium						
pT2	2241	18,88	23,56	28,16	29,41	<0,0001
pT3a	746	16,49	20,38	29,76	33,38	
pT3b	442	9,5	14,93	28,05	47,51	
pT4	20	5	25	30	40	
Gleason Grad						
≤3+3	669	28,25	25,86	23,62	22,27	<0,0001
3+4	1966	16,63	22,69	29,4	31,28	
4+3	595	9,58	17,48	31,26	41,68	
≥4+4	216	7,41	12,5	27,78	52,31	
Lymphknoten						
N0	2089	16,23	20,39	28,87	34,51	<0,0001
N+	200	6	16,5	28	49,5	
Resektionsrand						
negativ	2734	17,23	21,95	28,9	31,93	0,407
positiv	654	15,75	21,1	27,83	35,32	

Tabelle 4: MSH6-Expression und Tumorphänotyp (ERG-positive Tumoren).

MSH-6	analysierbar (n)	negativ (%)	schwach (%)	moderat (%)	stark (%)	p-Wert
alle Tumore	2682	1,5	7,0	24,7	66,8	
Tumorstadium						
pT2	1509	1,66	7,42	25,84	65,08	0,3689
pT3a	784	1,4	5,99	23,72	68,88	
pT3b	357	0,84	7,28	22,41	69,47	
pT4	18	5,56	5,56	11,11	77,78	
Gleason Grad						
≤3+3	515	2,14	9,9	29,13	58,83	0,0017
3+4	1625	1,29	6,09	24,74	67,88	
4+3	424	1,42	6,84	20,28	71,46	
≥4+4	100	2	6	18	74	
Lymphknoten						
N0	1615	1,49	7,43	23,72	67,37	0,8301
N+	177	1,69	8,47	20,9	68,93	
Resektionsrand						
negativ	2099	1,57	7,43	25,39	65,6	0,1166
positiv	536	1,31	5,41	22,57	70,71	

MSH6-Expression und andere genetische Defekte

Es konnte eine statistisch signifikante Assoziation des Deletionsstatus von PTEN und 3p13 mit einer hohen MSH6-Expression in allen Postatakarzinomen gezeigt werden (Abbildungen 5 und 7, $p < 0,0001$). Die Subgruppenanalyse machte aber deutlich, dass diese Assoziation im wesentlichen bzw. praktisch ausschliesslich durch die ERG-negativen Prostatakarzinome zustande ($p < 0,0001$, Abbildungen 5, 6 und 8).

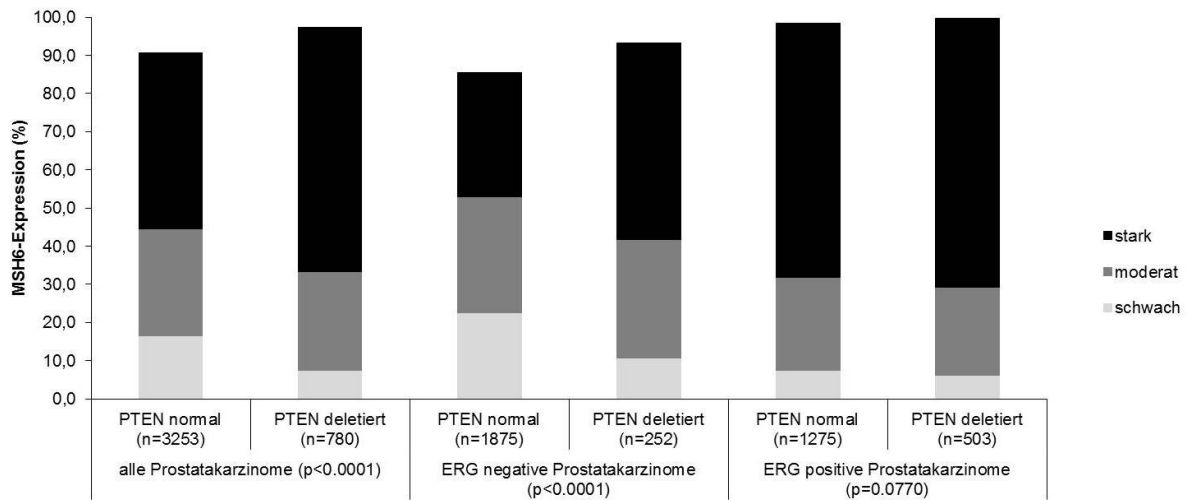


Abbildung 5: MSH6-Expression und PTEN-Deletionsstatus

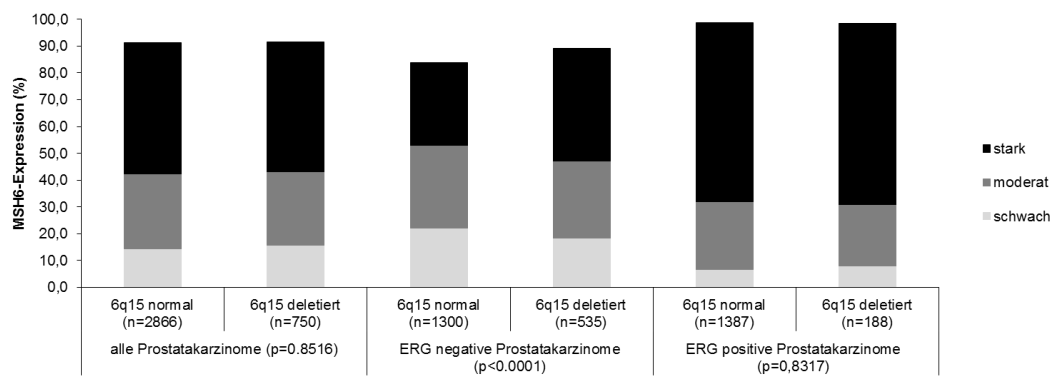


Abbildung 6: MSH6-Expression und Deletionsstatus von 6q15

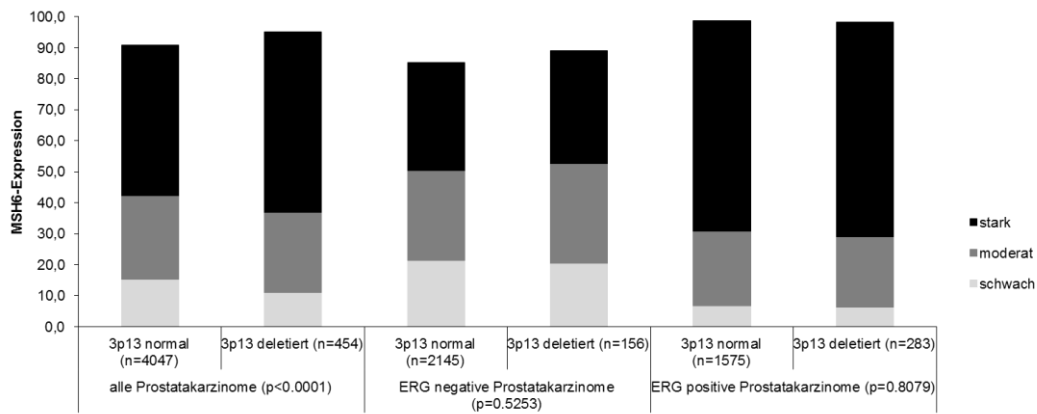


Abbildung 7: MSH6-Expression und Deletionsstatus von 3p13

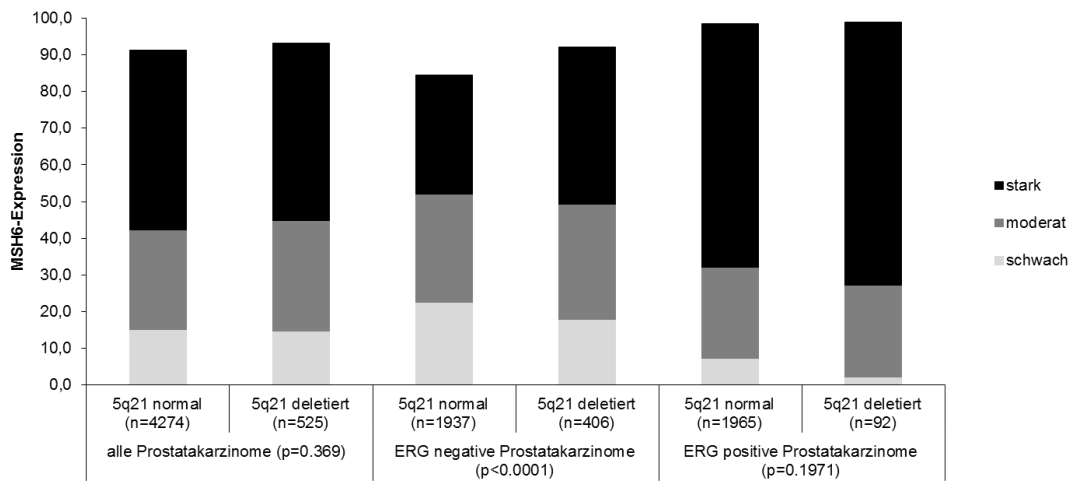


Abbildung 8: MSH6-Expression und Deletionsstatus von 5q21

Um die Hypothese zu testen, dass die MSH6-Expression bei steigender Zahl von Deletionen (3p13, 6q15, 5q21 und 10q23) ansteigt, wurde eine entsprechende Analyse durchgeführt. Tatsächlich ergab die Untersuchung einen signifikanten Zusammenhang bei allen Tumoren ($p < 0.0001$, Abbildung 9). Bei Subgruppenanalyse der ERG- negativen (Abbildung 10) und ERG- positiven Tumoren (Abbildung 11) fand sich diese Assoziation aber nur in der Gruppe der ERG-negativen Karzinome.

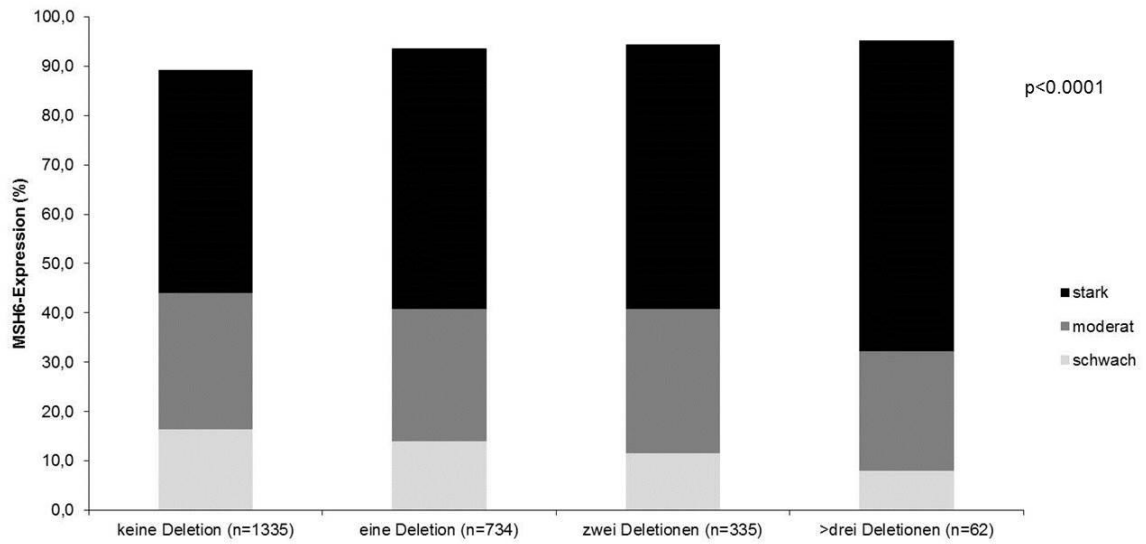


Abbildung 9: MSH6-Expression und Zahl der Deletionen (alle Tumoren)

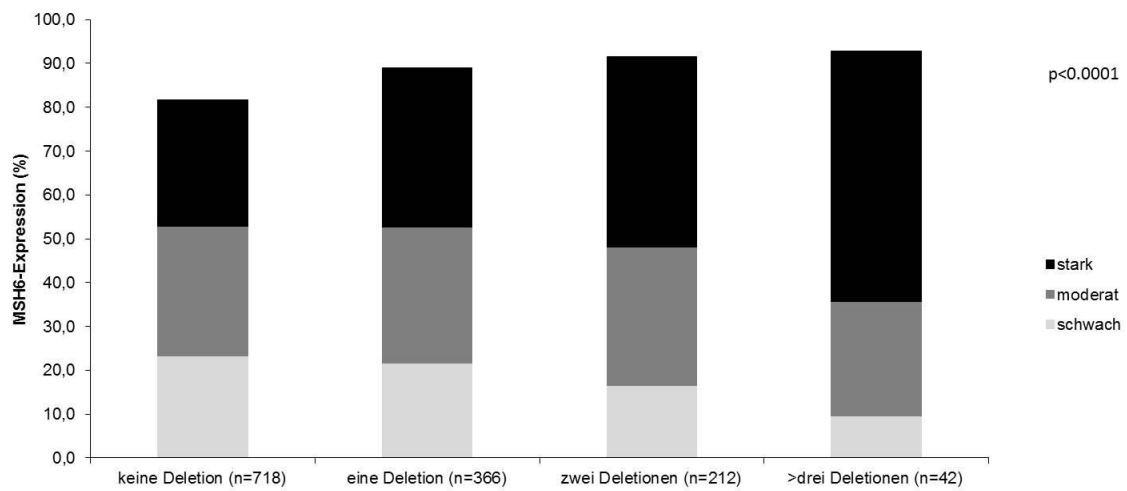


Abbildung 10: MSH6-Expression und Zahl der Deletionen (ERG-negative Tumoren)

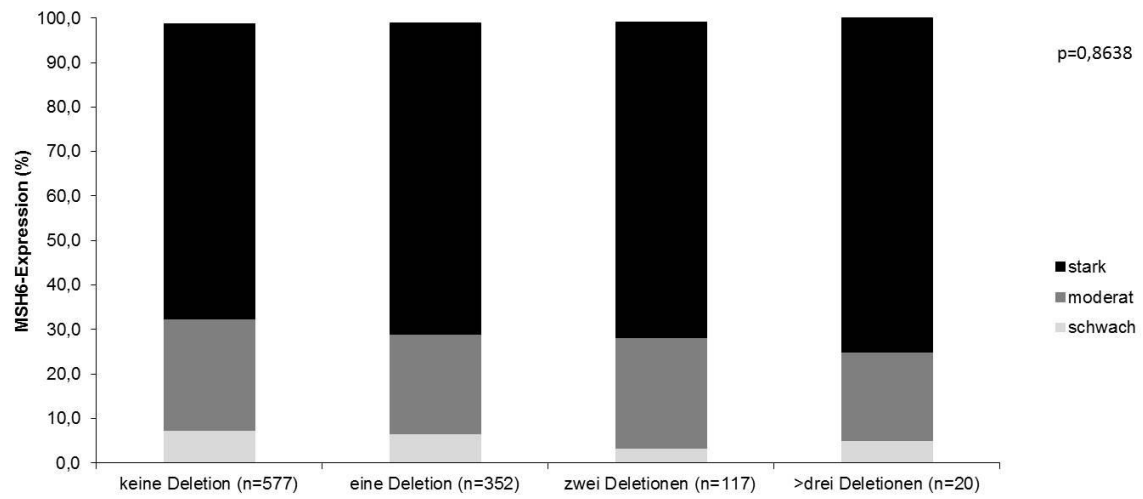


Abbildung 11: MSH6-Expression und Zahl der Deletionen (ERG-positive Tumoren)

Prognostische Relevanz

Verlaufsdaten waren bei 5917 MSH6 analysierbaren Patienten verfügbar. In der Kaplan-Meier-Analyse war ein hohes MSH6-Expressions-Niveau mit einem frühen PSA-Rezidiv in der Gesamtpopulation assoziiert ($p < 0,0001$), die wie die Graphiken zeigt, allein auf die ERG-negativen Tumoren zurückzuführen ist ($p < 0,0001$). Außerdem war in der Subgruppe der ERG-negativen/PTEN nicht deletierten Prostatakarzinome die MSH6-Expression prognostisch relevant ist ($p = 0,0007$). Wohingegen die MSH6-Expression bei den ERG-positiven Prostatakarzinomen keinen Einfluss auf die Prognose gezeigt hat ($p = 0,1004$).

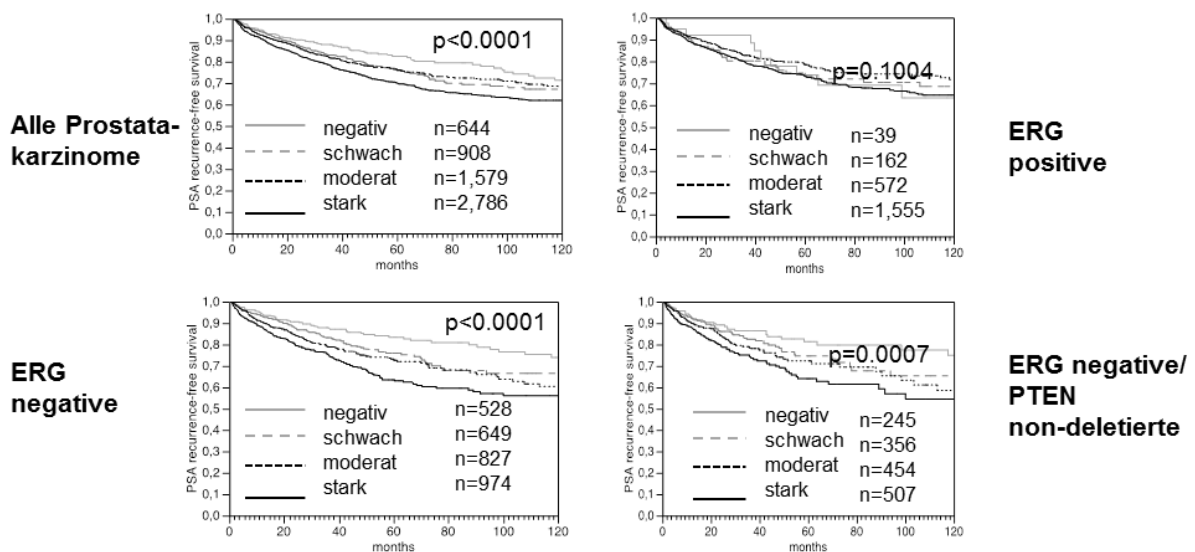


Abbildung 11: Kaplan-Meier-Analyse zum Einfluss der MSH6-Expression auf das PSA-Rezidiv, inklusive Log-Rank-Test und Stratifizierung nach Subgruppen

Multivariate Analyse

Zur multivariaten Analyse der klinischen Relevanz der MSH6-Expression erfolgte die Evaluation in verschiedenen Szenarios. Szenario 1 beinhaltet alle postoperativ verfügbaren Parameter, wie pT-, pN, den Gleason Grad und Resektionsrandstatus, sowie präoperatives PSA-Level im Serum. Szenario 2 beinhaltet ebenfalls alle postoperativ verfügbaren Parameter außer dem pN-Status. Grund für die Exklusion des Nodalstatus in dieser Analyse war, dass eine radikale Lymphadenektomie nicht bei allen Patienten durchgeführt wird, so dass nach Exklusion des pN-Status eine höhere Fallzahl zur statistischen Berechnung zur Verfügung steht. Die Szenarien 3 und 4 beinhalten oder simulieren präoperativ verfügbare Parameter. Szenario 3 beinhaltet das präoperative PSA-Level im Serum, das klinische Stadium cT und den Gleason Grad am Prostatektomie-Präparat. Szenario 4 beinhaltet neben den Parametern von Szenario 3, anstatt des postoperativen Gleason Grad, den Gleason Grad der Stanzbiopsie, da häufig Abweichung zwischen dem präoperativ beobachteten Gleason Grad und dem definitivem Gleason Grad des Prostatektomie-Präparates beobachtet wurden. Bei der Durchführung der multivariaten Analyse in der Subgruppe der ERG-negativen

Prostatakarzinome konnte teilweise ein Trend zu einer unabhängigen prognostischen Relevanz der MSH6-Expression gesehen werden. Dies galt insbesondere für die Szenarien 3 und 4.

Tabelle 5: Multivariate Analysen

a) Multivariate Analyse (alle Karzinome)

Szenario	n auswertbar	p -Wert							MSH6 Expression auf dem TMA
		präoperativer PSA-Level	pT Stadium	cT Stadium	Gleason-Grad Prostatektomie	Gleason Grad Biopsie	Lymphknoten- status	chirurgische Resektionslinien	
1	3.753	<0,0001	<0,0001	-	<0,0001	-	<0,0001	<0,0001	0,2081
2	5.771	<0,0001	<0,0001	-	<0,0001	-	-	<0,0001	0,2118
3	5,670	<0,0001	-	<0,0001	<0,0001	-	-	-	0,0242
4	5.582	<0,0001	-	<0,0001	-	<0,0001	-	-	0,0012

b) Multivariate Analyse (ERG-negative Karzinome)

Szenario	n auswertbar	p -Wert							MSH6 Expression auf dem TMA
		präoperativer PSA-Level	pT Stadium	cT Stadium	Gleason-Grad Prostatektomie	Gleason Grad Biopsie	Lymphknoten- status	chirurgische Resektionslinien	
1	1,907	0,0003	<0,0001	-	<0,0001	-	<0,0001	0,0042	0,3673
2	2.904	<0,0001	<0,0001	-	<0,0001	-	-	0,0006	0,3178
3	2.879	<0,0001	-	<0,0001	<0,0001	-	-	-	0,0145
4	2.838	<0,0001	-	0,0002	-	<0,0001	-	-	0,0015

c) Multivariate Analyse (ERG-positive Karzinome)

Szenario	n auswertbar	p -Wert							MSH6 Expression auf dem TMA
		präoperativer PSA-Level	pT Stadium	cT Stadium	Gleason-Grad Prostatektomie	Gleason Grad Biopsie	Lymphknoten- status	chirurgische Resektionslinien	
1	1.503	0,0274	<0,0001	-	<0,0001	-	0,0301	0,0039	0,5297
2	2.271	0,0008	<0,0001	-	<0,0001	-	-	<0,0001	0,5567
3	2.207	<0,0001	-	<0,0001	<0,0001	-	-	-	0,3105
4	2.169	<0,0001	-	<0,0001	-	<0,0001	-	-	0,087

Diskussion

In dieser Studie fand sich eine MSH-6-Expression in 89,5 % von 6824 untersuchten Karzinomen. Da MSH-6 immunhistochemisch mit dem gleichen Protokoll in normalem Prostataepithel meist nur eine geringe Anfärbung zeigte, kann postuliert werden, dass es in einem Teil der Prostatakarzinome zu einer „pathologisch“ gesteigerten MSH-6-Expression kommt. Nur zwei frühere Studien haben die Rolle von MSH-6 in Prostatakarzinomen untersucht (Grindedal et al. 2009 und Soravia et al. 2003). Beide Studien konnten keine MSH6-Expression darstellen. Diese Divergenzen sind gut durch Unterschiede in den immunhistochemischen Färbeprotokollen und bei der Auswahl der Antikörper zu erklären. In keiner der vorangegangenen Studien war der gleiche Antikörper wie in unserem Projekt (EPR3945 Abcam) verwendet worden und auch die Färbeprotokolle zeigten grundsätzliche Unterschiede im Vergleich zu dem in diesem Projekt verwendeten Vorgehen. Es ist gut bekannt, dass Variationen der Immunhistochemie-Protokolle zu großen Abweichungen bei den Ergebnissen immunhistochemischer Studien führen können. In einer Studie am Institut für Pathologie des UKE wurde der Anteil von P53-positiven Prostatakarzinomen durch Veränderungen der Protokolle von 5 auf 95% gesteigert (Schlomm et al. 2008).

Die starke Assoziation von MSH6-Expression mit einem ungünstigen Tumorphänotyp und einem erhöhtem Risiko eines PSA-Rezidivs ist ein relevanter neuer Befund. Die Prognose-Relevanz der MSH6-Expression passt aber zu Befunden anderer Proteine des Reparatur-Systems, wo eine Assoziation dieser mit einem erhöhten Tumor-Stadium, einem ungünstigen Tumorgrad und einer schlechten Patienten-Prognose beim Prostatakarzinom beschrieben wurden (Norris et al, 2009).

Die TMPRSS2-ERG Translokation ist die häufigste genomische Aberration bei Prostatakarzinomen und kommt in ca. 50 % der Fälle vor (Tomlins et al. 2005, Soller et al. 2006, Kumar-Sinha et al. 2008, Mosquera et al. 2009, Minner et al. 2013). Als Folge dieser Translokation kommt es zur Bildung eines Fusionsproteins welches in Prostataepithelzellen massiv überexprimiert wird (Tomlins et al. 2008). In ERG-aktivierten Zellen werden zahlreiche Gene aberrant exprimiert (Chakrabarti et al. 2002, Jeronimo et al. 2004, Lapointe et al. 2007, Cazares et al. 2010, Szczyrba et al. 2010, Taylor et al. 2010, Berger et al. 2011, Kim und Yu 2012). Die Daten unserer Studie zeigen, dass auch MSH6 zum Kreis der ERG-abhängigen Gene gehört. Am gleichen TMA wurden früher von unserer Arbeitsgruppe zahlreiche Gene gefunden, welche positiv mit dem ERG-Status assoziiert sind (Krohn et al. 2012, Burkhardt et al. 2013, Krohn et al. 2013, Kluth et al. 2013, Kluth et al. 2014). Da die positive Assoziation nicht nur immunhistochemisch, sondern auch mit der FISH-Methode zur Darstellung kommt, kann ein technisches Problem als Ursache der Assoziation ausgeschlossen werden. Technische Probleme müssen in immunhistochemischen Studien immer im Falle von positiven Assoziationen erwogen werden, da eine größere Menge von areaktiven Geweben zu einer Subpopulation von Fällen führen würden welche mit allen untersuchten Antikörpern ein negatives Ergebnis ergeben.

Ob eine vermehrte ERG-Expression in Prostataepithelzellen tatsächlich zu einer MSH6-Aktivierung führt ist nicht gesichert. Alternativ könnte MSH6 auch sekundär aktiviert werden in Zellen mit genomischen Aberrationen wie beispielsweise einer TMPRSS2-ERG-Translokation. Für eine reaktive MSH6-Überexpression als Folge genomischer

Veränderungen würde auch die signifikante Assoziation mit dem Vorliegen von Deletionen sprechen. Auch hier wäre denkbar, dass das Vorhandensein von einer oder mehreren genomischen Aberrationen zur einer Aktivierung von Reparatur-Mechanismen (einschließlich MSH6) führen könnte. Diese Hypothese würde auch die mangelnde Assoziation von MSH6 und Deletionen in der Subgruppe der ERG-positiven Karzinome erklären. Schließlich ist in ERG-positiven Tumoren MSH6 bereits aktiviert, so dass das zusätzliche Vorliegen einer weiteren genomischen Aberration zu keiner weiteren messbaren Steigerung der MSH6-Expression führen würde.

Unabhängig von den zugrunde liegenden Mechanismen darf konstatiert werden, dass die MSH6-Expression ein relevanter Prognosefaktor beim Prostatakarzinom ist. Diese Aussage ist trotz einer signifikanten methodischen Schwäche unserer Arbeit gültig. Die Schwäche betrifft die Tatsache, dass ein Patientenkollektiv untersucht wurde, bei dem die Prostatakarzinom-Erkrankung durch ein chirurgischen Angriff potentiell geheilt wurde, so dass der weitere Verlauf des Tumorleidens durch die Operation künstlich unterbrochen wurde. Optimalerweise würden Prognosefaktoren beim Prostatakarzinom an Stanzbiopsien untersucht werden, an denen ein Karzinom neu diagnostiziert worden ist und an Patienten, bei denen man sich nach der initialen Diagnose für eine abwartende nichtchirurgische Behandlung entschlossen hat (sog. „Active surveillance“). Aus praktischen Gründen sind derartige - wünschenswerte - Studien aber nicht möglich, da die initialen Prostatabiopsien von Patienten über das ganze Land verstreut in zahlreichen kleinen Pathologien-Instituten liegen und es eine fast unüberwindbare logistische Herausforderung wäre diese Proben zu sammeln. Wegen der Kleinheit der Prostata Tumoren an Stanzbiopsien und wegen deren geringem Durchmesser wäre die so aufwändig zusammengestellte Kohorte dann auch schon nach wenigen Studien aufgebraucht. Das von uns gewählte Verfahren Prognosefaktoren an Prostatektomie-Material zu untersuchen, ist somit in der Realität nicht zu verbessern. Immerhin hat unser Vorgehen den Vorteil, dass nur 0,6 mm große Gewebefragmente pro Patient zur Untersuchung kamen. Diese Situation simuliert in etwa eine molekulare Untersuchung an Prostatastanzen wo häufig auch nicht mehr Karzinomgewebe zur Verfügung steht. Wir postulieren deswegen, dass an TMA s erhobene ermittelte Prognosefaktoren auch an Prostatastanzbiopsien zur Anwendung kommen könnten.

Ein wesentlicher Aspekt unserer Studie ist auch eine erneute Demonstration der großen Bedeutung von Tissue Micro Arrays für die Evaluation von molekularen Parametern beim Prostatakarzinom. Mehr als 6000 Tumoren konnten in Rahmen dieses Projektes immunhistochemisch untersucht werden. In früheren Studien wurden am gleichen Tissue Micro Array oder an Unterkollektiven mehr als 100 molekulare Parameter untersucht. Dabei konnten alle etablierten Prognosefaktoren wie PTEN-Deletionen, P53-Veränderungen, 8p-Zugwinne und eine erhöhte Tumorpheriferation am Tissue Micro Array bestätigt werden (El Gammal et al. 2010, Krohn et al. 2012, Krohn et al. 2014, Kluth et al. 2014). Viele neue Prognosefaktoren wurden zudem an unserem Tissue Micro Array als solche identifiziert. Wir gehen davon aus, dass in Zukunft eine Kombination von Parametern – möglicherweise einschließlich MSH6 - zu einem klinisch belastbaren Prognosetest kombiniert werden könnte.

Zusammengefasst zeigen die Daten dieser Studie dass die Expression von MSH6 einen potentiell relevanten Prognoseparameter beim Prostatakarzinom darstellt. Die enge

Assoziation mit genomischen Aberrationen wie TMPRSS2-ERG-Fusion und chromosomalen Deletionen passt zu einer Aktivierung von MSH6 als Folge von genomischen Aberrationen.

Zusammenfassung

Beim Prostatakarzinom besteht ein großer Bedarf nach Prognosefaktoren, die dabei helfen die richtigen Therapieentscheidungen zu treffen. Die Analyse der MSH6-Expression ist in diesem Zusammenhang von Interesse, ist doch MSH-6 ein wichtiger Faktor bei der DNA-Reparatur. Eine aberrante MSH-6-Expression wird bei verschiedenen Tumoren beschrieben. Zur Klärung der Prognose-Relevanz der MSH-6-Expression wurde ein Tissue Micro Array bestehend aus 11.152 Prostatakarzinomen immunhistochemisch in einem Tissue Micro Array-Format auf MSH-6 überprüft. Insgesamt 6824 Gewebeproben waren auswertbar. Eine MSH6-Expression fand sich bei 89,5 % der Prostatakarzinome, wobei eine geringgradige Expression bei 15,4 %, eine mäßiggradige bei 27,1 % und eine starke Expression bei 47,0 % der Tumoren festgestellt wurde. In Normalgeweben wurde im Prostataepithel MSH-6 nur gering bis mäßiggradig exprimiert gefunden, so dass somit in einem Teil der Karzinome eine MSH-6-Überexpression vorliegt. Die MSH-6-Überexpression war hochsignifikant mit einem positivem ERG-Status assoziiert ($p < 0,0001$). Eine MSH-6-Expression fand sich in 82,9 % der ERG-negativen aber in 98,5 % der ERG-positiven Karzinome ($p < 0,0001$). Eine gesteigerte MSH6-Expression war signifikant mit einem hohen Gleason Grad, einem fortgeschrittenen Tumorstadium und auch mit einem positiven Nodalstatus assoziiert (p jeweils $< 0,0001$). Diese Beziehung war insbesondere in den ERG-negativen Tumoren zu sehen, fand sich aber auf einem geringeren Niveau auch in ERG-positiven Karzinomen. Eine vermehrte MSH-6 Expression war auch mit allen untersuchten Deletionen (3p, 5q, 6q, PTEN) assoziiert. Diese Assoziation war bei separater Betrachtung der ERG-positiven und ERG – negativen Tumoren allerdings nur in ERG–negativen Tumoren erkennbar. In allen Tumoren, und vor allem in ERG-negativen Karzinomen war eine zunehmende Steigerung der MSH6-Expression mit der Zahl der Deletionen zu sehen. Multivariate Analysen ergaben in Szenarien, welche nur die präoperativ vorhandenen Parameter in Erwägung zogen (PSA, Gleason Grad an der Stanzbiopsie, klinisches Stadium), eine unabhängige Prognoserelevanz der MSH6-Expression zumindest in ERG-negativen Tumoren. Insgesamt zeigen die Daten dieser Studie, dass ein erhöhter Expressions-Spiegel von MSH6 ein relevanter Prognosefaktor beim Prostatakarzinom ist und möglicherweise in Kombination mit anderen Parametern für die Routine-Evaluation von Prostatakarzinomen genutzt werden könnte. Die starke Assoziation der MSH-6-Expression mit chromosomalen Aberrationen wie Deletionen von 3p13, 5q21, 6q15, PTEN und der TMRSS2-ERG-Translokation spricht für einen Zusammenhang der MSH-6-Expression mit einer erhöhten genetischen Instabilität im Prostatakarzinom.

Literaturverzeichnis

- Aaltonen, L. A.; Peltomäki, P.; Leach, F. S.; Sistonen, P.; Pylkkänen, L.; Mecklin, J. P. et al. (1993): Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. In: *Science* 260 (5109), S. 812–816.
- Aysal, Anil; Karnezis, Anthony; Medhi, Irum; Grenert, James P.; Zaloudek, Charles J.; Rabban, Joseph T. (2012): Ovarian endometrioid adenocarcinoma: incidence and clinical significance of the morphologic and immunohistochemical markers of mismatch repair protein defects and tumor microsatellite instability. In: *The American journal of surgical pathology* 36 (2), S. 163–172. DOI: 10.1097/PAS.0b013e31823bc434.
- Bansal, Anju; Soni, Abha; Rao, Punita; Singh, L. C.; Mishra, Ashwani Kumar; Mohanty, N. K.; Saxena, Sunita (2012): Implication of DNA repair genes in prostate tumorigenesis in Indian males. In: *Indian J. Med. Res.* 136 (4), S. 622–632.
- Bauer, Christina M.; Ray, Anna M.; Halstead-Nussloch, Bronwen A.; Dekker, Robert G.; Raymond, Victoria M.; Gruber, Stephen B.; Cooney, Kathleen A. (2011): Hereditary prostate cancer as a feature of Lynch Syndrome. In: *Familial Cancer* 10 (1), S. 37–42. DOI: 10.1007/s10689-010-9388-8.
- Berger, Michael F.; Lawrence, Michael S.; Demichelis, Francesca; Drier, Yotam; Cibulskis, Kristian; Sivachenko, Andrey Y. et al. (2011): The genomic complexity of primary human prostate cancer. In: *Nature* 470 (7333), S. 214–220. DOI: 10.1038/nature09744.
- Burkhardt, Lia; Fuchs, Sarah; Krohn, Antje; Masser, Sawinee; Mader, Malte; Kluth, Martina et al. (2013): CHD1 is a 5q21 tumor suppressor required for ERG rearrangement in prostate cancer. In: *Cancer Res.* 73 (9), S. 2795–2805. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-1342.
- Carver, Brett S.; Tran, Jennifer; Gopalan, Anuradha; Chen, Zhenbang; Shaikh, Safa; Carracedo, Arkaitz et al. (2009): Aberrant ERG expression cooperates with loss of PTEN to promote cancer progression in the prostate. In: *Nat. Genet.* 41 (5), S. 619–624. DOI: 10.1038/ng.370.
- Cazares, L. H.; Drake, R. R.; Esquela-Kirscher, A.; Lance, R. S.; Semmes, O. J.; Troyer, D. A. (2010): Molecular pathology of prostate cancer. In: *Cancer Biomark* 9 (1-6), S. 441–459. DOI: 10.3233/CBM-2011-0181.
- Chakrabarti, Ratna; Robles, Liza D.; Gibson, Jane; Muroski, Megan (2002): Profiling of differential expression of messenger RNA in normal, benign, and metastatic prostate cell lines. In: *Cancer genetics and cytogenetics* 139 (2), S. 115–125.
- Chen, Y.; Wang, J.; Fraig, M. M.; Metcalf, J.; Turner, W. R.; Bissada, N. K. et al. (2001): Defects of DNA mismatch repair in human prostate cancer. In: *Cancer Res.* 61 (10), S. 4112–4121.
- D’Amico, Anthony V.; Whittington, Richard; Malkowicz, S. Bruce; Weinstein, Michael; Tomaszewski, John E.; Schultz, Delray et al. (2001): Predicting prostate specific antigen outcome preoperative in the prostate specific era. In: *The Journal of Urology* 166 (6), S. 2185–2188. DOI: 10.1016/S0022-5347(05)65531-0.
- Demark-Wahnefried, W.; Price, D. T.; Polascik, T. J.; Robertson, C. N.; Anderson, E. E.; Paulson, D. F. et al. (2001): Pilot study of dietary fat restriction and flaxseed supplementation in men with prostate cancer before surgery: exploring the effects on hormonal levels, prostate-specific antigen, and histopathologic features. In: *Urology* 58 (1), S. 47–52.

- Eble, John N.; Sauter, Guido, Epstein, Johnatan I.; Sesterhenn, Isabell A (2004): Tumors of the Prostate. In: Pathology and genetics of tumours of the urinary system and male genital organs. World Health Organisation, IARC Press, Frankreich. 162 - 164.
- Egawa, S.; Uchida, T.; Suyama, K.; Wang, C.; Ohori, M.; Irie, S. et al. (1995): Genomic instability of microsatellite repeats in prostate cancer: relationship to clinicopathological variables. In: *Cancer Res.* 55 (11), S. 2418–2421.
- El Gammal, Alexander T; Brüchmann, Michael; Zustin, Jozef; Isbarn, Hendrik; Hellwinkel, Olaf J C; Köllermann, Jens et al. (2010): Chromosome 8p deletions and 8q gains are associated with tumor progression and poor prognosis in prostate cancer. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 16 (1), S. 56–64. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-1423.
- Engel, Christoph; Loeffler, Markus; Steinke, Verena; Rahner, Nils; Holinski-Feder, Elke; Dietmaier, Wolfgang et al. (2012): Risks of less common cancers in proven mutation carriers with lynch syndrome. In: *J. Clin. Oncol.* 30 (35), S. 4409–4415. DOI: 10.1200/JCO.2012.43.2278.
- Fredriksson, H.; Ikonen, T.; Autio, V.; Matikainen, M. P.; Helin, H. J.; Tammela, T L J et al. (2006): Identification of germline MLH1 alterations in familial prostate cancer. In: *Eur. J. Cancer* 42 (16), S. 2802–2806. DOI: 10.1016/j.ejca.2006.04.024.
- Grindedal, Eli Marie; Møller, Pål; Eeles, Ros; Stormorken, Astrid Tenden; Bowitz-Lothe, Inger Marie; Landrø, Stefan Magnus et al. (2009): Germ-line mutations in mismatch repair genes associated with prostate cancer. In: *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 18 (9), S. 2460–2467. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-09-0058.
- Hsieh, Peggy; Yamane, Kazuhiko (2008): DNA mismatch repair: molecular mechanism, cancer, and ageing. In: *Mech. Ageing Dev.* 129 (7-8), S. 391–407. DOI: 10.1016/j.mad.2008.02.012.
- Ionov, Y.; Peinado, M. A.; Malkhosyan, S.; Shibata, D.; Perucho, M. (1993): Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. In: *Nature* 363 (6429), S. 558–561. DOI: 10.1038/363558a0.
- Jarzen, John; Diamanduros, Andrew; Scarpinato, Karin D. (2013) Mismatch Repair Proteins in Recurrent Prostate Cancer. In: *Advances in Clinical Chemistry*. Elsevier Inc. 65 - 84.
- Jemal, Ahmedin; Bray, Freddie; Center, Melissa M.; Ferlay, Jacques; Ward, Elizabeth; Forman, David (2011): Global cancer statistics. In: *CA Cancer J Clin* 61 (2), S. 69–90. DOI: 10.3322/caac.20107.
- Jerónimo, Carmen; Henrique, Rui; Hoque, Mohammad O.; Mambo, Elizabeth; Ribeiro, Franclim R.; Varzim, Graça et al. (2004): A quantitative promoter methylation profile of prostate cancer. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 10 (24), S. 8472–8478. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-04-0894.
- Kim, Jung; Yu, Jindan (2012): Interrogating genomic and epigenomic data to understand prostate cancer. In: *Biochimica et biophysica acta* 1825 (2), S. 186–196. DOI: 10.1016/j.bbcan.2011.12.003.
- King, Jennifer C.; Xu, Jin; Wongvipat, John; Hieronymus, Haley; Carver, Brett S.; Leung, David H. et al. (2009): Cooperativity of TMPRSS2-ERG with PI3-kinase pathway activation in prostate oncogenesis. In: *Nat. Genet.* 41 (5), S. 524–526. DOI: 10.1038/ng.371.
- Kluth, Martina; Harasimowicz, Silvia; Burkhardt, Lia; Grupp, Katharina; Krohn, Antje; Prien, Kristina et al. (2014): Clinical significance of different types of p53 gene alteration in

surgically treated prostate cancer. In: *International journal of cancer*. *Journal international du cancer* 135 (6), S. 1369–1380. DOI: 10.1002/ijc.28784.

Kluth, Martina; Hesse, Jana; Heidl, Anna; Krohn, Antje; Steurer, Stefan; Sirma, Hüseyin et al. (2013): Genomic deletion of MAP3K7 at 6q12-22 is associated with early PSA recurrence in prostate cancer and absence of TMPRSS2:ERG fusions. In: *Mod. Pathol.* 26 (7), S. 975–983. DOI: 10.1038/modpathol.2012.236.

Krohn, Antje; Diedler, Tobias; Burkhardt, Lia; Mayer, Pascale-Sophie; Silva, Colin de; Meyer-Kornblum, Marie et al. (2012): Genomic deletion of PTEN is associated with tumor progression and early PSA recurrence in ERG fusion-positive and fusion-negative prostate cancer. In: *Am. J. Pathol.* 181 (2), S. 401–412. DOI: 10.1016/j.ajpath.2012.04.026.

Krohn, Antje; Diedler, Tobias; Burkhardt, Lia; Mayer, Pascale-Sophie; Silva, Colin de; Meyer-Kornblum, Marie et al. (2012): Genomic deletion of PTEN is associated with tumor progression and early PSA recurrence in ERG fusion-positive and fusion-negative prostate cancer. In: *The American journal of pathology* 181 (2), S. 401–412. DOI: 10.1016/j.ajpath.2012.04.026.

Krohn, Antje; Freudenthaler, Fabian; Harasimowicz, Silvia; Kluth, Martina; Fuchs, Sarah; Burkhardt, Lia et al. (2014): Heterogeneity and chronology of PTEN deletion and ERG fusion in prostate cancer. In: *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 27 (12), S. 1612–1620. DOI: 10.1038/modpathol.2014.70.

Krohn, Antje; Seidel, Annemarie; Burkhardt, Lia; Bachmann, Frederic; Mader, Malte; Grupp, Katharina et al. (2013): Recurrent deletion of 3p13 targets multiple tumour suppressor genes and defines a distinct subgroup of aggressive ERG fusion-positive prostate cancers. In: *The Journal of pathology* 231 (1), S. 130–141. DOI: 10.1002/path.4223.

Kumar-Sinha, Chandan; Tomlins, Scott A.; Chinnaiyan, Arul M. (2008): Recurrent gene fusions in prostate cancer. In: *Nature reviews. Cancer* 8 (7), S. 497–511. DOI: 10.1038/nrc2402.

Langeberg, Wendy J.; Kwon, Erika M.; Koopmeiners, Joseph S.; Ostrander, Elaine A.; Stanford, Janet L. (2010): Population-based study of the association of variants in mismatch repair genes with prostate cancer risk and outcomes. In: *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 19 (1), S. 258–264. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-09-0800.

Lapointe, Jacques; Li, Chunde; Giacomini, Craig P.; Salari, Keyan; Huang, Stephanie; Wang, Pei et al. (2007): Genomic profiling reveals alternative genetic pathways of prostate tumorigenesis. In: *Cancer Res.* 67 (18), S. 8504–8510. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-0673.

Leach, Fredrick S. (2002): Microsatellite instability and prostate cancer: clinical and pathological implications. In: *Curr Opin Urol* 12 (5), S. 407–411.

Lynch, H. T.; de la Chapelle, A (1999): Genetic susceptibility to non-polyposis colorectal cancer. In: *Journal of medical genetics* 36 (11), S. 801–818.

Lynch, H. T.; Lynch, P. M.; Lanspa, S. J.; Snyder, C. L.; Lynch, J. F.; Boland, C. R. (2009): Review of the Lynch syndrome: history, molecular genetics, screening, differential diagnosis, and medicolegal ramifications. In: *Clinical genetics* 76 (1), S. 1–18. DOI: 10.1111/j.1399-0004.2009.01230.x.

Minner, Sarah; Gärtner, Michael; Freudenthaler, Fabian; Bauer, Melanie; Kluth, Martina; Salomon, Georg et al. (2013): Marked heterogeneity of ERG expression in large primary

prostate cancers. In: *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology*, Inc 26 (1), S. 106–116. DOI: 10.1038/modpathol.2012.130.

Mirlacher, Martina; Simon, Ronald (2010): Recipient block TMA technique. In: *Methods Mol. Biol.* 664, S. 37–44. DOI: 10.1007/978-1-60761-806-5_4.

Mosquera, Juan-Miguel; Mehra, Rohit; Regan, Meredith M.; Perner, Sven; Genega, Elizabeth M.; Bueti, Gerri et al. (2009): Prevalence of TMPRSS2-ERG fusion prostate cancer among men undergoing prostate biopsy in the United States. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 15 (14), S. 4706–4711. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-08-2927.

Murata, Hiroaki; Khatrar, Nada H.; Kang, Yuna; Gu, Liya; Li, Guo-Min (2002): Genetic and epigenetic modification of mismatch repair genes hMSH2 and hMLH1 in sporadic breast cancer with microsatellite instability. In: *Oncogene* 21 (37), S. 5696–5703. DOI: 10.1038/sj.onc.1205683.

Murphy, Megan A.; Wentzensen, Nicolas (2011): Frequency of mismatch repair deficiency in ovarian cancer: a systematic review This article is a US Government work and, as such, is in the public domain of the United States of America. In: *Int. J. Cancer* 129 (8), S. 1914–1922. DOI: 10.1002/ijc.25835.

Myers, M. P.; Stolarov, J. P.; Eng, C.; Li, J.; Wang, S. I.; Wigler, M. H. et al. (1997): P-TEN, the tumor suppressor from human chromosome 10q23, is a dual-specificity phosphatase. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (17), S. 9052–9057.

Norris, Alixanna M.; Gentry, Michael; Peehl, Donna M.; D'Agostino, Ralph; Scarpinato, Karin D. (2009): The elevated expression of a mismatch repair protein is a predictor for biochemical recurrence after radical prostatectomy. In: *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 18 (1), S. 57–64. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-08-0377.

Pande, Mala; Wei, Chongjuan; Chen, Jinyun; Amos, Christopher I.; Lynch, Patrick M.; Lu, Karen H. et al. (2012): Cancer spectrum in DNA mismatch repair gene mutation carriers: results from a hospital based Lynch syndrome registry. In: *Fam. Cancer* 11 (3), S. 441–447. DOI: 10.1007/s10689-012-9534-6.

Peltomäki, P.; Aaltonen, L. A.; Sistonen, P.; Pylkkänen, L.; Mecklin, J. P.; Järvinen, H. et al. (1993): Genetic mapping of a locus predisposing to human colorectal cancer. In: *Science* 260 (5109), S. 810–812.

Perner, Sven; Mosquera, Juan-Miguel; Demichelis, Francesca; Hofer, Matthias D.; Paris, Pamela L.; Simko, Jeff et al. (2007): TMPRSS2-ERG fusion prostate cancer: an early molecular event associated with invasion. In: *The American journal of surgical pathology* 31 (6), S. 882–888. DOI: 10.1097/01.pas.0000213424.38503.aa.

Robert Koch Institut (2013) ICD-10 C61 URL: <http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Prostatakrebs/prostatakrebs.html>. [Stand 23.08.2014, 10.55]

S3-Leitlinie Prostatakarzinom, Version 2.0, 1. Aktualisierung 2011. Deutschland [online im Internet] URL: <http://www.dgu.de/index.php?id=113&frame=leitlinieebphdiag.pdf> [Stand 23.08.2014, 10.43]

Schlomm, Thorsten; Iwers, Liv; Kirstein, Patrick; Jessen, Birte; Köllermann, Jens; Minner, Sarah et al. (2008): Clinical significance of p53 alterations in surgically treated prostate

- cancers. In: *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology*, Inc 21 (11), S. 1371–1378. DOI: 10.1038/modpathol.2008.104.
- Segev, Yakir; Pal, Tuya; Rosen, Barry; McLaughlin, John R.; Sellers, Thomas A.; Risch, Harvey A. et al. (2014): Risk factors for ovarian cancers with and without microsatellite instability. In: *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society* 24 (4), S. 664–669. DOI: 10.1097/IGC.000000000000134.
- Simon, R. (2002): Tissue microarrays for miniaturized high-throughput molecular profiling of tumors. In: *Experimental Hematology* 30 (12), S. 1365–1372. DOI: 10.1016/S0301-472X(02)00965-7.
- Soller, Maria Johansson; Isaksson, Margareth; Elfving, Peter; Soller, Wolfgang; Lundgren, Rolf; Panagopoulos, Ioannis (2006): Confirmation of the high frequency of the TMPRSS2/ERG fusion gene in prostate cancer. In: *Genes, chromosomes & cancer* 45 (7), S. 717–719. DOI: 10.1002/gcc.20329.
- Soravia, Claudio; van der Klift, Heleen; Bründler, Marie-Anne; Blouin, Jean-Louis; Wijnen, Juul; Hutter, Pierre et al. (2003): Prostate cancer is part of the hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) tumor spectrum. In: *Am. J. Med. Genet. A* 121A (2), S. 159–162. DOI: 10.1002/ajmg.a.20106.
- Szczyrba, Jaroslaw; Löprich, Elke; Wach, Sven; Jung, Volker; Unteregger, Gerhard; Barth, Stephanie et al. (2010): The microRNA profile of prostate carcinoma obtained by deep sequencing. In: *Molecular cancer research : MCR* 8 (4), S. 529–538. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-09-0443.
- Tanaka, Yuichiro; Zaman, Mohd S.; Majid, Shahana; Liu, Jan; Kawakami, Kazumori; Shiina, Hiroaki et al. (2009): Polymorphisms of MLH1 in benign prostatic hyperplasia and sporadic prostate cancer. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 383 (4), S. 440–444. DOI: 10.1016/j.bbrc.2009.04.025.
- Taylor, Barry S.; Schultz, Nikolaus; Hieronymus, Haley; Gopalan, Anuradha; Xiao, Yonghong; Carver, Brett S. et al. (2010): Integrative genomic profiling of human prostate cancer. In: *Cancer Cell* 18 (1), S. 11–22. DOI: 10.1016/j.ccr.2010.05.026.
- Thibodeau, S. N.; Bren, G.; Schaid, D. (1993): Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. In: *Science* 260 (5109), S. 816–819.
- Tomlins, Scott A.; Laxman, Bharathi; Varambally, Sooryanarayana; Cao, Xuhong; Yu, Jindan; Helgeson, Beth E. et al. (2008): Role of the TMPRSS2-ERG Gene Fusion in Prostate Cancer. In: *Neoplasia* 10 (2), S. 177–IN9. DOI: 10.1593/neo.07822.
- Tomlins, Scott A.; Rhodes, Daniel R.; Perner, Sven; Dhanasekaran, Saravana M.; Mehra, Rohit; Sun, Xiao-Wei et al. (2005): Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. In: *Science* 310 (5748), S. 644–648. DOI: 10.1126/science.1117679.
- Win, Aung Ko; Lindor, Noralane M.; Young, Joanne P.; Macrae, Finlay A.; Young, Graeme P.; Williamson, Elizabeth et al. (2012): Risks of primary extracolonic cancers following colorectal cancer in lynch syndrome. In: *J. Natl. Cancer Inst.* 104 (18), S. 1363–1372. DOI: 10.1093/jnci/djs351.

Danksagung

Zunächst möchte ich mich an dieser Stelle bei all denjenigen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben:

Prof. Sauter, Prof. Graefen, Martina Kluth, Dr. med Linnewedel, PD. Dr Simon, Dr. med. Burdelski, Frau Nilda Mercedes Colombo und das Labor-Forschungsteam unter der Leitung von Frau Christina Koop.

Lebenslauf

Lebenslauf entfällt aus Datenschutztechnischen Gründen.

Veröffentlichte Publikationen

Baldessari, Carlos Martín; Martínez, Pablo; **Noriega, María de las Mercedes**; Secin, Fernando Pablo; Marrugat, Rodolfo Emilio; Avagnina, Alejandra; Rovegno, Agustín Roberto (2010): Aportes para la elección de una conducta terapéutica en masas quísticas renales multiloculadas. Contributions for the election of a therapeutic conduct in multiloculated renal cystic masses. In: *Revista Argentina de Urología* 75 (1), S. 28-33.

Baldessari, Carlos Martín; Martínez, Pablo; **Noriega, María de las Mercedes**; Secin, Fernando Pablo; Marrugat, Rodolfo Emilio; Avagnina, Alejandra; Rovegno, Agustín Roberto (2010): Linfoma de Burkitt Vesical. Vesical Burkitt's lymphoma. In: *Revista Argentina de Urología* 75 (1), S. 34-36.

Kostianovsky, Alex; Maskin, Patricio; **Noriega, María de las Mercedes**; Soler, Cristina; Bonelli, Ignacio; Claire, S Riley; Kevin, C. O'Connor; Cristián, López Saubidet; Paulino, A Alvarez (2011): Acute demyelinating disease after use of oral therapy with herbal extract. In: *Case Rep Neurol* 3, S. 141–146.

Mazzuocolo, Luis; Noguera, Monica; **Noriega, María de las Mercedes**; Stengel, Fernando (2010): Psoriasis fotoinducida. Comunicación de un caso y revisión de la literatura. Fotoinduced psoriasis: Case report and review of the literature. In: *Arch. Argent. Dermatol.* 60, S. 205-207.

Mazzuocolo, Luis Daniel; Tiscornia, Jorge; González, Pablo; **Noriega, María de las Mercedes**; Kien, Cristina; Abeldaño, Alejandra (2011): Neoplasia de células dendríticas plasmocitoides blásticas. Presentación de dos casos y revisión de la literatura. Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm. A report of two cases and review of the literature. In: *Dermatologia Argentina* 17(1), S. 63-66.

Noriega, María de las Mercedes; Paesani, Fernando; Perazzo, Florencia; Lago, Néstor; Krupitzki, Hugo; Nieto, Silvana et al. (2012): Immunohistochemical characterization of neoplastic cells of breast origin. In: *Diagnostic pathology* 7, S. 73. DOI: 10.1186/1746-1596-7-73.

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: