

Bedeutung und Charakterisierung der 6q-Deletion beim Prostatakarzinom

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.) am Department Biologie der Fakultät
Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
der Universität Hamburg

**Vorgelegt von
Martina Kluth
Heide-Holstein**

Hamburg 2015

Gutachter der Dissertation

Prof. Dr. Guido Sauter

Prof. Dr. Thomas Dobner

Datum der Disputation: 22.01.2016

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Epidemiologie und Ätiologie des Prostatakarzinoms	1
1.2	Früherkennung und Primärdiagnostik des Prostatakarzinoms	2
1.2.1	Digitale rektale Untersuchung (DRU)	3
1.2.2	Prostata-spezifisches Antigen (PSA)	3
1.2.3	Stanzbiopsie der Prostata	5
1.3	Pathologie und Stadieneinteilung des Prostatakarzinoms	5
1.4	Therapie des Prostatakarzinoms	7
1.5	Prognosemarker beim Prostatakarzinom	11
1.6	Genomische Veränderungen beim Prostatakarzinom	12
1.6.1	Punktmutation	12
1.6.2	Chromosomale Zugewinne	12
1.6.3	Translokationen	13
1.6.4	Deletionen	14
1.7	Die 6q-Deletion beim Prostatakarzinom	15
1.7.1	Prävalenz der 6q-Deletion beim Prostatakarzinom	15
1.7.2	Assoziation der 6q-Deletion mit dem Tumorphänotyp und der Prognose des Prostatakarzinoms	15
1.7.3	Architektur der 6q-Deletion	16
1.7.4	Potentielle Tumorsuppressorgene der 6q-Deletion	19
1.8	Zielsetzung der Arbeit	20
2	Material	23
2.1	Gewebekollektiv	23

2.2	Prostata-Prognose-Array	23
2.3	Prostata-Heterogenitätsarray	26
2.3.1	Multifokaler Prostata-Heterogenitätsarray	26
2.3.2	Unifokaler Prostata-Heterogenitätsarray	27
2.4	DH10B <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>) Klone für die Herstellung von Fluoreszenz- markierten Sonden	28
2.5	Humane Zelllinien	29
2.6	shRNA-pLKO.1 transformierte <i>E. coli</i> Klone	29
2.7	Plasmide zur Produktion von lentiviralen Partikeln	31
2.8	TaqMan®-Sonden	31
2.9	Western Blot Antikörper	34
2.10	Zellkulturmedien für humane Zelllinien	34
2.11	Reagenzien und Kits	35
2.12	Verwendete Lösungen	38
2.13	Geräte	39
2.14	Materialien	41
2.15	Software und Datenbanken	41
3	Methoden	42
3.1	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung (FISH)	42
3.1.1	Kultivierung von pBACe3.6 transformierten DH10B <i>E. coli</i>	42
3.1.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus DH10B <i>E. coli</i>	43
3.1.3	Bestimmung der Konzentration und Reinheit von DNA-Proben	44
3.1.4	Nick Translation zur Herstellung von FISH-Sonden	44
3.1.5	Isolierung und Aufreinigung von FISH-Sonden	45
3.1.6	Durchführung der FISH	46
3.1.7	Mikroskopische Auswertung	48
3.1.8	Statistische Auswertung	49
3.2	Zellkulturmethoden	49
3.2.1	Kultivierung von humanen Zelllinien	50
3.2.2	Kryokonservierung von humanen Zelllinien	50
3.2.3	Bestimmung der Zellkonzentration	51
3.2.4	Kultivierung von shRNA-pLKO.1 transformierten <i>E. coli</i>	51
3.2.5	Isolierung von shRNA-Konstrukten aus <i>E. coli</i>	52

3.2.6	Transfektion von Prostata-(karzinom)Zelllinien mit Lipofectamin [®] 2000	52
3.2.7	Produktion von lentiviralen Partikeln in 293T-Zellen	53
3.2.8	Transduktion von Prostata-(karzinom)Zelllinien mit lentiviralen Partikeln	55
3.2.9	Colony-Formation-Assay	55
3.2.10	Softagar-Colony-Formation-Assay	57
3.2.11	Invasion-Assay	58
3.3	Expressionsanalysen	59
3.3.1	RNA-Präparation	59
3.3.1.1	RNA-Isolierung aus mikrodisezierten Prostataepithelzellen	60
3.3.1.2	RNA-Isolierung aus kryokonservierten Gewebegroßflächen .	61
3.3.1.3	RNA-Isolierung aus Prostata-(karzinom)zellen nach Qiagen .	62
3.3.1.4	RNA-Isolation aus Prostata-(karzinom)zellen nach Machery-Nagel	62
3.3.2	Bestimmung der Konzentration und Reinheit von RNA-Proben . . .	63
3.3.3	Bestimmung der RNA-Integritätszahl (RIN)	63
3.3.4	Reverse Transkription	64
3.3.5	TaqMan [®] -PCR	64
3.3.6	Proteinpräparation aus Prostata-(karzinom)zellen	65
3.3.7	Bestimmung der Proteinkonzentration	66
3.3.8	Western Blot	66
4	Ergebnisse	69
4.1	Untersuchungen des 6q15 (<i>MAP3K7</i>) Locus mittels FISH am Prognose-TMA	69
4.1.1	Auswertbarkeit der 6q15 FISH-Analyse	69
4.1.2	Prävalenz und Assoziation der 6q15-Deletion zum Tumorphänotyp	70
4.1.2.1	Prävalenz der 6q15-Deletion	70
4.1.2.2	Assoziation der 6q15-Deletion mit den klinisch-pathologischen Parametern des Prostatakarzinoms	70
4.1.2.3	Assoziation der 6q15-Deletion mit der Zellproliferation (Ki67 Labeling Index)	73

4.1.3	Assoziation der 6q15-Deletion mit der Prognose des Patienten beim Prostatakarzinom	75
4.1.3.1	Assoziation der 6q15-Deletion mit dem Auftreten eines PSA-Rezidivs	75
4.1.3.2	Assoziation der 6q15-Deletion mit biologisch-klinischen Endpunktgruppen	79
4.1.4	Assoziation der 6q15-Deletion mit häufigen genomischen Veränderungen des Prostatakarzinoms	82
4.1.4.1	Assoziation der 6q15-Deletion mit der <i>TMPRSS2:ERG</i> Fusion	82
4.1.4.2	Assoziation der 6q15-Deletion mit weiteren häufigen Deletionen des Prostatakarzinoms	83
4.2	Untersuchungen der 6q-Deletionsgröße mittels FISH am Prognose-TMA . . .	85
4.2.1	Auswertbarkeit der 6q FISH-Analyse	85
4.2.2	Prävalenz und Assoziation der unterschiedlichen 6q-Deletionsgrößen zum Tumorphänotyp	86
4.2.2.1	Prävalenz der unterschiedlichen 6q-Deletionsgrößen	86
4.2.2.2	Assoziation der unterschiedlichen 6q-Deletionsgrößen mit den klinisch-pathologischen Parametern des Prostatakarzinoms .	87
4.2.2.3	Assoziation der unterschiedlichen 6q-Deletionsgrößen mit der Zellproliferation (Ki67 Labeling Index)	89
4.2.3	Assoziation der unterschiedlichen 6q-Deletionsgrößen mit der Prognose des Patienten beim Prostatakarzinom	91
4.2.3.1	Assoziation der unterschiedlichen 6q-Deletionsgrößen mit dem Auftreten eines PSA-Rezidivs	91
4.2.3.2	Assoziation der 6q-Deletionsgröße mit biologisch-klinischen Endpunktgruppen	93
4.2.4	Assoziation der 6q-Deletionsgröße mit der <i>TMPRSS2:ERG</i> Fusion . .	94
4.3	Untersuchungen des 6q15 (<i>MAP3K7</i>) Locus mittels FISH am multifokalen Heterogenitäts-TMA	95
4.3.1	Auswertbarkeit der 6q15-Heterogenitätsanalyse mittels FISH	95
4.3.2	Heterogenität der 6q15-Deletion	96
4.3.3	Chronology der Entstehung einer 6q15-Deletion und der <i>TMPRSS2:ERG</i> Fusion	97

4.4	Untersuchungen zur 6q-Deletionsgröße mittels FISH am unifokalen Heterogenitäts-TMA	98
4.4.1	Auswertbarkeit der 6q-FISH-Analyse und Prävalenz der 6q-Deletion	98
4.4.2	Ausdehnung der 6q-Deletion während der Tumorprogression	99
4.5	Identifizierung potentieller Tumorsuppressorgene	
	<i>in vitro</i>	102
4.5.1	Expression und Auswahl von Kandidatengenen innerhalb der 6q12-q22-Deletion	102
4.5.1.1	Expression von 43 Genen innerhalb der 6q14-q16 Region in 6 Prostata-Zelllinien	102
4.5.1.2	Expression von 43 Genen innerhalb der 6q14-q16 Region in mikrodisszierten benignen Prostatadrüsengewebe	103
4.5.1.3	Expression von 13 Genen außerhalb der 6q14-q16 Region in 4 Prostata-Zelllinien	104
4.5.2	Auswahl der optimalen shRNA-Konstrukte für die Suppression der Kandidatengene innerhalb der 6q12-q22-Deletion	105
4.5.3	Einfluss der lentiviralen Transduktion auf die shRNA-vermittelte Suppression der mRNA (Depletionseffizienz)	107
4.5.4	Einfluss der lentiviralen Transduktion auf die shRNA-vermittelte Suppression auf Proteinebene (Depletionseffizienz)	108
4.5.5	Quantifizierung des Suppressions-bedingten Einflusses der Kandidatengene auf das Zellwachstum im Colony-Formation-Assay	109
4.5.6	Validierung der potentiellen Zielgene der 6q12-q22-Deletion im Colony-Formation-Assay	119
4.5.7	Auswirkungen der Ko-Depletion der vier potentiellen Tumorsuppressorgene auf das Wachstumsverhalten von Prostatazellen	121
4.5.7.1	Nachweis der Ko-Depletion auf mRNA-Ebene	121
4.5.7.2	Auswirkungen der Ko-Depletion auf das Zellkoloniebildungsvermögen	123
4.5.7.3	Auswirkungen der Ko-Depletion auf das verankerungsunabhängige Zellwachstum	125
4.5.7.4	Auswirkungen der Ko-Depletion auf die Fähigkeit des invasiven Zellwachstums	127

5 Diskussion	128
6 Zusammenfassung	148
7 Abstract	151
Literaturverzeichnis	I
A Auflistung der gestesten shRNA-Konstrukte	XVI
B Affymetrix-Chip-Analyse	XXII
C shRNA-Konstrukttest	XXV
D Validierung der shRNA-Konstrukte	XXVII
E Validierung der potentiellen Zielgene der 6q12-q22-Deletion	XXIX
Abbildungsverzeichnis	XXIX
Tabellenverzeichnis	XXXI
Publikationen und Kongresse	XXXIV
Danksagung	XXXV
Eidesstattliche Versicherung	XXXVI

Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption
aCGH	array based comperative genomic hybridization / Array-basierte komperative genomische Hybridisierung
ad	auffüllen auf
ANOVA	analysis of variance / Varianzanalyse
ATCC	American Type Culture Collection
BAC	Bacterial Artificial Chromosome / bakterielles artifizielles Chromosom
BPH	benigne Prostatahyperplasie
c	clinical / klinisch
cDNA	complementary DNA / komplementäre DNS
CDS	coding DNA sequence / kodierende DNA-Sequenz
°C	Grad Celcius
CGH	comperative genomic hybridization / komperative genomische Hybridisierung
CO₂	Kohlenstoffdioxid
Cot	concentration time / Konzentration und Zeit
cPSA	complex PSA / komplexiertes PSA
CT	Computertomographie
C_T	Cycle Treshold / Zyklus-Schwellenwert
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH₂O	destilliertes Wasser
DHT	Dihydrotestosteron
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid / Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DRU	Digital rektale Untersuchung
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
E. coli	Escherichia coli
FCS	Fetal Bovine Serum
FFPE	Formalin-fixiert und Paraffin-eingebettet
FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
fPSA	free PSA / freies PSA
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
GFP	grün fluoreszierendes Protein
Gy	Gray
HE	Hämatoxylin-Eosin
HDR	high-dose rate / hohe Dosisrate
Kb	Kilobasen
K-SFM	Keratinocyte Serum-free Medium
l	Liter
LB	Lysogeny Broth
LDR	low-dose rate / geringe Dosisrate
LOH	loss of heterozygosity / Verlust der Heterozygotie
m	Milli
m	Meter
M	Molar
μ	Mikro
Mb	Megabasen
MEM	Minimum Essential Medium
mRNA	messenger ribonucleic acid / Boten-Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
n	Nano
NEAA	Non essential amino acid / nicht-essentielle Aminosäuren
neg	Negativ
NGS	Next Generation Sequencing / Sequenzierung der nächsten Generation
NP40	Nonylphenolethoxylat 40
p	Plasmid
p	pathological/pathologisch
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	polymerase chain reaction / Polymerasekettenreaktion
PEI	Polyethylenimin
PenStrep	Penicillin und Streptomycin

PET	Polyethylenterephthalat
PIN	Prostatische intraepitheliale Neoplasie
PSA	Prostataspezifisches Antigen
PSAD	PSA density / PSA-Dichte
PSATZD	PSA pro Volumen der tranzitionalen Zone
pST	perkutane Strahlentherapie
RIN	RNA integrity number / RNS Integritätszahl
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	ribonucleic acid / Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	revolutions per minute / Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
shRNA	Small hairpin ribonucleic acid / kleine haarnadelförmige Ribonukleinsäure
SNP	single nucleotide polymorphism / einzelner Nukleotidpolymorphismus
SSC	Sodium/Sodiumcitrat / Natrium/Natriumcitrat
Taq	thermus aquaticus
TMA	tissue micro array / Gewebemikroarray
TNM	Tumor, Nodal (Lymphknoten), Metastasen
tPSA	total PSA / Gesamt-PSA
UICC	International Union of Cancer
UTR	untranslated region / untranslatierter Bereich

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Epidemiologie und Ätiologie des Prostatakarzinoms

Das Prostatakarzinom ist in den westlichen Industrieländern mit 648.400 Neuerkrankungen pro Jahr und einem Anteil von 12,2 % an den gesamten Karzinomneuerkrankungen die häufigste Tumorerkrankung des Mannes^[1]. Die in den letzten Jahrzehnten ansteigende Inzidenz ist jedoch vielmehr auf eine höhere Lebenserwartung und eine verbesserte Frühdiagnostik zurückzuführen als auf eine Steigerung des Erkrankungsrisikos. So werden zum Beispiel vermehrt asymptomatische Prostatakarzinome durch den Nachweis des Prostata-spezifischen Antigens (PSA) in der Frühdiagnostik entdeckt^[2]. Obwohl die Mehrzahl der Karzinome nur langsam wachsen, existiert jedoch eine kleine Gruppe von hoch aggressiven Tumoren, die einen für den Patienten lebensbedrohlichen Krankheitsverlauf bewirken. Aus diesem Grund zählt das Prostatakarzinom mit einem weltweiten Anteil von 6 % immer noch zu den häufigsten tumorbedingten Todesursachen^[1]. Zusätzlich dazu besteht das Problem in der primären Diagnostik des Prostatakarzinoms, dass die bisher etablierten Prognoseparameter nicht ausreichen, um die hoch aggressiven Karzinome von den indolenten Karzinomen sicher zu unterscheiden.

Die kausale Pathogenese des Prostatakarzinoms ist bis heute unklar. In der Literatur werden unterschiedliche Faktoren, wie zum Beispiel das Alter des Mannes, genetische Dispositionen, hormonelle Einflüsse oder lebensstilbedingte Parameter diskutiert. Das Alter des Mannes stellt dabei den größten Risikofaktor für die Entstehung eines Prostatakarzinoms dar. Ab einem Alter von 50 Jahren kann ein exponentieller Anstieg des Erkrankungsrisikos beobachtet werden^[3]. Zudem werden weltweit dreiviertel aller Prostatakarzinome ab einem Alter von 65 Jahren diagnostiziert^[1-3]. Autopsiestudien zeigen jedoch, dass bereits ab der dritten

Lebensdekade prostatiche intraepitheliale Neoplasien (PIN) und Karzinome der Prostata auftreten können^[4,5].

Circa 20 % aller Prostatakarzinome kommen familär gehäuft vor^[6] und das Risiko das ein weiterer erstgradig Verwandter an dieser Tumorentität erkrankt, ist bei familären Prostatakarzinomen 5 bis 11-fach höher als beim Fehlen einer familären Disposition^[7]. Zusätzlich gehören circa 5 bis 10 % der familär bedingten Karzinome in die Gruppe der hereditären Prostatakarzinome^[8]. Des Weiteren zeigt die Inzidenz des Prostatakarzinoms geografische und ethnische Unterschiede auf. So erkrankten jährlich pro 100.000 Männer in Ost-Asien 8,2, in Süd-Europa 50,2, in Süd-Afrika 53,9 und in Nord-Amerika 85,6 Männer an einem Prostatakarzinom^[1].

Eine wesentliche Rolle bei der Entwicklung und dem Wachstum des Prostatakarzinoms spielen die Androgene Testosteron und Dihydrotestosteron (DHT). Der genaue Mechanismus der zur Prostatakarzinogenese führt ist bisher jedoch nicht geklärt. Es ist vorstellbar, dass die Varianz des Erkrankungsrisikos bedingt durch Polymorphismen in Genen ist, die an der androgenabhängigen Expression beteiligt sind. Das Androgen Rezeptor (AR) Gen besitzt zum Beispiel im Exon 1 eine polymorphische Region aus 6 bis 39 CAG Wiederholungen, die eine wesentliche Rolle in der AR-Aktivität spielt^[9,10]. Eine geringe Anzahl an CAG Wiederholungen in dieser Region ist vermutlich assoziiert mit einer gesteigerten AR-Aktivität und damit mit einem höheren Karzinomrisiko^[9–12]. Andere genetische Aberrationen die mit einem erhöhten Prostatakarzinomrisiko in Zusammenhang gebracht werden, sind Polymorphismen im Vitamin D Rezeptorgen und in Genen die am Insulin-like growth factor (IGF) Signalweg beteiligt sind^[13–15].

1.2 Früherkennung und Primärdiagnostik des Prostatakarzinoms

Als Maßnahmen zur Früherkennung eines Prostatakarzinoms werden laut der S3-Leitlinie aus dem Leitlinienprogramm für Onkologie die digital rektale Untersuchung (DRU) und die Bestimmung des Serum-PSA für Männer ab dem 40. Lebensjahr empfohlen^[16]. Bei auffälligen Befunden in der Früherkennung oder bei symptomatischen Patienten wird zur Tumordiagnostik eine Stanzbiopsie der Prostata unter transrektal-sonographischer Kontrolle durchgeführt. Bei diagnostizierten fortgeschrittenen Prostatakarzinomen sollten vor der Therapieentscheidung zusätzliche bildgebende Verfahren wie die Magnetresonanztomographie (MRT) und

die Computertomographie (CT) eingesetzt werden^[16]. Im Folgenden werden die wesentlichen Methoden zur Früherkennung und Diagnostik des Prostatakarzinoms beschrieben.

1.2.1 Digitale rektale Untersuchung (DRU)

Die DRU ist eine Tastuntersuchung des Rektums und der angrenzenden Organe. Während der DRU gelten Indurationen, knotige Veränderungen und / oder Verhärtungen der Prostata als suspekt und daher als Indikation für eine Stanzbiopsie. Tastbar sind während der DRU ausschließlich periphere Tumore^[17]. Aus diesem Grund besitzt die DRU nur eine geringe Sensitivität und durchschnittlich 20-50 % der Prostatakarzinome werden nicht entdeckt^[18]. Allerdings ist die Spezifität der DRU mit 84-94 % sehr hoch und es werden 10-15 % der Prostatakarzinome mit einem PSA-Wert $< 4 \text{ ng/ml}$ innerhalb der DRU entdeckt^[18,19]. Aus diesem Grund wird innerhalb der Früherkennung eine kombinierte Untersuchung aus DRU und Bestimmung des PSA-Wertes empfohlen^[16,19]. Bei suspekten DRU Befunden sollte außerdem eine Stanzbiopsie der Prostata, unabhängig vom PSA-Wert, durchgeführt werden^[16,20].

1.2.2 Prostataspezifisches Antigen (PSA)

Das PSA wird in serumrelevanten Konzentration ausschließlich in den luminalen Epithelzellen der prostatistischen Drüsen und Ausführungsgänge produziert und direkt in das prostatistische Gangsystem sezerniert. Im Serum ist PSA sowohl in freier Form (fPSA) als auch in gebundener Form (cPSA) vorhanden. Eine Bindung von PSA im Serum ist sowohl an α -1-anti-Chymotrypsin (PSA-ACT) als auch an α -2-Makroglobulin (PSA-MG) möglich. Beim fPSA handelt es sich in der Regel um eine enzymatische inaktive Form von PSA oder defekte PSA-Moleküle^[21–23].

Die Bestimmung des PSA Gehaltes im Serum kann mit Hilfe von Immunoassays für fPSA, cPSA und Gesamt-PSA (tPSA) durchgeführt werden. Untersuchungen haben gezeigt, dass der PSA-Wert einen natürlichen Anstieg mit dem Alter aufzeigt. Daher wird ein tPSA-Wert bei Männern die jünger sind als 50 Jahre von $\leq 2,5 \text{ ng/ml}$, jünger als 60 Jahre von $\leq 3,5 \text{ ng/ml}$, jünger als 70 Jahre von $\leq 4,5 \text{ ng/ml}$ und jünger als 80 Jahre von $\leq 6,5 \text{ ng/ml}$ als normal bewertet^[24]. Da ein Anstieg des tPSA-Wertes auf mehr als 4 ng/ml bei den meisten Prostatakarzinomen messbar ist, werden ab einem Grenzwert von 4 ng tPSA/ml weitere diagnostische Maßnahmen wie die DRU oder eine Stanzbiopsie empfohlen^[16,20]. Bei der benignen Prostatahyperplasie (BPH), Entzündungen der Prostata, Gewebereizungen durch die DRU, urethrale Katheterisierung oder Stanzbiopsien kann es jedoch ebenfalls zu deutlich erhöh-

ten tPSA-Werten kommen^[20,21]. Des Weiteren kann ein Prostatakarzinom bei tPSA-Werten unterhalb von 4 ng/ml nicht vollständig ausgeschlossen werden^[16,20]. Dies bedeutet, dass das PSA einen gewebespezifischen aber keinen tumorspezifischen Marker in der Prostatakrebsdiagnostik darstellt.

Die Aussagekraft kann jedoch durch eine genauere Betrachtung der gemessenen PSA-Werte deutlich erhöht werden^[20]. Der durchschnittliche prozentuale fPSA-Wert im Bezug auf den mittleren tPSA-Wert ist bei Männern mit einem Prostatakarzinom mit 10,5 % fPSA wesentlich geringer als bei Männern mit BPH (20,8 % fPSA) und bei Männern mit einer gesunden Prostata (23,6 % fPSA). Allerdings ist ab einem Prostatavolumen von 40 cm^3 kein signifikanter Unterschied im prozentualen fPSA zwischen Patienten mit Prostatakarzinomen und Patienten mit einer BPH mehr vorhanden^[25]. Eine weitere Möglichkeit ist die Bestimmung der PSA density (PSAD), die das Verhältnis von tPSA zum Prostatavolumen angibt. Hierbei werden PSAD-Werte von $\leq 0,050 \frac{\text{ng}}{\text{ml}}/\text{cm}^3$ als normal, von 0,051 bis $0,099 \frac{\text{ng}}{\text{ml}}/\text{cm}^3$ als intermediär und PSAD-Werte $\geq 0,1 \frac{\text{ng}}{\text{ml}}/\text{cm}^3$ als pathologisch eingestuft. Der PSAD-Wert ist assoziiert mit der BPH, dem Prostatakarzinom, dem Epithelzellgehalt und dem histologischen Grad des Karzinoms^[24,26]. Zur besseren Beurteilung des PSAD sollte bei tPSA-Werten unterhalb von 10 ng/ml das Verhältnis des PSA-Gehaltes zum Volumen der tranzitionalen Zone (PSA TZD) bestimmt werden, da eine BPH vor allem in Form einer nodulären Hyperplasie auftritt. Durch die Bestimmung des PSA TZD kann eine genauere Unterscheidung zwischen der Wahrscheinlichkeit einer BPH und eines Karzinoms erfolgen^[27].

Bei Männern mit einem tPSA-Wert $< 2 \text{ ng/ml}$ sollte alle 2 Jahre und bei Männern $> 2 \text{ ng/ml}$ einmal jährlich eine Bestimmung des tPSA-Wertes erfolgen^[16,20]. Bei einem Anstieg des tPSA um $0,75 \text{ ng/ml}$ innerhalb von 12 Monaten besteht der begründete Verdacht auf ein Prostatakarzinom und eine Stanzbiopsie der Prostata sollte durchgeführt werden, auch wenn bereits ein negativer Stanzbefund vorliegt^[23]. Neben der tPSA Anstiegsgeschwindigkeit spielt die tPSA Verdopplungszeit eine wesentliche Rolle. Es ist bekannt dass sich der tPSA-Wert in der exponentiellen Phase bei Patienten mit einem lokalen Karzinom innerhalb von 1,5 bis 6,6 Jahren und bei Patienten mit einem fortgeschrittenen oder metastasierenden Karzinom innerhalb von 0,9 bis 8,5 Jahren verdoppelt. Im Vergleich dazu liegt die tPSA Verdopplungszeit bei Patienten mit einer BPH im Alter von 60 Jahren bei 12 ± 5 Jahren und steigt mit dem Alter weiter an^[28,29]. Neben der Verwendung des tPSA-Wertes innerhalb der Früherkennung und Primärdiagnostik wird dieser außerdem zur Verlaufs- und Therapiekontrolle bei diagnostizierten Prostatakarzinomen verwendet.

1.2.3 Stanzbiopsie der Prostata

Die Stanzbiopsie wird im Rahmen der Früherkennung und Diagnostik bei einem erstmaligen tPSA-Wert von $\geq 4\text{ng/ml}$, karzinomverdächtigen Befunden innerhalb der DRU und / oder einem auffällig schnellem tPSA Anstieg empfohlen. Bei der Stanzbiopsie werden 8 bis 12 Gewebezylinder aus unterschiedlichen Regionen der Prostata unter transrektal-sonographischer Kontrolle entnommen. Palpatorisch auffällige Areale der Prostata sollten zusätzlich palpatorisch biopsiert werden. Bei Befunden die auf die Entwicklung eines Prostatakarzinoms hindeuten, wie zum Beispiel eine ausgedehnte High-Grade PIN, oder bei negativer Gewebebefundung die mit suspekten PSA-Werten oder –Verläufen einhergehen, sollte die Stanzbiopsie nach 6 Monaten wiederholt werden^[16].

1.3 Pathologie und Stadieneinteilung des Prostatakarzinoms

Prostatakarzinome sind in über 90 % der Fälle Adenokarzinome, die aus den azinären Zellen des Drüsenepithels entstanden sind. Selten sind außerdem duktale Adenokarzinome, Plattenepithelkarzinome, neuroendokrine Tumoren oder auch Sarkome, die häufig jedoch aggressive Prostatakarzinome darstellen^[31]. Adenokarzinome der Prostata entstehen in der Regel multifokal aus mehreren Ursprungstumorzellen^[32], so dass in den einzelnen Tumoreregionen häufig unterschiedliche Differenzierungsgrade vorliegen.

Zur Bestimmung der Differenzierung hat sich das nach Donald F. Gleason modifizierte Gleason Grading etabliert^[33]. Anhand der Drüsenstruktur und der Karzinomarchitektur werden so fünf Abweichungen vom normalen histologischen Drüsenmuster definiert, die von Gleason Grad 1 (sehr gut differenziert) bis zu Gleason Grad 5 (sehr niedrig differenziert) reichen (siehe Abbildung 1.1). Zur Berücksichtigung der morphologischen Heterogenität wird außerdem ein Gleason Score aus dem primär und

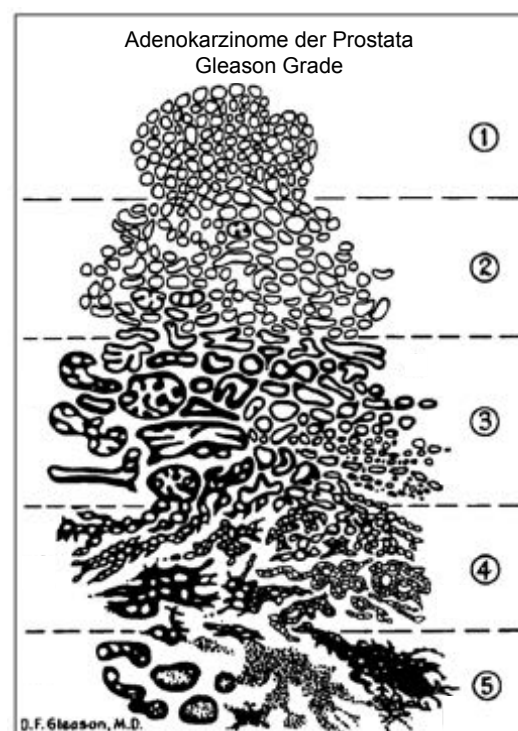


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung des Gleason Grading nach D.F. Gleason. Dargestellt sind die histologischen Drüsenmuster in den einzelnen Gleason Graden. Grad 1: sehr gut differenziert bis Grad 5: sehr niedrig differenziert. Abbildung modifiziert nach Humphrey et al.^[30].

sekundär vorliegendem Differenzierungsgrad gebildet (zum Beispiel $3 + 4 = 7$), der mit dem Tumorstadium und der Prognose korreliert^[16,33]. Karzinome mit einem Gleason Score von ≤ 6 weisen in der Regel eine gute Prognose auf, während Tumoren ab einem Gleason Score von 8 eher eine schlechte Prognose aufzeigen. Tumoren mit einem Gleason Score von 7 müssen im Bezug auf den primären und sekundären Differenzierungsgrad betrachtet werden, da Tumoren mit einem Gleason Score von $3 + 4 = 7$ häufig eine bessere Prognose aufweisen als Tumoren mit einem Gleason Score von $4 + 3 = 7$ ^[16].

Zur pathologischen Beurteilung der Prostatakarzinome wird außerdem eine Stadieneinteilung anhand der UICC (International Union against Cancer) TNM-Klassifikation durchgeführt (siehe Tabelle 1.1).

Tabelle 1.1: TNM-Klassifikation von Prostatakarzinomen nach UICC^[34].

T-Stadium = Tumorausdehnung	
T0	Kein Hinweis auf einen Primärtumor
T1	Kleiner nicht tastbarer Tumor. Zufallsbefund während einer Prostataoperation auf Grund einer BPH oder erhöhten PSA-Werten
T1a	Tumorbefall in $< 5\%$ des Gewebes
T1b	Tumorbefall in $\geq 5\%$ des Gewebes
T1c	Diagnose des Tumors in Nadelbiopsie
T2	Tumor ist innerhalb der Prostatakapsel lokalisiert
T2a	Tumorbefall in $< 50\%$ des Seitenlappens
T2b	Tumorbefall in $> 50\%$ des Seitenlappens
T2c	Tumorbefall in beiden Seitenlappen
T3	Tumor geht über die Prostatakapsel hinaus
T3a	Kapselüberschreitung ohne Infiltration der Samenblasen
T3b	Kapselüberschreitung mit Infiltration der Samenblasen
T4	Tumorbefall von Nachbarstrukturen
N-Stadium = Tumorbefall der Lymphknoten	
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen vorhanden
N1	Regionäre Lymphknotenmetastasen vorhanden
M-Stadium = Fernmetastasen	
M0	keine Fernmetastasen vorhanden
M1	Fernmetastasen vorhanden
M1a	Lymphknotenmetastasierung (nicht regionär)
M1b	Knochenmetastasen
M1c	Metastasen in anderen Organen und/oder Strukturen

Hierbei wird die lokale Ausdehnung des Primärtumors (T-Stadium), das Vorhandensein oder Fehlen von Tumor in den regionalen Lymphknoten (N-Stadium) und das mögliche Vorliegen von Fernmetastasen berücksichtigt^[34]. Das lokalbegrenzte Prostatakarzinom umfasst dabei die Stadien T1-T2 N0 M0, das lokal fortgeschrittene Prostatakarzinom die Stadien T3-4 N0 M0 und das fortgeschrittene bzw. metastasierende Prostatakarzinom zusätzlich die Stadien N1-3 und/oder M1^[16]. Zur Einschätzung des Progressionsrisikos bzw. der Aggressivität von lokalbegrenzten Karzinomen wird zusätzlich der Gleason Score in den tumorenthaltenden Stanzbiopsien und der PSA-Wert herangezogen (siehe Abbildung 1.2).

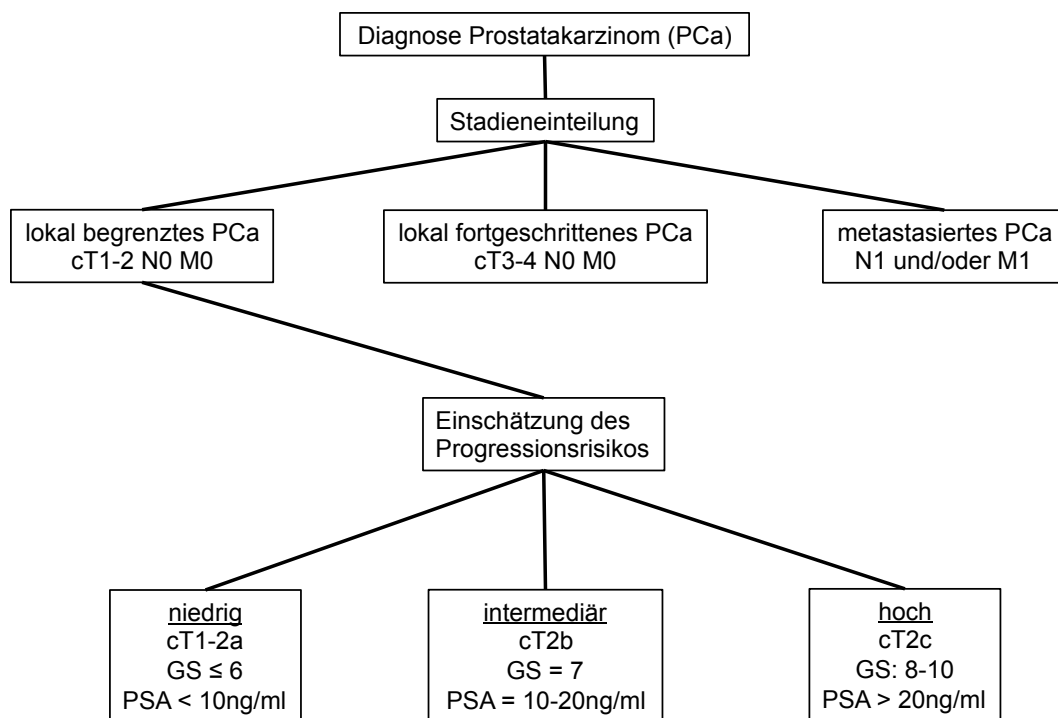


Abbildung 1.2: Einteilung der Prostatakarzinome nach ihrem Risikoprofil. PCa: Prostatakarzinom, cT: klinisches Tumorstadium, N: Lymphknotenstatus, M: Fernmetastasen, 0: negativ, 1: positiv, GS: Gleason Score.

1.4 Therapie des Prostatakarzinoms

Die verschiedenen Therapiemöglichkeiten des Prostatakarzinoms hängen von unterschiedlichen Faktoren wie dem PSA-Wert, cTNM Stadium und klinischen Gleason Score, dem Gesundheitszustand bzw. vorhandenen Nebenerkrankungen des Patienten, dem Patientenalter, der Lebenserwartung des Patienten und des individuelle Patientenwunsches ab. Eine Heilung ist jedoch nur bei Patienten mit einem lokalbegrenzten Karzinom und in einigen Fällen bei einem lokal fortgeschrittenen Karzinom möglich (siehe Abbildung 1.3 und 1.4).

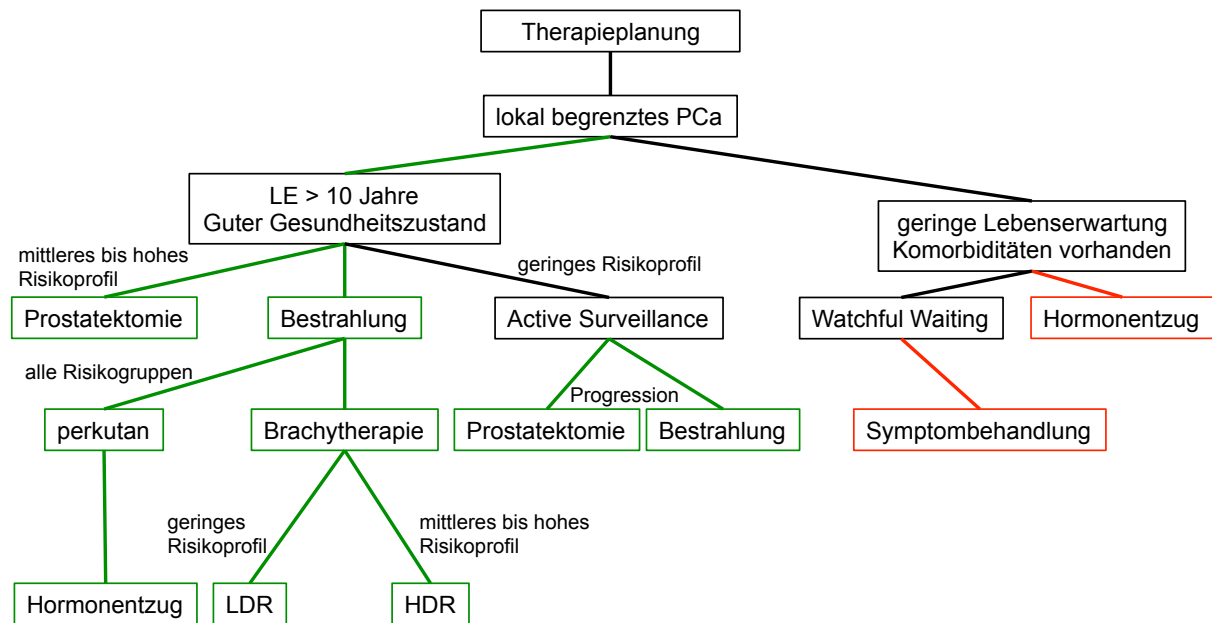


Abbildung 1.3: Therapieoptionen bei lokal begrenzten Prostatakarzinomen. Grün: kurative Therapien, rot: palliative Therapien. PCa: Prostatakarzinom, LE: Lebenserwartung, LDR: low-dose rate, HDR: high-dose rate.

Als kurative Therapieformen für die Behandlung von lokal begrenzten und lokal fortgeschrittenen Prostatakarzinomen werden die radikale Prostatektomie, die Brachytherapie oder die perkutane Strahlentherapie durchgeführt. Diese Therapien können jedoch Nebenwirkungen wie Harninkontinenz und Impotenz zur Folge haben. Die derzeit wichtigste primäre Therapieoption für Patienten mit einem lokal begrenzten Prostatakarzinom, unabhängig von der Risikogruppe und einer Lebenserwartung von mindestens 10 Jahren, ist die radikale Prostatektomie^[16,20]. Der Vorteil dieser Behandlung ist die Reduzierung des Risikos für die Entstehung von Fernmetastasen und der lokalen Tumorprogression. Des Weiteren wird die tumorbedingte Mortalität gesenkt^[35]. Zur weiteren Verlaufskontrolle erfolgt postoperativ eine mindestens jährliche Bestimmung des PSA. Bei organbegrenzten Tumoren kann eine Heilung des Patienten angenommen werden, wenn innerhalb der ersten 5 Jahre postoperativ kein PSA-Rezidiv auftritt^[16,36]. Die perkutane Strahlentherapie (pST) auf Basis der dreidimensionalen (3D-konformale) Bestrahlungsplanung ist ebenfalls eine primäre Therapieoption für Patienten mit einem lokal begrenzten Prostatakarzinom unabhängig von der Risikogruppe und für Patienten die eine Prostatektomie ablehnen. Des Weiteren wird die pST in Kombination mit der hormonablativen Therapie bei Patienten mit einem lokal fortgeschrittenen Karzinom als Behandlungsmethode empfohlen. Bei der pST wird die zu bestrahlende Region mittels CT bestimmt und eine externe Bestrahlung durchgeführt. Die Einzelstrahlungsdosen reichen von 1,8 Gy bis 2,0 Gy, wobei eine höhere Strahlendosis die Wahrscheinlichkeit für ein biochemisch Rezidiv freies Überleben deutlich erhöht^[16,31,37]. Bei der Brachytherapie handelt

es sich um eine Kurzdistanzbestrahlung mit Hilfe von radioaktivem Jod-125, Palladium-103 oder Iridium-192 Seeds die temporär direkt in die Prostata injiziert werden. Unterschieden wird die Brachytherapie in die geringdosierte Brachytherapie (low-dose rate, LDR) und die hochdosierte Brachytherapie (high-dose rate, HDR), wobei die LDR als primäre Therapieoption bei lokalbegrenzten Prostatakarzinomen und die HDR in Kombination mit der pST bei lokal fortgeschrittenen Karzinomen empfohlen wird^[16]. Sowohl die LDR als auch die HDR haben den Vorteil, dass die Bestrahlung auf die Prostata beschränkt ist und so strahlungsbedingte Schädigungen der benachbarten Organe vermieden werden^[16,37].

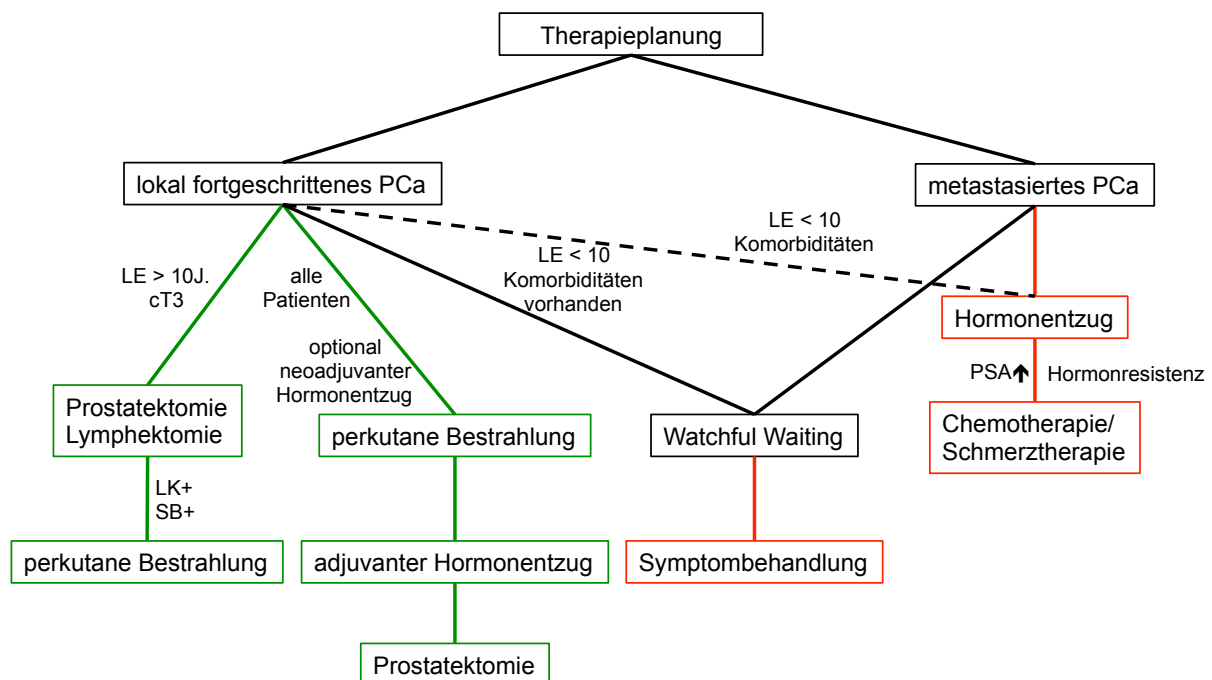


Abbildung 1.4: Therapieoptionen bei lokal fortgeschrittenen oder metastasierten Prostatakarzinomen. Grün: kurative Therapien, rot: palliative Therapien. PCa: Prostatakarzinom, cT: klinisches Tumorstadium, LK: Lymphknoten, SB: Samenblase, LE: Lebenserwartung, J.: Jahre.

Neben den kurativen Therapien zählen außerdem das „Active Surveillance“ und das „Watchful Waiting“ zu den gängigen Therapiestrategien beim Prostatakarzinom^[16,31]. Diese Methoden haben gemeinsam, dass die Behandlung des Patienten unter ärztlicher Kontrolle zunächst hinaus- bzw. verzögert wird. Das „Active Surveillance“ (aktives Überwachen) bezeichnet dabei das Herauszögern einer kurativen Therapie bis zur Änderung der Tumorbiologie oder des Patientenwunsches bei ansonsten gesunden Patienten^[38]. Voraussetzung für die Durchführung sind PSA-Werte ≤ 10 ng/ml, ein Gleason Score ≤ 6 , ein cT1c-cT2a Stadium, ein Tumorgehalt von weniger als 50 % in der Gewebestanz und Tumor in maximal 2 Gewebeständen^[39,40]. Innerhalb des „Active Surveillance“ wird ein regelmäßiger Patientenkontakt gepflegt, sowie eine regelmäßige Kontrolle der Tumorprogression mittels PSA-Bestimmung,

DRU und Kontrollbiopsien durchgeführt. Bei vorhandener Tumorprogression wird dem Patienten dann eine kurative Therapie empfohlen^[16]. Das „Watchful Waiting“ hingegen bezeichnet das Herauszögern einer palliativen Therapie bis zur symptomatischen Tumorprogression bei Patienten deren Lebenserwartung unter 10 Jahren liegt und bei denen aus diesem Grund eine kurative Therapie nicht sinnvoll erscheint. Hintergrund der „Watchful Waiting“ Therapie ist dabei die Vermeidung von Therapiekomplicationen die zu einer Einschränkung der Lebensqualität führen können. Sie ist strikt von der Strategie des „Active Surveillance“, abzugrenzen und kann bei Tumoren mit einem T1-T4 Stadium, einem Gleason Score ≤ 7 und beliebigen PSA-Werten durchgeführt werden^[41–44].

Als palliative Behandlungsmethoden werden die hormonablative Therapie und die Chemotherapie bei fortgeschrittenen oder metastasierten Prostatakarzinomen angewendet. Bei der hormonablativen Therapie wird eine Wachstumshemmung der Karzinomzellen durch den Entzug von Androgenen induziert, die eine proliferierende Wirkung auf Karzinomzellen und gesunde Zellen der Prostata haben^[45]. Sie wird insbesondere bei Patienten mit fortgeschrittenen oder metastasierenden Prostatakarzinomen angewandt, kann aber auch zur Behandlung von Patienten im Rahmen des „Watchful Waitings“ oder zur Behandlung von Patienten, die kurative Behandlungsmöglichkeiten ablehnen, verwendet werden^[16]. Generell sind innerhalb der hormonablativen Therapie vier Behandlungsoptionen vorhanden: Der vollständige Androgenentzug durch die medikamentöse Hemmung des Gonadotropin Releasing Hormons oder des Luteinisierten Hormons innerhalb der Androgensynthese in den Hoden. Der vollständige Androgenentzug durch die operative Entfernung der Hoden aus dem Hodensack. Die Inhibierung der Aktivierung von Testosteron zu DHT oder die Blockade der AR an den Karzinomzellen^[31,45,46]. Durch die Therapie kann eine zeitlich begrenzte Verzögerung der Tumorprogression erzielt werden. Die meisten Tumoren entwickeln jedoch nach 12 bis 33 Monaten eine Androgenresistenz, die eventuell durch den Wachstumsvorteil von androgenunabhängigen Tumorzellen unter Androgenentzug entsteht^[16,46]. Bei hormonresistenten Prostatakarzinomen kann dann eine Chemotherapie als palliative Behandlungsmöglichkeit durchgeführt werden. Als Erstlinientherapie wird die Gabe von Docetaxel empfohlen. Weitere verwendete Zytostatika sind Prednisolon und Mitoxantron als Einzel- oder Kombipräparat. Ziel der Chemotherapie ist ausschließlich eine Verbesserung der Lebensqualität des Patienten und nicht die Verlängerung der Lebenszeit^[16,31,47].

1.5 Prognosemarker beim Prostatakarzinom

Ein Problem in der Diagnostik und Therapie des Prostatakarzinoms ist, dass die etablierten Prognosemarker, wie das Tumorstadium, der Gleason Score und der PSA-Wert nicht ausreichen, um potentiell aggressive und damit klinisch relevante Karzinome von indolenten Karzinomen, die zeitlebens zu keinen Symptomen führen würden, klar zu unterscheiden. Auf Grund der zahlreichen Therapiemöglichkeiten wäre es jedoch essentiell die Prognose für jeden Patienten besser einschätzen zu können, um so die Therapieentscheidung zu erleichtern und einen möglicherweise unnötigen invasiven Eingriff zu vermeiden. Während bei Patienten, die bereits initial einen systemischen (metastasierenden) Tumor aufweisen, die Therapieentscheidung klar ist (siehe Abbildung 1.4), stehen vor allem Patienten mit initial lokal begrenzten Karzinomen vor der schwierigen Entscheidung zwischen einem invasiven Eingriff, wie zum Beispiel der Prostatektomie, und dem „Active Surveillance“ zu wählen (siehe Abbildung 1.3). Insbesondere bei Patienten, deren Tumoren ein intermediäres Progressionsrisiko aufweisen, ist die Einschätzung des Krankheitsverlaufs sehr schwierig (siehe Abbildung 1.2). Um diese Patienten in ihrer Entscheidungsfindung zu unterstützen, ist es zwingend notwendig, prognostische Marker zu etablieren, welche die etablierten Prognoseparameter bei der Einschätzung der Aggressivität eines Prostatakarzinoms unterstützen können. In den letzten Jahren wurden bereits zahlreiche molekulare und genomische Veränderungen auf ihre prognostische Relevanz beim Prostatakarzinom untersucht. Allerdings konnte trotz dieser Studien bisher kein einziger Biomarker etabliert werden, der eine bessere Vorhersage über den Krankheitsverlauf erlaubt. Gründe dafür sind unter anderem, dass viele Studien an nicht ausreichend großen und gut charakterisierten Studienkohorten durchgeführt wurden. So konnten Schlomm et al. in einer Metaanalyse zeigen, dass die meisten Studien weniger als 100 Patienten umfassen und das zudem die Mehrzahl der potentiell prognostisch relevanten Marker nur in Einzelstudien untersucht wurden und eine Validierung in Folgestudien fehlt^[48]. Zu dem sind Prostatakarzinome häufig multifokal und damit charakterisiert durch eine ausgeprägte genomische Heterogenität^[49–51]. Erste Studien konnten außerdem zeigen, dass neben der interfokalen Heterogenität auch innerhalb eines Tumorfoki eine ausgeprägte heterogen Verteilung der genomischen Veränderungen vorliegen kann^[52,53]. Zur Etablierung von prognostischen Biomarkern ist es daher zwingend notwendig den Grad der Heterogenität einer Veränderung zu kennen. Ein weiteres Problem ist, dass die genomischen Veränderungen die zur Entstehung und Progression eines Prostatakarzinoms führen immer noch unzureichend geklärt sind.

1.6 Genomische Veränderungen beim Prostatakarzinom

Über die genomischen Veränderungen beim Prostatakarzinom ist bis heute nur wenig bekannt. Neuere „Next Generation Sequencing (NGS)“ Studien haben jedoch gezeigt, dass das Prostatakarzinom sich wesentlich von anderen Tumorentitäten, im Bezug auf die genomischen Veränderungen, unterscheidet. Tumoren der Mamma und des Colons sind zum Beispiel charakterisiert durch eine ausgeprägte genomische Instabilität und damit durch zahlreiche Punktmutationen, Amplifikationen und Deletionen^[54–58]. Das Prostatakarzinom hingegen ist insbesondere charakterisiert durch Deletionen und Translokationen unterschiedlichen Ausmaßes. Chromosomale Zugewinne (Gains und Amplifikationen), sowie Punktmutationen treten nur sehr selten auf^[59–64]. Im Folgenden werden die genannten genomischen Veränderungen des Prostatakarzinoms kurz beschrieben.

1.6.1 Punktmutation

Im Vergleich zu anderen Tumorentitäten treten inaktivierende Punktmutationen sehr selten beim Prostatakarzinom auf. Studien zeigten, dass die Mutationsrate pro Megabasen (Mb) Desoxyribonukleinsäure (DNA) zwischen 0,4 bis 1,4 liegt^[63,65,66]. Im Vergleich dazu konnten beim Mammakarzinom 1,12 bis 1,96 Mutationen/Mb DNA und beim Lungenkarzinom sogar 4,41 bis 5,79 Mutationen/Mb DNA nachgewiesen werden^[66]. Auch die relative Rate spezifischer inaktivierender Punktmutationen in bekannten tumorrelevanten Genen ist beim Prostatakarzinom vergleichsweise gering. Während in anderen Tumorentitäten Mutationsraten von weit über 10 % messbar sind, ist bisher beim Prostatakarzinom kein Gen bekannt, dessen Mutationsrate über 10 % liegt^[67,68]. So zählt zum Beispiel das bekannte Tumorsuppressorgen TP53 mit einer Mutationsrate von bis zu 5 % zu den am häufigsten mutierten Genen beim Prostatakarzinom^[63,64,67,68]. Im Vergleich dazu wurden TP53 Punktmutationsraten von 15 % beim Harnblasenkarzinom, 27 % beim Mammakarzinom, 16 % beim Lungenkarzinom und 18 % beim kolorektalen Karzinom gefunden^[67,68].

1.6.2 Chromosomale Zugewinne

Chromosomale Zugewinne (Gains) und insbesondere Amplifikationen zählen zu den seltenen Veränderungen beim Prostatakarzinom. Zwei Metaanalysen und eine große Array-basierte komparative genomische Hybridisierungs (aCGH)-Studie konnten zeigen dass diese Veränderungen in weniger als 3 % aller Prostatakarzinome vorkommen^[60–62]. Die wenigen

bisher rekurrenten Gains und Amplifikationen die in diesen Studien nachgewiesen werden konnten betreffen die Regionen 8q24 (MYC), 7p12 (EGFR), 11q13 (CCND1) und 17q12 (HER2)^[60–62]. Eine Ausnahme stellen Gains und Amplifikationen des Androgenrezeptors dar, die fast ausschließlich in der Untergruppe der besonders aggressiven hormonrefraktären Prostatatumoren einen Anteil von bis zu 80 % (Gains) bzw. 30 % (Amplifikationen) erreichen können^[69].

1.6.3 Translokationen

Die häufigste genomische Aberration beim Prostatakarzinom ist die *TMPRSS2:ERG* Fusion^[59,70]. Bei dieser Genfusion gelangt der onkogene Transkriptionsfaktor *ERG* (ETS related gene) bedingt durch eine Deletion auf Chromosom 21q22 unter die Kontrolle des Promotors der Androgen-abhängigen Serinprotease *TMPRSS2* (Transmembrane protease, serine 2). Die Folge daraus ist eine Androgen-abhängige *ERG* Expression in den betroffenen epithelialen Tumorzellen^[70]. Die *TMPRSS2:ERG* Fusion entsteht insgesamt in circa 50 % aller Prostatatumoren, tritt jedoch gehäuft bei jungen Patienten auf, die bei der initialen Diagnose eines Prostatakarzinoms nicht älter als 50 Jahre waren^[59,71]. Auf Grund der hohen Frequenz der *TMPRSS2:ERG* Fusion erfolgt in Studien häufig eine Einteilung in ERG-positive (mit *TMPRSS2:ERG* Fusion) und ERG-negative (ohne *TMPRSS2:ERG* Fusion) Tumoren um die Identifizierung von molekularen Subgruppen zu erleichtern. Bemerkenswert ist allerdings, dass die Expression des Transkriptionsfaktors *ERG* zwar zu einer Veränderung in der Zusammensetzung des Transkriptoms in den betroffenen Tumorzellen führt, aber die *TMPRSS2:ERG* Fusion selbst keine prognostische Relevanz bzw. Assoziation zu einem bestimmten Tumorphänotyp beim Prostatakarzinom aufzeigt^[71–73].

Neben der *TMPRSS2:ERG* Fusion existieren zahlreiche weitere Androgen-abhängige und Androgen-unabhängige Translokationen, die jedoch eher selten auftreten und häufig nicht rekurrent sind. Zu diesen chromosomalen Veränderungen zählen zum Beispiel Fusionen von *SLC45A3:ERG* (3 %)^[74], *TMPRSS2:ETV1* (6 %)^[75], *SLC45A3:ETV4* (6 %)^[75] und *SNURF:ETV1* (9 %)^[59]. Auch Genbrüche die zu einer Inaktivierung des betroffenen Genes führen treten eher selten beim Prostatakarzinom auf. In Relation zu anderen Genen, sind hier vor allem Brüche in den Genen *PTEN* (1 %)^[53,59] und *TP53* (0,6 %)^[76] nachweisbar.

1.6.4 Deletionen

Zwei große Metaanalysen von Sun et al. (n=872)^[61] und Williams et al. (n=662)^[60], sowie eine große aCGH-Studie von Taylor et al. (n=181)^[62] zeigten deutlich, dass chromosomale Verluste zu den häufigsten genomischen Veränderungen beim Prostatakarzinom zählen. Die häufigsten Deletionen sind lokalisiert auf Chromosom 8p, 13q, 16q, 6q, 10q, 17p, 12p, 5q, 18q, 3p und 2q und treten in circa 10 % bis 40 % aller Prostatakarzinome auf (siehe auch Tabelle 1.3)^[60–62].

Tabelle 1.3: Häufige Deletionsregionen beim Prostatakarzinom.

Williams et al. ^[60]		Sun et al. ^[61]		Taylor et al. ^[62]	
Region	(%)	Region	(%)	Region	(%)
8p23.3-p11.21	61,8	8p23.1-p21.1	34,1	8p21.3-p11.21	78,3
13q12.3-q31.1	52,9	13q14.13-q22.1	28,0	6q12-q22.3	62,4
16q11.2-q24.3	52,3	6q14.1-q21	22,2	12p13.31-p12.3	61,3
6q12-q22.33	46,7	16q13-q24.3	17,9	13q12.11-q14.2	12,9-47,4
5q11.2-q23.3	42,9	5q13.3-q21.2	13,1	16q23.1-q24.2	37,6
17p13.3-p11.2	37,0	18q12.1-q23	12,8	10q23.31-q24.33	12,4-34,0
10q23.2-q26.12	36,3	2q21.2-q22.3	12,4	2q14.3-q22.3	29,9
18q12.1-q23	32,8	10q23.1-q25.3	11,8	5q11.2-q22.2	11,9-26,3
2q14.1-q24.2	29,6	4q21.3-q31.3	7,6	17p13.1	26,3
12p13.31-p12.3-	28,9	15q21.1-q25.3	6,7	3p13	21,2
3p13	21,9	12p13.32-p11.23	6,0	17q21.31	12,4-14,9
17q21.2-q21.31	21,6			22q12.1-q13.31	13,9

Williams et al.^[60]: CGH und aCGH Metaanalyse an 662 Prostatakarzinomen, Sun et al.^[61]: aCGH Metaanalyse an 872 Prostatakarzinomen, Taylor et al.^[62]: aCGH Studie an 181 Prostatatumoren.

In einigen dieser deletierten Regionen sind bekannte Tumorsuppressorgene lokalisiert. Dazu zählen zum Beispiel *PTEN* auf Chromosom 10q23^[77], *TP53* auf Chromosom 17p13^[78,79], *RB1* auf Chromosom 13q14^[80,81] und *CDKN1B* auf Chromosom 12p13^[82]. Die Zielgene der meisten Deletionen konnten bis heute jedoch nicht eindeutig identifiziert werden. Auffällig ist, dass die Deletionen typischerweise neben einer potentiell minimal deletierten Region häufig sehr große Bereiche der Chromosomen betreffen und damit vermutlich eine Vielzahl von Genen^[59,62,83–85]. Eine Ausnahme stellen hier Deletionen im Bereich 10q23 (*PTEN*) und 3p13 (*FOXP1*, *RYBP* und *SHQ1*) dar. Diese Deletionen betreffen in der Regel nur sehr kleine Regionen des Chromsoms und damit nur ein oder sehr wenige Gene^[83,86]. Eine prognostische Relevanz konnte bereits für einige der häufigsten Deletionen beim Prostatakar-

zinom nachgewiesen werden. Dazu zählen Deletionen im Bereich 5q21, 8p21, 10q23, 17p13 und 3p13^[76,83,86–88]. Obwohl die 6q12-22 Deletion zu den häufigsten Deletionen beim Prostatakarzinom zählt, ist die Bedeutung dieser Deletion im Bezug auf die Prognose des Patienten und den Tumorphänotyp nicht vollständig geklärt.

1.7 Die 6q-Deletion beim Prostatakarzinom

1.7.1 Prävalenz der 6q-Deletion beim Prostatakarzinom

Die Prävalenz der 6q-Deletion beim Prostatakarzinom ist bis heute nicht vollständig geklärt. Zwei Metaanalysen an 662^[60] und 872^[61] Prostatatumoren sowie eine große aCGH-Studie an 181 Tumoren^[62] zeigten deutlich, dass die 6q Region zu den vier häufigsten deletierten Bereichen des Prostatakarzinoms zählt (siehe Tabelle 1.3). Insgesamt weist die 6q-Deletionsrate in den bisherigen Studien mit 13 % bis 62 % eine hohe Varianz auf. Studien die den Verlust der Heterozygotie (loss of heterozygosity, LOH) auf dem langen Arm des Chromosoms 6 untersuchten, fanden eine 6q Verlustrate von 13 % bis 54 % in 21 bis 128 analysierten Prostatakarzinomen^[89–96]. Eine vergleichbare Varianz der 6q-Deletionsrate von 22 % bis 62 % wurde mittels SNP (single nucleotide polymorphism), komperative genomische Hybridisierung (CGH) oder aCGH an 19 bis 181 untersuchten Prostatakarzinomen festgestellt^[62,97–104].

1.7.2 Assoziation der 6q-Deletion mit dem Tumorphänotyp und der Prognose des Prostatakarzinoms

Nur wenige Studien haben sich bisher mit der Bedeutung der 6q-Deletion in Bezug auf den Tumorphänotyp und der prognostischen Relevanz für den Patienten beim Prostatakarzinom befasst. Zusätzlich dazu sind die Ergebnisse dieser Studien nicht einheitlich. In fünf Studien konnte eine Assoziation zwischen der 6q-Deletion und einem hohen Gleason Score^[60,100,104] oder einem fortgeschrittenem Tumorstadium^[92,94] in 21 bis 662 analysierten Prostatatumoren nachgewiesen werden. In drei weiteren Studien an 33 bis 138 Prostatatumoren konnte lediglich eine Tendenz des Auftretens einer 6q-Deletion zu einem ungünstigen Tumorphänotyp gezeigt werden^[90,91,96]. Gegensätzliche Ergebnisse wurden in vier weiteren Studien an 21 bis 55 Prostatakarzinomen festgestellt. In diesen Studien konnte kein Zusammenhang zwischen der 6q-Deletion und einem hohem Gleason Score^[92–95], einem fortgeschrittenem Tumorstadium^[93,95], einer Metastasierung der Lymphknoten^[93] oder einem erhöhtem präoperativen PSA-Wert^[94,95] festgestellt werden. Eine mögliche Assoziation der 6q-Deletion

mit dem Auftreten eines biochemischen Rezidivs (PSA-Rezidiv) wurde in nur drei Studien untersucht, die insgesamt zu stark divergenten Ergebnissen kamen. Strohmeyer et al. fanden eine signifikante Assoziation der 6q-Deletion mit einem frühem PSA-Rezidiv^[100] in 59 Prostatakarzinomen, während Lapointe et al. in ihrer aCGH Analyse an 54 organbegrenzten und 9 metastasierten Prostatatumoren, die 6q-Deletion mit einer guten Prognose für den Patienten in Beziehung setzen konnten^[98]. Srikantan et al. hingegen stellten keinen Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer 6q-Deletion und der Wahrscheinlichkeit eines frühen PSA-Rezidivs in 38 primären bzw. fortgeschrittenen Prostatakarzinomen fest^[90]. Die bisherige Studienlage zeigt deutlich, dass die klinische Relevanz der 6q-Deletion beim Prostatakarzinom bis heute ungeklärt ist.

1.7.3 Architektur der 6q-Deletion

Die 6q-Deletion betrifft, je nach Ausdehnung der Deletion, unterschiedlich große Bereiche des langen Armes des Chromosoms 6. Die maximal gemessene 6q-Deletionslänge, die bisher mittels CGH und aCGH ermittelt werden konnte, liegt zwischen 23,6 Mb (6q16.2-q22.31) und 65,8 Mb (6q12-q22.33)^[60,97]. Dies bedeutet, dass in einigen Fällen nahezu der gesamte q-Arm von der 6q-Deletion betroffen ist (siehe Tabelle 1.5).

Tabelle 1.5: Maximale Ausdehnung der 6q-Deletion in der Literatur.

Studie (Autor)	Methode	PCa (n)	Cytobande	Größe (Mb)
Ribeiro et al. ^[97]	aCGH	46	6q16.2-q22.31	23,6
Mao et al. ^[85]	aCGH	77	6q13-q16.2	> 27*
Sun et al. * * ^[61]	CGH	872	6q14.1-q21	29,9
Ishkanian et al. ^[102]	CGH	24	6q14.1-q21	30
Liu et al. ^[104]	SNP	55	6q14.1-q21	> 30*
Sorensen et al. ^[103]	SNP	40	6q14.1-q22.1	≈ 37
Lapointe et al. ^[98]	aCGH	64	6q13-q22	> 45*
Visakorpi et al. ^[101]	CGH	40	6cen-q21	> 45*
Huang et al. ^[84]	CGH	86	6q13-6q22.31	> 50*
Krohn et al. ^[83]	SNP	72	6q12-q22.31	> 50*
Taylor et al. ^[62]	aCGH	181	6q12-q22.33	58,2
Williams et al. * * ^[60]	CGH/aCGH	662	6q12-q22.33	65,8

* maximale Deletionslänge ist geschätzt, in der Publikation wurde diese nicht angegeben. * * Metaanalyse. PCa: Prostatakarzinome, n: Anzahl analysierte Tumoren, Mb: Megabasen, aCGH: Array-basierte komparative genomische Hybridisierung, CGH: komparative genomische Hybridisierung, SNP: einzelner Nukleotidpolymorphismus.

Eine detaillierte Analyse der Rohdaten von vier großen aCGH Studien mittels der am Institut für Pathologie entwickelten FISH Oracle Datenbank^[105,106] zeigt jedoch deutlich, dass die 6q-Deletion grob in drei Deletionstypen bzw. Deletionslängen eingeteilt werden kann. In der Mehrzahl ist die 6q-Deletion charakterisiert durch große Deletionen die mehr als 60 Mb umfassen und in etwa den Bereich 6q12-q22.31 einschließen. Daneben gibt es kleinere Deletionen von denen die Region 6q14.1-q16.2 betroffen ist und die circa 25 Mb umfassen. Des Weiteren deuten die Daten klar auf die Existenz einer gemeinsam minimal deletierten Region hin, die in nahezu allen 6q-deletierten Tumoren vorkommt (siehe Abbildung 1.5).



Abbildung 1.5: Architektur der 6q-Deletion. Dargestellt sind die mittels FISH Oracle^[105,106] analysierten Daten aus vier publizierten Array-basierten Kopiezahl-Analyse Studien von Taylor et al. an 181 Tumoren^[62], Krohn et al. an 72 Tumoren^[83], Huang et al. an 86 Tumoren^[84] und Mao et al. an 77 Tumoren^[85]. Die blauen Linien zeigen die nachgewiesenen deletierten Regionen auf Chromosom 6 in den einzelnen Prostatatumoren bei einem Intensitäts-Grenzwert von -0,3.

Die Mehrzahl der Studien die sich mit der 6q-Deletion befassen, konnten einen gemeinsam minimal deletierten Bereich in der Region 6q15 nachweisen, der zwischen 800 Kilobasen (Kb) und 4 Mb umfasst. In dieser minimal deletierten Region sind je nach Ausdehnung zwischen 5 und 23 Gene lokalisiert^[98,104]. Einen etwas größeren minimal deletierten Bereich in der Region 6q14-q16 fanden Huang et al.^[84] und Mao et al.^[85]. Diese Region umschließt circa 10 Mb und damit circa 40 Gene (siehe Tabelle 1.6).

Tabelle 1.6: Minimal deletierte Region der 6q-Deletion in der Literatur.

Studie (Autor)	Methode	Cytobande MDR	Größe (Mb)	Gene (n)	potentielle TSG
Liu et al. ^[104]	SNP	6q15	0,817	5	<i>MAP3K7</i>
Krohn et al. ^[83]	SNP	6q15	2	12	n.a.
Taylor et al. ^[62]	aCGH	6q15	2,6	16	<i>MAP3K7</i> <i>CASP8AP2</i> <i>RRAGD</i>
Ishkanian et al. ^[102]	CGH	6q15	3,2	18	n.a.
Lapointe et al. ^[98]	aCGH	6q15	< 4*	23	<i>PNRC1</i> <i>ANKRD6</i> <i>CASP8AP2</i> <i>MAP3K7</i>
Huang et al. ^[84]	CGH	6q14.3-q16.1	10*	≈ 40*	n.a.
Mao et al. ^[85]	aCGH	6q14.1-q16.1	10,5*	≈ 40*	n.a.

* Anzahl codierender Gene/Größe in Megabasen wurde geschätzt, in der Publikation wurde diese nicht angegeben. MDR: minimal deletierte Region, TSG: Tumorsuppressorgen, n: Anzahl codierender Gene, Mb: Megabasen, n.a.: nicht angegeben, aCGH: Array-basierte komparative genomische Hybridisierung, CGH: komparative genomische Hybridisierung, SNP: einzelner Nukleotidpolymorphismus.

In einer eigenen am Institut für Pathologie durchgeführten SNP Studie konnte in 22 von 72 untersuchten Prostatatumoren eine 6q-Deletion nachgewiesen werden^[83,107]. In allen 6q-deletierten Tumoren wurde eine minimal deletierte Region im Bereich 6q15 detektiert. Diese deletierte Region umfasste in 21 Fällen einen circa 2 Mb großen Bereich, in dem insgesamt 12 Gene lokalisiert sind. In einem Fall (Fall 22 in Abbildung 1.6) waren von der Deletion weniger als 700 Kb und damit nur 8 Gene betroffen (siehe Abbildung 1.6). Eine ähnlich kleine gemeinsam minimal deletierte Region fanden Liu et al. mittels SNP. Hier umfasste die minimal deletierte Region etwas mehr als 800 Kb und damit nur 5 Gene (*MDN1* bis *MAP3K7*)^[104]. Basierend auf den SNP Ergebnissen in der Arbeitsgruppe und den bisher publizierten Daten ist es wahrscheinlich, dass eine minimal deletierte Region im Bereich 6q15 existiert, deren telomerische Ausdehnung durch das Gen *MAP3K7* begrenzt ist. Basie-

rend auf den eigenen Daten könnte in der zentromerischen Richtung das Gen *PM20D2* als mögliche Grenze dienen.

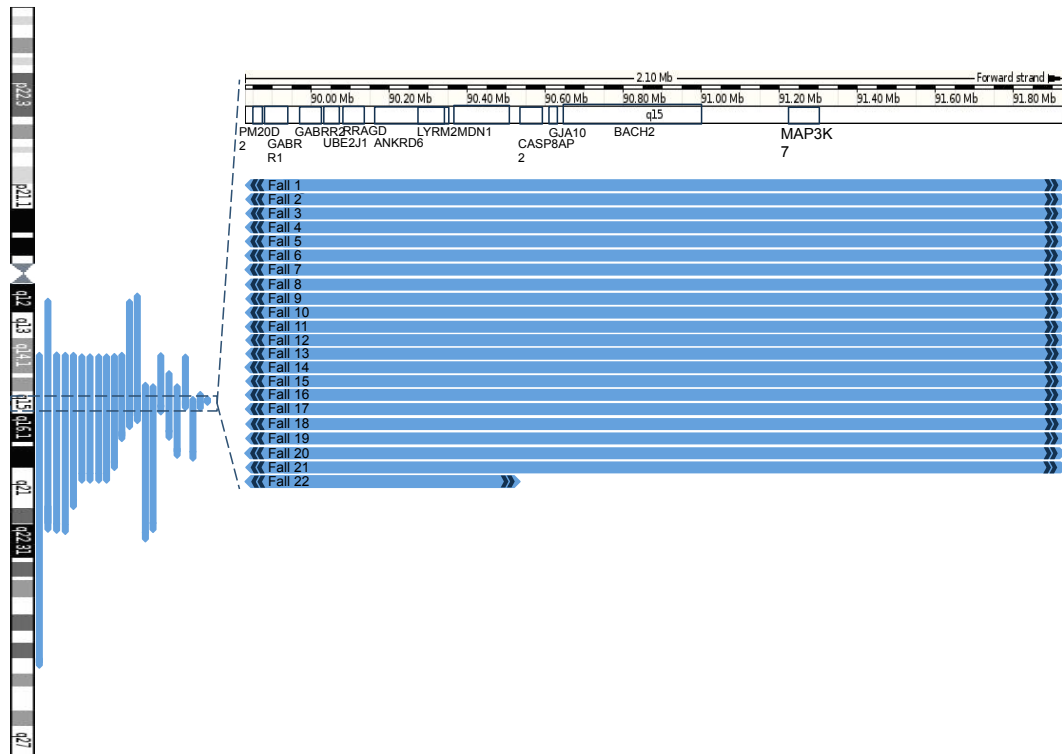


Abbildung 1.6: Minimal deletierte Region auf 6q15. Dargestellt sind die Ergebnisse von Krohn et al.^[83] und Kluth et al.^[107] zur minimal deletierten Region innerhalb der 6q-Deletion. Die blauen Linien zeigen die Ausdehnung der 6q-Deletion in 22 deletierten Fällen von 72 untersuchten Tumoren. Links: Ausdehnung der 6q-Deletion. Die gestrichelten Linien markieren den minimal deletierten Bereich auf 6q15. Rechts: Vergrößerung des minimal deletierten Bereiches auf 6q15 und Lokalisation der von der Deletion betroffenen 12 Gene.

1.7.4 Potentielle Tumorsuppressorgene der 6q-Deletion

Eine verbreitete Strategie zur Identifizierung von bisher unbekannten Tumorsuppressorgenen ist die Suche nach kleinen rekurrenten Deletionen die nur ein oder wenige Gene enthalten. Solch eine rekurrente Deletion stellte der mutmaßliche, ca. 0,8-4 Mb große, Kernbereich der 6q-Deletion auf 6q15 dar. In dieser Region sind je nach Ausdehnung 5 bis 23 Gene von der Deletion betroffen, welche zum Teil eine potentiell tumorbiologisch relevante Funktion besitzen und damit gute Kandidatengene für Tumorsuppressorgene darstellen^[62,98,104]. Zu diesen Genen zählen unter anderem *ANKRD6*, *CASP8AP4*, *BACH2* und *MAP3K7*. *ANKRD6* (Ankyrin Repeat Domain 6) kodiert für das Protein Diversin das als negativer Regulator der kanonischen Wnt/ β -Catenin Signalkaskade fungiert^[108], die eine wesentliche Komponente in der Regulation der Proliferation darstellt^[109]. *CASP8AP2* (Caspase 8 Associated Protein 2) ist essentiell für die Aktivierung von CASP8 und damit für die FAS-vermittelte Apoptose^[110]. *BACH2* (BTB And CNC Homology 1, Basic Leucine Zipper Transcription Factor 2)

kann sowohl als hemmender als auch aktivierender Transkriptionsfaktor bei der Expression verschiedener Gene wirken. Eine bekannte Funktion ist dabei die Induktion der Apoptose bei oxidativem Stress^[111]. MAP3K7 (Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 7) ist eine wichtige Komponente des BMP-Signalweges, der die Balance zwischen Differenzierung (BMP Signalweg) und Proliferation (WNT Signalweg) reguliert^[112,113]. Eine potentiell tumorsuppressive Funktion beim Prostatakarzinom konnte für MAP3K7 bereits in Mausversuchen nachgewiesen werden^[114]. In der Literatur werden jedoch auch Gene außerhalb der minimal deletierten Region als potentielle Tumorsuppressorgene beim Prostatakarzinom diskutiert. Zu diesen Gene zählen unter anderem *FOXO3*^[60,61] (6q21), *CCNC*^[90,93] (6q16.2), *HEK11*^[90] (6q16.1), *AIM1*^[90] (6q21), *FYN*^[103] (6q21), *SNX14*^[103] (6q14.3) und *GOPC*^[61] (6q22.1).

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Ein bestehendes Problem in der Diagnostik und Therapie des Prostatakarzinoms ist, dass prognostische Marker fehlen, die eine verlässliche Einschätzung der Aggressivität der Prostatakarzinome ermöglichen. Obwohl Deletionen auf Chromosom 6q mit einer Deletionsrate von 13 %-62 %^[62,96] zu den häufigsten chromosomalen Veränderungen des Prostatakarzinoms zählen, ist die Bedeutung dieser Deletion für die Pathogenese und den klinischen Verlauf des Prostatakarzinoms bis heute unklar. Die vorliegende Arbeit verfolgte daher das Ziel, die klinische Relevanz der 6q-Deletion beim Prostatakarzinom zu klären und zu prüfen, ob der Nachweis einer 6q-Deletion zu einer besseren Beurteilung des Aggressivitätspotentials der Karzinome beitragen kann. Des Weiteren soll untersucht werden, ob innerhalb der 6q-deletierten Region potentiell tumorrelevante bzw. tumorsuppressive Gene lokalisiert sind, welche zu einem ungünstigen Tumorphänotyp beitragen. Insbesondere wurden in dieser Arbeit folgende Fragestellungen bzw. Hypothesen bearbeitet.

1. Die 6q-Deletion weist eine hohe klinischer Relevanz beim Prostatakarzinom auf. Die klinische Relevanz der 6q-Deletion ist dabei jedoch abhängig von der Deletionsgröße.
 - Wie häufig sind kleine, mittlere und große 6q-Deletionen?
 - Korreliert das Auftreten der 6q-Deletion mit dem klinisch-pathologischen Phänotyp und der Patientenprognose beim Prostatakarzinom (z. B. Gleason Score, Tumorstadium, präoperativer PSA-Wert, postoperatives PSA-Rezidiv)?
 - Hat die Deletionsgröße einen Einfluss auf die klinisch-pathologische Relevanz?

- Sind 6q-Deletionen ein frühes oder spätes Ereigniss innerhalb der Tumorprogression?
- Entstehen die unterschiedlichen 6q-Deletionsgrößen *de novo* oder „wächst“ die Deletion im Verlauf der Tumorprogression?
- Tritt die 6q-Deletion gemeinsam mit anderen genomischen Veränderungen (z. B. *TMPRSS2:ERG*) des Prostatakarzinoms auf?

Zur Bearbeitung dieser Hypothese wurde die 6q-Deletion an einem großen Kollektiv von Prostatakarzinomen mittels Fluoreszenz in-situ Hybridisierung (FISH) untersucht. Dazu wurden FISH-Sonden hergestellt, die innerhalb der minimal deletierten Region (6q15), flankierend davon (6q14.3 und 6q16.1), sowie an den zentromerischen (6q12) und telomerischen (6q22) Endpunkten der 6q-Deletion lokalisiert waren. Für die FISH-Analyse wurden drei Gewebemikroarrays (tissue micro array, TMA) des Institut für Pathologie verwendet. 1. Ein Prognose-TMA mit mehr als 12.000 Prostatatumoren mit dazu gehörigen klinisch-pathologischen Parametern, postoperativen Verlaufsdaten und einer molekularen Datenbank die Studienergebnisse zu weiteren häufigen Veränderungen des Prostatakarzinoms enthält. Mit Hilfe dieses TMAs wurde die prognostische Relevanz der 6q-Deletion anhand des Tumorphänotyps, des PSA-Rezidivs und neuer klinischen Endpunkte, die wesentliche Charakteristika des Prostatakarzinoms umfassen, geprüft (siehe 2.2). 2. Ein multifokaler Heterogenitäts-TMA zur Untersuchung der intra- und interfokalen Heterogenität der 6q-Deletion und 3. Ein unifokaler Heterogenitäts-TMA zur Untersuchung der Entstehung der unterschiedlichen 6q-Deletionsgrößen während der Tumorprogression. Eine genaue Beschreibung der verwendeten TMAs ist im Materialteil vorhanden (siehe 2.2 und 2.3).

2. Die 6q-Deletion enthält mehrere unbekannte potentiell tumorsuppressive Gene. Tumoren mit kleinen 6q-Deletionen sind durch die Inaktivierung eines oder weniger tumorrelevanter Gene charakterisiert, während der tumorrelevante Effekt bei großen 6q-Deletionen durch die gleichzeitige Inaktivierung oder Funktionsverminderung mehrerer tumorsuppressiver Gene bewirkt wird.

- Gibt es bisher unbekannte Tumorsuppressorgene innerhalb der kleinen, mittleren und großen 6q-Deletion?

- Welche Auswirkung hat die reduzierte Funktion ausgewählter Gene auf das Wachstum benigner und maligner Prostataepithelzelllinien?
- Liegt eine homozygote oder heterozygote Inaktivierung der potentiell tumorrelevanten Gene vor?
- Führt die Inaktivierung eines oder mehrerer Gene der 6q-deletierten Gene ursächlich zu einer malignen Transformation oder existieren kooperative Effekte von eventuell mehreren haploinsuffizienten Genen?

Zur Bearbeitung dieser Hypothese wurden 38 Gene innerhalb der 6q12-q22 Deletion shRNA-vermittelt runterreguliert und die Auswirkungen der reduzierten Expression dieser Gene auf das Verhalten von benignen (BPH-1) und malignen (PC-3, DU 145) Zelllinien getestet. Dazu wurden zunächst shRNA-Konstrukte ausgewählt und die Auswirkungen der reduzierten Expression in drei verschiedenen Assays untersucht. Mit Hilfe des Colony-Formation-Assay wurde geprüft, ob die Suppression der untersuchten Gene einen relevanten Effekt auf die Wachstumsfähigkeit der Zellen hat. Gene deren Suppression eine deutliche Steigerung des Zellwachstums verursacht, wurden dann in zwei weiteren Assays untersucht. Im Softagar-Assay wurde geprüft, ob die Suppression eines oder mehrere Gene eine Auswirkung auf die Fähigkeit des adhäsionsunabhängigen Zellwachstums besitzt. Im Invasion-Assay wurde geprüft, ob die reduzierte Expression dieser Gene alleine oder in Kombination eine Auswirkung auf das Potential des invasiven Zellwachstums hat.

Insgesamt soll die vorliegende Arbeit einen Beitrag dazu leisten, die genomischen Veränderungen beim Prostatakarzinom zu identifizieren, welche einen Einfluss auf die Entstehung und die Progression der Karzinome besitzen. Es ist anzunehmen, dass durch ein besseres Verständnis der Tumorbilogie molekulare prognostische Parameter identifiziert werden können. Diese sind insbesondere für Karzinome notwendig, deren Aggressivitätspotential mit den etablierten Prognosemarkern gar nicht bis schwierig einschätzbar ist. Es besteht die Hoffnung, dass durch die Etablierung neuer Biomarker, die Therapieentscheidung für Patienten mit solchen Karzinomen erleichtert wird. Dies würde zu einer Verbesserung der individuellen Situation der Patienten führen, da die Notwendigkeit eines invasiven Eingriffes frühzeitig geklärt werden könnte.

Kapitel 2

Material

2.1 Gewebekollektiv

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Gewebeproben stammen von Patienten, bei denen in der Zeit von 1992 bis 2012 in der Klinik und Poliklinik für Urologie und in der Martini-Klinik am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf nach Diagnose eines Prostatakarzinoms eine Prostatektomie durchgeführt wurde. Alle Prostatektomiepräparate wurden mittels eines standardisierten Verfahrens zugeschnitten, in Paraffinblöcke eingebettet und durch einen Pathologen histologisch beurteilt. Ein geringer Teil der Prostatektomiepräparate wurde nach einem standardisierten Verfahren zugeschnitten und kryokonserviert.

2.2 Prostata-Prognose-Array

Der Prostata-Prognose-Array (tissue micro array, TMA) ist zusammengesetzt aus jeweils einer Tumorstanze aus insgesamt 12.427 Prostatektomiepräparaten (siehe 2.1). Zur Herstellung des TMAs wurde ein repräsentativer Tumorblick pro Patient ausgewählt, eine im Durchmesser 0,6 mm breite Stanze entnommen und die Stanzen auf insgesamt 27 TMA-Blöcke mit je 144 bis 522 Stanzen verteilt (siehe Abbildung 2.1).

Der Prostata-Prognose-TMA oder ein TMA-Subset wurde bereits in zahlreichen Studien zur Identifizierung von neuen molekularen Markern am Institut für Pathologie verwendet.

Neben klinisch-pathologischen Daten wie dem PSA-Wert zum

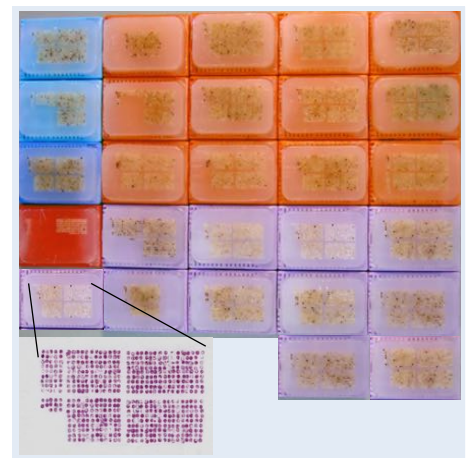


Abbildung 2.1:
Prostata-Prognose-Array.
Quelle: Institut für Pathologie,
UKE

Zeitpunkt der Prostatektomie, dem Gleason Score, dem Tumorstadium, dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen und dem Status des Resektionsrandes waren außerdem klinische Verlaufsdaten für 12.344 der 12.427 untersuchten Patienten nach der Prostatektomie vorhanden. Im Median konnten eine Nachbeobachtung von 36 Monaten (Bereich: 1 bis 241 Monate) durchgeführt werden. Dazu wurde im Anschluss an die Prostatektomie in regelmäßigen Abständen der PSA-Wert im Serum bestimmt. Ein PSA-Rezidiv wurde angenommen bei einem erstmaligen Anstieg des PSA-Wertes auf $\geq 0,2 \text{ ng/ml}$. Die genaue Zusammensetzung der TMA-Patientengruppe ist in der Tabelle 2.1 aufgeführt.

Tabelle 2.1: Zusammensetzung des Prostata-Prognose-Arrays (tissue micro array, TMA). Auf Grund von fehlenden Daten ergibt die Patientenanzahl in den einzelnen Kategorien nicht immer 12.427. PSA: Prostataspezifisches Antigen, AJCC: American Joint Committee on Cancer, Follow-up: klinische Verlaufsdaten.

	Anzahl Patienten (n)	
	TMA Studienkohorte (n = 12.427)	PSA-Rezidiv (n = 2.759)
Follow-up (Monate)		
Mittelwert	49	
Median	36,4	
Alter (Jahre)		
<50	334	81
50 – 59	3.061	705
60 – 70	7.188	1.601
>70	1.761	370
Präoperativer PSA (ng/ml)		
<4	1.585	242
4 – 10	7.480	1.355
10 – 20	2.412	737
>20	812	397
Tumorstadium (AJCC 2002)		
pT2	8.187	1.095
pT3a	2.660	817
pT3b	1.465	796
pT4	63	51
Gleason Score		
$\leq 3 + 3$	2.983	368
$3 + 4$	6.945	1.289
$4 + 3$	1.848	788
$\geq 4 + 4$	584	311
Lymphknoten-Metastasen		
pN0	6.970	1.636
pN1	693	393
Resektionsrand		
negativ	9.990	1.848
positiv	2.211	853

Tabelle 2.2: Zusammensetzung der biologisch-klinischen Endgruppen. Für 9.227 der Patienten konnte auf Grund von fehlenden Daten keine Zuordnung in die Endgruppen erfolgen. BCR: Biochemisches Rezidiv / PSA-Rezidiv.

biologisch-klinische Endgruppe		Pathologie	Patienten (n)
Gruppe 1	lokale Tumoren	pT2 kein BCR	1.546
Gruppe 2	lokale invasive Tumoren	pT3a/pT3b kein BCR / reversibles BCR	496
Gruppe 3	okkulte invasive Tumoren	irreversibles BCR keine Metastasen	847
Gruppe 4	metastasierende Tumoren	Lymphknoten- und/oder Fernmetastasen	311

Des Weiteren erfolgte eine Einteilung der Patienten anhand des Tumorphänotyps in vier biologisch-klinische Endgruppen, die wesentliche Charakteristika des Prostatakarzinoms beinhalten. Dazu zählen das auf die Prostata lokal begrenzte Karzinomwachstum, das organüberschreitende Karzinomwachstum und die lymphogene und hämatogene Metastasierung. Eine genaue Darstellung der biologisch-klinischen Endgruppen ist in Tabelle 2.2 zu finden.

Zusätzlich zu den obengenannten Daten werden am Institut für Pathologie alle mittels FISH und IHC ermittelten Studiendaten zu potentiellen molekularen Markern beim Prostatakarzinom in einer molekulare Datenbank gesammelt. Diese Datenbank wurde ebenfalls für die vorliegende Arbeit verwendet, um zum Beispiel eine Assoziation mit dem ERG Expressionsstatus oder anderen häufigen Deletionen beim Prostatakarzinom zu prüfen.

2.3 Prostata-Heterogenitätsarray

Die Prostata-Heterogenitätsarrays sind zusammengesetzt aus jeweils zehn Karzinomgewebestanzten aus unterschiedlichen Tumorbereichen eines Ektomiepräparates (siehe Abbildung 2.2). Ein unifokaler Tumor wurde angenommen, wenn der Abstand zwischen den einzelnen Tumorbereichen in einem Gewebeschnitt ≤ 3 mm war oder ≤ 4 mm zwischen zwei anliegenden Gewebeschnitten. Dementsprechend wurden zwei oder mehr Tumoren angenommen, wenn der Abstand zwischen den einzelnen Tumorabschnitten in einem Gewebeschnitt ≥ 3 mm oder zwischen zwei anliegenden Gewebeschnitten ≥ 4 mm war^[49]. Mit Hilfe des Heterogenitätsarrays können die Verteilung und das Vorkommen einer molekularen Veränderung untersucht werden. In dieser Arbeit wurde sowohl ein multifokaler als auch ein unifokaler Heterogenitätsarray verwendet.

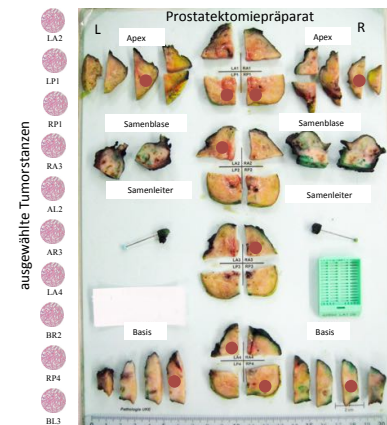


Abbildung 2.2: Makroskopie einer standardmäßig zugeschnittenen Prostata. Rote Punkte: Entnahme der 10 Tumorstanzten für den Prostata-Heterogenitätsarray. Quelle: Institut für Pathologie, UKE.

2.3.1 Multifokaler Prostata-Heterogenitätsarray

Der multifokale Prostata-Heterogenitätsarray wurde aus 189 Ektomiepräparaten zusammengestellt. Für jeden Patienten wurde die Anzahl der unabhängigen Tumoren histologisch im Ektomiepräparat wie unter 2.3 beschrieben ermittelt. Insgesamt hatten 66 Patienten einen Tumorfokus, 48 Patienten 2 Foci, 28 Patienten 3 Foci und 38 Patienten 4 oder mehr Foci (siehe Abbildung 2.3). Bei 10 der 38 Patienten mit ≥ 4 Foci konnte die genaue Anzahl der Tumoren nicht bestimmt werden, da die einzelnen Tumorbereiche nicht klar voneinander abgegrenzt werden konnten. Die 10 Tumorgewebestanzten pro Patient wurden aus unterschiedlichen Tumorbereichen und wenn möglich unterschiedlichen Foci entnommen und in 10 verschiedene TMA-Blöcke gesetzt, so dass, 10 TMA-Blöcke mit je einer Gewebestanze der 189 Prostatektomiepräparate hergestellt wurden. Die Zusammensetzung der TMA-Patientengruppe bezüglich der klinisch-pathologischen Daten ist in der Tabelle 2.3 aufgeführt.

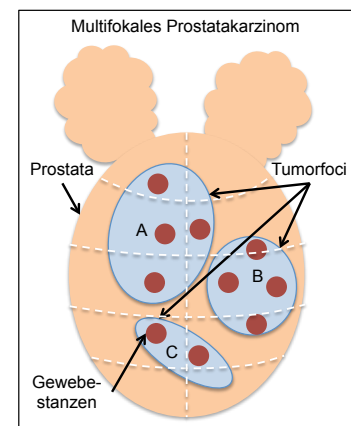


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung eines multifokalen Prostatakarzinoms. In der Prostata sind drei unabhängige Tumorfoci lokalisiert (A-C). Rote Punkte: Entnahme der 10 Tumorstanzten für den Prostata-Heterogenitätsarray.

Tabelle 2.3: Zusammensetzung des multifokalen Prostata-Heterogenitätsarrays (TMA). Auf Grund von fehlenden Daten ergibt die Patientenanzahl in den einzelnen Kategorien nicht immer 189. AJCC: American Joint Committee on Cancer.

Parameter	TMA Studienkohorte (n = 189)
Alter bei OP	
< 50	3
50 – 60	43
60 – 70	120
> 70	23
Tumorstadium (AJCC 2002)	
pT2	127
pT3a	32
pT3b	29
pT4	1
Gleason Score	
$\leq 3 + 3$	4
$3 + 4$	144
$4 + 3$	33
$\geq 4 + 4$	8
Lymphknoten-Metastasen	
N0	130
N1	10
Resektionsrand	
negativ	160
positiv	26

2.3.2 Unifokaler Prostata-Heterogenitätsarray

Der unifokale Prostata-Heterogenitätsarray wurde aus 317 Prostatektomiepräparaten zusammengestellt. Für jeden Patienten wurde der Tumorbereich histologisch im Prostatektomiepräparat wie unter 2.3 beschrieben bestimmt. Die zehn Gewebestanzen pro Patient wurden aus unterschiedlichen Tumorgebieten eines Tumorfokus entnommen und nebeneinander in einen TMA-Block gesetzt (siehe Abbildung 2.4). Insgesamt wurden 7 TMA-Blöcke mit 17 bis 50 Patienten pro TMA-Block hergestellt. Die genaue Zusammensetzung der TMA-Patientengruppe bezüglich der klinisch-pathologischen Daten ist in der Tabelle 2.4 aufgeführt.

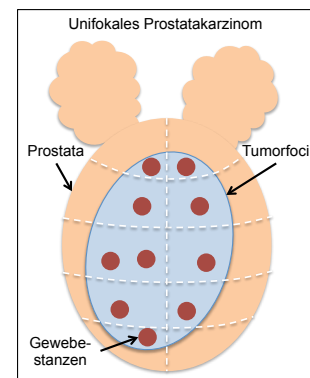


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung eines unifokalen Prostatakarzinoms. In der Prostata befindet sich ein Tumorfokus. Rote Punkte: Entnahme der 10 Tumorstanzen für den Prostata-Heterogenitätsarray.

Tabelle 2.4: Zusammensetzung des unifokalen Prostata-Heterogenitätsarrays (TMA). Auf Grund von fehlenden Daten ergibt die Patientenanzahl in den einzelnen Kategorien nicht immer 317. AJCC: American Joint Committee on Cancer.

Parameter	TMA Studienkohorte (n = 317)
Alter bei OP	
< 50	2
50 – 60	89
60 – 70	168
> 70	57
Tumorstadium (AJCC 2002)	
pT2	89
pT3a	97
pT3b	129
pT4	2
Gleason Score	
$\leq 3 + 3$	4
$3 + 4$	154
$4 + 3$	102
$\geq 4 + 4$	57
Lymphknoten-Metastasen	
N0	158
N1	55
Resektionsrand	
negativ	175
positiv	132

2.4 DH10B *Escherichia coli* (*E. coli*) Klone für die Herstellung von Fluoreszenz-markierten Sonden

Zur Herstellung der FISH-Sonden wurden mit pBACe3.6 transformierte DH10B *E. coli* Klone der Firma Source Bioscience (Nottingham, UK) verwendet (siehe Tabelle 2.5).

Tabelle 2.5: DH10B-Klone zur Herstellung der FISH-Sonden. Kb: Kilobasen.

DH10B-Klon ID	Länge	Lokalisation
RP11-473K10	186 Kb	6q12
RP11-707M13	169 Kb	6q12
RP11-72C17	153 Kb	6q14.3
RP11-475H7	148 Kb	6q14.3
RP3-470J8	175 Kb	6q15
RP11-501P02	167 Kb	6q15
RP11-624G20	159 Kb	6q16.1
RP11-392E05	140 Kb	6q16.1
RP11-746B17	198 Kb	6q22.31
RP11-769C19	171 Kb	6q22.31

2.5 Humane Zelllinien

Im Folgenden sind alle in dieser Arbeit verwendeten humanen Zelllinien in alphabetischer Reihenfolge aufgeführt (siehe Tabelle 2.6).

Tabelle 2.6: Humane Zelllinien

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft
293T (Phoenix)	embryonale Nierenzelllinie	G Nolan, Stanford, USA
BPH-1	epitheliale Zelllinie, isoliert aus einem transurethralen Resektionspräparat von einem Patienten mit benigner Prostatahyperplasie	DSMZ
DU 145	epitheliale Zelllinie, isoliert aus einer Hirnmetastase von einem Patienten mit Prostatakarzinom	ATCC®HTB-81 TM
LNCaP clone FGC	epitheliale Zelllinie, isoliert aus einer supraklavikulären Lymphknotenmetastase von einem Patienten mit metastasierendem Prostatakarzinom	ATCC®CRL-1740 TM
PC-3	epitheliale Zelllinie, isoliert aus einer Knochenmetastase von einem Patienten mit Prostatakarzinom	ATCC®CRL-1435 TM
RWPE-1	epitheliale Zelllinie, isoliert aus einer gesunden adulten Prostata	ATCC®CRL-11609 TM
VCaP	epitheliale Zelllinie, isoliert aus einer Knochenmetastase von einem Patienten mit hormonrefraktärem Prostatakarzinom	ATCC®CRL-2876 TM

2.6 shRNA-pLKO.1 transformierte *E. coli* Klone

Zur Durchführung der shRNA-vermittelten Depletionsversuche wurden mit pLKO.1 transformierte *E. coli* Klone der Firma Sigma-Aldrich (München, Deutschland) verwendet. Die shRNA-Konstrukte für die Negativkontrollen shGFP und shNeg wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Everett et al. zur Verfügung gestellt^[115,116]. Das shRNA-Konstrukt für die Positivkontrolle mTOR wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Sarbassov et al. zur Verfügung gestellt^[117]. In der Tabelle 2.7 sind alle in den Depletionsversuchen verwendeten shRNA-Konstrukte aufgelistet. Eine Liste aller getesteten shRNA-Konstrukte befindet sich in Anhang A.1.

Tabelle 2.7: shRNA-pLKO.1 transformierte *E. coli* Klone

Gensym.	TRC-Nummer	siRNA-Sequenz	Match
<i>AKRIN2</i>	TRCN0000219960	TTGCAAGAGGTCCCAATTATG	3UTR
<i>ANKRD6</i>	TRCN0000160562	CTAATCAACAAGCTGGAGAAT	CDS
<i>ASF1A</i>	TRCN0000074270	GTGAAGAATACGATCAAGTTT	CDS
<i>ATG5</i>	TRCN0000151963	CCTGAACAGAATCATCCTTAA	3UTR
<i>BACH2</i>	TRCN0000018166	CCTGTAGATCAAATCACAGAT	CDS
<i>C6orf162</i>	TRCN0000159717	GCTCTTCATTAAACCTAACAA	CDS
<i>C6orf168</i>	TRCN0000140766	GATTCGGATGTGGACATGGAT	CDS
<i>CASP8AP2</i>	TRCN0000061766	GCCAATTTACAAATCTGACAA	CDS
<i>CCNC</i>	TRCN0000020189	GCATCCAAAGTAGAGGAATTT	CDS
<i>CD164</i>	TRCN0000057555	GCTATTGTTACATAACTCAA	CDS
<i>COQ3</i>	TRCN0000035340	CCTGAAACACTAGAGAGCATT	CDS
<i>EEF1A1</i>	TRCN0000029333	CCTCTCCAGGATGTCTACAAA	CDS
<i>FBXL4</i>	TRCN0000118341	GCCAGGACTATGTGGAACCTTA	CDS
<i>GFP</i>	Everett et al. ^[115,116]	CAACAAGATGAAGAGCACCAA	
<i>HACE1</i>	TRCN0000003417	GCCAGTACCTAAAGATTCTAA	CDS
<i>HDAC2</i>	TRCN0000004819	CAGTCTCACCAATTTTCAGAAA	3UTR
<i>HMGN3</i>	TRCN0000275883	TCTGCCAGATTGTCAGCGAAA	CDS
<i>KIAA0776</i>	TRCN0000122062	CCAGTAAGCATAAGTCATATT	3UTR
<i>LYRM2</i>	TRCN0000230470	GATGATTACTCAAGGCAATAT	CDS
<i>MANEA</i>	TRCN0000049651	GCCTCTGAACTTAACCTTGGAT	CDS
<i>MAP3K7</i>	TRCN0000001556	CAGTGTGTCTTGTGATGGAAT	CDS
<i>MARCKS</i>	TRCN0000029041	GAGCGGCTTCTCCTTCAAGAA	CDS
<i>MMS22L</i>	TRCN0000130019	GCTTCATGGATTACTCTTGTA	CDS
<i>mTOR</i>	Sarbassov et al. ^[117]	TCAGCGTCCCTACCTTCTTCT	
<i>NDUFAF4</i>	TRCN0000122686	GCGAGAGCAGATTAGTCTCTA	CDS
<i>Neg</i>	Everett et al. ^[115,116]	TTATCGCGCATATCACGCG	
<i>ORC3</i>	TRCN0000150842	GCTACTTCTTACAACCTCAGTT	CDS
<i>PHIP</i>	TRCN0000130643	CCATGATATGCCTGACGTTAT	CDS
<i>PM20D2</i>	TRCN0000148358	CCAGATATGGCTGAACATGAT	CDS

(Fortsetzung...)

(fortgesetzt)

Gensym.	TRC-Nummer	siRNA-Sequenz	Match
<i>PNISR</i>	TRCN0000156518	GCTCAGGTAGTAGTCGTACTT	CDS
<i>PNRC1</i>	TRCN0000063278	GCAAATATAACTTGCCACTAA	CDS
<i>PTEN</i>	TRCN0000002746	CCACAGCTAGAACTTATCAAA	CDS
<i>RARS2</i>	TRCN0000045346	GTACTGGTCAAAGGACTGTAA	CDS
<i>RB1</i>	TRCN0000295892	GTGCGCTCTTGAGGTTGTAAT	CDS
<i>RRAGD</i>	TRCN0000059537	CCAGGGCCTACAAAGTGAATA	CDS
<i>SENP6</i>	TRCN0000272788	CCTTGATCCTCCGGCAAATAT	CDS
<i>SLC35A1</i>	TRCN0000038200	CCATCGTTAGTGTATGCTGTT	CDS
<i>SMAP1</i>	TRCN0000150993	CCGATGATTTCTAATCCCTTA	CDS
<i>TRAF3IP2</i>	TRCN0000160964	GCTTCAGAACACTCATGTCTA	CDS
<i>TTK</i>	TRCN0000006357	CCAGTTGTAAAGAATGACTTT	CDS
<i>UBE2J1</i>	TRCN0000320501	ACATTCTGCATTGGGTATAAT	3UTR
<i>ZNF292</i>	TRCN0000230618	TGAAGGCTGTGACCGTATATA	CDS

2.7 Plasmide zur Produktion von lentiviralen Partikeln

Für die Produktion der lentiviralen Partikel wurden die Plasmide pREV, pRRE und CMV-VSV-G verwendet, die freundlicherweise vom Heinrich-Pette-Institut in Hamburg (Arbeitsgruppe Carol Stocking) zur Verfügung gestellt wurden.

2.8 TaqMan[®]-Sonden

Zur Durchführung der TaqMan[®]-PCR wurden die in der Tabelle 2.8 aufgelisteten TaqMan[®]-Sonden der Firma Life TechnologiesTM (Carlsbad, USA) verwendet.

Tabelle 2.8: TaqMan[®]-Sonden

Gensym.	Genname	Assay-ID
<i>AKIRIN2</i>	akirin 2	Hs00363236_m1
<i>ANKRD6</i>	ankyrin repeat domain 6	Hs00208902_m1

(Fortsetzung...)

<i>(fortgesetzt)</i>		
Gensym.	Genname	Assay-ID
<i>ASF1A</i>	anti-silencing function 1 homolog A (S. cerevisiae)	Hs00204044_m1
<i>ATG5</i>	autophagy related 5 homolog (S. cerevisiae)	Hs00169468_m1
<i>BACH2</i>	BTB and CNC homology 1, basic leucine zipper tran- scription factor 2	Hs00222364_m1
<i>C6orf162</i>	chromosome 6 open reading frame 162	Hs00220794_m1
<i>C6orf163</i>	chromosome 6 open reading frame 163	Hs00906914_m1
<i>C6orf164</i>	chromosome 6 open reading frame 164	Hs03677286_m1
<i>C6orf165</i>	chromosome 6 open reading frame 165	Hs00401885_m1
<i>C6orf168</i>	chromosome 6 open reading frame 168	Hs00383314_m1
<i>CASP8AP2</i>	caspase 8 associated protein 2	Hs01594281_m1
<i>CCNC</i>	cyclin C	Hs01029304_m1
<i>CD164</i>	CD164 molecule, sialomucin	Hs00174789_m1
<i>CNR1</i>	cannabinoid receptor 1 (brain)	Hs01038522_s1
<i>COQ3</i>	coenzyme Q3 homolog, methyltransferase (S. cerevi- siae)	Hs00213616_m1
<i>EEF1A1</i>	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	Hs00265885_g1
<i>EPHA7</i>	EPH receptor A7	Hs00177891_m1
<i>FBXL4</i>	F-box and leucine-rich repeat protein 4	Hs00273315_m1
<i>FHL5</i>	four and a half LIM domains 5	Hs00220910_m1
<i>FUT9</i>	fucosyltransferase 9 (alpha (1,3) fucosyltransferase)	Hs00295996_s1
<i>GABRR1</i>	gamma-aminobutyric acid (GABA) receptor, rho 1	Hs00266687_m1
<i>GABRR2</i>	gamma-aminobutyric acid (GABA) receptor, rho 2	Hs01069773_m1
<i>GAPDH</i>	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Hs99999905_m1
<i>GJA10</i>	gap junction protein, alpha 10, 62kDa	Hs00261665_s1
<i>GJB7</i>	gap junction protein, beta 7, 25kDa	Hs01941292_s1
<i>GPR63</i>	G protein-coupled receptor 63	Hs01868848_s1
<i>HACE1</i>	HECT domain and ankyrin repeat containing E3 ubi- quitin protein ligase 1	Hs00410879_m1
<i>HDAC2</i>	histone deacetylase 2	Hs00231032_m1
<i>HMGN3</i>	high mobility group nucleosomal binding domain 3	Hs01070466_g1
<i>KIAA0776</i>	KIAA0776	Hs00391862_m1
<i>(Fortsetzung...)</i>		

<i>(fortgesetzt)</i>		
Gensym.	Genname	Assay-ID
<i>KLHL32</i>	kelch-like 32 (Drosophila)	Hs00536445_m1
<i>LYRM2</i>	LYR motif containing 2	Hs03027716_s1
<i>MANEA</i>	mannosidase, endo-alpha	Hs00226429_m1
<i>MAP3K7</i>	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7	Hs01105682_m1
<i>MARCKS</i>	myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate	Hs00158993_m1
<i>MDN1</i>	MDN1, midasin homolog (yeast)	Hs00277442_m1
<i>MMS22L</i>	MMS22-like, DNA repair protein	Hs00951791_m1
<i>mTOR</i>	mechanistic target of rapamycin (serine/threonine kinase)	Hs00234508_m1
<i>NDUFAF4</i>	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, assembly factor 4	Hs00832315_s1
<i>ORC3</i>	origin recognition complex, subunit 3	Hs01031852_g1
<i>PHIP</i>	pleckstrin homology domain interacting protein	Hs00215670_m1
<i>PM20D2</i>	peptidase M20 domain containing 2	Hs01384908_m1
<i>PNISR</i>	PNN-interacting serine/arginine-rich protein	Hs00369090_m1
<i>PNRC1</i>	proline-rich nuclear receptor coactivator 1	Hs00199095_m1
<i>POU3F2</i>	POU class 3 homeobox 2	Hs00271595_s1
<i>PTEN</i>	phosphatase and tensin homolog	Hs02621230_s1
<i>RARS2</i>	arginyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial	Hs00368084_m1
<i>RB1</i>	retinoblastoma 1	Hs01078066_m1
<i>RNGTT</i>	RNA guanylyltransferase and 5'-phosphatase	Hs01016926_m1
<i>RRAGD</i>	Ras-related GTP binding D	Hs00222001_m1
<i>SENP6</i>	SUMO1/sentrin specific peptidase 6	Hs00210213_m1
<i>SLC35A1</i>	solute carrier family 35 (CMP-sialic acid transporter), member A1	Hs00197423_m1
<i>SMAP1</i>	small ArfGAP 1	Hs00222567_m1
<i>SPACA1</i>	sperm acrosome associated 1	Hs01124418_m1
<i>SRSF12</i>	serine/arginine-rich splicing factor 12	Hs00365534_m1
<i>TRAF3IP2</i>	TRAF3 interacting protein 2	Hs00210113_m1
<i>TTK</i>	TTK protein kinase	Hs01009870_m1
<i>UBE2J1</i>	ubiquitin-conjugating enzyme E2, J1, U	Hs00249272_m1

(Fortsetzung...)

(fortgesetzt)

Gensym.	Genname	Assay-ID
<i>USP45</i>	ubiquitin specific peptidase 45	Hs00262906_m1
<i>ZNF292</i>	zinc finger protein 292	Hs00418352_m1

2.9 Western Blot Antikörper

Im Folgenden sind alle in dieser Arbeit verwendeten Western Blot Antikörper in alphabetischer Reihenfolge aufgelistet (siehe Tabelle 2.9).

Tabelle 2.9: Western Blot Antikörper

Protein	Bestellnummer	Firma
α -Tubulin	T5168	Sigma-Aldrich, München
goat α -mouse IgG	#115-035-062	Dianova, Hamburg
goat α -rabbit IgG	#115-035-144	Dianova, Hamburg
HMGN3	NB100-59839	Novus Biologicals, Littleton, USA
ORC3	LS-C1457	LSBio, Nottingham, UK
PM20D2	AP11466b	Abgent, San Diego, USA
SMAP1	NBP1-83702	Novus Biologicals, Littleton, USA
UBE2J1	AV43206	Sigma-Aldrich, München
ZNF292	ab128347	Abcam, Cambridge, UK

2.10 Zellkulturmedien für humane Zelllinien

Im Folgenden sind alle in dieser Arbeit verwendeten Zellkulturmedien in alphabetischer Reihenfolge aufgeführt.

DMEM-Vollmedium	500 ml DMEM (1x), liquid (High Glucose)
für 293T-Zellen	50 ml Fetal Bovine Serum Gold (FCS)
	5,5 ml Sodium Pyruvat
	5,5 ml MEM NEAA 100x
	5,5 ml PenStrep
Opti-MEM [®] I (1x)	keine weiteren Zusätze

K-SFM-Vollmedium	500 ml Defined Keratinocyte-SFM (1x), Liquid
für RWPE-1 Zellen	1 ml Defined Keratinocyte-SFM Growth Supplement
	5 ml PenStrep
RPMI-Vollmedium	500 ml RPMI Medium 1640 (1x)+GlutaMAX TM -I
für Prostatazelllinien	50 ml Fetal Bovine Serum Gold (FCS)
	5,5 ml Sodium Pyruvat
	5,5 ml MEM NEAA 100x
	5,5 ml PenStrep
Selektionsmedium	566,5 ml RPMI-Vollmedium für Prostatazelllinien
	84,9 μ l Puromycin-Lösung (10 μ g/ μ l)
Transduktionsmedium	50 ml RPMI-Vollmedium für Prostatazelllinien
	50 μ l Polybren (10 mg/ml)

2.11 Reagenzien und Kits

Im Folgenden sind alle in dieser Arbeit verwendeten Reagenzien und Kits in alphabetischer Reihenfolge aufgelistet.

Reagenz / Kit	Bezugsquelle
0,25 % Trypsin-EDTA	Invitrogen, Carlsbad, USA
20x SSC	Abbot, Ludwigshafen
Agarose	Sigma-Aldrich, München
Ampicillin Natriumsalz	Sigma-Aldrich, München
Blotting-Grade Blocker	Bio-Rad, München
Cell Extraction Buffer	Invitrogen, Carlsbad, USA
CEP 6 SpectrumAqua Probe	Abbot, Ludwigshafen
CEP 6 SpectrumOrange Probe	Abbot, Ludwigshafen
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich, München
Chloroform	VWR, Darmstadt
Clarity TM Western ECL Substrate	Bio-Rad, München
COT Human DNA	Roche, Grenzach-Wyhlen
Defined Keratinocyte-SFM, Liquid	Invitrogen, Carlsbad, USA

DEPC Wasser	Invitrogen, Carlsbad, USA
Dextransulfat (Natriumsalz)	Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, München
DMEM, liquid (High Glucose)	Invitrogen, Carlsbad, USA
Ethanol 70 %, 80 %, 96 %	VWR, Darmstadt
Ethanol Ph Eur	VWR, Darmstadt
Fetal Bovine Serum Gold (FCS)	Gibco, Carlsbad, USA
Formamid pro analysi	Merck, Darmstadt
Giemsa Azur-Eosin-Methylenblaulösung	Merck, Darmstadt
Green dUTP (50 nmol, lyophilisiert)	Abbot, Ludwigshafen
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Bioscience, Carlsbad, USA
Immersol TM 518 F	Zeiss, Oberkochen
Isopropanol 100 %	Merck, Darmstadt
Laemmli Sample Buffer	Bio-Rad, München
LB broth, Miller	Sigma-Aldrich, München
Lipofectamin [®] 2000	Invitrogen, Carlsbad, USA
MEM NEAA 100x	Invitrogen, Carlsbad, USA
Methanol	Merck, Darmstadt
Mini-PROTEAN TGX Precast Gel 4-15 %	Bio-Rad, München
Mounting Medium with DAPI (VECTA- SHIELD)	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Sigma-Aldrich, München
Nick Translations Reagent Kit	Abbot, Ludwigshafen
NP-40	Abbot, Ludwigshafen
Nukleasefreies Wasser	Sigma-Aldrich, München
NucleoBond [®] BAC 100	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin [®] RNA II Kit	Macherey-Nagel, Düren
Opti-MEM [®] I	Invitrogen, Carlsbad, USA
Orange dUTP (50 nmol, lyophilisiert)	Abbot, Ludwigshafen
PenStrep	Invitrogen, Carlsbad, USA
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, München
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Invitrogen, Carlsbad, USA
Polybren	Sigma-Aldrich, München
Polyethylenimin (PEI)	Polysciences, Eppelheim
Ponceau S	Serva, Heidelberg

Precision Plus Protein TM Standard Dual	Bio-Rad, München
Precision Protein StrepTactin-HRP Conjugate	Bio-Rad, München
Pretreatment Reagent	Abbot, Ludwigshafen
Protease Buffer	Abbot, Ludwigshafen
Protease I	Abbot, Ludwigshafen
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich, München
Puromycindihydrochlorid	Sigma-Aldrich, München
Qiagen [®] Plasmid Plus Maxi Kit	Qiagen, Venlo, Niederlande
QIAquick Nucleotide Removal Kit	Qiagen, Venlo, Niederlande
Qubit [®] Protein Assay Kit	Invitrogen, Carlsbad, USA
Reinigungsbenzin	Biesterfeld Chemiedistribution GmbH, Hamburg
RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
RNase-Free DNase Set	Qiagen, Venlo, Niederlande
RNeasy [®] FFPE Kit	Qiagen, Venlo, Niederlande
RNeasy [®] Mini Kit	Qiagen, Venlo, Niederlande
RPMI Medium 1640 (1x)+GlutaMAX TM -I	Invitrogen, Carlsbad, USA
Röntoroll Entwickler	Tetenal, Norderstedt
Salzsäure 37 %	Merck, Darmstadt
Sodium Pyruvat	Invitrogen, Carlsbad, USA
Superfix Fixierer für Röntgenfilme	Tetenal, Norderstedt
TaqMan [®] Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems [®] , Carlsbad, USA
Trans-Blot Turbo Transfer Pack Mini	Bio-Rad, München
Trichloressigsäure (3%)	Merck, Darmstadt
Tris-Glycine-SDS Buffer (TGS-Buffer)	Bio-Rad, München
Tris Hydrochlorid	Promega, Madison, USA
Trizol [®]	Invitrogen, Carlsbad, USA
Tween [®] 20	Merck, Darmstadt
Xylol	J. T. Baker, Center Valley, USA
β -Mercaptoethanol	Fluka, München

2.12 Verwendete Lösungen

Im Folgenden sind alle in dieser Arbeit verwendeten Lösungen in alphabetischer Reihenfolge aufgeführt.

Agaroselösung 0,7 %	0,7 g Agarose 100 ml destilliertes Wasser (dH ₂ O)
Agaroselösung 1,2 %	1,2 g Agarose 100 ml dH ₂ O
Ampicillin-Stocklösung (100 mg/ml)	1 g Ampicillin Natriumsalz 100 ml dH ₂ O
Basisansatz (FISH)	15,0 ml deionisiertes Formamid 4,5 ml 20 x SSC 3,0 g Dextransulfat pH-Wert: 7,0
Chloramphenicol-Lösung 3,4 %	34,0 mg Chloramphenicol 1,0 ml absoluter Ethanol
Hybridisierungswaschpuffer (FISH)	100 ml 20 x SSC 3,0 ml NP40 pH-Wert: 7,25
LB-Medium	25,0 g LB broth, Miller ad 1 l dH ₂ O 20 Minuten bei 121 °C autoklavieren
Milchpulverlösung (3 %)	3,0 g Blotting-Grade Blocker 100 ml TBS-T Waschpuffer
Natriumhydroxid-Lösung (1 molar)	4,0 g Natriumhydroxid ad 100 ml dH ₂ O
PMSF-Lösung (0,1 M)	8,85 mg PMSF 500 µl DMSO
Ponceau S Lösung	0,2 g Ponceau S ad 100 ml Trichloressigsäure (3%)
Protease-Lösung	250 mg Protease I 500 ml Protease Puffer
Proteinisolationspuffer	2,464 ml Cell Extraction Buffer 12,5 µl Protease Inhibitor Cocktail 25,5 µl PMSF-Lösung (0,1 M)
Puromycin-Lösung (10 µg/µl)	100 mg Puromycindihydrochlorid 10 ml dH ₂ O

Reinigungslösung	85 ml Reinigungsbenzin
für Mikroskope / Objektträger	15 ml Isopropanol 100 %
Salzsäurelösung (1 molar)	8,3 ml Salzsäure 37 %
	ad 100 ml dH ₂ O
SSC (20x)	132 g Natrium-Natriumcitrat
	500 ml dH ₂ O
	pH-Wert: 5,3
Stripping Lösung	0,375 g Tris Hydrochlorid
	1,0 g SDS
	0,39 ml β -Mercaptoethanol
	ad 50 ml dH ₂ O
TBS (10x)	60,5 g Tris Hydrochlorid
	87,6 g Natriumchlorid
	ad 1.000 ml dH ₂ O
	pH-Wert: 7,5
TBS-T Waschpuffer	100 ml TBS
	1 ml Tween [®] 20
	ad 1.000 ml dH ₂ O

2.13 Geräte

Im Folgenden sind alle in dieser Arbeit verwendeten Geräte in alphabetischer Reihenfolge aufgelistet.

Gerät	Bezugsquelle
7900HT Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems [®] , Carlsbad, USA
Bioanalyzer 2100	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Bioanalyzer Chip Vortexer (IKA MS 3)	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
C1000 TM Thermal Cycler	Bio-Rad, München
Cellometer TM Auto T4	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Fluoreszenzmikroskop, Axio Imager.A1	Zeiss, Oberkochen
Fluoreszenzmikroskop, IX 70 inverted microscope	Olympus, Shinjuku Monolith, Japan
Heizplatte	MEDAX GmbH-Co.KG, Neumünster
Heizrührer RCT basic	IKA [®] , Labortechnik, Staufen
Heracell TM 240i CO ₂ Inkubator	Heraeus Thermo Scientific, Hanau

Heraeus HB 2448 (Sicherheitswerkbank S1)	Heraeus Thermo Scientific, Hanau
Herasafe TM (Sicherheitswerkbank S2)	Heraeus Thermo Scientific, Hanau
HLC Vakuum-Sicherheits-Absaugsysteme	Ditabis, Pforzheim
Inkubator	GFL, Burgwedel
MS1 Minishaker	IKA®, Labortechnik, Staufen
Multifuge 3L	Heraeus Thermo Scientific, Hanau
Nanodrop ND 1000	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
ph-Meter 766 Calimatic	Knick, Berlin
Power Pac 200	Bio-Rad, München
Power Pac 3000	Bio-Rad, München
Primus (Thermocycler)	ALS, Jena
PTC 100® Thermal Cycler	MJ Research, Waltham, USA
Qubit®2.0 Fluorometer	Invitrogen, Carlsbad, USA
Rotor A-4-44	Eppendorf, Hamburg
Rotor- JA-14	Beckmann, Krefeld
Rotor- JA-20	Beckmann, Krefeld
Sanyo CO ₂ incubator	Sanyo, Moriguchi, Japan
Shaker S4	Elmi, Riga, Lettland
Thermobrite TM	Abbot, Ludwigshafen
Thermomixer®compact	Eppendorf, Hamburg
Trans-Blot®SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad, München
Trockenschrank	Memmert GmbH-Co.KG, Schwabach
Vac-Man®Laboratory Vacuum Manifold	Promega, Madison, USA
Vakuumpumpe, biovac 102	ILMVAC, Ilmenau
Vakuummzentrifuge, Concentrator Plus	Eppendorf, Hamburg
Wasserbäder	GFL, Burgwedel
Zentrifuge 5804 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge, Beckmann J2-21M/E	Beckmann, Krefeld
Zentrifuge, Biofuge fresco	Heraeus Thermo Scientific, Hanau
Zentrifuge, Sigma 2K15	Braun Biotech, Melsungen

2.14 Materialien

Im Folgenden sind alle über den normalen Laborbedarf hinausgehende Verbrauchsmaterialien aufgelistet.

Material	Bezugsquelle
BD BioCoat TM Control 8,0 μ m PET Membran	BD, Franklin Lakes, USA
BD BioCoat TM Matrigel TM Invasion Chamber	BD, Franklin Lakes, USA
CHT-4-SD Cell Counting Chamber	Nexcelom Bioscience, Lawrence, USA
Cryoröhrchen	VWR, Darmstadt
Einmalspritzen	B.Braun, Melsungen
Fixogum	Marabu, Tamm
Kanülen 0,9x20,0	B.Braun, Melsungen
Kodak X-Sight G/RA Film	Kodak, New York, USA
Millex Filter Units 33 mm	Millipore, Tullagreen, Irland
Paraffin Tape Slides	H.C.E. GmbH, Saarbrücken
Safe-Lock Reaktionsgefäße (amber) 0,5 ml, 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
TapeWindows	H.C.E.GmbH, Saarbrücken
Zellkultur Flaschen (T25, T75, T175)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkultur Platten (6-, 12-, 24-Well)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkultur Platten (10 cm)	BD, Franklin Lakes, USA

2.15 Software und Datenbanken

Ensemble release 71	Auswahl der DH10B-Klone zur Herstellung der FISH-Sonden
Microsoft [®] Excel [®] für MAC 2011	Erstellen von Abbildungen, Auswertung der TaqMan-PCR
JMP 9.0.2	Statistische Auswertung der Studiendaten
Microsoft [®] PowerPoint [®] für MAC 2011	Erstellen von Abbildungen

Kapitel 3

Methoden

3.1 Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH)

Die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) dient dem Nachweis von genomischen Veränderungen in Geweben oder Zellen direkt am Chromosom. Mit Hilfe von unterschiedlichen Fluoreszenz-markierten Nukleotidsträngen (FISH-Sonden) können so chromosomale Aberrationen wie Translokationen, Amplifikationen oder Deletionen detektiert werden^[118].

Sowohl die Herstellung der FISH-Sonden als auch die Hybridisierung der TMAs und Gewebegroßflächen erfolgte nach einem am Institut für Pathologie etablierten und standardisiertem Protokoll.

3.1.1 Kultivierung von pBACe3.6 transformierten DH10B *E. coli*

Vor der Isolierung der Plasmid-DNA aus den kommerziell transformierten DH10B Bakterien müssen diese zunächst vermehrt werden, damit eine ausreichende Plasmid-DNA Ausbeute erzielt werden kann.

Dazu wurden zunächst 10 ml LB-(Lysogeny Broth)Medium und 30 μ l Chloramphenicol-Lösung (3,4 %) in einem 100 ml Erlenmeyerkolben vorgelegt, mit einer Pipettenspitze mehrere Bakterienkolonien aus dem Schrägagar aufgenommen und die Pipettenspitze im Medium abgeworfen. Die Vorkultur wurde für 6 bis 8 Stunden bei 37 °C und 190 rpm bis zu einer leichten Trübung des Mediums inkubiert. Die Trübung zeigte an, dass die Bakterien in einer ausreichenden Menge vermehrt waren. Dann wurde eine Hauptkultur aus 250 ml LB-Medium, 750 μ l Chloramphenicol und 2 ml der Vorkultur in einem 500 ml Erlenmeyerkolben angesetzt. Die Hauptkultur wurde für mindestens 16 Stunden über Nacht bis zu einer leicht sichtbaren Trübung des Mediums bei 37 °C und 190 rpm inkubiert. Danach wurde die Hauptkultur in

ein Zentrifugengefäß überführt und für 15 Minuten bei 4 °C und 6.000 *g* zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und aus dem Bakterienpellet die Plasmid-DNA isoliert (siehe 3.1.2).

3.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus DH10B *E. coli*

Für die Isolierung der Plasmid-DNA aus dem unter 3.1.1 generiertem Bakterienpellet wurde das NucleoBond®BAC 100 Kit von der Firma Machery-Nagel (Düren, Deutschland) verwendet. Dieses System basiert auf der Isolierung von Plasmid-DNA mit Hilfe einer Anionenaustauscher gekoppelten Silkamatrix Säule. Während der Isolierung wird die bakterielle Plasmid-DNA von der chromosomalen DNA, RNA, Proteinen, Kohlenhydraten und weiteren unerwünschten Zellbestandteilen getrennt. Die Isolierung einer reinen Plasmid-DNA ist für die Herstellung von FISH-Sonden mittels Nick Translation notwendig (siehe 3.1.4).

Zu Beginn der Isolierung wurde zu dem S1 Puffer die RNase A in einer Endkonzentration von 100 µg/ml pipettiert. Dann wurde das Bakterienpellet (siehe 3.1.1) mit 24 ml S1 Puffer resuspendiert. Anschließend wurden 24 ml S2 Puffer zu der Bakteriensuspension gegeben, die Mischung durch leichtes drehen der Zentrifugengefäße homogenisiert und für 4 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dadurch erfolgte zum einen die alkalische Lyse der Bakterien und zum anderen die Denaturierung der Plasmid-DNA und chromosomalen DNA. Zur Neutralisation und damit Ausfällung der chromosomalen DNA und anderen unerwünschten Zellbestandteilen wurde die Mischung dann mit 24 ml S3 Puffer versetzt, durch mehrmalige leichte Drehungen homogenisiert und für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Der entstandene Überstand wurde mit Hilfe eines mit dH₂O angefeuchteten Filters filtriert. Während der Filtration wurde die Silikabasierte Anionenaustauscher Säule mit 6 ml N2 Puffer equilibriert. Sofort nach dem Durchlaufen des N2 Puffers wurde das Filtrat auf die Säule gegeben. Dabei band die Plasmid-DNA auf Grund ihrer negativen Ladung an die positiv geladene Silkamatrix und das Eluat konnte verworfen werden. Anschließend wurde die Säule zweimal mit 18 ml N3 Puffer gewaschen und das Eluat verworfen. Im Anschluss an den Waschprozeß wurde die Plasmid-DNA mit 15 ml des auf 50 °C erwärmten basischen N5 Puffers aus der Säule in ein Zentrifugenröhrchen eluiert. Zur Ausfällung der Plasmid-DNA wurde das Eluat mit 11 ml Isopropanol 100 % versetzt und für 30 Minuten bei 4 °C und 16.500 *g* zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zentrifugenröhrchen für einige Minuten auf ein Stück Zellstoff gestellt, um vorhandene Überstandreste zu entfernen. Danach wurde das Plasmid-DNA Pellet mit 5 ml Ethanol 70 % für 10 Minuten bei 4 °C und 16.500 *g* gewaschen. Nachdem

der Überstand abgenommen war, wurde das Plasmid-DNA Pellet unter dem Abzug für 10 bis 15 Minuten getrocknet. Dann wurden 150 μl nukleasefreies Wasser auf das Pellet pipettiert, über Nacht bei 4 °C inkubiert und die gelöste Plasmid-DNA in ein Reagiergefäß überführt. Abschließend wurde die Konzentration der Plasmid-DNA wie unter 3.1.3 beschrieben bestimmt und auf eine Endkonzentration von 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ mit nukleasefreiem Wasser verdünnt. Bis zur weiteren Verwendung wurde die Plasmid-DNA bei 4 °C gelagert.

3.1.3 Bestimmung der Konzentration und Reinheit von DNA-Proben

Zur Bestimmung der Konzentration und Reinheit von DNA-Proben wurde das Peqlab NanoDrop[®]ND-1000 UV/Vis-Spektralphotometer verwendet.

Als erstes wurde der Leerwert von 1,5 μl nukleasefreiem Wasser bei einer Wellenlänge von 260 nm eingestellt. Dann wurden 1,5 μl der DNA-Probe pipettiert und bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm gemessen. Bei einer Wellenlänge von 260 nm und einer Absorption (A) von 1 wurde von einer DNA-Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ausgegangen^[119]. Zur Reinheitsbestimmung wurde der Quotient von 260 nm/280 nm bestimmt. Ein Quotient zwischen 1,80 und 1,90 wurde von der Firma Machery-Nagel als Indikator für reine Plasmid-DNA angegeben.

3.1.4 Nick Translation zur Herstellung von FISH-Sonden

Die Nick Translation dient der Synthese von markierten Nukleotidsträngen an zirkulären doppelsträngigen DNA-Molekülen. Diese werden zum Beispiel zum Nachweis von DNA-Sequenzen in der FISH verwendet. Bei dieser Methode werden durch eine DNase induzierte Einzelstrangbrüche (Nicks) in eine doppelsträngige DNA eingefügt. Die dadurch freigesetzte Hydroxylgruppe am 3'-Ende des DNA-Stranges dient als Bindungsstelle für die *E. coli* DNA-Polymerase I. Diese baut auf Grund ihrer 3' → 5'-Exonuklease-Aktivität die Nukleotide am freien 3'-Ende ab. Zeitgleich katalysiert die Polymerase-Aktivität des Enzyms die Synthese eines neuen Stranges in 5' → 3'-Richtung bei der zum Beispiel Fluoreszenz-markierte Nukleotidtriphosphate eingefügt werden können^[120].

Für die Nick Translation der unter 3.1.2 isolierten pBACe3.6-DNA wurde das Nick Translation Reagent Kit der Firma Abbott (Illinois, USA) verwendet. Als erstes wurde die DNA auf eine Konzentration von 1.000 ng/17,5 μl mit nukleasefreiem Wasser auf Eis in einem lichtundurchlässigem Reagiergefäß verdünnt. Zu der verdünnten DNA wurden 5 μl 0,1 mM dTTP- Lösung, 10 μl 0,1 mM dNTP-Lösung, 2,5 μl 0,2 mM Green dUTP- oder 2,5 μl 0,2 mM

Orange dUTP-Lösung (Fluoreszenz-Markierung), 5 μ l Nick Translation Puffer und 10 μ l Nick Translation Enzym (DNase I, DNA-Polymerase I) pipettiert. Dann wurden die Proben kurz gevortext und für eine Minute bei 2.000 g zentrifugiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Proben im Primus Thermocycler bei 15 °C für 8 Stunden. Danach wurde die Reaktion durch das Erhitzen der Proben auf 72 °C für 10 Minuten gestoppt. Die FISH-Sonden wurden bis zur Aufreinigung (siehe 3.1.5) bei 4 °C gelagert.

3.1.5 Isolierung und Aufreinigung von FISH-Sonden

Zur Isolierung und Aufreinigung der unter 3.1.4 synthetisierten FISH-Sonden wurde das QIAquick[®]Nucleotide Removal Kit von der Firma Qiagen (Venlo, Niederlande) verwendet. Dieses basiert auf einer Kombination der Spin Column Technik und der Silikamembranbasierten Isolierung von Oligonukleotiden (> 17 mer) und DNA ($\geq$ 40 bp) bei der unerwünschte Bestandteile wie ungebundene Nukleotide, Enzyme oder Salze entfernt werden. Dieser Vorgang ist notwendig um eine optimale Hybridisierung der FISH-Sonden zu gewährleisten.

Zu Beginn wurden der im Kit enthaltene PNI Puffer mit 19 ml Isopropanol 100 % und der PE Puffer mit 30 ml absolutem Ethanol versetzt. Dann wurde 50 μ l der unter 3.1.4 synthetisierten FISH-Sonde mit 500 μ l PNI Puffer gemischt, auf die Silikamembran im QIAquick spin column pipettiert und bei Raumtemperatur für 1 Minute bei 3.800 g zentrifugiert. Begünstigt durch den hohen Salzgehalt des PNI Puffers banden dabei die Fluoreszenz-markierten doppelsträngigen Nukleotidstränge an die Silikamembran, während die ungebundenen Nukleotide und weiteren unerwünschten Bestandteile eluiert und anschließend verworfen wurden. Zur Auswaschung der Salze wurde der 750 μ l PE Puffer auf die Silikamembran pipettiert, die Probe bei Raumtemperatur für 1 Minute bei 3.800 g zentrifugiert, das Eluat verworfen und die Membran bei Raumtemperatur für 1 Minute bei 17.900 g trocken zentrifugiert. Das spin column wurde auf ein neues lichtundurchlässiges Reagiergefäß gesteckt, 60 μ l nukleasesfreies Wasser direkt auf die Silikamembran pipettiert und nach einer Inkubationszeit von 1 Minute die FISH-Sonde durch eine Zentrifugation von 1 Minute bei 17.900 g und Raumtemperatur eluiert. Abschließend wurde die Probe zur Aufkonzentrierung in einer Vakuumzentrifuge für 20 Minuten bei 45 °C zentrifugiert. Vor der Verwendung der FISH-Sonde wurde diese auf ihre Spezifität und Qualität an einem kleinen TMA aus circa 20 Prostatagewebespts getestet (siehe 3.1.7). Danach wurden die beiden FISH-Sonden, die einen gemeinsamen Sequenzabschnitt markierten, zusammenpipetiert und in einer Vakuumzentrifuge für 20 Minuten bei 45 °C aufkonzentriert. Die fertigen FISH-Sonden wurden bei -20 °C gelagert.

3.1.6 Durchführung der FISH

Die FISH an Formalin-fixierten und Paraffin-eingebetteten (FFPE) TMAs und großflächigen Gewebeschnitten wird in drei Schritten durchgeführt. Im ersten Schritt erfolgt eine Vorbehandlung zur Entparaffinierung des Gewebes, dem Abbau von formalinbedingten Gewebeproteinvernetzungen und die Denaturierung der Histone um die DNA für die Hybridisierung zugänglich zu machen. Im zweiten Schritt werden die DNA-Doppelstränge und die FISH-Sonden kodenaturiert und die FISH-Sonde an die Zielsequenz hybridisiert. Im letzten Schritt werden nicht gebundene FISH-Sonden und Nukleotide durch einen stringenten Waschprozess entfernt^[118].

1. Gewebevorbehandlung

Zur Fixierung der Gewebegroßflächenschnitte auf dem Objektträger wurden diese bei 60 °C über Nacht im Trockenschrank gelagert. Die TMAs wurden bereits beim Schneiden mit TapeWindows auf Paraffin Tape Slides (H.C.E.-GmbH, Saarbrücken) fixiert. Für die Entparaffinierung des Gewebes wurden die Schnitte dreimal für 10 Minuten in Xylol, zweimal für 5 Minuten in Ethanol 96% gestellt und anschließend für 3 Minuten bei 48 °C auf einer Heizplatte getrocknet. Zum Abbau der Gewebeproteinvernetzungen wurden die Schnitte für 15 Minuten in einer 80 °C warmen Pretreatment-Lösung inkubiert und dann zweimal für 1 Minute in dH₂O gewaschen. Im Anschluss daran wurden die TMAs für 150 Minuten und die Großflächen für 250 Minuten bei 37 °C in einer Proteaselösung zum Proteinverdau inkubiert. Danach wurden die Schnitte zweimal für 1 Minute in dH₂O gewaschen. Nachfolgend wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Ethanolreihe für je 3 Minuten in Ethanol 70 %, Ethanol 80 % und Ethanol 96 % entwässert und für weitere 3 Minuten auf einer Heizplatte bei 48 °C getrocknet.

2. DNA-Denaturierung und Hybridisierung der FISH-Sonden

Um eine Verminderung der Fluoreszenzstärke zu vermeiden, wurden alle Arbeiten ohne direktes Licht durchgeführt und lichtundurchlässige Reagiergefäße verwendet. Zunächst wurde ein Hybridisierungsansatz aus Basisansatz, Cot-DNA, genspezifischer FISH-Sonde und einer Centromer 6 Sonde hergestellt (siehe Tabelle 3.1). Durch die Verwendung der Cot-DNA wurden unspezifische Bindungsstellen abgedeckt. Die Centromer 6 Sonde wurde als Referenzsignal für die spätere FISH-Auswertung verwendet. Sie war je nach Farbe der genspezifischen FISH-Sonde orange oder aqua fluoreszenzmarkiert. Nachdem der Hybridisierungsansatz hergestellt war, wurde dieser kurz gevortext und für 10 Sekunden bei 2.500 g zentrifugiert. Dann wurde der komplette Hybridisierungsansatz auf das Gewebe pipettiert und mit einem Deck-

gläschen eingedeckelt. Um eine Austrocknung des Gewebes zu vermeiden wurden die Schnitte anschließend mit Fixogum (Marabou, Tamm) versiegelt und zum Trocknen des Fixogums für 10 Minuten in den ThermobriteTM gelegt. Danach erfolgte die Kodierung der Ziel-DNA und der FISH-Sonden bei 72 °C für 10 Minuten. Abschließend wurden die Schnitte zur Hybridisierung der FISH-Sonde an die Ziel-DNA bei 37 °C für 40 Stunden inkubiert. Für die Durchführung eines FISH-Sondentests war eine Hybridisierung über eine Nacht ausreichend.

Tabelle 3.1: Zusammensetzung des Hybridisierungsansatzes

Bestandteile	Sondentest	TMA's/Großflächen
Basisansatz	7 μ l	14 μ l
Cot-DNA	1 μ l	2 μ l
FISH-Sonde	2 μ l	4 μ l
Centromer-Sonde	0,25 μ l	0,5 μ l
Gesamtvolumen	10,25 μ l	20,5 μ l

3. stringentes Waschen der Gewebeschnitte

Alle Arbeiten während des Waschprozesses wurden ebenfalls ohne direktes Licht durchgeführt. Als erstes wurde der Hybridisierungswaschpuffer mit einer 1 molaren Salzsäurelösung und gegeben falls einer 1 molaren Natriumhydroxidlösung auf einen pH-Wert von 7,25 eingestellt. Dann wurden zwei Küvetten mit dem Hybridisierungswaschpuffer befüllt. Anschließend wurde das Fixogum von den Deckgläschen entfernt, die Schnitte in die erste Küvette gestellt und bis zum Ablösen der Deckgläschen bei Raumtemperatur im Dunkeln stehen gelassen. Die zweite Küvette wurde in ein Wasserbad gestellt und der Hybridisierungswaschpuffer auf 72 °C erhitzt. Nach dem Ablösen der Deckgläschen wurden die Schnitte in den erhitzten Hybridisierungswaschpuffer gestellt und für 2 Minuten gewaschen. Danach wurden die Schnitte kurz in dH₂O gewaschen und für 10 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln getrocknet. Abschließend wurde 1 Tropfen Vectashield® Mounting Medium mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) auf das Gewebe gegeben und das Gewebe mit einem Deckgläschen eingedeckelt. Durch die Verwendung des Vectashields wurde das Fluoreszenzsignal stabilisiert. Das DAPI wurde zur blauen Zellkernfärbung verwendet. Die hybridisierten Gewebeschnitte wurden bis zur Auswertung bei -20 °C gelagert.

3.1.7 Mikroskopische Auswertung

Die Auswertung der TMAs und Gewebegroßflächen erfolgte mit einem Axio Imager.A1 Lichtmikroskop und den dazugehörigen Filtern von der Firma Zeiss. Von der Analyse ausgeschlossen wurden Gewebespots die auf Grund einer schlechten Hybridisierung kein oder nur sehr schwache Gensignale zeigten. Gewebespots die eine starke Autofluoreszenz aufwiesen oder die ein hohes Potential von Schnittartefakten zeigten, wurden ebenfalls von der Analyse ausgeschlossen (siehe Abbildung 3.1.7 Ia-Id).

FISH-Sonden die in normalen Zellkernen wie zum Beispiel Stromazellkernen nicht mehr als zwei Signale aufzeigten wurden als sequenzspezifisch angenommen, da eine FISH-Sonde aus zwei BACe3.6 Clonen hergestellt wurde. Sequenzunspezifische Sonden müssten daher mehr als zwei Gensignale aufweisen.

Eine heterozygote Deletion wurde definiert, als das Vorhandensein von weniger Gensignalen als Centromer 6 Signalen in $\geq 60\%$ der Tumorzellkerne. Eine homozygote Deletion wurde definiert, als das komplette Fehlen von Gensignalen in den Tumorzellkernen bei Vorhandensein von Centromer 6 Signalen. Zusätzlich müssen Centromer 6 Signale und Gensignale in normalen Zellkernen wie zum Beispiel Stromazellkernen vorhanden sein (siehe Abbildung 3.1.7 IIa-IIId).

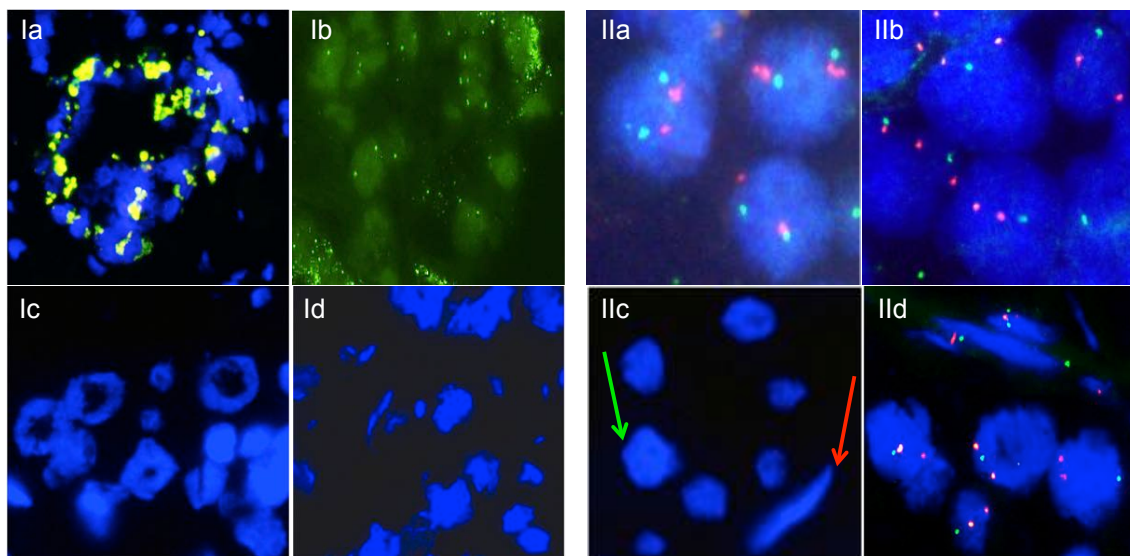


Abbildung 3.1: Beispiele für die mikroskopische FISH-Auswertung. Ia-Id: Eingeschränkte Bewertbarkeit des Gewebestatus. Ia: Autofluoreszenz von Sekreten, Ib: unspezifische Signale neben spezifischen Gensignalen, Ic: Schnittartefakte durch Löcher in den Zellkernen, Id: zu stark angedaute Zellkerne. IIa-IIId: Auswertung der FISH-Signale. IIa: normale *MAP3K7*-Kopiezahl mit zwei grünen *MAP3K7*-Signalen und zwei Centromer 6 Signalen, IIb: Heterozygote Deletion mit einem grünen *MAP3K7*-Signal und zwei Centromer 6 Signalen, IIc: Tumorzellkerne (roter Pfeil) mit einem Stromazellkern (grüner Pfeil) als Referenz, IIId: Heterozygote Deletion mit einem grünen *MAP3K7*-Signal und zwei Centromer 6 Signalen in den Tumorzellkernen und zwei grünen *MAP3K7*-Signalen im Stromazellkern.

3.1.8 Statistische Auswertung

Vor der statistischen Auswertung wurde der Tumorgehalt der Gewebespots auf HE (Hämatoxylin-Eosin) gefärbten Schnittpräparaten von Frau PD Dr. med Sarah Minner bestimmt. Alle Gewebe die kein Tumor enthielten wurden als nicht bewertbar gesetzt.

Die statistische Auswertung erfolgte mit JMP 9.0.2. (SAS, Cary, USA) Zur Bestimmung der Häufigkeit der 6q-Deletionen wurde eine Verteilung der Ergebnisse berechnet. Die prognostische Relevanz der 6q-Deletionen wurden mittels einer Kaplan-Meier-Kurve dargestellt und die Unterschiede in den einzelnen Gruppen mittels Log-Rank-Test ermittelt. Zur Prüfung der Korrelation der 6q-Deletionen mit klinisch-pathologischen Parametern und molekularen Markern (z.B. *ERG*-Fusions-Status) wurde ein Chi-Quadrat-Test durchgeführt. Mit Hilfe der Cox-Regression wurde eine multivariate Analyse durchgeführt, um die Abhängigkeit der 6q-Deletionen von bereits bekannten prognostischen Markern wie dem Gleason Score oder dem pT-Stadium zu testen.

3.2 Zellkulturmethoden

Zur Identifizierung von potentiellen tumorbiologisch relevanten Genen wurde die Expression ausgewählter Gene shRNA-vermittelt in mehreren Prostata-(karzinom)Zelllinien reduziert. Zur Analyse der Suppressions-bedingten Effekte auf das Zellwachstum wurden Colony-Formation-Assays durchgeführt. Zudem wurde die Auswirkungen der reduzierten Expression von mehreren Genen auf das Zellwachstum im Colony-Formation-Assay und auf das invasive Zellwachstum im Softagar-Assay und Invasion-Assay getestet. Als Negativkontrollen wurden zwei shRNAs verwendet, die zu einer nicht humanen messenger RNA (mRNA) komplementär sind. Die erste shRNA (shGFP) war gegen die mRNA des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) gerichtet, dessen Expression erstmals in der Quallenart *Aequorea victoria* beschrieben wurde^[115,121]. Die zweite shRNA (shNeg) war gegen die mRNA der bakteriellen Polymerase I gerichtet^[116]. Als Positivkontrollen wurden drei shRNAs verwendet. Die erste shRNA (shRB1) war gegen die mRNA des bekannten Tumorsuppressorgens *RB1* gerichtet^[122]. Die zweite shRNA (shPTEN) war gegen die mRNA des bekannten Tumorsuppressorgens *PTEN* gerichtet^[87,123]. Die dritte shRNA war gegen gegen das bekannte Tumorsuppressorgen *mTOR* (shmTOR) gerichtet^[124] und wurde in der Zelllinie PC-3 verwendet, da in dieser Prostatakarzinomzelllinie eine homozygote *PTEN*-Deletion vorliegt^[123]. PTEN und mTOR wurden als Positivkontrollen für Gene verwendet, welche eine essentielle Rolle für das Überleben der

Zelle spielen. Alle verwendeten Kontrollen waren bereits in vorherigen Untersuchungen am Institut für Pathologie etabliert wurden. Die Durchführung der Versuche, sowie der Umgang mit den verwendeten humanen Zelllinien sind im Folgenden beschrieben.

3.2.1 Kultivierung von humanen Zelllinien

Für die *in vitro* Versuche wurden humane Prostataepithelzelllinien (BPH-1, RWPE-1), Prostatakarzinomzelllinien (DU 145, PC-3, LNCaP, VCaP) und embryonale Nierenzellen (293T) verwendet (siehe 2.5). Die Kultivierung der einzelnen Zelllinien erfolgte in Kulturflaschen bei 37 °C und 5 % CO₂ im Inkubator. Alle Zelllinien wurden zweitägig mit neuem Zellkulturmedium (siehe 2.10) versorgt. Die Passagierung der Zellen erfolgte bei einer Konfluenz von 80 % bis 90 % mit Hilfe von 0,25 % Trypsin-EDTA (1x). Dazu wurde das Zellkulturmedium abgesaugt, die Trypsinlösung auf die Zellen gegeben und inkubiert. Dabei wurden die Zell-Matrix-Verbindungen und die Zell-Zell-Verbindungen abgebaut. Die gelösten Zellen wurden in neuem Zellkulturmedium aufgenommen und eine Subkultur der Zellsuspension in eine Kulturflasche überführt. Die verwendeten Volumina der Zellkulturmedien und Subkulturen, sowie weitere Angaben zur Trypsinierung sind in Tabelle 3.2 aufgeführt.

Tabelle 3.2: Kultivierung und Passagierung von humanen Zelllinien

Zelllinien	Kulturflaschen	Medium	Trypsinierung	Subkultur
DU 145, BPH-1	T25	5 ml	1 ml, 5 min, 37 °C	1 ml
PC-3, VCaP	T75	10 ml	2 ml, 5 min, 37 °C	2 ml
RWPE-1	T175	20 ml	4 ml, 5 min, 37 °C	4 ml
LNCaP	T25	5 ml	1 ml, 1 min, 22 °C	1 ml
	T75	10 ml	2 ml, 1 min, 22 °C	2 ml
293T	T25	5 ml	1 ml, 2 min, 37 °C	0,5 ml
	T75	10 ml	2 ml, 2 min, 37 °C	1 ml

3.2.2 Kryokonservierung von humanen Zelllinien

Die Kryokonservierung dient der Lagerung von humanen Zelllinien die nicht in permanenter Nutzung sind. Der Vorteil dieser Lagerung ist, dass die Lebensfähigkeit der Zellen erhalten bleibt und eine hohe Passagierung der einzelnen Zelllinien vermieden werden kann. Zur Kryokonservierung wurden die Zelllinien bis zu einer Konfluenz von 90 % in T75 Kulturflaschen kultiviert. Das Zellkulturmedium wurde abgesaugt und die Zellen mit 5 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen. Dann wurden die Zellen wie unter 3.2.1 beschrieben

trypsiniert und in 10 ml Zellkulturmedium aufgenommen. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 4 °C und 4.500 *g* für 4 Minuten zentrifugiert und das Zellkulturmedium über dem Zellpellet abgesaugt. Das Zellpellet wurde in einer Gefrierlösung aus 9 ml FCS und 1 ml Dimethylsulfoxid (DMSO) resuspendiert und jeweils 1 ml der Zellsuspension in ein Kryoröhrchen überführt. Das verwendete DMSO diente der Reduktion der Eiskristallbildung außerhalb und innerhalb der Zellen, da diese zu Zellschäden führen. Die Zellen wurden für 20 Minuten bei –20 °C und dann über Nacht bei –80 °C gelagert. Zur längeren Lagerung wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Zum Auftauen der kryokonservierten Zellen wurde das Kryoröhrchen in ein Wasserbad bei Raumtemperatur gestellt bis nur noch kleine Eisklumpen sichtbar waren. Dann wurde die Zellsuspension in eine T25 Kulturflasche mit Zellkulturmedium überführt. Nach 24 Stunden wurde das Zellkulturmedium gewechselt, um das bei Raumtemperatur toxische DMSO zu entfernen.

3.2.3 Bestimmung der Zellkonzentration

Zur Bestimmung der Zellkonzentration wurden die Zelllinien wie unter 3.2.1 beschrieben trypsiniert und im Zellkulturmedium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde durch mehrmaliges rauf und runter pipettieren homogenisiert und 20 μ l in eine Zählkammer (CHT4-SD Cell Counting Chamber, Nexcelom Bioscience, Lawrence, USA) pipettiert. Anschließend wurde die Zellzahl pro ml mit dem Cellometer[®] Auto T4 Cell Counter bestimmt.

3.2.4 Kultivierung von shRNA-pLKO.1 transformierten *E. coli*

Vor der Isolierung des shRNA-pLKO.1 Vektors (shRNA-Konstrukt) aus den kommerziell erworbenen *E. coli* (siehe 2.6) müssen diese zur Gewährleistung einer ausreichenden Plasmid-DNA Menge zunächst vermehrt werden. Zur Kultivierung der *E. coli* wurden 200 ml LB-Medium und 200 μ l Ampicillin-Stocklösung (100 mg/ml) in einem 250 ml Erlenmeyerkolben vorgelegt. Dann wurden mit einer Pipettenspitze mehrere Bakterienkolonien aus dem Glycerolstock aufgenommen und die Pipettenspitze im Medium abgeworfen. Die so hergestellte Hauptkultur wurde für 16 bis 18 Stunden bei 37 °C und 190 rpm bis zu einer leicht sichtbaren Trübung des Mediums inkubiert. Die Trübung zeigt an, dass die Bakterien in einer ausreichenden Menge vermehrt sind. Dann wurde die Hauptkultur in ein Zentrifugengefäß überführt und für 10 Minuten bei 4 °C und 6.000 *g* zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und aus dem Bakterienpellet die Plasmid-DNA isoliert (siehe 3.2.5).

3.2.5 Isolierung von shRNA-Konstrukten aus *E. coli*

Für die Isolierung der shRNA-Konstrukte (Plasmid-DNA) aus dem unter 3.2.4 generiertem Bakterienpellet wurde das Qiagen® Plasmid *Plus* Maxi Kit von der Firma Qiagen (Venlo, Niederlande) verwendet. Dieses System basiert auf einer Bakterienlyse mit anschließender Isolierung der reinen Plasmid-DNA über die Bindung an einen Membranfilter. Die Isolierung dient der Trennung der bakteriellen Plasmid-DNA von der chromosomalen DNA, RNA, Proteinen, Kohlenhydraten und weiteren unerwünschten Zellbestandteilen. Die isolierten shRNA-Konstrukte wurden mittels Transfektion oder Transduktion zur Gensuppression in die Prostatazelllinien eingebracht. Zu Beginn der Isolierung wurden der P1 Puffer mit 250 μ l RNase A, der P2 Puffer mit 250 μ l LyseBlue® und der PE Puffer mit 24 ml absolutem Ethanol versetzt. Dann wurde das Bakterienpellet (siehe 3.2.4) mit 8 ml P1 Puffer resuspendiert und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Anschließend wurden zur Lyse der Bakterien 8 ml P2 Puffer zu der Suspension pipettiert und bis zu einer homogenen Blaufärbung gemischt. Nach einer Inkubation von 3 Minuten bei Raumtemperatur wurden 8 ml S3 Puffer zu der Suspension gegeben und bis zur Entfärbung der Suspension invertiert. Dabei wurden die chromosomale DNA, Proteine und weitere unerwünschte Zellbestandteile ausgeflockt. Zur Trennung der Plasmid-DNA von den Zellfragmenten wurde die Mischung bei 5.000 *g* und Raumtemperatur für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand mit Hilfe der Maxi Cartridges filtriert. Das Eluat wurde mit 5 ml BB Puffer versetzt, auf den Qiagen® Plasmid *Plus* Maxi Spin Column Filter pipettiert und mittels einer Vakuumpumpe abgesaugt. Dabei wurde die Plasmid-DNA an die Filtermembran gebunden. Danach wurde die Filtermembran mit Hilfe der Vakuumpumpe mit 0,7 ml ETR Puffer und 0,7 ml PE Puffer gewaschen und die Membran bei 5.000 *g* und Raumtemperatur für 1 Minute trocken zentrifugiert. Dann wurden 400 μ l nukleasefreies Wasser auf die Membran pipettiert, für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und die Plasmid-DNA mittels Zentrifugation bei 5.000 *g* und Raumtemperatur für 1 Minute eluiert. Abschließend wurde die Konzentration der Plasmid-DNA wie unter 3.1.3 beschrieben bestimmt und die Plasmide bei 4 °C gelagert.

3.2.6 Transfektion von Prostata-(karzinom)Zelllinien mit Lipofectamin®2000

Die Transfektion mit Lipofectamin®2000 zählt zu den chemischen Transfektionsmethoden (Lipofektion) und wird zum transienten Einbringen von Fremd-DNA in eine Zielzelle verwendet. Lipofectamin®2000 besteht aus kationischen Lipiden die in wässriger Lösung spontan

positiv geladene Lipid-Komplexe (Liposomen) ausbilden. Die positiv geladenen Liposomen bilden auf Grund von Wechselwirkungen mit den negativ geladenen Plasmiden DNA-Lipid-Komplexe aus, die über Endozytose in das Zytosol der Zielzelle gelangen können. Im Zytosol werden die Plasmide freigesetzt und teilweise über die Zellkernporen in den Zellkern aufgenommen. Im Zellkern erfolgt dann die Transkription der eingeschleuften DNA-Sequenz^[125]. Zur Transfektion der Prostata-(karzinom)Zellen mit den unter 3.2.5 isolierten shRNA-Plasmiden wurden pro Well 2×10^5 Prostata-(karzinom)Zellen in 2 ml RPMI-Vollmedium im 6-Well-Plattenformat ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 70 % bis 80 % wachsen gelassen. Anschließend wurde das RPMI-Vollmedium gegen 2 ml serumfreies Opti-MEM®I Medium ausgetauscht. Danach wurde pro Well ein Transfektionsansatz aus 4 μ g shRNA-Plasmid, 100 μ l Opti-MEM®I und 8 μ l Lipofectamin®2000 hergestellt, durch leichtes schnippen gemischt und zur DNA-Lipid-Komplexbildung 20 Minuten inkubiert. Dann wurden 100 μ g des Transfektionsansatz auf die Prostata-(karzinom)Zellen pipettiert und durch Kreuzbewegungen der 6-Well-Zellkulturplatte im Opti-MEM®I Medium homogen verteilt. Für die spätere Selektionskontrolle der transfizierten Zellen blieben zwei Wells unbehandelt. Nach einer Inkubation von 8 bis 10 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde das Opti-MEM®I Medium gegen 2 ml RPMI-Vollmedium ausgetauscht. Die Selektion der transfizierten Zellen erfolgte 36 Stunden nach der Transfektion durch den Austausch des RPMI-Vollmediums gegen 2 ml puromycinhaltigen Selektionsmedium. Der Abschluss der Selektion der transfizierten Zellen wurde angenommen, nach dem alle Zellen in den Selektionskontrollwells gestorben waren.

3.2.7 Produktion von lentiviralen Partikeln in 293T-Zellen

Die lentiviralen Partikel dienen der Transduktion (siehe 3.2.8) der Prostata-(karzinom)Zelllinien zur stabilen shRNA-vermittelten Reduktion der Genexpression ausgewählter Kandidatengene und deren Ko-Depletion. Für die Synthese der lentiviralen Vektoren wurden die Verpackungsplasmide pREV und pRRE verwendet, welche die Human Immundefizienz-Virus Gene *group-specific-antigene (Gag)*, *polymerase (Pol)* und *Regulator of Expression of Virion Proteins (Rev)* kodieren^[126]. Für die Expression des Hüllproteins wurde CMV-VSV-G (*cytomegalovirus vesicular stomatitis virus-G protein*) verwendet^[127]. Die drei Plasmide wurden zusammen mit den unter 3.2.5 isolierten shRNA-Plasmiden mittels Polyethylenimin (PEI) in die 293T-Zellen kotransfiziert. PEI ist ein kationisches Polymer das mit den negativ geladenen Plasmiden Komplexe bildet, die über Endozytose in die Zielzelle aufgenommen werden. Nach Freisetzung der Plasmide im Zytosol und Aufnahme dieser in den Zellkern kommt es

zur Expression der eingebrachten Gene, Produktion der lentiviralen Vektoren und Abgabe dieser über die Zellmembran^[126,128].

Zur Produktion der viralen Vektoren wurden pro Well 2×10^5 293T-Zellen mit 2 ml DMEM-Vollmedium in 6-Well-Zellkulturplatten ausgesät. Bei einer Konfluenz von 50 % wurden die Zellen mit 2 ml neuem DMEM-Vollmedium versorgt. Dann wurde pro Well ein Transfektionsansatz aus 1 ml DMEM-Vollmedium, 6 μg shRNA-Plasmid, 3 μg pRev, 3 μg pRRE, 1,5 μg pVSV-G und 40 μl PEI hergestellt, durch leichtes schnippen gemischt und zur Plasmid-PEI-Komplexbildung 10 Minuten inkubiert. Die shRNA-Plasmid-Ansätze für die Ko-Depletion sind in Tabelle 3.3 aufgeführt. Danach wurde 1 ml des Transfektionsansatzes auf die 293T-Zellen pipettiert und durch Kreuzbewegungen der 6-Well-Zellkulturplatte homogen im DMEM-Medium verteilt. Zur Transfektion der 293T-Zellen wurden diese für 12 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die 293T-Zellen mit neuem DMEM-Vollmedium versorgt und zur Virusproduktion für weitere 24 bis 36 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Abschließend wurde zur Virusernte das virushaltige DMEM-Vollmedium mit einer Einmalspritze abgesaugt, durch einen Mikrofilter in ein Reagiergefäß gegeben und bei -80 °C gelagert.

Tabelle 3.3: Pipettierschema für die Ko-Transduktion der identifizierten tumorsuppressiven Gene

Experiment nummer	shUBE2J1 (μg)	shZNF292 (μg)	shSMAP1 (μg)	shHMGN3 (μg)	shNeg (μg)	shGFP (μg)
1					6,0	6,0
2	2,5	3,5			3,0	3,0
3	3,0		3,0		3,0	3,0
4	3,0			3,0	3,0	3,0
5	1,5	2,5	2,0		6,0	
6	1,5	2,5		2,0	6,0	
7	2,5	3,5	2,75	3,25		
8			1,5	4,5	3,0	3,0
9	2,0		2,0	2,0	6,0	
10		4,5	1,5		3,0	3,0
11		3,5		2,5	3,0	3,0
12		4,0	1,0	1,0	6,0	

3.2.8 Transduktion von Prostata-(karzinom)Zelllinien mit lentiviralen Partikeln

Bei der Transduktion wird Fremd-DNA mittels viraler Partikel in eine Zielzelle eingebracht und dort in das zelluläre Genom integriert. Dadurch kommt es zu einer stabilen Veränderung des Genoms. Im Vergleich zur Transfektion können transduzierte Zelllinien über einen längeren Zeitraum kultiviert werden. Das heißt mit Hilfe der Transduktion kann zum Beispiel die Expression eines spezifischen Gens in einer Zelllinie langfristig reduziert werden^[129].

Für die Transduktion mit den unter 3.2.7 synthetisierten lentiviralen Partikeln wurden die Prostata-(karzinom)Zelllinien wie in Tabelle 3.4 aufgeführt in RPMI-Vollmedium ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 70 % bis 80 % wachsen gelassen. Dann wurden die Zellen mit dem entsprechenden Volumen Transduktionsmedium versorgt und die lentiviralen Partikel in das Medium pipettiert (siehe Tabelle 3.4). Zur Selektionskontrolle der transduzierten Zellen blieb ein Zellansatz unbehandelt. Nach einer Inkubationszeit von 12 bis 16 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde das Transduktionsmedium gegen das entsprechende Volumen RPMI-Vollmedium ausgetauscht. Im Anschluss an eine weitere Inkubation von 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde das RPMI-Vollmedium gegen das puromycinhaltige Selektionsmedium ausgetauscht. Zur Produktion von stabil transduzierten Zelllinien wurden die Zellen in den Kulturflaschen wie unter 3.2.1 beschrieben trypsiniert und die komplette Zellsuspension in eine größere Kulturflasche umgesetzt. Der Austausch des Selektionsmediums erfolgte alle zwei Tage und das Zellwachstum wurde mikroskopisch kontrolliert. Der Abschluss der Selektion war gekennzeichnet durch das Sterben aller Zellen im Selektionskontrollansatz.

Tabelle 3.4: Transduktion von Prostata-(karzinom)Zelllinien

Kulturgefäß	Aussaat	Virusvolumen	Zellkulturmedium
T25-Kulturflasche	1×10^6	0,5 ml	5 ml
T75-Kulturflasche	2×10^6	1 ml	10 ml
12-Well-Platte	2×10^5	0,2 ml	0,5 ml
6-Well-Platte	2×10^5	0,4 ml	1 ml

3.2.9 Colony-Formation-Assay

Im Colony-Formation-Assay wird die Teilungsfähigkeit einer einzelnen Zelle und die daraus resultierende Zellkoloniebildung getestet. Zellen mit einer reduzierten Proliferationsfähigkeit bilden im Colony-Formation-Assay wenige und sehr kleine Zellkolonien aus. Während Zellen mit einer erhöhten Proliferationsfähigkeit mehrere größere Zellkolonien ausbil-

den. Der Colony-Formation-Assay kann damit zur Identifizierung von potentiellen Tumorsuppressorgenen, die einen Einfluss auf das Zellwachstum haben, verwendet werden^[130,131]. Zunächst wurde ein Colony-Formation-Assay Screening im Doppelansatz in den Prostata-(karzinom)Zelllinien PC-3, DU 145 und BPH-1 durchgeführt. Als Negativkontrollen wurden shGFP und shNeg verwendet. Als Positivkontrollen dienten shRB1, shPTEN und shmTOR (siehe 3.2).

Zu Beginn der Colony-Formation-Assays wurden pro Well 2×10^5 PC-3, DU 145 und BPH-1 Zellen in 2 ml RPMI-Vollmedium in 6-Well-Zellkulturplatten ausgesät. Dann wurden die Zellen zum Einbringen der unter Punkt 3.2.5 isolierten shRNA-Konstrukte in den Zellkern wie unter 3.2.6 beschrieben mit Lipofectamin[®]2000 transfiziert und mit Hilfe des puromycinhaltigen Selektionsmediums selektioniert. Danach wurden die Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, das Selektionsmedium alle zwei Tage ausgetauscht und die Zellen 10 bis 14 Tage wachsen gelassen. Im Anschluss an die Wachstumsphase wurde das Selektionsmedium abgesaugt und die Zellen mit 2 ml PBS gewaschen. Zur Fixierung der Zellen wurden diese für 2 bis 3 Minuten mit 1,5 ml Methanol inkubiert, das Methanol abgesaugt und die Zellen für 5 Minuten getrocknet. Danach wurden die Zellen zur Anfärbung für 2 Minuten in 1 ml Giemsa Azur-Eosin-Methylenblaulösung inkubiert, die Lösung abgegossen, die 6-Well-Zellkulturplatten mit Wasser ausgewaschen und die Zellen über Nacht an der Luft getrocknet. Abschließend wurde der Colony-Formation-Assay makroskopisch ausgewertet. Dazu wurden alle Zellkolonien ab einem Durchmesser von 1 mm gezählt. Dann wurde eine einfaktorielle ANOVA-Analyse durchgeführt, um statistisch signifikante Unterschiede im klonogenen Wachstum zwischen den Negativkontrollen und den supprimierten Genen zu identifizieren. Außerdem wurde das klonogene Wachstum mit dem der Positivkontrollen verglichen. Gene die im Colony-Formation-Assay Screening in allen drei Zelllinien einen signifikanten Unterschied im klonogenen Wachstum im Vergleich zu den Negativkontrollen zeigten wurden in einem zweiten Colony-Formation-Assay im vierfach-Ansatz validiert.

Der Colony-Formation-Assay wurde zudem verwendet, um die Einflüsse einer Ko-Suppression auf das Zellwachstum zu untersuchen. Dazu wurden die unter Punkt 3.2.7 transduzierten Zellen mit einer Zellzahl von 1×10^3 in 6-Well-Zellkulturplatten ausgesät und wie oben beschrieben 1 Woche im Inkubator wachsen gelassen und anschließend angefärbt. Dann wurden 25 repräsentative Zellkolonien im Mikroskop vermessen und die mittlere Koloniezahl berechnet. Zur Bestimmung von Wachstumsunterschieden wurde eine einfaktorielle ANOVA durchgeführt. Zur Vermeidung eines Observerbias wurden die Versuche mittels Doppelverblindung durchgeführt.

3.2.10 Softagar-Colony-Formation-Assay

Im Softagar-Colony-Formation-Assay wird die Fähigkeit einer Zelle zum verankerungsunabhängigen Wachstum getestet und damit die maligne Transformation von Zellen die zum Beispiel zur Metastasierung einer Zelle führen kann^[132]. Mit Hilfe des Softagar-Colony-Formation-Assay wurden die Auswirkung der shRNA-vermittelten Reduktion der Expression der potentiell tumorsuppressiven Gene alleine und in Kombination auf die Wachstumsfähigkeit der DU 145 Zellen im Doppelansatz getestet. Verwendet wurden dazu die unter 3.2.8 transduzierten und ko-transduzierten Zelllinien. Als Negativkontrollen dienten shNeg und shGFP, welche ebenfalls ko-transduziert wurden. Die Positivkontrolle war shRB1 (siehe 3.2). Zur Durchführung des Softagar-Colony-Formation-Assays wurde zunächst der Grundagar hergestellt. Dazu wurden 9 ml FCS und 9 ml RPMI Medium 1640 (1x)+GlutaMAXTM-I auf 37 °C und 2 ml 1,2 %ige Agaroselösung auf 50 °C erwärmt. Dann wurden die drei Komponenten in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen gemischt und je 2 ml Grundagar pro Well in eine 6-Well-Zellkulturplatte pipettiert. Zur Aushärtung des Grundagars wurden die 6-Well-Zellkulturplatten bei Raumtemperatur für 2 Stunden stehen gelassen. Dann wurden die Zellen trypsinisiert (siehe 3.2.1), die Zellkonzentration bestimmt (siehe 3.2.3) und 1×10^4 Zellen pro Well in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 4 °C und 4.500 g für 4 Minuten zentrifugiert und das Medium über dem Zellpellet abgesaugt. Danach wurde der Überschichtungsagar aus 2 ml FCS (37 °C), 9 ml 0,7 %iger Agaroselösung (50 °C) und 9 ml RPMI Medium 1640 (1x)+GlutaMAXTM-I (37 °C) hergestellt und auf eine Temperatur von circa 37 °C abgekühlt. Dann wurde das Zellpellet im Überschichtungsagar resuspendiert und je 2 ml der Zellsuspension auf den Grundagar in der 6-Well-Zellkulturplatte pipettiert. Zur Aushärtung des Überschichtungsagars wurden die 6-Well-Zellkulturplatte bei Raumtemperatur für 1 Stunden stehen gelassen. Anschließend wurden die Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ für 14 Tage inkubiert und die Koloniebildung mikroskopisch beobachtet. Im Anschluss an die Inkubation wurden 25 repräsentative Zellkolonien mikroskopisch vermessen und die durchschnittliche Koloniegröße berechnet. Abschließend wurden die Unterschiede in der Koloniezahl zwischen den Proben und den Negativkontrollen mit einer einfaktoriellen ANOVA-Analyse ermittelt. Zur Vermeidung eines Observerbias wurden die Versuche mittels Doppelverblindung durchgeführt.

3.2.11 Invasion-Assay

Der Invasion-Assay ist geeignet zur Untersuchung der Invasivität von Zellen. Mit Hilfe des Invasion-Assays wurden die Auswirkung der shRNA-vermittelten Reduktion der Expression der potentiell tumorsuppressiven Gene alleine und in Ko-Depletion auf das Metastasierungspotential der Prostatakarzinomzelllinie DU 145 im Doppelansatz untersucht. Zur Durchführung des Invasion-Assays wurden die BD BioCoatTM MatrigelTM Invasion Chamber (Invasion Chamber) und die BD BioCoatTM Control 8,0 μ m PET Membrane 24-well Cell culture inserts (Control Inserts) der Firma BD (Franklin Lakes, USA) verwendet. Die Invasion Chamber bestehen aus einer 8,0 μ m porigen Polyethylenterephthalat (PET) Membran, die mit einem dünnem Matrigel beschichtet ist. Das Matrigel verschließt die 8,0 μ m breiten Poren der PET-Membran und verhindert so ähnlich wie eine Basalmembran das durchgleiten von nicht-invasiven Zellen durch die Membranporen *in vitro*. Die Control Inserts bestehen nur aus der 8,0 μ m porigen PET-Membran und erlauben so die freie Diffusion der Zellen durch die Poren der PET-Membran. Für die Durchführung des Invasion-Assays wurden die unter 3.2.8 transduzierten und ko-transduzierten Zelllinien verwendet. Als Negativkontrollen dienten shNeg und shGFP, welche ebenfalls ko-transduziert waren. Als Positivkontrolle wurde shRB1 eingesetzt(siehe 3.2).

Zu Beginn wurden die bei -20 °C gelagerten Invasion Chamber bei Raumtemperatur aufgetaut. Dann wurden jeweils 0,5 ml RPMI Medium 1640 (1x)+GlutaMAXTM-I in eine 24-Well-Platte und die Invasion Chamber pipettiert und die Invasion Chamber in die 24-Well-Platte gesetzt. Anschließend wurden die Invasion Chamber bei 37 °C und 5 % CO₂ für 2 Stunden rehydriert. Währenddessen wurden die transduzierten Zellen mit RPMI Medium 1640 (1x)+GlutaMAXTM-I wie unter 3.2.1 beschrieben trypsiniert, die Zellkonzentration bestimmt (siehe 3.2.3) und die Zellen auf eine Konzentration von 1×10^5 Zellen/0,5 ml verdünnt. Anschließend wurde das RPMI Medium 1640 (1x)+GlutaMAXTM-I mit 10 % FCS versetzt und in zwei 24-Well-Platten pipettiert. Danach wurde das RPMI Medium 1640 (1x)+GlutaMAXTM-I von den rehydrierten Invasion Chambers abgesaugt, diese zusammen mit den Control Inserts in die 24-Well-Platten gesetzt und 0,5 ml der serumfreien Zellsuspension in die Invasion Chamber und die Control Inserts pipettiert. Danach erfolgte eine Inkubation des Invasion-Assays bei 37 °C und 5 % CO₂ für 36 Stunden. Nach der Inkubation wurde die Zellsuspension abgesaugt und die restlichen nicht-invasiven Zellen mit einem Medium-benetzten Wattestäbchen entfernt. Dann wurden die Invasion Chamber und Control Inserts zur Fixierung der Zellen in 1 ml Methanol für 2 Minuten inkubiert. Zur Färbung der

Zellen wurden diese für 2 Minuten in Giemsa Azur-Eosin-Methylenblaulösung getaucht, in Wasser gewaschen und für circa 5 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Abschließend wurde ein Tropfen ImmersolTM 518 F auf eine Objektträger gegeben, die PET-Membran mit Hilfe eines Skalpells aus den Invasion Chambers und den Control Inserts geschnitten, auf den Objektträger gelegt und mit einem Deckgläschen eingedeckelt. Zur Auswertung des Invasion-Assays wurden mit Hilfe eines Fotomikroskops vier repräsentative Regionen der PET-Membran fotografiert, die Zellen pro Bild gezählt und die mittlere Zellzahl bestimmt. Dann wurde die Invasionsrate und der Invasion Index wie folgt berechnet.

$$Invasionsrate = \frac{\text{mittlere Zellzahl}_{(Invasion\ Chamber)}}{\text{mittlere Zellzahl}_{(Control\ Insert)}}$$

$$Invasion\ Index = \frac{Invasionsrate_{(Testgen)}}{Invasionsrate_{(Negativkontrolle)}}$$

Ein Invasion Index >1 deutet darauf hin, dass die shRNA vermittelte Reduktion der Expression des untersuchten Genes zu einer Erhöhung des Metastasierungspotentiales geführt hat.

3.3 Expressionsanalysen

Die Expressionsanalysen auf mRNA-Ebene mittels TaqMan[®] und Affymetrix GeneChip[®] Analyse im Prostatagewebe und in den Prostata-(karzinom)zellen diente der Auswahl von potentiellen Zielgenen für das Colony-Formation-Assay-Screening (siehe 3.2.9). Zur Kontrolle der shRNA-vermittelten Suppression wurden Expressionsanalysen auf mRNA-Ebene mittels TaqMan[®]-PCR und Expressionsanalysen auf Protein-Ebene mittels Western Blot durchgeführt.

3.3.1 RNA-Präparation

Für die Isolierung der Ribonukleinsäuren (RNA) wurden, in Abhängigkeit vom Ausgangsmaterial und der nachfolgenden mRNA-Expressionsanalyse, unterschiedliche Verfahren angewendet.

3.3.1.1 RNA-Isolierung aus mikrodisssezierten Prostataepithelzellen

Für die RNA-Isolierung aus den mikrodisssezierten Prostataepithelzellen (FFPE-Gewebe) wurde das RNeasy®FFPE Kit von der Firma Qiagen (Venlo, Niederlande) verwendet. Zur Vorbereitung der RNA-Isolierung wurden pro Patient drei 20 µm dicke Gewebegroßflächen mikrodissseziert und die isolierten Prostataepithelzellen in den Deckel eines PCR-Reagiergefäßes überführt. Dann wurden die Zellen in 65 µl PKD Puffer aufgenommen, in ein 1,5 ml Reagiergefäß pipettiert und nochmals 150 µl PKD Puffer zu der Probe gegeben. Danach wurden 10 µl Proteinase K hinzugefügt, die Proben zum Gewebeverdau bei 56 °C in einem Heizblock für 3 Stunden geschüttelt und die Enzymreaktion durch eine Inkubation bei 80 °C für 15 Minuten und 3 Minuten auf Eis gestoppt. Im Anschluss an die Vorbereitung der Proben erfolgte die RNA-Isolierung mit dem RNeasy®FFPE Kit. Dazu wurden 240 µl PKD Puffer auf das Gewebe gegeben, die Mischung gevortext und für 1 Minute bei Raumtemperatur und 11.000 g zentrifugiert. Dann wurden 10 µl Proteinase K hinzugefügt, die Proben zum Gewebeverdau bei 56 °C in einem Heizblock für 14 Stunden geschüttelt und anschließend die Enzymreaktion durch eine Inkubation bei 80 °C für 15 Minuten und 3 Minuten auf Eis gestoppt. Danach wurden die Proben für 15 Minuten bei Raumtemperatur und 20.000 g zentrifugiert und die Lösung in ein neues Reagiergefäß überführt. Anschließend wurde zur Entfernung der genomischen DNA 10 µl DNase I Stocklösung in 25 µl RDD zur Probe gegeben und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden 500 µl RBC Puffer und 1.200 µl absoluter Ethanol zu der Probe gegeben und die Lösung vorsichtig gemischt. Danach wurde die Probe auf das RNeasy MinElute®spin column pipettiert und für 15 Sekunden bei Raumtemperatur und 8.000 g zentrifugiert. Dabei kam es zur Bindung der RNA an die Membran. Das Filtrat konnte verworfen werden. Zur Reinigung der Säule wurde der RPE Puffer mit 44 ml absolutem Ethanol versetzt, zweimal 500 µl der Lösung auf den Filter pipettiert und die Probe für 15 Sekunden bei Raumtemperatur und 8.000 g bzw. für 2 Minuten bei Raumtemperatur und 8.000 g zentrifugiert. Im Anschluss daran wurde der Filter für 5 Minuten bei Raumtemperatur und 20.000 g trocken zentrifugiert. Abschließend wurden 20 µl nukleasefreies Wasser auf den Filter pipettiert, 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert und die RNA für eine 1 Minute bei Raumtemperatur und 20.000 g in ein neues Reagiergefäß eluiert. Dann erfolgte die Quantitäts- und Qualitätsbestimmung der RNA wie unter 3.3.2 beschrieben. Die RNA-Proben wurden bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.3.1.2 RNA-Isolierung aus kryokonservierten Gewebegroßflächen

Für die RNA-Isolierung aus kryokonservierten Gewebegroßflächen wurde das RNeasy®Mini Kit von der Firma Qiagen (Venlo, Niederlande) verwendet. Dieses System basiert auf einer Gewebe- bzw. Zelllyse in Anwesenheit von Guanidiniumthiocyanat und der anschließenden RNA-Isolierung durch die Kombination der Spin Column Technik mit der Silikamembranbasierten Isolierung von Nukleotiden. Die Isolierung dient der Trennung der mRNA von der genomischen DNA, weiteren kleinen RNA-Molekülen (< 200 Nukleotide) und anderen unerwünschten Gewebe- bzw. Zellbestandteilen. Die isolierte RNA wurde für die Affymetrix GeneChip®Expressionsanalyse verwendet, die vom Institut für Klinische Chemie am UKE durchgeführt wurde.

Zur Vorbereitung der RNA-Isolierung wurden pro Patient drei $10\ \mu\text{m}$ dicke Gewebegroßflächenschnitte in ein eiskaltes Reagiergefäß überführt, mit einem Pistill zerkleinert und sofort mit $600\ \mu\text{l}$ β -Mercaptoethanolhaltigem RLT Puffer bedeckt. Dann wurde die Mischung in ein QIAshredder®spin column überführt und für 2 Minuten bei 4°C und $20.000\ g$ zur vollständigen Gewebelyse und Homogenisierung zentrifugiert. Das Lysat wurde in ein Reagiergefäß überführt, für 3 Minuten bei Raumtemperatur und $20.000\ g$ zentrifugiert, der Überstand in ein Reagiergefäß überführt und $500\ \mu\text{l}$ Ethanol 70 % zugesetzt. Die Mischung wurde in das RNeasy spin column überführt und für 15 Sekunden bei Raumtemperatur und $8.000\ g$ zentrifugiert. Anschließend erfolgte der DNA-Verdau durch das Zusetzen von $10\ \mu\text{l}$ DNase I Stocklösung in $70\ \mu\text{l}$ RDD Puffer und einer Inkubation von 15 Minuten bei Raumtemperatur. Dann wurden $700\ \mu\text{l}$ RW1 Puffer zu der Probe pipettiert, die Mischung für 15 Sekunden bei Raumtemperatur und $8.000\ g$ zentrifugiert und das Eluat verworfen. Zur Reinigung der Säule wurde der RPE Puffer mit 44 ml absolutem Ethanol versetzt, zweimal $500\ \mu\text{l}$ des Puffers auf den Filter pipettiert und die Probe für 15 Sekunden bzw. 2 Minuten bei Raumtemperatur und $8.000\ g$ zentrifugiert. Dann wurde der Filter für 1 Minuten bei Raumtemperatur und $20.000\ g$ trocken zentrifugiert. Abschließend wurden $30\ \mu\text{l}$ nukleasefreies Wasser auf den Filter pipettiert, 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert und dann die RNA für eine 1 Minute bei Raumtemperatur und $8.000\ g$ in ein Reagiergefäß eluiert. Dann erfolgte die Bestimmung der Qualität, Quantität (siehe 3.3.2) und der RNA integrity number (RIN) (siehe 3.3.3). Die RNA-Proben wurden bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.3.1.3 RNA-Isolierung aus Prostata-(karzinom)zellen nach Qiagen

Zur Isolierung der RNA für die Affymetrix GeneChip® Expressionsanalyse aus den Prostata-(karzinom)zellen wurde das RNeasy® Mini Kit von der Firma Qiagen (Venlo, Niederlande) verwendet (siehe 3.3.1.2).

Zur Vorbereitung der RNA-Isolierung wurden die Zellen in einer 12-Well-Zellkulturplatte bis zu einer Zellzahl von 1×10^6 wachsen gelassen. Dann wurde das Kulturmedium entfernt, die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen, 350 μ l β -Mercaptoethanolhaltiger RLT Puffer auf die Zellen gegeben, die Zellen mit einem Zellschaber vom Boden gelöst und die Zellsuspension in ein Reagiergefäß überführt. Danach wurde die Zellsuspension mit Hilfe einer 0,9 mm breiten Injektionsnadel vollständig lysiert und homogenisiert. Anschließend wurden 350 μ l Ethanol 70 % zu der Probe gegeben und die RNA wie unter 3.3.1.2 beschrieben isoliert.

3.3.1.4 RNA-Isolation aus Prostata-(karzinom)zellen nach Machery-Nagel

Zur RNA-Isolation aus den Prostata-(karzinom)zellen für die mRNA-Expressionsanalysen mittels TaqMan® PCR (siehe 3.3.5) wurde eine Trizol®-Chloroform-Fällung und dann eine silikamembranbasierte Säulenfiltration mit dem NucleoSpin® RNA II Kit (Machery-Nagel, Düren) durchgeführt. Trizol® ist zusammengesetzt aus Guanidiniumthiocyanat und Phenol. Das Guanidiniumthiocyanat führt zur Zelllyse und das Phenol dient als wässriges Lösungsmittel für die RNA^[133]. Durch die Zugabe von Chloroform werden unerwünschte Zellbestandteile wie zum Beispiel Proteine von der RNA getrennt.

Zur Vorbereitung der RNA-Isolierung wurden die Prostata-(karzinom)zellen bis zu einer Zellzahl von 1×10^6 Zellen in einer 12-Well-Zellkulturplatte wachsen gelassen. Dann wurden die Zellen in 400 μ l Trizol® lysiert, in ein 2 ml Reagiergefäß überführt, 100 μ l Chloroform hinzugefügt und die Mischung für 15 Sekunden gevortext. Danach wurden die Proben zur Auftrennung der wässrigen und organischen Phase für 15 Minuten bei 4 °C und 21.460 g zentrifugiert. Anschließend wurden circa 200 μ l der oberen wässrigen Phase abgenommen und mit 200 μ l Ethanol 80 % versetzt. Dann erfolgte die RNA-Isolation aus der wässrigen Phase mittels silikamembranbasierter Säulenfiltration. Dazu wurde die RNA-Ethanol-Mischung auf die Membran pipettiert und mittels einer Vakuumpumpe abgesaugt. Zur Entfernung der Salze aus der Trizol®-Lyse wurde 400 μ l MDB Puffer auf die Membran pipettiert und mittels Vakuumpumpe abgesaugt. Dann wurde die Membran für 1 Minute bei 4 °C und 21.460 g trocken zentrifugiert. Anschließend wurde zum DNA-Verdau 95 μ l DNase-Lösung auf die Membran pipettiert und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde

der RA3 Puffer mit 100 ml absolutem Ethanol versetzt und das Waschen der Membran mit 300 μ l RA2 Puffer, 600 μ l RA3 Puffer und 300 μ l RA3 Puffer durchgeführt. Nach der Zugabe der Puffer wurden diese jeweils mittels Vakuum abgesaugt. Im Anschluss an den Waschprozeß wurde die Membran für 1 Minute bei 4 °C und 21.460 *g* trocken zentrifugiert. Abschließend erfolgte die Eluierung der RNA durch die Zugabe von 40 μ l nukleasefreiem Wasser auf die Membran, Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur und Zentrifugation für 1 Minute bei 4 °C und 21.460 *g*. Dann erfolgte die Quantitäts- und Qualitätsbestimmung der RNA wie unter 3.3.2 beschrieben. Die RNA-Lösung wurde bei -20 °C gelagert.

3.3.2 Bestimmung der Konzentration und Reinheit von RNA-Proben

Zur Bestimmung der Konzentration von RNA-Proben wurde das Peqlab NanoDrop®ND-1000 UV/Vis-Spektralphotometer verwendet.

Als erstes wurde der Leerwert von 1,5 μ l nukleasefreiem Wasser bei einer Wellenlänge von 260 nm eingestellt. Dann wurden 1,5 μ l der RNA-Probe pipettiert und bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm gemessen. Bei einer Wellenlänge von 260 nm und $A = 1$ wurde von einer RNA-Konzentration von 40 μ g/ml ausgegangen^[119]. Zur Reinheitsbestimmung wurde der Quotient von 260 nm/280 nm bestimmt. Ein Quotient zwischen 1,90 und 2,10 wurde von der Firma Qiagen als Indikator für reine RNA angegeben.

3.3.3 Bestimmung der RNA-Integritätszahl (RIN)

Die RIN von isolierten RNA-Proben ist neben der Reinheit ein wichtiger Qualitätsfaktor. Mit der RIN wird der Degradierungsgrad von einer kompletten Degradierung (RIN=0) bis zu keiner Degradierung (RIN=10) von isolierter RNA bestimmt. Ein geringer RNA-Degradierungsgrad ist für die Durchführung von hochsensitiven Analysen wie zum Beispiel der Affymetrix®Genechip Expressionsanalyse essentiell. Die Prüfung der RNA-Integrität erfolgte mittels Kapillarelektrophorese im Bioanalyzer 2100 mit dem RNA 6000 Nano Kit (Agilent, Santa Clara, USA).

Als erstes wurden die isolierten RNA-Proben mit nukleasefreiem Wasser auf eine Konzentration von 100 ng/ μ l verdünnt. Dann wurden die Lösungen für den Agilent RNA NanoLab Chip®vorbereitet. Dazu wurde die RNA 6000 Nanogelmatrix für 15 Minuten bei Raumtemperatur und 10.000 *g* in einem Filtersystem zentrifugiert. Dann wurden 1 μ l des RNA 6000 Nano Dye Concentrate in ein Reagiergefaß pipettiert, 65 μ l der RNA 6000 Nanogelmatrix zugesetzt, die Mischung homogenisiert und für 10 Minuten bei Raumtemperatur und 13.000 *g*

zentrifugiert. Danach wurden die verdünnten Proben und der RNA-Marker bei 70 °C für 2 Minuten denaturiert und auf Eis gestellt. Anschließend wurde der Agilent RNA NanoLab Chip® in der Füllstation mit den vorbereiteten Lösungen und der RNA Nano Conditioning Solution laut Herstellerangabe beladen und im Agilent IKA vortex mixer bei 2.000 rpm geschüttelt. Abschließend erfolgte die Elektrophorese im Bioanalyzer 2100 für circa 30 Minuten und die Auswertung des Elektropherogramms. Das Elektropherogramm sollte einen Marker-peak und zwei Peaks für die ribosomalen Untereinheiten S18 und S28 aufzeigen. Die RIN ergibt sich neben dem Quotienten S18/S28 aus dem gesamten Elektropherogramm.

3.3.4 Reverse Transkription

Die Reverse Transkription bezeichnet die Synthese eines zur mRNA komplementären DNA-Stranges (cDNA), katalysiert durch eine RNA-abhängige DNA-Polymerase^[129]. Die Synthese der cDNA ist Voraussetzung für die Durchführung von Expressionsanalysen mittels PCR. Zur Herstellung der cDNA wurde das High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit von der Firma Applied Bioscience (Carlsbad, USA) verwendet.

Zunächst wurden die unter 3.3.1.1 und 3.3.1.4 isolierten RNA-Proben mit nukleasefreiem Wasser auf eine Konzentration von 1.000 ng/25 µl verdünnt. Anschließend wurde pro RNA-Probe eine cDNA-Synthese-Mischung aus 5 µl Reverse Transcription Buffer, 2 µl dNTP Mix, 5 µl Random Primer, 8 µl nukleasefreiem Wasser, 2,5 µl MultiScribe Reverse Transcriptase (50 U/µl) und 2,5 µl RNase Inhibitor (1 U/µl) hergestellt. Dann wurde die cDNA-Synthese-Mischung zu 25 µl der RNA-Probe pipettiert. Danach erfolgte die Reverse Transkription in einem Thermocycler für 10 Minuten bei 25 °C, 120 Minuten bei 37 °C und 5 Sekunden bei 85 °C. Abschließend wurden die cDNA-Proben mit 150 µl nukleasefreiem Wasser auf eine Endkonzentration von 5 ng/µl verdünnt und bei 4 °C gelagert.

3.3.5 TaqMan®-PCR

Die TaqMan®-PCR wurde zur Expressionsanalyse auf mRNA-Ebene in den Prostata-(karzinom)zelllinien und dem Prostatagewebe verwendet. Diese Methode hat im Vergleich zur herkömmlichen PCR den Vorteil, dass die Vervielfältigung von spezifischen Nukleinsäureabschnitten während der Amplifikationsphase gemessen wird. Zur Durchführung der TaqMan®-PCR werden sogenannte TaqMan®-Sonden (siehe 2.8) verwendet, die aus einem Reporter und einem Quencher bestehen und spezifisch an die Zielsequenz binden. Während der Amplifikationsphase wird der Quencher auf Grund der 5'-3'-Exonuklease Aktivität der

Thermus aquaticus (Taq)-Polymerase vom Reporter getrennt und ein Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt. Angegeben wird dann der PCR-Zyklus als Schwellenwert (Cycle Threshold, C_T -Wert), bei dem die Emission des Farbstoffes das Hintergrundrauschen übersteigt^[129,134,135]. Zur Durchführung der TaqMan[®]-PCR wurde pro Probe ein TaqMan[®]-PCR-Ansatz aus 15 μ l TaqMan[®]Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems[®], Carlsbad, USA, enthält AmpliTaq Gold[®]DNA Polymerase, dUTP, dNTP, ROX[®]Dye und PCR-Puffer), 1,5 μ l der entsprechenden TaqMan[®]-Sonde und 8,5 μ l Diethylpyrocarbonat (DEPC)-Wasser hergestellt. Dann wurden 25 μ l des TaqMan[®]-PCR-Ansatzes zusammen mit 5 μ l cDNA-Probe (siehe 3.3.4) in eine 96iger Mikrotiterplatte pipettiert und bei 15.000 g und Raumtemperatur für 1 Minute zentrifugiert. Anschließend erfolgte die TaqMan[®]-PCR im 7900HT Fast Real-Time PCR System Cyclor (Applied Biosystems[®], Carlsbad, USA). Dabei erfolgte zunächst die Aktivierung der Taq-Polymerase für 10 Minuten bei 95 °C. Anschließend wurde die cDNA bei 95 °C für 15 Sekunden denaturiert und die TaqMan[®]-Sonden dann bei 60 °C für 1 Minute an die Zielsequenz hybridisiert. Dieser TaqMan[®]-PCR-Zyklus wurde 40 mal wiederholt.

Die Auswertung der TaqMan[®]-PCR erfolgte mit Hilfe der Standardkurven-Methode^[136]. Dann wurde die ermittelte relative mRNA-Kopiezahl gegen den Housekeeper *GAPDH* normalisiert, um versuchsbedingte Änderungen der mRNA-Expression auszuschließen. Abschließend wurde die virtuelle mRNA-Kopienzahl, bezogen auf 10^4 *GAPDH*-mRNA-Kopien, errechnet.

3.3.6 Proteinpräparation aus Prostata-(karzinom)zellen

Die Proteinisolation aus den Prostata-(karzinom)zellen ist Voraussetzung für die Expressionsanalysen auf Proteinebene mittels Western Blot (siehe 3.3.8). Zur Isolierung der nukleären und cytosolischen Proteine aus den Zellen wurde der Cell Extraction Buffer von der Firma Invitrogen (Carlsbad, USA) verwendet. Dieser wurde zur Vermeidung der Proteindegradation mit Proteinase-Inhibitoren versetzt (siehe 2.12). Für die Proteinisolierung wurden 2×10^6 transduzierte Zellen (siehe 3.2.8) mit Selektionsmedium in 10 cm Zellkulturplatten ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 90 % wachsen gelassen. Dann wurden die Zellen auf Eis zweimal mit 1 ml PBS gewaschen, 2,5 ml Proteinisolationspuffer auf die Zellen gegeben und die Zellen mit einem Zellschaber vom Plattenboden gelöst. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Zentrifugengefäß überführt und zur vollständigen Zelllyse für 10 Minuten auf Eis stehengelassen, kurz gevortext und nochmals für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde

die Zellsuspension für 10 Minuten bei 4 °C und 5.000 *g* zentrifugiert und der proteinhaltige Überstand in ein Reagiergefäße überführt. Abschließend erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentration wie unter 3.3.7 beschrieben mit dem Qubit®2.0 Fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, USA). Die Proteinproben wurden bei -20 °C gelagert.

3.3.7 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das Qubit®2.0 Fluorometer und das Qubit® Protein Assay Kit von der Firma Invitrogen (Carlsbad, USA) verwendet. Als erstes wurden die Proteinproben 1:10 mit nukleasefreiem Wasser verdünnt. Dann wurden drei Proteinstandardlösungen aus 190 μ l Qubit Working Solution und 10 μ l Qubit Protein Standard hergestellt. Danach wurden 1 μ l Proteinverdünnung und 199 μ l Qubit Working Solution in einem Reagiergefäß gemischt und ein Blindwert aus 1 μ l nukleasefreiem Wasser und 199 μ l Qubit Working Solution angesetzt. Anschließend wurden die Proteinstandardlösungen, die Proteinproben und der Blindwert gevortext und für 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Dann wurden die Proteinstandardlösungen gemessen und eine Eichgrade erstellt. Abschließend wurde die Proteinkonzentration der Proteinproben und des Blindwertes anhand der Eichgraden in μ g/ml ermittelt und die Konzentration der ursprünglichen Proteinproben mit der folgenden Formel berechnet.

$$C_{Proteinprobe}(\text{mg/ml}) = (200 * C_{Proteinverdünnung} - 200 * C_{Blindwert}) * \frac{10}{1000}$$

3.3.8 Western Blot

Der Western Blot wurde zum Nachweis der Expression auf Proteinebene in den Prostatakarzinomzelllinien DU 145 und PC-3 und der Prostataepithelzelllinie BPH-1 verwendet. Dieses Verfahren basiert auf der Übertragung von gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteinen auf eine Trägermembran und der darauffolgenden Detektion eines spezifischen Proteins mittels einer Antigen-Antikörper-Antikörper-Reaktion^[137,138]. Die Durchführung des indirekten Proteinnachweises erfolgte in den folgenden sieben Schritten.

1. Gelelektrophorese

Zur Durchführung der Gelelektrophorese wurden die unter 3.3.6 isolierten Proteinproben auf Eis aufgetaut, mit dH₂O auf eine Endkonzentration von 40 μ g/Gelfach (ZNF292 in PC-3 und BPH-1: 20 μ g/Gelfach) verdünnt. Dann wurden 950 μ l Laemmli-Puffer mit 50 μ l β -Mercaptoethanol versetzt und die Proteinproben 1:1 mit Laemmli-Puffer gemischt. Danach

wurden die Proben zur Denaturierung der Proteine für 5 Minuten auf 99 °C erhitzt. Durch das β -Mercaptoethanol wurden die Disulfidbrücken der Proteine gespalten und die Proteine bis zu ihrer Primärstruktur aufgebrochen. Außerdem wurden durch das SDS im Laemmli-Puffer die individuellen Proteinladungen überdeckt und eine einheitliche negative Ladung der Proteine erzeugt. Im Anschluss an die Denaturierung wurden die Proben für 10 Minuten bei 4 °C gelagert. Dann wurde das Mini-PROTEAN TGX Precast Gel 4-15 % (Bio-Rad, München) wie vom Hersteller beschrieben vorbereitet, in die Gelelektrophoresekammer gesetzt und die Kammer bis zur Markierung mit TGS-Puffer gefüllt. Danach wurden 25 μ l Proteinprobe bzw. 5 μ l Precision Plus ProteinTM Standard Dual Marker (Molekülgrößen-Marker) pro Gelfach aufgetragen. Abschließend wurden die Proteine im Elektrischen Feld bei 400 Volt für 15 Minuten nach ihrer Molekülgröße aufgetrennt.

2. Western Blot

Im Anschluss an die Gelelektrophorese erfolgte die Übertragung der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran. Dazu wurde das Trans-Blot Turbo Transfer Pack Mini (Bio-Rad, München) wie vom Hersteller beschrieben zusammen mit dem Proteingel vorbereitet und in den Trans-Blot[®]SD Semi-Dryer (Bio-Rad, München) gelegt. Dann wurde ein Elektrisches Feld von 2,5 Ampere für 7 Minuten erzeugt, das zum Transfer der negativ geladenen Proteine auf die Membran führte. Danach wurde eine Ponceau S Färbung zur Überprüfung des erfolgreichen Proteintransfers durchgeführt.

3. Blocken der Membran

Zur Überdeckung der unspezifischen Membran-Bindungsstellen wurde die Membran für eine Stunde in einer 3 % Milchpulverlösung auf einem Schüttler geblockt.

4. Antigen-Antikörper-Antikörper-Reaktion

Im Anschluss an das Blocken der Membran wurde die 3 % Milchpulverlösung abgegossen, der proteinspezifische erste Antikörper auf die Membran gegeben und auf dem Schüttler inkubiert. Dann wurde die Membran dreimal für 5 Minuten mit TBS-T Waschpuffer gewaschen, der zweite Antikörper auf die Membran gegeben und auf dem Schüttler inkubiert. Für die letzten 30 Minuten der Inkubationszeit wurde Precision Protein StrepTactin-HRP Conjugate für den Molekülgrößen-Marker in einer 1:50.000 Verdünnung zugesetzt. Nach der Inkubation wurde die Membran dreimal für 5 Minuten mit TBS-T Waschpuffer gewaschen. Die Verdünnungen des ersten und zweiten Antikörpers in der 3 %igen Milchpulverlösung und die jeweilige Inkubationszeiten sind in Tabelle 3.5 aufgeführt.

Tabelle 3.5: Verwendung der Western Blot Antikörper

Protein	Verdünnung	Inkubation	2. Antikörper	Verdünnung	Inkubation
α -Tubulin	1:5.000	2 Stunden	goat α -mouse IgG	1:10.000	1 Stunde
HMGN3	1:2.000	12 Stunden	goat α -rabbit IgG	1:10.000	2 Stunden
ORC3	1:1.000	12 Stunden	goat α -rabbit IgG	1:10.000	2 Stunden
PM20D2	1:500	12 Stunden	goat α -rabbit IgG	1:10.000	2 Stunden
SMAP1	1:1.000	12 Stunden	goat α -rabbit IgG	1:10.000	2 Stunden
UBE2J1	1:400	12 Stunden	goat α -rabbit IgG	1:10.000	2 Stunden
ZNF292	1:1.000	12 Stunden	goat α -rabbit IgG	1:10.000	2 Stunden

5. Proteindetektion

Für die Proteindetektion wurde die Peroxid-Lösung und die Luminol/Enhancer-Lösung 1:1 gemischt (ClarityTM Western ECL Substrate, Bio-Rad, München), auf die Membran pipetiert, für 5 Minuten im Dunkel inkubiert und die Detektionslösung wieder von der Membran entfernt. Dann erfolgte die Detektion des Chemilumineszenz-Signals mit einem Kodak X-Sight G/RA Film bei einer Belichtungszeit von 30 Sekunden bis 5 Minuten und anschließender Entwicklung des Films durch leichtes Schwenken in der Entwicklerlösung, der Fixierlösung und dH₂O.

6. Membran-Stripping / Blockierung des 2. Antikörpers

Durch das Membran-Stripping wurden der erste und zweite Antikörper von der Membran entfernt. Dazu wurde die Membran in 10 ml Stripping Lösung für 30 Minuten bei 50 °C im Trockenschrank inkubiert und dann fünfmal für 5 Minuten in TBS-T Waschpuffer gewaschen. Das Membran-Stripping wurde durchgeführt, wenn zum Nachweis des Zielproteins und des Referenzproteins der gleiche zweite Antikörper verwendet wurde. Eine Blockierung des zweiten Antikörpers wurde durchgeführt, wenn dieser für das Zielprotein und Referenzprotein unterschiedlich war. Dazu wurde die Membran in einer Natriumacetat-Milchpulver-Lösung (2 μ g/ml für 30 Minuten auf dem Schüttler inkubiert und dann dreimal für 5 Minuten in TBS-T Waschpuffer gewaschen. Im Anschluss an das Membran-Stripping bzw. des Blockieren des 2. Antikörpers wurde das Referenzprotein α -Tubulin wie unter Schritt 4 und 5 nachgewiesen.

7. Auswertung

Die Größe der detektierten Proteinbanden wurden anhand des Molekülgrößen-Markers Precision Plus ProteinTM Standard Dual Marker ermittelt und mit der laut Antikörper-Hersteller erwarteten Molekülgröße verglichen. Zusätzlich wurde durch den Nachweis des Referenzproteins α -Tubulin die Proteinauftragsmenge geprüft.

Kapitel 4

Ergebnisse

4.1 Untersuchungen des 6q15 (*MAP3K7*) Locus mittels FISH am Prognose-TMA

Die Analyse des Prognose-TMAs mittels FISH wurden teilweise durch Frau Jana Hesse und Herrn Thomas Haß unter meiner Anleitung durchgeführt. Tumoren mit einer 6q-Deletion wurden in einer 2. Analyse durch mich bestätigt. Frau Jana Hesse und Herr Thomas Haß haben die ermittelten FISH-Daten ebenfalls in ihrer Dissertation zur Erlangung des Grades Dr. med. verwendet.

4.1.1 Auswertbarkeit der 6q15 FISH-Analyse

Insgesamt konnte für 6.069 (48,8 %) der 12.427 untersuchten Gewebeproben unter der Verwendung der 6q15 (*MAP3K7*)-Sonde der 6q15-Kopiezahlstatus mittels FISH bestimmt werden. Die verbleibenden 6.358 Gewebespots mussten aus folgenden Gründen aus der Analyse ausgeschlossen werden: 1.532 (24,1 %) Gewebeproben zeigten nur wenig oder kein Tumorgewebe in der H/E-Auswertung, bei 726 (11,4 %) Gewebeproben war in der TMA-Analyse kein Gewebe mehr vorhanden und 4.100 (64,5 %) der Gewebeproben zeigten keine oder nur sehr schwache 6q15-Signale und daher eine unzureichenden FISH für die Analyse.

4.1.2 Prävalenz und Assoziation der 6q15-Deletion zum Tumorphänotyp

4.1.2.1 Prävalenz der 6q15-Deletion

Insgesamt konnte in 1.164 (19,2 %) der 6.069 auswertbaren Tumorgewebeproben eine heterozygote 6q15-Deletion (Verlust eines 6q15 Allels) mittels FISH nachgewiesen werden (siehe Abbildung 4.1 und Tabelle 4.1). Homozygote 6q15-Deletionen (Verlust beider 6q15 Allele) wurden nicht gefunden.

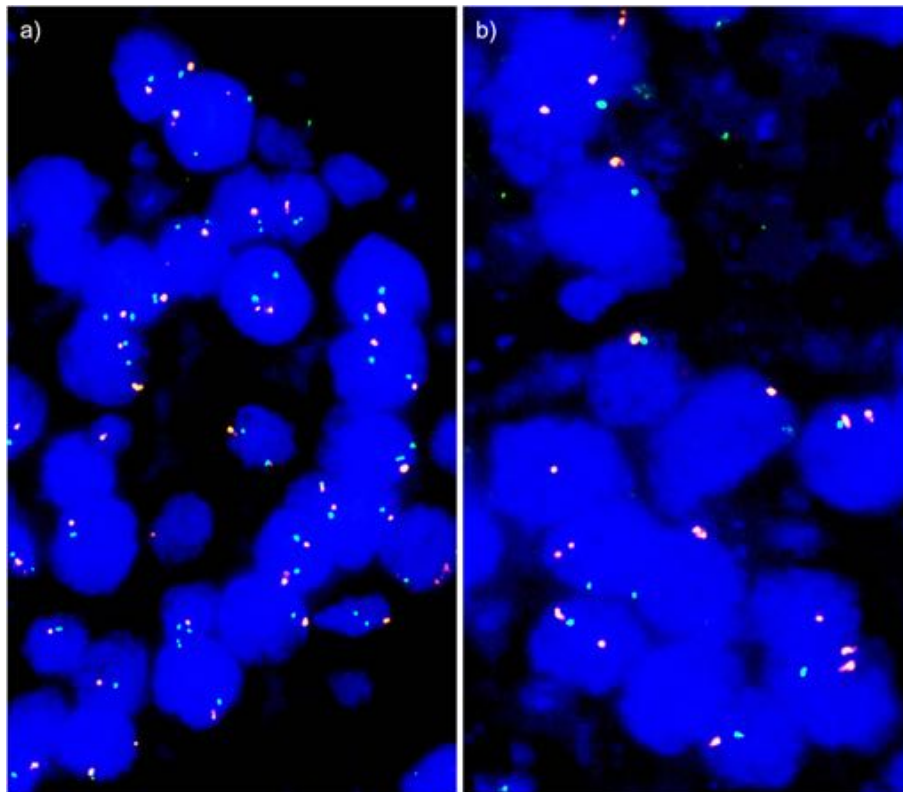


Abbildung 4.1: Beispiele der mikroskopischen 6q15-FISH Auswertung. a) Normaler 6q15-Kopiezahlstatus mit einer gleichen Anzahl an grünen 6q15-Signalen und orangen Centromer 6-Signalen. b) Heterozygote 6q15-Deletion mit deutlich weniger grünen 6q15-Signalen als orangen Centromer 6-Signalen.

4.1.2.2 Assoziation der 6q15-Deletion mit den klinisch-pathologischen Parametern des Prostatakarzinoms

Zur Bestimmung eines möglichen Zusammenhangs des 6q15-Kopiezahlstatus mit dem Tumorphänotyp, wurde der 6q15-Kopiezahlstatus mittels eines Chi-Quadrat-Tests mit den klinisch-pathologischen Parametern des Prostatakarzinoms in allen Tumoren und in den Untergruppen der ERG-positiven und ERG-negativen Tumoren assoziiert. Die Analyse aller Prostatakarzinome zeigte eine deutliche Assoziation der 6q15-Deletion mit einem ungünstigen Tumorphänotyp. Die 6q15-Deletion war signifikant assoziiert mit einem fortgeschrittenen

Tumorstadium, einem hohen Gleason Score und einem erhöhten präoperativen PSA-Wert ($P < 0,0001$ für alle). Tendenziell konnte die 6q15-Deletion ebenfalls häufiger bei Tumoren mit Metastasen in den Lymphknoten und Tumorbefall des chirurgischen Resektionsrandes nachgewiesen werden. Diese Assoziation war jedoch statistisch nicht signifikant ($P \geq 0,0800$). Eine detaillierte Darstellung der Ergebnisse ist in Tabelle 4.1 vorhanden.

Tabelle 4.1: Assoziation der 6q15-Deletion mit den klinisch-pathologischen Parametern des Prostatakarzinoms in allen Tumoren. N0: keine Metastasen in den Lymphknoten, N+: Metastasen in den Lymphknoten, PSA: Prostata-spezifisches Antigen, negativ: kein Tumor im Resektionsrand des Prostatektomiepräparates, positiv: Tumor im Resektionsrand des Prostatektomiepräparates. Angewendet wurde ein Chi-Quadrat-Test

	analysierbar	keine 6q15-Deletion	6q15-Deletion	
	n	n (%)	n (%)	<i>P</i> -Wert
Alle Tumoren	6.069	4.905 (80,8)	1.164 (19,2)	
Tumorstadium				
pT2	3.868	3.203 (82,8)	665 (17,2)	$< 0,0001$
pT3a	1.356	1.062 (78,3)	294 (21,7)	
pT3b-pT4	822	620 (75,4)	202 (24,6)	
Gleason Score				
$\leq 3 + 3$	1.450	1.298 (89,5)	152 (10,5)	$< 0,0001$
$3 + 4$	3.325	2.718 (81,7)	607 (18,3)	
$4 + 3$	951	644 (67,7)	307 (32,3)	
$\geq 4 + 4$	313	221 (70,6)	92 (29,4)	
Lymphknotenstatus				
N0	3.459	2.724 (78,8)	735 (21,3)	0,0837
N+	356	266 (74,7)	90 (25,3)	
PSA-Wert (ng/μl)				
< 4	767	658 (85,8)	109 (14,2)	$< 0,0001$
$4 - 10$	3.570	2.899 (81,2)	671 (18,8)	
$10 - 20$	1.228	956 (77,9)	272 (22,2)	
> 20	439	336 (76,5)	103 (23,5)	
Status des Resektionsrandes				
negativ	4.805	3.901 (81,2)	904 (18,8)	0,2216
positiv	1.157	921 (79,6)	236 (20,4)	

Um eine Einteilung der Tumoren in die Untergruppen der ERG-negativen und ERG-positiven Tumoren vorzunehmen, wurden die immunohistochemischen Daten zum ERG-Status aus einer vorherigen Studie verwendet^[59,71]. Diese Analyse zeigte, dass die Assoziation der 6q15-Deletion mit einem schlechtem Tumorphänotyp unabhängig vom ERG-Status war. In beiden Untergruppen war die 6q15-Deletion signifikant assoziiert mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium und einem hohen Gleason Score ($P \leq 0,0100$, siehe auch Tabelle 4.2 und 4.3).

In den ERG-negativen Tumoren zeigte sich außerdem eine signifikante Assoziation zu einem erhöhten präoperativen PSA-Wert ($P < 0,0001$) und in den ERG-positiven Tumoren zum Vorhandensein von metastasierten Lymphknoten ($P = 0,0441$). Eine detaillierte Darstellung der Ergebnisse ist in Tabelle 4.2 und 4.3 zu finden.

Tabelle 4.2: Assoziation der 6q15-Deletion mit den klinisch-pathologischen Parametern des Prostatakarzinoms in den ERG-negativen Tumoren. N0: keine Metastasen in den Lymphknoten, N+: Metastasen in den Lymphknoten, PSA: Prostata-spezifisches Antigen, negativ: kein Tumor im Resektionsrand des Prostatektomiepräparates, positiv: Tumor im Resektionsrand des Prostatektomiepräparates. Angewendet wurde ein Chi-Quadrat-Test

	analysierbar	keine 6q15-Deletion	6q15-Deletion	<i>P</i> -Wert
	n	n (%)	n (%)	
ERG-negative Tumoren	3.053	2.236 (73,2)	817 (26,8)	
Tumorstadium				
pT2	2.037	1.545 (75,9)	492 (24,1)	< 0,0001
pT3a	609	419 (68,8)	190 (31,2)	
pT3b-pT4	395	262 (66,3)	133 (33,7)	
Gleason Score				
≤ 3 + 3	708	606 (85,6)	102 (14,4)	< 0,0001
3 + 4	1.629	1.210 (74,3)	419 (25,7)	
4 + 3	524	292 (56,1)	230 (43,9)	
≥ 4 + 4	177	115 (65,0)	62 (35,0)	
Lymphknotenstatus				
N0	1.755	1.228 (70,0)	527 (30,0)	0,2730
N+	170	112 (65,9)	58 (34,1)	
PSA-Wert (ng/μl)				
< 4	328	258 (78,7)	70 (21,3)	0,0317
4 – 10	1.783	1.310 (73,5)	473 (26,5)	
10 – 20	676	481 (71,2)	195 (28,9)	
> 20	235	162 (68,9)	73 (31,1)	
Status des Resektionsrandes				
negativ	2.448	1.803 (73,7)	645 (26,4)	0,4125
positiv	556	400 (71,9)	156 (28,1)	

Tabelle 4.3: Assoziation der 6q15-Deletion mit den klinisch-pathologischen Parametern des Prostatakarzinoms in den ERG-positiven Tumoren. N0: keine Metastasen in den Lymphknoten, N+: Metastasen in den Lymphknoten, PSA: Prostata-spezifisches Antigen, negativ: kein Tumor im Resektionsrand des Prostatektomiepräparates, positiv: Tumor im Resektionsrand des Prostatektomiepräparates. Angewendet wurde ein Chi-Quadrat-Test

	analysierbar	keine 6q15-Deletion	6q15-Deletion	
	n	n (%)	n (%)	<i>P</i> -Wert
ERG-positive Tumoren	2.630	2.334 (88,7)	296 (11,3)	
Tumorstadium				
pT2	1.564	1.421 (90,9)	143 (9,1)	0,0096
pT3a	675	580 (85,9)	95 (14,1)	
pT3b-pT4	367	324 (84,8)	58 (15,2)	
Gleason Score				
$\leq 3 + 3$	603	562 (93,2)	41 (6,8)	$< 0,0001$
$3 + 4$	1.522	1.360 (89,4)	162 (10,6)	
$4 + 3$	379	309 (81,5)	70 (18,5)	
$\geq 4 + 4$	114	92 (80,7)	22 (19,3)	
Lymphknotenstatus				
N0	1.517	1.338 (88,2)	179 (11,8)	0,0441
N+	166	137 (82,5)	29 (17,5)	
PSA-Wert (ng/μl)				
< 4	382	346 (90,6)	36 (9,4)	0,3333
$4 - 10$	1.568	1.394 (88,9)	174 (11,1)	
$10 - 20$	478	416 (87,0)	62 (13,0)	
> 20	173	150 (86,7)	23 (13,3)	
Status des Resektionsrandes				
negativ	2.047	1.826 (89,2)	221 (10,8)	0,2022
positiv	532	464 (87,2)	68 (12,8)	

4.1.2.3 Assoziation der 6q15-Deletion mit der Zellproliferation (Ki67 Labeling Index)

Zur Bestimmung eines möglichen Zusammenhanges des 6q15-Kopiezahlstatus mit der Zellproliferation wurde der immunohistochemisch ermittelte Ki67 Labeling Index (Ki67 LI) aus der molekularen Datenbank mittels einer einfaktoriellen ANOVA mit den Ergebnissen der 6q15 FISH-Analyse korreliert^[139]. Diese Analyse wurden in allen Tumoren, der Untergruppe der ERG-negativen und ERG-positiven Tumoren und in den Untergruppen der Gleason Score $\leq 3 + 3 = 6$, $3 + 4 = 7$, $4 + 3 = 7$ und $\geq 4 + 4 = 8$ durchgeführt. Das Auftreten einer 6q15-Deletion war signifikant assoziiert mit einer gesteigerten Proliferation der Tumorzellen in allen Tumoren ($P < 0,0001$). Diese Assoziation war unabhängig vom ERG-Status und

dem Gleason Score, da in fast allen Untergruppen ebenfalls eine signifikante Assoziation der 6q15-Deletion mit einem erhöhten Ki67 LI ermittelt werden konnte ($P \leq 0,0233$). Eine Ausnahme stellte die Untergruppe der Tumoren mit einem Gleason Score $\geq 4 + 4$ dar, in der vermutlich auf Grund der geringen Fallzahl ($n = 180$) lediglich eine Tendenz zu einer gesteigerten Zellproliferation ermittelt werden konnte ($P = 0,0608$). Die Ergebnisse der Analysen sind detailliert in Tabelle 4.4 dargestellt.

Tabelle 4.4: Assoziation der 6q15-Deletion mit der Proliferation der Prostatatumorzellen gemessen am Ki67 Labeling Index (Ki67 LI). MW: Mittelwert, SDF: Standardfehler. Angewendet wurde eine einfaktorielle ANOVA.

	Anzahl	MW Ki67 LI	SDF	<i>P</i> -Wert
alle Tumoren				
keine 6q15-Deletion	3.125	2,88	0,05	< 0,0001
6q15-Deletion	824	3,64	0,10	
ERG-negative Tumoren				
keine 6q15-Deletion	1.451	2,71	0,07	< 0,0001
6q15-Deletion	600	3,60	0,11	
ERG-positive Tumoren				
keine 6q15-Deletion	1.616	3,05	0,07	0,0009
6q15-Deletion	209	3,73	0,19	
Gleason Score $\leq 3 + 3$				
keine 6q15-Deletion	844	2,31	0,07	0,0016
6q15-Deletion	129	2,95	0,19	
Gleason Score $3 + 4$				
keine 6q15-Deletion	1.776	2,92	0,06	0,0149
6q15-Deletion	428	3,24	0,12	
Gleason Score $4 + 3$				
keine 6q15-Deletion	365	3,56	0,19	0,0233
6q15-Deletion	206	4,28	0,25	
Gleason Score $\geq 4 + 4$				
keine 6q15-Deletion	123	4,45	0,44	0,0608
6q15-Deletion	57	5,91	0,64	

4.1.3 Assoziation der 6q15-Deletion mit der Prognose des Patienten beim Prostatakarzinom

4.1.3.1 Assoziation der 6q15-Deletion mit dem Auftreten eines PSA-Rezidivs

Zur Bestimmung der prognostischen Relevanz der 6q15-Deletion wurde in einer Univariaten-Analyse der Status der 6q15-Kopiezahl mit der Wahrscheinlichkeit eines PSA-Rezidivs in einem Log-Rank-Test assoziiert und in einer Kaplan-Meier-Kurve dargestellt. Für die Analyse wurden alle Patienten verwendet, für die postoperative Verlaufsdaten vorhanden waren. Insgesamt wurden drei Analysen durchgeführt, die erste in allen Tumoren, die zweite in den Untergruppen der ERG-negativen und ERG-positiven Tumoren und die dritte in den Untergruppen der Tumoren mit einem geringen Gleason Score ($\leq 3 + 4$) und einem hohem Gleason Score ($\geq 4 + 3$). In der Analyse aller Tumoren war die 6q15-Deletion stark mit der erhöhten Wahrscheinlichkeit eines PSA-Rezidivs und damit einer schlechten Prognose für den Patienten in 5.505 analysierbaren Patienten assoziiert ($P < 0,0001$, siehe Abbildung 4.2a). Diese Assoziation zeigte sich unabhängig vom ERG-Status, da sowohl in den 2.799 ERG-negativen Tumoren als auch in den 2.384 ERG-positiven Tumoren die 6q15-Deletion mit dem PSA-Rezidiv korrelierte ($P < 0,0001$ für ERG-negative und $P = 0,0004$ für ERG-positive Tumoren, siehe Abbildung 4.2b und c). Die Einteilung in Tumoren mit einem geringen und einem hohen Gleason Score zeigte deutlich, dass die Assoziation der 6q15-Deletion zum PSA-Rezidiv durch die Tumoren mit einem geringen Gleason Score bedingt war ($n = 4.325$, $P < 0,0001$, siehe Abbildung 4.2d). In den 1.173 Tumoren mit einem hohem Gleason Score konnte kein Zusammenhang zwischen der 6q15-Deletion und dem Auftreten des PSA-Rezidivs mehr gemessen werden ($P = 0,3551$, siehe Abbildung 4.2e).

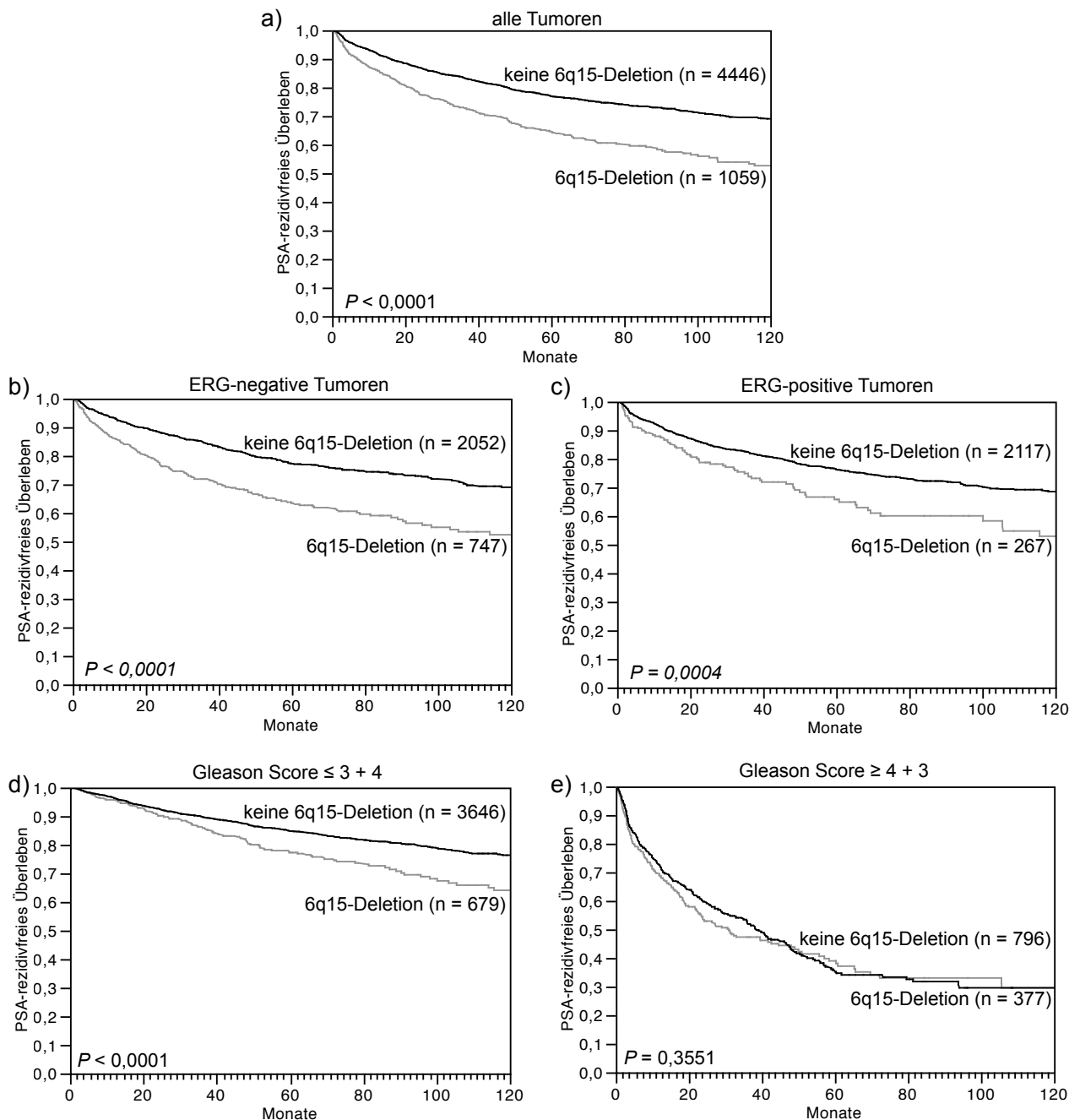


Abbildung 4.2: Assoziation des 6q15-Kopiezahlstatus mit der Wahrscheinlichkeit eines PSA-Rezidivs in a) allen Tumoren, b) ERG-negativen Tumoren, c) ERG-positiven Tumoren, d) Tumoren mit einem geringem Gleason Score ($\leq 3 + 4$) und e) Tumoren mit einem hohen Gleason Score ($\geq 4 + 3$). Die Analyse erfolgte mittels Log-Rank-Test.

Um zu untersuchen, ob die Assoziation der 6q15-Deletion mit dem frühen Auftreten des PSA-Rezidiv unabhängig von den etablierten prognostischen Parametern war, wurde eine Cox-proportionalen Hazard Analyse durchgeführt in der neben dem 6q15-Kopiezahlstatus das Tumorstadium, der Gleason Score, der präoperative PSA-Wert, das Vorhandensein von Metastasen in den Lymphknoten und der Tumorbefall des Resektionsrandes berücksichtigt wurden. Diese Analyse zeigte, dass die prognostische Aussagekraft der 6q15-Deletion zur Vorhersage eines PSA-Rezidivs unabhängig von den klinisch-pathologischen Prognosepara-

metern war ($P = 0,0005$, siehe Tabelle 4.5). Die Subgruppen-Analyse zeigte jedoch, dass der prognostische Wert der 6q15-Deletion auf die Untergruppe der ERG-negativen Tumoren beschränkt war ($P = 0,0001$, siehe Tabelle 4.6). In der Untergruppe der ERG-positiven Tumoren war die Assoziation zum PSA-Rezidiv nicht mehr signifikant und damit nicht unabhängig von den etablierten Prognoseparametern ($P = 0,8075$, siehe Tabelle 4.7).

Tabelle 4.5: Cox-proportionalen Hazard Analyse zur Bestimmung der prognostischen Aussagekraft der 6q15-Deletion im Vergleich zu den etablierten Prognoseparametern in allen Prostatatumoren. RV: Risiko-Verhältnis, KI: Konfidenzintervall

	RV	95 % KI	P-Wert
Tumorstadium			
pT3a vs pT2	2,0	1,7-2,4	< 0,0001
pT3b vs pT3a	1,4	1,2-1,7	
pT4 vs pT3b	1,8	1,2-2,7	
Gleason Score			
3 + 4 vs $\leq 3 + 3$	1,8	1,4-2,4	< 0,0001
4 + 3 vs 3 + 4	2,1	1,8-2,4	
$\geq 4 + 4$ vs 4 + 3	1,3	1,0-1,6	
Lymphknotenstatus			
pN+ vs pN0	1,5	1,3-1,8	< 0,0001
PSA-Wert ($\text{ng}/\mu\text{l}$)			
4 – 10 vs < 4	1,1	0,9-1,5	< 0,0001
10 – 20 vs 4 – 10	1,3	1,1-1,5	
> 20 vs 10 – 20	1,4	1,2-1,7	
Status des Resektionsrandes			
positiv vs negativ	1,2	1,0-1,4	0,0110
Deletionsstatus			
6q15-Deletion vs keine Deletion	1,2	1,1-1,4	0,0055

Tabelle 4.6: Cox-proportionalen Hazard Analyse zur Bestimmung der prognostischen Aussagekraft der 6q15-Deletion im Vergleich zu den etablierten Prognoseparametern in ERG-negativen Prostatatumoren. RV: Risiko-Verhältnis, KI: Konfidenzintervall

	RV	95 % KI	P-Wert
Tumorstadium			
pT3a vs pT2	1,96	1,54-2,51	< 0,0001
pT3b vs pT3a	1,40	1,11-1,77	
pT4 vs pT3b	2,01	1,14-3,31	
Gleason Score			
3 + 4 vs $\leq 3 + 3$	1,49	1,05-2,17	< 0,0001
4 + 3 vs 3 + 4	1,92	1,54-2,40	
$\geq 4 + 4$ vs 4 + 3	1,21	0,91-1,59	
Lymphknotenstatus			
pN+ vs pN0	1,66	1,26-2,17	0,0004
PSA-Wert (ng/μl)			
4 – 10 vs < 4	1,11	0,75-1,72	< 0,0001
10 – 20 vs 4 – 10	1,49	1,20-1,84	
> 20 vs 10 – 20	1,23	0,96-1,57	
Status des Resektionsrandes			
positiv vs negativ	1,16	0,93-1,43	0,1895
Deletionsstatus			
6q15-Deletion vs keine Deletion	1,44	1,20-1,74	0,0001

Tabelle 4.7: Cox-proportionalen Hazard Analyse zur Bestimmung der prognostischen Aussagekraft der 6q15-Deletion im Vergleich zu den etablierten Prognoseparametern in ERG-positiven Prostatatumoren. RV: Risiko-Verhältnis, KI: Konfidenzintervall

	RV	95 % KI	P-Wert
Tumorstadium			
pT3a vs pT2	2,14	1,62-2,83	< 0,0001
pT3b vs pT3a	1,47	1,16-1,89	
pT4 vs pT3b	1,44	0,70-2,63	
Gleason Score			
3 + 4 vs $\leq 3 + 3$	2,40	1,60-3,76	< 0,0001
4 + 3 vs 3 + 4	2,17	1,70-2,76	
$\geq 4 + 4$ vs 4 + 3	1,77	1,29-2,43	
Lymphknotenstatus			
pN+ vs pN0	1,28	0,96-1,70	0,0928
PSA-Wert ($\text{ng}/\mu\text{l}$)			
4 – 10 vs < 4	1,20	0,85-1,76	0,0006
10 – 20 vs 4 – 10	1,04	0,82-1,32	
> 20 vs 10 – 20	1,62	1,21-2,16	
Status des Resektionsrandes			
positiv vs negativ	1,27	1,02-1,59	0,0347
Deletionsstatus			
6q15-Deletion vs keine Deletion	1,04	0,79-1,39	0,8075

4.1.3.2 Assoziation der 6q15-Deletion mit biologisch-klinischen Endpunktgruppen

Zur Bestimmung der prognostischen Relevanz der 6q15-Deletion im Bezug auf die wesentlichen biologischen und klinischen Charakteristika des Prostatakarzinoms wurde der 6q15-Kopiezahlstatus mittels eines Chi-Quadrat-Tests mit vier klinisch-biologischen Endpunktgruppen assoziiert. Für diese Analyse standen 1.710 Patienten zur Verfügung für die sowohl der 6q15-Kopiezahlstatus des Tumors als auch eine Endpunktgruppe vorlag. Die 6q15-Deletion zeigte eine starke signifikante Assoziation zur Verteilung der vier Endpunktgruppen bei der Analyse aller Tumoren ($P < 0,0001$). Bei den Tumoren mit einer 6q15-Deletion war das Risiko eines okkult systemischen Tumors oder eines metastasierenden Tumors um das 1,6-fache höher im Vergleich zu Tumoren mit einer normalen 6q15-Kopiezahl ($P \leq 0,002$). Im Gegensatz dazu war die Wahrscheinlichkeit eines lokalbegrenzt wachsenden Tumors bei Tumoren mit einer 6q15-Deletion um das 0,64-fache geringer als bei Tumoren ohne einer 6q15-Deletion ($P < 0,001$). Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Abbildung 4.3 dargestellt.

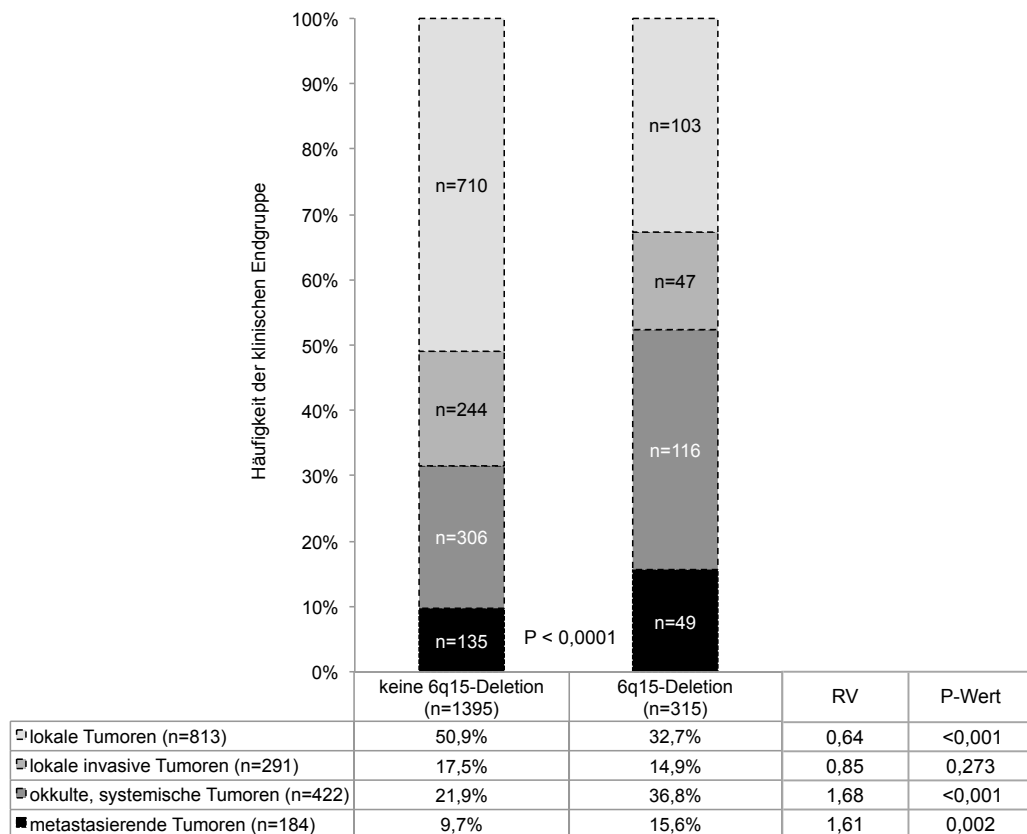


Abbildung 4.3: Assoziation des 6q15-Kopiezahlstatus mit der Verteilung klinisch-biologischer Endpunktgruppen in allen Prostatatumoren. RV: Risikoverhältnis (% 6q15-Deletion / % keine 6q15-Deletion). Angewendet wurde ein Chi-Quadrat-Test

Die Korrelation des 6q15-Kopiezahlstatus mit den klinisch-biologischen Endpunktgruppen nach Aufteilung der Tumoren in solche mit einem geringen Gleason Score ($\leq 3 + 4$) und einem hohen Gleason Score ($\geq 4 + 3$) zeigte allerdings deutlich, dass der Zusammenhang vor allem durch die Tumoren mit einem geringen Gleason Score bedingt war ($P = 0,0052$). In dieser Untergruppe von 1.281 Prostatatumoren war die Wahrscheinlichkeit eines Tumors mit einem ungünstigen Phänotyp bei Vorliegen einer 6q15-Deletion um mindestens das 1,6-fache höher im Vergleich zu Tumoren ohne eine 6q15-Deletion ($P \leq 0,083$). Auf Grund der geringen Fallzahl in der Endpunktgruppe der metastasierten Tumoren erreichte dieser Unterschied jedoch keine statistische Signifikanz (siehe Abbildung 4.4).

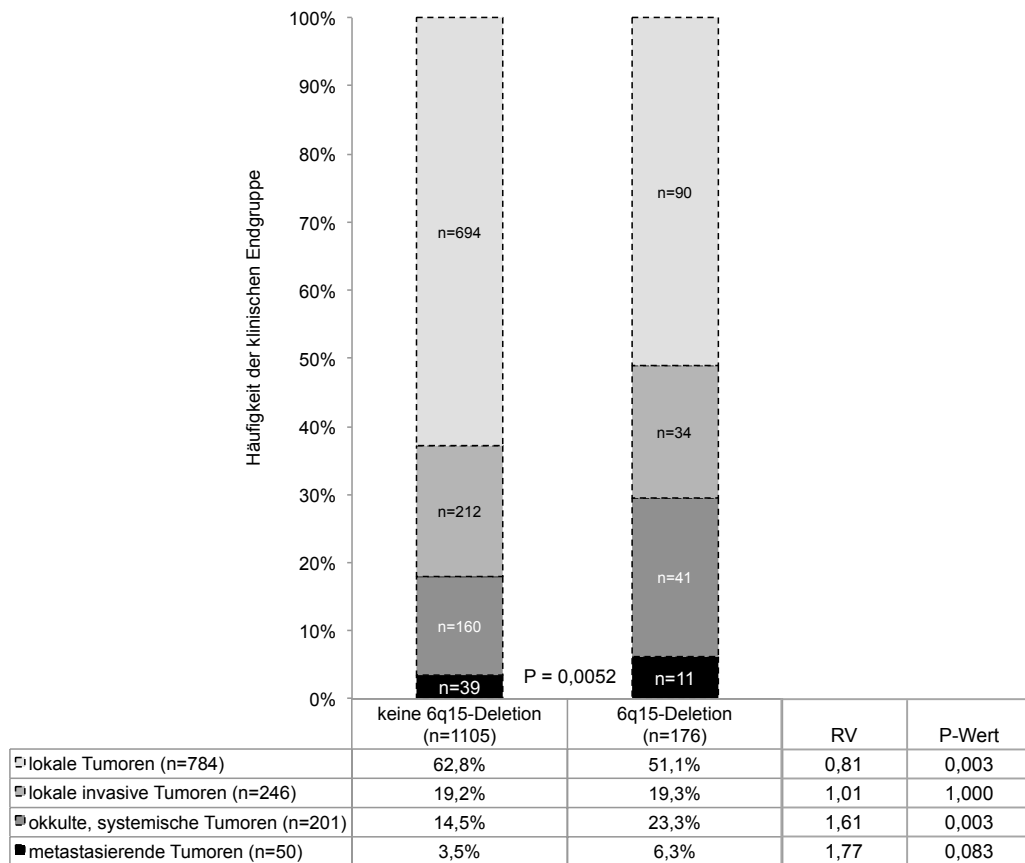


Abbildung 4.4: Assoziation des 6q15-Kopiezahlstatus mit der Verteilung klinisch-biologischer Endpunktgruppen in Tumoren mit einem geringen Gleason Score ($\leq 3 + 4$). RV: Risikoverhältnis (% 6q15-Deletion / % keine 6q15-Deletion). Angewendet wurde ein Chi-Quadrat-Test

In den Tumoren mit einem hohen Gleason Score ($\geq 4 + 3$) konnte kein Unterschied mehr in der Verteilung der klinisch-biologischen Endpunktgruppen zwischen den Tumoren mit oder ohne 6q15-Deletion mehr gemessen werden ($P = 0,3224$). In der Gruppe der Tumoren mit einer 6q15-Deletion war die Wahrscheinlichkeit eines Tumors mit einem schlechten Phänotyp lediglich 0,83 bis 1,07-fach höher als in den Tumoren mit einem normalen 6q15-Kopiezahlstatus (siehe Abbildung 4.5).

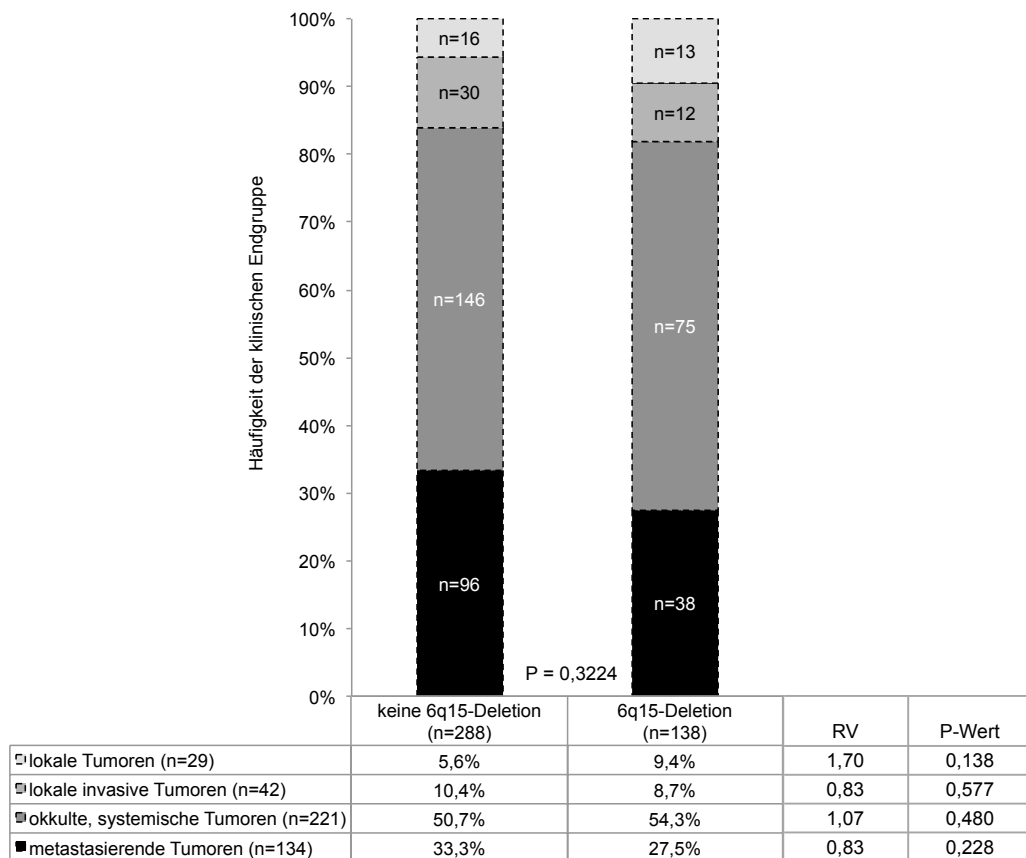


Abbildung 4.5: Assoziation des 6q15-Kopiezahlstatus mit der Verteilung klinisch-biologischer Endpunktgruppen in Tumoren mit einem hohen Gleason Score ($\geq 4 + 3$). RV: Risikoverhältnis (% 6q15-Deletion / % keine 6q15-Deletion). Angewendet wurde ein Chi-Quadrat-Test.

4.1.4 Assoziation der 6q15-Deletion mit häufigen genomischen Veränderungen des Prostatakarzinoms

4.1.4.1 Assoziation der 6q15-Deletion mit der *TMPRSS2:ERG* Fusion

Um die Assoziation des 6q15-Kopiezahlstatus mit der *TMPRSS2:ERG* Fusion zu untersuchen, wurden mittels IHC und FISH ermittelte Daten zum ERG-Expressionsstatus und *ERG*-Translokationsstatus aus einer vorherigen Studie des Instituts für Pathologie am UKE verwendet^[59,71]. Diese Daten wurden mittels eines Chi-Quadrat-Test mit den 6q15 FISH Analyse-Daten korreliert. Insgesamt waren für diese Analysen 5.683 (6q15/ERG IHC) und 4.814 (6q15/*ERG* FISH) Tumoren verfügbar. Beide Analysen zeigten eine klare Assoziation der 6q15-Deletion mit einem negativen bzw. normalen ERG-Status ($P < 0.0001$ für beide). Eine 6q15-Deletion konnte in 26,8 % (IHC) und 27,6 % (FISH) der ERG-negativen Tumoren nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu zeigten nur 11,3 % (IHC) und 12,0 % (FISH) der ERG-positiven Tumoren eine 6q15-Deletion. Demnach war der Anteil an 6q15-deletierten Tumoren in der Gruppe der ERG-negativen Tumoren um das 2,3-fache höher als in der

Gruppe der ERG-positiven Tumoren. Die Ergebnisse dieser Analysen sind in Abbildung 4.6 dargestellt.

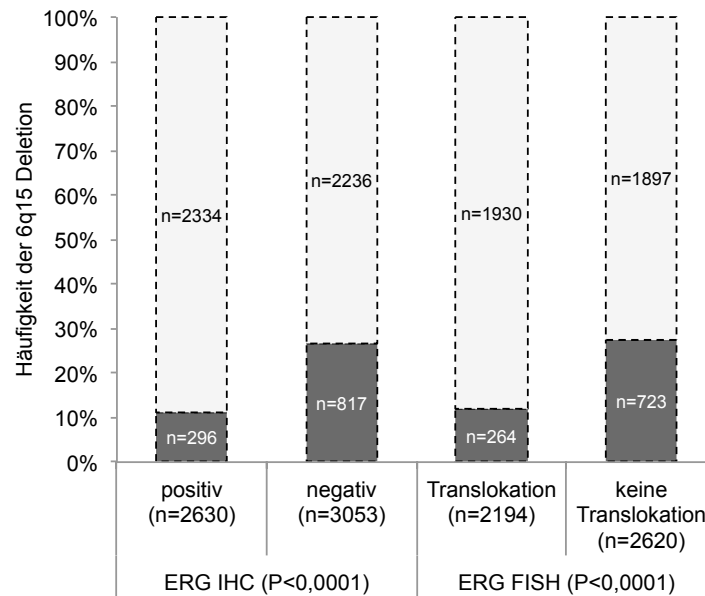


Abbildung 4.6: Assoziation der 6q15-Deletion mit der *TMPRSS2:ERG* Fusion. IHC: Immunohistochemie, FISH: Fluoreszenz in-situ Hybridisierung. Angewendet wurde ein Chi-Quadrat-Test.

4.1.4.2 Assoziation der 6q15-Deletion mit weiteren häufigen Deletionen des Prostatakarzinoms

Um die Assoziation der 6q15-Deletion mit weiteren häufigen Deletionen des Prostatakarzinoms zu untersuchen wurde die molekulare Datenbank des Instituts für Pathologie verwendet in der sich neben bereits publizierten Studiendaten auch bisher nicht veröffentlichte Daten befinden. Insgesamt konnte die Assoziation der 6q15-Deletion mit 15 weiteren Deletionsloci mittels Chi-Quadrat-Test untersucht werden. Eine signifikante Assoziation der 6q15-Deletion konnte zu 8 der untersuchten Deletion in den Bereichen 2q32.1, 2q23.2, 2q21.3, 5q21.1, 5q13.2, 13q14.11, 12p13.1 und 8p21.2 (alle $P < 0,0001$ außer 2q32.1 mit $P = 0,0028$) gefunden werden. Des Weiteren zeigte sich eine Assoziation zur 2p16.3 Deletion die auf Grund der geringen Fallzahl ($n = 960$) jedoch nicht signifikant war ($P = 0,0540$). Insgesamt war die Wahrscheinlichkeit einer 6q15-Deletion bei den Tumoren mit einer Deletion in einem dieser Genloci um das 1,4 bis 3,4-facher höher im Vergleich zu Tumoren die keine Deletion in einem der oben genannten Genloci aufwiesen. Eine besonders stark ausgeprägte Assoziation wurde zwischen der 6q15-Deletion und Deletionen im Bereich 2q32.1, 2q23.2, 2q21.3 und 5q21.1 gefunden. Hier zeigten die deletierten Tumoren mindestens 3-mal häufiger eine 6q15-Deletion als die nicht deletierten Tumoren. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Abbildung 4.7 dargestellt.

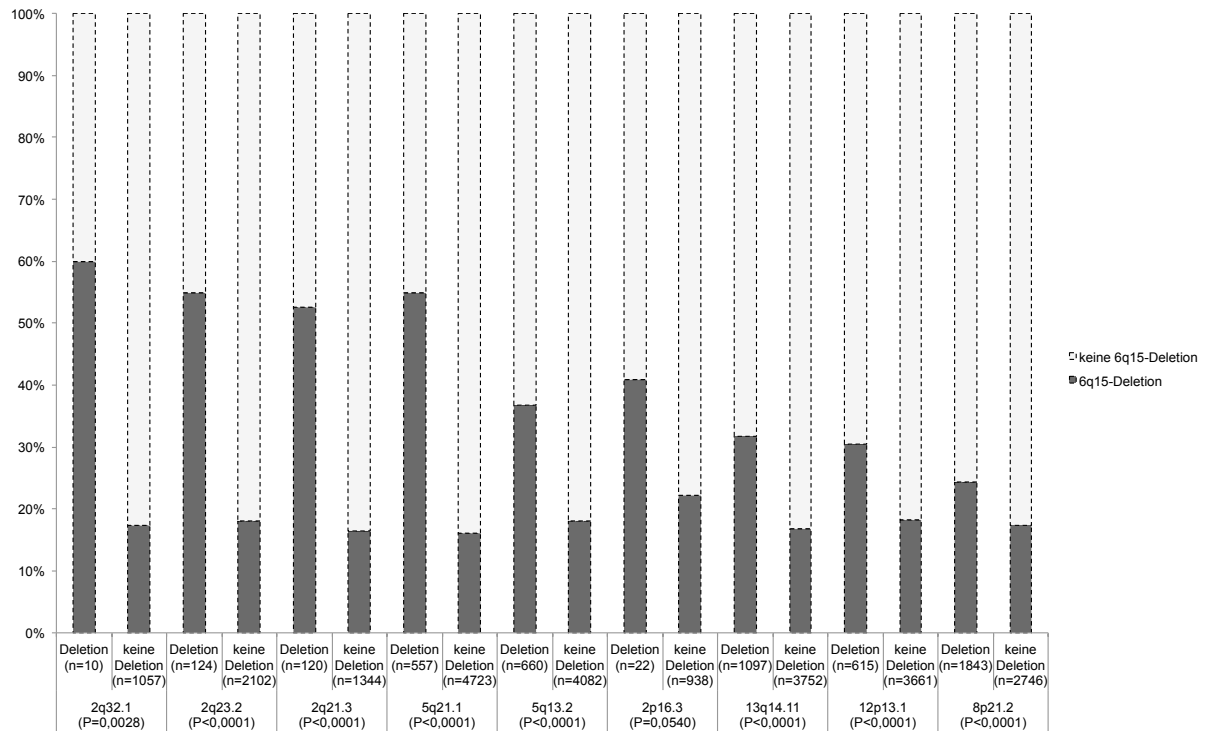


Abbildung 4.7: Assoziation der 6q15-Deletion mit weiteren häufigen Deletionen des Prostatakarzinoms. Dargestellt sind alle 9 Deletionsloci die eine Assoziation zur 6q15-Deletion aufwiesen. Angewendet wurde ein Chi-Quadrat-Test.

Keine Assoziation der 6q15-Deletion wurde zu 6 der untersuchten Deletionen in den Regionen 12q24.31, 18q21.31, 3p13, 16q24, 10q23.31 und 17p13.1 gefunden ($P \geq 0,0600$). In den Tumoren mit diesen Deletionen war die Rate der Tumoren die zusätzlich eine 6q15-Deletion aufwiesen nur um das 1,0 bis 1,4-fache höher als in den Tumoren ohne Deletion. In den Tumoren mit oder ohne Deletion von 16q24, 10q23.31 und 17p13.1 war die Rate der 6q15-deletierten Tumoren mit 1,0 bis 1,1 sogar nahezu identisch. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Abbildung 4.8 dargestellt.

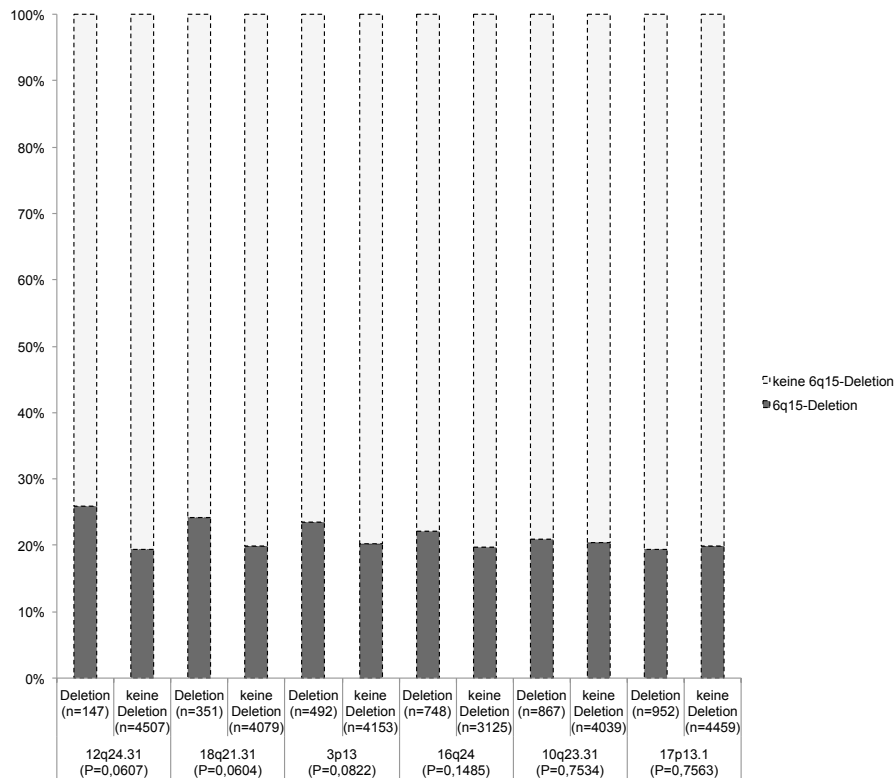


Abbildung 4.8: Assoziation der 6q15-Deletion mit weiteren häufigen Deletionen des Prostatakarzinoms. Dargestellt sind alle 6 Deletionsloci die keine Assoziation zur 6q15-Deletion aufwiesen. Angewendet wurde ein Chi-Quadrat-Test.

4.2 Untersuchungen der 6q-Deletionsgröße mittels FISH am Prognose-TMA

4.2.1 Auswertbarkeit der 6q FISH-Analyse

Um die Größe der 6q-Deletion in den einzelnen untersuchten Tumoren zu bestimmen, wurden 5 FISH-Sonden verwendet, die komplementär zu einem circa 300 Kb großen Bereich innerhalb der Regionen 6q12, 6q14.3, 6q15, 6q16.1 und 6q22.31 sind. Diese Sonden wurden an einem Subset aus 7.344 Tumoren des Prognose-TMAs an drei aufeinanderfolgend geschnittenen Präparaten analysiert. Jeweils die Regionen 6q12 und 6q22.31 sowie die Regionen 6q14.3 und 6q16.1 wurden gemeinsam mit einer Centromer 6 Sonde an einem TMA-Schnitt analysiert. Die Region 6q15 wurde an dem dritten Schnitt in Kombination mit einer Centromer 6 Sonde ausgewertet. Für die Bestimmung der 6q-Deletionsgröße konnten 3.725 Tumoren (50,7 %) verwendet werden, da bei diesen Tumoren alle fünf 6q-Regionen in der FISH auswertbar waren. Die verbleibenden 3.619 Spots mussten aus folgenden Gründen aus der Analyse ausgeschlossen werden: 826 (22,8 %) Gewebeproben zeigten nur wenig oder kein Tumorgewebe

in der H/E-Auswertung, bei 433 (12,0 %) Gewebeproben war in mindestens einem TMA-Schnitt kein oder nur sehr wenig Gewebe vorhanden und 2.360 (65,2 %) der Gewebeproben zeigten für mindestens eine der 6q-Region keine oder nur sehr schwache Fluoreszenz-Signale und daher eine unzureichenden FISH für die Analyse.

4.2.2 Prävalenz und Assoziation der unterschiedlichen 6q-Deletionsgrößen zum Tumorphänotyp

4.2.2.1 Prävalenz der unterschiedlichen 6q-Deletionsgrößen

Die 6q-deletierten Tumoren wurden entsprechend der Größe der 6q-Deletion in drei Gruppen eingeteilt. 1. Tumoren mit kleiner 6q14-q16-Deletion die eine Deletion in den Regionen 6q14, 6q15 und 6q16 und einem normalen Kopiezahlstatus für die Bereiche 6q12 und 6q22 aufwiesen, 2. Tumoren mit einer mittleren 6q14-q22-Deletion die eine Deletion in den Regionen 6q14, 6q15, 6q16 und 6q22 und einem normalen Kopiezahlstatus für den Bereich 6q12 aufwiesen und 3. Tumoren mit einer großen 6q12-q22-Deletion die eine Deletion in allen 5 untersuchten Regionen zeigten. Insgesamt konnte in 573 (15,4 %) der 3.725 auswertbaren Tumorgewebeproben eine dieser 6q-Deletionsgrößen mittels FISH nachgewiesen werden. Von den 6q-deletierten Tumoren wiesen 348 (60,7 %) eine kleine 6q-Deletion, 151 (26,5 %) eine mittlere 6q-Deletion und 74 (12,9 %) eine große 6q-Deletion auf. Alle nachgewiesenen Tumoren waren heterozygot. Homozygote 6q-Deletionen wurden in keiner der 5 untersuchten Regionen gefunden (siehe Abbildung 4.9 und Tabelle 4.8).

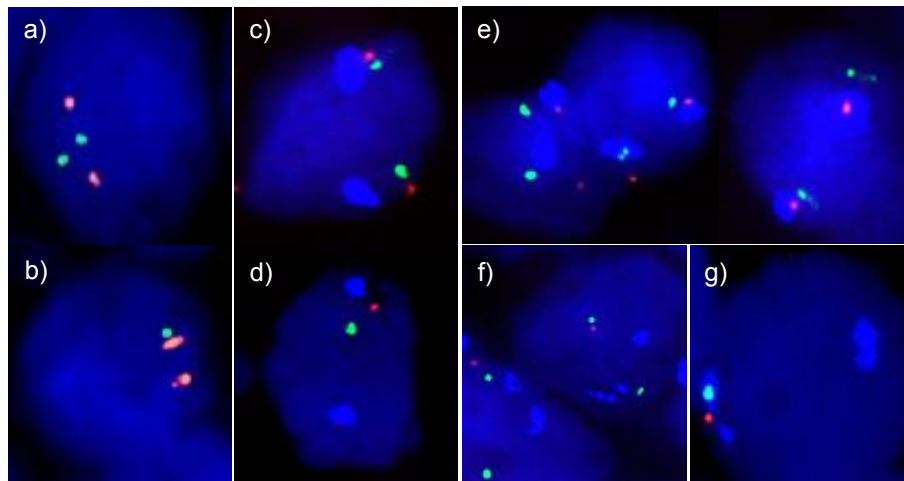


Abbildung 4.9: Beispiele der mikroskopischen 6q-FISH Auswertung. a) Normaler 6q15-Kopiezahlstatus mit zwei grünen 6q15-Signalen und zwei orangen Centromer 6-Signalen, b) Heterozygote 6q15-Deletion mit einem grünen 6q15-Signal (Verlust eines 6q15-Allels) und zwei orangen Centromer 6-Signalen, c) Normaler 6q14- und 6q16-Kopiezahlstatus mit zwei orangen 6q14-Signalen, zwei grünen 6q16-Signalen und zwei blauen Centromer 6-Signalen, d) Heterozygote 6q14- und 6q16-Deletion mit einem orangen 6q14-Signal und einem grünen 6q16-Signal und zwei blauen Centromer 6-Signalen, e) Normaler 6q12- und 6q22-Kopiezahlstatus mit zwei orangen 6q12-Signalen, zwei grünen 6q22-Signalen und zwei blauen Centromer 6-Signalen, f) Heterozygote 6q22-Deletion mit einem grünen 6q22-Signal und zwei orangen 6q12-Signalen sowie zwei blauen Centromer 6-Signalen und g) Heterozygote 6q12- und 6q22-Deletion mit einem orangen 6q12-Signal, einem grünen 6q22-Signal und zwei blauen Centromer 6-Signalen.

4.2.2.2 Assoziation der unterschiedlichen 6q-Deletionsgrößen mit den klinisch-pathologischen Parametern des Prostatakarzinoms

Zur Bestimmung eines möglichen Zusammenhangs der 6q-Deletionsgröße mit dem Tumorphänotyp, wurden die 6q-deletierten Tumoren für die eine Größe der 6q-Deletion bestimmt werden konnte, mittels eines Chi-Quadrat-Tests mit den klinisch-pathologischen Parametern des Prostatakarzinoms assoziiert. Diese Analyse zeigte keine Unterschiede zwischen den drei 6q-Deletionsgrößen und der Assoziation zu einem schlechten Tumorphänotyp ($P \geq 0,4000$), die bereits unter Punkt 4.1.2.2 für die 6q15-Deletion nachgewiesen werden konnte. Es wurde lediglich eine tendenziell steigende Häufigkeit der mittleren 6q14-q22-Deletion und großen 6q12-q22-Deletion mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium (6q14-q22: 24,0 %-27,6 %, 6q12-q22: 12,5 %-16,3 %) und einem hohen Gleason Score (6q14-q22: 25,6 %-26,2 %, 6q12-q22: 13,3 %-14,3 %) festgestellt werden. Eine detaillierte Darstellung der Ergebnisse ist in Tabelle 4.8 vorhanden.

Tabelle 4.8: Assoziation der 6q-Deletionsgröße mit den klinisch-pathologischen Parametern des Prostatakarzinoms in allen 6q-deletierten Tumoren. N0: keine Metastasen in den Lymphknoten, N+: Metastasen in den Lymphknoten, PSA: Prostata-spezifisches Antigen, negativ: kein Tumor im Resektionsrand des Prostatektomiepräparates, positiv: Tumor im Resektionsrand des Prostatektomiepräparates. Angewendet wurde ein Chi-Quadrat-Test.

	analysierbar	6q14-q16 Deletion n (%)	6q14-q22 Deletion n (%)	6q12-q22 Deletion n (%)	<i>P</i> -Wert
	n				
alle Tumoren	573	348 (60,7)	151 (26,4)	74 (12,9)	
Tumorstadium					
pT2	321	204 (63,6)	77 (24,0)	40 (12,5)	0,4041
pT3a	151	89 (58,9)	46 (30,5)	16 (10,6)	
pT3b-pT4	98	55 (56,1)	27 (27,6)	16 (16,3)	
Gleason Score					
$\leq 3 + 3$	90	55 (61,1)	23 (25,6)	12 (13,3)	0,9887
$3 + 4$	291	179 (61,5)	79 (27,1)	33 (11,3)	
$4 + 3$	143	87 (60,8)	36 (25,2)	20 (14,0)	
$\geq 4 + 4$	42	25 (59,5)	11 (26,2)	6 (14,3)	
Lymphknotenstatus					
N0	347	215 (62,0)	90 (25,9)	42 (12,1)	0,9445
N+	35	21 (60,0)	10 (28,6)	4 (11,4)	
PSA-Wert (ng/μl)					
< 4	52	32 (61,5)	15 (28,9)	5 (9,6)	0,8464
$4 - 10$	325	204 (62,8)	79 (24,3)	42 (12,9)	
$10 - 20$	149	86 (57,7)	42 (28,2)	21 (14,1)	
> 20	41	24 (58,5)	13 (31,8)	4 (9,8)	
Status des Resektionsrandes					
negativ	442	272 (61,5)	116 (26,2)	54 (12,2)	0,8526
positiv	120	72 (60,0)	31 (25,8)	17 (14,2)	

4.2.2.3 Assoziation der unterschiedlichen 6q-Deletionsgrößen mit der Zellproliferation (Ki67 Labeling Index)

Zur Bestimmung eines möglichen Einflusses der 6q-Deletionsgröße auf die Zellproliferation wurde der immunohistochemisch ermittelte Ki67 Labeling Index (Ki67LI) aus der molekularen Datenbank des Instituts für Pathologie^[139] mittels einer einfaktoriellen ANOVA mit den Ergebnissen der 6q FISH-Analyse korreliert. Diese Analyse wurden in allen Tumoren, der Untergruppe der ERG-negativen und ERG-positiven Tumoren sowie in den Untergruppen der Tumoren mit einem Gleason Score $\leq 3 + 3 = 6$, $3 + 4 = 7$, $4 + 3 = 7$ und $\geq 4 + 4 = 8$ durchgeführt. Die Größe der 6q-Deletion war signifikant assoziiert mit der Proliferation der Tumorzellen in allen Tumoren ($P < 0,0001$). Je größer die 6q-Deletion in den Tumoren war, desto höher war der Ki67LI. Diese Assoziation war unabhängig vom ERG-Status und dem Gleason Score, da in fast allen Untergruppen ebenfalls eine steigende 6q-Deletionsgröße mit einem erhöhten Ki67LI assoziiert war ($P \leq 0,0350$). Eine Ausnahme stellten die Untergruppe der Tumoren mit einem Gleason Score $4 + 3$ und $\geq 4 + 4$ in der vermutlich auf Grund der geringen Fallzahl ($n = 371$ und 106) lediglich eine Tendenz zu einer gesteigerten Zellproliferation ermittelt werden konnte ($P = 0,0621$ und $P = 0,6603$). Die Ergebnisse der Analysen sind detailliert in Tabelle 4.9 dargestellt.

Tabelle 4.9: Assoziation der 6q-Deletionsgröße mit der Proliferation der Prostatatumorzellen gemessen am Ki67 Labeling Index (Ki67LI). MW: Mittelwert, SDF: Standardfehler. Angewendet wurde eine einfaktorielle ANOVA.

	Anzahl	MW Ki67 LI	SDF	<i>P</i> -Wert
alle Tumoren				
keine Deletion	2208	2,70	0,05	< 0,0001
6q14-q16 Deletion	282	3,20	0,15	
6q14-q22 Deletion	118	3,86	0,23	
6q12-q22 Deletion	60	3,58	0,32	
ERG-negative Tumoren				
keine Deletion	979	2,58	0,08	< 0,0001
6q14-q16 Deletion	189	3,23	0,19	
6q14-q22 Deletion	86	3,55	0,29	
6q12-q22 Deletion	50	3,90	0,38	
ERG-positive Tumoren				
keine Deletion	1185	2,83	0,07	0,0014
6q14-q16 Deletion	85	3,02	0,25	
6q14-q22 Deletion	30	4,40	0,42	
6q12-q22 Deletion	9	1,89	0,76	
Gleason Score $\leq 3 + 3$				
keine Deletion	694	2,26	0,08	0,0003
6q14-q16 Deletion	47	3,49	0,31	
6q14-q22 Deletion	18	3,44	0,51	
6q12-q22 Deletion	11	2,73	0,65	
Gleason Score $3 + 4$				
keine Deletion	1161	2,73	0,07	0,0313
6q14-q16 Deletion	148	2,78	0,18	
6q14-q22 Deletion	65	3,55	0,28	
6q12-q22 Deletion	27	3,07	0,43	
Gleason Score $4 + 3$				
keine Deletion	264	3,33	0,20	0,0621
6q14-q16 Deletion	66	3,52	0,39	
6q14-q22 Deletion	26	4,23	0,63	
6q12-q22 Deletion	15	5,40	0,82	
Gleason Score $\geq 4 + 4$				
keine Deletion	75	4,45	0,44	0,6603
6q14-q16 Deletion	20	4,50	0,85	
6q14-q22 Deletion	7	6,29	1,43	
6q12-q22 Deletion	4	4,00	1,90	

4.2.3 Assoziation der unterschiedlichen 6q-Deletionsgrößen mit der Prognose des Patienten beim Prostatakarzinom

4.2.3.1 Assoziation der unterschiedlichen 6q-Deletionsgrößen mit dem Auftreten eines PSA-Rezidivs

Zur Bestimmung der prognostischen Relevanz der 6q-Deletionsgröße wurde in einer Univariaten-Analyse der Status der 6q-Deletionsgröße mit der Wahrscheinlichkeit eines PSA-Rezidivs in einem Log-Rank-Test assoziiert und in einer Kaplan-Meier-Kurve dargestellt. Für die Analyse wurden alle Patienten verwendet, für die postoperative Verlaufsdaten vorhanden waren. Insgesamt wurden drei Analysen durchgeführt, die erste in allen Tumoren, die zweite in den Untergruppen der ERG-negativen und ERG-positiven Tumoren und die dritte in den Untergruppen der Tumoren mit einem geringen Gleason Score ($\leq 3 + 4$) und einem hohem Gleason Score ($\geq 4 + 3$). In der Analyse aller Tumoren war die 6q-Deletionsgröße stark mit der erhöhten Wahrscheinlichkeit eines PSA-Rezidivs und damit einer schlechten Prognose für den Patienten in 3.455 analysierbaren Patienten assoziiert ($P < 0,0001$, siehe Abbildung 4.10a). Dabei war für Patienten deren Tumoren eine große 6q12-q22 Deletion aufwiesen die Prognose wesentlich schlechter im Vergleich zu den Patienten mit Tumoren die eine mittlere 6q14-q22 oder kleine 6q14-q16 Deletion hatten. Dieser Unterschied war jedoch nur zwischen der großen und der kleinen 6q-Deletion statistisch signifikant ($P = 0,0362$). Obwohl das Vorhandensein einer kleinen 6q-Deletion eine deutlich geringer Assoziation zum PSA-Rezidiv aufwies, war die Prognose für die Patienten mit dieser 6q-Deletionsgröße immer noch signifikant schlechter als für Patienten deren Tumoren keine 6q-Deletion hatten ($P = 0,0004$). Diese Assoziation konnte außerdem in der Untergruppe der ERG-negativen Tumoren gezeigt werden ($P < 0,0001$, siehe Abbildung 4.10b), während in den ERG-positiven Tumoren keine relevanten Unterschiede in der Assoziation zum PSA-Rezidiv zwischen den drei 6q-Deletionsgrößen mehr vorhanden war ($P = 0,1156$, siehe Abbildung 4.10c). Die Einteilung in Tumoren mit einem geringen und einem hohen Gleason Score zeigte deutlich, dass die Assoziation der 6q-Deletionsgröße zu dem Auftreten eines PSA-Rezidivs durch die Tumoren mit einem geringen Gleason Score bedingt war ($n = 2.801$, $P = 0,0113$, siehe Abbildung 4.10d). In den 648 Tumoren mit einem hohem Gleason Score konnten kein relevanten Unterschiede bezüglich des Zusammenhanges mit dem PSA-Rezidivs zwischen den drei 6q-Deletionsgrößen mehr gemessen werden ($P = 0,4773$, siehe Abbildung 4.10e).

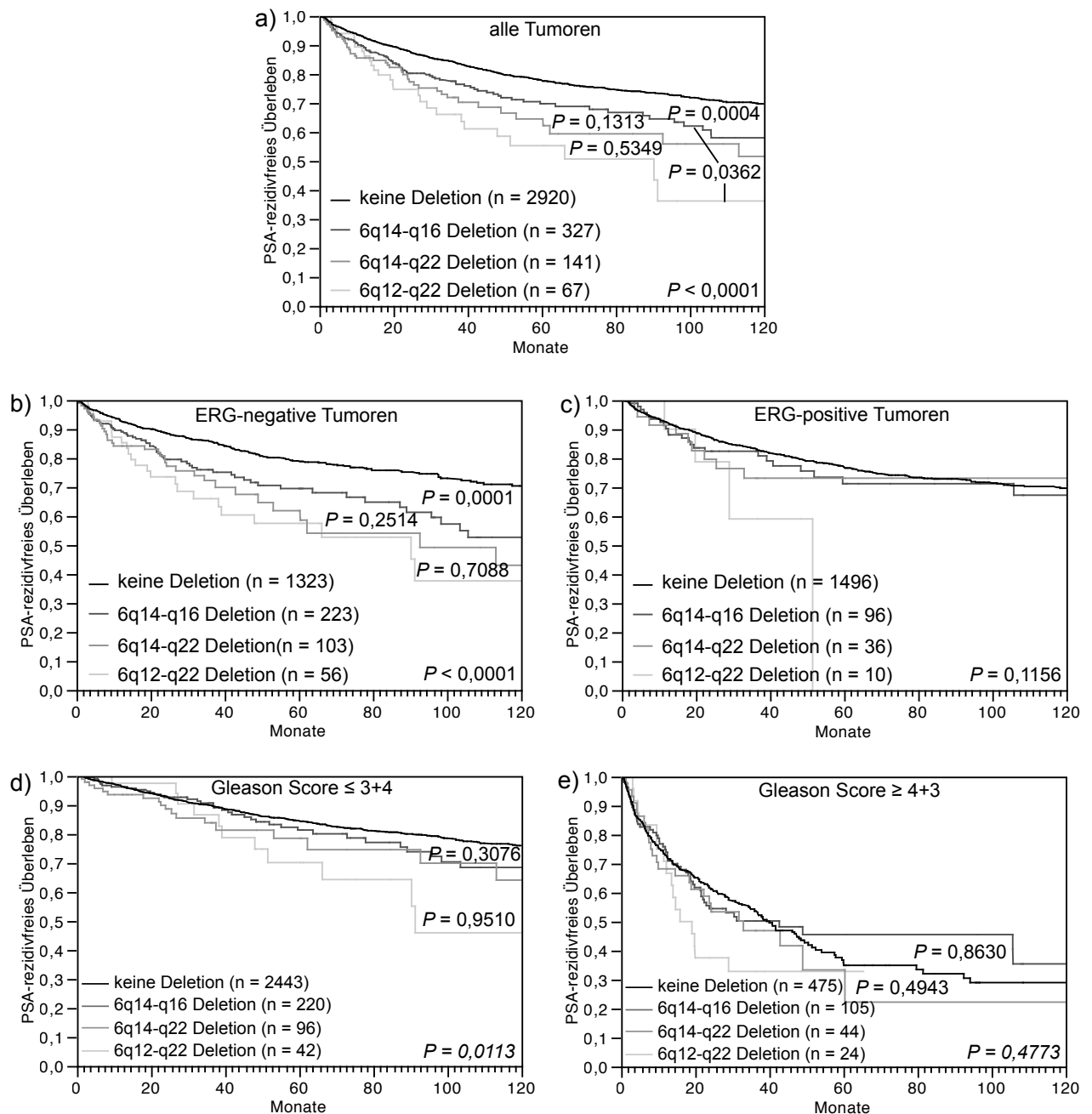


Abbildung 4.10: Assoziation der 6q-Deletionsgröße mit der Wahrscheinlichkeit eines PSA-Rezidivs in a) allen Tumoren, b) ERG-negativen Tumoren, c) ERG-positiven Tumoren, d) Tumoren mit einem geringem Gleason Score ($\leq 3 + 4$) und e) Tumoren mit einem hohen Gleason Score ($\geq 4 + 3$). Durchgeführt wurde ein Log-Rank-Test.

Um zu untersuchen, ob die Assoziation der 6q-Deletionsgröße mit dem Auftreten des PSA-Rezidiv unabhängig von den etablierten prognostischen Parametern war, wurde eine Cox-proportionalen Hazard Analyse durchgeführt in der neben dem Status der 6q-Deletionsgröße das Tumorstadium, der Gleason Score, der präoperative PSA-Wert, das Vorhandensein von Metastasen in den Lymphknoten und der Tumorbefall des Resektionsrandes berücksichtigt wurden. Diese Analyse zeigte, dass die prognostische Aussagekraft der 6q-Deletionsgröße zur Vorhersage eines PSA-Rezidivs unabhängig von den klinisch-pathologischen Prognose-

parametern war ($P = 0,0130$). Dabei stieg die Wahrscheinlichkeit eines PSA-Rezidivs mit der Deletionsgröße an. So war zum Beispiel das Risiko eines Rezidivs bei Vorliegen einer großen 6q12-q22-Deletion um das 1,5-fache höher als bei einer mittleren 6q14-q22-Deletion. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Tabelle 4.10 zusammengefasst.

Tabelle 4.10: Cox-proportionalen Hazard Analyse zur Bestimmung der prognostischen Aussagekraft der 6q-Deletionsgröße im Vergleich zu den etablierten Prognoseparametern in allen Prostatatumoren. RV: Risiko-Verhältnis, KI: Konfidenzintervall.

	RV	95 % KI	P-Wert
Tumorstadium			
pT3a vs pT2	1,9	1,5-2,4	< 0,0001
pT3b vs pT3a	1,4	1,1-1,7	
pT4 vs pT3b	2,2	1,4-3,3	
Gleason Score			
3 + 4 vs $\leq 3 + 3$	2,0	1,5-2,8	< 0,0001
4 + 3 vs 3 + 4	2,2	1,8-2,7	
$\geq 4 + 4$ vs 4 + 3	1,0	0,8-1,3	
Lymphknotenstatus			
pN+ vs pN0	1,9	1,5-2,4	< 0,0001
PSA-Wert ($\text{ng}/\mu\text{l}$)			
4 – 10 vs < 4	0,9	0,7-1,3	< 0,0001
10 – 20 vs 4 – 10	1,3	1,0-1,5	
> 20 vs 10 – 20	1,5	1,2-1,9	
Status des Resektionsrandes			
positiv vs negativ	1,4	1,2-1,7	0,0002
Deletionsstatus			
6q14-q16 Deletion vs keine Deletion	1,1	0,9-1,4	0,0130
6q14-q22 Deletion vs 6q14-q16 Deletion	1,2	0,8-1,8	
6q12-q22 Deletion vs 6q14-q22 Deletion	1,5	0,8-2,5	

4.2.3.2 Assoziation der 6q-Deletionsgröße mit biologisch-klinischen Endpunktgruppen

Zur Bestimmung der prognostischen Relevanz der 6q-Deletionsgröße im Bezug auf die wesentlichen biologischen und klinischen Charakteristika des Prostatakarzinoms wurde der Status der 6q-Deletionsgröße mittels eines Chi-Quadrat-Tests mit vier klinisch-biologischen Endpunktgruppen assoziiert. Für diese Analyse standen 1.360 Patienten zur Verfügung für die sowohl die Größe der 6q-Deletion in den Tumorzellen als auch eine Endpunktgruppe vorlag. Die Größe der 6q-Deletion zeigte eine starke signifikante Assoziation zur Verteilung der vier

Endpunktgruppen bei der Analyse aller Tumoren ($P < 0,0001$). Je größer die 6q-Deletion in den Tumorzellen war, desto höher war tendenziell das Risiko eines okkult systemischen Tumors oder eines metastasierenden Tumors. Demgegenüber lag die Wahrscheinlichkeit von lokalen Tumoren bei den Tumoren ohne 6q-Deletion bei über 50 %, während bei Tumoren mit einer 6q-Deletion je nach Größe der Deletion die Wahrscheinlichkeit für lokale Tumoren nur bei 27 % bis 38 % lag. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Abbildung 4.11 dargestellt.

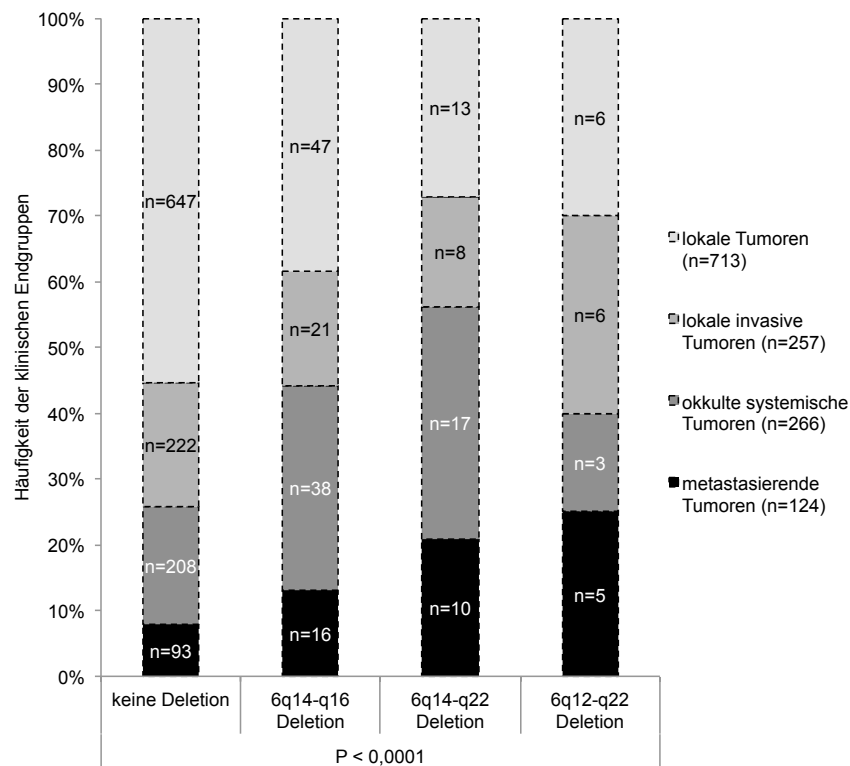


Abbildung 4.11: Assoziation der 6q-Deletionsgröße mit der Verteilung klinisch-biologischer Endpunktgruppen in allen Prostatatumoren. Angewendet wurde ein Chi-Quadrat-Test.

4.2.4 Assoziation der 6q-Deletionsgröße mit der *TMPRSS2:ERG* Fusion

Um die Assoziation der 6q-Deletionsgröße mit der *TMPRSS2:ERG* Fusion zu untersuchen, wurden mittels IHC und FISH ermittelte Daten zum ERG-Expressionsstatus und *ERG*-Translokationsstatus aus einer vorherigen Studie des Instituts für Pathologie am UKE verwendet^[59,71]. Diese Daten wurden mittels eines Chi-Quadrat-Test mit den FISH Analyse-Daten zur Bestimmung der 6q-Deletionsgröße korreliert. Insgesamt waren für diese Analysen 3.599 (6q/ERG IHC) und 2.763 (6q/*ERG* FISH) verfügbar. Beide Analysen zeigten eine klare Assoziation der 6q-Deletion mit einem negativen bzw. normalen ERG-Status unabhängig

von der 6q-Deletionsgröße ($P < 0,0001$ für beide). Allerdings stieg die Wahrscheinlichkeit einer 6q-Deletion in den ERG-negativen Tumoren mit der Ausdehnung der Deletion an. Die 6q14-q16-Deletion war 2,3- bzw. 2,2-fach häufiger, die 6q14-q22-Deletion war 2,9 mal häufiger und die 6q12-q22-Deletion 5,8- bzw. 4,7-fach häufiger in den ERG-negativen Tumoren im Vergleich zu den ERG-positiven Tumoren vorhanden. Die Ergebnisse dieser Analysen sind in Abbildung 4.12 dargestellt.

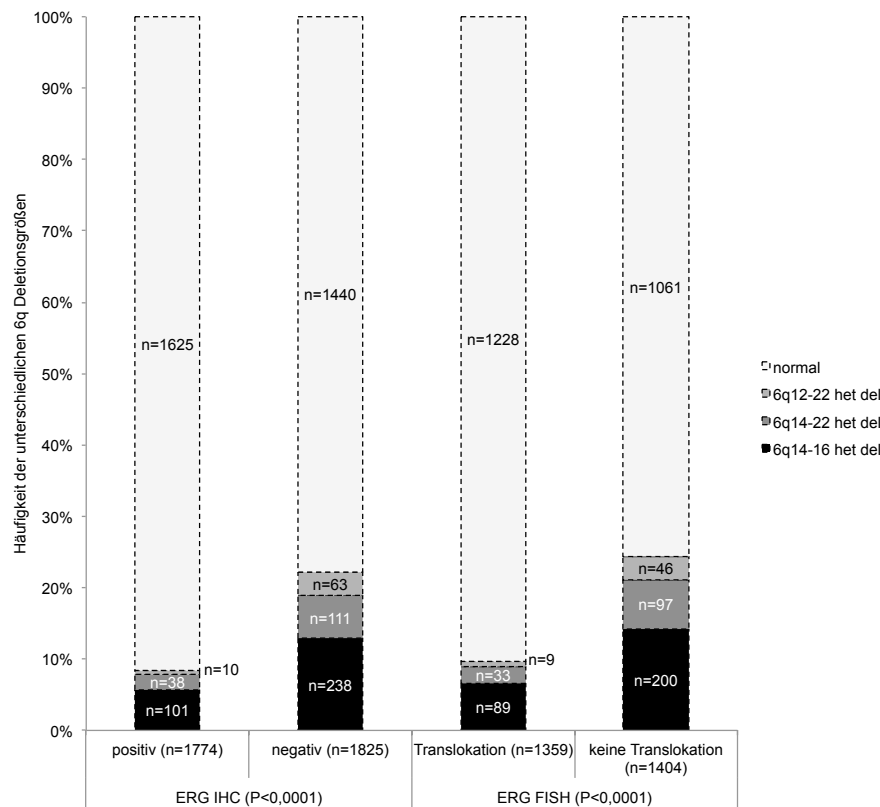


Abbildung 4.12: Assoziation der 6q-Deletionsgröße mit der *TMPRSS2:ERG* Fusion. IHC: Immunohistochemie, FISH: Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung. Angewendet wurde ein Chi-Quadrat-Test.

4.3 Untersuchungen des 6q15 (*MAP3K7*) Locus mittels FISH am multifokalen Heterogenitäts-TMA

4.3.1 Auswertbarkeit der 6q15-Heterogenitätsanalyse mittels FISH

Insgesamt konnte für 924 (48,9 %) der 1.890 untersuchten Gewebeproben unter der Verwendung der 6q15 (*MAP3K7*)-Sonde der 6q15-Kopiezahlstatus mittels FISH bestimmt werden. Die verbleibenden 966 Gewebespots mussten auf Grund von fehlendem Tumorgewebe in der H/E-Auswertung, fehlendem Gewebe in der 6q15-FISH-Analyse oder keinen bzw. nur sehr schwachen 6q15-Signalen aus der Analyse ausgeschlossen werden. Für 140 der 189 Patien-

ten konnte in mindestens drei der zehn TMA-Stanzen der 6q15-Kopiezahlstatus bestimmt werden. Von diesen Patienten hatten 133 Patienten mindestens einen Tumorfokus für den mindestens 3 TMA-Stanzen in der FISH-Analyse auswertbar waren. Insgesamt konnten so 138 Tumorfoki in die Heterogenitätsanalyse aufgenommen werden (siehe Tabelle 4.11). Eine detaillierte Beschreibung des multifokalen Heterogenitäts-TMA ist unter Punkt 2.3 zu finden.

4.3.2 Heterogenität der 6q15-Deletion

Eine 6q15-Deletion in mindestens einer Gewebestanze konnte in 36 (25,7 %) von 140 Patienten nachgewiesen werden. Von diesen Patienten hatten 15 Patienten eine homogene 6q15-Deletion in den Tumورproben. Dies bedeutet, dass die 6q15-Deletion in allen analysierbaren Tumорproben nachweisbar war. Bei 21 Patienten war die 6q15-Deletion nicht in allen Tumорproben nachweisbar. Dementsprechend zeigten diese Patienten eine heterogene Verteilung der 6q15-Deletion. Um eine interfokale Heterogenität der 6q15-Deletion auszuschließen, wurde die Verteilung der 6q15-Deletion in den einzelnen Tumorfoki unabhängig von den Patienten betrachtet. In dieser Analyse hatten 34 (24,6 %) der 138 Tumorfoki eine 6q15-Deletion in mindestens einer Tumorgewebeprobe. Bei 16 Tumorfoki war die 6q15-Deletion in allen Gewebeproben nachweisbar. In den restlichen 18 Tumorfoki war die 6q15-Deletion heterogen. Dementsprechend war der Anteil an Tumorfoki mit einer homogenen (47,1 %) und einer heterogenen (52,9 %) Verteilung der 6q15-Deletion nahezu identisch. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Tabelle 4.11 und Abbildung 4.13 dargestellt.

Tabelle 4.11: Prävalenz der 6q15-Deletion in der Heterogenitätsanalyse auf der Ebene der einzelnen analysierten Gewebeproben, der Patienten mit mindestens drei auswertbaren Tumорproben und der Tumorfoki mit mindestens drei bewertbaren Gewebeproben.

	keine 6q15-Deletion n (%)	6q15-Deletion n (%)
Gewebespts		
<i>n</i> = 924	759 (82,1)	165 (17,8)
Patienten		
<i>n</i> = 140	104 (74,3)	36 (25,7)
Tumorfoki		
<i>n</i> = 138	104 (75,4)	34 (24,6)

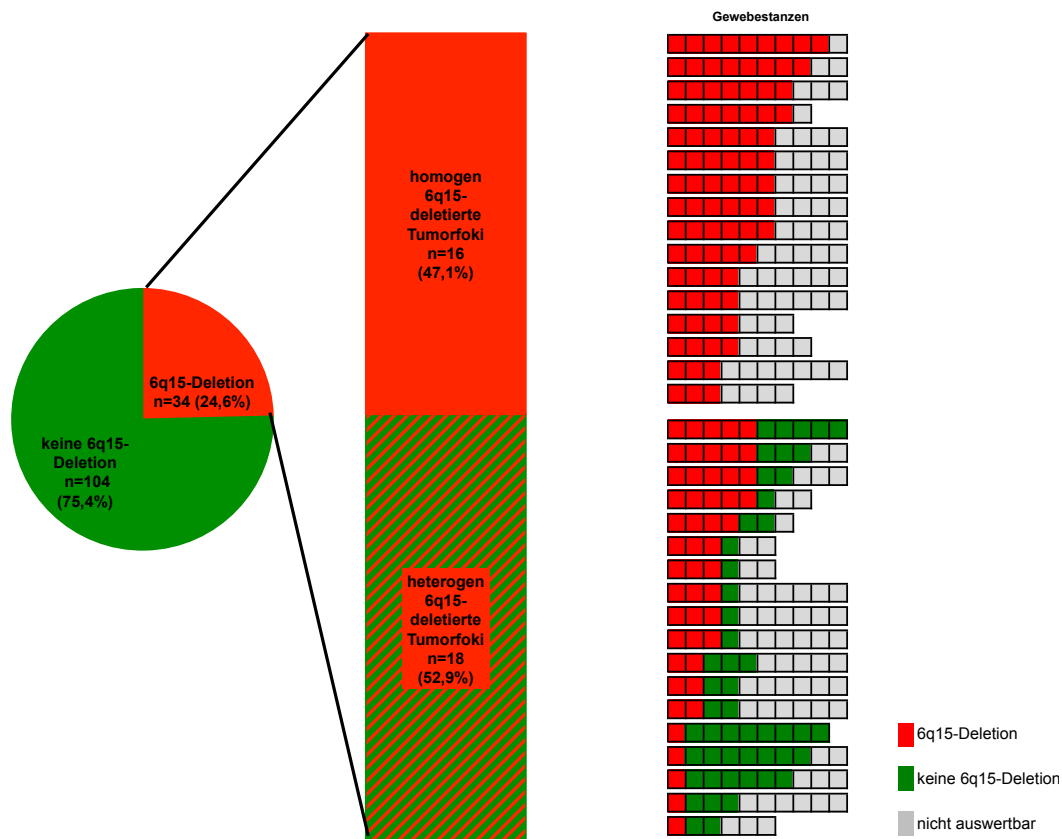


Abbildung 4.13: Heterogenität der 6q15-Deletion in den 34 6q15-deletierten Tumorfoki. Dargestellt sind alle Tumorfoki die eine 6q15-Deletion aufwiesen und für die mindestens 3 Gewebeprobe in der FISH-Analyse bewertbar waren.

4.3.3 Chronology der Entstehung einer 6q15-Deletion und der *TMPRSS2:ERG* Fusion

Um zu testen, ob der inverse Zusammenhang der 6q15-Deletion und der *TMPRSS2:ERG* Fusion darauf beruht, dass eine dieser Veränderungen innerhalb der Tumorphysion vor der anderen entsteht und so eventuell sogar die Entwicklung der anderen Veränderung verhindert, wurden die Daten der 6q15-Heterogenitätsanalyse mit den immunohistochemischen ERG-Daten aus einer vorherigen Studie des Instituts für Pathologie korreliert^[52]. Von den 138 6q15 analysierbaren Tumorfoki wiesen 42 einen homogen positiven ERG-Status, 38 einen heterogen positiven ERG-Status und 56 einen negativen ERG-Status auf. Um die chronologische Abfolge der 6q15-Deletion und der *TMPRSS2:ERG* Fusion zu bestimmen, wurden die homogen ERG-positiven Tumoren nach fokalen 6q15-Deletion untersucht und die homogen 6q15-deletierten Tumoren nach fokalen ERG-positiven Regionen. Diese Analyse zeigte, dass in keinem der 16 homogen 6q15-deletierten Tumorfoki eine kleine fokale ERG-positive Region vorhanden war, während in 6 der 42 homogen ERG-positiven Tumorfoki ein kleiner fokaler Bereich eine 6q15-Deletion aufwies ($P=0,1296$, siehe Abbildung 4.14). Zusätzlich

zur TMA-Analyse wurden drei Fälle der homogen ERG-positiven Tumorfoki die eine fokale 6q15-Deletion zeigten in einer Großflächenanalyse untersucht und so die Ergebnisse der TMA-Analyse validiert.

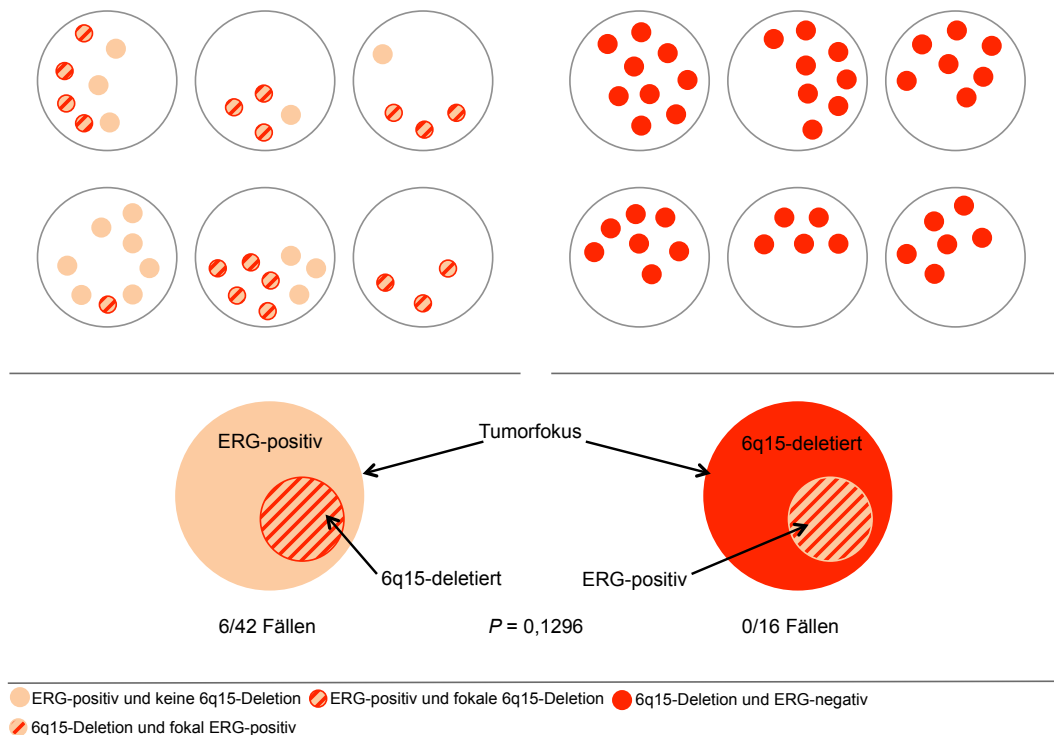


Abbildung 4.14: Chronologische Abfolge der Entstehung einer 6q15-Deletion und einer *TMPS2:ERG* Fusion. Dargestellt sind exemplarisch jeweils 6 Tumorfoki die eine homogene 6q15-Deletion oder eine homogene ERG-Positivität aufwiesen.

4.4 Untersuchungen zur 6q-Deletionsgröße mittels FISH am unifokalen Heterogenitäts-TMA

4.4.1 Auswertbarkeit der 6q-FISH-Analyse und Prävalenz der 6q-Deletion

Die Bestimmung der 6q-Deletionsgröße in den Tumoren wurde, wie zuvor bei der FISH-Analyse des Prognose-TMAs beschrieben, durchgeführt (siehe Punkt 4.2.1). Eine detaillierte Beschreibung des unifokalen Heterogenitäts-TMAs ist unter Punkt 2.3 vorhanden.

In die Analyse wurden alle Patienten aufgenommen, bei denen mindestens 3 der 10 Tumorstanzien für alle 5 Regionen auf dem Chromosomarm 6q in der FISH-Analyse auswertbar waren. Insgesamt konnte für 208 der 317 Patienten der 6q-Kopiezahlstatus bewertet werden. Bei 100 (48,1 %) dieser Patienten konnte in mindestens einer der analysierbaren Tumorstanzien eine 6q-Deletion unabhängig von der Größe der Deletion festgestellt werden. Bei 108 der

Patienten (51,9 %) wurde in keiner der bewertbaren Tumorstanzen eine 6q-Deletion in einer der fünf untersuchten Regionen nachgewiesen.

4.4.2 Ausdehnung der 6q-Deletion während der Tumorprogression

Um zu untersuchen, ob die 6q-Deletion während der Tumorprogression „wächst“, oder ob die unterschiedlichen 6q-Deletionsgrößen *de novo* entstehen, wurden alle Patienten verwendet, die in mindestens 3 von ≥ 5 auswertbaren Tumorstanzen eine 6q-Deletion aufwiesen. Insgesamt konnten für diese Analyse 51 Patienten verwendet werden. Bei 21 (41,2 %) Patienten war die nachgewiesene 6q-Deletionsgröße in allen Tumorstanzen identisch. Bei den restlichen 30 (58,8 %) Patienten konnten unterschiedliche 6q-Deletionsgrößen in den verschiedenen Tumorstanzen detektiert werden. Auffällig war das in der Gruppe der Tumoren mit einer konstanten 6q-Deletionsgröße fast die Hälfte aller Tumoren in allen auswertbaren Stanzen eine 6q-Deletion aufwiesen. Im Gegensatz dazu zeigten 70 % der Tumoren mit unterschiedlichen 6q-Deletionsgrößen eine heterogene Verteilung der 6q-Deletion. Dieser Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant ($P = 0,3440$, siehe Tabelle 4.12).

Tabelle 4.12: Auftreten und Verteilung der 6q-Deletionsgrößen in der Heterogenitätsanalyse. Homogen: alle auswertbaren Stanzen hatten eine 6q-Deletion, heterogen: nicht alle analysierbaren Stanzen wiesen eine 6q-Deletion auf. Deletionsgröße: angegeben ist die maximal gemessene Ausdehnung der 6q-Deletion.

Deletionsgröße	6q-deletierte Tumoren n (%)	heterogen 6q-deletiert n	homogen 6q-deletiert n	P-Wert
konstant ($n = 21$)				
6q14-6q16	10 (47,6)	8	2	
6q14-q22	9 (42,9)	4	5	
6q12-q22	2 (9,5)	0	2	
wachsend ($n = 30$)				
6q14-6q16	5 (16,7)	4	1	
6q14-q22	11 (36,7)	8	3	
6q12-q22	14 (46,7)	9	5	
konstant vs wachsend				0,3440

In der Gruppe der Tumoren mit einer konstanten 6q-Deletionsgröße lag in 52,4 % der Fälle eine mittlere (6q14-q22) oder eine große (6q12-q22) 6q-Deletion vor und in 38,1 % der Fälle war die Deletion auf die Region 6q14-q16 oder kleiner beschränkt. In 2 Fällen konnte eine Deletion nachgewiesen werden, die auf den Bereich 6q22 beschränkt war (siehe Abbildung 4.15).



Abbildung 4.15: Tumoren mit einer konstanten 6q-Deletionsgröße in allen 6q-deletierten Tumorstanzen. Die orangen Balken markieren die Ausdehnung der 6q-Deletion in den einzelnen Tumorstanzen.

In der Gruppe der Tumoren mit unterschiedlich großen 6q-Deletionen konnte in 23 (76,7 %) Fällen in mindestens einer deletierten Tumorstanze eine kleine 6q-Deletion nachgewiesen werden. Hier konnte für 9 Tumoren eine Deletion in der Region 6q15 und für 14 Tumoren eine Deletion in den Regionen 6q14, 6q15 und 6q16 nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass die Region 6q15 Ursprungsort der 6q-Deletion ist (siehe Abbildung 4.16).



Abbildung 4.16: Tumoren mit unterschiedlichen 6q-Deletionsgrößen in den 6q-deletierten Tumorstanzen. Die orangen Balken markieren die Ausdehnung der 6q-Deletion in den einzelnen Tumorstanzen.

Auf Grund des hohen Anteils an Tumoren mit einer homogenen Verteilung der 6q-Deletion in der Gruppe der Tumoren mit einer einheitlichen 6q-Deletionsgröße wurden je zwei Fälle mit einer konstanten und einer sich ausdehnenden 6q-Deletionsgröße in einer Großflächenanalyse validiert. Diese Analyse zeigte, dass die zwei Tumoren mit einer einheitlichen 6q-Deletionsgröße kleine Areale aufwiesen in denen die Ausdehnung der 6q-Deletionsgröße geringer war. Dies deutet daraufhin, dass der Anteil an Tumoren mit einer „wachsenden“ 6q-Deletionsgröße höher ist als in der TMA-Analyse gezeigt werden konnte.

4.5 Identifizierung potentieller Tumorsuppressorgene *in vitro*

Ein Teil der Vorversuche und *in vitro* Analysen wurden unter meiner Anleitung von Frau Mina Eshagzaiy, Herrn Omar Habib und Herrn Simon Jung durchgeführt. Die von Ihnen erhobenen Ergebnisse wurden zur Erlangung des Grades Dr. med in der eigenen Dissertation verwendet.

4.5.1 Expression und Auswahl von Kandidatengenen innerhalb der 6q12-q22-Deletion

4.5.1.1 Expression von 43 Genen innerhalb der 6q14-q16 Region in 6 Prostata-Zelllinien

Zur Bestimmung der Kandidatengene innerhalb der 6q14-q16 Region für die Depletionsexperimente wurde die mRNA-Expression von 43 Genen in diesem Bereich mittels TaqMan-PCR in den benignen Prostatazelllinien RWPE-1 und BPH-1 und den malignen Prostatazelllinien LNCaP, VCaP, DU 145 und PC-3 bestimmt. Dann wurde die virtuelle mRNA-Kopiezahl mit Hilfe der Standardkurvenmethode gegen 10.000 *GAPDH*-mRNA-Kopien bestimmt. Insgesamt konnte eine geringe bis hohe mRNA-Kopiezahl für 37 (86,0%) der 43 getesteten Gene gemessen werden. Für 7 Gene konnte in keiner der 6 getesteten Zelllinien eine mRNA-Expression detektiert werden. Eine für die Depletionsexperimente ausreichend hohe mRNA-Kopiezahl von ≥ 10 Kopien in mindestens 2 der untersuchten Zelllinien, konnte für 25 (67,6%) der expremierten Gene gemessen werden (siehe Abbildung 4.17). In den nachfolgenden Depletionsversuchen wurden aus diesem Grund die Gene *AKIRIN2*, *ANKRD6*, *BACH2*, *CASP8AP2*, *CCNC*, *COQ3*, *C6orf162*, *C6orf168*, *FBXL4*, *KIAA0776*, *LYRM2*, *MANEA*, *MAP3K7*, *MDN1*, *MMS22L*, *NDUFAF4*, *ORC3*, *PM20D2*, *PNISR*, *PNRC1*, *RARS2*, *RRAGD*, *SLC35A1*, *UBE2J1*, *ZNF292* aus der Region 6q14-q16 auf eine potentiell tumorrelevante Funktion untersucht.

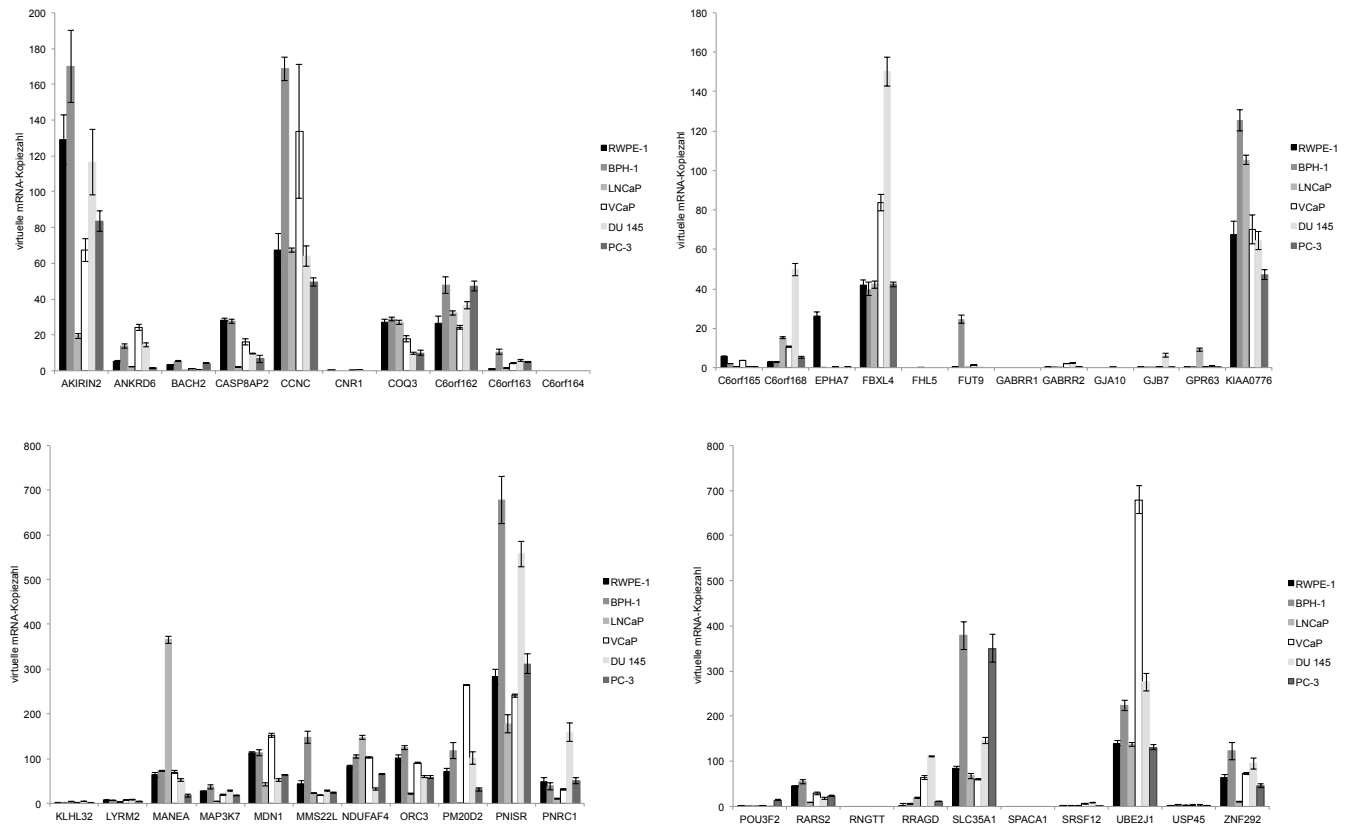


Abbildung 4.17: Expressionsniveau von 43 Genen innerhalb der 6q14-q16 Region in den benignen Prostatazelllinien RWPE-1 und BPH-1 und den malignen Prostatazelllinien LNCaP, VCaP, DU 145 und PC-3. Durchgeführt wurde eine TagMan-PCR. Die virtuelle mRNA-Kopiezahl wurde mittels der Standardkurvenmethode gegen 10.000 *GAPDH*-Kopien bestimmt.

4.5.1.2 Expression von 43 Genen innerhalb der 6q14-q16 Region in mikrodissezierten benignen Prostatadrüsengewebe

Zur Validierung der Expressionsergebnisse in den 6 getesteten Prostatazelllinien wurde die Expression der 43 Gene innerhalb der 6q14-q16 Region in mikrodisseziertem benignen Prostatadrüsengewebe mittels TaqMan-PCR bestimmt. Dann wurde die virtuelle mRNA-Kopiezahl mit Hilfe der Standardkurvenmethode gegen 10.000 *GAPDH*-mRNA-Kopien bestimmt (siehe Abbildung 4.18). In dieser Analyse konnte nur für die Gene *GABRR1* und *SPACA1* keine mRNA-Expression gemessen werden. Von den exprimierten Genen zeigten 13 ein sehr hohes Expressionsniveau von ≥ 800 Kopiezahlen. Dies war vergleichbar mit den mRNA-Messungen in den Zelllinien. Unter den 28 Genen die eine mRNA-Kopiezahl von ≤ 500 aufzeigten, waren sowohl Gene die basierend auf den Zelllinienversuche für die Depletionsversuche ausgewählt wurden als auch Gene die auf Grund der unter Punkt 4.5.1.1 erzielten Ergebnisse aus den weiteren Analysen ausgeschlossen wurden. Nach Durchführung der Zellwachstumsversuche (siehe Punkt 4.5.6), zeigte sich, dass die identifizierten potential tumorrelevanten Gene innerhalb der 6q14-q16 Region alle eine hohe mRNA-Expressionsniveau von ≥ 800

mRNA-Kopiezahlen im mikrodisezierten benignen Prostatadrüsengewebe aufzeigten. Basierend auf diesem Ergebnis wurde mittels Affymetrix-Chip-Analyse die Expression aller Gene auf Chromosom 6 bestimmt und „hochexpremierte“ Gene außerhalb der 6q14-q16 Region für weitere Zellwachstumsversuche ausgewählt (siehe Anhang B.1).

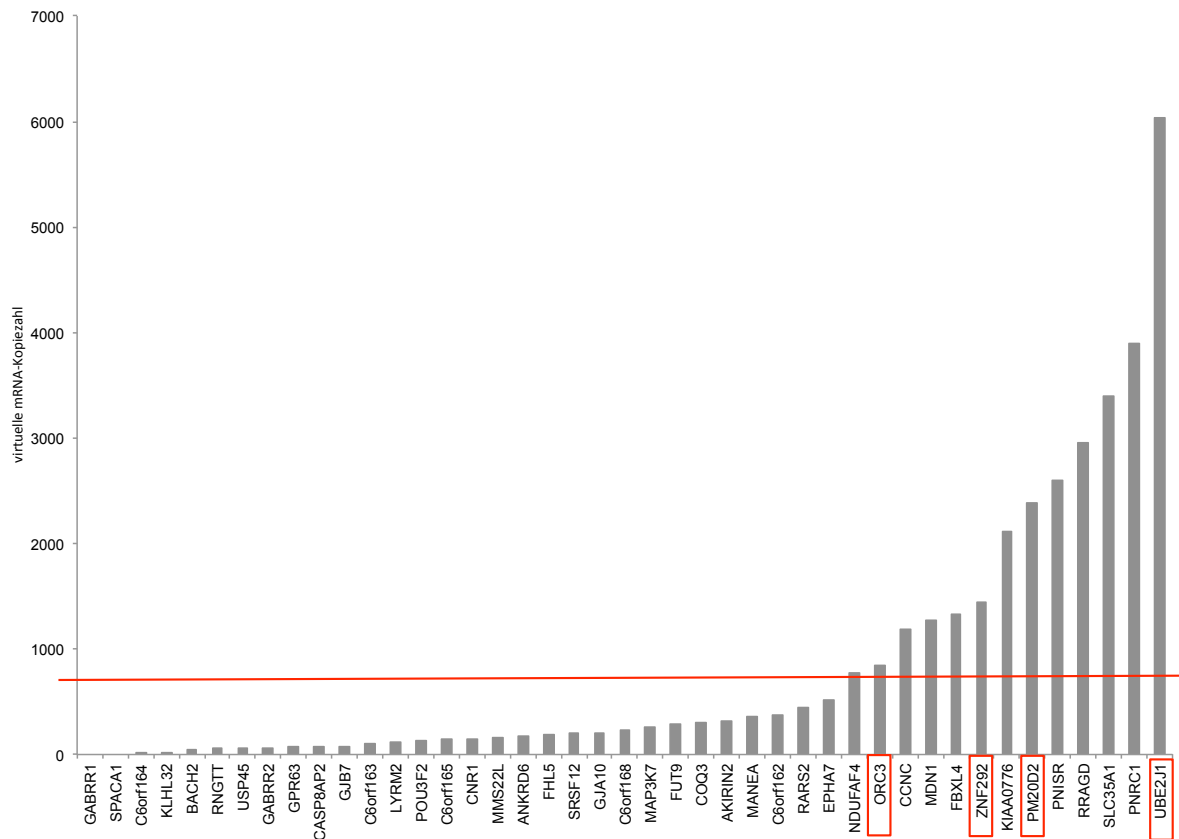


Abbildung 4.18: Expressionsniveau von 43 Genen innerhalb der 6q14-q16 Region in mikrodiseziertem benignen Prostatadrüsengewebe. Durchgeführt wurde eine TagMan-PCR. Die virtuelle mRNA-Kopiezahl wurde mittels der Standardkurvenmethode gegen 10.000 *GAPDH*-Kopien bestimmt. Rote Linie: Grenzwert zur Bestimmung der „hoch expremierten“ Gene ab einer mRNA-Kopiezahl von ≥ 800 . Rote Kästchen: Gene die in den Zellwachstumsversuchen als potentiell tumorrelevante Gene identifiziert werden konnten.

4.5.1.3 Expression von 13 Genen außerhalb der 6q14-q16 Region in 4 Prostata-Zelllinien

Von den in der Affymetrix-Chip-Analyse „hochexpremierten“ Genen wurden 13 Gene ausgewählt und deren mRNA-Expression mittels TaqMan-PCR in der benignen Prostatazelllinie BPH-1 und den malignen Prostatazelllinien LNCaP, DU 145 und PC-3 bestimmt. Dann wurde die virtuelle mRNA-Kopiezahl mit Hilfe der Standardkurvenmethode gegen 10.000 *GAPDH*-mRNA-Kopien bestimmt. Für alle Gene konnte eine mRNA-Kopiezahl von ≥ 10 Kopien gemessen werden (siehe Abbildung 4.19). Basierend auf diesen Ergebnissen wurden alle 13 Gene in den nachfolgenden Depletionsexperimenten untersucht.

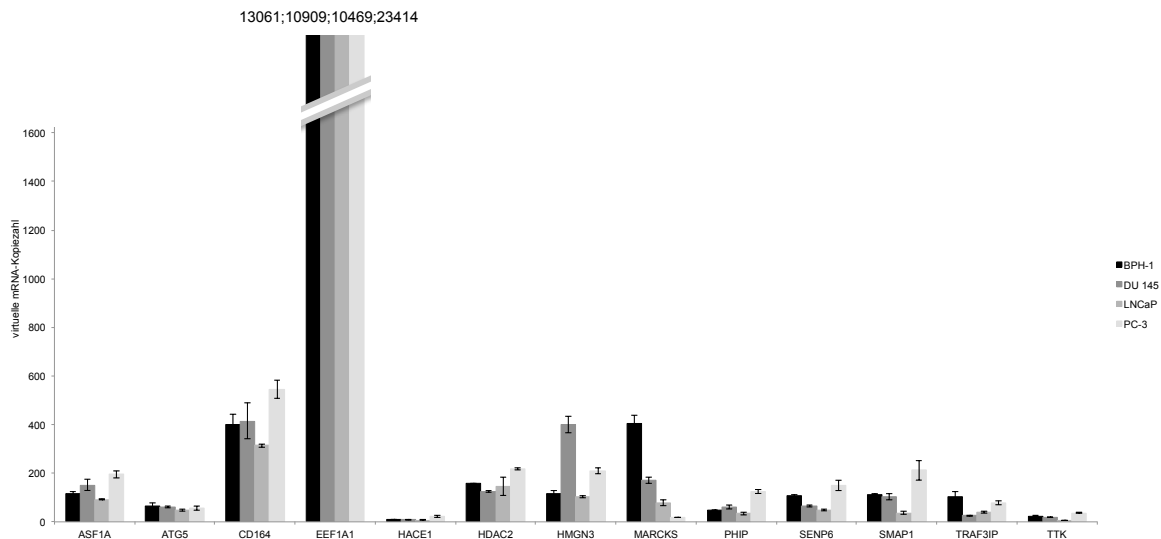


Abbildung 4.19: Expressionsniveau von 13 Genen außerhalb der 6q14-q16 Region in der benignen Prostatazelllinie BPH-1 und den malignen Prostatazelllinien LNCaP, DU 145 und PC-3. Durchgeführt wurde eine TagMan-PCR. Die virtuelle mRNA-Kopiezahl wurde mittels der Standardkurvenmethode gegen 10.000 *GAPDH*-Kopien bestimmt.

4.5.2 Auswahl der optimalen shRNA-Konstrukte für die Suppression der Kandidatengene innerhalb der 6q12-q22-Deletion

Um die Auswirkungen einer verminderten Expression der ausgewählten Kandidatengene innerhalb der 6q12-q22-Deletion auf das Zellwachstum zu untersuchen, wurden zunächst 5 kommerzielle shRNA-Konstrukte pro Gen auf ihre Depletionseffizienz getestet. Die getesteten shRNA-Konstrukte sind unter Punkt 2.6 und im Anhang unter Punkt A.1 aufgeführt. Für den Versuch wurde die Zelllinie BPH-1 verwendet, da alle ausgewählten Gene in dieser Zelllinie exprimiert waren. Der Versuch wurde wie folgt durchgeführt:

1. Lentivirale Transduktion der shRNA-Konstrukte in die BPH-1 Zellen
2. Inkubation der Zellen unter Puromycin-Selektion für 14 Tage
3. RNA-Isolierung und cDNA-Synthese
4. Bestimmung des Expressionsniveaus mittels TaqMan-PCR

Für 32 der untersuchten Gene konnte nach Transduktion der 5 shRNAs eine mRNA-Expression in allen 5 Gruppen (KO-A bis KO-E) gemessen werden. Für die Gene *COQ3*, *HMGN3*, *MMS22L*, *PM20D2*, *PNISR* und *SLC35A1* konnte der Effekt der shRNA-vermittelten Suppression nur für 4 der 5 ausgewählten shRNA-Konstrukte gemessen werden, da im Anschluss an die Puromycin-Selektion in einer Gruppe die Zellzahl nicht ausreichte für die

RNA-Isolierung. Zur Suppression der Kandidatengene in den Zellwachstumsversuchen wurden die shRNA-Konstrukte verwendet, welche den stärksten suppressiven Effekt auf das Niveau der mRNA-Expression aufwiesen (siehe Abbildung 4.20 und Anhang C.1).

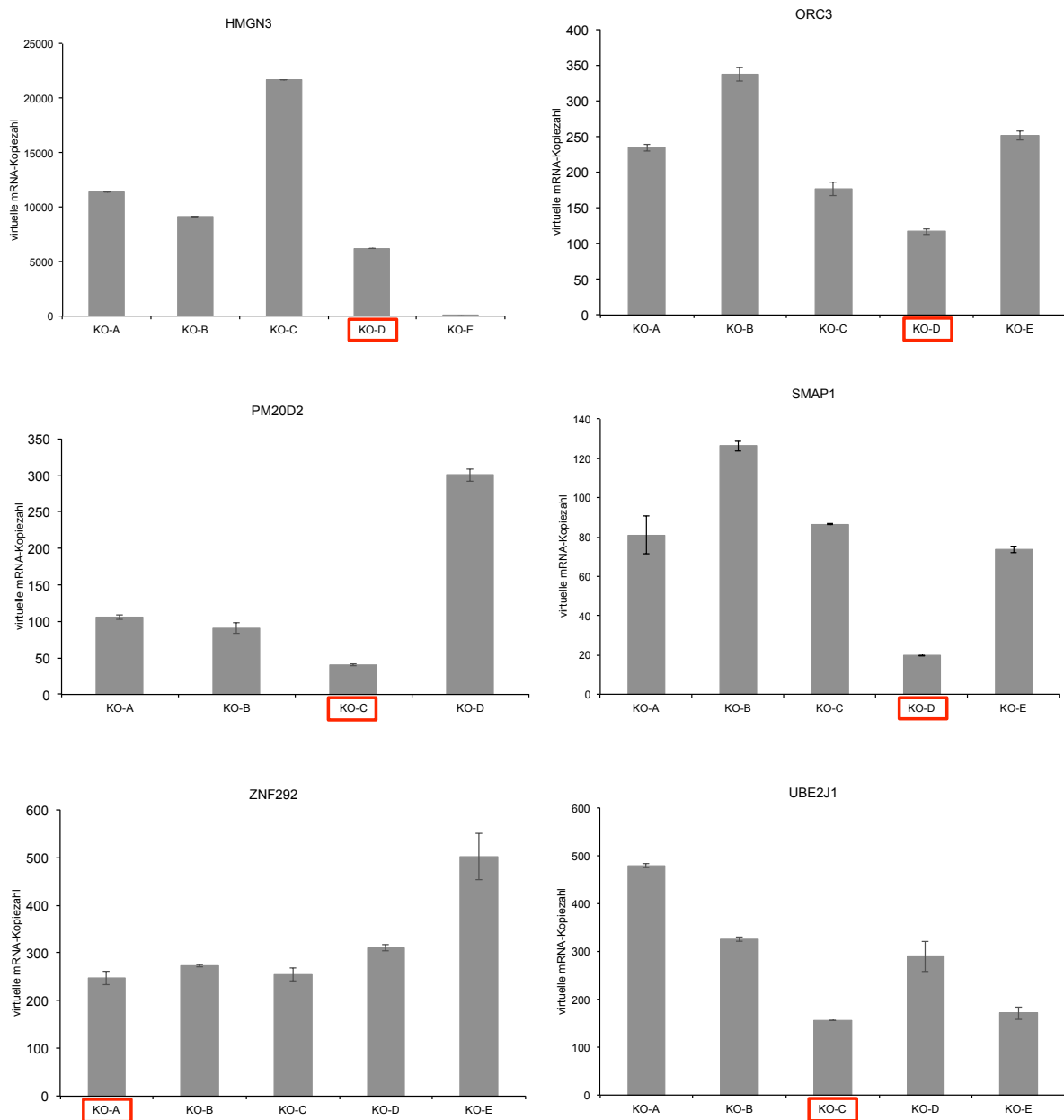


Abbildung 4.20: Testung 5 kommerziell erhältlicher shRNA-Konstrukte zur Suppression der Kandidatengene innerhalb der 6q12-q22-Deletion. Es erfolgte eine lentivirale Transduktion der shRNA-Konstrukte und eine Bestimmung der mRNA-Expression mittels TaqMan-PCR. Die virtuelle mRNA-Kopiezahl wurde mittels Standardkurvenmethode gegen 10.000 *GAPDH*-Kopien bestimmt. Dargestellt sind die Gene, welche als potentiell tumorrelevant identifiziert werden konnten.

4.5.3 Einfluss der lentiviralen Transduktion auf die shRNA-vermittelte Suppression der mRNA (Depletionseffizienz)

Um einen Einfluss der lentiviralen Transduktion auf die shRNA-vermittelte Suppression der Kandidatengene auszuschließen, wurden die unter Punkt 4.5.2 ausgewählten shRNA-Konstrukte in einem weiteren Versuch validiert. Dazu wurden, zusätzlich zu den ausgewählten shRNA-Konstrukten, in zwei weiteren Probenansätzen die Negativkontrollen shGFP und shNeg in die BPH-1 Zellen transduziert. Bei den Negativkontrollen handelt es sich um zwei shRNA-Konstrukte die nicht gegen eine mRNA des menschlichen Genoms gerichtet sind (siehe Punkt 3.2). Die Konstruktvalidierung wurde analog zu den Versuchen unter Punkt 4.5.2 durchgeführt. Zusätzlich zu den Kandidatengenen wurden außerdem die Positivkontrollen shPTEN, shRB1 und shmTOR auf ihren suppressiven Effekt geprüft. Bei den Positivkontrollen handelt es sich um bereits bekannte Tumorsuppressorgene (siehe Punkt 3.2). Für 37 der Kandidatengene konnte eine deutliche Suppression der virtuellen mRNA-Kopiezahl im Vergleich zu mindestens einer der verwendeten Negativkontrollen gemessen werden. Die geringste Depletionseffizienz wurde für das Gen *MARCKS* gemessen. Hier konnte eine Reduktion der mRNA-Kopiezahl von 229 (shGFP) auf 152 (shMAPRCKS) gemessen werden (30,4 %, $P=0,0801$). Die stärkste Depletionseffizienz konnte mit einer Suppression von 92,5 % für das Gen *C6orf162* detektiert werden ($P=0,0001$). Keine eindeutige Runterregulierung der mRNA-Kopiezahl konnte für das Gen *MDN1* nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurde *MDN1* aus den folgenden Zellwachstumsversuchen ausgeschlossen. Für die getesteten Positivkontrollen konnte ebenfalls eine deutliche Suppression der mRNA-Kopiezahl von 56,9 % bis 79,3 % gemessen werden. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden die drei Positivkontrollen in den nachfolgenden Zellwachstumsversuchen eingesetzt. In Abbildung 4.21 sind die Ergebnisse der Konstruktvalidierung für die Positivkontrollen und die unter Punkt 4.5.6 identifizierten potentiell tumorrelevanten Gene dargestellt. Die Konstruktvalidierungen der anderen shRNAs sind im Anhang D.1 zu finden.

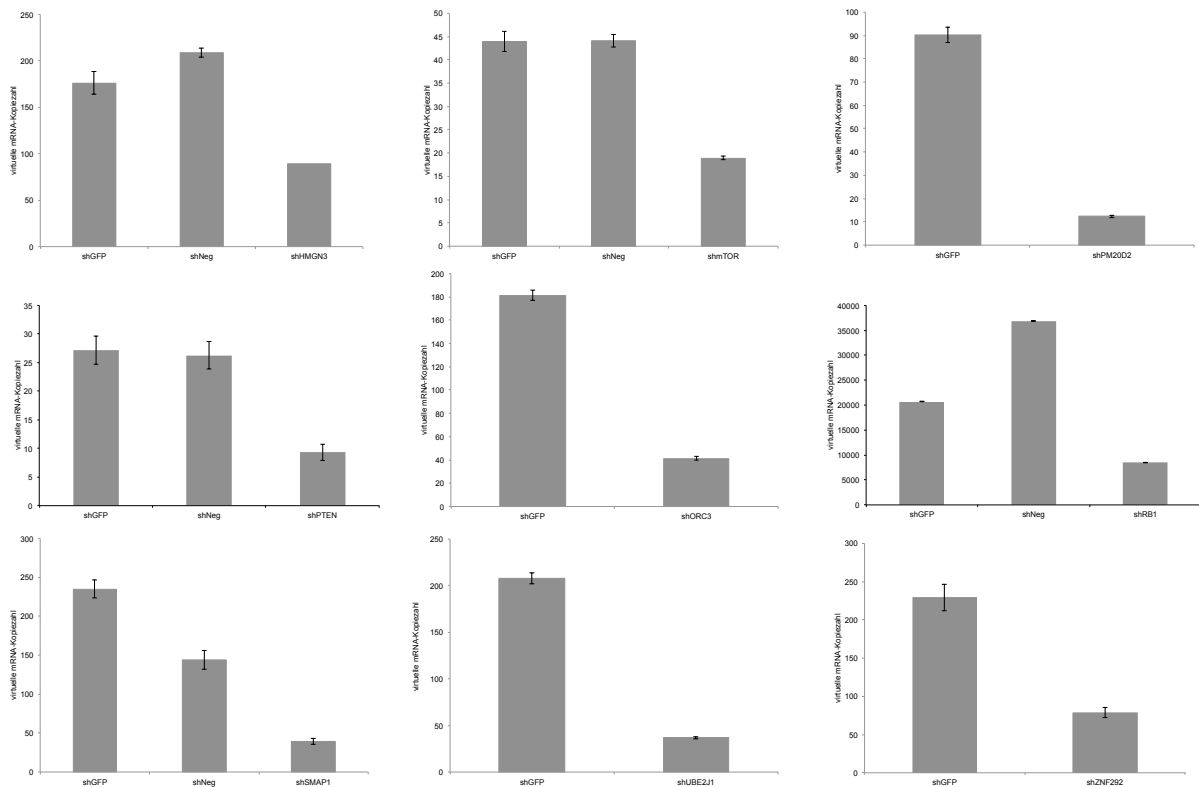


Abbildung 4.21: Validierung der ausgewählten shRNA-Konstrukte zur Suppression der Kandidatengene innerhalb der 6q12-q22-Deletion. Es erfolgte eine lentivirale Transduktion der shRNA-Konstrukte und eine Bestimmung der mRNA-Expression mittels TaqMan-PCR. Die virtuelle mRNA-Kopiezahl wurde mittels Standardkurvenmethode gegen 10.000 *GAPDH*-Kopien bestimmt. Die Depletionseffizienz wurde im Vergleich zu den Negativkontrollen shNeg und shGFP bestimmt.

4.5.4 Einfluss der lentiviralen Transduktion auf die shRNA-vermittelte Suppression auf Proteinebene (Depletionseffizienz)

Um einen Einfluss der lentiviralen Transduktion auf den Suppressionseffekt auszuschließen, wurde zusätzlich zur Konstruktvalidierung auf mRNA-Ebene die Proteinmenge mittels Western Blot in den Zelllinien DU 145, BPH-1 und PC-3 semiquantifiziert. In diesem Versuch wurden alle Gene untersucht die unter Punkt 4.5.6 als potentiell tumorrelevante Gene der 6q12-q22-Deletion identifiziert werden konnten. Im Western Blot wurden neben den shRNA-Konstrukten zur Suppression der Gene *HMG3*, *PM20D2*, *ORC3*, *SMAP1*, *UBE2J1* und *ZNF292*, die Negativkontrollen shNeg und shGFP verwendet, die unter Punkt 3.2 genauer beschrieben sind. Für alle Gene konnte eine deutliche Reduktion der Expression auf Proteinebene in den drei untersuchten Zelllinien im Vergleich zu den beiden Negativkontrollen detektiert werden. Um Unterschiede in der Proteinauftragsmenge sichtbar zu machen wurde zusätzlich zu einer definierten Proteinmenge das Referenzprotein α -Tubulin verwendet, dass in allen Proben oberhalb der 50 kDa Markerbande nachgewiesen werden konnte. Die Ergebnisse der Western Blot Analyse sind unter Abbildung 4.22 dargestellt.

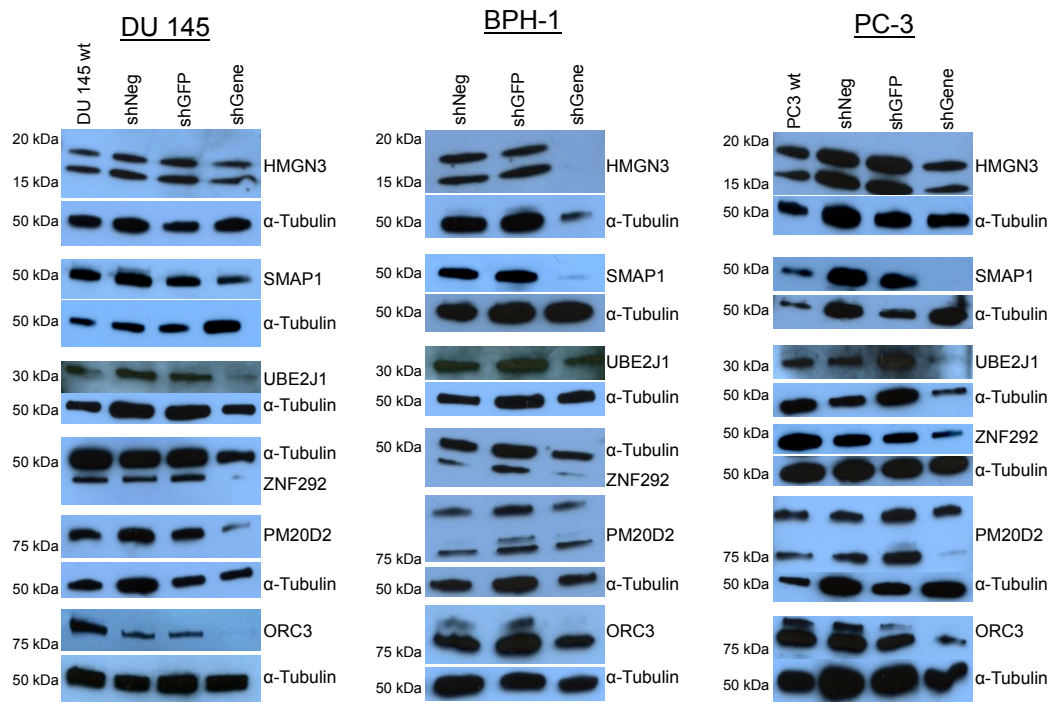


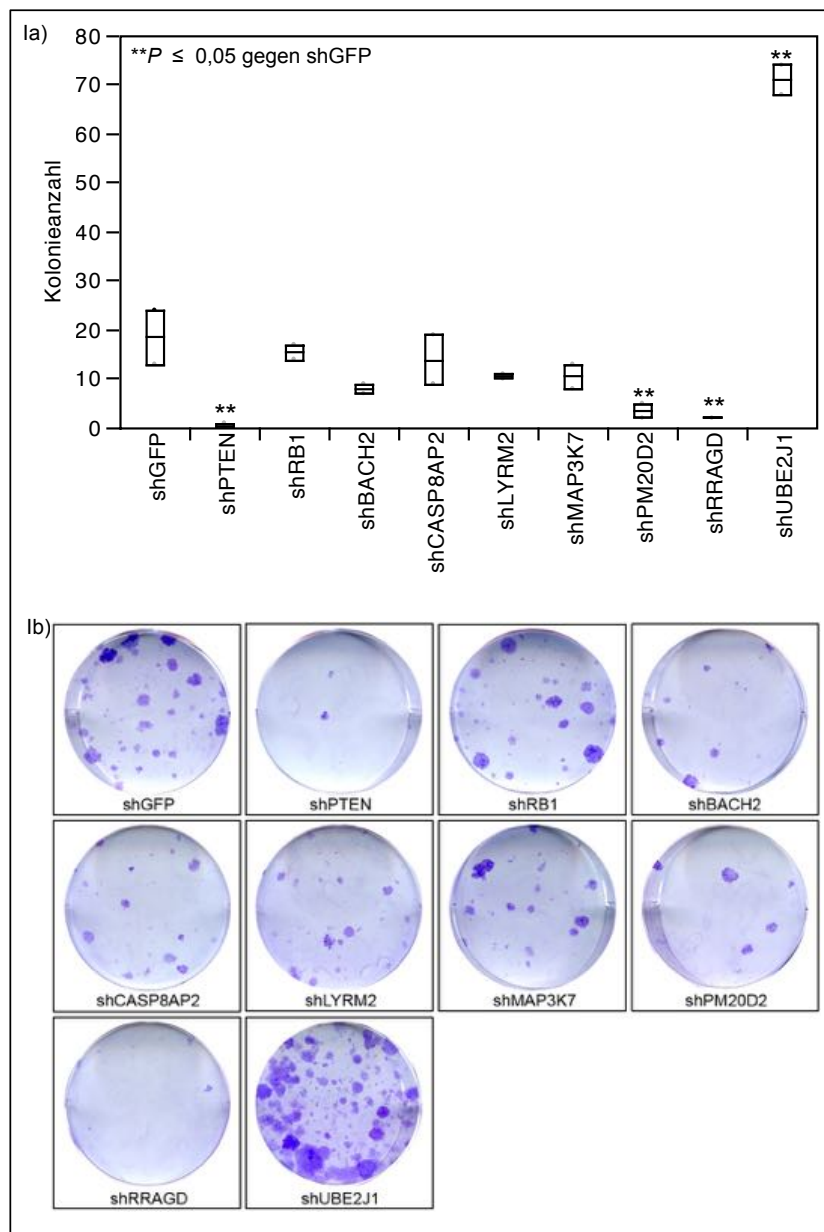
Abbildung 4.22: Validierung der shRNA-vermittelten Suppression der potentiell tumorrelevanten Gene innerhalb der 6q12-q22-Deletion. Es erfolgte eine lentivirale Transduktion der shRNA-Konstrukte und eine Detektion der Proteinmenge mittels Western Blot. Die Depletionseffizienz wurde im Vergleich zu den Negativkontrollen shNeg und shGFP bestimmt. Als Referenzprotein diente α -Tubulin. wt: Wildtyp.

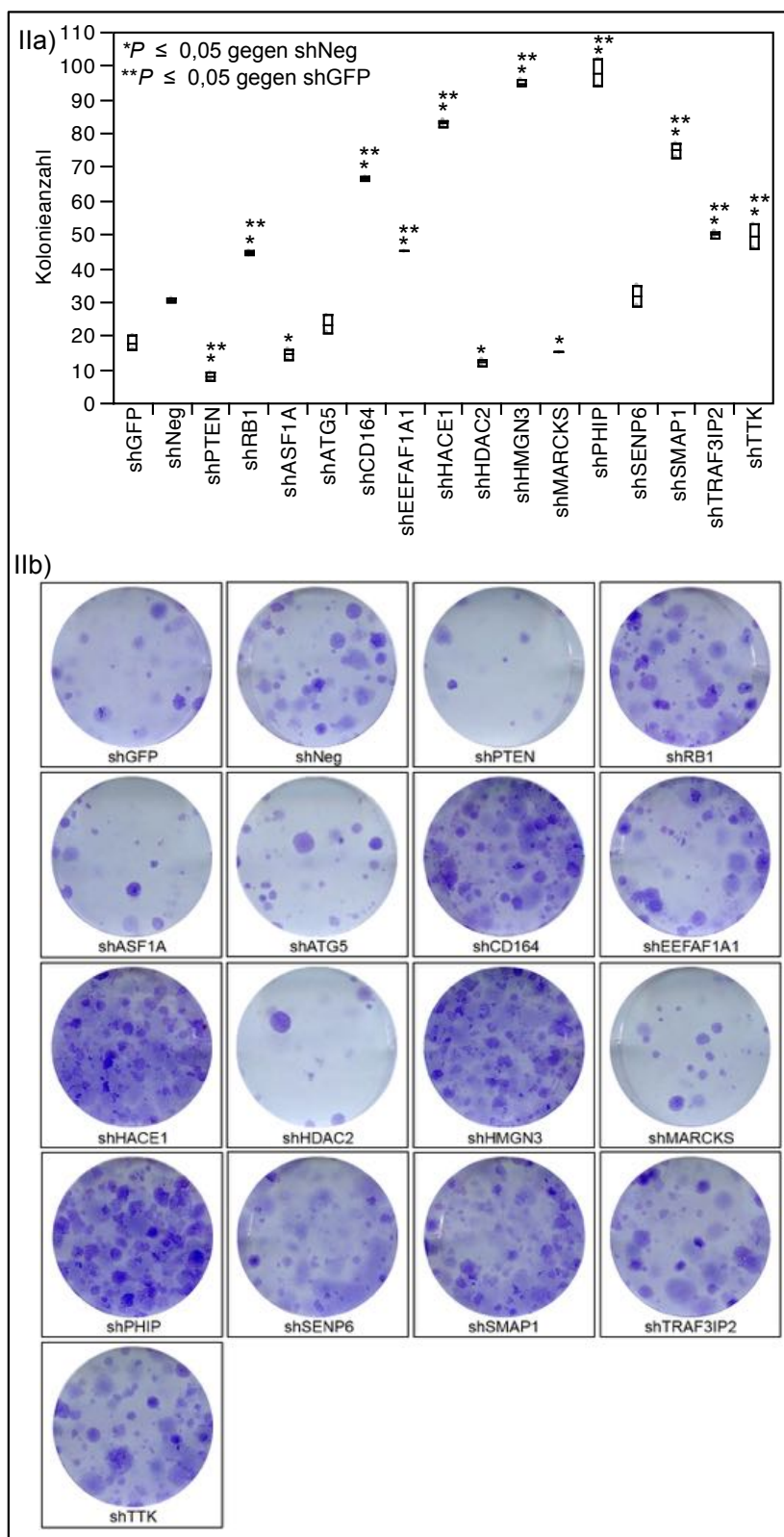
4.5.5 Quantifizierung des Suppressions-bedingten Einflusses der Kandidatengene auf das Zellwachstum im Colony-Formation-Assay

Zur Identifizierung potentiell tumorrelevanter Gene, deren Deletions-bedingte reduzierte Expression einen relevanten Einfluss auf das Zellwachstums aufweist, wurde der Effekt der shRNA-vermittelten Suppression auf das Zellkoloniebildungsvermögen in der epithelialen Prostatazelllinie BPH-1 und den Prostatakarzinomzelllinien DU 145 und PC-3 im Colony-Formation-Assay untersucht. Zur Beurteilung eines potentiell veränderten Zellwachstums wurden die beiden Negativkontrollen shGFP und shNeg verwendet, sowie die Suppression der bekannten Tumorsuppressorgene *PTEN*, *mTOR* (nur PC-3) und *RB1* als Positivkontrollen (siehe Punkt 3.2). Die shRNA-Konstrukte wurden mittels Lipofectamin[®]2000 wie unter Punkt 3.2.6 beschrieben in die Zellen transfiziert. Alle Proben wurden im Doppelansatz untersucht. Die Unterschiede im Zellwachstum zwischen den suppressierten Kandidatengenen und den Negativkontrollen wurden im Anschluss an die makroskopische Zellkoloniezählung mittels einer einfaktoriellen ANOVA-Analyse bestimmt.

In der Zelllinie BPH-1 führte die Suppression von 13 der 37 getesteten Gene zu einer signifikanten Steigerung des Zellwachstums, das sich durch eine deutliche höher Koloniezahl in diesen Proben im Vergleich zu beiden Negativkontrollen zeigte ($P \leq 0,0500$). Für 5 die-

ser Gene war der Effekt auf das Zellwachstum sogar höher als in den *RB1* suppressierten Zellen, die als Positivkontrolle für ein nicht-essentielles Tumorsuppressorgen dienten. Eine signifikant geringere Kolonieanzahl wurde durch die reduzierte Expression von 4 der 37 untersuchten Kandidatengene im Vergleich zu beiden verwendeten Negativkontrollen gefunden ($P \leq 0,0500$). Der negative Einfluss auf das Zellwachstum war dabei vergleichbar mit den reduzierenden Effekten auf das Zellwachstum in der *PTEN* suppressierten Probe, die als Positivkontrolle für ein für das Zellüberleben essentielles Tumorsuppressorgen diente. Die Ergebnisse der Colony-Formation-Assays sind in Abbildung 4.23 dargestellt.





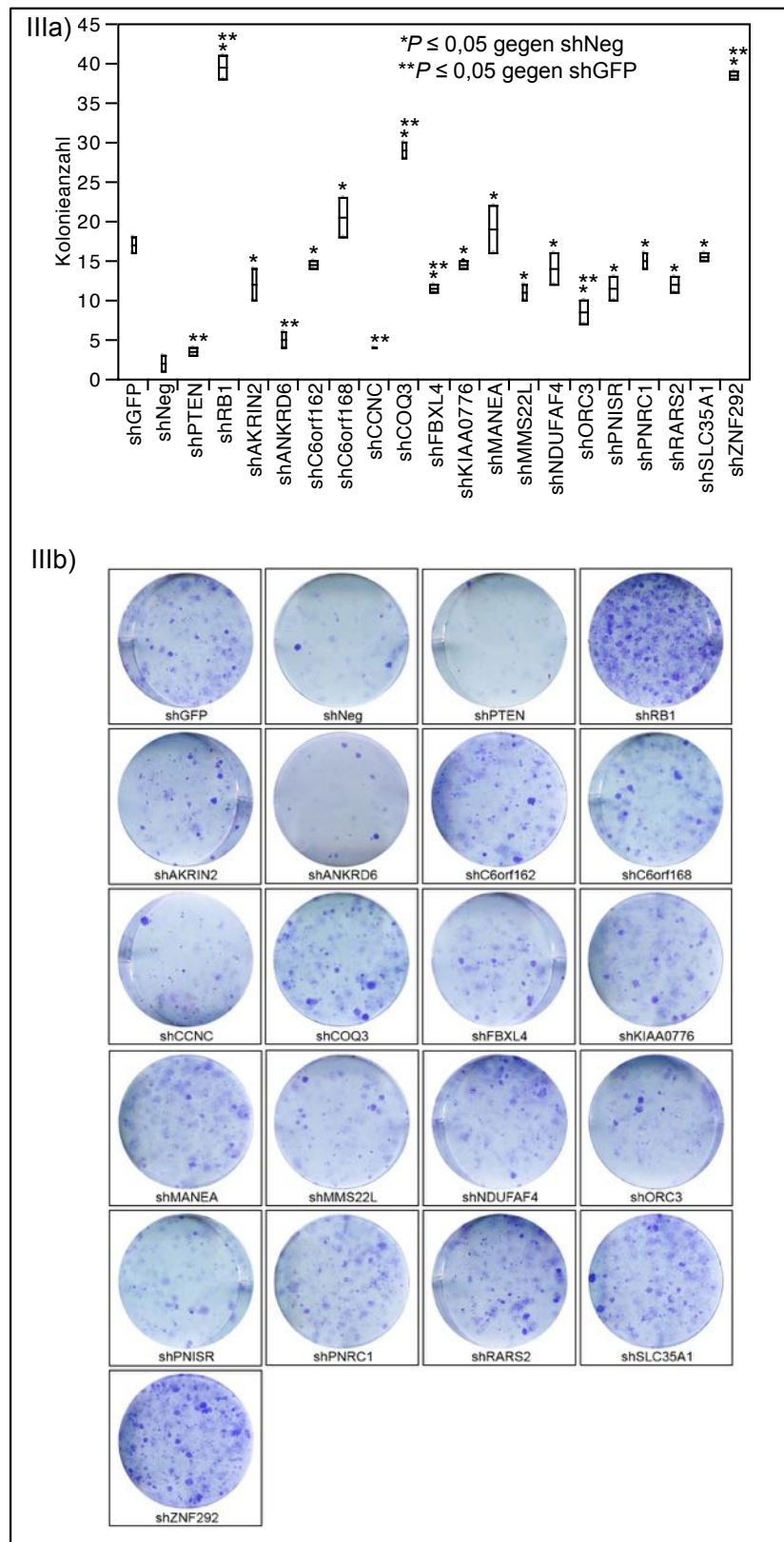
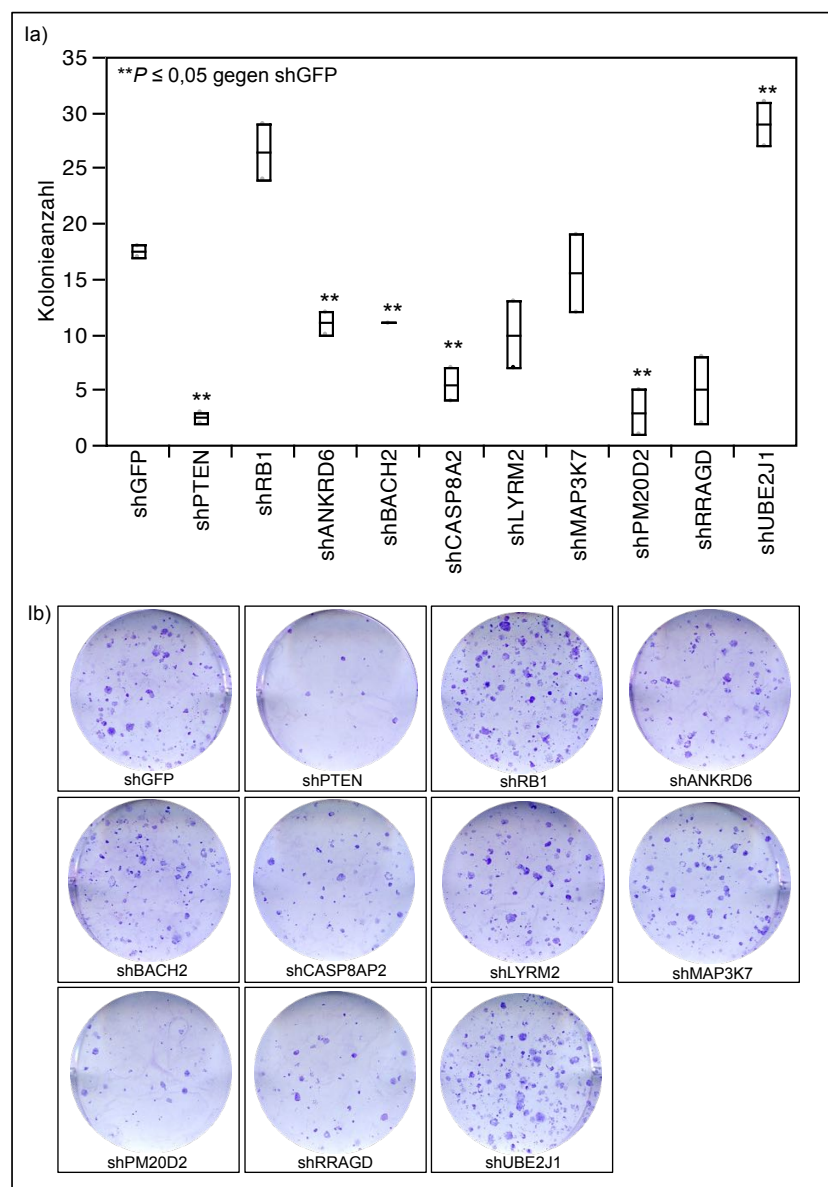
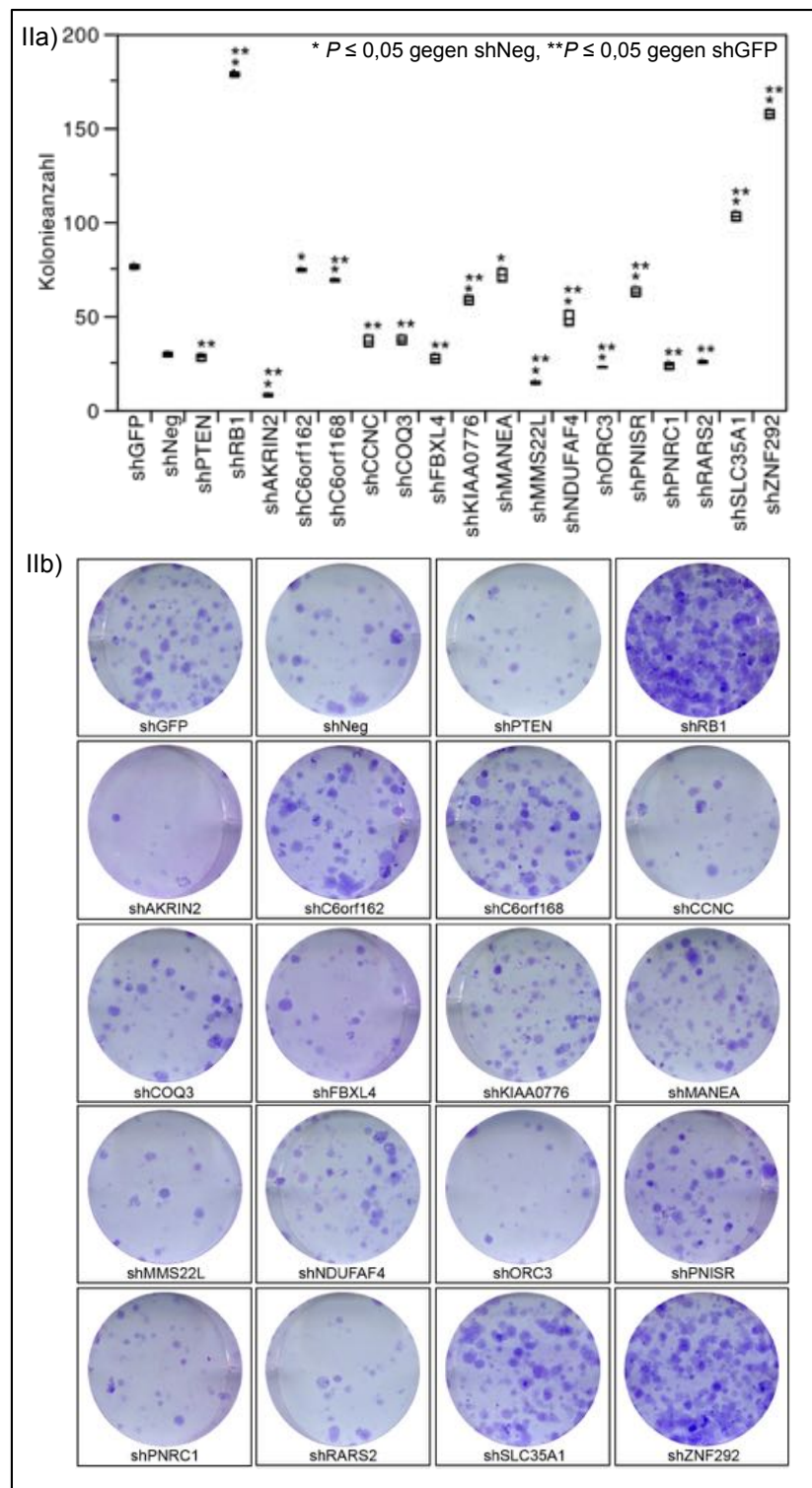


Abbildung 4.23: Screening der ausgewählten Kandidatengene innerhalb der 6q12-q22-Deletion mittels Colony-Formation-Assay in der Zelllinie BPH-1. Die jeweiligen shRNA-Konstrukte wurden mittels Lipofectamin®2000 in die Zellen transfiziert. Insgesamt wurden 37 Gene in drei Colony-Formation-Assays untersucht (I-III). Dargestellt sind in a) die Unterschiede in der Kolonieanzahl als Boxplot. Alle Zellkolonien ab einem Durchmesser von ≥ 1 mm wurden makroskopisch gezählt und die Unterschiede zu den Negativkontrollen shGFP und shNeg mittels einer einfaktoriellen ANOVA-Analyse bestimmt, b) Beispiel der sichtbaren Zellkolonien nach der Giemsa-Färbung.

In der Zelllinie DU 145 führte die Suppression von 7 der 37 getesteten Gene zu einer signifikanten Steigerung des Zellwachstums, das sich durch eine deutliche höher Kolonieanzahl in diesen Proben im Vergleich zu beiden Negativkontrollen zeigte ($P \leq 0,0500$). Für 4 dieser Gene war der Effekt auf das Zellwachstum sogar höher als in den *RB1* suppressierten Zellen, die als Positivkontrolle für ein nicht-essentielles Tumorsuppressorgen dienten. Eine signifikant geringere Kolonieanzahl wurde durch die reduzierte Expression von 7 der 37 untersuchten Kandidatengene im Vergleich zu beiden verwendeten Negativkontrollen gefunden ($P \leq 0,0500$). Der negative Einfluss von 3 Genen auf das Zellwachstum war dabei vergleichbar mit den reduzierenden Effekten auf das Zellwachstum in der *PTEN* suppressierten Probe, die als Positivkontrolle für ein für das Zellüberleben essentielles Tumorsuppressorgen diente. Die Ergebnisse der Colony-Formation-Assays sind in Abbildung 4.24 dargestellt.





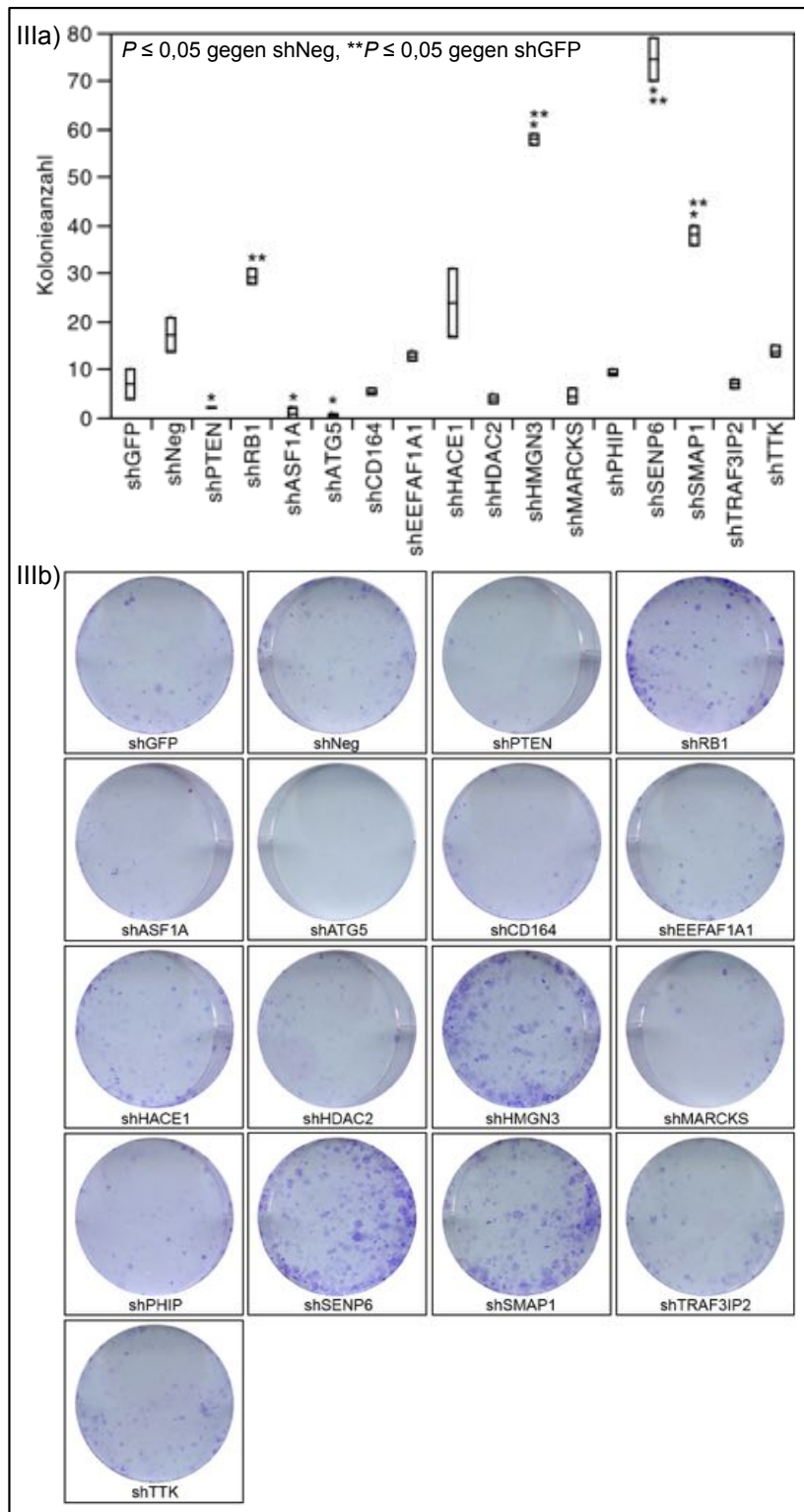
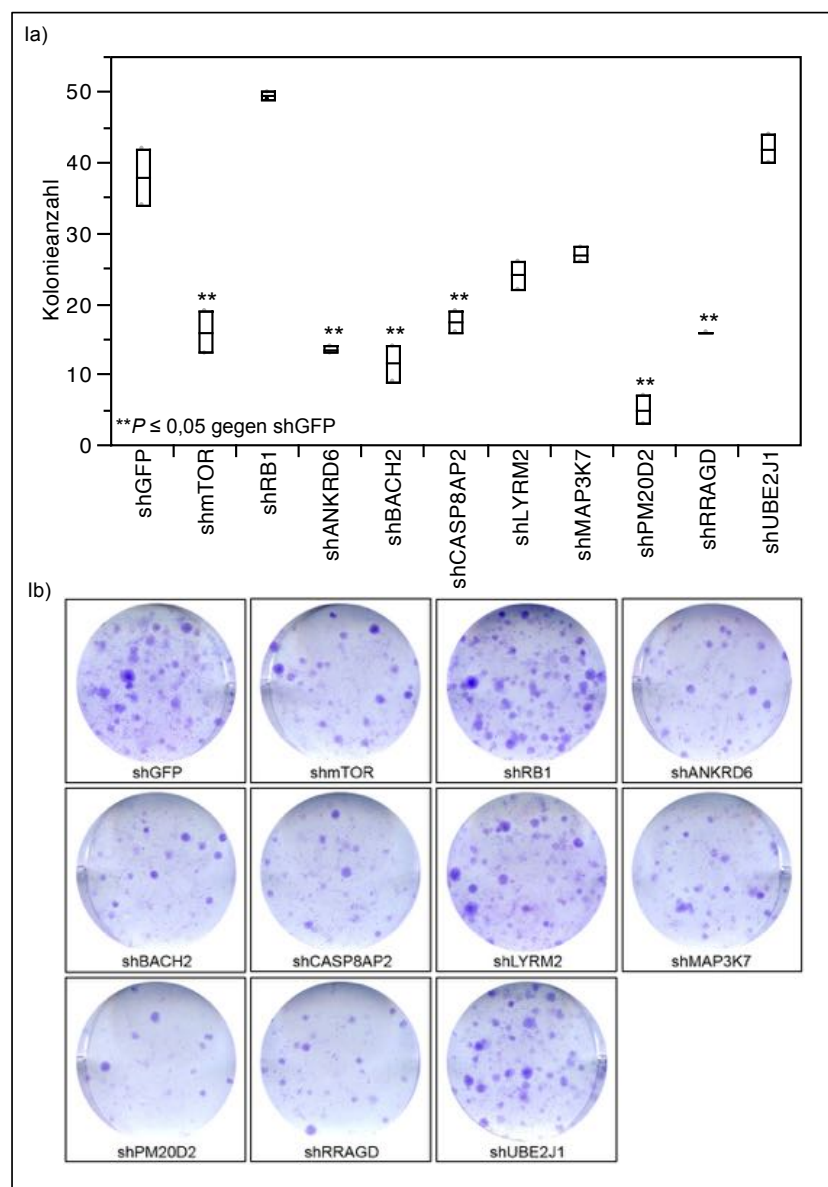
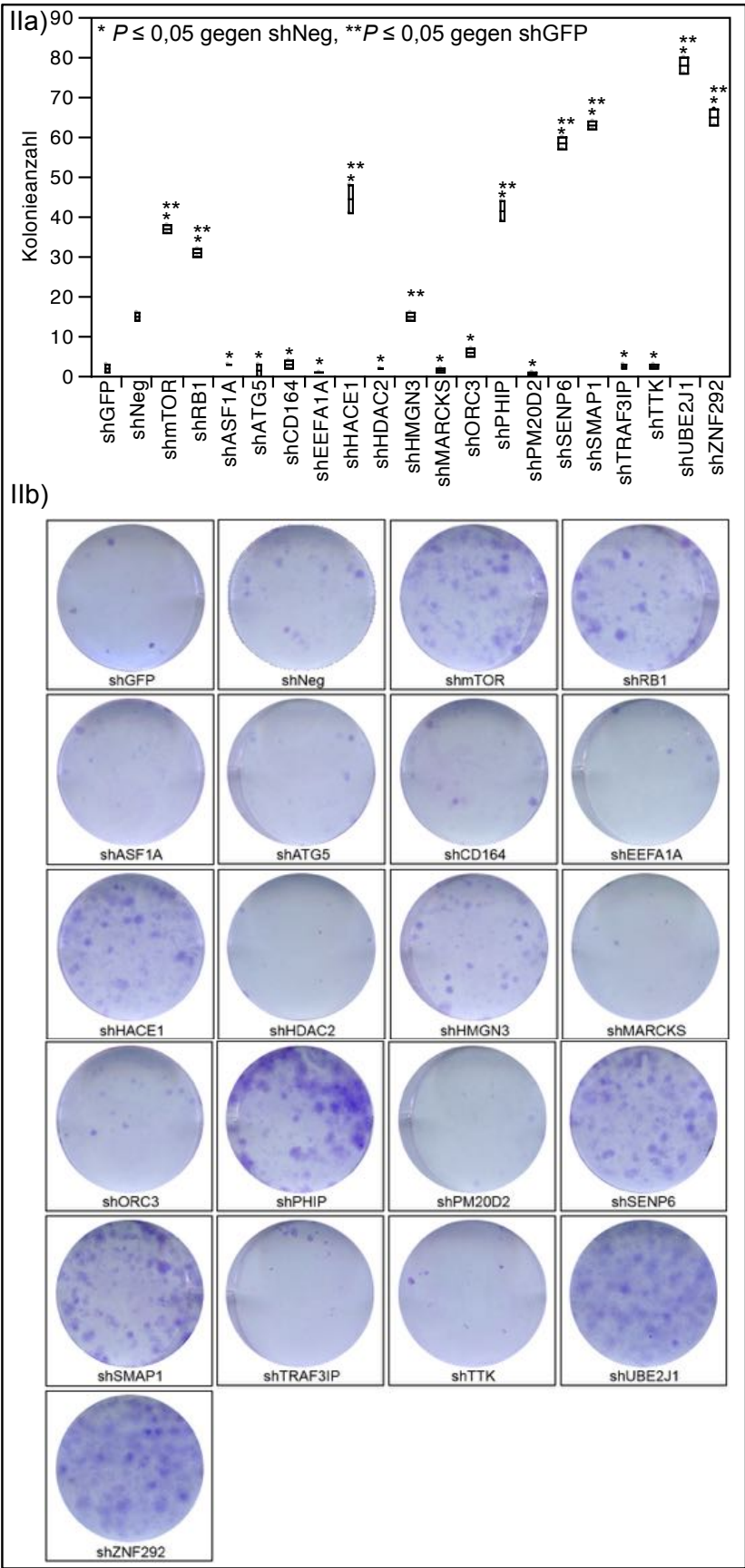


Abbildung 4.24: Screening der ausgewählten Kandidatengene innerhalb der 6q12-q22-Deletion mittels Colony-Formation-Assay in der Zelllinie DU 145. Die jeweiligen shRNA-Konstrukte wurden mittels Lipofectamin®2000 in die Zellen transfiziert. Insgesamt wurden 37 Gene in drei Colony-Formation-Assays untersucht (I-III). Dargestellt sind in a) die Unterschiede in der Kolonieanzahl als Boxplot. Alle Zellkolonien ab einem Durchmesser von ≥ 1 mm wurden makroskopisch gezählt und die Unterschiede zu den Negativkontrollen shGFP und shNeg mittels einer einfaktoriellen ANOVA-Analyse bestimmt, b) Beispiel der sichtbaren Zellkolonien nach der Giemsaefärbung.

In der Zelllinie PC-3 führte die Suppression von 16 der 37 getesteten Gene zu einer signifikanten Steigerung des Zellwachstums, das sich durch eine deutlich höhere Koloniezahzahl in diesen Proben im Vergleich zu beiden Negativkontrollen zeigte ($P \leq 0,0500$). Für 6 dieser Gene war der Effekt auf das Zellwachstum sogar höher als in den *RB1* suppressierten Zellen, die als Positivkontrolle für ein nicht-essentielles Tumorsuppressorgen dienten. Eine signifikant geringere Koloniezahzahl wurde durch die reduzierte Expression von 14 der 37 untersuchten Kandidatengene im Vergleich zu beiden verwendeten Negativkontrollen gefunden ($P \leq 0,0500$). Der negative Einfluss auf das Zellwachstum war für 4 Gene stärker als der Effekt der reduzierten *mTOR*-Expression auf das Zellwachstum, das als Positivkontrolle für ein für das Zellüberleben essentielles Tumorsuppressorgen diente. Die Ergebnisse der Colony-Formation-Assays sind in Abbildung 4.25 dargestellt.





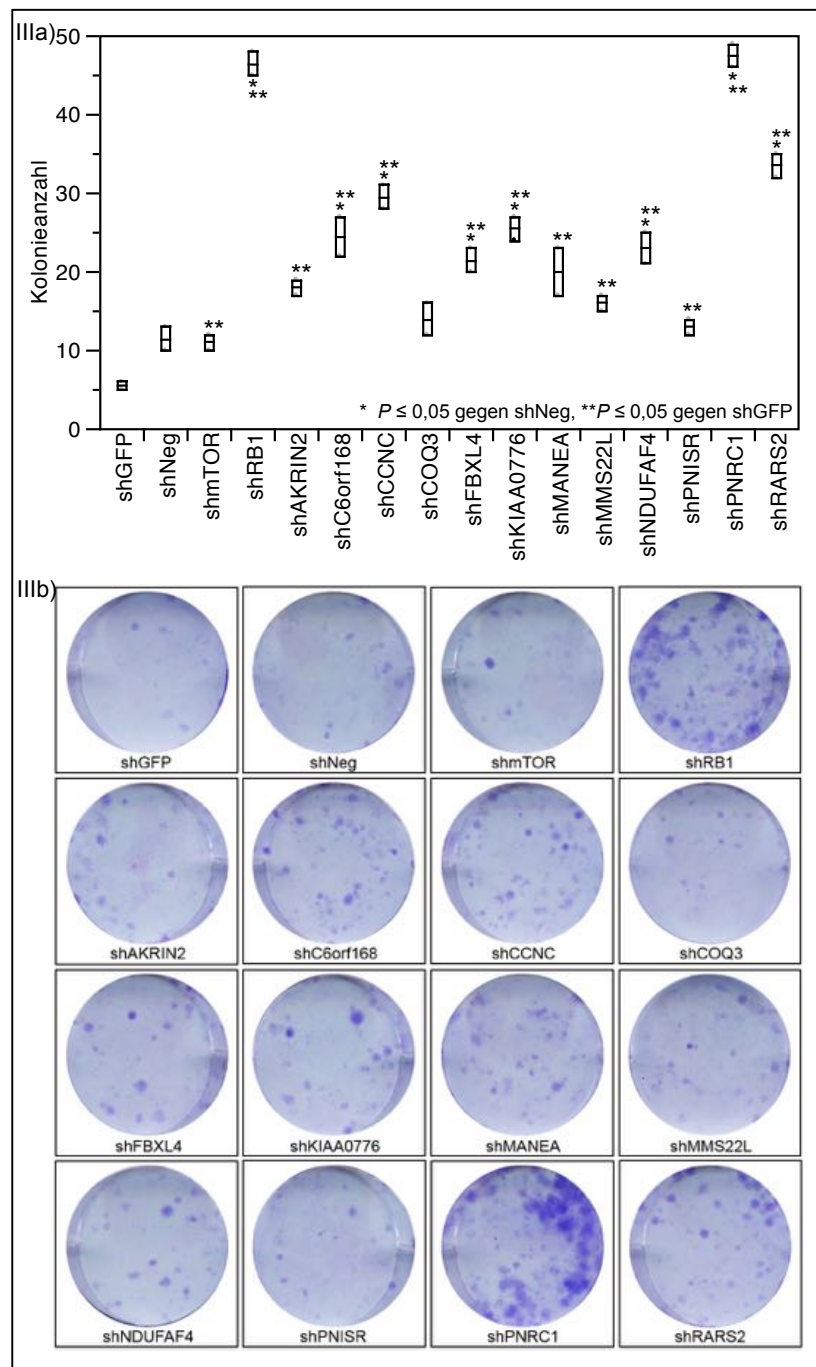


Abbildung 4.25: Screening der ausgewählten Kandidatengene innerhalb der 6q12-q22-Deletion mittels Colony-Formation-Assay in PC-3. Die jeweiligen shRNA-Konstrukte wurden mittels Lipofectamin®2000 in die Zellen transfiziert. Insgesamt wurden 37 Gene in drei Colony-Formation-Assays untersucht (I-III). Dargestellt sind in a) die Unterschiede in der Kolonieanzahl als Boxplot. Alle Zellkolonien ab einem Durchmesser von ≥ 1 mm wurden makroskopisch gezählt und die Unterschiede zu den Negativkontrollen shGFP und shNeg mittels einer einfaktoriellen ANOVA-Analyse bestimmt, b) Beispiel der sichtbaren Zellkolonien nach der Giemsafärbung.

Um auszuschließen, dass die Effekte der suppressierten Kandidatengene auf das Zellwachstum durch bereits vorhandene molekulare Veränderungen in den verwendeten Zelllinien verursacht wurde, sind die Ergebnisse der Colony-Formation-Assays in den drei Zelllinien verglichen wurden. Von den Genen, deren Suppression zu einer signifikanten Steigerung der Koloniezahl führte, zeigten 4 Gene diesen Einfluss auf das Zellwachstum in allen drei Zelllinien. Damit konnten *HMGN3*, *SMAP1*, *UBE2J1* und *ZNF292* als potentiell tumorsuppressive Gene der 6q12-q22-Deletion identifiziert werden. Von den Genen, deren Suppression zu einer signifikanten Verminderung der Koloniezahl führte, zeigten 2 Gene diesen Einfluss auf das Zellwachstum in allen drei Zelllinien. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden *PM20D2* und *ORC3* der Gruppe der für das Zellüberleben essentiellen Gene innerhalb der 6q12-q22-Deletion zugeordnet.

4.5.6 Validierung der potentiellen Zielgene der 6q12-q22-Deletion im Colony-Formation-Assay

Zur Validierung der potentiell tumorsuppressiven Rolle von *HMGN3*, *SMAP1*, *UBE2J1* und *ZNF292* und der essentiellen Funktion von *PM20D2* und *ORC3* für das Überleben der Prostatazellen wurden diese Gene erneut mittels shRNAs in den Zelllinien BPH-1, DU 145 und PC-3 suppressiert und ein weiterer Colony-Formation-Assay im Vierfachansatz durchgeführt. Als Negativkontrollen dienten shGFP und shNeg die keinen suppressiven Effekt auf ein im humanen Genom vorkommendes Gen haben. Die verwendeten shRNAs zur Positivkontrolle waren gerichtet gegen die bekannten Tumorsuppressorgene *RB1*, *PTEN* und *mTOR* (nur PC-3) (siehe auch Punkt 3.2). Die shRNA-Konstrukte wurden mittels Lipofectamin®2000 wie unter Punkt 3.2.6 beschrieben in die Zellen transfiziert. Die Unterschiede im Zellwachstum zwischen den suppressierten Zielgenen und den Negativkontrollen wurden im Anschluss an die makroskopische Zellkoloniezählung mittels einer einfaktoriellen ANOVA-Analyse bestimmt. Die Suppression der Gene *HMGN3*, *SMAP1*, *UBE2J1* und *ZNF292* führte in allen drei Zelllinien zu einer deutlichen Steigerung des Zellwachstums, gemessen an der Zellkoloniezahl im Vergleich zu den Negativkontrollen ($P \leq 0,005$). Eine Ausnahme zeigte sich in der Zelllinie DU 145, in der die suppressierten *HMGN3* und *SMAP1* Zellen kein gesteigertes Zellwachstum im Vergleich zu der Negativkontrolle shNeg zeigten. Dies kann zurückgeführt werden auf eine ungleiche Aussaat der Zellen oder einer unterschiedlichen Transfektionseffizienz zwischen den drei Zellproben. Der Zellwachstumssteigernde Effekt war außerdem in allen drei Zelllinien vergleichbar mit dem Einfluss einer *RB1* Suppression auf das Zellwachs-

tum. Die Suppression der Gene *PM20D2* und *ORC3* führte in allen drei Zelllinien zu einer Verminderung des Zellwachstums gemessen an der Zellkolonieanzahl im Vergleich zu den Negativkontrollen ($P \leq 0,005$). Der Zellwachstumsreduzierende Effekt war außerdem in den DU 145 und BPH-1 Zelllinien vergleichbar mit dem Einfluss einer *PTEN* Suppression auf das Zellwachstum. In der PC-3 Zelllinie führte die Depletion von *mTOR* nicht zu einer Reduktion des Zellwachstums, so dass hier kein Vergleich mit der Positivkontrolle möglich war. Die Ergebnisse des Colony-Formation-Assays mit den transfizierten BPH-1 Zellen sind in Abbildung 4.26 und mit DU 145 und PC-3 in Anhang E.1 dargestellt.

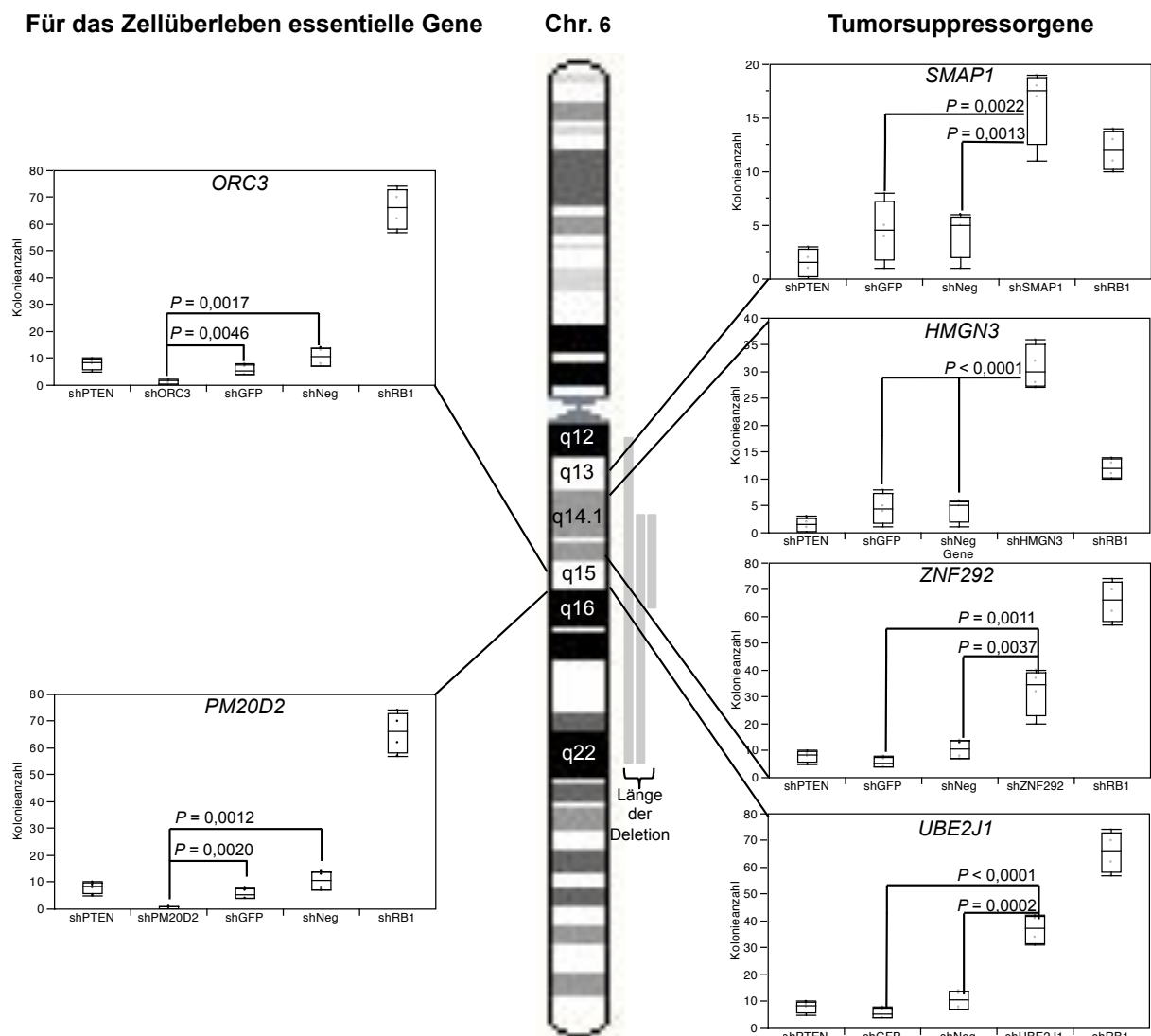


Abbildung 4.26: Validierung der potentiellen Zielgene der 6q12-q22-Deletion. Durchgeführt wurde ein Colony-Formation-Assay mit den shRNA-supprimierten BHP-1 Zellen. Makroskopisch gezählt wurden alle Zellkolonien ab einem Durchmesser von 1 mm. Die Unterschiede in der Kolonieanzahl wurden mittels einfaktorieller ANOVA-Analyse gegen die Kontrollen shGFP und shNeg bestimmt. Links: *ORC3* und *PM20D2*, deren Suppression einen negativen Einfluss auf die Zellkolonieanzahl besitzt. Rechts: *HMGN3*, *SMAP1*, *ZNF292* und *UBE2J1*, deren Suppression einen positiven Effekt auf die Zellkolonieanzahl besitzt.

4.5.7 Auswirkungen der Ko-Depletion der vier potentiellen Tumorsuppressorgene auf das Wachstumsverhalten von Prostatazellen

4.5.7.1 Nachweis der Ko-Depletion auf mRNA-Ebene

Um die Auswirkungen einer gleichzeitigen Suppression der identifizierten potentiellen Tumorsuppressorgene auf das Zellwachstum zu untersuchen, wurden die Gene *HMGN3*, *SMAP1*, *ZNF292* und *UBE2J1* in der Zelllinie DU 145 ko-depletiert. Dazu wurden die Gene zunächst in einzelne Gruppen eingeteilt, so dass immer zwei bis vier der untersuchten Gene in einem Versuchsansatz gleichzeitig supprimiert wurden. Einschließlich der Negativkontrolle wurden 12 unterschiedliche Experimentgruppen gebildet (siehe Abbildung 4.27a). Der Versuch wurde wie folgt durchgeführt:

1. Lentivirale Transduktion der shRNA-Konstrukte in die DU 145 Zellen
2. Inkubation der Zellen unter Puromycin-Selektion für 14 Tage
3. Teilen der Zellen in vier Gruppen (Gruppe 1: RNA-Isolierung und cDNA-Synthese, Gruppe 2-4: Zellwachstumsversuche)
4. Bestimmung des Expressionsniveaus der vier Gene in den einzelnen Versuchsansätzen mittels TaqMan-PCR.

In allen getesteten Experimentansätzen konnte eine Suppression der Ziel-mRNAs nachgewiesen werden. Die Depletionseffizienz betrug für *HMGN3* 46,4 % (Nummer 12) bis 74,1 % (Nummer 8), für *SMAP1* 59,6 % (Nummer 12) bis 82,9 % (Nummer 9), für *UBE2J1* 53,6 % (Nummer 5) bis 83,1 % (Nummer 4) und für *ZNF292* 35,6 % (Nummer 11) bis 60,8 % (Nummer 2). Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Abbildung 4.27 zusammengefasst.

a)

Experiment- nummer	shUBE2J1	shZNF292	Co-Depletion		shNeg	shGFP
			shSMAP1	shHMGN3		
1					X	X
2	X	X			X	X
3	X		X		X	X
4	X			X	X	X
5	X	X	X		X	
6	X	X		X	X	
7	X	X	X	X		
8			X	X	X	X
9	X		X	X	X	
10		X	X		X	X
11		X		X	X	X
12		X	X	X	X	

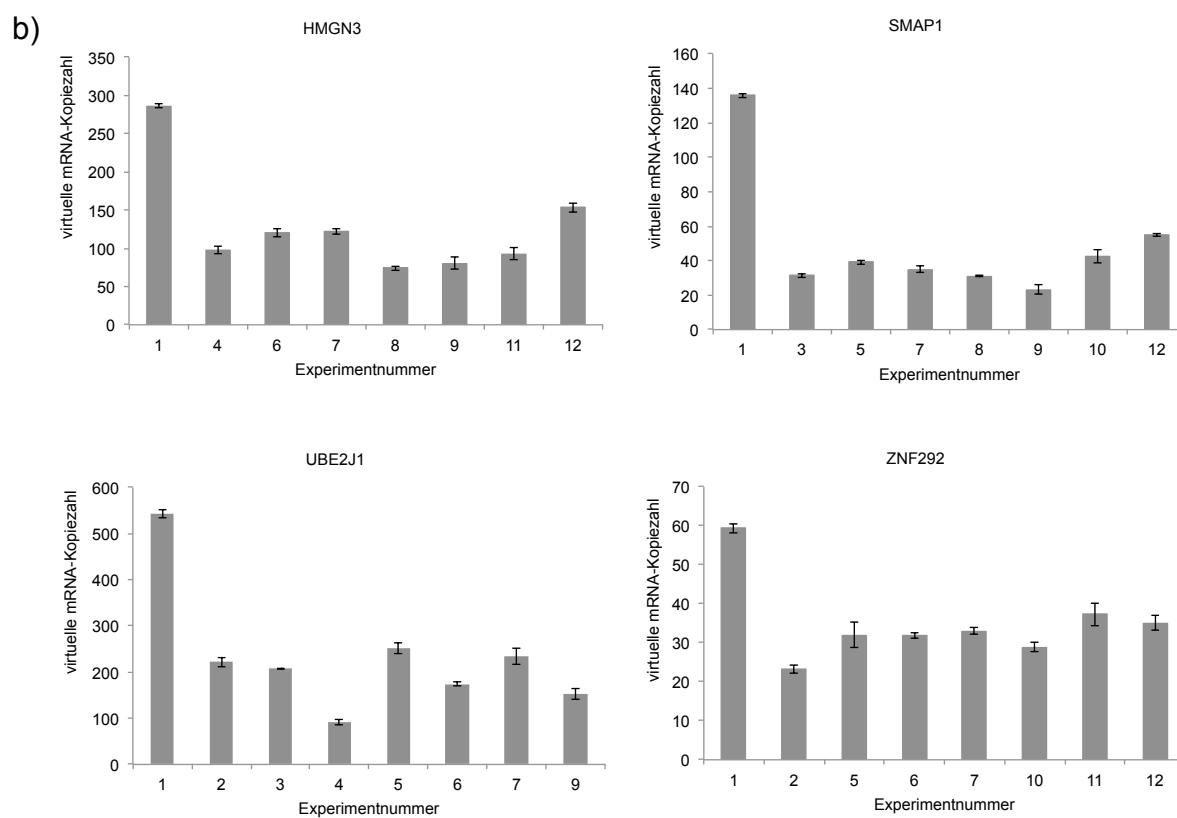


Abbildung 4.27: Nachweis der Ko-Depletion der potentiellen Tumorsuppressorgene der 6q12-q22-Deletion in DU 145. Es erfolgte eine lentivirale Transduktion der shRNA-Konstrukte und eine Bestimmung der mRNA-Expression mittels TaqMan-PCR. a) Einteilung der Ko-Depletionsproben und b) Ergebnisse der TaqMan-PCR. Die virtuelle mRNA-Kopiezahl wurde mittels Standardkurvenmethode gegen 10.000 *GAPDH*-Kopien bestimmt. Bei der Experimentnummer 1 handelt es sich um die Negativkontrolle.

4.5.7.2 Auswirkungen der Ko-Depletion auf das Zellkoloniebildungsvermögen

Um die Auswirkungen der Ko-Depletion auf das Zellwachstum zu testen, wurde das Koloniebildungsvermögen der suppressierten Zellen im Colony-Formation-Assay getestet. Dazu wurden die mittels lentiviraler Transduktion ko-depletierten Zellen in 6-Well-Zellkulturplatten dünn ausgesät (1×10^3 Zellen / Well) und für mindestens 1 Woche wachsen gelassen. Anschließend wurde die Größe der Zellkolonien gemessen und mittels einer einfaktoriellen ANOVA verglichen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen deutlich, dass der Einfluss auf das Zellwachstum mit der Anzahl der suppressierten Gene steigt. Die Suppression eines Genes alleine führte zwar zu einem Anstieg der Koloniegröße, aber in allen Versuchen konnten die größten Zellkolonien in der Gruppe der vierfach ko-depletierten Zellen gemessen werden (siehe Abbildung 4.28a-d). Dieses Phänomen war unabhängig von den suppressierten Genen. Dies zeigte auch eine weitere Analyse in der unabhängig von den untersuchten Genen die Anzahl der suppressierten Gene in der Versuchsgruppe betrachtet wurden. Auch hier stieg die Größe der Zellkolonien mit der Anzahl der suppressierten Gene an ($P \leq 0,2500$, siehe Abbildung 4.28e). Damit konnte gezeigt werden, dass innerhalb der 6q12-q22-Deletion mindestens vier Gene lokalisiert sind, die gemeinsam einen wachstumssteigernden Effekt auf die Prostatakarzinomzellen haben.

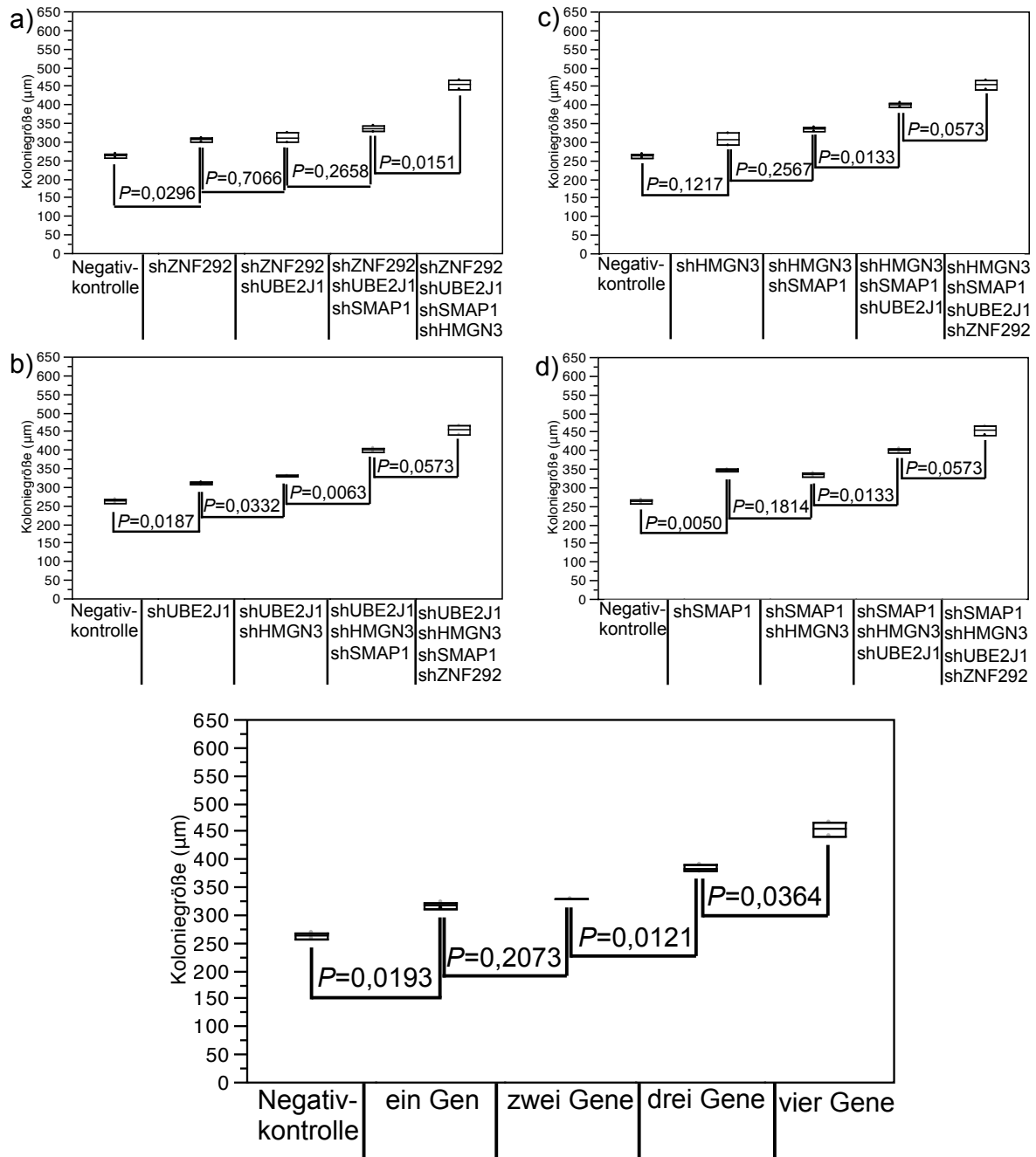


Abbildung 4.28: Auswirkungen der Ko-Depletion auf das Koloniebildungsvermögen. Durchgeführt wurde eine Ko-Transduktion von zwei bis vier shRNAs in die Zelllinie DU 145 zur Testung von kooperativen Wachstumseinflüssen. Die Auswirkungen auf das Koloniebildungsvermögen wurden anhand der Koloniegröße im Colony-Formation-Assay bestimmt. Dargestellt sind in a) bis d) die Auswirkungen auf die Koloniegröße ausgehend von einem bestimmten Zielgen und in e) die Auswirkungen auf die Koloniegröße nach Anzahl der supprimierten Gene.

4.5.7.3 Auswirkungen der Ko-Depletion auf das verankerungsunabhängige Zellwachstum

Um die Auswirkungen der Ko-Depletion auf die Fähigkeit des verankerungsunabhängigen Zellwachstums zu testen, wurden die Wachstumsfähigkeiten der suppressierten Zellen im Softagar-Colony-Formation-Assay getestet. Dazu wurden die mittels lentiviraler Transduktion ko-depletierten Zellen in 6-Well-Zellkulturplatten ausgesät (1×10^4 Zellen / Well) und für 14 Tage wachsen gelassen. Anschließend wurde die Größe der gebildeten Zellkolonien gemessen und mittels einer einfaktoriellen ANOVA verglichen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen deutlich, dass der Einfluss auf die Fähigkeit des verankerungsunabhängigen Zellwachstum ebenfalls mit der Anzahl der suppressierten Gene steigt. Die Suppression eines Genes alleine führte zwar zu einem Anstieg der Koloniegröße, aber in allen Versuchen konnten die größten Zellkolonien in der Gruppe der vierfach ko-depletierten Zellen gemessen werden (siehe Abbildung 4.29a-d). Dieses Phänomen war unabhängig von den suppressierten Genen. Dies zeigte auch eine weitere Analyse in der unabhängig von den untersuchten Genen die Anzahl der suppressierten Gene in der Versuchsgruppe betrachtet wurden. Auch hier stieg die Größe der Zellkolonien mit der Anzahl der suppressierten Gene an ($P \leq 0,1500$, siehe Abbildung 4.29e). Damit konnte gezeigt werden, dass innerhalb der 6q12-q22-Deletion mindestens vier Gene lokalisiert sind, die gemeinsam einen Einfluss auf die Fähigkeit eines unabhängigen Wachstums von Prostatakarzinomzellen haben.

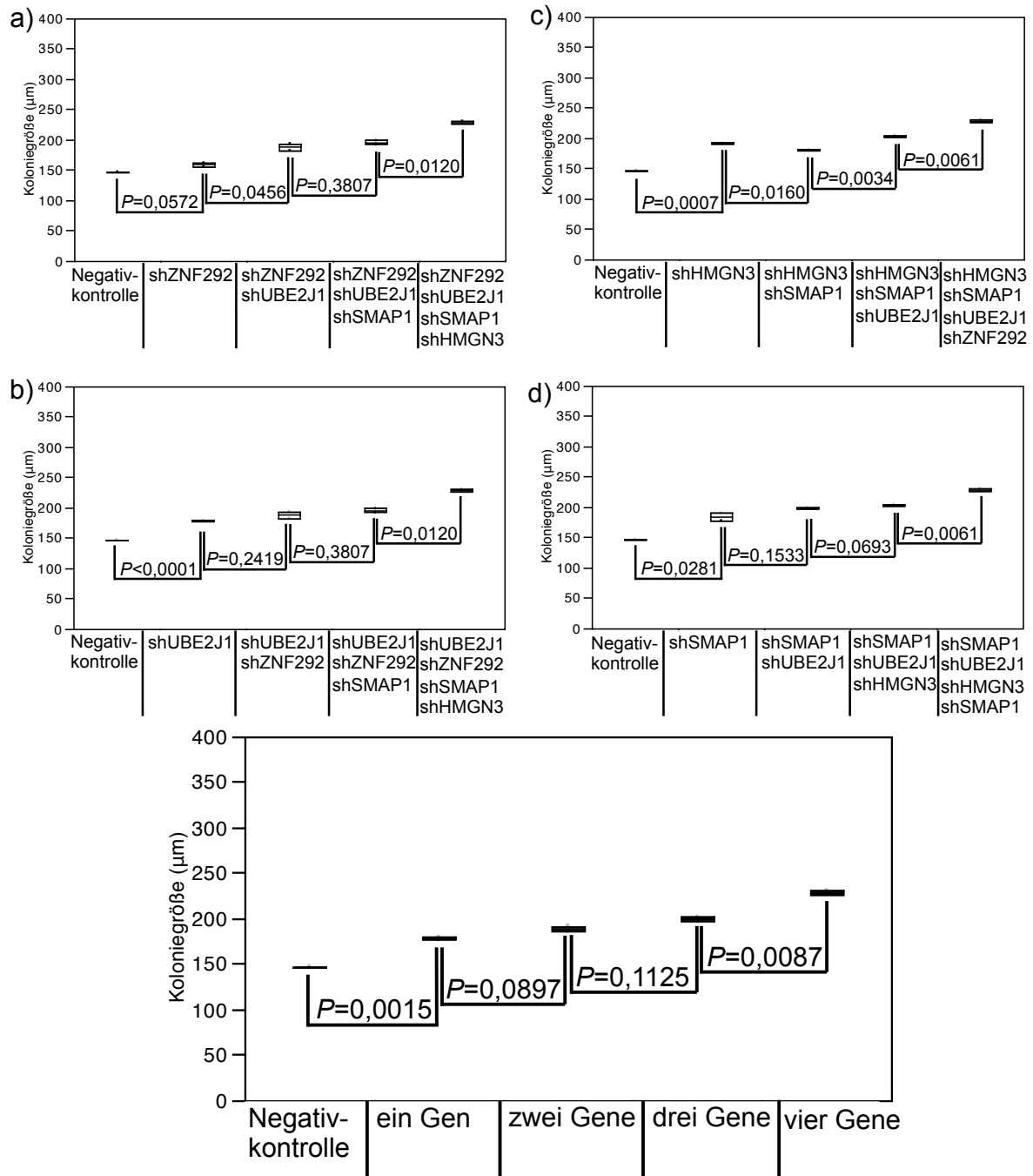


Abbildung 4.29: Auswirkungen der Ko-Depletion auf die Fähigkeit des verankerungsunabhängigen Zellwachstums. Durchgeführt wurde eine Ko-Transduktion von zwei bis vier shRNAs in die Zelllinie DU 145 zur Testung von kooperativen Wachstumseinflüssen. Die Auswirkungen auf das verankerungsunabhängige Wachstum wurden anhand der Koloniegröße im Softagar-Colony-Formation-Assay bestimmt. Dargestellt sind in a) bis d) die Auswirkungen auf die Koloniegröße ausgehend von einem bestimmten Zielgen und in e) die Auswirkungen auf die Koloniegröße nach Anzahl der supprimierten Gene.

4.5.7.4 Auswirkungen der Ko-Depletion auf die Fähigkeit des invasiven Zellwachstums

Um die Auswirkungen der Ko-Depletion auf die Fähigkeit des invasiven Zellwachstums zu testen, wurden die Wachstumsfähigkeiten der suppressierten Zellen im Invasions-Assay getestet. Im Anschluss an den Invasion-Assay wurden die verbleibenden Zellen gezählt und die Invasionsrate und der Invasionsindex bestimmt (siehe Punkt 3.2.11). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigten, dass die Suppression der potentiell tumorsuppressiven Gene nicht zu einer Steigerung des invasiven Potentials der Zellen führte. Auch durch die Ko-Depletion verschiedener Gene konnte die Fähigkeit zum invasiven Wachstum der Zellen nicht deutlich gesteigert werden. Die Ko-Suppression aller vier Gene zeigte jedoch auch hier einen der stärksten Effekte. Im Vergleich zur Negativkontrolle stieg die Invasionsrate von 50 % auf 141 % an, was einem Invasionsindex von 3,16 entspricht. Damit konnte gezeigt werden, dass die gemeinsame Suppression der vier identifizierten Gene nicht zu einer geringen Steigerung des invasiven Potentials führt. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tabelle 4.13 dargestellt.

Tabelle 4.13: Auswirkungen der Ko-Depletion auf die Fähigkeit des invasiven Zellwachstums. Durchgeführt wurde eine Ko-Transduktion von zwei bis vier shRNAs in die Zelllinie DU 145 zur Testung von kooperativen Wachstumseinflüssen. Die Auswirkungen auf die Fähigkeit des invasiven Wachstums wurden anhand der Invasionsrate und dem Invasionsindex bestimmt. Invasionsrate: mittlere Zellzahl der Probe / mittlere Zellzahl der Kontrolle. Invasionsindex: Invasionsrate der Probe / Invasionsrate der Negativkontrolle.

Depletionsprobe	Invasionsrate (%)	Invasionsindex
Neg	50,00	1,04
shRB1	54,81	1,15
shZNF292	46,75	1,03
shUBE2J1	49,69	1,11
shHMGN3	66,77	1,48
shSMAP1	95,60	1,92
shUBE2J1, shZNF292	46,29	1,01
shUBE2J1, shHMGN3	43,19	0,80
shUBE2J1, shSMAP1	51,48	1,23
shSMAP1, shHMGN3	157,54	2,89
shUBE2J1, shZNF292, shSMAP1	163,76	1,91
shUBE2J1, shSMAP1, shHMGN3	182,42	3,53
shUBE2J1, shHMGN3, shZNF292	83,87	1,79
shUBE2J1, shHMGN3, shSMAP1, shZNF292	141,23	3,16

Kapitel 5

Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu klären, ob der Nachweis einer 6q-Deletion dazu beiträgt die Klassifizierung der Prostatakarzinome in indolente und aggressive Tumoren bei der initialen Diagnose eines Prostatakarzinoms zu unterstützen. Des Weiteren sollten potentiell Tumor-relevanten Gene der 6q12-q22-Deletion identifiziert werden. Zusätzlich dazu war ein weiteres Ziel dieser Arbeit zu prüfen, ob die Größe der 6q-Deletion eine klinische Relevanz beim Prostatakarzinom besitzt.

Zur Bestimmung der Prävalenz und klinischen Relevanz der 6q-Deletion wurden über 12.000 Prostatakarzinome im TMA-Format mit Hilfe einer 6q15-Sonde mittels FISH untersucht. Eine heterozygote 6q-Deletion konnte in 1.164 (19,2 %) der 6.069 analysierbaren Karzinome nachgewiesen werden. Damit liegt die 6q-Deletionsrate in der vorliegenden Arbeit im unteren Bereich der bisherigen Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen, die eine 6q-Deletion in 13 %-62 % von 19 bis 872 untersuchten Prostatatumoren fanden^[62,89-104]. Die vergleichbar geringe 6q-Deletionsrate in der vorliegenden Studie und die generell hohe Varianz der 6q-Deletionsrate in den anderen Studien beruht vermutlich auf der Verwendung unterschiedlicher Methoden zur Bestimmung der 6q-Kopiezahl. So fanden Studien, die mittels der „LOH Methode“ Verluste auf dem langen Arm des Chromosoms 6 untersuchten, eine 6q-Verlustrate von 13 %-54 %^[89-96]. Eine vergleichbare Varianz der 6q-Deletionsrate von 22 %-62 % wurde mittels SNP, CGH oder aCGH ermittelt^[62,97-104].

Die in der eigenen Untersuchung verwendete FISH ermöglicht den präzisen Nachweis eines Genes oder einer chromosomalen Region direkt am zu untersuchenden Gewebe. Die bisher verwendeten Methoden zur Bestimmung von Verlusten im Bereich des 6q Armes haben im

Gegensatz dazu alle gemeinsam, dass die Analysen an isolierter DNA, die aus zerstörtem Gewebe gewonnen wird, erfolgen. Damit können Messungen des Kopiezahlstatus, mittels dieser Methoden, beeinflusst werden durch Veränderungen des Ploidiestatus der Zellen und durch Verunreinigung der Gewebeproben durch gesunde Zellen oder auch Bindegewebszellen^[140,141]. Bei der FISH hingegen kann der Status der Kopiezahl der untersuchten Region für jeden Tumorzellkern individuell bestimmt werden. Damit können Veränderungen der Kopiezahl eines Gens unabhängig von der Reinheit des Gewebes und dem Ploidystatus der Zelle determiniert werden^[141]. Ein Problem bei der FISH an TMA- und auch Großflächenschnitten ist jedoch, dass es bei der Untersuchung von Deletionen bedingt durch Schnittartefakte zu falsch positiven Ergebnissen kommen kann. Um dies zu vermeiden, wurden in der vorliegenden Arbeit neben einer Referenzsonde, die das Centromer des Chromosomes 6 detektierte, außerdem stringente Kriterien verwendet, die in einer früheren *PTEN*-Deletionsstudie des Instituts für Pathologie erfolgreich etabliert werden konnten. In dieser Studie wurde eine Übereinstimmung von 100 % bei der Ermittlung des *PTEN*-Deletionsstatus mittels FISH und SNP erzielt^[86]. Basierend auf den Ergebnissen dieser Studie wurde daher von einer 6q-Deletion ausgegangen, wenn mindestens 60 % der Tumorzellkerne einen Verlust des 6q-Signales im Vergleich zum Centromer 6-Signal aufwiesen. Um sicherzustellen, dass in der FISH-Analyse alle 6q-deletierten Karzinome detektiert werden, wurde in der vorliegenden Arbeit zudem eine FISH-Sonde hergestellt die gegen das Gen *MAP3K7* gerichtet war. *MAP3K7* ist laut der Literatur eines der potentiell tumorsuppressiven Gene der 6q-Deletion im Bereich 6q15^[62,98,104,114]. Die 6q15 Region konnte bereits in früheren SNP, CGH und aCGH Studien als gemeinsam minimal deletierter Bereich der 6q-Deletion identifiziert werden. In diesen Studien zeigten nahezu 100 % der 6q-deletierten Prostatakarzinome eine Deletion innerhalb der 6q15 Region von der auch das Gen *MAP3K7* betroffen war^[62,83,98,102,104].

Ein weiteres Problem frühere 6q-Deletionsstudien ist die vergleichsweise geringe Fallzahl von 19-872 untersuchten Tumoren^[62,89-104]. Dies und die teilweise artifizielle Zusammensetzung der Studienkohorte kann neben den unterschiedlichen verwendeten Methoden außerdem ein Grund für die hohe Varianz der 6q-Deletionsrate in den vorherigen Studien sein. Eine eigene Studie am Institut für Pathologie konnte zeigen, dass mehr als 6.000 Tumoren notwendig sind, um eine verlässliche Aussage über die Relevanz einer molekularen Veränderung treffen zu können^[142]. Die verwendeten TMAs bestehen aus jeweils einer 0,6 mm durchmessenden Gewebestanze pro Patient. Die TMA Technik hat damit den Vorteil, dass auf einem Objektträger mehrere Hundert Tumoren auf eine Veränderung hin untersucht werden können^[143,144].

Studien konnten zeigen, dass bereits eine solch kleine Gewebestanze ausreicht, um eine repräsentative Aussage über die molekularen Veränderungen eines Karzinoms im Bezug auf deren tumorphänotypische Relevanz zutreffen^[144–146]. Zudem ist der Durchmesser der Gewebestanze vergleichbar mit dem einer Biopsiestanze. Damit ist es wahrscheinlich, dass eine Veränderung die mittels TMA validiert wurde auch bei der initialen Diagnose am Gewebematerial einer Stanzbiopsie nachgewiesen werden kann. Des Weiteren konnte die Prävalenz und klinische Relevanz zahlreicher molekularer Veränderungen, wie zum Beispiel Veränderungen der Proteinexpression oder chromosomale Verluste, auf Grund der Analyse dieses TMAs beim Prostatakarzinom bereits geklärt werden^[71,86,87,139,142,147,148]. Basierend auf der Spezifität der FISH-Analyse, der Verwendung einer 6q15-Sonde zur Detektion der minimal deletierten Region und der hohen Fallzahl konnte die vorliegende Studie zeigen, dass circa 20 % aller Prostatakarzinome eine 6q-Deletion aufweisen. Damit zählt die 6q-Deletion eindeutig zu den häufigsten genomischen Veränderungen des Prostatakarzinoms.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine starke Assoziation der 6q-Deletion zu einem hohen Gleason Score, einem fortgeschrittenen Tumorstadium, erhöhten präoperativen PSA-Werten und einer gesteigerten Proliferation der Tumorzellen gezeigt werden. Damit besteht ein deutlicher Zusammenhang zwischen der 6q-Deletion und einem ungünstigen Phänotyp des Prostatakarzinoms. Dies deutet darauf hin, dass der Verlust der untersuchten 6q-Region substantiell zur Malignität der Prostatakarzinomzellen beiträgt. Damit stehen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit in Einklang mit fünf früheren Studien, deren Daten ebenfalls auf eine Assoziation der 6q-Deletion mit einem hohen Gleason Score^[60,100,104] oder einem fortgeschrittenen Tumorstadium hindeuteten^[92,94].

Neben der Assoziation zu den klinisch-pathologischen Parametern zeigte die 6q-Deletion einen klaren Zusammenhang mit dem Auftreten eines PSA-Rezidivs im Anschluss an eine Prostatektomie. Der Nachweis des postoperativen PSA im Serum des Patienten dient in der Praxis als klinische Verlaufskontrolle der Karzinomerkkrankung^[16]. Der postoperative Anstieg des PSA Wertes über 0,2 ng/ml kann darauf hindeuten, dass keine vollständige Entfernung der Tumorzellen durch die Ektomie erzielt werden konnte oder dass bereits eine nicht diagnostizierte Metastasierung zum Zeitpunkt der Operation vorlag^[16]. Aus diesem Grund ist ein PSA-Rezidiv hinweislich für eine schlechte Prognose bzw. einen ungünstigen Krankheitsverlauf des Patienten. Eine zusätzliche Analyse in den Untergruppen der ERG-negativen und ERG-positiven Tumoren zeigte außerdem, dass die 6q-Deletion unabhängig

vom ERG-Status, mit dem Auftreten eines PSA-Rezidivs assoziiert ist. Eine weitere Analyse in den Untergruppen der Tumoren mit einem niedrigen Gleason Score ($\leq 3 + 4$) und einem hohen Gleason Score ($\geq 4 + 3$) ergab allerdings, dass der Zusammenhang zwischen einer 6q-Deletion und dem PSA-Rezidiv auf die Gruppe der Tumoren mit einem niedrigen Gleason Score beschränkt war. Es ist daher annehmbar, dass der Nachweis einer 6q-Deletion insbesondere zur Klassifizierung dieser klinisch besonders wichtigen Karzinomgruppe geeignet ist. Nur drei frühere Studien untersuchten bisher die prognostische Relevanz der 6q-Deletion und erzielten dabei gegensätzliche Ergebnisse. Während Strohmeyer et al. ebenfalls eine signifikante Assoziation der 6q-Deletion mit dem PSA-Rezidiv in 59 untersuchten Prostatakarzinomen feststellten^[100], konnten Srikantan et al. keinen Zusammenhang zwischen der 6q-Deletion und dem PSA-Rezidiv in 38 analysierten Tumoren zeigen^[90]. Lapointe et al. ordneten in ihrer Studie an 54 Prostatakarzinomen die 6q-Deletion sogar den Tumoren mit einer guten Prognose zu^[98]. Um zu klären, in wieweit die Assoziation der 6q-Deletion mit dem PSA-Rezidiv durch den Zusammenhang der Deletion mit einem ungünstigen Tumorphänotyp bedingt war, wurde zusätzlich eine multivariate Analyse durchgeführt. In dieser Analyse wurden neben dem 6q-Kopiezahlstatus auch die etablierten postoperativ erhobenen Prognoseparameter, wie der Gleason Score, das Tumorstadium, das Vorhandensein von Metastasen in den Lymphknoten und der Tumorbefall des Resektionsrandes sowie der präoperative PSA-Wert verwendet. In dieser Analyse konnte deutlich gezeigt werden, dass der Nachweis einer 6q-Deletion unabhängig von den genannten Parametern eine prognostische Relevanz zur Vorhersage des PSA-Rezidivs besitzt.

Die eindeutige prognostische Relevanz der 6q-Deletion im Bezug auf die Vorhersage eines PSA-Rezidivs führte zu der Frage, ob der Nachweis dieser Deletion geeignet ist, um Patienten nach dem klinisch-biologischen Verhalten ihrer Karzinome weiter einzuteilen. Dies ist insofern wichtig, da das PSA-Rezidiv zwar ein häufig verwendeter Studienendpunkt in Prostatakarzinomstudien zur Identifizierung von prognostischen Markern ist, allerdings eine genaue Vorhersage des Krankheitsverlaufes nicht ermöglicht^[149–151]. Grund dafür ist, dass circa ein Drittel der Patienten im Anschluss an eine Prostataektomie ein PSA-Rezidiv erleiden^[149,150]. Einen lebensbedrohlichen Krankheitsverlauf entwickeln aber nicht mal die Hälfte dieser Patienten. Studien konnten zeigen, dass bei nur 10 %-30 % der PSA-Rezidiv-Patienten 4 bis 8 Jahren nach Auftreten des PSA-Rezidivs eine Metastasierung diagnostiziert wird^[150,152]. Dazu kommt das immerhin fast 20 % der Patienten innerhalb von 8 Jahren nach Auftreten des PSA-Rezidivs an anderen Erkrankungen versterben^[150]. Des Weiteren ist die Überle-

bensrate von Patienten mit oder ohne PSA-Rezidiv sehr ähnlich (mit Rezidiv: 88 %, ohne Rezidiv: 93 %) ^[153]. Es ist daher zwingend notwendig weitere Studienendpunkte zu prüfen, um potentiell prognostisch relevante Marker über das Auftreten eines PSA-Rezidivs hinaus zu validieren. Aus diesem Grund wurden am Institut für Pathologie in Zusammenarbeit mit der Martini-Klinik vier neue Studienendpunkte definiert, welche die wesentlichen biologischen und klinischen Charakteristika eines Prostatakarzinoms berücksichtigen. Dazu zählen das auf die Prostata lokal begrenzte Wachstum des Tumors, das über die Prostata kapsel hinausgehende Tumorstadium, das Auftreten eines PSA-Rezidivs ohne Nachweis einer Metastasierung (Lokalrezidiv) sowie die lymphogene bzw. hämatogene Metastasierung. Die Analyse der neuen klinischen Endpunkte ergab eine klare Assoziation der 6q-Deletion mit einem aggressiven Tumorphänotyp und damit mit einer schlechten Prognose für den Patienten. Das Risiko eines Lokalrezidivs oder einer lymphogenen bzw. hämatogenen Metastasierung war um das 1,6 fache höher bei Tumoren mit einer nachgewiesenen 6q-Deletion im Vergleich zu der Gruppe der Tumoren mit einem normalen 6q-Kopiezustand. Dementsprechend war die Wahrscheinlichkeit eines lokalbegrenzten Tumors in der Gruppe der Karzinome mit einer 6q-Deletion wesentlich geringer als in der Gruppe der Karzinome ohne 6q-Deletion. Eine zusätzliche Analyse in den Untergruppen der Tumoren mit einem niedrigen ($\leq 3 + 4$) und einem hohen ($\geq 4 + 3$) Gleason Score zeigte wiederum, dass diese Assoziation durch die klinisch besonders relevante Gruppe der Tumoren mit einem geringen Gleason Score bedingt war. Während die Verteilung der neuen Studienendpunkte in der Gruppe der Tumoren mit einem geringen Gleason Score vergleichbar war mit der Verteilung dieser bei der Analyse aller Karzinome, führte der Nachweis der 6q-Deletion in den Tumoren mit einem hohem Gleason Score nicht mehr zu einem erhöhten Risiko für eine der vier getesteten Endpunkte. Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass der Nachweis einer 6q-Deletion mit einem aggressiven Tumorphänotyp einhergeht und damit eine prognostische Relevanz beim Prostatakarzinom besitzt. Insbesondere zur Identifizierung der potentiell aggressiveren Tumoren mit einem niedrigen Gleason Score, die in der Regel eine eher günstige Prognose aufweisen, scheint die 6q-Deletion geeignet zu sein. Allerdings reicht der alleinige Nachweis einer 6q-Deletion nicht aus, um eine absolut sichere individuelle Prognose für den Patienten zu liefern.

Ein wesentlicher Aspekt bei der Beurteilung der klinischen Bedeutung von Prognoseparametern ist der Zeitpunkt zu dem die genomische Veränderung während der Tumorstadium entsteht. Alterationen die zu einem frühen Zeitpunkt des Tumorstadiums auftreten oder

sogar zur Entstehung des Karzinoms beitragen müssten in großen Teilen des Tumors homogen vorhanden sein. Im Gegensatz dazu wären Veränderungen die zu einem späten Zeitpunkt innerhalb der Progression entstehen nur in Teilen des Tumors nachweisbar. In diesem Fall ist von einer heterogenen Verteilung auszugehen. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die präoperative histo-pathologische Diagnostik eines Prostatakarzinoms ausschließlich an Biopsiematerial erfolgen kann wird deutlich, dass das Fehlen einer typischerweise heterogenen Veränderung in den Tumorzellen einer Biopsiestanze nicht sicher als negatives Ergebnis gewertet werden kann. Ein Problem bei der Untersuchung potentiell prognostisch relevanter Marker beim Prostatakarzinom ist zusätzlich das eine Vielzahl von Tumoren multifokal vorkommen^[49,50]. Dies bedeutet, dass innerhalb einer Prostata mehrere Tumorfoci existieren die aus unterschiedlichen Ursprungszellen entstanden sind. Daraus resultiert die Möglichkeit, dass die Tumorfoci sich bezüglich der molekularen Veränderungen stark unterscheiden können^[51,154,155]. Um zu prüfen, ob der Nachweis einer genomischen Veränderung geeignet ist für den Einsatz in der klinischen Diagnostik muss folglich der Status der intrafokalen (innerhalb eines Fokus) und der interfokalen (zwischen den Foci) Heterogenität bestimmt werden.

Zur Bestimmung der Heterogenität einer 6q-Deletion wurde der am Institut für Pathologie entwickelte Heterogenitäts-TMA verwendet. In Anbetracht dessen, dass die Heterogenität eine molekulare Veränderung zu einer starken Limitierung der Anwendbarkeit in der Diagnostik aber auch in der Therapie führt, ist es erstaunlich, dass nur wenige Studien eine systematische Untersuchung der Heterogenität von potentiellen molekularen Prognosemarkern durchführten. Des Weiteren ist ein häufiges Problem der wenigen Heterogenitätsstudien, dass diese in der Regel nur einen Tumorblock pro Patient bzw. Karzinom untersuchten^[156–158]. Es ist jedoch schwer vorstellbar, dass die Analyse nur eines Tumorblockes zu einer verlässlichen Aussage über eine möglicherweise heterogene Verteilung einer Veränderung führt. Damit ist die Aussagekraft solcher Studien stark eingeschränkt. Um bessere Aussagen treffen zu können, wurde am Institut für Pathologie ein Heterogenitäts-TMA entwickelt, der pro Patient 10 Prostatakarzinomstanzen aus 10 verschiedenen Tumorböcken enthält^[52]. Zur Berücksichtigung des häufigen Auftretens von multifokalen Tumoren wurden sowohl Patienten mit multifokalen als auch unifokalen Karzinomen für die Herstellung des TMAs ausgewählt. Die Analyse einer Tumorstanze aus zehn verschiedenen Tumorböcken im TMA-Format bietet die Möglichkeit einer drei-dimensionalen Untersuchung einer molekularen Alteration über den gesamten Tumorbereich hinweg in einer großen Anzahl an Patienten. Dies führt damit zu einer deutlichen Steigerung der Repräsentativität im Vergleich zu anderen Heterogenitätsstu-

dien, in denen mehrere Tumorstanzen aus nur einem Tumorblock entnommen wurden^[156–158]. In circa 50 % der 6q-deletierten Tumorfoci war die Deletion nicht in allen Gewebestanden des Tumorfokus nachweisbar. In der vorliegenden Arbeit konnte damit erstmals gezeigt werden, dass die 6q-Deletion eine deutlich heterogene Verteilung beim Prostatakarzinom aufzeigt. Diese Heterogenität erklärt auch die etwas höhere 6q-Deletionsrate von 24,6 % im Vergleich zur 6q-Deletionsrate von 19,2 % bei der Analyse des Prognose-TMAs, wo nur eine Stanze pro Patient analysiert wurde. In einer weiteren Studie des Instituts für Pathologie wurde derselbe TMA bereits verwendet um die Heterogenität der *PTEN*-Deletion zu untersuchen. In dieser Studie war die Heterogenität der *PTEN*-Deletion mit 92 % heterogener Tumorfoci im Vergleich zur Heterogenität der 6q-Deletion wesentlich stärker ausgeprägt^[53]. Nichts desto trotz limitieren die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deutlich die alleinige Anwendung der 6q-Deletion als molekularen Marker für den Nachweis in nur einer Biopsiestanze.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu klären, ob die 6q-Deletion mit anderen häufigen genomischen Veränderungen des Prostatakarzinoms assoziiert ist und somit einer bestimmten molekularen Untergruppe zu geordnet werden kann. Die häufigste genomische Veränderung beim Prostatakarzinom ist die *TMPRSS2:ERG* Fusion, die in circa 50 % aller Prostatakarzinome vorkommt^[62,71,159]. Hierbei entsteht bedingt durch eine Deletion auf Chromosom 21 eine Fusion zwischen der Androgen-regulierten Serinprotease *TMPRSS2* und dem Transkriptionsfaktor *ERG*. Dadurch gelangt das *ERG* Gen unter die Kontrolle des *TMPRSS2* Promotors und es erfolgt eine Expression von ERG in den betroffenen Prostatakarzinomzellen^[70]. Studien anderer Arbeitsgruppen und der eigenen Arbeitsgruppe konnten bereits zeigen, dass einige der häufigsten Deletionen deutlich mit dem ERG-Status assoziiert sind. So konnten Deletionen von *PTEN* (10q23)^[62,86,160,161], *TP53* (17p13)^[62,76], 3p13^[62,83] und 16q23^[98,162,163] der Untergruppe der ERG-positiven Tumoren zugeordnet werden, während Deletionen von 5q21 häufiger in der Untergruppe der ERG-negativen Karzinome vorkommen^[62,87,164]. Die 6q-Deletion zeigte in der vorliegenden Arbeit eine deutliche Assoziation zu den ERG-negativen Tumoren unabhängig davon ob der ERG-Status mittels FISH oder IHC ermittelt wurde. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie stehen damit in Einklang mit früheren Studien die ebenfalls die 6q-Deletion klar der Untergruppe der ERG-negativen Tumoren zu ordnen konnten^[98,163,165]. Des Weiteren war die Verteilung der Tumoren bezüglich des Tumorphänotyps, zum Beispiel gemessen am Gleason Score und dem Tumorstadium, in den Untergruppen der ERG-negativen und ERG-positiven Tumoren sehr ähnlich. Daher kann ausgeschlossen werden, dass die Assoziation der 6q-Deletion mit den

ERG-negativen Karzinomen durch die Assoziation der Deletion mit einem schlechten Tumorphänotyp bedingt war. Es ist bereits bekannt, dass die *TMPRSS2:ERG* Fusion vor allem bei jungen Patienten auftritt und zudem eine zentrale Rolle in der frühen Entwicklung und Progression von Prostatakarzinomen einnimmt^[59,166,167]. Es ist annehmbar, dass die Entstehung einer 6q-Deletion dazu führt, dass zelluläre Prozesse unterdrückt werden, die zur Entwicklung der *TMPRSS2:ERG* Fusion führen. Es ist jedoch ebenso möglich, dass ERG-negative Tumorzellen, die zusätzlich eine 6q-Deletion aufweisen, einen Selektionsvorteil gegenüber Tumorzellen besitzen, die sowohl eine ERG Expression als auch eine 6q-Deletion aufzeigen. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass eine bestehende *TMPRSS2:ERG* Fusion die Entstehung einer 6q-Deletion verhindert. Des Weiteren könnte angenommen werden, dass die 6q-Deletion wie auch die *TMPRSS2:ERG* Fusion ein frühes Ereignis innerhalb der Karzinogenese von Prostatatumoren ist. Dagegen sprechen jedoch die Ergebnisse der in vorliegender Arbeit durchgeführten Heterogenitätsanalyse, da circa 50 % der 6q-deletierten Tumorfoci heterogen waren und dies eher gegen ein frühes Ereignis in der Tumورprogression spricht.

Die chronologische Abfolge von genomischen Veränderungen ist insbesondere im Hinblick auf die mögliche Verwendbarkeit eines eigentlich heterogenen Markers als diagnostischen, prognostischen oder prädiktiven Parameter von großem Interesse. Um die Chronologie der 6q-Deletion und der *TMPRSS2:ERG* Fusion zu untersuchen, wurden die Daten aus der oben genannten 6q-Heterogenitätsstudie mit den immunohistochemischen Daten zum ERG-Status aus einer vorherigen Studie des Instituts für Pathologie korreliert^[52]. Bei Vorliegen einer kausalen Beziehung zwischen diesen beiden Veränderungen während der Tumورprogression, wäre in dieser Analyse zu erwarten, dass Tumorfoci existieren, die eine kleine Region aufweisen, in der beide Veränderungen vorkommen. Außerhalb dieser kleinen Region wäre allerdings nur die Veränderung nachweisbar, die als erstes entstanden ist. Da in 6 der 42 homogen ERG-positiven Tumorfoci eine fokale 6q-Deletion nachweisbar war, lässt darauf schließen, dass die *TMPRSS2:ERG* Fusion die Entstehung einer 6q-Deletion nicht verhindert. Bemerkenswert ist, dass in keinem der 16 homogen 6q-deletierten Tumorfoci ein kleiner ERG-positiver Bereich vorhanden war. Dies unterstützt die Hypothese einer protektiven Wirkung der 6q-Deletion auf die Entstehung einer *TMPRSS2:ERG* Fusion. Es ist daher annehmbar, dass der Verlust von zumindest einem der 6q-deletierten Gene direkt oder indirekt die Entwicklung der *TMPRSS2:ERG* Fusion verhindert.

DNA-Schäden, insbesondere Doppelstrangbrüche können während der Aktivierung verschiedener transkriptioneller Programme entstehen. Eine gesunde Zelle reagiert darauf mit Zellzyklusarrest, Seneszenz und/oder Apoptose. Bei einer ungenügenden Aktivierung der Reparaturmechanismen kann es jedoch zu Rearrangements, Amplifikationen und Deletionen kommen^[168–171]. Es ist bereits bekannt, dass die Androgen-vermittelte Aktivierung von transkriptionellen Programmen, die zu sogenannten „transkriptionellen Hubs“ führen, in einer Fusion von Genen der ETS-Familie mit Androgen-regulierten Genen in malignen Prostataepithelzellen resultieren kann. Das häufigste Rearrangement ist hier die *TMPRSS2:ERG* Fusion^[165,171,172]. Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass das Auftreten dieser Rearrangements durch eine veränderte Funktion von Chromatin-modifizierenden Genen beeinflusst wird^[173]. Neuere Studien konnten außerdem verschiedenen Chromatin-regulierenden Genen eine zentrale Rolle beim Prostatakarzinom nachweisen^[59,62,65]. In einer eigenen Studie der Arbeitsgruppe konnte eine bemerkenswert starke inverse Assoziation der 5q21-Deletion mit der *TMPRSS2:ERG* Fusion gezeigt werden. In dieser Studie von Burkhardt et al. konnte außerdem das Chromatin-modifizierende Gen Chromodomain Helicase DNA Binding Protein 1 (*CHD1*) als eines der Zielgene dieser Deletion identifiziert werden. Die reduzierte CHD1-Expression führte außerdem *in vitro* zu einer starken Verminderung der durch DHT induzierten *ERG*-Brüche in den untersuchten Prostatakarzinomzellen^[87]. Es ist daher vorstellbar, dass innerhalb der 6q-Deletion zumindest ein Gen lokalisiert ist, dessen Funktionsverlust oder Verminderung ebenfalls die Induktion der *TMPRSS2:ERG* Fusion beeinträchtigt. Der Zusammenhang zwischen der 6q-Deletion und einem ERG-negativen Status könnte jedoch auch durch die Assoziation der 6q-Deletion mit weiteren häufigen Veränderungen des Prostatakarzinoms bedingt sein.

Zu den häufigsten Veränderungen beim Prostatakarzinom, zählen neben der *TMPRSS2:ERG* Fusion, Deletionen unterschiedlicher chromosomaler Regionen. Für einige dieser Regionen konnte bereits eine Assoziation zum Phänotyp und der Prognose beim Prostatakarzinom gezeigt werden^[76,83,86,87]. Eines der primären Forschungsziele des Instituts für Pathologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf ist der Aufbau einer molekularen Datenbank anhand der Analyse zahlreicher genomischer und molekularer Veränderungen am Prostata-Prognose-TMA. Durch die Verwendung dieser Datenbank bot sich in der vorliegenden Arbeit die Möglichkeit den Zusammenhang der 6q-Deletion mit 15 der häufigsten deletierten Regionen beim Prostatakarzinom zu prüfen. Kein Zusammenhang bestand zwischen der 6q-Deletion und Deletionen auf Chromosom 12q24.31, 3p13, 16q24, 10q23.31 und 17p13.1, die

gehäuft in ERG-positiven Tumoren vorkommen^[62,76,83,86,98,160–163]. Das Fehlen einer Assoziation zu diesen Deletionen war komplett unerwartet. Da die 6q-Deletion eine klare Assoziation zu den ERG-negativen Tumoren besitzt, wäre es annehmbar gewesen, dass zumindest die stark ERG-positiv assoziierten Deletionsregionen wie zum Beispiel 10q23.31, 17p13.1, 16q24 und 3p13 einen inversen Zusammenhang mit der 6q-Deletion zeigen. Im Gegensatz dazu zeigte die 6q-Deletion eine stark ausgeprägte Assoziation zu Verlusten von chromosomalen Regionen auf dem 2q Arm und zu Deletionen im Bereich 5q13 und 5q21. Für alle diese Deletionsregionen konnte mit Hilfe der molekularen Datenbank und in früheren Studien ein deutlicher Zusammenhang mit dem Fehlen einer *TMPRSS2:ERG* Fusion nachgewiesen werden^[62,87,164]. Es ist daher annehmbar, dass über diese Arbeit hinausgehende Analysen dazu führen können, molekulare Untergruppen zu definieren, die mit bestimmten phänotypischen Merkmalen des Prostatakarzinoms einhergehen. Es besteht die begründete Hoffnung, dass die Identifizierung solcher Untergruppen, die Entwicklung von diagnostischen Tests unterstützt und damit zu einer Verbesserung der momentanen Situation für den Patienten durch eine individuellere Diagnose führt.

Der Zusammenhang der 6q-Deletion mit weiteren häufigen genomischen Veränderungen deutet darauf hin, dass der Verlust von Genen auf unterschiedlichen Chromosomen gemeinsam zu einem Tumor-relevanten Effekt führt. Um diese Hypothese zu bestätigen müssten Gene unterschiedlicher Deletionsregionen identifiziert werden, welche anhand ihres Funktionsverlustes auf einen möglichen kooperativen oder additiven Effekt innerhalb der Tumorprogression schließen lassen. Eine Möglichkeit zur Identifizierung solcher Gene ist die Untersuchung von Genen innerhalb der minimal deletierten Regionen von unterschiedlichen Chromosomen. In der kürzlich veröffentlichten Studie von Rodrigues et al. konnte ein solch kooperativer Effekt für die Gene *MAP3K7* und *CHD1* gezeigt werden^[174]. Diese Gene sind in den minimal deletierten Regionen der 6q- und 5q-Deletion lokalisiert. Frühere Arbeiten konnten bereits zeigen, dass die 5q21-Deletion ebenfalls vermehrt in Tumoren mit einem schlechten Phänotyp und einer schlechten Prognose für den Patienten vorkommt^[87]. Des Weiteren konnte sowohl in der vorliegenden Arbeit als auch in Studien anderer Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass die Regionen 6q15 und 5q21 beim Prostatakarzinom häufig ko-deletiert sind^{[164][174]}. In der Studie von Rodrigues et al. führte die gemeinsame Suppression von *MAP3K7* und *CHD1* zu einem deutlich stärkeren Tumor-begünstigenden Effekt als die reduzierte Expression eines dieser Gene alleine, sowohl im Zelllinienmodell als auch *in-vivo*. So führte die kombinierte Suppression von *MAP3K7* und *CHD1* im Mausmodell zur Ausbildung von atypischen Drü-

senzellen, PIN und letztendlich Karzinomzellen. Zusätzlich dazu führte die Ko-Suppression zu einer massiven Steigerung des Tumorwachstums und zu einer starken Reduzierung der Lebenszeit der Mäuse im Vergleich zur Suppression nur eines der beiden untersuchten Gene^[174]. Es ist daher annehmbar, dass noch weitere zahlreiche Gene innerhalb der häufigsten Deletionen lokalisiert sind, die durch solch kooperative Effekte einen ungünstigen Tumorphänotyp verursachen. Des Weiteren besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass auf einem Chromosom mehrere Gene lokalisiert sind, deren gemeinsamer Verlust durch nur eine Deletion auf diesem Chromosom zu einem Tumor-begünstigenden Effekt führt.

Frühere SNP, CGH und aCGH Studien konnten zeigen, dass die 6q-Deletion beim Prostatakarzinom je nach Ausdehnung unterschiedliche große Bereiche des langen Arms des Chromosoms 6 umfasst. Neben der minimal deletierten Region im Bereich 6q15, die 800 Kilobasen bis 4 Megabasen umfasst, existieren auch weitaus größere 6q-Deletionen von denen bis zu 65 Megabasen betroffen sind^[60,62,83–85,97,98,102,104]. Unter Berücksichtigung der Deletionsgröße können also zwischen einigen wenigen Genen bis zu mehr als 200 Gene von der 6q-Deletion betroffen sein. Frühere Studien unterlagen der Annahme, dass das oder die Zielgene der 6q-Deletion innerhalb der minimal deletierten Region lokalisiert sein müssen, da von dieser fast alle deletierten Tumoren betroffen sind^[62,98,102,104]. Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Ausdehnungen der 6q-Deletion scheint diese Hypothese jedoch nicht mehr haltbar zu sein. Vielmehr liegt die Vermutung nahe, dass innerhalb der 6q-Deletion, die in einigen Fällen immerhin nahezu den gesamten q-Arm umfasst, mehrere Tumor-relevante Gene lokalisiert sind.

Dieser Hypothese entsprechend, konnte in der vorliegenden Arbeit für die vier Gene *UBE2J1* (6q15), *ZNF292* (6q14.3), *HMGN3* (6q14.1) und *SMAP1* (6q13) eine potentiell tumorsuppressive Funktion nachgewiesen werden. Identifiziert wurden diese Gene innerhalb eines Screenings in dem der Effekt einer shRNA-vermittelten Suppression von 37 Genen innerhalb der Region 6q12-q22 auf das Zellwachstum mittels Colony-Formation-Assay in der benignen Prostatazelllinie BPH-1 und den malignen Prostatazelllinien PC-3 und DU 145 untersucht wurde. Der Colony-Formation-Assay ist ein schnelles und einfaches Verfahren zur Testung von relevanten Effekten auf das Zellwachstum. Gemessen wird der Einfluss auf das Zellwachstum anhand der Anzahl und Größe der Zellkolonien im Anschluss an die Veränderung der Ausgangszellen. Die Anzahl der Zellkolonien in den veränderten Versuchsansätzen wird dann mit der Anzahl der Zellkolonien in der Negativkontrolle verglichen. Ein Tumorsuppressor-

gen ist dadurch charakterisiert, dass der Funktionsverlust dieser Gene zu einem relevanten wachstumsbegünstigenden Effekt für die betroffenen Zellen führt^[175]. Dementsprechend ist zu erwarten, dass die Suppression eines Tumorsuppressorgenes im Colony-Formation-Assay zu einer deutlichen Erhöhung der Koloniezahl und -größe, im Vergleich zur Negativkontrolle, führt. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass bereits Gene identifiziert werden konnten, die zusätzlich zu ihrer tumorsuppressiven Funktion eine für das Wachstum essentielle Funktion aufweisen^[175,176]. Ein Beispiel dafür ist das bekannte Tumorsuppressorgen *PTEN*^[87,176]. Bei diesen Genen besteht ein von der Expression dosisabhängiger Effekt auf das Zellwachstum. Durch das Unterschreiten eines bestimmten Expressionsniveaus dieser Gene kommt es zu einer starken Reduktion der Proliferationsfähigkeit oder zum Tod der betroffenen Zellen^[177]. Dementsprechend führt die Suppression dieser „essentiellen“ Tumorsuppressorgene im Colony-Formation-Assay zu einer deutlich geringeren Anzahl der Zellkolonien im Vergleich zur Negativkontrolle. Die Suppression der Gene *UBE2J1*, *ZNF292*, *HMGN3* und *SMAP1* führte im Colony-Formation-Assay zu einer deutlichen Steigerung der Koloniezahl im Vergleich zu den Negativkontrollen shGFP und shNeg. Da der Effekt der Suppression dieser Gene zudem in allen drei getesteten Zelllinien vergleichbar war, kann ein Zelllinien spezifischer Einfluss durch bereits vorhandene genomische Veränderungen weitgehend ausgeschlossen werden. Zusätzlich war der wachstumssteigernde Effekt vergleichbar mit der Suppression des bekannten nicht „essentiellen“ Tumorsuppressorgenes *RB1*^[87,178]. Damit konnten diese vier Gene als potentiell tumorsuppressive Gene der 6q-Deletion identifiziert werden. Die Ergebnisse dieser Analysen stehen durchaus im Einklang mit den bisher bekannten Funktionen dieser Gene.

UBE2J1 (Ubiquitin-Conjugating Enzyme E2) kodiert für das Ubiquitin-konjugierte Enzym E2, welches notwendig ist für die Ubiquitin-Markierung von Proteinen durch die Ubiquitin Ligasen E3 für die transkriptionelle Aktivität, den Transport und die Degradation der Proteine^[179]. Das Ubiquitinsystem spielt eine Rolle in zahlreichen zellulären Prozessen und Signalkaskaden. Es ist involviert in die posttranslationale Modifikation, den Abbau von beschädigten Proteinen, der Regulation des Zellzykluses und der Transkription^[179]. Es ist bereits bekannt, dass die Fehlregulierung der Ubiquitinierung zur Entstehung von malignen Zellen beiträgt, da es zu einer Akkumulation von Onkogenen und Transkriptionsfaktoren in verschiedenen Zellkompartimenten kommen kann. Diese Akkumulation resultiert in Änderungen der Expression von tumorbegünstigenden und tumorsuppressiven Genen und führt letztendlich zur Tumorprogression^[179]. Studien konnten zeigen, dass Alterationen von Enzy-

men des Ubiquitinsystems zu einer Initiation und Progression von Karzinomen unterschiedlicher Entitäten führen können^[179]. So wird zum Beispiel die Aktivität und Expression zweier bekanntesten Tumorsuppressorgene *PTEN* und *TP53* teilweise über die Ubiquitinierung durch die Ligasen NEDDL-1^[180] und MDM2^[181] reguliert.

ZNF292 (Zinc Finger Protein 292) zählt zur Gruppe der Zinkfingerproteine die durch die Interaktion mit DNA-Abschnitten zur Regulation der Transkription beitragen^[182]. Über die genaue Funktion von ZNF292 ist jedoch nur wenig bekannt. Beschrieben ist die Aktivierung der Expression der Polymerase II durch ZNF292, welche auf eine Bedeutung von ZNF292 innerhalb der allgemeinen Transkription von Genen hindeutet^[182]. Des Weiteren wurde das paraloge Gen *ZNF654* als ein putatives Tumorsuppressorgen bei Karzinomen der Eierstöcke beschrieben^[183]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten jedoch daraufhin, dass *ZNF292* zur Klasse der Tumorsuppressorgene zählt. In zukünftigen Studien sollte daher geklärt werden, ob die Suppression von *ZNF292* zu tumorrelevanten Änderungen im Transkriptom der Zelle führt.

SMAP1 (small ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein) ist eine für den ADP-Ribosylierungsfaktor 6 spezifische aktivierende GTPase. Damit besitzt SMAP1 eine Funktion beim Membrantransport von Proteinen und dem Aktinremodeling. Basierend darauf wird vermutet, dass SMAP1 eine Rolle bei der Entwicklung von instabilen Mikrosatelliten im Genom und damit in der Karzinogenese besitzt^[184–186]. Vergleichbar mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit konnte in der Studie von Sangar et al. gezeigt werden, dass die Inaktivierung von *SMAP1* durch Mutationen zu einer gesteigerten Zellproliferation und einem erhöhten Koloniebildungsvermögen *in vitro* führt. Begründet ist dies durch eine verkürzte G2/M Phase des Zellzykluses^[187].

HMGN3 (High Mobility Group Nucleosomal Binding Domain 3) zählt zur Familie der HMGN Proteine. Die HMGN Proteine beeinflussen durch die Bindung an die Nukleosom-Core-Partikel die Chromotinstruktur und die posttranslationale Modifikation von Histonen. Dies bedeutet, dass die HMGN Proteine einen Einfluss auf die Zusammensetzung des zellulären Transkriptoms besitzen. Des Weiteren wird vermutet, dass diese Proteine eine Rolle bei epigenetischen Prozessen spielen, die ebenfalls die Genexpression beeinflussen^[188]. Dementsprechend reguliert HMGN3 eine Vielzahl von Genen, die zum Beispiel auch eine Funktion im Glukose- und Lipidstoffwechsel aufweisen. Dazu zählt unter anderem das potentielle Tumor-

suppressorgen *AZGP1*, dessen Inaktivierung mit einer gesteigerten Zellproliferation, einem schlechtem Tumorphänotyp und einer ungünstigen Prognose des Prostatakarzinoms assoziiert ist^[189].

Bemerkenswert ist, dass bereits das Screening von einem Fünftel der Gene in der Region 6q12-q22 zur Identifizierung von vier potentiellen Tumorsuppressorgenen führte. Zudem war die Suppression der identifizierten potentiellen Tumorsuppressorgene ausreichend, um einen wachstumsbegünstigenden Effekt zu erzielen. Dies deutet daraufhin, dass bereits die Haploinsuffizienz dieser Gene zur Auslösung des Tumor-relevanten Effekts ausreicht. Diese Hypothese wird unterstützt durch das vollständige Fehlen von homozygoten 6q-Deletion in allen in dieser Arbeit durchgeführten FISH-Analysen. Des Weiteren sind keine inaktivierenden Punktmutationen von 6q-deletierten Genen beim Prostatakarzinom in der Literatur bekannt^[59,62,64,72]. Basierend darauf ist es annehmbar, dass die gemeinsame Deletions-bedingte Suppression mehrerer haploinsuffizienten Gene gemeinsam zur Progression und eventuell auch Aggressivität der Prostatakarzinome beiträgt.

Um zu testen, ob die in dieser Arbeit identifizierten potentiellen Tumorsuppressorgene einen kooperativen Effekt auf das Zellwachstum besitzen, wurden diese in der malignen Zelllinie DU 145 ko-supprimiert. Diese Analyse zeigte, dass unabhängig von der Kombination der Gene die Ko-Suppression zu einer Erhöhung der Wachstumsfähigkeit der Zellen führt. Die gemeinsame Suppression aller vier Gene hatte dabei den größten wachstumssteigernden Effekt gemessen an der Koloniegröße im Colony-Formation-Assay und auf die Fähigkeit zum verankerungsunabhängigen Wachstum im Softagar-Colony-Formation-Assay. Basierend darauf ist anzunehmen, dass die Auswirkungen der 6q-Deletion auf das Karzinomwachstum abhängig von der Anzahl der von der Deletion betroffenen Gene sind. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stehen in Einklang mit der Studie von Xue et al. in der kooperative Effekte der Gene innerhalb der 8p11-p23-Deletion in hepatozellulären Karzinomen im Mausmodell nachgewiesen werden konnten^[190]. Insgesamt deuten die Ergebnisse daraufhin, dass ein kooperativ wirkender Tumor-begünstigender Effekt der reduzierten Aktivität der gemeinsam deletierten Gene besteht und damit die Auswirkungen der Deletion auf den Phänotyp der Karzinome vermutlich abhängig von der Deletionsgröße ist. Des Weiteren widersprechen die Ergebnisse dieser Arbeit der Hypothese, dass nur ein tumorsuppressives Gen die Entstehung von großen Deletionen herbeiführt. Zweifelsohne erklären die Ergebnisse dieser Arbeit damit, warum die Suche nach einem „klassischen“ Tumorsuppressorgen entsprechend der Second-Hit Theorie

von Knudson^[191] bisher in den minimal deletierten Regionen der häufigsten Deletionen beim Prostatakarzinom erfolglos war.

Der Nachweise von vier potentiell tumorsuppressiven Genen in unterschiedlichen Regionen des 6q-Arms, sowie die Ergebnisse der Ko-Suppression dieser Gene resultierte in der Annahme, dass die Größe der Deletion einen Einfluss auf die Stärke des Tumor-begünstigenden Effekts der 6q-Deletion besitzt. Aus diesem Grund war ein weiteres wesentliches Ziel der vorliegenden Arbeit zu prüfen, ob die Ausdehnung der 6q-deletierten Region in Zusammenhang mit den klinisch-pathologischen Parametern und der Prognose des Patienten beim Prostatakarzinom steht. Dazu wurden fünf Sonden, welche die Bereiche 6q12, 6q14, 6q15, 6q16 und 6q22 markierten, anhand des Prostata-Prognose-TMAs auf ihren Kopiezahlstatus mittels FISH analysiert. In dieser Analyse konnten im Wesentlichen drei unterschiedliche „Größen“ der 6q-Deletion in 573 von 3.725 für alle fünf FISH-Sonden analysierbaren Prostatakarzinomen nachgewiesen werden. In 61 % der 6q-deletierten Tumoren waren kleine Deletionen der Region 6q14-q16, in 26 % mittlere Deletion im Bereich 6q14-q22 und in 13 % große Deletionen die mindestens die Region 6q12-q22 umfassten vorhanden. Dies zeigt deutlich, dass die 6q-Deletion in einem großen Teil der deletierten Karzinome weit über den minimal deletierten Bereich innerhalb der Region 6q15 hinausgeht. Die Ergebnisse dieser Analyse stehen damit in Einklang mit der Häufigkeit und Ausdehnung der 6q-Deletion in früheren aCGH und SNP Studien anderer und der eigenen Arbeitsgruppe^[62,83–85].

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich keine Assoziation zwischen der Expansion der 6q-Deletion und den klinisch-pathologischen Parametern des Prostatakarzinoms. Allerdings konnte ein deutlicher Anstieg der Proliferationsrate der Zellen, gemessen am Ki67LI, in Abhängigkeit von der Ausdehnung der 6q-Deletion gemessen werden. Tumorzellen mit einer großen Deletion im Bereich 6q12-q22 wiesen dabei eine wesentlich höhere Teilungs- und Wachstumsgeschwindigkeit auf, als Tumorzellen mit einer 6q14-q16 Deletion. Diese Assoziation zeigte sich außerdem unabhängig vom ERG-Status und dem Gleason Score. Die Ergebnisse dieser Untersuchung stehen in Einklang mit den *in vitro* Versuchen in der vorliegenden Arbeit, in denen die Ko-Suppression der Gene *HMGN3*, *SMAP1*, *UBE2J1* und *ZNF292* zu einer deutlichen Wachstumssteigerung, wie auch einer Erhöhung der Metastasierungsfähigkeit der Prostatakarzinomzellen im Vergleich zur Suppression nur eines Genes führte. Bemerkenswert ist hier außerdem, dass die 6q-Deletionen in allen Regionen ausnahmslos heterozygot waren. Dies unterstützt das Konzept der kooperativ wirkenden haplo-insuffizienten

Gene in den Deletionsregionen des Prostatakarzinoms. Damit ist es annehmbar, dass Tumoren mit einer großen Deletion ein höheres Aggressivitätspotential besitzen als Tumoren mit eher kleinen 6q-Deletion. Dies zeigte sich auch bei der Assoziation der Deletionsgröße mit dem PSA-Rezidiv. Hier hatte die Größe der 6q-Deletion einen deutlichen Einfluss auf die Prognose des Patienten. Während circa 50 % der Patienten mit einer großen 6q-Deletion in den Karzinomzellen bereits nach 60 Monaten ein biochemisches Rezidiv erlitten, konnte zu diesem Zeitpunkt erst bei 30 % bis 40 % der Patienten mit einer kleinen oder mittleren 6q-Deletion im Tumor ein PSA-Rezidiv nachgewiesen werden. Dieser Zusammenhang war unabhängig vom ERG-Status. Eine Analyse der Untergruppen der Tumoren mit einem niedrigen ($\leq 3 + 4$) und einem hohen Gleason-Score ($\geq 4 + 3$) zeigte jedoch, dass diese Assoziation vor allem durch die Tumoren mit einem niedrigen Gleason-Score bedingt war. Unterstützt werden diese Ergebnisse durch die zusätzliche Analyse der 6q-Deletionsgröße im Zusammenhang mit den neuen klinischen Endpunktgruppen. Die Wahrscheinlichkeit eines aggressiven okkult systemischen oder metastasierenden Tumors stieg hier, mit dem Nachweis von großen 6q-Deletionen im Vergleich zu kleinen 6q-Deletion, deutlich an. Zusätzlich dazu konnte in einer multivariaten Analyse gezeigt werden, dass die 6q-Deletionsgröße unabhängig von den etablierten Prognoseparametern, wie zum Beispiel dem Gleason-Score und dem Tumorstadium, mit der Wahrscheinlichkeit eines PSA-Rezidivs assoziiert war. Vergleichbare Ergebnisse wurden kürzlich von drei Arbeitsgruppen publiziert. In den Studien von Hieronymus et. al und Lalonde et al. konnte gezeigt werden, dass der prozentuale Anteil an Kopiezahlverlusten gemessen am gesamten Genom positiv mit der Wahrscheinlichkeit des PSA-Rezidivs und der Entwicklung von Metastasen beim Prostatakarzinom assoziiert ist. Diese Assoziation war in der Studie von Hieronymus et. al außerdem unabhängig vom PSA-Wert und dem Nomogram-Score, der etablierte Prognoseparameter wie den Gleason Score, den preoperativen PSA-Wert und das Vorhandensein von Metastasen in den Lymphknoten beinhaltet^[192,193]. Dal Bo et. al führten Untersuchungen zur chronischen lymphatischen Leukämie durch. Diese hämatologische Tumorentität ist charakterisiert durch eine häufige, kleine Deletion des Genes *DLEU2* (deleted in lymphocytic leukemia 2) auf 13q14. Dal Bo et al. konnten jedoch zeigen, dass größere Deletion in diesem Bereich existieren, in die auch der 1,8 Megabasen entfernte Genlokus des bekannten Tumorsuppressorgenes *RB1* involviert ist. Patienten, deren Tumorzellen diese große Deletion aufwiesen, hatten in der Studie ebenfalls eine wesentlich schlechtere Prognose als Patienten, deren Tumorzellen die auf *DLEU2* beschränkte Deletion besaßen^[194]. Basierend auf diesen Daten und den eigenen Analysen bestärken diese Ergebnisse die Hypothese, dass große Deletionen zu den Schlüsselmechanismen

zur Suppression von mehreren haplo-insuffizienten Genen beim Prostatakarzinom zählen und dass der Verlust der tumorsuppressiven Fähigkeiten von mehreren Genen gleichzeitig zu einem eindeutig schlechtem Tumorphänotyp führt.

Basierend auf den Auswirkungen der 6q-Deletionsgröße stellte sich die Frage, ob die 6q-Deletion während der Tumorprogression expandiert oder ob die verschiedenen 6q-Deletionsgrößen *de novo* entstehen. Zur Klärung dieser Frage wurde die 6q-Deletionsgröße mit Hilfe des Heterogenitäts-TMAs mittels FISH in den unterschiedlichen Bereichen eines Tumorfokus bestimmt. In den 51 Patienten mit einer 6q-Deletion im Tumorfokus zeigte sich eine identische Deletionsgröße in 41 % der Fälle und unterschiedliche Deletionsgrößen in 59 % der Tumorfoci. Bemerkenswert ist, dass in nahezu 50 % der Fälle mit einer konstanten Deletionsgröße diese maximal die Region 6q14-q16 betraf. Dazu kommt, dass 64 % der Fälle mit einer konstanten mittleren oder großen 6q-Deletion eine homogene Verteilung in allen analysierbaren Karzinomstanzen zeigten. Es ist daher annehmbar, dass große 6q-Deletion zu den frühen Ereignissen innerhalb der Tumorprogression zählen. Dies würde auch die fehlende Assoziation der 6q-Deletionsgröße mit den klinisch-pathologischen Parametern des Prostatakarzinoms erklären. Ebenso ist es jedoch auch möglich, dass auf Grund der Ausdehnung der 6q-Deletion innerhalb des Tumorfokus die kleineren 6q-Deletionen nicht mehr in den kleinen 0,6 mm messenden Karzinomstanzen detektiert werden konnten. Immerhin zeigten die Hälfte der 6q-deletierten Tumorfoci mindestens zwei der gemessenen 6q-Deletionsgrößen. Dabei zeigte sich vor allem die minimal deletierte Region im Bereich 6q15 als Ursprungsort der Deletion. Dies spricht dafür, dass es während der Tumorprogression teleomerisch und centromerisch zur 6q15-deletierten Region zu weiteren Verlusten auf dem 6q-Arm kommt.

Zusätzlich zur hohen prognostischen Relevanz der 6q-Deletion und insbesondere der 6q-Deletionsgröße beim Prostatakarzinom konnten durch die in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro* Versuche auch therapeutische Möglichkeiten identifiziert werden. Diese basieren auf dem Befund, dass zwei der shRNA-vermittelten supprimierten Gene (*PM20D2* und *ORC3*) im Colony-Formation-Assay eine für das Wachstum essentielle Funktion aufwiesen. Diese zeigte sich in einer starken Beeinträchtigung des Zellwachstums und der Fähigkeit der Zellkoloniebildung bedingt durch die Suppression von *PM20D2* und *ORC3* im Vergleich zum Koloniebildungsvermögen der Negativkontrollen shGFP und shNeg. Dieser Effekt war außerdem vergleichbar mit den Auswirkungen der *PTEN*-Suppression auf das Zellwachstum. Es ist bereits bekannt, dass *PTEN* zu den „essentiellen“ Tumorsuppressorgenen zählt, bei denen der

Tumor-begünstigende Effekt auf ein bestimmtes Niveau der Expressionssenkung beschränkt ist. Das beim Prostatakarzinom trotzdem homozygote *PTEN*-Deletionen nachgewiesen werden konnten, basiert auf kompensatorischen Effekten in der Karzinomzelle. So verhindert die gleichzeitige Inaktivierung des Tumorsuppressorgenes *TP53* die Seneszenz der homozygot *PTEN*-inaktivierten Tumorzellen^[195,196]. Nichts desto trotz erklärt die Anwesenheit von mindestens zwei „essentiellen“ Genen innerhalb der 6q-Deletion das vollständige Fehlen von homozygoten Deletionen auf dem 6q-Arm. Es ist annehmbar das diese Gene die Entstehung einer deletionsbedingten homozygoten Inaktivierung verhindern oder das Tumorzellen die eine homozygote 6q-Deletion erleiden, diese auf Grund fehlender kompensatorischer Veränderungen nicht überleben. ORC3 (Origin Recognition Complex, Subunit 3) ist eine der sechs Untereinheiten des Origin-Erkennungskomplex (ORC, origin recognition complex) der essentiell für die Initiation der Replikation in der G1-Phase des Zellzykluses in eukaryotischen Zellen ist^[197–199]. Frühere Studien konnten bereits eine gestörte Replikation und/oder eine Vermehrung von DNA-Defekten bedingt durch die verminderte Aktivität von verschiedenen ORC-Untereinheiten zeigen^[200,201]. Welche Auswirkungen die *ORC3*-Suppression auf die Replikation besitzt ist jedoch noch nicht vollständig geklärt. Das ORC3 eine essentielle Funktion für das Zellwachstum besitzt, steht jedoch in Einklang mit den Ergebnissen früherer Studien. Prasanth et al. konnten in ihrer Studie an humanen HeLa-Zellen *in vitro* zeigen, dass die siRNA-vermittelte *ORC3*-Suppression zu einer irregulären Kondensation der Chromosomen, einer Beeinträchtigung der Chromosomenteilung und einem mitotischen Arrest der Zellen führt. Bedingt dadurch führte die *ORC3*-Suppression zu einer Blockade des Zellzykluses, die in einer starken Beeinträchtigung der Zellteilung resultierte^[200,201]. Ma et al. führten eine *ORC3* Suppressionsstudie an Mäusen durch und konnten so *in-vivo* zeigen, dass die reduzierte Expression von ORC3 zu einer ausgeprägten Verminderung der Glialvorläuferzellen in der subventrikulären Zone und der Astrozyten in der postnatalen Hirnrinde der Mäuse führt^[202]. PM20D2 (Peptidase M20 Domain Containing 2) zählt zur Gruppe der Hydrolasen und spielt vermutlich eine Rolle in verschiedenen metabolischen Prozessen. Über die genaue Funktion von PM20D2 ist jedoch nichts bekannt^[203].

Es wird vermutet, dass die Anwesenheit von „essentiellen“ Genen innerhalb von heterozygoten Deletionen eine Karzinomzelle angreifbar macht, da eine zusätzliche Inhibierung dieser Gene zum Tod der Karzinomzellen führen müsste. Des Weiteren konnten bereits mehr als 50 Gene identifiziert werden, deren Suppression bei einem bereits vorliegenden Verlust eines Allels zu einer Störung der Proliferation der betroffenen Zellen führt^[204]. Für diese Gene

wurde von der Arbeitsgruppe Nijhawan et al. der Begriff CYCLOPS (copy number alterations yielding cancer liabilities owing to partial loss) Gene eingeführt. Interessanterweise wird die Gruppe dieser Gene als mögliche Zielstruktur einer spezifischen Anti-Karzinom-Therapie postuliert^[205,206]. Die Erkenntnis, dass die Entstehung und Progression von Karzinomen häufig abhängig von sogenannten „driver“ Onkogenen ist, hat zu einer revolutionären Änderungen der Therapieformen bei Tumorerkrankungen geführt^[207]. So ist es heute möglich bei Vorliegen von bestimmten genomischen Veränderungen in den Karzinomzellen eine zielgerichtete individuelle Therapie durch das medikamentöse Aufheben der Onkogenenwirkung durchzuführen^[208–210]. Beispiele dafür sind die Verwendung von Cetuximab bei *EGFR*-Mutationen und Pertuzumap/Trastuzumap bei *HER2*-Amplifikationen^{[211][212]}. Prostatakarzinome sind jedoch charakterisiert durch das Auftreten von rekurrenten Deletionen, die zur Beeinträchtigung der Funktion von Tumorsuppressorgenen führen^[60–62]. Eine medikamentöse Behandlung die zu einer vollständigen Re-Aktivierung von Tumorsuppressorgenen führt, muss jedoch als schwierig bewertet werden. Grund dafür ist, dass die Auswirkungen einer gesteigerten Expression dieser Gene in den Nicht-Tumorzellen zu einer Beeinträchtigung des Zellwachstums führen kann. Eine alternative Möglichkeit bieten hier die „essentiellen“ Gene. Diese werden von der Karzinomzelle für das Zellüberleben benötigt. Bedingt durch das Vorliegen einer heterozygoten Inaktivierung kommt es allerdings zu einer lebensbedrohlichen Situation in der Karzinomzelle. Es ist annehmbar, dass die Expression des verbleibenden Allels gerade ausreicht um das Überleben der Zellen zu sichern. Damit ergibt sich ein sogenanntes Dosisfenster für eine zielgerichtete Anti-Karzinom-Therapie. Würde es gelingen, eine medikamentös-bedingte Reduktion der Aktivität dieser Gene auf dem Niveau einer heterozygoten Inaktivierung zu bewirken, könnten die benignen Zellen diese Überleben. Die Karzinomzellen, die bereits eine heterozygote Deletion aufweisen würden jedoch die restliche Aktivität des Genes verlieren und sterben. Damit ergibt sich das Potential vollkommen neuer Therapiestrategien beim Prostatakarzinom.

Insgesamt konnte die vorliegende Arbeit eine hohe unabhängige prognostische Relevanz der 6q-Deletion beim Prostatakarzinom aufzeigen. Insbesondere in den Karzinomen mit einem eigentlich histo-pathologisch günstigeren Phänotyp (Gleason Score $\leq 3 + 4$) kann der Nachweise einer 6q-Deletion zur besseren Unterscheidung von indolenten und aggressiven Karzinomen beitragen. Die nachgewiesene Heterogenität der 6q-Deletion deutet jedoch darauf hin, dass die alleinige Anwendung der 6q-Deletion als diagnostischer Marker nicht zu einer sicheren Stratifizierung der Karzinome beiträgt. Da die 6q-Deletion in dieser Arbeit ne-

ben der Korrelation mit einem ERG-negativen Status außerdem eine deutliche Assoziation zu weiteren häufigen Deletionen beim Prostatakarzinom aufzeigte, besteht die begründet Hoffnung das in Zukunft eine Entwicklung von Multi-Parameter-Tests basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit zu einer Verbesserung der diagnostischen Situation des Patienten beiträgt. Die vorliegende Arbeit zeigt jedoch auch vollkommen neue diagnostische und therapeutische Möglichkeiten im Bezug auf das Vorkommen von großen 6q-Deletionen auf. Dies basiert auf dem Ergebnis das die Anzahl der deletions-bedingt betroffenen Tumor-relevanten Gene und die Größe der Deletion einen Einfluss auf das klinisch-relevante biologische Verhalten der Karzinomzellen besitzt. Da sich der prognostische Wert der Deletionsgröße außerdem unabhängig von den heute etablierten Parametern zeigte ist es annehmbar, dass der Nachweis der Menge der verlorenen chromosomalen Regionen mittels zum Beispiel NGS ebenfalls als diagnostischer Parameter zur Identifizierung von aggressiven Karzinomen genutzt werden kann. Allerdings ist das NGS-Verfahren zum heutigen Zeitpunkt im Vergleich zu anderen diagnostischen Methoden wie zum Beispiel der FISH noch sehr Zeit und kostenintensiv. Das innerhalb der heterozygoten 6q-Deletion mindestens zwei für das Wachstum der Karzinomzellen essentielle Gene lokalisiert sind bietet zu dem die Möglichkeit einer neuen medikamentösen ziel-gerichteten Therapie dieser Gene beim Prostatakarzinom. Dieses sollte zwingend in weiteren Untersuchungen geprüft werden, da die heutigen kurativen Therapiemöglichkeiten immer das Risiko von Nebenwirkungen mit sich bringen, die eindeutig zu einer Einschränkung der Lebensqualität der Patienten führen. Auch im Hinblick auf die Therapiemöglichkeiten der aggressiven, metastasierenden Prostatakarzinome, für die lediglich eine palliative Therapieform möglich ist, besteht dringend die Notwendigkeit einer Verbesserung der Therapieformen, um ein zusätzliches Leiden der Patienten zu vermeiden oder zumindest zu reduzieren.

Kapitel 6

Zusammenfassung

Das Prostatakarzinom ist die häufigste Karzinomerkrankung und eine der häufigsten tumorbedingten Todesursachen des Mannes. Ein primäres Ziel in der Prostatakarzinomforschung ist die Identifizierung neuer prognostischer molekularer Marker, welche dazu beitragen, das Aggressivitätspotential der Karzinome sicher einzuschätzen und somit eine optimale Therapieentscheidung zu gewährleisten. Besondere Herausforderungen bei der klinischen Anwendbarkeit molekularer Marker stellen jedoch die ausgesprochene Multifokalität und Heterogenität dieses Tumortyps dar. Deletionen auf dem langen Arm des Chromosomes 6 zählen zu den häufigsten molekularen Veränderungen beim Prostatakarzinom. Sowohl die klinische Relevanz als auch die potentiell tumorsuppressiven Zielgene dieser Deletion sind bis heute allerdings nicht bekannt.

Die Ziele der vorliegenden Arbeit waren daher die Aufklärung der klinischen Relevanz der 6q-Deletion sowie ihres zeitliche Auftreten während der Tumorprogression und die Identifikation der potentiellen Tumorsuppressorgene innerhalb der Deletion. Dazu wurde ein großes Kollektiv von mehr als 12.000 Prostatakarzinomen mittels Fluoreszenz in-situ Hybridisierung auf 6q-Deletionen untersucht. Das Kollektiv lag in Form von unterschiedlichen Gewebemikroarrays (TMA) vor. Zur Bestimmung der prognostischen Relevanz wurde von allen 12.427 Tumoren jeweils eine Probe (0,6 mm TMA-Spot) untersucht und der 6q-Deletionsstatus mit dem Tumorphänotyp und der Patientenprognose verglichen. Es zeigte sich, dass die 6q-Deletion mit einer Deletionsrate von 19,2 % eine signifikante Assoziation zu einem schlechtem Tumorphänotyp ($P < 0,0001$ für Gleason-Score, pT-Stadium, präoperativer PSA-Wert, Ki67LI) und einer schlechten Prognose für den Patienten ($P < 0,0001$ für PSA-Rezidiv, $P \leq 0,002$ für okkulte systemische oder metastasierte Tumoren) besitzt. Die Assoziation mit der Patien-

tenprognose war unabhängig von den etablierten Prognoseparametern des Prostatakarzinoms ($P = 0,0055$) und vor allem bedingt durch die Tumoren mit einem geringen Gleason-Score ($\leq 3 + 4$). Die 6q-Deletion war außerdem assoziiert mit einem negativen ERG-Status und Deletionen von 5q, 2q, 13q, 12p und 8q21 ($P \leq 0,0030$). Ein Subset von über 7.000 Tumoren des genannten Patientenkollektivs wurde darüber hinaus verwendet, um die Bedeutung der 6q-Deletionsgröße beim Prostatakarzinom zu klären. Es zeigten sich drei wesentliche „Deletionsgrößen“ in 573 6q-deletierten Tumoren. Eine kleine Deletion im Bereich 6q14-q16 (61 %), eine mittlere Deletion im Bereich 6q14-q22 (26 %) und eine große Deletion die mindestens die Region 6q12-q22 (13 %) umfasste. Die Größe der Deletion zeigte eine deutliche Assoziation zur Patientenprognose, jedoch nicht zu den klinisch-pathologischen Parametern ($P \geq 0,4000$). Die Wahrscheinlichkeit eines PSA-Rezidivs, einer okkult systemischen Erkrankung oder einer Metastasierung stieg mit Ausdehnung der 6q-Deletion an ($P \leq 0,0150$). Die Assoziation zum PSA-Rezidiv war außerdem unabhängig von den etablierten Prognoseparametern ($P = 0,0130$). Im dritten Projektteil wurden jeweils 10 verschiedene Bereiche eines jeden Tumors von 506 Patienten untersucht um Rückschlüsse auf die Heterogenität der 6q-Deletion sowie ihres zeitlichen Auftretens und ihrer Größe während der Tumorprogression zu ziehen. Es zeigte sich dass circa 50 % aller 6q-deletierten Tumorfoci eine heterogene Verteilung der Veränderung aufwiesen und dass die 6q-Deletion ausgehend von der Region 6q15 während der Tumorprogression größer wird. Im letzten Projektteil wurden stichprobenartig 37 der über 200 Gene, die von einer 6q-Deletion betroffen sein können, funktionell im Zellkulturmodell auf ihre tumorsuppressiven Eigenschaften untersucht. Es zeigte sich dass die Gene *HMGN3*, *SMAP1*, *UBE2J1* und *ZNF292* tumorsuppressive Eigenschaften und die Gene *ORC3* und *PM20D2* eine für das Wachstum essentielle Funktion besitzen. Die Ko-Depletion der identifizierten Tumorsuppressorgen zeigte, dass der wachstumsbegünstigende Effekt mit der Anzahl der supprimierten Gene ansteigt.

Insgesamt konnte die vorliegende Arbeit zeigen, dass die 6q-Deletion eine wesentliche klinische Bedeutung beim Prostatakarzinom besitzt. Der Nachweis einer 6q-Deletion kann genutzt werden um insbesondere in der Gruppe der Tumoren mit einem eher günstigen Phänotyp (Gleason Score $\leq 3 + 4$) Karinome mit einem aggressiven Verhalten zu identifizieren. Der Nachweis der 6q-Deletionsgröße kann dies zusätzlich unterstützen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die kombinierte Suppression von putativ haplo-insuffizienten Genen den Tumor-begünstigenden Effekt erhöht. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass große Deletionen generell durch einen Dosiseffekt auf mehrere Gene „krebsfördernd“ wirken. Die

„ein Gen inaktiviert pro Deletion“ Hypothese ist nicht aufrecht zuhalten. Die Identifizierung von essentiellen Genen birgt möglicherweise die Möglichkeit einer alternativen molekularen zielgerichteten Therapieform. Es besteht die begründete Hoffnung, dass die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit einen Beitrag zur Aufklärung der genomischen Veränderungen beim Prostatakarzinom und damit zur Verbesserung der individuellen Diagnostik und Therapie des Patienten leisten können.

Kapitel 7

Abstract

Prostate cancer is the most frequent cancer and one of the most common tumor-related causes of death in males. A primary goal in prostate cancer research is to identify new prognostic molecular markers, which can help to estimate the aggressiveness of individual cancers. This is mandatory to provide an optimal individual therapeutic decision. However, multifocality and heterogeneity of this tumor type limit the clinical applicability of molecular markers. Deletions of 6q are one of the most frequent chromosomal alterations in prostate cancer, but the tumor suppressor (s) in this chromosomal region and the clinical relevance of the deletion are still unknown.

The aims of this study were: 1. Clarify the clinical relevance of 6q deletions and their association to key molecular alterations in prostate cancer, 2. Determine the temporal occurrence of 6q deletion during tumor progression and 3. Identify potential tumor suppressor genes within the 6q deletion. For this purpose, 6q deletions were analyzed on a large cohort of 12,427 prostate cancers by fluorescence in situ hybridization. To determine the prognostic relevance of 6q deletions, all tumors were analyzed on a tissue micro array (TMA, one 0.6 mm sample each). Deletions of 6q were found in 19.2% of 6,069 analyzable cancers and were strongly associated with adverse tumor features (Gleason score, pT stage, preoperative PSA level, Ki67LI; $P < 0.0001$ each) and poor patient prognosis ($P < 0.0001$ for PSA recurrence, $P \leq 0.002$ for occult systemic or metastatic tumors). The association between 6q deletions and patient prognosis was independent of established prognostic parameters ($P = 0.0055$) but strongest in the subgroup of low Gleason score ($\leq 3 + 4$) cancers. Deletions of 6q were strongly related to ERG-negative cancers and deletions of 5q, 2q, 13q, 12p and 8q21 ($P \leq 0.0030$). A subset of about 7,000 cancers was used to clarify the importance of 6q dele-

tion size in prostate cancer. Three main deletion sizes were detectable in 573 6q-deleted cancers: A small-sized deletion ranging from 6q14-q16 (61 %), a medium-sized deletion ranging from 6q14-q22 (26 %) and a large-sized deletion including the entire 6q12-q22 region (13 %). A large 6q deletion size was strongly associated to patient prognosis, but not to pathological parameters ($P \geq 0.4$). The likelihood of PSA recurrence and occult systemic or metastatic disease strongly increased with 6q deletion size ($P \leq 0.0150$). The relationship between 6q deletion size and PSA recurrence was also independent of the established prognostic parameters ($P = 0.0130$). In addition, 10 different tumor areas were collected from 506 patients and assembled in a tissue micro array format to estimate the heterogeneity of 6q deletions, their temporal occurrence and changes of the 6q deletion size during tumor progression. These analyses showed, that about 50 % of 6q-deleted cancers occurred only in parts of the cancer and that large 6q deletions developed from small deletions at 6q15. In the last part of the study, the tumor suppressive features of 37 randomly selected 6q deleted genes were estimated in cell culture models. These analyses identify HMGN3, SMAP1, UBE2J1 and ZNF292 as potential tumor suppressive genes and ORC3 and PM20D2 as potential essential genes within the 6q deletion. In addition, co-depletion of the identified tumor suppressor genes showed, that the growth-promoting effect increases with the number of suppressed genes.

In summary, the present study indicates a substantial clinical relevance of 6q deletions in prostate cancer. Especially in the subgroup of cancers with a more favorable phenotype (Gleason Score $\leq 3 + 4$) detection of 6q deletion can contribute to identify cancers with a more aggressive behavior. Additional prognostic information may be obtained through determination of the 6q deletion size. Furthermore, the results of the study provide strong evidence for the existence of multiple tumor suppressor genes at 6q, loss of which may promote tumor growth in concert. This finding challenges the one inactivated gene per deletion concept. Of note, presence of essential genes might open new therapeutic possibilities by targeting the remaining copies of these genes in cancers harboring heterozygous 6q deletions.

Literaturverzeichnis

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011;61(2):69–90.
- [2] Krebs in Deutschland 2007/2008. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg); 8. Ausgabe; Berlin, 2012.
- [3] Cook PJ, Doll R, Fellingham SA. A mathematical model for the age distribution of cancer in man. *Int J Cancer.* 1969 Jan;4(1):93–112.
- [4] Nelson WG, De Marzo AM, Isaacs WB. Prostate cancer. *N Engl J Med.* 2003 Jul;349(4):366–381.
- [5] Sánchez-Chapado M, Olmedilla G, Cabeza M, Donat E, Ruiz A. Prevalence of prostate cancer and prostatic intraepithelial neoplasia in Caucasian Mediterranean males: an autopsy study. *Prostate.* 2003 Feb;54(3):238–247.
- [6] Hemminki K, Sundquist J, Bermejo JL. How common is familial cancer? *Ann Oncol.* 2008 Jan;19(1):163–167.
- [7] Steinberg GD, Carter BS, Beaty TH, Childs B, Walsh PC. Family history and the risk of prostate cancer. *Prostate.* 1990;17(4):337–347.
- [8] Carter BS, Bova GS, Beaty TH, Steinberg GD, Childs B, Isaacs WB, et al. Hereditary prostate cancer: epidemiologic and clinical features. *J Urol.* 1993 Sep;150(3):797–802.
- [9] Chamberlain NL, Driver ED, Miesfeld RL. The length and location of CAG trinucleotide repeats in the androgen receptor N-terminal domain affect transactivation function. *Nucleic Acids Res.* 1994 Aug;22(15):3181–3186.
- [10] Chan JM, Stampfer MJ, Giovannucci EL. What causes prostate cancer? A brief summary of the epidemiology. *Semin Cancer Biol.* 1998 Aug;8(4):263–273.
- [11] Platz EA, Rimm EB, Willett WC, Kantoff PW, Giovannucci E. Racial variation in prostate cancer incidence and in hormonal system markers among male health professionals. *J Natl Cancer Inst.* 2000 Dec;92(24):2009–2017.
- [12] Ross RK, Pike MC, Coetzee GA, Reichardt JK, Yu MC, Feigelson H, et al. Androgen metabolism and prostate cancer: establishing a model of genetic susceptibility. *Cancer Res.* 1998 Oct;58(20):4497–4504.

- [13] Zhang Q, Shan Y. Genetic polymorphisms of vitamin D receptor and the risk of prostate cancer: a meta-analysis. *J BUON*. 2013;18(4):961–969.
- [14] Ingles SA, Coetzee GA, Ross RK, Henderson BE, Kolonel LN, Crocitto L, et al. Association of prostate cancer with vitamin D receptor haplotypes in African-Americans. *Cancer Res*. 1998 Apr;58(8):1620–1623.
- [15] Cao Y, Lindström S, Schumacher F, Stevens VL, Albanes D, Berndt SI, et al. Insulin-like Growth Factor Pathway Genetic Polymorphisms, Circulating IGF1 and IGFBP3, and Prostate Cancer Survival. *J Natl Cancer Inst*. 2014 May;106(5).
- [16] Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms. Deutsche Gesellschaft für Urologie e. V.; Version 2.0; 2011.
- [17] Jocham D, Miller K. *Praxis der Urologie*. Band 1. Thieme-Verlag; 3.Auflage; 2007.
- [18] Hoogendam A, Buntinx F, de Vet HC. The diagnostic value of digital rectal examination in primary care screening for prostate cancer: a meta-analysis. *Fam Pract*. 1999 Dec;16(6):621–626.
- [19] Mistry K, Cable G. Meta-analysis of prostate-specific antigen and digital rectal examination as screening tests for prostate carcinoma. *J Am Board Fam Pract*. 2003;16(2):95–101.
- [20] Heidenreich A, Bellmunt J, Bolla M, Joniau S, Mason M, Matveev V, et al. EAU guidelines on prostate cancer. Part 1: screening, diagnosis, and treatment of clinically localised disease. *Eur Urol*. 2011 Jan;59(1):61–71.
- [21] Romero Otero J, Garcia Gomez B, Campos Juanatey F, Touijer KA. Prostate cancer biomarkers: an update. *Urol Oncol*. 2014 Apr;32(3):252–260.
- [22] Wu JT, Zhang P, Wang T, Wilson L, Astill M. Evaluation of free PSA isoforms, PSA complex formation, and specificity of anti-PSA antibodies by HPLC and PAGE-immunoblotting techniques. *J Clin Lab Anal*. 1995;9(1):1–14.
- [23] Loeb S, Catalona WJ. Prostate-specific antigen in clinical practice. *Cancer Lett*. 2007 Apr;249(1):30–39.
- [24] Ebel JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA. *Pathology and Genetics; Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs*. World Health Organization - Classification of Tumours. IARC Press; 2004.
- [25] Stephan C, Lein M, Jung K, Schnorr D, Loening SA. The influence of prostate volume on the ratio of free to total prostate specific antigen in serum of patients with prostate carcinoma and benign prostate hyperplasia. *Cancer*. 1997 Jan;79(1):104–109.
- [26] Lepor H, Wang B, Shapiro E. Relationship between prostatic epithelial volume and serum prostate-specific antigen levels. *Urology*. 1994 Aug;44(2):199–205.

- [27] Djavan B, Zlotta A, Kratzik C, Remzi M, Seitz C, Schulman CC, et al. PSA, PSA density, PSA density of transition zone, free/total PSA ratio, and PSA velocity for early detection of prostate cancer in men with serum PSA 2.5 to 4.0 ng/mL. *Urology*. 1999 Sep;54(3):517–522.
- [28] Leibman BD, Dilliogluligil O, Scardino PT, Abbas F, Rogers E, Wolfinger RD, et al. Prostate-specific antigen doubling times are similar in patients with recurrence after radical prostatectomy or radiotherapy: a novel analysis. *J Clin Oncol*. 1998 Jun;16(6):2267–2271.
- [29] Montironi R, Mazzucchelli R, Algaba F, Bostwick DG, Krongrad A. Prostate-specific antigen as a marker of prostate disease. *Virchows Arch*. 2000 Apr;436(4):297–304.
- [30] Humphrey PA. Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate. *Mod Pathol*. 2004 Mar;17(3):292–306.
- [31] Bracarda S, de Cobelli O, Greco C, Prayer-Galetti T, Valdagni R, Gatta G, et al. Cancer of the prostate. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2005 Dec;56(3):379–396.
- [32] Byar DP, Mostofi FK. Carcinoma of the prostate: prognostic evaluation of certain pathologic features in 208 radical prostatectomies. Examined by the step-section technique. *Cancer*. 1972 Jul;30(1):5–13.
- [33] Gleason DF. Histologic grading of prostate cancer: a perspective. *Hum Pathol*. 1992 Mar;23(3):273–279.
- [34] Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C. The TNM Classification of malignant tumors. UICC (International Union Against Cancer). Wiley-Blackwell; 7. Auflage; 2009.
- [35] Bill-Axelson A, Holmberg L, Ruutu M, Garmo H, Stark JR, Busch C, et al. Radical prostatectomy versus watchful waiting in early prostate cancer. *N Engl J Med*. 2011 May;364(18):1708–1717.
- [36] Rübber H. Uroonkologie. Springer; 5.Auflage; 2009.
- [37] Hautmann R, Huland H. Urologie. Springer Medizin-Verlag, Heidelberg; 2010.
- [38] Parker C. Active surveillance: towards a new paradigm in the management of early prostate cancer. *Lancet Oncol*. 2004 Feb;5(2):101–106.
- [39] Klotz L. Active surveillance for prostate cancer: for whom? *J Clin Oncol*. 2005 Nov;23(32):8165–8169.
- [40] Bastian PJ, Carter BH, Bjartell A, Seitz M, Stanislaus P, Montorsi F, et al. Insignificant prostate cancer and active surveillance: from definition to clinical implications. *Eur Urol*. 2009 Jun;55(6):1321–1330.
- [41] Aus G, Robinson D, Rosell J, Sandblom G, Varenhorst E, SERPCG. Survival in prostate carcinoma—outcomes from a prospective, population-based cohort of 8887 men with up to 15 years of follow-up: results from three countries in the population-based National Prostate Cancer Registry of Sweden. *Cancer*. 2005 Mar;103(5):943–951.

- [42] Lu-Yao GL, Yao SL. Population-based study of long-term survival in patients with clinically localised prostate cancer. *Lancet*. 1997 Mar;349(9056):906–910.
- [43] McLaren DB, McKenzie M, Duncan G, Pickles T. Watchful waiting or watchful progression?: Prostate specific antigen doubling times and clinical behavior in patients with early untreated prostate carcinoma. *Cancer*. 1998 Jan;82(2):342–348.
- [44] Parker C. The Scandinavian Prostate Cancer Group Study: the case for conservative management. *BJU Int*. 2005 Nov;96(7):952–953.
- [45] Brawley OW. Hormonal prevention of prostate cancer. *Urol Oncol*. 2003;21(1):67–72.
- [46] Wolff JM. Intermittent androgen deprivation in advanced prostate cancer: a review. *Aktuelle Urol*. 2012 Mar;43(2):115–120.
- [47] Wolff JM. Chemotherapy in hormone-refractory prostate cancer. *Front Radiat Ther Oncol*. 2008;41:103–107.
- [48] Schlomm T, Erbersdobler A, Mirlacher M, Sauter G. Molecular staging of prostate cancer in the year 2007. *World J Urol*. 2007 Mar;25(1):19–30.
- [49] Wise AM, Stamey TA, McNeal JE, Clayton JL. Morphologic and clinical significance of multifocal prostate cancers in radical prostatectomy specimens. *Urology*. 2002 Aug;60(2):264–269.
- [50] Andreoiu M, Cheng L. Multifocal prostate cancer: biologic, prognostic, and therapeutic implications. *Hum Pathol*. 2010 Jun;41(6):781–793.
- [51] Boutros PC, Fraser M, Harding NJ, de Borja R, Trudel D, Lalonde E, et al. Spatial genomic heterogeneity within localized, multifocal prostate cancer. *Nat Genet*. 2015 May;.
- [52] Minner S, Gärtner M, Freudenthaler F, Bauer M, Kluth M, Salomon G, et al. Marked heterogeneity of ERG expression in large primary prostate cancers. *Mod Pathol*. 2013 Jan;26(1):106–116.
- [53] Krohn A, Freudenthaler F, Harasimowicz S, Kluth M, Fuchs S, Burkhardt L, et al. Heterogeneity and chronology of PTEN deletion and ERG fusion in prostate cancer. *Mod Pathol*. 2014 Dec;27(12):1612–1620.
- [54] Grady WM, Carethers JM. Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology*. 2008 Oct;135(4):1079–1099.
- [55] Aquilina G, Bignami M. Genetic instability and methylation tolerance in colon cancer. *Ann Ist Super Sanita*. 1996;32(1):123–131.
- [56] Feunteun J. Breast cancer and genetic instability: the molecules behind the scenes. *Mol Med Today*. 1998 Jun;4(6):263–267.
- [57] Deng CX. BRCA1: cell cycle checkpoint, genetic instability, DNA damage response and cancer evolution. *Nucleic Acids Res*. 2006;34(5):1416–1426.

- [58] Njiaju UO, Olopade OI. Genetic determinants of breast cancer risk: a review of current literature and issues pertaining to clinical application. *Breast J.* 2012 Sep;18(5):436–442.
- [59] Weischenfeldt J, Simon R, Feuerbach L, Schlangen K, Weichenhan D, Minner S, et al. Integrative genomic analyses reveal an androgen-driven somatic alteration landscape in early-onset prostate cancer. *Cancer Cell.* 2013 Feb;23(2):159–170.
- [60] Williams JL, Greer PA, Squire JA. Recurrent copy number alterations in prostate cancer: an in silico meta-analysis of publicly available genomic data. *Cancer Genet.* 2014;207(10-12):474–488.
- [61] Sun J, Liu W, Adams TS, Sun J, Li X, Turner AR, et al. DNA copy number alterations in prostate cancers: a combined analysis of published CGH studies. *Prostate.* 2007 May;67(7):692–700.
- [62] Taylor BS, Schultz N, Hieronymus H, Gopalan A, Xiao Y, Carver BS, et al. Integrative genomic profiling of human prostate cancer. *Cancer Cell.* 2010 Jul;18(1):11–22.
- [63] Barbieri CE, Baca SC, Lawrence MS, Demichelis F, Blattner M, Theurillat JP, et al. Exome sequencing identifies recurrent SPOP, FOXA1 and MED12 mutations in prostate cancer. *Nat Genet.* 2012 Jun;44(6):685–689.
- [64] Grasso CS, Wu YM, Robinson DR, Cao X, Dhanasekaran SM, Khan AP, et al. The mutational landscape of lethal castration-resistant prostate cancer. *Nature.* 2012 Jul;487(7406):239–243.
- [65] Berger MF, Lawrence MS, Demichelis F, Drier Y, Cibulskis K, Sivachenko AY, et al. The genomic complexity of primary human prostate cancer. *Nature.* 2011 Feb;470(7333):214–220.
- [66] Kan Z, Jaiswal BS, Stinson J, Janakiraman V, Bhatt D, Stern HM, et al. Diverse somatic mutation patterns and pathway alterations in human cancers. *Nature.* 2010 Aug;466(7308):869–873.
- [67] Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, et al. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal.* 2013 Apr;6(269):pl1.
- [68] Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, et al. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov.* 2012 May;2(5):401–404.
- [69] Waltering KK, Urbanucci A, Visakorpi T. Androgen receptor (AR) aberrations in castration-resistant prostate cancer. *Mol Cell Endocrinol.* 2012 Sep;360(1-2):38–43.
- [70] Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, Dhanasekaran SM, Mehra R, Sun XW, et al. Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science.* 2005 Oct;310(5748):644–648.
- [71] Minner S, Enodien M, Sirma H, Luebke AM, Krohn A, Mayer PS, et al. ERG status is unrelated to PSA recurrence in radically operated prostate cancer in the absence of antihormonal therapy. *Clin Cancer Res.* 2011 Sep;17(18):5878–5888.

- [72] Brase JC, Johannes M, Mannsperger H, Fälth M, Metzger J, Kacprzyk LA, et al. TMPRSS2-ERG - specific transcriptional modulation is associated with prostate cancer biomarkers and TGF- β signaling. *BMC Cancer*. 2011;11:507.
- [73] Massoner P, Kugler KG, Unterberger K, Kuner R, Mueller LAJ, Fälth M, et al. Characterization of transcriptional changes in ERG rearrangement-positive prostate cancer identifies the regulation of metabolic sensors such as neuropeptide Y. *PLoS One*. 2013;8(2):e55207.
- [74] Pflueger D, Rickman DS, Sboner A, Perner S, LaFargue CJ, Svensson MA, et al. N-myc downstream regulated gene 1 (NDRG1) is fused to ERG in prostate cancer. *Neoplasia*. 2009 Aug;11(8):804–811.
- [75] Barros-Silva JD, Paulo P, Bakken AC, Cerveira N, Løvf M, Henrique R, et al. Novel 5' fusion partners of ETV1 and ETV4 in prostate cancer. *Neoplasia*. 2013 Jul;15(7):720–726.
- [76] Kluth M, Harasimowicz S, Burkhardt L, Grupp K, Krohn A, Prien K, et al. Clinical significance of different types of p53 gene alteration in surgically treated prostate cancer. *Int J Cancer*. 2014 Sep;135(6):1369–1380.
- [77] Milella M, Falcone I, Conciatori F, Cesta Incani U, Del Curatolo A, Inzerilli N, et al. PTEN: Multiple Functions in Human Malignant Tumors. *Front Oncol*. 2015;5:24.
- [78] Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*. 1992 Jul;358(6381):15–16.
- [79] Efeyan A, Serrano M. p53: guardian of the genome and policeman of the oncogenes. *Cell Cycle*. 2007 May;6(9):1006–1010.
- [80] Yamasaki L. Role of the RB tumor suppressor in cancer. *Cancer Treat Res*. 2003;115:209–239.
- [81] Giacinti C, Giordano A. RB and cell cycle progression. *Oncogene*. 2006 Aug;25(38):5220–5227.
- [82] Lee J, Kim SS. The function of p27 KIP1 during tumor development. *Exp Mol Med*. 2009 Nov;41(11):765–771.
- [83] Krohn A, Seidel A, Burkhardt L, Bachmann F, Mader M, Grupp K, et al. Recurrent deletion of 3p13 targets multiple tumour suppressor genes and defines a distinct subgroup of aggressive ERG fusion-positive prostate cancers. *J Pathol*. 2013 Sep;231(1):130–141.
- [84] Huang S, Gulzar ZG, Salari K, Lapointe J, Brooks JD, Pollack JR. Recurrent deletion of CHD1 in prostate cancer with relevance to cell invasiveness. *Oncogene*. 2012 Sep;31(37):4164–4170.
- [85] Mao X, Boyd LK, Yáñez-Muñoz RJ, Chaplin T, Xue L, Lin D, et al. Chromosome rearrangement associated inactivation of tumour suppressor genes in prostate cancer. *Am J Cancer Res*. 2011;1(5):604–617.
- [86] Krohn A, Diedler T, Burkhardt L, Mayer PS, De Silva C, Meyer-Kornblum M, et al. Genomic deletion of PTEN is associated with tumor progression and early PSA recurrence in ERG fusion-positive and fusion-negative prostate cancer. *Am J Pathol*. 2012 Aug;181(2):401–412.

- [87] Burkhardt L, Fuchs S, Krohn A, Masser S, Mader M, Kluth M, et al. CHD1 is a 5q21 tumor suppressor required for ERG rearrangement in prostate cancer. *Cancer Res.* 2013 May;73(9):2795–2805.
- [88] El Gammal AT, Brüchmann M, Zustin J, Isbarn H, Hellwinkel OJC, Köllermann J, et al. Chromosome 8p deletions and 8q gains are associated with tumor progression and poor prognosis in prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2010 Jan;16(1):56–64.
- [89] Sun M, Srikantan V, Ma L, Li J, Zhang W, Petrovics G, et al. Characterization of frequently deleted 6q locus in prostate cancer. *DNA Cell Biol.* 2006 Nov;25(11):597–607.
- [90] Srikantan V, Sesterhenn IA, Davis L, Hankins GR, Avallone FA, Livezey JR, et al. Allelic loss on chromosome 6Q in primary prostate cancer. *Int J Cancer.* 1999 Jun;84(3):331–335.
- [91] Lu T, Hano H. Deletion at chromosome arms 6q16-22 and 10q22.3-23.1 associated with initiation of prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2008;11(4):357–361.
- [92] Hyytinen ER, Saadut R, Chen C, Paull L, Koivisto PA, Vessella RL, et al. Defining the region(s) of deletion at 6q16-q22 in human prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer.* 2002 Jul;34(3):306–312.
- [93] Cooney KA, Wetzel JC, Consolino CM, Wojno KJ. Identification and characterization of proximal 6q deletions in prostate cancer. *Cancer Res.* 1996 Sep;56(18):4150–4153.
- [94] Konishi N, Nakamura M, Kishi M, Ishida E, Shimada K, Matsuyoshi S, et al. Genetic mapping of allelic loss on chromosome 6q within heterogeneous prostate carcinoma. *Cancer Sci.* 2003 Sep;94(9):764–768.
- [95] Cunningham JM, Shan A, Wick MJ, McDonnell SK, Schaid DJ, Tester DJ, et al. Allelic imbalance and microsatellite instability in prostatic adenocarcinoma. *Cancer Res.* 1996 Oct;56(19):4475–4482.
- [96] Saric T, Brkanac Z, Troyer DA, Padalecki SS, Sarosdy M, Williams K, et al. Genetic pattern of prostate cancer progression. *Int J Cancer.* 1999 Apr;81(2):219–224.
- [97] Ribeiro FR, Henrique R, Hektoen M, Berg M, Jerónimo C, Teixeira MR, et al. Comparison of chromosomal and array-based comparative genomic hybridization for the detection of genomic imbalances in primary prostate carcinomas. *Mol Cancer.* 2006;5:33.
- [98] Lapointe J, Li C, Giacomini CP, Salari K, Huang S, Wang P, et al. Genomic profiling reveals alternative genetic pathways of prostate tumorigenesis. *Cancer Res.* 2007 Sep;67(18):8504–8510.
- [99] Verhagen PCMS, Hermans KGL, Brok MO, van Weerden WM, Tilanus MGJ, de Weger RA, et al. Deletion of chromosomal region 6q14-16 in prostate cancer. *Int J Cancer.* 2002 Nov;102(2):142–147.
- [100] Strohmeyer DM, Berger AP, Moore DH 2nd, Bartsch G, Klocker H, Carroll PR, et al. Genetic aberrations in prostate carcinoma detected by comparative genomic hybridization and microsatellite analysis: association with progression and angiogenesis. *Prostate.* 2004 Apr;59(1):43–58.
- [101] Visakorpi T, Kallioniemi AH, Syvänen AC, Hyytinen ER, Karhu R, Tammela T, et al. Genetic changes in primary and recurrent prostate cancer by comparative genomic hybridization. *Cancer Res.* 1995 Jan;55(2):342–347.

- [102] Ishkanian AS, Malloff CA, Ho J, Meng A, Albert M, Syed A, et al. High-resolution array CGH identifies novel regions of genomic alteration in intermediate-risk prostate cancer. *Prostate*. 2009 Jul;69(10):1091–1100.
- [103] Sørensen KD, Borre M, Ørntoft TF, Dyrskjød L, Tørring N. Chromosomal deletion, promoter hypermethylation and downregulation of FYN in prostate cancer. *Int J Cancer*. 2008 Feb;122(3):509–519.
- [104] Liu W, Chang BL, Cramer S, Koty PP, Li T, Sun J, et al. Deletion of a small consensus region at 6q15, including the MAP3K7 gene, is significantly associated with high-grade prostate cancers. *Clin Cancer Res*. 2007 Sep;13(17):5028–5033.
- [105] Mader M, Simon R, Steinbiss S, Kurtz S. FISH Oracle: a web server for flexible visualization of DNA copy number data in a genomic context. *J Clin Bioinforma*. 2011;1(1):20.
- [106] Mader M, Simon R, Kurtz S. FISH Oracle 2: a web server for integrative visualization of genomic data in cancer research. *J Clin Bioinforma*. 2014;4(1):5.
- [107] Kluth M, Hesse J, Heintl A, Krohn A, Steurer S, Sirma H, et al. Genomic deletion of MAP3K7 at 6q12-22 is associated with early PSA recurrence in prostate cancer and absence of TMPRSS2:ERG fusions. *Mod Pathol*. 2013 Jul;26(7):975–983.
- [108] Itoh K, Jenny A, Mlodzik M, Sokol SY. Centrosomal localization of Diversin and its relevance to Wnt signaling. *J Cell Sci*. 2009 Oct;122(Pt 20):3791–3798.
- [109] Brembeck FH, Rosário M, Birchmeier W. Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of beta-catenin. *Curr Opin Genet Dev*. 2006 Feb;16(1):51–59.
- [110] Imai Y, Kimura T, Murakami A, Yajima N, Sakamaki K, Yonehara S. The CED-4-homologous protein FLASH is involved in Fas-mediated activation of caspase-8 during apoptosis. *Nature*. 1999 Apr;398(6730):777–785.
- [111] Muto A, Tashiro S, Tsuchiya H, Kume A, Kanno M, Ito E, et al. Activation of Maf/AP-1 repressor Bach2 by oxidative stress promotes apoptosis and its interaction with promyelocytic leukemia nuclear bodies. *J Biol Chem*. 2002 Jun;277(23):20724–20733.
- [112] Liu C, Goswami M, Talley J, Chessier-Martinez PL, Lou CH, Sater AK. TAK1 promotes BMP4/Smad1 signaling via inhibition of erk MAPK: a new link in the FGF/BMP regulatory network. *Differentiation*. 2012 Apr;83(4):210–219.
- [113] Verheyen EM. Opposing effects of Wnt and MAPK on BMP/Smad signal duration. *Dev Cell*. 2007 Dec;13(6):755–756.
- [114] Wu M, Shi L, Cimic A, Romero L, Sui G, Lees CJ, et al. Suppression of Tak1 promotes prostate tumorigenesis. *Cancer Res*. 2012 Jun;72(11):2833–2843.

- [115] Everett RD, Rechter S, Papior P, Tavalai N, Stamminger T, Orr A. PML contributes to a cellular mechanism of repression of herpes simplex virus type 1 infection that is inactivated by ICP0. *J Virol.* 2006 Aug;80(16):7995–8005.
- [116] Glass M, Everett RD. Components of promyelocytic leukemia nuclear bodies (ND10) act cooperatively to repress herpesvirus infection. *J Virol.* 2013 Feb;87(4):2174–2185.
- [117] Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science.* 2005 Feb;307(5712):1098–1101.
- [118] Lang G. *Histotechnik - Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik.* Springer-Verlag/Wien; 2. Auflage; 2013.
- [119] Holtzhauer M. *Biochemische Labormethoden.* Springer-Verlag/Berlin Heidelberg; 3. Auflage; 1997.
- [120] Rigby PW, Dieckmann M, Rhodes C, Berg P. Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J Mol Biol.* 1977 Jun;113(1):237–251.
- [121] Shimomura O. The discovery of aequorin and green fluorescent protein. *J Microsc.* 2005 Jan;217(Pt 1):1–15.
- [122] Phillips SM, Barton CM, Lee SJ, Morton DG, Wallace DM, Lemoine NR, et al. Loss of the retinoblastoma susceptibility gene (RB1) is a frequent and early event in prostatic tumorigenesis. *Br J Cancer.* 1994 Dec;70(6):1252–1257.
- [123] Chetram MA, Odero-Marrah V, Hinton CV. Loss of PTEN permits CXCR4-mediated tumorigenesis through ERK1/2 in prostate cancer cells. *Mol Cancer Res.* 2011 Jan;9(1):90–102.
- [124] Easton JB, Houghton PJ. mTOR and cancer therapy. *Oncogene.* 2006 Oct;25(48):6436–6446.
- [125] Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, et al. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987 Nov;84(21):7413–7417.
- [126] Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, et al. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol.* 1998 Nov;72(11):8463–8471.
- [127] Tiscornia G, Singer O, Verma IM. Design and Cloning of an shRNA into a Lentiviral Silencing Vector: Version A. *CSH Protoc.* 2008;2008:pdb.prot5009.
- [128] Haensler J, Szoka F Jr. Polyamidoamine cascade polymers mediate efficient transfection of cells in culture. *Bioconjug Chem.* 1993;4(5):372–379.
- [129] Graw J. *Genetik.* Springer; 5. Auflage; 2010.
- [130] Puck TT, Marcus PI. Action of x-rays on mammalian cells. *J Exp Med.* 1956 May;103(5):653–666.
- [131] Franken NAP, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc.* 2006;1(5):2315–2319.

- [132] Schmitz S. Der Experimentator Zellkultur. Spectrum Akademischer Verlag Heidelberg 2011; 3. Auflage; 2011.
- [133] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987 Apr;162(1):156–159.
- [134] Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'—3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Aug;88(16):7276–7280.
- [135] Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 1996 Oct;6(10):986–994.
- [136] Bookout AL, Mangelsdorf DJ. Quantitative real-time PCR protocol for analysis of nuclear receptor signaling pathways. *Nucl Recept Signal.* 2003;1:e012.
- [137] Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979 Sep;76(9):4350–4354.
- [138] Burnette WN. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem.* 1981 Apr;112(2):195–203.
- [139] Minner S, Jessen B, Stiedenroth L, Burandt E, Köllermann J, Mirlacher M, et al. Low level HER2 overexpression is associated with rapid tumor cell proliferation and poor prognosis in prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2010 Mar;16(5):1553–1560.
- [140] Oros KK, Arcand SL, Bayani J, Squire JA, Mes-Masson AM, Tonin PN, et al. Analysis of genomic abnormalities in tumors: a review of available methods for Illumina two-color SNP genotyping and evaluation of performance. *Cancer Genet.* 2013 Apr;206(4):103–115.
- [141] Kallioniemi, Visakorpi, Karhu, Pinkel, Kallioniemi. Gene Copy Number Analysis by Fluorescence in Situ Hybridization and Comparative Genomic Hybridization. *Methods.* 1996 Feb;9(1):113–121.
- [142] Burdelski C, Matuszewska A, Martina Kluth CK, Grupp K, Steurer S, Wittmer C, et al. Qualitative and Quantitative Requirements for Assessing Prognostic Markers in Prostate Cancer. *Microarrays.* 2014;3:137–158.
- [143] Kallioniemi OP, Wagner U, Kononen J, Sauter G. Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer. *Hum Mol Genet.* 2001 Apr;10(7):657–662.
- [144] Simon R, Sauter G. Tissue microarray (TMA) applications: implications for molecular medicine. *Expert Rev Mol Med.* 2003 Oct;5(26):1–12.

- [145] Tennstedt P, Köster P, Brüchmann A, Mirlacher M, Haese A, Steuber T, et al. The impact of the number of cores on tissue microarray studies investigating prostate cancer biomarkers. *Int J Oncol.* 2012 Jan;40(1):261–268.
- [146] Sauter G. Representativity of TMA studies. *Methods Mol Biol.* 2010;664:27–35.
- [147] Tsourlakis MC, Schoop M, Plass C, Huland H, Graefen M, Steuber T, et al. Overexpression of the chromatin remodeler death-domain-associated protein in prostate cancer is an independent predictor of early prostate-specific antigen recurrence. *Hum Pathol.* 2013 Sep;44(9):1789–1796.
- [148] Grupp K, Jedrzejewska K, Tsourlakis MC, Koop C, Wilczak W, Adam M, et al. High mitochondria content is associated with prostate cancer disease progression. *Mol Cancer.* 2013;12(1):145.
- [149] Roberts WB, Han M. Clinical significance and treatment of biochemical recurrence after definitive therapy for localized prostate cancer. *Surg Oncol.* 2009 Sep;18(3):268–274.
- [150] Bruce JY, Lang JM, McNeel DG, Liu G. Current controversies in the management of biochemical failure in prostate cancer. *Clin Adv Hematol Oncol.* 2012 Nov;10(11):716–722.
- [151] Punnen S, Cooperberg MR, D’Amico AV, Karakiewicz PI, Moul JW, Scher HI, et al. Management of biochemical recurrence after primary treatment of prostate cancer: a systematic review of the literature. *Eur Urol.* 2013 Dec;64(6):905–915.
- [152] Pound CR, Partin AW, Eisenberger MA, Chan DW, Pearson JD, Walsh PC. Natural history of progression after PSA elevation following radical prostatectomy. *JAMA.* 1999 May;281(17):1591–1597.
- [153] Jhaveri FM, Zippe CD, Klein EA, Kupelian PA. Biochemical failure does not predict overall survival after radical prostatectomy for localized prostate cancer: 10-year results. *Urology.* 1999 Nov;54(5):884–890.
- [154] Ibeawuchi C, Schmidt H, Voss R, Titze U, Abbas M, Neumann J, et al. Genome-wide investigation of multifocal and unifocal prostate cancer-are they genetically different? *Int J Mol Sci.* 2013;14(6):11816–11829.
- [155] Cooper CS, Eeles R, Wedge DC, Van Loo P, Gundem G, Alexandrov LB, et al. Analysis of the genetic phylogeny of multifocal prostate cancer identifies multiple independent clonal expansions in neoplastic and morphologically normal prostate tissue. *Nat Genet.* 2015 Apr;47(4):367–372.
- [156] Prudnikova TY, Soultzis N, Kutsenko OS, Mostovich LA, Haraldson K, Ernberg I, et al. Heterogeneity of d-glucuronyl C5-epimerase expression and epigenetic regulation in prostate cancer. *Cancer Med.* 2013 Oct;2(5):654–661.
- [157] Yoshimoto M, Ding K, Sweet JM, Ludkovski O, Trottier G, Song KS, et al. PTEN losses exhibit heterogeneity in multifocal prostatic adenocarcinoma and are associated with higher Gleason grade. *Mod Pathol.* 2013 Mar;26(3):435–447.

- [158] Kristiansen G, Fritzsche FR, Wassermann K, Jäger C, Töls A, Lein M, et al. GOLPH2 protein expression as a novel tissue biomarker for prostate cancer: implications for tissue-based diagnostics. *Br J Cancer*. 2008 Sep;99(6):939–948.
- [159] St John J, Powell K, Conley-Lacomb MK, Chinni SR. TMPRSS2-ERG Fusion Gene Expression in Prostate Tumor Cells and Its Clinical and Biological Significance in Prostate Cancer Progression. *J Cancer Sci Ther*. 2012 Apr;4(4):94–101.
- [160] Han B, Mehra R, Lonigro RJ, Wang L, Suleman K, Menon A, et al. Fluorescence in situ hybridization study shows association of PTEN deletion with ERG rearrangement during prostate cancer progression. *Mod Pathol*. 2009 Aug;22(8):1083–1093.
- [161] King JC, Xu J, Wongvipat J, Hieronymus H, Carver BS, Leung DH, et al. Cooperativity of TMPRSS2-ERG with PI3-kinase pathway activation in prostate oncogenesis. *Nat Genet*. 2009 May;41(5):524–526.
- [162] Kluth M, Runte F, Barow P, Omari J, Abdelaziz ZM, Paustian L, et al. Concurrent deletion of 16q23 and PTEN is an independent prognostic feature in prostate cancer. *Int J Cancer*. 2015 May;.
- [163] Demichelis F, Setlur SR, Beroukhim R, Perner S, Korbel JO, Lafargue CJ, et al. Distinct genomic aberrations associated with ERG rearranged prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 2009 Apr;48(4):366–380.
- [164] Liu W, Lindberg J, Sui G, Luo J, Egevad L, Li T, et al. Identification of novel CHD1-associated collaborative alterations of genomic structure and functional assessment of CHD1 in prostate cancer. *Oncogene*. 2012 Aug;31(35):3939–3948.
- [165] Tomlins SA, Mehra R, Rhodes DR, Cao X, Wang L, Dhanasekaran SM, et al. Integrative molecular concept modeling of prostate cancer progression. *Nat Genet*. 2007 Jan;39(1):41–51.
- [166] Schaefer G, Mosquera JM, Ramoner R, Park K, Romanel A, Steiner E, et al. Distinct ERG rearrangement prevalence in prostate cancer: higher frequency in young age and in low PSA prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2013 Jun;16(2):132–138.
- [167] Perner S, Mosquera JM, Demichelis F, Hofer MD, Paris PL, Simko J, et al. TMPRSS2-ERG fusion prostate cancer: an early molecular event associated with invasion. *Am J Surg Pathol*. 2007 Jun;31(6):882–888.
- [168] Mani RS, Chinnaiyan AM. Triggers for genomic rearrangements: insights into genomic, cellular and environmental influences. *Nat Rev Genet*. 2010 Dec;11(12):819–829.
- [169] Halazonetis TD, Gorgoulis VG, Bartek J. An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. *Science*. 2008 Mar;319(5868):1352–1355.
- [170] Mitelman F, Johansson B, Mertens F. The impact of translocations and gene fusions on cancer causation. *Nat Rev Cancer*. 2007 Apr;7(4):233–245.

- [171] Haffner MC, De Marzo AM, Meeker AK, Nelson WG, Yegnasubramanian S. Transcription-induced DNA double strand breaks: both oncogenic force and potential therapeutic target? *Clin Cancer Res.* 2011 Jun;17(12):3858–3864.
- [172] Kumar-Sinha C, Tomlins SA, Chinnaiyan AM. Recurrent gene fusions in prostate cancer. *Nat Rev Cancer.* 2008 Jul;8(7):497–511.
- [173] Rickman DS, Soong TD, Moss B, Mosquera JM, Dlabal J, Terry S, et al. Oncogene-mediated alterations in chromatin conformation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Jun;109(23):9083–9088.
- [174] Rodrigues LU, Rider L, Nieto C, Romero L, Karimpour-Fard A, Loda M, et al. Coordinate loss of MAP3K7 and CHD1 promotes aggressive prostate cancer. *Cancer Res.* 2015 Mar;75(6):1021–1034.
- [175] Wagener C, Müller O. *Molekulare Onkologie - Entstehung, Progression, klinische Aspekte.* Thieme-Verlag; 3.Auflage; 2010.
- [176] Simpson L, Parsons R. PTEN: life as a tumor suppressor. *Exp Cell Res.* 2001 Mar;264(1):29–41.
- [177] Yamada KM, Araki M. Tumor suppressor PTEN: modulator of cell signaling, growth, migration and apoptosis. *J Cell Sci.* 2001 Jul;114(Pt 13):2375–2382.
- [178] Chinnam M, Goodrich DW. RB1, development, and cancer. *Curr Top Dev Biol.* 2011;94:129–169.
- [179] Chen Z, Lu W. Roles of ubiquitination and SUMOylation on prostate cancer: mechanisms and clinical implications. *Int J Mol Sci.* 2015;16(3):4560–4580.
- [180] Michael D, Oren M. The p53 and Mdm2 families in cancer. *Curr Opin Genet Dev.* 2002 Feb;12(1):53–59.
- [181] Wang X, Trotman LC, Koppie T, Alimonti A, Chen Z, Gao Z, et al. NEDD4-1 is a proto-oncogenic ubiquitin ligase for PTEN. *Cell.* 2007 Jan;128(1):129–139.
- [182] GeneCards - The Human Gene Compendium. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ZNF292>; 2015.
- [183] Cody NAL, Shen Z, Ripeau JS, Provencher DM, Mes-Masson AM, Chevrette M, et al. Characterization of the 3p12.3-pcen region associated with tumor suppression in a novel ovarian cancer cell line model genetically modified by chromosome 3 fragment transfer. *Mol Carcinog.* 2009 Dec;48(12):1077–1092.
- [184] Marcos I, Borrego S, Rodríguez de Córdoba S, Galán JJ, Antiñolo G. Cloning, characterization and chromosome mapping of the human SMAP1 gene. *Gene.* 2002 Jun;292(1-2):167–171.
- [185] Tanabe K, Kon S, Ichijo N, Funaki T, Natsume W, Watanabe T, et al. A SMAP gene family encoding ARF GTPase-activating proteins and its implication in membrane trafficking. *Methods Enzymol.* 2008;438:155–170.
- [186] Kon S, Tanabe K, Watanabe T, Sabe H, Satake M. Clathrin dependent endocytosis of E-cadherin is regulated by the Arf6GAP isoform SMAP1. *Exp Cell Res.* 2008 Apr;314(7):1415–1428.

- [187] Sangar F, Schreurs AS, Umaña-Diaz C, Clapéron A, Desbois-Mouthon C, Calmel C, et al. Involvement of small ArfGAP1 (SMAP1), a novel Arf6-specific GTPase-activating protein, in microsatellite instability oncogenesis. *Oncogene*. 2014 May;33(21):2758–2767.
- [188] Kugler JE, Deng T, Bustin M. The HMGN family of chromatin-binding proteins: dynamic modulators of epigenetic processes. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Jul;1819(7):652–656.
- [189] Jung WY, Sung CO, Han SH, Kim K, Kim M, Ro JY, et al. AZGP-1 immunohistochemical marker in prostate cancer: potential predictive marker of biochemical recurrence in post radical prostatectomy specimens. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2014 Oct;22(9):652–657.
- [190] Xue W, Kitzing T, Roessler S, Zuber J, Krasnitz A, Schultz N, et al. A cluster of cooperating tumor-suppressor gene candidates in chromosomal deletions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 May;109(21):8212–8217.
- [191] Knudson A Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1971 Apr;68(4):820–823.
- [192] Lalonde E, Ishkanian AS, Sykes J, Fraser M, Ross-Adams H, Erho N, et al. Tumour genomic and microenvironmental heterogeneity for integrated prediction of 5-year biochemical recurrence of prostate cancer: a retrospective cohort study. *Lancet Oncol*. 2014 Dec;15(13):1521–1532. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)71021-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(14)71021-6).
- [193] Hieronymus H, Schultz N, Gopalan A, Carver BS, Chang MT, Xiao Y, et al. Copy number alteration burden predicts prostate cancer relapse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Jul;111(30):11139–11144. Available from: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1411446111>.
- [194] Dal Bo M, Rossi FM, Rossi D, Deambrogi C, Bertoni F, Del Giudice I, et al. 13q14 deletion size and number of deleted cells both influence prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. 2011 Aug;50(8):633–643.
- [195] Kim JS, Lee C, Bonifant CL, Ransom H, Waldman T. Activation of p53-dependent growth suppression in human cells by mutations in PTEN or PIK3CA. *Mol Cell Biol*. 2007 Jan;27(2):662–677.
- [196] Chen Z, Trotman LC, Shaffer D, Lin HK, Dotan ZA, Niki M, et al. Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature*. 2005 Aug;436(7051):725–730.
- [197] Brand N, Faul T, Grummt F. Interactions and subcellular distribution of DNA replication initiation proteins in eukaryotic cells. *Mol Genet Genomics*. 2007 Dec;278(6):623–632.
- [198] Duncker BP, Chesnokov IN, McConkey BJ. The origin recognition complex protein family. *Genome Biol*. 2009;10(3):214.
- [199] Sun J, Kong D. DNA replication origins, ORC/DNA interaction, and assembly of pre-replication complex in eukaryotes. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2010 Jul;42(7):433–439.

- [200] Prasanth SG, Prasanth KV, Siddiqui K, Spector DL, Stillman B. Human Orc2 localizes to centrosomes, centromeres and heterochromatin during chromosome inheritance. *EMBO J.* 2004 Jul;23(13):2651–2663.
- [201] Prasanth SG, Shen Z, Prasanth KV, Stillman B. Human origin recognition complex is essential for HP1 binding to chromatin and heterochromatin organization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Aug;107(34):15093–15098.
- [202] Ma S, Kwon HJ, Huang Z. A functional requirement for astroglia in promoting blood vessel development in the early postnatal brain. *PLoS One.* 2012;7(10):e48001.
- [203] GeneCards - The Human Gene Compendium. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PM20D2&search=83af06384daa5ec682221fb13b158c9f>; 2015.
- [204] Nijhawani D, Zack TI, Ren Y, Strickland MR, Lamothe R, Schumacher SE, et al. Cancer vulnerabilities unveiled by genomic loss. *Cell.* 2012 Aug;150(4):842–854.
- [205] Ashworth A, Lord CJ, Reis-Filho JS. Genetic interactions in cancer progression and treatment. *Cell.* 2011 Apr;145(1):30–38.
- [206] Kaelin WG Jr. The concept of synthetic lethality in the context of anticancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2005 Sep;5(9):689–698.
- [207] Majidi J, Barar J, Baradaran B, Abdolalizadeh J, Omid Y. Target therapy of cancer: implementation of monoclonal antibodies and nanobodies. *Hum Antibodies.* 2009;18(3):81–100.
- [208] Carli P, Turchet E, Quitadamo D, Spada A, Miolo G, Lamaj E, et al. Target therapy in elderly breast cancer patients. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2012 Sep;83(3):422–431.
- [209] Tsuda T, Nakajima T, Boku N. Current status and problems of molecular target therapy for colorectal cancer. *Nihon Shokakibyo Gakkai Zasshi.* 2011 Jan;108(1):19–23.
- [210] Mitsudomi T. Advances in target therapy for lung cancer. *Jpn J Clin Oncol.* 2010 Feb;40(2):101–106.
- [211] Baselga J. The EGFR as a target for anticancer therapy—focus on cetuximab. *Eur J Cancer.* 2001 Sep;37 Suppl 4:S16–S22.
- [212] Moya-Horno I, Cortés J. The expanding role of pertuzumab in the treatment of HER2-positive breast cancer. *Breast Cancer (Dove Med Press).* 2015;7:125–132.

Anhang A

Auflistung der gestesten shRNA-Konstrukte

Tabelle A.1: Auflistung der gestesten shRNA-Konstrukte (5 pro Gen). Getestet wurden kommerziell erhältliche shRNA-Konstrukte von der Firma Sigma-Aldrich. Fett: Verwendete shRNA-Konstrukte in den Depletionsexperimenten.

Gensym.	TRC-Nr.	siRNA-Sequenz	Kennung
<i>AKRIN2</i>	TRCN0000167153	CACAGAACAAATTCTGTACAA	KO-A
	TRCN0000219960	TTGCAAGAGGTCCCAATTATG	KO-B
	TRCN0000219959	TGCAGCATCCTCACCATTAAA	KO-C
	TRCN0000167846	GATCAAATAATGCGACGATAT	KO-D
	TRCN0000167847	GAAGACATTTAGAAACGAGTT	KO-E
<i>ANKRD6</i>	TRCN0000158616	CCAAGGAGTCAACTATTGTAT	KO-A
	TRCN0000160562	CTAATCAACAAGCTGGAGAAT	KO-B
	TRCN0000160756	CATCTACTTGTGTGGACCAAT	KO-C
	TRCN0000163262	GCAGAGCTAAATCCACACCAT	KO-D
	TRCN0000159706	GAAGTTTGAAAGCTCAGATTA	KO-E
<i>ASF1A</i>	TRCN0000074268	GCCAGATGTTAAACTTTGAAT	KO-A
	TRCN0000074269	CCAAATCTACAGTCACTTCTT	KO-B
	TRCN0000074270	GTGAAGAATACGATCAAGTTT	KO-C
	TRCN0000074271	AGGCGTAACTGTTGTGCTAAT	KO-D
	TRCN0000074272	GCACCTAATCCAGGACTCATT	KO-E
<i>ATG5</i>	TRCN0000330323	GATTCATGGAATTGAGCCAAT	KO-A
	TRCN0000330392	CCTTTCATTCAGAAGCTGTTT	KO-B
	TRCN0000151963	CCTGAACAGAATCATCCTTAA	KO-C
	TRCN0000150645	GATTCATGGAATTGAGCCAAT	KO-D
	TRCN0000151474	CCTTTCATTCAGAAGCTGTTT	KO-E

(Fortsetzung...)

(fortgesetzt)			
Gensym.	TRC-Nr.	siRNA-Sequenz	Kennung
<i>BACH2</i>	TRCN0000018113	CCGGGAAGATAACTCTAGCAA	KO-A
	TRCN0000018114	CGCAAATTGGTGTGTGAGA	KO-B
	TRCN0000018115	CCAGCTTGCATGTACCAAGAA	KO-C
	TRCN0000018116	CCTGTAGATCAAATCACAGAT	KO-D
	TRCN0000018117	GCCCAGGAAAGATTATACCTA	KO-E
<i>C6orf162</i>	TRCN0000159717	GCTCTTCATTAAACCTAACAA	KO-A
	TRCN0000158968	GCAGCCATTATCTCATTCTTT	KO-B
	TRCN0000158473	CGTGAAAGTTTACTTGTGTTT	KO-C
	TRCN0000161213	GCTTTCGGATTGGTAACTCTT	KO-D
	TRCN0000158561	CCAAAGAGAAAGAGTTTCAAA	KO-E
<i>C6orf168</i>	TRCN0000140766	GATTCGGATGTGGACATGGAT	KO-A
	TRCN0000140243	GCTGGTTGTCAGCTGATAGTT	KO-B
	TRCN0000142017	GCATGGTTCCTGAAATCCATT	KO-C
	TRCN0000139241	CGGAAGATGCTCTCTCTTAGT	KO-D
	TRCN0000141386	CCACGATGATGACAATACCAT	KO-E
<i>CASP8AP2</i>	TRCN0000061763	GCCAGGATCAAATTGTGAT	KO-A
	TRCN0000061764	CCAGTGTATAATAACAGTCAT	KO-B
	TRCN0000061765	GCGAGTCTATAACCAGCTTGTA	KO-C
	TRCN0000061766	GCCAATTTACAAATCTGACAA	KO-D
	TRCN0000061767	CCAGTCTCTTAAGAAGAATAT	KO-E
<i>CCNC</i>	TRCN0000020189	GCATCCAAAGTAGAGGAATTT	KO-A
	TRCN0000020190	CCATTCTTAGTAAGATGCCAA	KO-B
	TRCN0000020192	CTACGGTATATTTCAAGAGAT	KO-C
	TRCN0000020193	CCCACTATTTGCAATGGATTT	KO-D
	TRCN0000319164	GCATCCAAAGTAGAGGAATTT	KO-E
<i>CD164</i>	TRCN0000057553	CCTGTGCGAAAGTCTACCTTT	KO-A
	TRCN0000057554	CTGCAAATCTAAAGAACGAAA	KO-B
	TRCN0000057555	GCTATTGTTACATAACTCAA	KO-C
	TRCN0000057556	CGTGACGACTTTAGCGCCCAT	KO-D
	TRCN0000057557	CGACAGACTTCTGTTCCGTTT	KO-E
<i>COQ3</i>	TRCN0000035339	GCTCACAAATGGTGGGATGAA	KO-A
	TRCN0000035340	CCTGAAACACTAGAGAGCATT	KO-B
	TRCN0000035341	CCGGTGGTTCTTTATTCATTA	KO-C
	TRCN0000035342	CCTTAATTCCTCGGCGGTTT	KO-D
	TRCN0000035343	CCAGTCCTGGATAAGAGAATA	KO-E
<i>EEF1A1</i>	TRCN0000029329	CCTTGGTTCAAGGGATGGAAA	KO-A
	TRCN0000029330	GCTGCCATTGTTGATATGGTT	KO-B
	TRCN0000029331	CCAGAAGAGATATGAGGAAAT	KO-C

(Fortsetzung...)

(fortgesetzt)				
Gensym.	TRC-Nr.	siRNA-Sequenz	Kennung	
EPHA7	TRCN0000029332	CCCAGGACACAGAGACTTTAT	KO-D	
	TRCN0000029333	CCTCTCCAGGATGTCTACAAA	KO-E	
	TRCN0000006418	CGGTCATAATTGGTCTTGTTT	KO-A	
	TRCN0000006421	TGGTCCATTATTGAGAACTTA	KO-B	
	TRCN0000195051	CGATGTGACCTACAGAATA	KO-C	
FBXL4	TRCN0000196477	GAAACCAGTCATGATAGTAAT	KO-D	
	TRCN0000011019	CCACCCAAATGTTGTCCATTT	KO-E	
	TRCN0000118338	CCGAATTAGTACGCCTTGAAT	KO-A	
	TRCN0000118339	GCCACTTTCTTAATGAAACTT	KO-B	
	TRCN0000118340	CGAATTAGTACGCCTTGAATT	KO-C	
GFP	TRCN0000118341	GCCAGGACTATGTGGAACCTTA	KO-D	
	TRCN0000118337	GCAATAAAGTATCGTGGCATT	KO-E	
	Everett et al. [115,116]	CAACAAGATGAAGAGCACCAA	shGFP	
	HACE1	TRCN0000003413	GCTGTGCCATATACTCCAAAT	KO-A
		TRCN0000003414	CGGAAGGATTTGTTATGTTTA	KO-B
TRCN0000003415		GCAGATTGTCAGGATGTTATT	KO-C	
TRCN0000003416		CCAGAAATTGATGTGAGTGAT	KO-D	
TRCN0000003417		GCCAGTACCTAAAGATTCTAA	KO-E	
HDAC2	TRCN0000004822	GCAGACTCATTATCTGGTGAT	KO-A	
	TRCN0000004823	GCAAATACTATGCTGTCAATT	KO-B	
	TRCN0000004819	CAGTCTCACCAATTTTCAGAAA	KO-C	
	TRCN0000004820	CCAGCGTTTGATGGACTCTTT	KO-D	
	TRCN0000004821	GCCTATTATCTCAAAGGTGAT	KO-E	
HMGN3	TRCN0000019106	CTGTAGATAACGAGGGAGAAT	KO-A	
	TRCN0000285453	AGCTGTGTGTAAGATTGATTC	KO-B	
	TRCN0000275882	ACTAAACAGGAGCCCACAAGA	KO-C	
	TRCN0000275883	TCTGCCAGATTGTCAGCGAAA	KO-D	
	TRCN0000019104	TCTGCCAGATTGTCAGCGAAA	KO-E	
KIAA0776	TRCN0000122630	CCACCAAGCATATTCTCCTA	KO-A	
	TRCN0000140595	GCAGGGAGATTATCCCTTGAA	KO-B	
	TRCN0000143982	CCTGTGCATTTAATCACTGAA	KO-C	
	TRCN0000122062	CCAGTAAGCATAAGTCATATT	KO-D	
	TRCN0000142805	CCACCTCATAACACACAATT	KO-E	
LYRM2	TRCN0000064120	TGATGATTACTCAAGGCAATA	KO-A	
	TRCN0000218964	ACGTTAAAGCAGTTCGTAAGA	KO-B	
	TRCN0000230471	TCTACTAGAATGGCTGTAATTA	KO-C	
	TRCN0000230470	GATGATTACTCAAGGCAATAT	KO-D	
	TRCN0000230468	CAAATGATTCTGATCGCAAAT	KO-E	
(Fortsetzung...)				

(Fortsetzung...)

<i>(fortgesetzt)</i>			
Gensym.	TRC-Nr.	siRNA-Sequenz	Kennung
<i>MANEA</i>	TRCN0000049648	CCCATTATAGACATGGTGAAT	KO-A
	TRCN0000049649	CCCTAGAATAGCCAAGAATTA	KO-B
	TRCN0000049650	CGTCCTCATAAACCAGGTCTT	KO-C
	TRCN0000049652	CCGAATCAATGGGAAGTAT	KO-D
	TRCN0000049651	GCCTCTGAACTTAACTTGGAT	KO-E
<i>MAP3K7</i>	TRCN0000001554	GCAGTGATTCTTGGATTGTTT	KO-A
	TRCN0000001555	CCCGTGTGAACCATCCTAATA	KO-B
	TRCN0000001556	CAGTGTGTCTTGTGATGGAAT	KO-C
	TRCN0000001557	GACACACATGACCAATAAC	KO-D
	TRCN0000001558	TCCTGCCACAAATGATACTAT	KO-E
<i>MARCKS</i>	TRCN0000029039	CTCCTTCAAGAAGAACAAGAA	KO-A
	TRCN0000029040	GCCTTCCAAAGCGAACGGACA	KO-B
	TRCN0000029041	GAGCGGCTTCTCCTTCAAGAA	KO-C
	TRCN0000029042	TGAAGGTAAACGGCGACGCTT	KO-D
	TRCN0000029043	CAGCCCGAGTGCAGTCCAGAA	KO-E
<i>MDN1</i>	TRCN0000136876	CAAGCACATTCTCATGCAAAC	KO-A
	TRCN0000136629	AGACTTAACTGTGGTCAGAAC	KO-B
	TRCN0000229953	AACCACTGTGTGCGTATTAAC	KO-C
	TRCN0000229952	ATCCTGACTTCCGTTTATTTTC	KO-D
	TRCN0000218331	GGAGAGTCCAAAGTGAGACTT	KO-E
<i>MMS22L</i>	TRCN0000130019	GCTTCATGGATTACTCTTGTA	KO-A
	TRCN0000128663	CCAACTCTTCAAGGAAACTAA	KO-B
	TRCN0000127753	GTCACTCAACAGGTACGACAA	KO-C
	TRCN0000147361	GTTCCACTCTAATTCCTACTT	KO-D
<i>mTOR</i>	Sarbassov et al. ^[117]	TCAGCGTCCCTACCTTCTTCT	mTOR
<i>NDUFAF4</i>	TRCN0000122686	GCGAGAGCAGATTAGTCTCTA	KO-A
	TRCN0000122226	GAAGCATTGACACTTCTCAAT	KO-B
	TRCN0000139262	TGTGTCTTCCTTGCAGGTAA	KO-C
	TRCN0000139526	CCAAAGATCCTGTGTCTTCCT	KO-D
	TRCN0000122540	CCTCCTGAAGACAAGAAAGCA	KO-E
<i>Neg</i>	Everett et al. ^[115,116]	TTATCGCGCATATCACGCG	shNeg
<i>ORC3</i>	TRCN0000151827	CCCATTGATGTTTAACCAGAA	KO-A
	TRCN0000153342	GCTCGGTTTATTAGAGCTGTT	KO-B
	TRCN0000151061	GCGACTACAAGAGGAATTAAA	KO-C
	TRCN0000150842	GCTACTTCTTACAACCTCAGTT	KO-D
	TRCN0000152134	CTTACAACCTCAGTTTCCCTTT	KO-E
<i>PHIP</i>	TRCN0000147136	CCAGGAACCATTCAAGTAAAT	KO-A
	TRCN0000147009	CGGATATTTACTGGTTCTGAT	KO-B

(Fortsetzung...)

(fortgesetzt)			
Gensym.	TRC-Nr.	siRNA-Sequenz	Kennung
<i>PM20D2</i>	TRCN0000130419	GTTAAGGAGAAGTAACCGAAA	KO-C
	TRCN0000130643	CCATGATATGCCTGACGTTAT	KO-D
	TRCN0000127738	GCTGGAAGACAGTCTTTACTA	KO-E
	TRCN0000183794	CCCTACACAATACTAACCTTT	KO-A
	TRCN0000149131	GTCTGTGTTCAGACAGCAAAT	KO-B
<i>PNISR</i>	TRCN0000148358	CCAGATATGGCTGAACATGAT	KO-C
	TRCN0000183458	GAAATTAAAGGTGGAGCACAT	KO-D
	TRCN0000156518	GCTCAGGTAGTAGTCGTACTT	KO-A
	TRCN0000153550	CAGGTAGTAGTCGTACTTCTT	KO-B
	TRCN0000152910	GACGGTGATGTGGTTAATGAA	KO-C
<i>PNRC1</i>	TRCN0000154265	CCAGTGAACCAGTTTGACTAT	KO-D
	TRCN0000152569	GCAACAATGGATGCAGTCATT	KO-E
	TRCN0000063278	GCAAATATAACTTGCCACTAA	KO-A
	TRCN0000063279	GCATTTGAAGAAATCAGCATT	KO-B
	TRCN0000063280	CAAAGTTTAGTGATCCACCTT	KO-C
<i>PTEN</i>	TRCN0000063281	GCTTGTTTCATGGTATACACTT	KO-D
	TRCN0000063282	CGACCCTCTTCCTCCCTCATT	KO-E
	TRCN0000002746	CCACAGCTAGAACTTATCAAA	shPTEN
<i>RARS2</i>	TRCN0000045343	GCGTTCTACCATCATAGGAAA	KO-A
	TRCN0000045344	CTCCTCAATTTGTACTGTAAT	KO-B
	TRCN0000045345	CCTTTGGAGTAGTACAGGGAA	KO-C
	TRCN0000045346	GTACTGGTCAAAGGACTGTAA	KO-D
	TRCN0000045347	ACCCAGGCATATCGTCAGTTA	KO-E
<i>RB1</i>	TRCN0000295892	GTGCGCTCTTGAGGTTGTAAT	shRB1
<i>RRAGD</i>	TRCN0000059535	CTGTTCTTGAGAGCACTAAT	KO-A
	TRCN0000059537	CCAGGGCCTACAAAGTGAATA	KO-B
	TRCN0000059536	GTGATATGATAGATGTGGTTA	KO-C
	TRCN0000059533	CGGCAAGTTCGTCTATTCAGAA	KO-D
	TRCN0000059534	GCTTAATAATACAACCGTGCT	KO-E
<i>SEN6</i>	TRCN0000004103	GACAGAACTAACAGAAGAGAA	KO-A
	TRCN0000004104	CACAGGATTAACAACCAAGAA	KO-B
	TRCN0000004105	CTACAGGAAGATCAGAGCAAA	KO-C
	TRCN0000272788	CCTTGATCCTCCGGCAAATAT	KO-D
	TRCN0000272838	CACAGGATTAACAACCAAGAA	KO-E
<i>SLC35A1</i>	TRCN0000038199	GCCGTGTGTATCACAGAAGTT	KO-A
	TRCN0000038200	CCATCGTTAGTGTATGCTGTT	KO-B
	TRCN0000038201	GCTTCAAAGGAGAGAGTTATT	KO-C
	TRCN0000038202	GCAGTCTATACCATAGCTTTA	KO-D

(Fortsetzung...)

<i>(fortgesetzt)</i>			
Gensym.	TRC-Nr.	siRNA-Sequenz	Kennung
<i>SMAP1</i>	TRCN0000038203	GCGCTATAGCTATTGCTGTAT	KO-E
	TRCN0000151136	GCTGTTGTTATGATGTGCTTA	KO-A
	TRCN0000151900	CCATCCAATTAGCTTATGGTA	KO-B
	TRCN0000151035	GCAGCACAAGTGTAATGAATA	KO-C
	TRCN0000150993	CCGATGATTTCTAATCCCTTA	KO-D
<i>TRAF3IP2</i>	TRCN0000151488	CCTGGAATATTGGTGTGTTTA	KO-E
	TRCN0000162747	CCGTGATGATAATCGTAGCAA	KO-A
	TRCN0000160964	GCTTCAGAACACTCATGTCTA	KO-B
	TRCN0000158477	CATGGAACATCATTACCATT	KO-C
	TRCN0000158671	CGAGGCATTGATATCATTAATA	KO-D
<i>TTK</i>	TRCN0000158694	GCGGAAAGTCTTTATCACTTA	KO-E
	TRCN0000006356	CGGTATTAAGTCCCAAGAAT	KO-A
	TRCN0000006357	CCAGTTGTAAAGAATGACTTT	KO-B
	TRCN0000006358	GCACAATTTGAACTGTCAC	KO-C
	TRCN0000011012	GCCAACTTGTTGGTCTGAATT	KO-D
<i>UBE2J1</i>	TRCN0000011011	GCAACCACTTATGGTACTGTA	KO-E
	TRCN0000004131	GCTGAGATTGTGTGCTAGGAA	KO-A
	TRCN0000004134	CAGCTCTTATATTCCGACGAA	KO-B
	TRCN0000320501	ACATTCTGCATTGGGTATAAT	KO-C
	TRCN0000320500	CAGCTCTTATATTCCGACGAA	KO-D
<i>ZNF292</i>	TRCN0000320498	CCACCAAGCATTATTCTCCTA	KO-E
	TRCN0000230618	TGAAGGCTGTGACCGTATATA	KO-A
	TRCN0000218026	GGATGTACTCGAACCTATAAT	KO-B
	TRCN0000230619	CGAATCTCCTCCGACACATTT	KO-C
	TRCN0000230620	CAGCGAGAGGTAGAGGTTATT	KO-D
	TRCN0000230617	TGACAAAGGATGCACTATTTA	KO-E

Anhang B

Affymetrix-Chip-Analyse

Tabelle B.1: Ergebnisse der Affymetrix-Chip-Analyse. Fett: Ausgewählte Gene der 6q12-q22-Deletion zur Untersuchung in den Depletionsversuchen. *: Identifizierte potentiell tumorrelevante Gene innerhalb der 6q14-q16-Deletion.

Gensym.	mittlere Signalstärke			
	BPH-1	DU 145	PC-3	Kryogewebe
<i>AIM1</i>	10,45	9,70	9,98	10,42
<i>AMD1</i>	8,81	9,04	9,09	10,27
<i>ASCC3</i>	8,84	8,08	7,53	7,48
<i>ASF1A</i>	9,45	8,59	8,92	7,95
<i>ATG5</i>	9,12	7,58	8,60	8,00
<i>BCKDHB</i>	8,77	8,84	7,88	8,97
<i>C6orf204</i>	8,36	6,23	7,22	8,01
<i>CD109</i>	10,57	9,35	9,77	7,41
<i>CD164</i>	11,33	10,72	11,32	11,21
<i>COX7A2</i>	11,87	11,60	11,73	11,58
<i>CYB5R4</i>	9,05	9,15	8,09	8,05
<i>DSE</i>	10,14	10,30	4,80	8,42
<i>EEF1A1</i>	12,74	12,54	12,52	12,79
<i>FOXO3</i>	9,05	7,33	8,48	9,39
<i>GOPC</i>	9,34	8,19	8,23	8,68
<i>GTF3C6</i>	10,70	10,81	10,59	10,87
(Fortsetzung...)				

<i>(fortgesetzt)</i>				
mittlere Signalstärke				
Gensym.	BPH-1	DU 145	PC-3	Kryogewebe
<i>HACE1</i>	8,25	7,36	6,36	7,36
<i>HDAC2</i>	10,60	9,51	9,98	8,99
<i>HMG N3</i>	10,44	10,11	11,21	10,39
<i>IBTK</i>	9,26	9,62	9,48	9,36
<i>MARCKS</i>	10,43	4,20	8,64	9,51
<i>MCM9</i>	8,13	7,01	5,45	6,85
<i>ME1</i>	9,73	9,99	9,09	8,30
<i>MTO1</i>	8,62	7,84	7,54	7,60
<i>MYO6</i>	9,78	8,96	6,62	9,68
<i>NT5DC1</i>	8,52	8,01	8,19	8,44
<i>NUS1</i>	9,97	9,09	9,60	9,57
<i>OSTM1</i>	8,50	8,14	8,40	8,90
<i>PHIP</i>	9,39	8,90	8,94	9,46
<i>POPDC3</i>	8,10	9,51	8,57	4,41
<i>REV3L</i>	9,06	8,12	7,71	9,20
<i>RWDD1</i>	9,42	8,69	8,77	9,09
<i>SEC63</i>	9,78	9,24	9,14	10,15
<i>SENP6</i>	9,28	8,82	8,56	9,77
<i>SH3BGRL2</i>	8,65	6,43	6,65	7,85
<i>SLC17A5</i>	8,44	6,68	7,38	8,53
<i>SMAP1</i>	8,80	8,23	8,37	8,64
<i>SNX3</i>	11,35	10,55	10,88	10,81
<i>TMEM30A</i>	10,23	9,78	9,54	9,82
<i>TPBG</i>	8,78	9,36	7,55	7,92
<i>TRAF3IP2</i>	8,99	7,98	6,91	8,33
<i>TSPYL1</i>	10,74	9,90	9,91	10,88
<i>TSPYL4</i>	9,15	7,48	7,70	9,51
<i>TTK</i>	9,52	8,87	7,98	4,11
<i>TUBE1</i>	8,11	7,84	7,21	8,68
<i>PM20D2*</i>	9,15	7,94	8,31	7,92
<i>(Fortsetzung...)</i>				

(fortgesetzt)

mittlere Signalstärke				
Gensym.	BPH-1	DU 145	PC-3	Kryogewebe
<i>ORC3*</i>	10,29	10,15	8,37	9,54
<i>UBE2J1*</i>	8,34	9,15	7,61	8,46
<i>ZNF292*</i>	9,12	7,44	8,31	9,38

Anhang C

shRNA-Konstruktttest

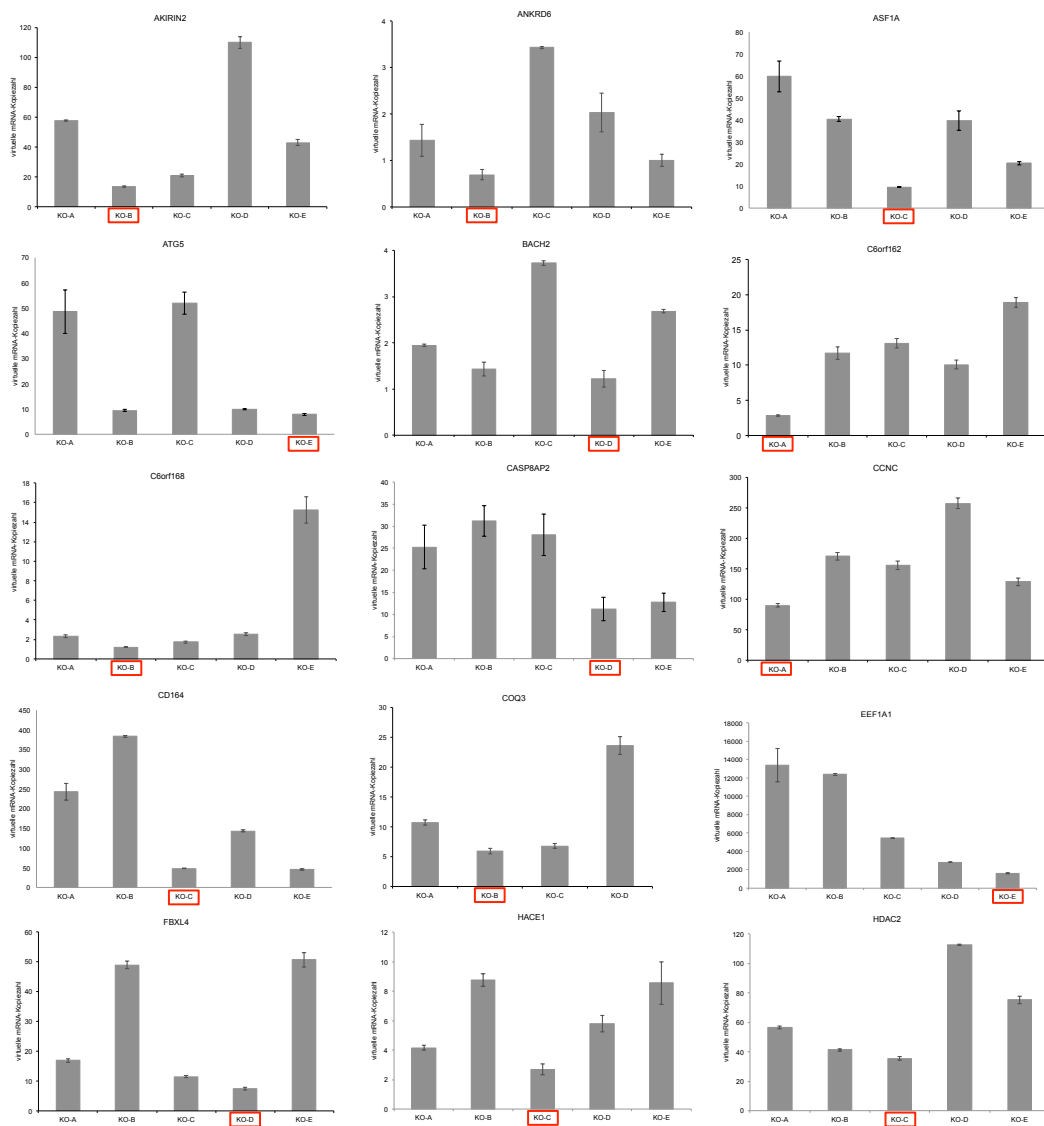
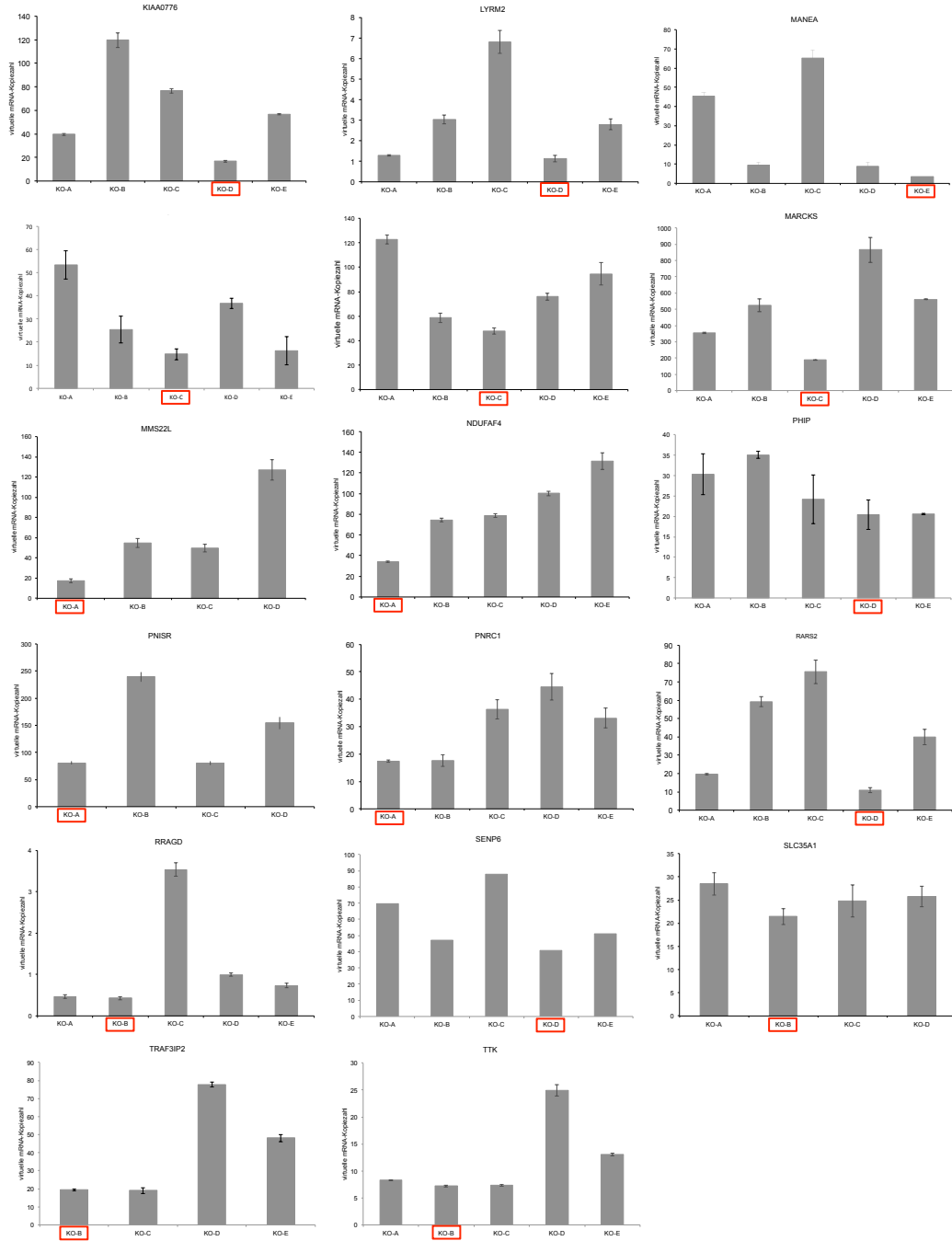


Abbildung C.1: Testung 5 kommerziell erhältlicher shRNA-Konstrukte zur Suppression der Kandidatengene innerhalb der 6q12-q22-Deletion. Es erfolgte eine lentivirale Transduktion der shRNA-Konstrukte und eine Bestimmung der mRNA-Expression mittels TaqMan-PCR. Die virtuelle mRNA-Kopiezahl wurde mittels Standardkurvenmethode gegen 10.000 *GAPDH*-Kopien bestimmt.

Abbildung C.1: Fortgesetzt



Anhang D

Validierung der shRNA-Konstrukte

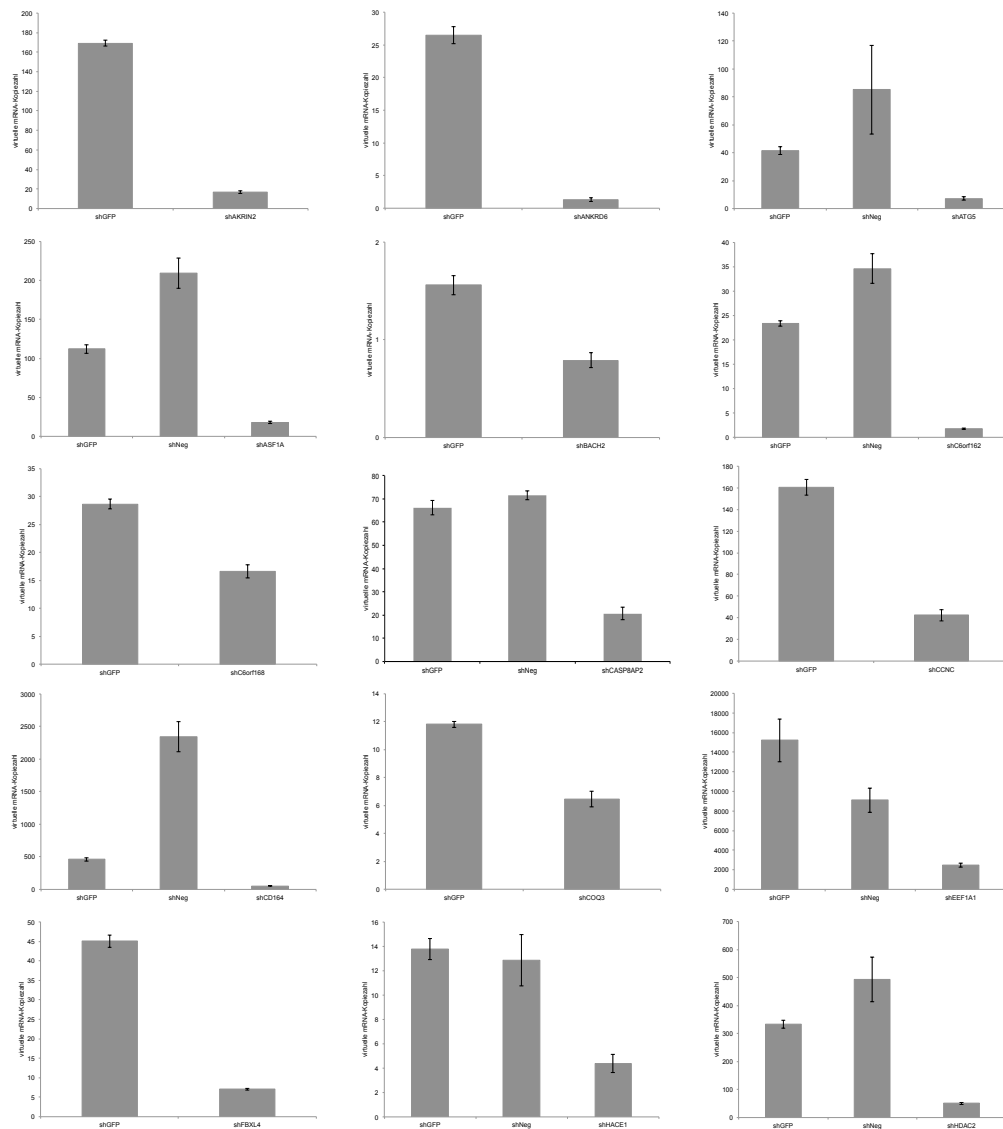
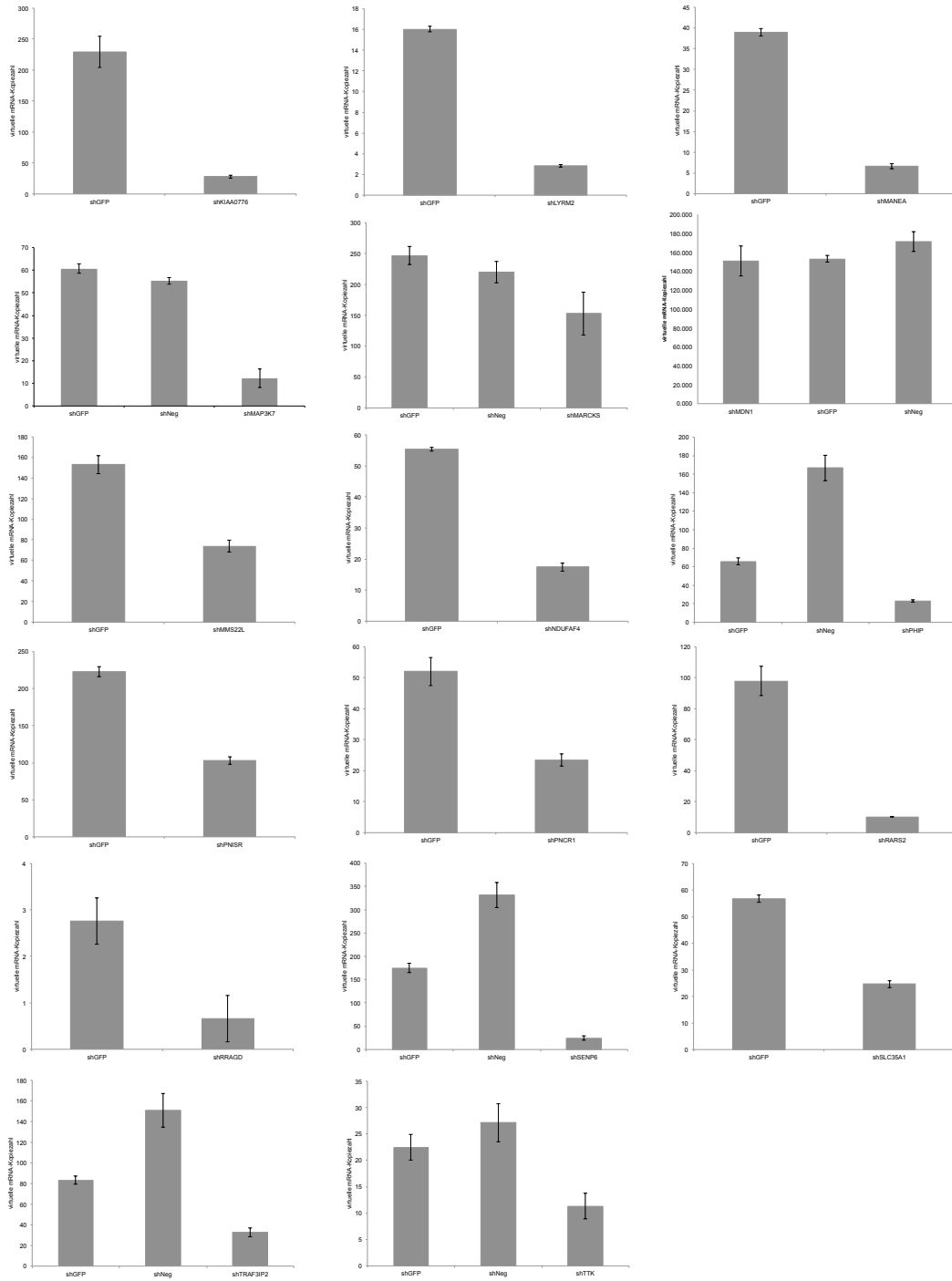


Abbildung D.1: Validierung der ausgewählten shRNA-Konstrukte zur Suppression der Kandidatengene innerhalb der 6q12-q22-Deletion. Es erfolgte eine lentivirale Transduktion der shRNA-Konstrukte und eine Bestimmung der mRNA-Expression mittels TaqMan-PCR. Die virtuelle mRNA-Kopiezahl wurde mittels Standardkurvenmethode gegen 10.000 *GAPDH*-Kopien bestimmt. Die Depletionseffizienz wurde im Vergleich zu den Negativkontrollen shNeg und shGFP bestimmt

Abbildung D.1: Fortgesetzt



Anhang E

Validierung der potentiellen Zielgene der 6q12-q22-Deletion

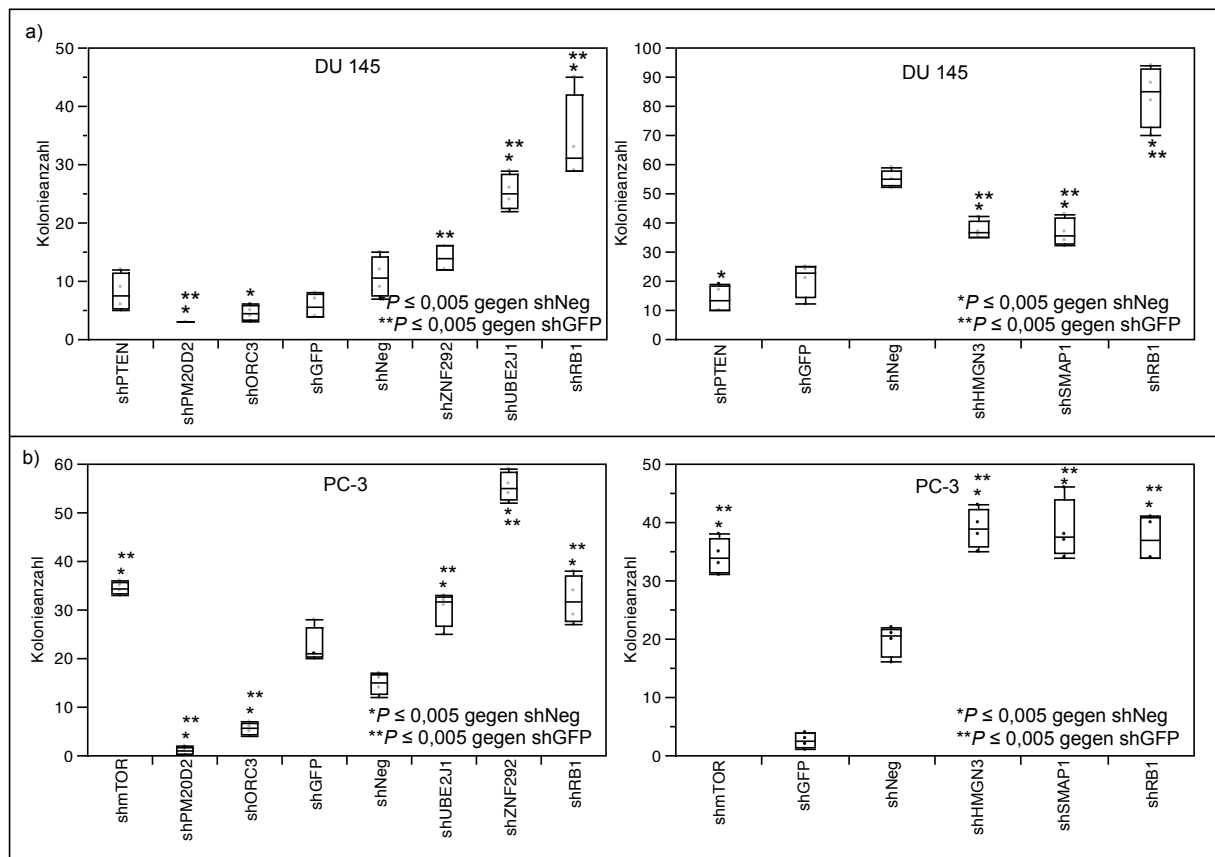


Abbildung E.1: Validierung der potentiellen Zielgene der 6q12-q22-Deletion. Durchgeführt wurde ein Colony-Formation-Assay mit den shRNA-supprimierten Zellen in a) DU 145 und b) PC-3. Makroskopisch gezählt wurden alle Zellkolonien ab einem Durchmesser von 1 mm. Die Unterschiede in der Kolonienanzahl wurden mittels einfaktorieller ANOVA-Analyse gegen die Kontrollen shGFP und shNeg bestimmt.

Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematische Darstellung des Gleason Grading nach D.F. Gleason	5
1.2	Einteilung der Prostatakarzinome nach ihrem Risikoprofil.	7
1.3	Therapieoptionen bei lokal begrenzten Prostatakarzinomen.	8
1.4	Therapieoptionen bei lokal fortgeschrittenen oder metastasierten Prostatakarzinomen.	9
1.5	Architektur der 6q-Deletion	17
1.6	Minimal deletierte Region auf 6q15	19
2.1	Prostata-Prognose-Array	23
2.2	Makroskopie einer standardmäßig zugeschnittenen Prostata	26
2.3	Schematische Darstellung eines multifokalen Prostatakarzinoms	26
2.4	Schematische Darstellung eines unifokalen Prostatakarzinoms	27
3.1	Beispiele für die mikroskopische FISH-Auswertung	48
4.1	Beispiele der mikroskopischen 6q15-FISH Auswertung	70
4.2	Assoziation des 6q15-Kopiezahlstatus mit der Wahrscheinlichkeit eines PSA-Rezidivs	76
4.3	Assoziation des 6q15-Kopiezahlstatus mit der Verteilung klinisch-biologischer Endpunktgruppen in allen Prostatatumoren.	80
4.4	Assoziation des 6q15-Kopiezahlstatus mit der Verteilung klinisch-biologischer Endpunktgruppen in Tumoren mit einem geringen Gleason Score ($\leq 3 + 4$).	81
4.5	Assoziation des 6q15-Kopiezahlstatus mit der Verteilung klinisch-biologischer Endpunktgruppen in Tumoren mit einem hohen Gleason Score ($\geq 4 + 3$).	82
4.6	Assoziation der 6q15-Deletion mit der <i>TMPRSS2:ERG</i> Fusion.	83
4.7	Häufige Deletionen des Prostatakarzinoms die mit der 6q15-Deletion assoziiert sind	84
4.8	Häufige Deletionen des Prostatakarzinoms die nicht mit der 6q15-Deletion assoziiert sind.	85
4.9	Beispiele der mikroskopischen 6q-FISH Auswertung.	87
4.10	Assoziation der 6q-Deletionsgröße mit der Wahrscheinlichkeit eines PSA-Rezidivs	92
4.11	Assoziation der 6q-Deletionsgröße mit der Verteilung klinisch-biologischer Endpunktgruppen in allen Prostatatumoren	94
4.12	Assoziation der 6q-Deletionsgröße mit der <i>TMPRSS2:ERG</i> Fusion	95
4.13	Heterogenität der 6q15-Deletion	97
4.14	Chronologische Abfolge der Entstehung einer 6q15-Deletion und einer <i>TMPRSS2:ERG</i> Fusion	98
4.15	Tumoren mit einer konstanten 6q-Deletionsgröße in allen 6q-deletierten Tumorstanzen	100

4.16 Tumoren mit unterschiedlichen 6q-Deletionsgrößen in den 6q-deletierten Tumorstanzen	101
4.17 Expressionsniveau von 43 Genen innerhalb der 6q14-q16 Region in 6 Prostata-Zelllinien	103
4.18 Expressionsniveau von 43 Genen innerhalb der 6q14-q16 Region in mikrodisseziertem benignen Prostatadrüsengewebe	104
4.19 Expressionsniveau von 13 Genen außerhalb der 6q14-q16 Region in 4 Prostata-Zelllinien	105
4.20 Testung 5 kommerziell erhältlicher shRNA-Konstrukte zur Suppression der Kandidatengene innerhalb der 6q12-q22-Deletion	106
4.21 Validierung der ausgewählten shRNA-Konstrukte zur Suppression der Kandidatengene inner- halb der 6q12-q22-Deletion	108
4.22 Validierung der shRNA-vermittelten Suppression der potentiell tumorrelevanten Gene inner- halb der 6q12-q22-Deletion	109
4.23 Screening der ausgewählten Kandidatengene innerhalb der 6q12-q22-Deletion mittels Colony- Formation-Assay in der Zelllinie BPH-1	112
4.24 Screening der ausgewählten Kandidatengene innerhalb der 6q12-q22-Deletion mittels Colony- Formation-Assay in der Zelllinie DU 145	115
4.25 Screening der ausgewählten Kandidatengene innerhalb der 6q12-q22-Deletion mittels Colony- Formation-Assay in der Zelllinie PC-3	118
4.26 Validierung der potentiellen Zielgene der 6q12-q22-Deletion	120
4.27 Nachweis der Ko-Depletion der potentiellen Tumorsuppressorgene der 6q12-q22-Deletion in der Zelllinie DU 145	122
4.28 Auswirkungen der Ko-Depletion auf das Koloniebildungsvermögen	124
4.29 Auswirkungen der Ko-Depletion auf die Fähigkeit des verankerungsunabhängigen Zellwachstums	126
C.1 Testung 5 kommerziell erhältlicher shRNA-Konstrukte zur Suppression der Kandidatengene innerhalb der 6q12-q22-Deletion	XXV
D.1 Validierung der ausgewählten shRNA-Konstrukte zur Suppression der Kandidatengene inner- halb der 6q12-q22-Deletion	XXVII
E.1 Validierung der potentiellen Zielgene der 6q12-q22-Deletion in den Zelllinien DU 145 und PC-3	XXIX

Tabellenverzeichnis

1.1	TNM-Klassifikation von Prostatakarzinomen nach UICC ^[34]	6
1.3	Häufige Deletionsregionen beim Prostatakarzinom.	14
1.5	Maximale Ausdehnung der 6q-Deletion in der Literatur.	16
1.6	Minimal deletierte Region der 6q-Deletion in der Literatur.	18
2.1	Zusammensetzung des Prostata-Prognose-Arrays	24
2.2	Zusammensetzung der biologisch-klinischen Endgruppen	25
2.3	Zusammensetzung des multifokalen Prostata-Heterogenitätsarrays	27
2.4	Zusammensetzung des unifokalen Prostata-Heterogenitätsarrays	28
2.5	DH10B-Klone zur Herstellung der FISH-Sonden	28
2.6	Humane Zelllinien	29
2.7	shRNA-pLKO.1 transformierte <i>E. coli</i> Klone	29
2.8	TaqMan [®] -Sonden	31
2.9	Western Blot Antikörper	34
3.1	Zusammensetzung des Hybridisierungsansatzes für die FISH	47
3.2	Kultivierung und Passagierung von humanen Zelllinien	50
3.3	Pipettierschema für die Ko-Transduktion der identifizierten tumorsuppressiven Gene.	54
3.4	Transduktion von Prostata-(karzinom)Zelllinien	55
3.5	Verwendung der Western Blot Antikörper	68
4.1	Assoziation der 6q15-Deletion mit den klinisch-pathologischen Parametern des Prostatakarzi- noms in allen Tumoren	71
4.2	Assoziation der 6q15-Deletion mit den klinisch-pathologischen Parametern des Prostatakarzi- noms in den ERG-negativen Tumoren	72
4.3	Assoziation der 6q15-Deletion mit den klinisch-pathologischen Parametern des Prostatakarzi- noms in den ERG-positiven Tumoren	73
4.4	Assoziation der 6q15-Deletion mit der Proliferation der Prostatatumorzellen gemessen am Ki67 Labeling Index (Ki67 LI)	74
4.5	Cox-proportionalen Hazard Analyse zur Bestimmung der prognostischen Aussagekraft der 6q15-Deletion im Vergleich zu den etablierten Prognoseparametern in allen Prostatatumoren	77

4.6	Cox-proportionalen Hazard Analyse zur Bestimmung der prognostischen Aussagekraft der 6q15-Deletion im Vergleich zu den etablierten Prognoseparametern in ERG-negativen Prostatatumoren	78
4.7	Cox-proportionalen Hazard Analyse zur Bestimmung der prognostischen Aussagekraft der 6q15-Deletion im Vergleich zu den etablierten Prognoseparametern in ERG-positiven Prostatatumoren	79
4.8	Assoziation der 6q-Deletionsgröße mit den klinisch-pathologischen Parametern des Prostatakarzinoms in allen 6q-deletierten Tumoren	88
4.9	Assoziation der 6q-Deletionsgröße mit der Proliferation der Prostatatumorzellen gemessen am Ki67 Labeling Index (Ki67LI)	90
4.10	Cox-proportionalen Hazard Analyse zur Bestimmung der prognostischen Aussagekraft der 6q-Deletionsgröße im Vergleich zu den etablierten Prognoseparametern in allen Prostatatumoren	93
4.11	Prävalenz der 6q15-Deletion in der Heterogenitätsanalyse	96
4.12	Auftreten und Verteilung der 6q-Deletionsgrößen in der Heterogenitätsanalyse.	99
4.13	Auswirkungen der Ko-Depletion auf die Fähigkeit des invasiven Zellwachstums.	127
A.1	Auflistung der gestesten shRNA-Konstrukte	XVI
B.1	Ergebnisse der Affymetrix-Chip-Analyse	XXII

Publikationen und Kongresse

Publikation

Kluth M, Hesse J, Heidl A, Krohn A, Steurer S, Sirma H, Simon R, Mayer PS, Schumacher U, Grupp K, Izbickei JR, Pantel K, Dikomey E, Korbel JO, Plass C, Sauter G, Schlomm T, Minner S. **Genomic deletion of MAP3K7 at 6q12-22 is associated with early PSA recurrence in prostate cancer and absence of TMPRSS2:ERG fusions.** Modern Pathology 2013, Jul;26(7):975-83

Kongresse

1. Vortrag:

MAP3K7 deletions have prognostic relevance in prostate cancer without ERG protein expression. 96. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie e.V. 31.05. - 03.06. 2012 Berlin

2. Posterpräsentation

Kluth M, Amschler N, Heidl A, Jung S, Simon R, Schlomm T, Sauter G, Minner S. **Clinical impact of 6q deletion patterns in prostate cancer.** [abstract]. In: Proceedings of the 104th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research; 2013 Apr 6-10; Washington, DC. Philadelphia (PA): AACR; Cancer Res 2013;73(8 Suppl):Abstract nr 1972. doi:10.1158/1538-7445.AM2013-1972

3. Posterpräsentation

Kluth M, Tsourlakis MC, Meyer D, Krohn A, Freudenthaler F, Bauer M, Salomon G, Heinzer H, Michl U, Steurer S, Simon R, Sauter G, Schlomm T, Minner S. **6q15 deletion impede development of ERG fusion in prostate cancer.** [abstract]. In: Proceedings of the 105th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research; 2014 Apr 5-9; San Diego, CA. Philadelphia (PA): AACR; Cancer Res 2014;74(19 Suppl):Abstract nr 2216. doi:10.1158/1538-7445.AM2014-2216

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei denen bedanken, die mich bei der Durchführung dieser Arbeit unterstützt haben. Besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Guido Sauter für die fachkompetente Unterstützung sowie die konstruktive Kritik bei der Erstellung meiner Arbeit. Herrn Prof. Dr. Thomas Dobner danke ich für die Zweitbetreuung meiner Arbeit und die sehr hilfreichen Forschungsseminare am HPI.

Besonderer Dank gilt außerdem PD Dr. Ronald Simon und PD Dr. Sarah Minner für die immer offene Tür, die fachkompetenten und konstruktiven Gespräche, sowie die aufmunternden Worte, wenn mal nicht alles gleich geklappt hat.

Anna Heintl, Dr. Jana Hesse, Dr. Omar Habib, Mina Eshagzaiy, Thomas Haß und Simon Jung danke ich für die super Zusammenarbeit am 6q-Projekt.

Außerdem Danke ich all meinen Kolleginnen und Kollegen die mir während der Erstellung dieser Arbeit zur Seite standen und mir an so manchen arbeitsintensiven und stressigen Tagen den Rückenfrei gehalten haben. Dies gilt insbesondere für Sawinee Masser, Silvia Schnöger, Sascha Egthessadi, Anne Meyer und Bianca Kelp.

Außerdem Danke ich meinem Mann Christian Wolff dafür, dass er mich immer unterstützt und immer für mich da ist.

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Die den herangezogenen Werken wörtlich oder sinngemäß entnommenen Stellen sind als solche gekennzeichnet.

Hamburg, den