Anwendung von Hochdurchsatzmethoden zur translationalen Erforschung der 5q21-Deletion beim Prostatakarzinom

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
im Fachbereich Biologie der Universität Hamburg

Vorgelegt von
Lia Burkhardt

Hamburg 2015

Genehmigt vom Fachbereich Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Priv.-Doz. Dr. R. SIMON
Weitere Gutachterin der Dissertation:
Frau Professor Dr. J. KEHR
Tag der Disputation: 01. April 2016

Professor Dr. D. Hanelt
Vorsitzender des
Fach-Promotionsausschusses Biologie

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG 4

1.1 DIE ROLLE VON HOCHDURCHSATZMETHODEN IN DER TRANSLATIONALEN FORSCHUNG 4

1.2 NEXT GENERATION SEQUENCING (NGS) 7

1.2.1 ÜBERSICHT 7

1.2.2 TECHNISCHE VORAUSSETZUNGEN FÜR DIE GESAMTGENOMSEQUENZIERUNGEN PER NGS 8

1.2.3 NGS-TECHNOLOGIE 8

1.3 INTERNATIONAL CANCER GENOME CONSORTIUM (ICGC) 11

1.4 DAS PROSTATAKARZINOM (PCA) 12

1.4.1 INZIDENZ UND MORTALITÄT DES PROSTATAKARZINOMS 12

1.4.2 DIAGNOSTIK DES PROSTATAKARZINOMS 14

1.4.3 THERAPIE DES PROSTATAKARZINOMS 16

1.4.4 STAGING UND GRADING DES PROSTATAKARZINOMS 18

1.5 DIE BEDEUTUNG DER TRANSLATIONALEN FORSCHUNG FÜR DAS PROSTATAKARZINOM 19

1.6 DIE MOLEKULARBIOLOGIE DES PROSTATAKARZINOMS 20

1.7 DER 5Q-LOCUS BEIM PROSTATAKARZINOM 23

1.8 CHROMODOMAIN HELICASE DNA BINDING PROTEIN 1 (CHD1) 25

1.9 ZIEL DER ARBEIT UND FRAGESTELLUNG 29

2 MATERIAL UND METHODEN 30

2.1 MATERIAL 30

2.1.1 VERWENDETE REAGENZIEN, LÖSUNGEN UND KITS 30

2.1.2 VERWENDETE GERÄTE 30

2.1.3 GEWEBEKOLLEKTIV 30

2.1.4 ZELLKULTURMEDIEN 37

2.1.5 OLIGONUKLEOTIDE 38

2.1.6 ANTIKÖRPER FÜR DIE WESTERNBLOTS 38

2.1.7 SHRNA-KONSTRUKTE 39

2.1.8 ÜBEREXPRESSIONSKONSTRUKTE 40

2.1.9 PLASMIDE ZUR PRODUKTION VON LENTIVIRALEN PARTIKELN 40

2.1.10 TAQMAN SONDEN 40

2.1.11 SOFTWARE UND DATENBANKEN 41

2.2 METHODEN 41

2.2.1 FIXIERUNG UND EINBETTUNG VON FFPE-GEWEBE 41

2.2.2 NUKLEINSÄUREISOLATION 42
2.2.3 QUALITÄTSKONTROLLEN ISOLIERTER NUKLEINSÄUREN 43
2.2.4 FLUORESZENZ-*IN-SITU*-HYBRIDISIERUNG (FISH) 45
2.2.5 EXPRESSIONSANALYSEN MITTELS Q-PCR 48
2.2.6 ZELLKULTUREXPERIMENTE 49
2.2.7 PROTEINISOLATION UND BESTIMMUNG DER PROTEINKONZENTRATION 50
2.2.8 WESTERNBLOT 51
2.2.9 COLONY FORMATION ASSAY 51
2.2.10 STATISTIK 53

3 ERGEBNISSE 54

3.1 ENTWICKLUNG EINES DNA-ISOLATIONSVERFAHRENS ZUR MATE-PAIR-SEQUENZIERUNG 54
3.1.1 ISOLATION VON NUKLEINSÄUREN AUS PROSTATA-GEWEBESCHNITTEN 54
3.1.2 EIGNUNG DES ETABLIERTEN PROBENAUFBEREITUNGSVERFAHRENS FÜR DIE MATE-PAIR-SEQUENZIERUNG 70
3.2 UNTERSUCHUNG DER MOLEKULAREN EPIDEMIOLOGIE VON 5Q21-DELETIONEN AN EINEM REPRÄSENTATIVEN SET VON PROSTATAKARZINOMEN 82
3.2.1 5Q21 DELETIONEN IN KLINISCHEN PROSTATAKARZINOMEN 82
3.2.2 5Q21-DELETIONEN IN PROSTATAKARZINOM-VORSTUFEN 82
3.3 UNTERSUCHUNG DER KLINISCHEN RELEVANZ DER 5Q21-INAKTIVIERUNG 83
3.3.1 ASSOZIATION VON 5Q21-DELETIONEN ZU KLINISCH-PATHOLOGISCHEN PARAMETERN 83
3.3.2 ASSOZIATION VON *CHD1*-DELETIONEN ZUR PATIENTENPROGNOSE 85
3.3.3 ASSOZIATION VON 5Q21-DELETIONEN MIT ALTERNATIVEN ENDPUNKTEN 87
3.4 EXPRESSIONSANALYSEN VON CHD1 IN KLINISCHEN TUMOREN 91
3.5 ASSOZIATIONEN DER 5Q21-DELETION ZU ANDEREN MOLEKULAREN VERÄNDERUNGEN DES PROSTATAKARZINOMS 92
3.6 FUNKTIONELLE ANALYSEN ZUR KLÄRUNG DER TUMORSUPPRESSOR-ROLLE VON CHD1 95
3.6.1 ETABLIERUNG VON TESTSYSTEMEN FÜR FUNKTIONELLE ANALYSEN ZUM CHD1 95
3.6.2 EINFLUSS VON CHD1 AUF DAS WACHSTUM VON PROSTATAKARZINOMZELLEN 97
3.6.3 EINFLUSS DES CHD1 AUF DIE FÄHIGKEIT DES ADHÄSIONSUNABHÄNGIGEN WACHSTUMS VON PCA-ZELLLINIEN (SOFT AGAR ASSAY) 99
3.6.4 EINFLUSS DES CHD1 AUF DIE FÄHIGKEIT DER MIGRATION VON PCA-ZELLLINIEN (INVASION ASSAY) 100
3.7 FUNKTIONELLE ANALYSEN ZUR KLÄRUNG DER MOLEKULAREN KONSEQUENZEN DER CHD1-INAKTIVIERUNG 101
3.7.1 BEDEUTUNG DER CHD1-INAKTIVIERUNG FÜR DIE ENTSTEHUNG VON TMPRSS2:ERG-FUSIONEN 101
3.7.2 EINFLUSS VON CHD1 AUF DEN AR-SIGNALWEG 102
3.7.3 DER EINFLUSS VON CHD1 AUF DIE EXPRESSION ANDERER AR-RESPONSIVER TUMORSUPPRESSOREN 104

4 DISKUSSION 106

4.1 ENTWICKLUNG EINES DNA-ISOLATIONSVERFAHRENS ZUR MATE-PAIR-SEQUENZIERUNG 106

4.2 UNTERSUCHUNGEN DES 5Q21-LOKUS DES PROSTATAKARZINOMS 109

5 ZUSAMMENFASSUNG 116

6 VERZEICHNIS DER VERWENDETEN LITERATUR I

7 ANHANG XII

7.1 VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN XII

7.2 VERZEICHNIS DER TABELLEN XIV

7.3 VERWENDETE MATERIALIEN UND REAGENZIEN XV

7.4 VERWENDETE GERÄTE XX

7.5 VERZEICHNIS DER WICHTIGSTEN ABKÜRZUNGEN XXII

7.6 ZUSÄTZLICHE PROTOKOLLE XXIV

7.7 AUS DIESER ARBEIT HERVORGEGANGENE PUBLIKATIONEN XXXIII

7.8 DANKSAGUNG XXXIII

7.9 EIDESTATTLICHE VERSICHERUNG XXXIII

1 EINLEITUNG

1.1 Die Rolle von Hochdurchsatzmethoden in der translationalen Forschung

Der Begriff der translationalen Forschung wurde erstmals 1992 vom National Cancer Institute (NCI) des National Institute of Health (NIH) verwendet. Unter dem Leitsatz „*Vom Forschungslabor direkt in die Klinik*" sollte im Rahmen des SPORE (Specialized Program of Research Excellence) Forschung betrieben werden, deren Erkenntnisse direkt der Prävention, Diagnose und Behandlung von humanen Tumorerkrankungen dienten. Claude Lenfant definierte den Begriff der Translationalen Forschung 2003 folgendermaßen: *Forschung, die darauf abzielt, Erkenntnisse der Grundlagenforschung für praktische Anwendungen zur Verbesserung der menschlichen Gesundheit zu erlangen* (1). Die Strategie der translationalen Forschung schließt im Allgemeinen zwei Phasen ein. In einer ersten Screeningphase werden potentiell krankheitsrelevante molekulare Veränderungen identifiziert, deren Bedeutung als klinischer Marker oder Therapieziel dann in einer zweiten Phase validiert wird. Beide Phasen unterscheiden sich grundlegend. Während des Screenings werden möglichst *viele* molekulare Merkmale an einem *kleinen* Patientenkollektiv verglichen, z.B. an gesunden und erkrankten Geweben, um die besten Kandidaten für krankheitsassoziierte Merkmale zu identifizieren. In der Validierungsphase werden diese Kandidaten-Merkmale gezielt an einem möglichst *großen* Patientenkollektiv analysiert, um Rückschlüsse auf ihre Bedeutung für den Verlauf der Erkrankung zu erhalten.

Mit der Einführung des sogenannten „Next Generation Sequencing" (NGS) haben sich die technischen Möglichkeiten zur Durchführung translationaler Studien grundlegend gewandelt. Diese noch relativ junge Methode ermöglicht eine parallele Hochdurchsatzsequenzierung großer Mengen DNA und stellt somit die ideale Screeningmethode in der Genomforschung dar. Im Gegensatz zur Sanger-Sequenzierung, mit der in einem Ansatz nur wenige Exons ausgewählter Gene sequenziert werden können, ermöglicht das NGS die Sequenzierung ganzer Genome in wenigen Tagen. Neben diesem sogenannten „Whole Genome Sequencing" (WGS) ist es jedoch ebenso möglich, über Anreicherungsverfahren ausgewählte Regionen eines Genoms zu sequenzieren („Targeted NGS"). Das „Whole Exome Sequencing" z.B. ist eine Form des „Targeted Sequencings", bei dem alle Exons eines Genoms angereichert und parallel sequenziert werden. Doch nicht nur der hohe Datendurchsatz, sondern auch die Bandbreite der analysierbaren molekularen Veränderungen, machen diese Methode einzigartig. Das NGS ermöglicht nicht nur die Identifizierung von Punktmutationen (Single Nucleotide Variations, SNV), sondern auch alle strukturellen Veränderungen der DNA (Structural Variations; SV). Hierbei kann es sich um Deletionen (Verlust von DNA-Basen), Insertionen (zusätzlicher Einbau von DNA-Basen), Inversionen (Drehung eines DNA-Fragmentes um 180°), Amplifikationen (Vervielfältigung von Genen) oder Translokationen (Verlagerung von Chro-

mosomenabschnitten) handeln. Gerade Translokationen, bei denen ganze Chromosomenabschnitte auseinanderbrechen und sich neu zusammenlagern, sind ein besonderes Merkmal des Prostatakarzinoms. Als Folge solcher Zusammenlagerungen von DNA-Abschnitten, die normalerweise nicht nebeneinander liegen, kommt es häufig zu dem Zusammenschluss zweier Gene, die auf diese Weise ein neues, sogenanntes Fusionsgen, bilden. Doch nicht nur Veränderungen der DNA-Sequenz können mittels NGS analysiert werden. Auf RNA-Ebene ist die Sequenzierung von Micro-RNAs, kurzen und langen nicht kodierenden RNAs sowie natürlich der mRNA möglich. Sogar die Darstellung epigenetische Muster ist mittels NGS möglich. So kann per Bisulfidsequenzierungen die Darstellung des kompletten Epigenoms erfolgen. Durch die Fähigkeit, all diese molekularen Ebenen einer Probe mit einer einzigen Methode zu analysieren und zu kombinieren, hat dieses Verfahren die Krebsforschung revolutioniert. Dieser Charakter des NGS spiegelt sich auch in der Tatsache wieder, dass zur Zeit drei internationale Konsortien in einer bislang einzigartig koordinierten Weise die Profilierung von humanen Tumoren (The Cancer Genome Atlas, TCGA und das International Cancer Genome Consortium, ICGC) und gesunden menschlichen Geweben (1000 Genome Project) mit dieser Methode durchführen.

Bereits Ende der 1990er Jahre hat die Validierungsphase mit der Entwicklung der Gewebe-Mikro-Array-Technologie (Tissue Micro Array, TMA) eine ebenso große Veränderung erfahren wie die Identifizierungsphase heute mit der NGS-Technologie. Die TMA-Technologie ist ein Hochdurchsatzverfahren zur Gewebeanalyse, das bereits 1998 entwickelt wurde (2) und seitdem eine rasante Verbreitung erfahren hat. Bei diesem Verfahren können mehrere hundert Gewebeproben gleichzeitig auf einem Objektträger analysiert werden. Dazu werden kleine Gewebestanzen (0,6 mm Durchmesser) mit einer Hohlnadel aus jedem der Gewebeblöcke entfernt und in einem geordneten Raster (Array) in einen leeren Paraffinblock eingebracht. Die TMA-Technologie bietet gegenüber dem herkömmlichen Verfahren (d.h. der sequenziellen Analyse von hunderten einzelner Objektträger) nicht nur den Vorteil einer enormen Geschwindigkeitssteigerung, sondern vor allem einen bisher unerreichten Grad der Standardisierung von Gewebeanalysen. Dies gilt sowohl für die experimentelle Durchführung, weil alle Gewebeproben innerhalb des Arrays mit exakt denselben Reagenzien unter exakt den gleichen experimentellen Bedingungen analysiert werden, als auch für die Interpretation der Analyseergebnisse, weil alle Gewebeproben in kürzester Zeit im direkten Vergleich betrachtet werden können. Die TMA-Technologie hat sich daher zum Goldstandard der Gewebeanalyse entwickelt. Sie erlaubt alle Arten von *in-situ*-Analysen, die auch an konventionellen Großschnitten durchgeführt werden können, wie z. B. Immunhistochemie, Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung und RNA-*in-situ*-Hybridisierung. Idealerweise wird zu einem TMA eine Datenbank mit den klinisch-pathologischen Parametern der Gewebeproben des TMAs angelegt, die dann mit den molekularen Befunden der TMA-Analyse ergänzt wird. Je nach Länge der Gewebestanzen im TMA-Block (meist 2-4 mm) können ca. 100 - 200 Gewebeschnitte von

einem TMA angefertigt werden, die ebenso viele molekulare Analysen erlauben. Durch den Vergleich von klinisch-pathologischen Parametern mit den molekularen Daten können gezielt Korrelationen zwischen dem Genotyp und dem Phänotyp (z.B. Assoziationen zwischen der Veränderung eines Genes und dem pathologischem Tumorstadium) oder der Patientenprognose (z.B. Assoziationen zwischen der Veränderung eines Genes und der Überlebenszeit eines Patienten) durchgeführt werden. Aufgrund der hohen Anzahl von Gewebeproben in einem solchen Array ermöglichen TMA-Untersuchungen eine hohe statistische Aussagekraft.

Die NGS- und TMA-Technologien ergänzen sich in so idealer Weise, dass sie ein hohes Potential für das zukünftige Standardvorgehen für translationale Forschungsprojekte aufweisen.

1.2 Next Generation Sequencing (NGS)

1.2.1 Übersicht

Obwohl die Struktur der DNA schon 1953 durch Watson und Crick aufgeklärt werden konnte (3), sollten noch über zwanzig Jahre vergehen, bis es gelang, die genaue Nukleotid-Abfolge von DNA-Abschnitten in praktikablen Verfahren zu entschlüsseln. Mitte der siebziger Jahre wurden gleich zwei Methoden entwickelt, die dies zuließen: die Methode von Maxam und Gilbert, die auf einer basenspezifischen chemischen Spaltung der DNA beruht (4) und die Kettenabbruchmethode von Sanger und Coulson (5), wobei sich letztere durchsetzen konnte und sich ihr Grundprinzip noch heute in der Standardsequenzierung wiederfindet („Sanger-Sequenzierung"). Seither unterliegt die DNA-Sequenzierung einer ständigen technischen Weiterentwicklung. Mit dem Start des *Human Genome Projects (HGP)* 1990, dem öffentlich geförderten Forschungsverbund zur Sequenzierung des menschlichen Genoms, nahm die Geschwindigkeit dieser Entwicklungen deutlich zu. Ein Effekt, der nochmals verstärkt wurde, als das *HGP* private Konkurrenz durch die 1998 von Craig Venter gegründete Firma *Celera Genomics* erhielt. Der Ersatz handgegossener Gele durch Gelkapillaren und die Markierung der vier DNA-Basen mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen legten den Grundstein für die Automatisierung der zuvor sehr zeitaufwendigen und fehleranfälligen DNA-Sequenzierung. Weiterentwicklungen wurden im Zuge des Wettlaufs um die Entschlüsselung des menschlichen Genoms zwischen dem *HGP* und *Celera Genomics* stark vorangetrieben und führten zu immer schnelleren und kostengünstigeren Sequenziertechniken. Diese, immer noch auf der „Sanger-Sequenzierung" basierenden Methoden, die schließlich die Entschlüsselung des menschlichen Genoms ermöglichten (6,7), werden im Allgemeinen als „*Sequenziertechniken der ersten Generation*" bezeichnet. Obwohl noch heute in den meisten molekularbiologischen Laboren angewendet und für einzelne Gene gut geeignet, waren diese Verfahren für die Sequenzierung kompletter Genome ineffizient. Die aufwendige Probenaufbereitung, die notwendige Auftrennung der PCR-Produkte mittels Elektrophorese und die geringe Parallelisierbarkeit führten zu immensen Kosten und standen einer annehmbaren Geschwindigkeit der Bearbeitung großer Nukleotidmengen entgegen. Inklusive der Vorarbeiten dauerte die erste Sequenzierung eines humanen Konsensus-Genoms 13 Jahre und kostete rund 3 Milliarden US-Dollar. Der Einsatz von gut 1000 Wissenschaftlern aus 40 Ländern war hierzu nötig (6,8). Die Weiterentwicklung dieser Technologien, sowie die Einführung des sogenannten „Shot Gun" – Verfahrens durch den Biotechunternehmer Craig Venter, senkten den finanziellen und zeitlichen Aufwand deutlich. Anfang 2007 wurde auf diese Weise die Sequenzierung des ersten Genoms eines einzelnen Menschen fertiggestellt Es war das Genom von Venter selbst, sequenziert durch seine Firma „*Celera Genomics*" und kostetet noch gut 100 Millionen US Dollar. Es wurde daher bald klar, dass für die Sequenzierung weiterer Komplettgenome neue Verfahren entwickelt werden mussten, die auf parallelen Arbeitsverfahren basieren. Mit einer Dauer von 4 Monaten, Kosten von rund 1,5 Millionen US-Dollar und der

Arbeit einer Hand voll Wissenschaftlern, brachte die Sequenzierung des Genoms von James Watson 2007 den beabsichtigten Publicity-Effekt in der Einführungsphase des sogenannten Next Generation Sequencing (*NGS)* (9).

1.2.2 Technische Voraussetzungen für die Gesamtgenomsequenzierungen per NGS

Das NGS ist eine aufwendige und anspruchsvolle Methode. Um alle Ebenen genetischer und epigenetischer Alterationen zu analysieren, müssen verschiedene Verfahren innerhalb des NGS durchgeführt werden. Die Entschlüsselung der reinen DNA-Sequenz wird mittels sogenannter Single-Read- oder Paired-End-Sequenzierung durchgeführt. Große strukturelle Veränderungen werden mit der sogenannten Mate-Pair-Sequenzierung detektiert. Für die Ermittlung des Expressionsmusters werden cDNA-Libraries aus hochgenomischer RNA sequenziert. Methylierungsmuster ganzer Genome lassen sich über das NGS bisulfidbehandelter DNA darstellen. Jedes dieser Verfahren stellt unterschiedliche Anforderungen an die Qualität des Ausgangsmaterials. Schon für reine Sequenz-, Expressions- und Methylierungsanalysen bedarf es qualitativ hochwertiger und reiner DNA bzw RNA in relativ großen Mengen. Für Untersuchungen großer struktureller Varianten per Mate-Pair-Sequenzierung reicht selbst diese Qualität der Nukleinsäuren jedoch nicht aus. Hier bedarf es besonders hochgenomischer DNA, deren Integrität auch nach dem Gewebeaufschluss und dem Isolationsvorgang noch in höchstem Maße erhalten bleibt. Ist für erstgenannte Methoden eine Fragmentlänge von 1.000 bp ausreichend, so ist eine Sequenzierung per Mate-Pair-Verfahren auf Fragmentlängen von mindestens 20.000 bp angewiesen. Je nach Organ oder Tumortyp muss das Gewebe jedoch mehr oder weniger stark aufgeschlossen werden, wobei ein stärkerer Aufschluss immer auch eine stärkere DNA-Schädigung bedingt. Die Etablierung eines auf den zu untersuchenden Gewebe- oder Tumortyp optimal zugeschnittenen Gewebeaufschlussverfahrens hat bei NGS-Analysen per Mate-Pair-Sequenzierung daher eine kritische Bedeutung.

1.2.3 NGS-Technologie

Die Besonderheit des NGS ist die Fähigkeit, mehrere Millionen von DNA-Fragmenten gleichzeitig in einem parallelen Ansatz zu sequenzieren. Hierzu gibt es verschiedene Verfahren, von denen sich momentan zwei auf dem Markt durchgesetzt haben. Die „Sequencing-By-Synthesis-Methode“ von Illumina liest neu eingebaute Nukleotide von auf Glasslides gebundenen DNA-Strängen während ihrer Synthese. Der Ion Torrent von Life-Technologies nutzt eine auf einer Halbleitertechnologie basierenden, ph-gesteuerten Sequenzierung von DNA-Strängen, die an Beads gebunden sind. Beiden Verfahren sind allerdings die allgemeinen Schritte des NGS gemein: die zu sequenzierende DNA muss amplifiziert und fragmentiert

werden und anschließend mit Adaptoren versehen werden, die an das jeweilige Trägermaterial für die Sequenzierung binden können. Die so entstandenen, adapterlegierten DNA-Fragmente werden als Library bezeichnet. Soll das ganze Genom sequenziert werden, so wird eine Library aus der gesamten DNA erstellt. Sind nur spezifische Regionen interessant, so werden diese vor der Sequenzierung angereichert („Targeted Sequencing"). Beim NGS werden alle Fragmente, oder „Reads", grundsätzlich mehrfach gelesen. Die Häufigkeit, mit der ein Nukleotid gelesen wurde, wird als sogenannte „Depth of Coverage" angegeben oder oftmals auch nur als „Coverage" oder „Sequenziertiefe". Innerhalb der oben beschriebenen Grundverfahren des NGS gibt es nun wiederum - je nach Fragestellung - verschiedene Techniken der Library-Präparation, die zu einem unterschiedlichem Output führen und verschiedene Anforderungen an die eingesetzten Nukleinsäuren stellen. Die für die vorliegende Arbeit verwendeten Techniken werden im Folgenden kurz erläutert.

Verschiedene NGS-Techniken je nach Fragestellung:

1) „Single End Sequencing":
   Ziel dieses Verfahrens, das auch als „Single Read" oder „Short Read" Sequencing bezeichnet wird, ist eine möglichst tiefe Sequenzierung der DNA (also das Erlangen einer hohen Coverage), um Veränderungen auf Basenebene zu identifizieren. Es werden hierbei zwischen 75 und 300 bp eines Endes der Libraryfragmente sequenziert und die Sequenzdaten mit dem Referenzgenom verglichen (sogenanntes „Mapping").

2) „Paired End Sequencing":
   Bei diesem Verfahren wird nicht nur ein, sondern es werden beide Enden eines Libraryfragmentes sequenziert. Dies führt zu einer höheren Sequenziergenauigkeit, da außer den reinen Sequenzen außerdem Informationen zur Länge des Abstandes, der zwischen den sequenzierten Fragmenten liegt, erlangt werden. Besonders wichtig ist dieser Ansatz für „*De Novo* Sequenzierungen", also Erstsequenzierungen eines neuen Genoms. Aber auch bei der Gesamtgenomsequenzierung bekannter Genome und sogar beim „Targeted Sequencing" ausgewählter Regionen wird dieses Verfahren aufgrund seiner höheren Genauigkeit häufig angewendet.

3) „Transcriptome Sequencing"
   Transkriptomsequenzierungen werden an cDNA-Libraries vollzogen, die aus möglichst unversehrter RNA generiert werden müssen und anschließend per „Single Read" oder „Paired End Sequencing" analysiert werden.

4) „Mate Pair Sequencing“

Diese Technik wird zur Identifizierung von strukturellen Varianten innerhalb des Genoms angewendet und ist eine besondere Form des „Paired End Sequencing“. Wie bei der normalen Paired End Sequenzierung werden beide Enden eines Libraryfragmentes sequenziert, der dazwischen liegende DNA-Bereich, das sogenannte Insert, ist jedoch sehr lang (bis zu 5 kb). Auch hier wird als Zusatzinformation zu der reinen Sequenz beider Enden die Information über den Abstand beider Sequenzabschnitte erlangt. Ein abnormales Mapping der Probenlibraries gegen das Referenzgenom weist auf eine strukturelle Veränderung hin. Ist in der Probe der Abstand zwischen den Reads kleiner als im Referenzgenom, so liegt eine Deletion in der untersuchten Probe vor, ist er größer, eine Insertion. Bei diesem Verfahren wird weniger tief sequenziert, es hat deshalb ein geringeres Potential Mutationen auf der Basenebene zu detektieren, ist aber hervorragend geeignet, um große strukturelle Veränderungen wie Translokationen, Deletionen, Insertionen und Duplikationen zu detektieren. Dieses Verfahren ist bislang noch relativ wenig verbreitet und stellt extrem hohe Ansprüche an die DNA-Qualität (≥ 20 kb Fragmentlänge). Die üblichen Extraktionsverfahren arbeiten mit einem rigorosen mechanischen Gewebeaufschluss, welche eine unerwünschte Fragmentierung der DNA provozieren. Spezielle für die Isolation extrem hochgenomischer DNA für die Mate Pair Sequenzierung entwickelte kommerzielle Lösungen existieren zur Zeit nicht.

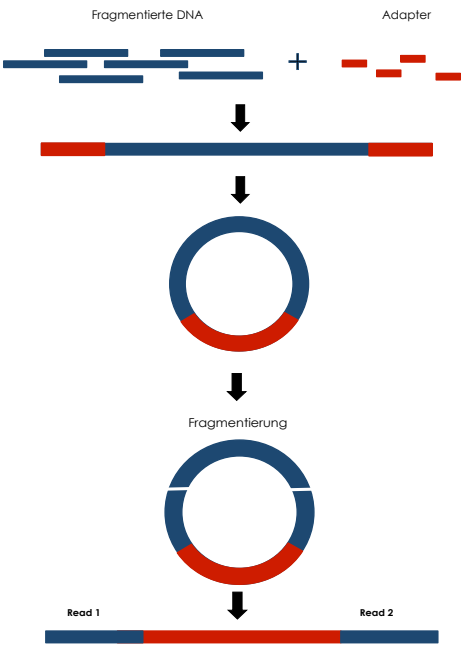


Abbildung 1-1: Vereinfachte Darstellung der Libraryerstellung für die Mate-Pair-Sequenzierung

1.3 International Cancer Genome Consortium (ICGC)

Das International Cancer Genome Consortium (ICGC, www.icgc.org) ist ein Zusammenschluss von Forschungsgruppen aus 16 Ländern mit dem gemeinsamen Ziel, alle genetischen, transkriptionellen und epigenetischen Veränderungen der 50 weltweit wichtigsten Tumorerkrankungen zu kartieren. Momentan laufen weltweit 53 Projekte, in denen jeweils mehrere hundert Tumoren von 19 Organen und Organsystemen per NGS und entsprechenden Validierungsuntersuchungen analysiert werden. Das deutsche ICGC-Konsortium zum Prostatakarzinom besteht aus Ärzten und Wissenschaftlern folgender Institutionen:

- Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf,
- Martiniklinik, Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf,
- European Molecular Biology Laboratory (EMBL), Heidelberg
- Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ), Heidelberg
- Max Planck Institut für Molekulare Genetik, Berlin.

Als eine von drei deutschen Konsortien werden in dieser Gruppe Veränderungen des frühen Prostatakarzinoms untersucht, d. h. von Patienten, deren Alter zum Zeitpunkt der Diagnose 50 Jahre nicht überschritten hat.

1.4 Das Prostatakarzinom (PCA)

Die ersten bekannten anatomischen Beschreibungen der Prostata, oder auch Vorsteherdrüse, erfolgten im 3. Jahrhundert vor Christus durch den griechischen Arzt Herophilos von Chalkedon, der die frühesten wissenschaftlichen Obduktionen am Menschen durchführte (10). Die Beschreibung des genauen Aufbaus und der Funktion dieses Organs hinterließ der italienische Anatom und Mitbegründer der Pathologie Giovanni Battista Morgagni 1761 (11). Es handelt sich hierbei um ein etwa walnussgroßes Organ, welches die Harnröhre (Urethra) umgibt und zwischen Harnblase und Beckenboden liegt. Die Prostata produziert elementare Bestandteile des Ejakulates, welche das Überleben sowie die Mobilität der Spermien gewährleistet.

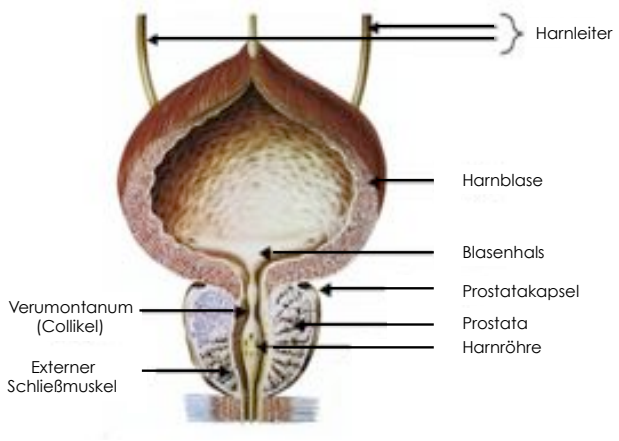


Abbildung 1-2: Anatomische Darstellung der Prostata mit Harnblase (12)

1.4.1 Inzidenz und Mortalität des Prostatakarzinoms

Wie der Nachweis von Metastasen eines PCA in einem 2.700 Jahre alten Skelett bewies, litten die Menschen bereits im 7. Jahrhundert vor Christus an dieser Tumorerkrankung. Es handelt sich bei diesem Fund um einen Fürsten der Skyten, einem Reiternomadenvolk der eurasischen Steppe, der bereits mehrere Knochenmetastasen aufwies (13,14). Auch an einem vor über 2.000 Jahren lebenden Ägypter wurde dieser Tumor anhand von Untersuchungen seiner Mumie nachgewiesen (15). Das Vorhandensein dieser Erkrankung seit Jahrtausenden konnte somit belegt werden, über die Verbreitung zu jener Zeit ist jedoch nichts bekannt. Heute allerdings handelt es sich bei etwa ein viertel aller bei Männern neu auftretenden Krebserkrankungen in Deutschland um ein PCA (16). Es stellt somit inzwischen die häufigste Tumorerkrankung des Mannes in den westlichen Industrieländern dar. Allein in Deutschland werden ca. 63.000 Neuerkrankungen pro Jahr verzeichnet. Während ein Prostatakarzinom bei Männern unter 40 Jahren extrem selten ist, steigt die Häufigkeit danach rapide mit dem Alter des

Patienten an (17-19). Eine Auffälligkeit stellt die unterschiedliche Inzidenz dieser Erkrankung in verschiedenen ethnischen Gruppen dar. Die größte Diskrepanz ist hier zwischen den USA und China zu beobachten. Während erstere in den Jahren 1988 bis 1992 eine Inzidenz von 140/100.000 verzeichneten, lag diese in China lediglich bei 3/100.000 (20). Schweden und Finnland registrieren etwa doppelt so hohe Zahlen für Neuerkrankungen wie der EU-weite Durchschnitt, während Italien, Spanien und Portugal unter diesem Durchschnitt liegen. Zurückgeführt werden diese Differenzen zum Teil auf die unterschiedliche Verbreitung des PSA-Testes zur Früherkennung des PCA. Dieser ist in seiner intensivsten Form, dem PSA-Screening, in den USA besonders stark verbreitet (21). Doch auch innerhalb der US-Bevölkerung zeigen sich Unterschiede. Mit 277 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohnern im Jahre 1992, liegt die Inzidenz des PCA in der schwarzen US-Bevölkerung deutlich über der der Weißen (190/100.000 im Jahre 1992). Gründe hierfür sind nicht bekannt (22,23). Interessanterweise konnte ein Anstieg der Inzidenz dieser Tumorerkrankung bei Japanern festgestellt werden, die von Japan nach Kalifornien umsiedelten (24). Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass hierbei Umwelteinflüsse, vor allem aber wahrscheinlich die Ernährung, eine Rolle spielen.

1.4.2 Diagnostik des Prostatakarzinoms

Vorbemerkung

Die erste Diagnostik einer krankhaften Veränderung der Prostata erfolgte 1761 durch den italienischen Anatomen Giovanni Battista Morgagni, der erstmals eine Prostatahyperplasie beschrieb (11). Heute kommen mehrere Diagnostika zum Einsatz, um ein Karzinom der Vorsteherdrüse zu identifizieren. Da eine Behandlung des Prostatakarzinoms mit Aussicht auf Heilung ausschließlich im organbegrenztem Stadium möglich ist, stellt das frühzeitige Erkennen vor dem Auftreten erster Beschwerden den entscheidenden Faktor für eine kurative Therapie dar (22). Die Problematik hierbei liegt in der Eigenschaft dieses Tumors, erst im fortgeschrittenen, meist metastasierenden Stadium Symptome zu verursachen. Männer sollten sich aus diesem Grund ab dem 45. - 50. Lebensjahr (je nach Guideline) einer jährlichen Vorsorgeuntersuchung unterziehen, solche mit positiver Familienanamnese schon ab dem 40. Lebensjahr (25). Hierbei wird eine digital rektale Untersuchung (DRU), sowie die Bestimmung des Prostataspezifischen Antigens (PSA) durchgeführt. Bei auffälliger DRU und/oder erhöhtem PSA-Wert werden Stanzbiopsien der Prostata entnommen und histologisch beurteilt (17).

Digitale rektale Untersuchung (DRU)

Die DRU steht am Anfang jeder Basisdiagnostik eines PCA. Es handelt sich dabei um die palpatorische Untersuchung der Prostata. Mit dieser einfachen und schmerzlosen Methode können große, bereits tastbare Karzinome der peripheren Zone der Prostata diagnostiziert werden, die der Transitionalzone (harnröhrennah) bleiben hierbei meist unentdeckt. Die diagnostische Wertigkeit der DRU ist von der Größe des Tumors, seiner Lage und der Erfahrung des untersuchenden Arztes abhängig (17). Heutzutage werden durch den flächendeckenden Einsatz der PSA-basierten Frühdiagnose nur unter 2% aller PCA mittels Tastuntersuchung diagnostiziert (25).

Prostataspezifisches Antigen (PSA)

Das PSA ist eine Serin-Protease, die hauptsächlich von den Epithelzellen der Prostata synthetisiert wird (26,27). Es dient der Verflüssigung des Ejakulats und der Erhöhung der Spermienmobilität und kann in niedriger Menge physiologisch im Blut nachgewiesen werden. Durch die Auflösung der Basalmembran (Leakage) beim PCA kann das PSA vermehrt in die Blutbahn gelangen (28). Als sogenannter Tumormarker gehört es zu den Substanzen, die von der Tumorzelle produziert werden oder deren Serumkonzentration durch das Tumorwachstum erhöht wird. Die Detektion solcher Substanzen, bzw. eine Veränderung ihrer Menge, können somit ein Hinweis auf ein mögliches Tumorgeschehen sein. Tatsächlich konnte eine gewisse Menge an PSA sogar im oben beschriebenen 2.700 Jahre alten Skelett eines tumorerkrankten Skyten nachgewiesen werden (29). Da das PSA organ- und nicht tumorspezifisch ist, stellt ein erhöhter Wert keinen unabdingbaren Indikator für ein Tumorgeschehen dar. Eine Erhöhung

kann ebenso durch eine nichttumoröse prostatische Erkrankung, urologische Manipulation oder die Einnahme von Medikamenten verursacht werden. Dennoch hat der PSA-Wert die Früherkennung des Prostatakarzinoms revolutioniert und stellt einen der besten zur Zeit verfügbaren Tumormarker dar (26,30,31). Erwiesen sich vor der Einführung der PSA-Bestimmung 2/3 der diagnostizierten Karzinome als organ*überschreitend*, so waren es zehn Jahre danach 2/3 der Karzinome, die ein organ*beschränktes* Stadium aufwiesen (Stagemigration) (27,32). Der allgemein gültige Grenzwert des PSA ist 4 ng/µl. Übersteigt das Laborergebnis diesen Wert, so gilt er als tumorsuspekt. Bei Werten zwischen 4 und 10 ng/µl führt eine nachfolgende Biopsie bei 20 bis 25 % der Fälle zu einer Tumordiagnose, bei Werten über 10 ng/µl ist dies bei 30-50 % der Patienten der Fall (33). Heutzutage gilt der Absolutwert des PSA nicht mehr als alleiniger Parameter zur Entscheidung einer Biopsie, sondern er wird kombiniert mit der PSA-Dynamik (zeitlicher Verlauf des PSA-Wertes), der PSA-Dichte (Verhältnis des PSA zum Prostatavolumen) sowie dem Patientenalter (33). Außerdem werden regelmäßige Verlaufskontrollen des PSA-Wertes nach erfolgter Operation durchgeführt.

Transrektaler Ultraschall (TRUS)

Bei dem Transrektalen Ultraschall wird eine Ultraschallsonde in das Rektum eingeführt, um die Prostata und ihre Umgebung abzubilden. Als Standarduntersuchung bei der Routinediagnostik des PCA hat sich diese Methode nicht durchsetzen können. Die Nachteile ergeben sich aus der begrenzten Sensitivität und Spezifität (34), an deren Verbesserung jedoch gearbeitet wird (z.B. in Form der kontrastmittelverstärkten Dopplersonographie, oder der Elastographie). Zur Bestimmung des Prostatavolumens und vor allem zur sonographisch gesteuerten PCA-Stanzbiopsie-Entnahme (siehe unten „Stanzbiopsien der Prostata“) kommt der TRUS jedoch eine bedeutende Rolle zu (35,36).

Stanzbiopsien der Prostata

Ist die DRU auffällig und/oder besteht ein suspekter PSA-Wert, bzw. eine suspekte PSA-Dynamik, so werden transrektale Bioptate der Prostata entnommen. Hierbei werden je Prostataseitenlappen mindestens 3 Biopsien entnommen (33,37). Nach international etabliertem Standard wird die Entnahme unter Ultraschallkontrolle durchgeführt. Es hat sich eine Gesamtzahl von mindestens 10 Stanzen durchgesetzt, die im Anschluss von einem Pathologen histologisch beurteilt werden.

1.4.3 Therapie des Prostatakarzinoms

Vorbemerkung

Die Wahl des geeigneten Therapieansatzes des Prostatakarzinoms hängt von folgenden Gegebenheiten ab:

- Lokale Ausdehnung des Tumors sowie seine wahrscheinliche Aggressivität
- Alter, Komorbiditäten (Begleiterkrankungen) und voraussichtliche Lebenserwartung des Patienten
- Therapiewunsch des Patienten

Je nach den aus diesen Daten abgeleiteten Bedingungen stehen die folgenden Therapien zur Verfügung (einzeln oder in Kombination):

- Radikale Prostatektomie (operative Entfernung der gesamten Prostata)
- Lokale Strahlentherapie
- Beobachtendes Abwarten („Watchful Waiting“ oder „Active Surveilance“)
- Antihormontherapie (Androgensuppression)

Das PCA ist häufig ein langsam wachsender Tumor und tritt bevorzugt im höheren Alter auf. Ein Großteil der Patienten verstirbt daher an tumorunabhängigen Erkrankungen, was auch anhand von Autopsiestudien deutlich wird (38). Eine kurative (heilende) Behandlung erscheint deshalb nur bei Patienten mit einem lokal begrenztem Karzinom und einer geschätzten Lebenserwartung von mindestens 10 Jahren sinnvoll (39).

Therapie des lokal begrenzten Prostatakarzinoms

Die **radikale Prostatektomie** wurde erstmals 1889 von dem deutschen Onkologen und Chirurgen Vincenz Czerny in Heidelberg durchgeführt, und hat sich seitdem als Standardtherapie des ausschließlich auf die Vorsteherdrüse begrenzten, nicht metastasierten PCA etabliert (40). Hierbei wird die gesamte Prostata, sowie deren Kapsel und die anhängenden Samenblasen, entfernt. Die Einschätzung des lokalen Tumorstadiums erfolgt vorher mittels der DRU, des PSA-Wertes und des Befundes der Prostatabiopsien (41,42). Eine sichere Beurteilung des Lymphknotenstatus ist nur durch eine Entnahme der im Beckenraum liegenden Lymphknoten möglich (pelvine Lymphadenektomie). Was die perioperative Sterberate betrifft (das Versterben innerhalb von 30 Tagen nach der Operation), so ist die Prostatektomie ein relativ risikoarmer Eingriff (39). Gefürchtet sind allerdings die Langzeitnebenwirkungen, hier vor allem die Harninkontinenz und die erektile Dysfunktion. Erstere kommt vornehmlich durch Traumatisierungen des externen Harnröhrenschließmuskels zustande (43). Die Gründe der möglichen Impotenz liegen in der Tatsache, dass die Prostata in nur wenigen Millimetern Abstand von beiden Ästen des für die Erektion notwendigen Nervus cavernosus umgeben ist. Diese können ent-

weder einen Tumorbefall aufweisen, oder bei der Operation verletzt werden (42). Das Auftreten beider Langzeitnebenwirkungen ist in den letzten Jahren dank verbesserter Operationstechniken deutlich gesunken und hängt stark von der Erfahrung des individuellen Operateurs ab (44-46).

Eine weitere Möglichkeit zur Behandlung des lokal begrenzten PCA bietet die **Strahlentherapie.** Hierbei unterscheidet man die äußere- (externe) und die innere- (interstitielle) Strahlentherapie. Die Vorteile der Strahlentherapie liegen in dem sehr niedrigen Risiko für das Auftreten einer Harninkontinenz und den fehlenden Narkoserisiken, weshalb diese hauptsächlich bei älteren Patienten und Patienten mit relevanten kardio-vaskulären Begleiterkrankung - einhergehend mit hohem Narkoserisiko - eingesetzt wird (47). Nachteile der Strahlentherapie sind fehlendes histologisches Staging (Stadieneinteilung entsprechend der anatomischen Tumorausbreitung), potentielle radiologische Schädigung des Rektums und der Harnblase und die Gefahr der Induktion strahlenbedingter Zweittumoren (48,49). Bei der interstitiellen Strahlentherapie steht die Low-Dose- oder High-Dose-Brachytherapie zur Verfügung. Bei der Low-Dose-Brachytherapie werden kleine Strahlenquellen („Seeds") permanent in die Prostata implantiert. Sie eignet sich für Patienten mit kleinem Prostatavolumen und einem Niedrigrisiko-Tumor (50,51). Bei der High-Dose-Brachytherapie handelt es sich um eine kurzzeitige Applikation einer lokalen Strahlenquelle mit einer Dosisaufsättigung durch externe Bestrahlung. Patienten mit großer Tumorausdehnung und mäßig bzw. schlecht differenziertem Karzinom können von dieser Therapie profitieren.

Eine weitere mögliche Strategie stellt ein abwartendes Verhalten dar. Bei dem sogenannten **Watchful Waiting** wird das Karzinom durch eine sorgfältige Verlaufskontrolle überwacht und gegebenenfalls symptomorientiert therapiert. Vor allem Patienten deren Lebenserwartung geringer als 10 Jahre eingeschätzt wird und Tumoren mit niedriger Malignität sind hierfür geeignet. Doch auch bei signifikanten Begleiterkrankungen, die das Risiko einer Operation oder Strahlentherapie erhöhen, wird diese Strategie angewandt (51). In den letzten Jahren wurde ein abwartendes Vorgehen sogar auf Patienten mit höherer Lebenserwartung angewandt (sogenanntes „Active Surveillance"). Durch regelmäßige Kontrollen soll hierbei der Zeitpunkt abgepasst werden, bei dem es zu einer Progression des Tumors kommt, um dann kurative Therapien einzuleiten. Bleibt diese Progression aus, so kann völlig auf aggressive Therapien verzichtet werden (51). Dieses Vorgehen wird allerdings durchaus kritisch diskutiert, da viele Tumoren im Laufe der Jahre progrient werden. Patienten jüngeren Alters weisen zudem noch relativ geringe Risiken für eine kurative Behandlung auf, so dass es vorteilhafter sein kann, diese zu behandeln, bevor es zur Tumorprogression kommt (52,53).

Therapie des metastasierenden Prostatakarzinoms

Der Nachweis von Knochenmetastasen kann grundsätzlich durch die Skelettszintigraphie erfolgen. Auf diese wird aufgrund niedriger Sensitivität und Spezifität bei low- und intermediate-risk Patienten jedoch bei gutem bis mäßigem Differenzierungsgrad und einem PSA-Wert von < 10 ng/µl verzichtet (33). Ein PCA, das bereits Metastasen hervorgebracht hat, wird nicht mehr chirurgisch behandelt und bietet keine Aussicht auf eine kurative Therapie (54). Als Goldstandard der palliativen Therapie hat sich seit den 40er Jahren die **Androgensuppression** gehalten (55,56). Sie nutzt die Tatsache, dass das Wachstum nicht nur gesunder, sondern auch tumoröser Prostatazellen vom männlichen Geschlechtshormon Testosteron abhängig ist (56). Eunuchen entwickeln aus diesem Grunde kein Prostatakarzinom (57). Der Androgenentzug kann in Form der bilaterale Orchiektomie (chirurgische Entfernung beider Hoden) oder medikamentös erfolgen. Durch Anpassungsmechanismen ist es Zellen eines PCA jedoch möglich, nach einiger Zeit auch mit reduziertem Hormonspiegel wieder zu wachsen. Tumoren in diesem Stadium werden als hormonrefraktär bezeichnet. Obwohl ca. 80 % der Patienten zunächst auf eine Androgensuppression ansprechen, tritt bei ihnen daher meist innerhalb von 12 bis 33 Monaten eine Resistenz auf die primäre Hormontherapie auf (54). Die Überlebenszeit nach Progression eines hormonsensitiven zu einem hormonrefraktären PCA beträgt heutzutage durch den Einsatz der Sequenztherapie mit second und third line Medikamenten bis zu fünf Jahren (58,59).

1.4.4 Staging und Grading des Prostatakarzinoms

Zur Beschreibung verschiedener Ausdehnungsstadien eines Tumors wird dieser einem sogenannten **Staging** mittels TNM-Klassifizierung unterzogen. Das TNM-System ist ein Klassifizierungssystem gemäß dem "New American Joint Committee on Cancer" (AJCC) und der "Union internationale contre le cancer" (UICC) zur Stadieneinteilung von malignen Tumoren. TNM steht hierbei für T = Tumorausdehnung, N = Nodalstatus (Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen) und M = Metastasen (Vorhandensein von Fernmetastasen). Die Tumorausdehnung wird dabei in verschiedenen Stufen von Tx (Primärtumor kann nicht nachgewiesen werden) bis T4 (Tumor infiltriert Nachbarstrukturen außer die Samenblasen) eingeteilt. Der am histologischen Präparat bestimmte pathologische Tumorgrad wird als pT bezeichnet und mit Nummern ergänzt, die mit der Tumorausdehnung aufsteigen (pT2 bis pT4). Für die Einteilung der Lymphknoten- und Fernmetastasen gelten die drei Stufen 0 = kein Anhalt für Metastasen, x= keine Beurteilung möglich und 1 = Metastasen vorhanden.

Das **Grading** bezeichnet die Einordnung des Malignitätsgrades eines Tumorgewebes. Das System, das sich für das PCA allgemein durchgesetzt hat, ist das von dem amerikanischen Pathologen Donald Gleason 1964 entwickelte *Gleason-Grading*. Hierbei werden fünf Wachs-

tumsmuster des Karzinoms beschrieben und nach steigender Abweichung vom normalen Gewebe von Grad 1 (geringe Abweichung) bis Grad 5 (starke Abweichung) bewertet. Der Pathologe beurteilt auf diese Weise das häufigste und zweithäufigste Wachstumsmuster und bildet einen Score aus der Summe beider Werte, wobei diese als Summenterm dargestellt wird. Der Grad des häufigsten Wachstumsmusters steht dabei an erster und der des zweithäufigsten an zweiter Stelle (59,60). Der Malignitätsgrad eines Tumors mit einem Gleason-Score 4+3=7 ist daher höher als der eines mit dem Gleason-Score 3+4 = 7 und weist auch eine schlechtere Prognose auf, als 3+4.

1.5 Die Bedeutung der translationalen Forschung für das Prostatakarzinom

Das Karzinom der Prostata stellt einen Tumortyp dar, dessen Therapie auf ganz besondere Weise von der translationalen Forschung profitieren kann. Während ca. 40 % der Männer der westlichen Industrieländer im Laufe ihres Lebens an einem PCA erkranken, werden nur etwa 10 % dieser Tumoren symptomatisch (61). Letztere lassen sich präoperativ jedoch nicht immer eindeutig von einem „harmlosen“, sogenannten klinisch insignifikanten PCA, unterscheiden. Durch flächendeckende PSA-Screenings (PSA-Tests zur Früherkennung des PCA) werden inzwischen immer mehr Prostatakarzinome diagnostiziert. Da es sich hierbei außerdem um einen altersassoziierten Tumor handelt, wird seine Inzidenz aufgrund der demographischen Entwicklung noch zunehmen. Aus diesem Grunde hält sich als Standardtherapie des PCA immer noch die radikale Prostatektomie mit all ihren Nebenwirkungen wie möglicher Inkontinenz und Impotenz, sowie erheblichen Kosten. Wird sich dies in naher Zukunft nicht ändern, so steuern wir zwangsläufig auf ein immenses sozioökonomisches Problem zu. Die translationale Erforschung des Prostatakarzinoms verfolgt daher das dringende Ziel, molekularbiologische Marker zu identifizieren, die eine Differenzierung der wenig malignen, und somit nicht operationsbedürftigen PCA, von den malignen Formen ermöglichen.

1.6 Die Molekularbiologie des Prostatakarzinoms

In Bezug auf seine Molekularbiologie hebt sich das Prostatakarzinom deutlich von anderen Tumoren ab. Die **Mutationshäufigkeit** ist verglichen mit anderen Tumorarten die niedrigste überhaupt (62-64). Dementsprechend sind rekurrente Mutationen, wie sie in anderen Tumortypen häufig vorkommen, in diesem Karzinom äußerst selten. Das mit etwa 10 % am häufigsten mutierte Gen ist *SPOP*, über dessen Funktion jedoch kaum etwas bekannt ist. Erstuntersuchungen konnten bisher keine klinische Relevanz dieses Genes nachweisen (62,65). Typische „Tumorgene", die häufig (> 20 %) in anderen Tumoren mutiert sind, wie das *EGFR* im Lungenkarzinom oder *BRAF* im Melanom, weisen im PCA nur sehr geringe Mutationsraten auf (64,66). So ist *TP53*, das relevanteste Tumorsuppressorgen, das in ca 50 % der humanen Tumoren mutiert vorliegt, nur in 2-5% der PCA mutiert (66,67). Auch DNA-**Amplifikationen**, wie sie beispielsweise beim Mammakarzinom häufig auftreten und die vielversprechende Angriffspunkte für die molekulare Therapie darstellen, konnten beim PCA nicht nachgewiesen werden. Die einzige Ausnahme stellt die Amplifikation des für den Androgenrezeptor kodierende Gens *AR* dar (68,69). Dem Androgenrezeptor kommt beim Prostatakarzinom eine besondere Rolle zu. Als hormonabhängiger Transkriptionsfaktor beeinflusst er die Transkription spezifischer Zielgene über die Interaktion mit regulatorischen Sequenzen in der DNA (70,71). Die Aktivierung des Androgenrezeptors durch Androgene wirkt direkt proliferationsfördernd auf das PCA (71,72). In Primärtumoren treten Amplifikationen des *AR* in weniger als 2 % auf, unter einer Antiandrogentherapie kommt es allerdings bei 20 – 30 % der PCA zu einer AR-Amplifikation (69,73). Dies ist einer der Gründe, warum die meisten Patienten, die zunächst erfolgreich auf eine Antiandrogentherapie angesprochen haben, nach einigen Monaten oder Jahren ein PSA-Rezidiv erleiden (72,74).

Wie sich erst durch die seit 2011 für das PCA durchgeführten NGS-Untersuchungen darstellte, sind die Hauptveränderungen des Prostatakarzinoms große strukturelle Variationen des Genoms (62,64,75,76). Bei Translokationen brechen ganze Abschnitte eines Chromosoms heraus und lagern sich an andere an. Häufig kommt es hierbei nicht zu Verlusten, sondern zum Austausch dieser oft großen Chromosomenabschnitte (Balancierte Translokationen). Translokationen und Deletionen meist großer DNA-Abschnitte führen häufig zu Genfusionen, welche ein weiteres Merkmal des PCA darstellen (75,76). Es fusionieren hierbei zwei Gene, die in der gesunden Zelle nicht direkt benachbart sind. Vornehmlich handelt es sich beim PCA um Fusionen, deren 3'-Partner ein Gen der ETS (E-twenty-six)-Familie ist, einer der größten Familien innerhalb der Transkriptionsfaktoren (77,78). Oftmals stellt dessen Partner am 5'-Ende ein Androgen-reguliertes Gen (wie *TMPRSS2, SLC45A3* oder *NDRG1*) dar, wodurch der ETS-Partner unter die Kontrolle eines Androgen-abhängigen Promotors gerät (77,79). Den größten Anteil nimmt hierbei eine Fusion des ETS-Familienmitgliedes *ERG* mit der Serinprotease *TMPRSS2* ein (Abb. 1-3). Etwa 50 % der PCA weisen eine Fusion dieser beiden Gene auf (77). *ERG* wird in

gesundem Prostatagewebe nicht exprimiert. Erst dadurch, dass es seinen Promotor verliert und ihm der des *TMPRSS2* vorgeschaltet wird, kommt es zur Entstehung eines Genproduktes von *ERG* im tumorösen Prostatagewebe. Der Nachweis von exprimiertem ERG gilt somit allgemein als Indikator für eine *ERG*-beteiligte Genfusion (ERG-positives PCA) (80). Prostatakarzinome lassen sich somit in ERG-positive (ERG+) und ERG-negative (ERG-) Tumoren einteilen. Es hat sich herausgestellt, dass diese zwei Subgruppen sich in ihrer Molekularbiologie unterscheiden und es mehrere genetische Veränderungen gibt, die mit ERG-Positivität bzw. ERG-Negativität assoziiert sind. So sind beispielsweise 5q- wie auch 6q-Deletionen mit einem negativen ERG-Status korreliert, während PTEN-Inaktivierungen vermehrt in ERG+ Tumoren gefunden werden (81-83).

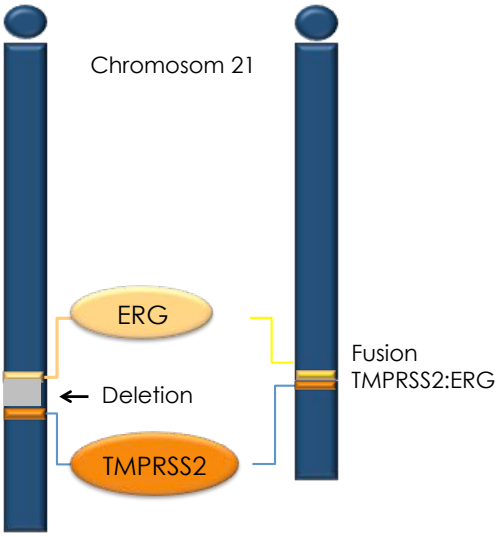


Abbildung 1-3: Schematische Darstellung der TMPRSS2:ERG-Fusion

Deletionen, also fehlende DNA-Regionen, sind neben den Translokationen das zweite genetische Charakteristikum des PCA. Deletionen auf 8p können bei 26 - 78 % der PCA detektiert werden (84-86). An zweiter Stelle steht, je nach Arbeitsgruppe, 6q bzw. 13q (Tab.1). Putative Zielgene für diese Bereiche (also in diesem Falle Gene, deren Fehlen ein Tumorwachstum begünstigen) stellen auf 8p *LPL* und/oder *NKX3.1* dar (87,88), auf 13q *RB1* (89,90). Innerhalb der eigenen Arbeitsgruppe haben Kluth et al. die Region um 6q12-22 und *MAP3K7* als mögliches Zielgen eingehend untersucht (91). Die am häufigsten deletierten Chromosomenbereiche des PCA sind mit den jeweiligen Publikationen in Tabelle 1 zusammengefasst. Hervorzuheben sind außer den oben genannten Regionen der Bereich 10q23, in dem der bekannte Tumorsuppressor *PTEN* liegt, sowie 5q21, in dem das in dieser Arbeit näher untersuchte *CHD1* (Chromodomain-Helikase-DNA-Binding-Protein1) lokalisiert ist.

Tabelle 1: Häufigste Deletionen beim Prostatakarzinom. Vergleich der Ergebnisse von Lapointe et al (85), Sun et al. (86), Taylor et al. (84) sowie der eigenen Arbeitsgruppe (98).

	Lapointe et al. (n=64)		Sun et al. (n=872)		Taylor et al. (n=181)		Krohn (n=72) (Eigene Arbeitsgruppe)	
Rang	**Genort**	**Deletion (%)**	**Genort**	**Deletion (%)**	**Genort**	**Deletion (%)**	**Genort**	**Deletion (%)**
1	13q	52	8p11-p21	34,1	8p11-p21	78,3	8p	26,4
2	8p	47	13q14-q21	28	6q12-q21	62,4	16q24	25
3	6q	38	6q14-q21	22,2	12p12-p13	61,3	6q13-6q21	20,8
4	10q	28	16q13-q24	17,9	13q14	47,4	21q22	19,4
5	12p	27	18q12-q23	12,8	16q24	37,6	10q23	18
6			5q13-q21	13,1	10q23	34	17q21	16,7
7			2q21-q22	12,4	2q14-q22	30,1	5q13	16,7
8			10q23	11,8	5q21	26,3	5q21	16,7
9					17p13	26,3	13q14	16,7
10					3p14	21,2	3p13-3p14	15,3
11							12p13	15,3

Abbildung 1-4 vermittelt einen Eindruck über die Verteilung von DNA-Kopiezahlveränderungen in 64 mittels Array CGH untersuchten PCA (85).

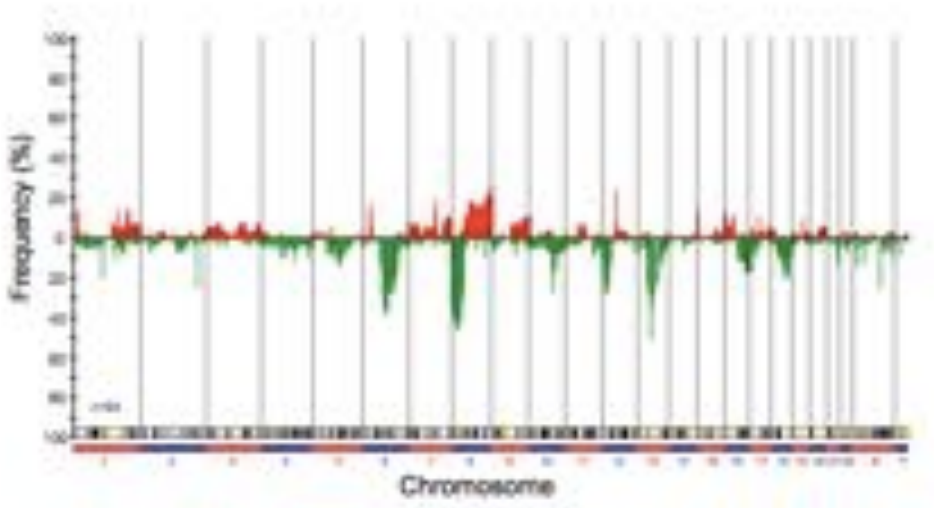


Abbildung 1-4: Zusammenfassung von Kopiezahlveränderungen von 64 PCA (Lapointe et al.) (85).

Rote Bereiche demonstrieren DNA-Zugewinne, grüne Bereiche DNA-Verluste. Die Daten wurden per Array CGH erhoben.

1.7 Der 5q-Locus beim Prostatakarzinom

Der Bereich 5q gehört zu den am häufigsten deletierten Regionen des PCA. Deletionen erstrecken sich hier insgesamt von 5q11 bis 5q32 und treten mit einer Häufigkeit von 13-26 % auf (84,86). Ein besonders häufig betroffener Bereich konzentriert sich auf 5q21 um die Gene *RGMB, CHD1* und *EFNA5. RGMB* steht für Repulsive Guidance Molecule (RGM) Family Member B. Über seine Funktion ist bisher äußerst wenig bekannt, es spielt möglicherweise eine Rolle in der Nervenentwicklung bei der Vermittlung von Zell-Zell-Adhäsionsvorgängen (93). *EFNA5* (Ephrin A5) gehört zur Gruppe der Ephrinliganden. Diese binden an Ephrinrezeptoren, die wiederum die größte Gruppe der Rezeptortyrosinkinasen darstellen. Die dadurch eingeleiteten Signalkaskaden regulieren verschiedene Prozesse während der Embryonalentwicklung (94-96). *EFNA5* spielt in diesem Zusammenhang eine Rolle in der Neurogenese, vor allem bei der Migration von neuronalen Axonen (96,97). Das Gen, welches innerhalb der 5q21-Deletion eine tumorrelevante Funktion haben könnte, ist zweifelsohne das Chromodomain-Helikase-DNA-Binding-Protein1, *CHD1*, welches zur Familie der Chromatinremodeler gehört und in Abschnitt 1.8 näher beschrieben wird. Eine klinische Relevanz dieses Genes wurde von zwei Arbeitsgruppen vermutet, aber bisher nur in kleinen Kohorten untersucht und nicht eindeutig bestätigt (81,82).

Architektur der 5q21-Deletion beim Prostatakarzinom

Um die umfangreiche Array-CGH (aCGH)- Studie von Taylor et al. über 218 Prostatakarzinome (84) intensiver auswerten zu können, wurde im Rahmen der Vorarbeiten der vorliegenden Arbeit eine bioinformatische Reanalyse der Rohdaten vorgenommen. Deletionen auf 5q traten mit einer Häufigkeit von 16 % auf und erstreckten sich in den meisten Fällen von 5q11 bis 5q32. Innerhalb dieser Region wurde eine gemeinsam minimal deletierte Region im Bereich der Gene *CHD1* bis *EFNA5* deutlich (Abb. 1-5 und 1-6).

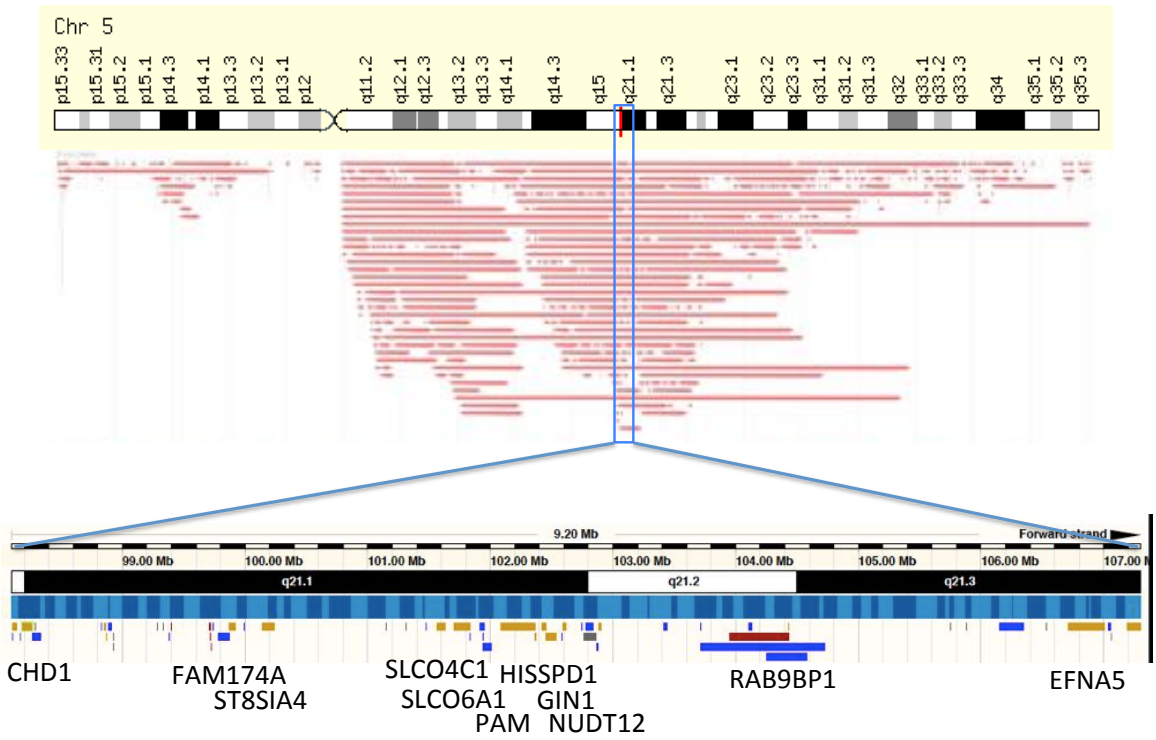


Abbildung 1-5: Architektur der 5q21-Deletionen beim Prostatakarzinom (Reanalyse der Daten von Taylor et al.) (84)

Dargestellt sind die Ausdehnungen der um den Bereich 5q21 liegenden Deletionen verschiedener Prostatakarzinome. Das Chromosom 5 ist liegend dargestellt, jeder rote Balken steht für eine Deletion einer Probe.

Array-CGH-Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe von 72 PCA und 6 Prostatakarzinom-Zelllinien (LNCaP, VCaP, RWPE-1, PC-3, BPH-1 und X22RV) wiesen in 9 der 72 Karzinome (12,5 %) eine 5q21 Deletion auf (98). Unsere Analysen wiesen eine minimal deletierte Region auf, die im gleichen Bereich lag, wie die oben genannte. Durch eine weitere bioinformatische, sogenannte „HeatMap"-Analyse konnte dieser Bereich sogar noch eingeengt werden und enthielt bei einer Größe von 1,3 Mb nur noch die beiden Gene *CHD1* und *RGMB*. Bei der „Heat-Map"-Analyse handelt es sich um eine farbliche Darstellung der DNA-Kopiezahlen über ein Chromosom, bzw. einen Chromosomenabschnitt. Bereiche heterozygot oder homozygot deletierter DNA, bzw. solche mit normaler DNA-Kopiezahl, sind hierbei anhand ihrer Farbe zu identifizieren (Abb. 1-6).

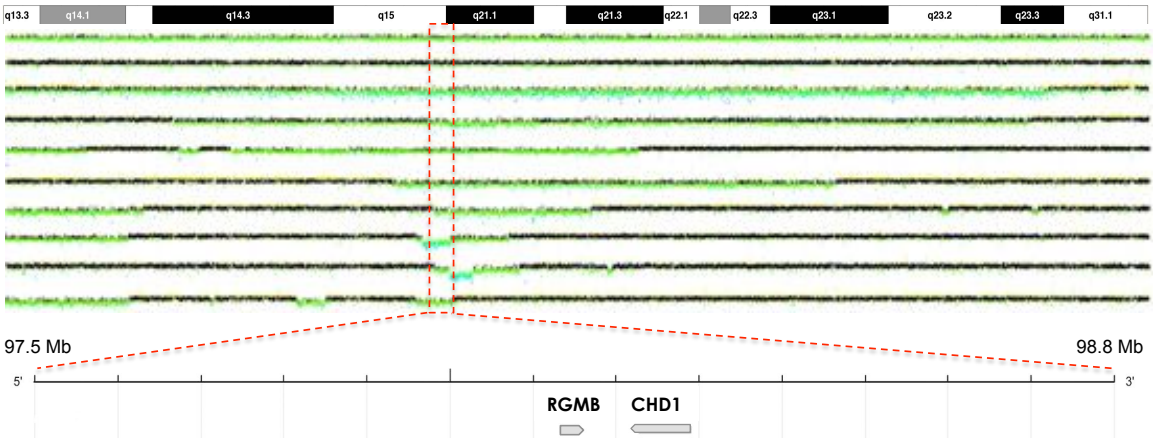


Abbildung 1-6: Architektur und Ausdehnung der 5q21 Deletionen basierend auf institutsinternen Daten, dargestellt mittels „Heat-Map"-Analyse

Die unterschiedlichen Farben stehen für den Deletionsstatus des jeweiligen Bereiches:

Grün: heterozygot deletiert

Türkis: homozygot deletiert

schwarz: normale Kopiezahl

rot eingegrenzter Bereich: gemeinsame minimal deletierte Region, Mb: Megabasen DNA

1.8 Chromodomain Helicase DNA Binding Protein 1 (CHD1)

Das CHD1 gehört zu der Gruppe der Chromatinremodeler oder auch Chromatinmodifier. Hiermit bezeichnet man Proteine und Komplexe, die an der Strukturveränderung des Chromatins beteiligt sind. Vorgänge wie das Lösen von Nukleotiden vom Chromatin, das Bewegen der Nukleotide entlang eines DNA-Abschnittes (nucleotide sliding), der Austausch von Histonvarianten oder die posttranslationale Modifikation von Histonen sind entscheidende Prozesse innerhalb der DNA-Reparatur, der Replikation und der Genexpression (99-101). Chromatinmodifizierende Komplexe lassen sich in zwei Hauptgruppen unterteilen:

1. Solche, die kovalente posttranslationale Modifikationen von Histonproteinen vermitteln (vornehmlich Acethylierung und Methylierung).
2. Solche, die durch ATP-Hydrolyse frei werdende Energie nutzen, um ganze Histonoktamere entlang der DNA zu bewegen, um nukleosomfreie Regionen zu schaffen (ATP-abhängige Chromatinremodeler) (100).

Vertreter der ersten Gruppe beeinflussen die lokale Chromatinstruktur und die Faltung höherer Ordnung der Nukleosomenstruktur. Die bekanntesten und bestuntersuchten Mitglieder dieser Gruppe sind die Histon-Acetyltransferasen (HAT) sowie deren Gegenspieler, die Histon-Deacetylasen (HDAC). Sie regulieren den Grad der Acetylierung der Lysinreste im N-terminalen Ende der Histone (100,101). Doch auch die für die Methylierung verantwortli-

chen Histon-Methyltransferasen (HMT) spielen innerhalb der posttranslationalen Modifikation eine entscheidende Rolle. Das *CHD1* ist ein Vertreter der zweiten Gruppe, also der ATP-abhängigen Chromatinremodeler (CR). Diese bilden wiederum drei Subfamilien:

a) SWI / SNF2-
b) ISWI-
c) CHD-

Als ATP-abhängige CR ist ihnen allen eine ATPase-Untereinheit gemein, die zur SWI2 / SNF2-Familie gehört und sie zur ATP-Hydrolyse befähigt (101). Die CHD-Familie ist durch drei unterschiedliche Domainen gekennzeichnet: zwei Chromo (chromatin-organization-modifier) – Domainen, einer SWI2 / SNF2-like-Helicase-ATPase-Domaine und einer DNA-Bindungs-Domaine. Chromodomainen sind von Protisten über Amphibien bis hin zu den Säugetieren stark konservierte Motive (99,102). Sie erkennen und binden Nukleosomen. Gene, die eine Chromodomaine enthalten, gelten allgemein als Regulatoren der Chromatinstruktur (103,104). So wie Bromodomainen Histon-Acethylierungen erkennen, so binden Chromodomainen spezifisch methylierte Lysinreste von Histonen (103,105). Vertreter der CHD-Subfamilie können sowohl eine transkriptionsfördernde, wie auch transkriptionshemmende Funktion ausüben (106,107). Sie sind in den meisten Spezies zu finden. Die Hefe *S. cerevisiae* besitzt nur das *CHD1*, während *Drosophila melanogaster* und *Xenopus laevis* einen Mi-2-Komplex aufweisen, der als *CHD*-Homolog gilt (103,108,109). Die CHD-Familie des Menschen umfasst 9 Mitglieder: CHD1 bis CHD9. Basierend auf ihren strukturellen Unterschieden außerhalb der drei Hauptdomainen und ihren funktionellen Partnern, werden diese wiederum in drei CHD-Subfamilien unterteilt:

1. CHD-Subfamilie 1: CHD1 + CHD2
2. CHD-Subfamilie 2: CHD3 + CHD4
3. CHD-Subfamilie 3: CHD5 – CHD9

1993 entdeckten Delmas et al. durch Zufall die Sequenz eines Proteins bei der Maus, das eine Chromodomaine, eine DNA-Bindungsdomaine und eine SWI2 / SNF2-like Helikase / ATPase-Domaine enthielt und welches sie *Chromodomain Helicase DNA Binding Protein1 (CHD1)* nannten (110). Das Vorhandensein dieser Domainen führte zu der Annahme, dass das Protein eine Rolle bei der Regulation der Chromatinstruktur spielen könnte. Stokes und Perry beobachteten 1995 eine Assoziation des CHD1 mit nichtkompaktem Interphasechromatin sowie ein Abwandern des CHD1 in das Cytoplasma zum Zeitpunkt der Kondensierung des Chromatins während der Mitose (111). Untersuchungen des Proteins bei Drosophila melanogaster durch Stokes et al. 1996 ergaben ebenfalls eine bevorzugte Lokalisation von CHD1 in den dekondensierten, aktiven Regionen der Polytenchromosomen (112). Diese Ergebnisse er-

härteten die Vermutung, dass das Protein dazu beiträgt, das Chromatin in einem offenen und für die Transkription zugänglichen Status zu erhalten. Inzwischen ist das *CHD1*, bzw. seine Homologe, bei vielen Spezies nachgewiesen worden und wurde bei *S. cerevisiae, S. pombe, C. elegans, Drosophila melanogaster*, *Xenopus laevis*, der Maus, dem Huhn und dem Menschen näher untersucht. Unter dem Aspekt, dass zwischen Erst- und Letztgenanntem ein Evolutionsunterschied von ca. einer Milliarde Jahre liegen, kann man das CHD1 als hochkonserviert und somit als ein Protein von entscheidender Bedeutung betrachten. Tatsächlich besitzt es nicht eine, sondern zwei Chromodomainen im N-Terminalen Bereich, eine DNA-Bindungsdomaine am C-Terminalen Ende und eine Helikase-ATPase-Domaine dazwischen (107). Diese Kombination an Domainen ist allen CHD-Proteinen gleich, sonst aber einzigartig. Das *CHD1* ist aus 1710 Aminosäruen aufgebaut, die Nukleotidsequenz ist in 35 Exons unterteilt.

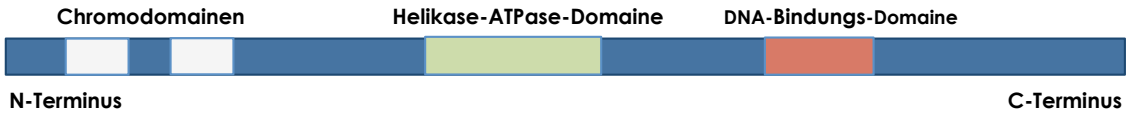


Abbildung 1-7: Schematische Darstellung der Domainen des humanen CHD1

Klonierung und nähere Charakterisierung des humanen CHD1 durch Woodage et al. 1997 führten zu der Annahme, dass es durch Modifikationen der Chromatinstruktur den Zugriff von Transkriptionseinheiten auf die DNA kontrolliert und somit die Genexpression beeinflusst (107). Interaktionen von CHD1 mit verschiedenen Transkriptions-Elongationsfaktoren führten Simic et al. 2003 zu der Annahme, dass das Protein außerdem eine Rolle innerhalb der Transkriptionselongation spielt (113). Pray-Grant et al. konnten 2005 nachweisen, dass CHD1 über seine Chromodomainen spezifisch mit methyliertem Lysin4 des Histons H3 (H3K4me) interagiert, welches mit aktivem Chromatin und Promotoren aktiver Gene assoziiert ist (114). Es wird vermutet, dass das H3K4me somit ein Erkennungszeichen für das CHD1 darstellt, welches hieran bindet und daran mitwirkt, dass Histone dieses Nukleosoms verschoben werden, um Promotorregionen bestimmter Gene frei zu legen (115). Weiterführende Untersuchungen von Flanagan et al. führten zu der Erkenntnis, dass beide Chromodomainen gemeinsam interagieren, um H3K4me zu binden (105). Gaspar Maia et al. konnten nachweisen, dass CHD1 benötigt wird, um das Chromatin pluripotenter embryonaler Maus-Stammzellen in einem geöffneten und somit aktiven Status zu halten (116). Die gleiche Arbeitsgruppe fand heraus, dass CHD1 mit Promotoren aktiver Gene Interagiert, dass es mit Euchromatin assoziiert ist, und dass eine Herabregulation von *CHD1* zu einer vermehrten Akkumulation von Heterochromatin führt. Eine weitere interessante Beobachtung bestand darin, dass CHD1-defiziente embryonale Stammzellen Ihre Pluripotenz verlieren (116).

Zusammenfassend führen die bisherigen Untersuchungen zur Funktion des CHD1 zu dem Schluss, dass es sich um ein Enzym handelt, das durch ATP-Hydrolyse frei werdende Energie nutzt, um die Struktur des Chromatins vorübergehend zu verändern, indem es dabei mitwirkt, Nukleosomen entlang der DNA zu verschieben. Bei den hierdurch frei werdenden DNA-Regionen handelt es sich vermutlich um Promotorregionen von Genen, die transkribiert werden sollen. Wahrscheinlich spielt das CHD1 hierbei vor allem eine Rolle bei der Erhaltung des Chromatins in einem offenen und somit für die Transkription zugänglichen Stadium. Des Weiteren wird dem CHD1 eine Funktion innerhalb der Transkriptionselongation, sowie in der Pluripotenz embryonaler Stammzellen zugeschrieben. Untersuchungen von CHD1 in anderen Tumoren vermuten eine Rolle des Gens im Tumorgeschehen des Mammakarzinom (117) und der Leukämie (118). Bislang liegen nur zwei Studien zum CHD1 beim PCA vor, die beide eine Rolle des Gens beim PCA bestätigen. Huang et al. haben eine erhöhte Invasivität von PCA-Zelllinien durch einen Knock-Down des CHD1 beobachten können, Liu et al. beschrieben eine Veränderung der Morphologie in Prostatazellen der Maus nach Herabregulation des CHD1, beide haben jedoch eine recht kleine Zahlen an klinischen Tumoren untersucht (86 und 244 Tumore) (81,82). Ebenso konnten fast sämtliche andere Vertreter der CHD-Genfamilie mit einem Tumorgeschehen in Zusammenhang gebracht werden. Nagarajan et al. haben CHD2 als möglichen Tumorsupressor vorgeschlagen, der eine Rolle in der Entstehung von Lymphomen spielt (119). CHD5 ist über den p19-TP53-Pathway an der Kontrolle der Apoptose beteiligt und liegt in der bei Tumoren häufig deletierten Region 1p36 (120). Mutationen im CHD7 konnten von Pleasance et al. in einer Lungenkarzinom-Zelllinie nachgewiesen werden (121). CHD8 könnte laut den Untersuchungen von Menon et al. eine Rolle in der Androgen-abhängigen Transkription verschiedener Gene im Prostatakarzinom spielen (122). In Magen- und Colonkarzinomen konnten schließlich frameshiftverändernde Mutationen und Verluste der Heterozygotie (Loss of heterozygosity, LOH) der Gene CHD1, CHD2, CHD3, CHD4, CHD7 und CHD8 nachgewiesen werden (123).

1.9 Ziel der Arbeit und Fragestellung

Mit der Hochdurchsatzsequenzierung und der Gewebemikro- (Tissue Micro Array, TMA) Technologie stehen zwei potente Verfahren zur Verfügung, um translationale Forschung vom Screening nach neuen molekularen Markern bis hin zu deren klinischer Validierung durchzuführen. Das Ziel der vorliegenden Arbeit lag darin, diese beiden Methoden zur Etablierung eines neuen klinisch relevanten Biomarkers zur Vorhersage der Aggressivität von Prostatakarzinomen anzuwenden.

Das Projekt teilte sich dabei in zwei Unterziele:

1) Zum einen sollte ein Nukleinsäureextraktionsverfahren etabliert werden, das es erlaubt, aus Prostatakarzinomgewebe DNA zur Durchführung der sogenannten Mate-Pair-Sequenzierung zu gewinnen. Diese DNA sollte dann Eingang in das ICGC im Rahmen des deutschen Beitrages „The Genomes of Early Onset Prostate Cancer“ finden, um rekurrente strukturelle Aberrationen des frühen PCA zu identifizieren.
2) Zum anderen sollte die Bedeutung der rekurrenten Deletion auf Chromosom 5q21 für die Biologie und den klinischen Verlauf des PCA untersucht werden.

Dabei stand das Projekt unter den Hypothesen, dass der Chromatin-Modifier CHD1 ein Tumorsuppressorgen ist, der durch die 5q21-Deletion inaktiviert wird, und dass dieser Defekt mit einer aggressiven Form des PCA, bestimmten molekularen Schlüsselveränderungen und einer ungünstigen Patientenprognose einhergeht.

<u>Konkret sollten die folgenden Fragen beantwortet werden:</u>

1) Welche Gewebeaufschlussmethode ist am besten geeignet, DNA in optimaler Qualität und ausreichender Menge für die spezielle Mate-Pair-Sequenzierung aus PCA-Gewebe zu generieren?
2) Wie häufig ist die 5q21-Deletion beim PCA und welche klinische Relevanz hat sie?
3) Welche Rolle spielt die 5q21-Deletion für den ERG-Fusionsstatus des PCA?
4) Ist CHD1 ein Tumorsupressorgen in der 5q21-Region?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Verwendete Reagenzien, Lösungen und Kits

Eine Übersicht aller für diese Arbeit verwendeten Materialien und Reagenzien befindet sich im Anhang unter 7.3.

2.1.2 Verwendete Geräte

Eine Auflistung aller für diese Arbeit verwendeten Geräte befindet sich im Anhang unter 7.4.

2.1.3 Gewebekollektiv

Kryokonserviertes Gewebe

Die in dieser Arbeit analysierten kryokonservierten Prostaten wurden direkt vom OP der Martiniklinik auf Eis per Schnellschnitt-Kurier in den Zuschnitt der Pathologie transportiert und vom Pathologen komplett zugeschnitten und aufgeblockt (Beispiel einer zugeschnittenen Kryoprostata siehe Abb. 2-1). Nach Anfertigung der histologischen Schnitte wurden alle Blöckchen bei -20 °C eingefroren und anschließend bei -80 °C gelagert. Eine nähere Beschreibung des Kollektives der kryokonservierten Gewebe ist in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2: Beschreibung des kryokonservierten Gewebekollektives

Patienten ID	Alter des Patienten bei OP	Gleason Score	Tumor-Stadium (pT)
1	45	3+4	3a
2	51	3+4	2c
3	46	5+4	3a
4	51	4+3	3b
5	50	3+4	3a
6	38	3+4	3b
7	49	3+4	2c
8	44	3+4	2c
9	48	3+4	2c
10	49	3+4	2c
11	46	3+4	2c

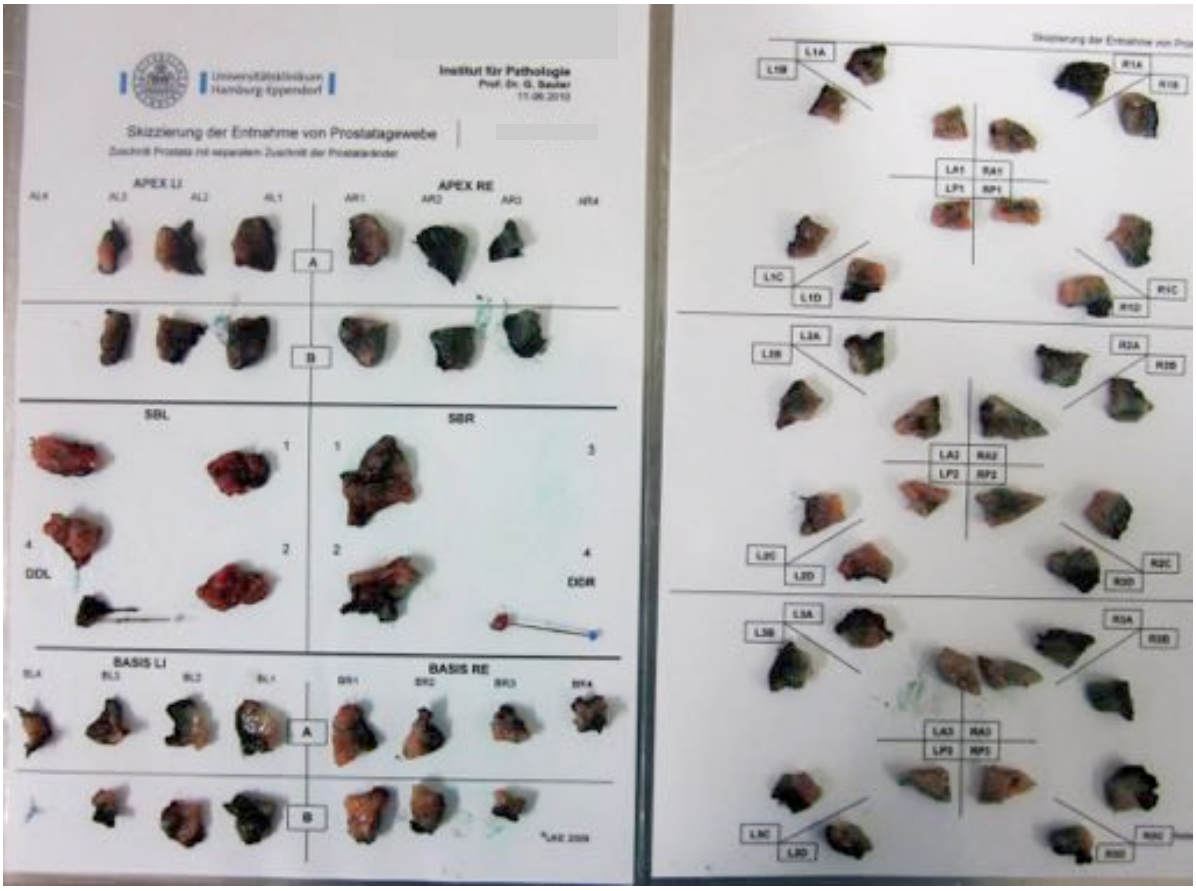


Abbildung 2-1: Komplettzuschnitt einer Prostata für die Kryokonservierung (Institut für Pathologie des UKE Hamburg)

Formalinfixiertes Gewebe

Untersucht wurden radikale Prostataresektate von 12.427 Patienten, die in Form eines TMA archiviert waren. Es handelte sich um Proben von Patienten, deren Behandlung in den Jahren von 1992 bis 2011 in der Klinik und Poliklinik für Urologie sowie der Martiniklinik, beides Einrichtungen des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf, erfolgte. Daten der Nachbeobachtung post OP („Follow-up-Daten") von 1 bis 241 Monaten waren von 12.344 Patienten verfügbar, der Median der Nachbeobachtungszeit betrug 36,4 Monate, der Mittelwert 49 Monate. Keiner der Patienten erhielt adjuvante oder neoadjuvante Therapien (begleitende Therapien, wie Chemo- oder Strahlentherapie). Das Auftreten eines Rezidivs wurde definiert als ein Wiederanstieg des PSA-Wertes auf mindestens 0,2 ng/ml. Anhand dieser Daten wurde von der Martiniklinik und dem Institut für Pathologie ein System von klinisch-biologisch relevanten Endpunkten erstellt, mit Hilfe dessen Prostatakarzinome anhand ihrer klinischen und biologischen Charakteristika in Gruppen eingeteilt werden. Hierbei steigen mit der Nummer der Gruppe die aggressiven Eigenschaften des Tumors (Tab. 4). Eine Korrelation molekularbiologischer Auffälligkeiten mit diesen Endpunkten kann die prognostische Relevanz einer Veränderung aufzeigen.

Im Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf werden grundsätzlich alle Prostaten komplett eingebettet und begutachtet. Alle Gewebeschnitte wurden einer histologischen Diagnostik, sowie einem zusätzlichen Review unterzogen, bei dem alle forschungsrelevanten histologischen Merkmale festgehalten wurden. Ein TMA besteht aus mehreren Paraffinblöcken, die wiederum je einen repräsentativen Prostatakarzinomgewebezylinder jedes Tumors enthalten. Auf diese Weise enthält jeder Paraffinblock bis zu mehrere hundert Gewebezylinder eines Durchmessers von je 0,6 mm pro Patienten. Die in dieser Arbeit untersuchten FFPE-Gewebe bilden einen TMA, dessen Zusammenstellung in Tabelle 3 dargestellt ist. Der TMA wurde aus 27 Paraffinblöckchen gebildet, welche jeweils 144 bis 522 Prostatakarzinomgewebeproben in Form von formalinfixierten Gewebezylindern enthielt (Abb. 2-2).

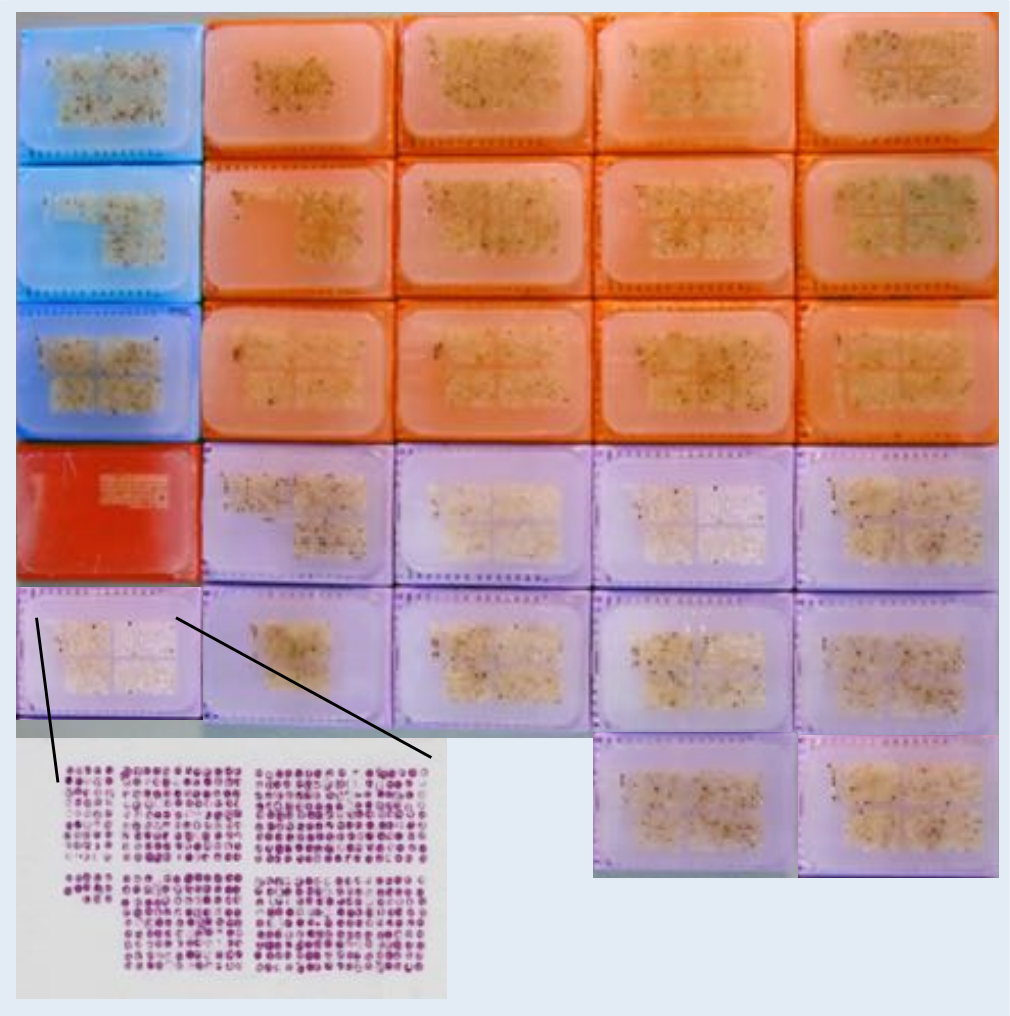


Abbildung 2-2: Aufbau des in dieser Arbeit verwendeten TMAs über 12.427 Patienten

Tabelle 3: Übersicht des in dieser Arbeit verwendeten FFPE-Gewebekollektives

	Anzahl Patienten	
	Patientenkollektiv auf dem TMA (n = 12.427)	**Biochemisches 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	1761	370
PSA prä OP (ng/ml)		
< 4	1.585	242
4 -10	7.48	1.355
10 - 20	2.412	737
> 20	812	397
Tumor-Stadium(pT, nach AJCC 2002)		
pT2	8.181	1.095
pT3a	2.66	817
pT3b	1.465	796
pT4	63	51
Tumor-Grad (Gleason Score)		
≤ 3 + 3	2.983	368
3 + 4	6.945	1.289
4 + 3	1.848	788
≥ 4 + 4	584	311
Lymphknotenstatus (pN)		
pN0	6.97	1.636
pN+	693	393
Resektionsrand		
Negativ	9.990	1.848
Positiv	2.211	858

Die Zahlen der einzelnen Kategorien summieren sich nicht immer auf 12.427, da zu einzelnen Fällen keine klinischen Daten existieren. AJCC: American Joint Committee on Cancer.

Tabelle 4: Einteilung der klinisch-pathologischen Endpunktgruppen nach Tumoreigenschaften

Gruppe	Eigenschaft	Pathologie	Anzahl der Patienten
1	Lokal begrenztes Karzinom, nicht invasiv	pT2 kein BCR	1.025
2	Lokal begrenztes Karzinom, invasiv	pT3a / pT3b kein BCR / reversibles BCR	357
3	Okkulte Karzinome*	Irreversibles BCR ohne Metastasen	564
4	Metastasierende Karzinome	Mit Lymphknoten- und / oder Fernmetastasen	212

** Okkultes Karzinom: Per Zufallsbefund entdecktes Karzinom*

Verwendete Zellkulturen

Die Zellkulturexperimente der vorliegenden Arbeit wurden an folgenden sechs adhärenten humanen Prostatakarzinom-Zelllinien durchgeführt: LNCaP, VCaP, PC-3, DU145, BPH-1 und RWPE-1, sowie der Nierenzelllinie HEK293 (Phönix-Zellen). Die Zelllinien zeichnen sich durch verschiedene Eigenschaften aus, die im Folgenden kurz beschrieben werden:

LNCaP (Lymphnote carcinoma prostate):

Diese Zellen wurden aus einer Lymphknotenmetastase des Prostata-Adenokarzinoms eines 50-jährigen Patienten generiert. Sie sind hormonresponsiv (AR-positiv) und zeigen einen hypotetraploiden Chromosomensatz mit 76 bis 91 Chromosomen. Die malignen Eigenschaften der Zelllinie sind gut erhalten, insgesamt zeigt die Zelllinie jedoch ein geringes malignes Potential. Bezogen über das ATCC (American Type Culture Collection): ATCC® CRL-1740™

VCaP (vertebral cancer of the prostate)

Die VCaP-Zelllinie ist aus Zellen einer Lendenwirbelmetastase eines Patienten mit einem hormonrefraktären Prostatakarzinom etabliert worden. Sie ist ERG-positiv und weist eine AR-Amplifikation auf. Bezogen über das ATCC: ATCC® CRL-2876™

PC-3

Eine der aggressivsten Prostata-Zelllinien ist die PC-3. Sie wurde aus einer Knochenmetastase eines Prostatakarzinoms etabliert und zeigt einen erhöhten Chromosomensatz von 62, wobei das Y-Chromosom komplett fehlt. Sie zeigt keine Hormonresponsivität. Bezogen über das ATCC: ATCC® CRL1435™

DU145

Hierbei handelt es sich um Zellen, die aus einer Hirnmetastase generiert wurden. Sie zeigen ein mittleres metastasierendes Potential und sind nicht hormonresponsiv. Bezogen über das ATCC: ATCC® HTB-81™

BPH-1 (Benigne prostatische Hyperplasie-1)

Diese Zelllinien entstammen einer gutartigen prostatischen Hyperplasie und stellen somit ein Modell für eine veränderte, aber noch benigne Prostata dar. Bezogen über das DSMZ-Institut.

RWPE-1

Das Modell einer unveränderten Prostata wird durch die RWPE-1 vertreten. Sie entstammt epithelialen Zellen der peripheren Zone einer histologisch normalen Prostata. Bezogen über das ATCC: ATCC® CRL-11609™

HEK293 (Human Embryonic Kidney)

Diese Zelllinie wird häufig, so auch in dieser Arbeit, für die Virusvermehrung eingesetzt. Sie ist durch eine Transformation einer menschlichen embryonalen Nierenzelle und Teilen der DNA des Adenovirus 5 hergestellt worden. Da ihr somit auf künstlichem Wege die Charakteristika einer Krebszelle verliehen wurden, ist die Zelllinie als Modellsystem nur bedingt geeignet. Aufgrund ihrer Unempfindlichkeit und ihrer guten Eigenschaften für die Vermehrung von Viren, werden HEK293-Zellen jedoch gerne zur Virusproduktion genutzt. Zur Verfügung gestellt von G. Nohlen, Standford, USA.

2.1.4 Zellkulturmedien

DMEM-Vollmedium 500 ml DMEM (1x), liquid (High Glucose) für 293T-Zellen:

Zusätze:

- 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):

Zusätze:

- keine weiteren Zusätze

K-SFM-Vollmedium 500 ml Defined Keratinocyte-SFM (1x), Liquid für RWPE-1 Zellen

Zusätze:

- 1 ml Defined Keratinocyte-SFM Growth Supplement
- 5 ml PenStrep

RPMI-Vollmedium 500 ml RPMI Medium 1640 (1x)+GlutaMAXTM-I für Prostatazelllinien:

Zusätze:

- 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

Zusätze:

- 84,9 µl Puromycin-Lösung (10 g/l)

Transduktionsmedium 50 ml RPMI-Vollmedium für Prostatazelllinien

Zusätze:

- 50 µl Polybren (10 mg/ml)

2.1.5 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden selbst designed und die Oligonukleotide von der Firma *MWG* hergestellt (Tab. 5).

Tabelle 5: Verwendete Oligonukleotide

GEN	Amplifizierte Region	Forward-Primer	Reverse-Primer
PSA	Promotor	CCT AGA TGA AGT CTC CAT GAG CTC CA	GGG AGG GAG AGC TAG CAC TTG
TMPRSS2	Promotor	CTG AGC CCC ACA ATT GC	GGT GGG ACA CAC CTC AGC
FKBP5	Promotor	GAG CCT CTT TCT CAG TTTTGC TTC C	TAC TGC CCT AGA GCA ATT TTG TTT TG
ELK4	Promotor	GGG TGATGA ACG AAG GCT TG	CTC CAG AGC AGA CTT AGC TG
KLK2	Promotor	ACC CCT GTT GCT GTT CAT CCT G	CCG CCC TTG CCC TGT TGG

2.1.6 Antikörper für die Westernblots

Für die Westernblots wurden je zwei Antikörper eingesetzt, ein für das nachzuweisende Protein spezifischer Primärer-Antikörper und ein weiterer, gegen den Wirt des ersten Antikörpers gerichteter Sekundärer-Antikörper (Tab. 6).

Tabelle 6: Für die Westernblots verwendete Antikörper

Antikörper	Wirt	Verdünnung	Firma
1. Antikörper			
mαCHD1	Maus	1:1000	Santa Cruz
rbαAR	Kaninchen	1:2500	Millipore
rbαERG (829)	Kaninchen	1:2500	Epitomics
αTubulin	Maus	1:5000	Sigma Aldrich
2. Antikörper			
gαm	Maus	1:10000	Dianova
gαrb	Kaninchen	1:10000	Dianova

2.1.7 shRNA-Konstrukte

Die getesteten shRNA-Konstrukte basieren auf einem lentiviralen pLKO.1-Vektor und wurden von der Firma *Sigma-Aldrich* bestellt. Ihre Zielsequenzen sind in Tabelle 7 aufgelistet.

Tabelle 7: Getestete shRNA-Konstrukte für die Gen-Depletion

Labor-ID	TRC-Nummer	Zielsequenz
AR:		
AR_1	TRCN0000003715	CCTGCTAATCAAGTCACACAT
AR_2	TRCN0000003716	GAAATGTTATGAAGCAGGGAT
AR_3	TRCN0000003717	CGCGACTACTACAACTTTCCA
AR_4	TRCN0000003718	CACCAATGTCAACTCCAGGAT
ERG:		
ERG_1	TRCN0000013913	GCCCATCAACAGACGTTGATA
ERG_2	TRCN0000013914	GCTCATATCAAGGAAGCCTTA
ERG_3	TRCN0000013915	GCGGTGAAAGAATATGGCCTT
ERG_4	TRCN0000013916	CCACCCACAGAAGATGAACTT
ERG_5	TRCN0000013917	GATGATGTTGATAAAGCCTTA
CHD1:		
CHD1_1	TRCN0000021309	GCGGTTTATCAAGAGCTATAA
CHD1_2	TRCN0000021311	GCGCAGTAGAAGTAGGAGATA
CHD1_3	TRCN0000021312	GCAGTTGTGATGAAACAGAAT
CHD1_4	TRCN0000234342	TGATGAAGCACACCGATTAAA
CHD1_5	TRCN0000234343	CAAGCAAGACAGCAGATATTA
PTEN:	TRCN0000002746	CCACAGCTAGAACTTATCAAA
mTOR	Sarbassov et al[1)]	TCAGCGTCCCTACCTTCTTCT
shNeg	Everett et al.[2)]	TTATCGCGCATATCACGCG
shGFP	Everett et al[-2)]	CAACAAGATGAAGAGCACCAA
shRB1	TRCN0000295892	GTGCGCTCTTGAGGTTGTAAT

TRC: „The RNAi Consortium" of the Broad Institute of MIT (Massachusetts Institute of Technology) and Harvard. [1)] (124) [2)] (125)

2.1.8 Überexpressionskonstrukte

Das Überexpressionskonstrukt für CHD1 wurde von der Firma Origene bestellt und basiert auf einem pCMV6-XL4-Vektor. Die Konstrukte für *RB1* und *PTEN* basieren beide auf einem PSG5L-HA-Vektor und wurden freundlicherweise von William Sellers vom Department of Adult Oncology der Harvard Medical School zur Verfügung gestellt. Als Kontrolle diente ein pLNGY-Vektor, der das eYFP (enhanced yellow fluorescent protein) exprimiert und freundlicherweise von Herrn Dr. Roger Everett vom Centre for Virus Research der University of Glasgow zur Verfügung gestellt wurde (Tab. 8).

Tabelle 8: Verwendete Konstrukte zur Überexpression von CHD1, RB1, PTEN und eYFP

Gen	Konstrukt	Quelle
CHD1	pCMV6-XL4-CHD1	Fa. Origene
RB1	PSG5L-HA-RB1	Sellers et al. [3)]
PTEN	PSG5L-HA-PTEN	Ramaswamy et al.[4)]
eYFP	pLNGY	Everett et al.[5)]

[3)] (90), [4)] (126), [5)] (125)

2.1.9 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 Hamburg (Arbeitsgruppe Carol Stocking) zur Verfügung gestellt wurden.

2.1.10 TaqMan Sonden

Zum Nachweis des mRNA-Expressionsniveaus per qPCR wurden die in Tabelle 9 aufgeführten Sonden der Firma Life Technologies verwendet.

Tabelle 9: Verwendete q-PCR-Sonden (TaqMan)

Gen	Assay-ID
CHD1	Hs00154405_m1
GAPDH	Hs99999905_m1

2.1.11 Software und Datenbanken

- Ensemble release 71: Auswahl der DH10B-Klone zur Herstellung der FISH-Sonden
- JMP 9.0.2: Statistische Auswertung der Studiendaten
- Primer3-Software: Erstellung von Primersequenzen
- Microsoft®Exel®für MAC 2011: Auswertung der TaqMan-PCR, der NGS-Daten und zur Erstellung von Abbildungen
- Microsoft®PowerPoint®für MAC 2011: Erstellung von Abbildungen

2.2 Methoden

2.2.1 Fixierung und Einbettung von FFPE-Gewebe

Prostaten, die nicht für eine Kryokonservierung ausgewählt wurden, wurden einer Formalin-fixierung und anschließender Einbettung in Paraffin wie folgt unterzogen:

- Fixierung in 4 %tigem Formalin direkt nach der operativen Entfernung
- Makroskopischer Zuschnitt durch den Pathologen
- Einkapselung der kompletten zerlegten Prostata
- Entwässerung der Gewebe über eine aufsteigende Alkoholreihe (70, 80, 100 %)
- Entfetten der Gewebe mittels Xylol
- Einlegen in Paraffin
- Einblocken in Paraffin
- Anfertigung von 5 µm-Gewebeschnitten jedes Blöckchens
- Hämalaun Eosin Färbung
- Histologische Begutachtung

2.2.2 Nukleinsäureisolation

Nukleinsäureisolation aus kryokonserviertem Gewebe

Isolation aus kryokonservierten Gewebeschnitten

Der entscheidende Schritt bei der Isolation von Nukleinsäuren aus tierischem und humanem Gewebe ist der vorgeschaltete Gewebeaufschluss. Aus diesem Grund sind hier verschiedene Gewebeaufschlussverfahren getestet worden, die Ergebnisse sind im Ergebnisteil unter 3.1 aufgeführt. Unabhängig von der verwendeten Gewebeaufschlussmethode erfolgte die DNA- und RNA-Isolation – getrennt wie auch parallel – mittels Nukleinsäureisolationskits der Firma Qiagen (QIAmp DNA Mini and Blood Mini Kit / RNeasy Mini Kit), deren Protokolle nach Herstellerangaben durchgeführt wurden. Grundsätzlich wurden die Protease-Verdau-Intervalle zugunsten einer höheren Ausbeute erhöht (3 x 20µl Proteinase K im Abstand von 4 Std). Bei der parallelen Isolation von DNA und RNA wurde die Konzentration des Ethanols erhöht, um ebenfalls Mikro-RNAs zu erhalten (EtOH absolut).

Isolation aus formalinfixiertem (formalin fixed and paraffin embedded = FFPE-) Gewebe

Isolation aus FFPE-Gewebestanzen

DNA- wie auch RNA-Isolation erfolgte aus Gewebestanzen eines Durchmessers von 0,6 mm und einer Länge von 2 bis 4 mm. Das Gewebe wurde zunächst entparaffiniert, indem es 2 mal je 10 min in Xylol und anschließend 2 mal je 10 min in Ethanol (70 %) inkubiert wurde. Die entparaffinierten Stanzen wurden bei 40 °C getrocknet. Die Aufarbeitung der Nukleinsäuren erfolgte nach einem modifizierten Protokoll der Isolationskits „QIAmp DNA FFPE Tissue Kit“ bzw. „RNeasy FFPE Kit“ der Firma Qiagen. Auch hier sind die Originalprotokolle der Firma für 4 µm-Gewebeschnitte etabliert. Für eine Isolation aus Gewebestanzen musste daher ein Proteinase-K-Verdau über Nacht vorgeschaltet werden. Dieser war für DNA in ALT-Puffer möglich, der selbst eine lysierende Wirkung hat. Ein Verdau der kompletten Stanzen war für die DNA-Isolierung dadurch möglich. Für die RNA-Isolierung konnte allerdings nur ein RLT-Plus-Puffer eingesetzt werden. Aufgrund der deutlich geringeren Lysis-Eigenschaften dieses Puffers war ein Verdau der kompletten Stanzen hier nicht möglich. Sie wurden daher nach der Entparaffinisierung und vor dem Verdau in Flüssigstickstoff getaucht und mit einer Pistille in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß zerkleinert. Nach dem Proteinase-K-Verdau wurden die Nukleinsäuren nach Herstellerangaben isoliert. Die Konzentrationen wurden per Spektrophotometer (Nanodrop, Fa. Thermo Scientific) gemessen.

Nukleinsäureisolation aus Zelllinien

DNA-Isolation:

Kultivierte Zellen wurden mittels Trypsin vom Flaschenboden gelöst, in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß bei 300 g für 5 min zentrifugiert und das Pellet in PBS-Puffer aufgenommen (Endvolumen 200 µl). Die anschließende DNA-Isolation erfolgte mit dem „Qiamp DNA Mini and Blood Mini Kit" der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellerprotokolls.

RNA-Isolation

Die Isolation von RNA aus kultivierten Zellen erfolgte über eine Chloroform-/ Phenol-Extraktion mit Ethanol-Fällung und anschließender Aufarbeitung mit dem „Kit Nucleospin-RNA II" der Firma Machery-Nagel mit abgeändertem Protokoll.

Das ausführliche Protokoll für die RNA-Isolation aus Zelllinien befindet sich im Anhang unter XXIV

RNAse-Verdau

Für den RNAse-Verdau der RNA in DNA wurde eine Ribonuclease A der Firma Sigma Aldrich eingesetzt. Sie wurde in einer Konzentration von 0,01 µg/µl (Endkonzentration der Gesamtlösung) für 30 min bei 60 °C inkubiert und bei 95 °C für 10 min abgestoppt. Anschließend erfolgte eine Aufreinigung mit dem „Qiamp DNA Micro Kit" der Firma Qiagen nach Herstellerprotokoll.

2.2.3 Qualitätskontrollen isolierter Nukleinsäuren

Die verschiedenen Schritte, die Nukleinsäuren vor einem NGS durchlaufen setzen eine möglichst hohe Anfangsqualität voraus. Neben der Reinheit ist vor allem der Fragmentierungsstatus der DNA wie auch RNA von entscheidender Bedeutung für das Gelingen der Sequenzierung des kompletten Genoms. Dies gilt insbesondere für die per Mate-Pair-Sequencing durchgeführte Analyse der großen Strukturveränderungen der DNA. Da im Rahmen dieser Arbeit neben dem Tumor auch jeweils eine Blutprobe desselben Patienten untersucht wurde, wurde neben den Qualitätstests auch überprüft, ob die isolierten und einander zugeordneten DNA-Paare wirklich von der selben Person stammten. Dies erfolgte mit Hilfe einer Mikrosatelliten-Analyse (auch Vaterschaftstest genannt).

Überprüfung der Reinheit und Konzentration der Nukleinsäuren

Der Anteil von Proteinen sowie chemischen Rückständen aus der Isolation in der DNA und RNA wurde mittels Spektrophotometer (Nanodrop, Fa. Thermo Scientific) ermittelt, ebenso die Konzentration der RNA. Die Konzentration der DNA wurde zusätzlich über einen Picogreen-Assay mit dem Qubit-Fluorometer (Fa. Invitrogen) ermittelt.

Überprüfung der Nukleinsäuren-Donoren per Mikrosatelliten-Analyse

Mikrosatelliten sind kurze repetitive DNA-Sequenzen oder Short Tandem Repeats (STR), die über das gesamte Genom verteilt auftreten und meist in nicht codierenden Regionen liegen. Sie bestehen aus 4 bis 10 Nukleotiden, die sich 10 bis 100 mal an einem Lokus wiederholen können. Die Anzahl der Wiederholungen unterscheidet sich bei verschiedenen Individuen einer Art. Bei manchen Mikrosatelliten ist die Anzahl der Wiederholungen so spezifisch, dass dies zur genetischen Identifizierung einer Person genutzt werden kann. Bei dem sogenannten Vaterschaftstest werden mehrere Mikrosatelliten einer Person auf Ihre Wiederholungshäufigkeit hin untersucht. Es ergibt sich ein für das Individuum spezifisches Muster, welches sich von denen anderer unterscheidet und somit eine 99,9 %ig sichere Zuordnung erlaubt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde dieser Test durchgeführt, um die für das NGS isolierten DNAs aus Tumorgewebe und die zugehörige aus Blut isolierte DNA vor dem NGS eindeutig demselben Patienten zuzuordnen. Es wurden nur Proben mit eindeutiger Übereinstimmung sequenziert. Hierzu wurde das „Mentype Nonaplex PCR Amplification Kit“ der Firma Biotype verwendet und nach Herstellerprotokoll folgende acht polymorphe STR-Loci analysiert: D3S1358, D8S1179, D18S51, D21S11, FGA (FIBRA), SE33 (AKTBP2), TH01 (TC11) und vWA. Die PCR wurde im Thermocycler (Bio-Rad C1000) und die Elektrophorese im ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer der Firma Applied Biosystems durchgeführt.

Überprüfung des Fragmentierungsstatus der DNA und RNA

Überprüfung des Fragmentierungsmusters der DNA mittels Gelelektrophorese

Der Grad der Fragmentierung der für das NGS isolierten DNAs wurde durch eine Agarosegelelektrophorese ermittelt. Hierzu wurde ein 1 %iges Agarosegel angefertigt (1 g Agarose, 99 ml TAE (Tris-Acetate-EDTA)-Puffer, 6 µl Ethidiumbromid) und je 200 g DNA in einem elektrischen Feld bei 60 V für 7 min und anschließend bei 100 V für 55 min aufgetrennt. Parallel wurde eine 1 kp-DNA-Leiter (Fa. GeneRuler) mit aufgetrennt und die DNA-Spuren unter UV-Licht sichtbar gemacht. Beispielbilder sind im Ergebnisteil unter 3.1 zu finden.

Überprüfung des Fragmentierungsmusters der RNA mittels Agilent Bioanalyzer

Der Fragmentierungsgrad der für das NGS isolierten RNAs wurde ebenfalls mittels einer Gelelektrophorese bestimmt. Hierzu wurde das chipbasierte Bioanalyzer-System der Firma Agilent verwendet. Der Assay wurde mittels „Agilent RNA 6000 Nano Kit“ nach Herstellerangaben vorbereitet und mit dem Gerät „2100 Bionalyzer“ durchgeführt.

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

Bei der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) werden Genomabschnitte durch eine fluoreszenzmarkierte DNA-Sonde sichtbar gemacht. In den meisten Fällen handelt es sich hierbei um für ein Gen spezifische DNA-Sequenzen, durch deren Nachweis man auf die Kopiezahl des entsprechenden Genes schließt. Man untersucht hiermit Gewebe auf erhöhte Kopiezahlen (Amplifikationen) oder erniedrigte Kopiezahlen (Deletionen) eines Genes. Hierzu werden die DNA-Sequenzen, aus denen Sonden hergestellt werden sollen, in BACs (bacterial artificial chromosomes) kloniert, um diese dann in Bakterien zu vermehren. BACs sind künstliche Chromosomen, die aus einem Plasmid von *E.coli* hergestellt wurden und als Vektoren dienen, die besonders lange DNA-Abschnitte in Bakterienzellen einschleusen können. Die Vermehrung der BACs in der Bakterienzelle führt zu sogenannten BAC-Klonen und zur Anreicherung der Zielsequenz. Diese wird im Anschluss isoliert und mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert, man erhält sogenannte FISH-Sonden. Nach der Hybridisierung dieser Sonden auf einem Gewebeschnitt stellen sich gebundene Sonden unter einem Fluoreszenzmikroskop als farbige Punkte dar. Die einzelnen Schritte einer FISH-Sonden-Herstellung werden im Folgenden näher erläutert.

BAC-Klone

Seit dem Human Genome Project liegen BAC-Klone für fast alle Regionen des menschlichen Genoms vor und können kommerziell erworben werden. Für die Herstellung von FISH-Sonden werden BAC-Klone mit integrierten DNA-Fragmenten (Inserts) einer Länge von 100-300 kbp genutzt. Für Deletionsuntersuchungen des CHD1 wurden zwei unterschiedliche BACs von der Firma SourceBioScience (Cambridge, UK) bestellt (BAC RP11-533M23 und BAC RP11-422M08) und mit dem Fluoreszenzfarbstoff „Spectrum Green“ markiert. Als Referenz diente eine mit „Spectrum Orange“ markierte Zentromersonde des Chromosomes 10 der Firma Abbott, da für Chromosom 5 keine kommerzielle Sonde erhältlich ist. Für die Herstellung der ERG-Break-Apart-Sonde wurden folgende BACs verwendet: 5'-ERG: RP11-95I21 und RP11-360N24 (Spectrum Green); 3'-ERG: RP11-720N21 und RP11-315E22 (Spectrum Orange).

Bakterienkultivierung

Die von SourceBioScience bestellten, in *E. coli* transformierten BACs werden in einer Stocklösung geliefert. Zur Vermehrung dieser vektorenthaltenen Bakterien (Stamm DH10B) wurde aus einer knapp stecknadelkopfgroßen Menge der Stocklösung eine Vorkultur hergestellt. Diese wurde für 8 bis 10 Stunden in 10 ml LB-Medium bei 37 °C geschüttelt (220 rpm). Zur Herstellung der Hauptkultur wurden 2 ml der Vorkultur in 250 ml LB-Medium bei 37 °C für 12 Stunden geschüttelt (220 rpm). Beiden Medien wurden mit 100 µg/ml Chloramphenicol versetzt.

DNA-Isolation aus Bakterien

Nach Zentrifugation der Hauptkultur bei 600 g und 4 °C für 15 min wurde das Bakterienpellet resuspendiert und die weitere DNA-Isolation mit Hilfe des Isolationskits „NucleoBond BAC100“ der Firma Macherey-Nagel nach Angaben des Herstellerprotokolls durchgeführt.

Nick-Translation (Sondenherstellung)

Die sogenannte Nick-Translation dient der Markierung von DNA mit detektierbaren Stoffen, in diesem Fall ein Fluoreszenzfarbstoff. Hierzu werden durch eine DNAse-Behandlung Einzelstrangbrüche in der DNA generiert, die von der bakteriellen DNA-Polymerase I repariert werden. Die Reaktion erfolgt unter Zugabe von fluoreszenzmarkierten Nukleotiden, die somit in die DNA eingebaut werden. Für die vorliegende Arbeit wurden das „Nick Translation Reagent Kit“ sowie markierte dUTPs („Vysis Orange dUTPs“ und „Vysis Green dUTPs“) der Firma Abbott eingesetzt und die Reaktion nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Es wurden 1000 ng DNA auf 17,5 µl H_2O eingesetzt. Eine anschließende Aufreinigung der DNA erfolgte mit dem „QIAquick Nucleotide Removal Kit“ der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellerprotokolls.

Hybridisierung der FISH-Sonden auf FFPE-Gewebe

Vorbehandlung des Gewebes

Um die Zellkerne des zu untersuchenden Gewebes für die FISH-Sonden zugänglich zu machen, wurden die FFPE-Gewebeschnitte zunächst entparaffiniert. Hierzu wurden die Schnitte 3 mal je 10 min in Xylol gebadet (Lösen des Paraffins) danach 2 mal je 5 min in Ethanol getaucht (Entfernen des Xylols) und anschließend bei 48 °C für 3 min getrocknet. Eine Fixierung von Gewebe durch Formalin bewirkt Protein-Protein- wie auch Protein-Nukleinsäure-Vernetzungen, welche zu einer Konservierung des Gewebes bei gleichzeitiger Erhaltung der Morphologie führen. Für den Zugang von DNA-Sonden zur Ziel-DNA des Gewebes wirken sich diese Vernetzungen (Cross-Links) jedoch störend aus. Eine Zerstörung der Cross-Links erfolgte bei den vorliegenden Untersuchungen durch eine Inkubation in „Vysis VP 2000 Pretreatment Reagent“ der Firma Abbott bei 80 °C für 15 min. Nach einminütigem Waschen in dH_2O folgte ein Protease-Verdau in Vysis VP 2000 Protease Buffer und Vysis Protease I (Fa. Abbott) bei 37 °C für 150 min bei TMAs und 250 min bei Großflächen. Es folgte eine zweifache Waschung in dH_2O und eine Dehydrierung der Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe in 70 %, 80 % und 96 % Ethanol für je 3 min, die Schnitte wurden abschließend bei 48 °C für 3 min getrocknet.

Hybridisierung

Für die Hybridisierung der FISH-Sonden auf den Gewebeschnitten wurde ein Basismix aus 15 ml deionisiertem Formamid, 4,5 ml 20 x SSC und 3,0 g Dextransulfat hergestellt. 14 µl Basismix wurden mit 4 µl der hergestellten DNA-Sonden-Lösung (entspricht 200 ng Sonde), 0,5 µl

„Centromer 10 Probe“ (Fa. Abbott) und 2 µl Cot1-DNA gemischt. Letzteres blockt unspezifische Bindungsstellen, vor allem repetetive Sequenzen. Der so hergestellte Hybridisierungs-Mix wurde auf den Gewebeschnitt gegeben, mit einem Deckgläschen abgedeckt und mit Fixogum (Fa. Marabu) abgedichtet. Die Präparate wurden im ThermoBrite (Fa. Abbott) bei 72 °C für 10 min (Denaturierung der DNA) und anschließend bei 37 °C für 36 Stunden (Hybridisierung) inkubiert und anschließend wie folgt gewaschen: 15 min bei RT im Hybridisierungswaschpuffer (100 ml 20x SSC, 3 ml NP40, 897 ml dH_2O, pH = 7,25), Ablösen des Deckgläschens, 2 min bei 72°C Hybridisierungspuffer, 1 min dH_2O, 15 min trocknen bei RT in Dunkelheit. Die hybridisierten Gewebe wurden mit einem Vectashield^{R}-Mounting-Medium mit DAPI eingedeckelt. DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der intakte Zellmembranen passieren kann und unspezifisch an die DNA bindet (vor allem AT-reiche Regionen). Er führt somit zu einer Blaufärbung der Zellkerne, was die Zuordnung der Sondensignale zu einzelnen Zellen erleichtert.

Auswertung am Fluoreszenzmikroskop

Die Auswertung erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop der Firma Zeiss (Imager A1) mit entsprechenden Filtern für die Fluoreszenzfarbstoffe DAPI, Spectrum Orange und Spectrum Green. Ein Gewebe wurde als deletiert gewertet, wenn mindestens 60 % der Zellkerne weniger Signale für das Zielgen als für das Zentromer aufwiesen. Ein Zellkern galt als homozygot deletiert beim kompletten Verlust der Gensignale in Tumorzellen bei vorhandenem Zentromersignal. Die Stromazellen müssen je zwei Zentromer und Gensignale zeigen. Bei der Break-Apart Sonde liegen in einem intakten ERG-Gen die grüne und orange Sonde so dicht beieinander, dass sich ein einziges gelbliches Signal darstellt. Ein Bruch im ERG-Gen führt zu einer Entfernung beider Signale, so dass in diesem Fall ein separiertes grünes und ein oranges Signal erkennbar sind. Ein Bruch wurde angenommen, wenn mindestens 60 % der Tumorkerne ein separiertes grünes und ein oranges Signal aufwiesen Dieser Schwellenwert ist institutsintern durch den Vergleich von Array-CGH-Profilen und zugehörigen FISH-Daten von 7 Prostatakarzinomen ermittelt worden (62,95).

2.2.5 Expressionsanalysen mittels Q-PCR

RNA-Isolation

RNA aus 2 Stanzen FFPE-Gewebes eines Durchmessers von 0,6 mm und einer Länge von 2-4 mm wurde nach dem unter 2.2.2 beschriebenen Protokoll isoliert und die Konzentration per Spektrophotometer (Nanodrop, Fa. Thermo Scientific) gemessen.

cDNA-Synthese

Für die Reverse Transkription der RNA in DNA wurde das „High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit" der Firma Applied Biosystems eingesetzt. Es wurden je 1000 ng RNA pro Ansatz eingesetzt und nach Herstellerprotokoll umgeschrieben.

Quantitative Real-Time-PCR (Q-PCR)

Bei der quantitativen Real-Time-PCR wird das entstehende PCR-Produkt direkt während der Synthese über einen Laser detektiert. Dies kann durch den Einbau eines Fluoreszenzfarbstoffes in das gesamte PCR-Produkt erfolgen (mit SYBR-Green) oder aber mit sequenzspezifischen, fluoreszenzmarkierten Sonden. Da letzteres spezifischer und somit genauer ist, wurden für die Expressionsanalysen der vorliegenden Arbeit Sonden verwendet. Genspezifische und etablierte Sonden für fast alle humanen Gene sind kommerziell erhältlich und wurden in diesem Falle von der Firma Applied Biosystems bezogen. Die q-PCR wurde in einer 96-Well-Platte im Doppelansatz in dem „7900HT Fast-Real-Time-PCR-System" der Firma Applied Biosystems durchgeführt. Es wurden Ansätze aus dem „TaqMan Gene Expression Assay" und dem „TaqMan Real-Time PCR-Mastermix" mit je 25 ng DNA nach Angaben des Herstellers angesetzt und eine PCR mit dem in Tab. 10 dargestellten Thermoprofil durchgeführt.

Tabelle 10: Thermoprofil der q-PCR

Temperatur [°C]	Dauer [min]	
95	10:00	
95	00:15	40 Zyklen
60	01:00	

Auswertung

Die Auswertung der Expressionsanalysen per Real-Time-PCR erfolgte über die Standard-Kurven-Methode. Hierüber wurde eine relative Quantifizierung ermittelt. Da für die q-PCR voretablierte Sonden-Assays von Applied Biosystems (ABI) verwendet wurden, wurden für die Berechnung der Kopiezahl die von ABI ermittelten Standardkurven der Assays verwendet. Als

Grenzwert für eine Expression gleich Null wurde ein ct-Wert von 40 angenommen. Dieser recht hohe Wert wurde angesetzt, weil es sich bei den analysierten Proben um FFPE-Gewebe handelte und die Effizienz der PCR daher geringer ist.

2.2.6 Zellkulturexperimente

Zellpflege

Alle verwendeten Zelllinien wurden im entsprechenden Vollmedium kultiviert (siehe Punkt 2.1.4). In Kultur gehaltene Zellen erhielten alle zwei bis drei Tage einen Mediumwechsel und wurden bei einer Konfluenz von 70 - 80 % subkultiviert. Hierzu wurde das Medium entfernt und der Zellrasen mit 2 ml 0,25- %igem Trypsin bedeckt, bis die Zellen vom Kulturflaschenboden gelöst waren (circa 5 min). Die Trypsin-Zell-Suspension wurde in 10 ml Kulturmedium aufgenommen und je 1-2 ml (abhängig von der Teilungsrater der jeweiligen Zelllinie) in einer neuen Zellkulturflasche ausgesäht. Nach Auffüllen mit Kulturmedium auf ein Gesamtvolumen von 10 ml wurden die Zellen weiterhin bei 37 °C und 5 % CO_2 Partialdruck inkubiert. Zur dauerhaften Lagerung wurden die Zellen in FCS und 10 % DMSO in Kryoröhrchen eingefroren. Hierzu verblieben sie zunächst 30 min bei -20 °C, danach 30 min bei -80 °C und schließlich bis zum nächsten Auftauen in Flüssigstickstoff. Zur erneuten Anzucht wurden die eingefrorenen Zellen im Wasserbad bei RT aufgetaut, in 10 ml Kulturmedium überführt und bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Nach 24 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel. Die Trypsinbehandlung von LNCaP und HEK293 weichen leicht von oben beschriebenen Verfahren ab: LNCaP: 1 min RT, HEK293 2 min 37°C.

Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen trypsiniert und in Vollmedium aufgenommen. Von der Zellsuspension wurden 20 µl in eine Zählkammer (Cellometer^R Cell-Countin Chamber) pipettiert und die Zellzahl mit Hilfe des Cellometer^R Auto T4 Cell Counters bestimmt.

Isolation der shRNA-Kontrukte

Die auf einem lentiviralen pLKO.1-Vektor basierenden shRNA-Konstrukte wurden von der Firma *Sigma-Aldrich* bezogen (siehe 2.1.7, Tab. 7) und in Form von vektorenthaltenen (transformierten) *E.colis* geliefert. Um diese zu vermehren, wurde eine Hauptkultur der Bakterien angesetzt, mit 100 mg pro ml Amplillicin versetzt und für 16-18 Stunden angezogen. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 4 °C und 6.000 g für 10 min. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet für die Plasmidisolation mit dem „Plasmid Plus Maxi Kit“ der Firma Qiagen nach Herstellerprotokoll verwendet.

Gezielte Gen-Depletion durch Transduktion

Um Rückschlüsse auf die Funktion des CHD1 ziehen zu können, wurde die Expression des Genes gezielt in *in vitro*-Modellen herunterreguliert (Gen-Depletion). Hierzu wurde DNA, welche für CHD1-spezifische shRNAs kodiert, über einen Virus in Prostatazelllinien verbracht (Virustransduktion). Es kommt so zur Expression der entsprechenden siRNAs, die spezifisch an die mRNA binden und die Expression dieser hemmen. Zur Produktion der lentiviralen Vektoren wurden die Vepackungsplasmide pREV und pRRE verwendet. Diese kodieren für die Gene GAG, POL und REV des Human-Immun Defizienzvirus. Für die Expression des Hüllproteins wurde CMV-VSV-G verwendet.
Die lentiviralen Partikel wurden zur Transduktion der Prostataversuchszellen verwendet.
Ausführliche Protokolle für die „Produktion von lentiviralen Partikeln" und die „Lentivirale Transduktion" befinden sich im Anhang unter XXV bis XXVI.

Gezielte Gen-Überexpression durch Transfektion

Die gezielte Überexpression von CHD1, RB1, PTEN und eYFP (letzteres diente als Kontrolle) erfolgte nicht durch eine virale Transduktion, sondern durch eine Transfektion, d.h. ein Einbringen eines Plasmids ohne viralen Vektor direkt in die Zelle. Dieses Verfahren, das zu einer nicht permanenten Veränderung des Expressionsmusters der Zelle führt, ist weniger aufwendig als die virale Transduktion. Es wird daher angewendet, wenn die geringere Dauer des Effektes für die durchgeführten Experimente ausreicht. Die Transfektion erfolgte mit Lipofectamin 2000 (Fa. Invitrogen). Lipofectamin ist ein Reagenz, das die Transfektion durch Lipofektion, also die Aufnahme von Fremd-Nukleinsäuren mittels Liposomen durch die Zellmembran ermöglicht.
Das ausführliche Protokoll für die „Transfektion mit Lipofektamin" befindet sich im Anhang unter XXVII.

2.2.7 Proteinisolation und Bestimmung der Proteinkonzentration

Für den Proteinnachweis via Westernblot wurde zunächst eine Proteinisolation aus den kultivierten und manipulierten Zellen durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen in 6-Well-Platten bis zu einer Konfluenz von 90 % angezogen, gewaschen und der Zellrasen mit einer Mischung aus Cell Extraction Buffer (Fa. Invitrogen), Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF, Fa. Sigma Aldrich), einem Proteaseinhibitor (Fa. Sigma Aldrich), Dimethylsulfoxid (DMSO, Fa. Sigma Aldrich) und einer phosphatgepufferten Salzlösung (PBS, Fa. Invitrogen) 10 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 14.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Der Überstand wurde abgenommen und die Proteinkonzentration mit dem Photometer „Qubit" der Firma Life Technology und dem zugehörigen „Qubit Protein Assay" durchgeführt.
Das ausführliche Protokoll für die „Proteinisolation aus Zellkulturen" befindet sich im Anhang unter XXVIII.

2.2.8 Westernblot

Für die Bestimmung der Expression von Genen wurde neben der q-PCR auch eine Bestimmung der Expression auf Proteinebene mittels Westernblots durchgeführt. Hierzu wurden 40 µg Protein in einer 1:1-Verdünnung mit Laemmli-Puffer in einem Polyacrylgel bei 80 V elektrophoretisch aufgetrennt. Es folgte der Transfer (Blotten) der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran und der Nachweis der Proteine mit einem primären und einem sekundären Antikörper. Die Detektion erfolgte mit einem Chemilumineszenz-Reagenz (SuperSignal West Dura Substrate, Fa. Thermo Scientific) auf Röntgenfilm. Als Kontrolle für den quantitativen Vergleich der Proteinbanden der Zielproteine wurde α-Tubulin nachgewiesen.
Das ausführliche Protokoll für den „Westernblot" befindet sich im Anhang unter XXIX.

2.2.9 Colony Formation Assay

Der Colony Formation Assay dient zur Testung der Proliferationsfähigkeit einzelner Zellen. Gemessen wird diese anhand der gebildeten Zellkolonien. Eine reduzierte Proliferationsfähigkeit führt zu wenigen und kleinen Zellkolonien, während eine gesteigerte Proliferationsfähigkeit zu vielen und großen Zellkolonien führt. Damit kann der Colony Formation Assay zur Testung von tumorsuppressiven Eigenschaften von Genen genutzt werden. Der Colony Formation Assay wurde im Doppelansatz mit den Zelllinien BPH-1, DU145 und PC-3 durchgeführt. Als Negativkontrollen wurde shGFP verwendet, das gegen das im humanen Genom nicht vorkommende Grün Fluoreszierende Protein (GFP) gerichtet ist und PLNGY, welches für das YFP (Yellow Fluorescent Protein) kodiert, das ebenfalls nicht im humanen Genom vorkommt. Als Positivkontrollen wurden für sowohl die Überexpression wie auch der Depletion die bekannten Tumorsuppressorgene RB1, PTEN und mTOR (nur PC-3) verwendet.
Das ausführliche Protokoll für den „Colony Formation Assay" befindet sich im Anhang unter XXXI.

Softagar Colony Formation Assay

Der Softagar Colony Formation Assay dient zur Testung der verankerungsunabhängigen Wachstumsfähigkeiten einzelner Zellen. Gemessen wird diese anhand der gebildeten Zellkolonien. Normale Prostatazellen können nur wachsen, wenn sie sich an eine Oberfläche, in diesem Fall der Zellkulturflasche, anheften können. In einem Softagar, der eine gelartige Konsistenz aufweist, gelangen die Zellen nicht an den Zellkulturflaschenboden, um sich anzuheften, was bei unveränderten Prostatazellen zum Erliegen der Proliferation führt. Zellen, die zu einem verankerungsunabhängigen Wachstum fähig sind, bilden jedoch Zellkolonien im Softagar aus. Der Softagar Colony Formation Assay wurde im Doppelansatz mit der Zelllinie PC-3 durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde shNeg verwendet, das gegen die DNA-Polymerase I aus *E.coli* gerichtet ist.

Das ausführliche Protokoll für die „Softagar Colony Formation Assay " befindet sich im Anhang unter XXII.

Invasion Assay

Ein Verfahren, um die Migrationsfähigkeit und somit die Fähigkeit zur Metastasierung von Zellen zu untersuchen, ist der sogenannte Invasion Assay. Hierbei werden Zellen in einer Kammer kultiviert, die sich wiederum in einem Well befindet, welches einen Lockstoff (FCS) enthält. Den Boden der Kammer bildet eine Membran, die von den Zellen passiert werde muss, um an den Lockstoff zu gelangen. Die Membran wiederum ist mit einem Matrix-Gel beschichtet, das benigne Zellen nicht zu passieren vermögen. Zellen mit invasiven Fähigkeiten jedoch können diese Matrix durchwandern, indem sie z.B. mit Hilfe von Proteasen Teile dieser auflösen. Diese Zellen adhärieren an der Unterseite der durchwanderten Membran und können dort nachgewiesen werden.
Der Invasion Assay wurde im Doppelansatz mit der Zellinie PC-3 durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde shNeg verwendet, das gegen die DNA-Polymerase I aus *E.coli* gerichtet ist. Der Invasion Assay wurde mit den BD BioCodeAT™ Matrigel™ Invasion Chamber der Firma BD laut Herstellerprotokoll durchgeführt.

Induktion von chromosomalen Brüchen in vitro

Für eine Induktion von chromosomalen Brüchen in LNCaP-Zellen wurden dem Zellmedium Doxorubicin (1 µmol / l) oder Dehydrotestosteron (100 nmol / l) oder, im kombinierten Fall beides, zugesetzt und für 48 Stunden inkubiert. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen mitgeführt. Dieses Vorgehen wurde zum einen an shCHD1-behandelte Zellen und zum anderen an shGFP-behandelten Zellen durchgeführt.

Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) an Zellkulturen

Zum Nachweis von Brüchen im ERG-Gen wurden FISH-Analysen an Zellkulturen mit selbsterstellten Break-Apart-Sonden durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen in Chamber-Slides bis zu einer Konfluenz von ca 80 % kultiviert, mit einer 2:3-Mischung Methanol-Aceton für 10 min fixiert und bei 48 °C getrocknet. Es folgte eine absteigende Alkoholreihe und anschließend eine Protease-Behandlung für 5 min. Das weitere Vorgehen deckt sich mit dem zuvor beschriebenen Verfahren der FISH an FFPE-Gewebe. Zur näheren Information zu den Sonden siehe 2.2.4.

Chromatinimmunopräzipitation (ChIP)

Hierbei werden bestehende Protein-DNA-Bindungen mit Formaldehyd fixiert, die DNA der aufgeschlossenen Zellen fragmentiert und die DNA-Protein-Komplexe von Interesse über

spezifische Antikörper isoliert. Das so isolierte Chromatin wurde per PCR mit Primern für Bereiche der AR-abhängigen Promotoren von TMPRSS2, PSA, FKBP5, ELK4 und KLK2 analysiert.

2.2.10 Statistik

Alle statistischen Analysen wurden mit der Software „JMP 9“ der Firma SAS Institute durchgeführt. Die Assoziation von 5q21-Deletionen und dem Tumorphänotyp (wie Gleason-Grade und Tumorstadium) sowie anderen molekularen Markern wurden durch Kontingenztabellen (Häufigkeits- oder Kreuztabellen) und den Chi-Quadrat-Test bestimmt. In Kontingenztabellen werden zwei Merkmale miteinander in Beziehung gebracht (z.B. 5q21-Deletion und Tumorstadium) und die Häufigkeit der Kombinationen dieser Merkmale dargestellt. Der Chi-Quadrat-Test überprüft, ob beide Merkmale voneinander unabhängig sind. Die Überlebenskurven, hier als Darstellung der Rezidivrate über der Zeit, wurde nach dem Kaplan-Meier-Schätzer berechnet. Ein Zusammenhang wurde als signifikant gewertet, wenn der Signifikanzwert p einen Wert von $\geq 0{,}05$ aufwies.

3 ERGEBNISSE

3.1 Entwicklung eines DNA-Isolationsverfahrens zur Mate-Pair-Sequenzierung

3.1.1 Isolation von Nukleinsäuren aus Prostata-Gewebeschnitten

Verschiedene Schnittdicken mit und ohne mechanischem Aufschlussverfahren

Um zu ermitteln, ob auf einen mechanischen Aufschluss und die damit verbundenen schädigenden Scherkräfte verzichtet werden kann, wurde zunächst eine DNA- und RNA-Isolation aus Gewebeschnitten verschiedener Schnittdicken mit und ohne mechanischem Aufschlussverfahren durchgeführt. Der Aufschluss erfolgte hierbei mit Keramikperlen eines Durchmessers von 1,4 mm, die zusammen mit dem Gewebe und einem Lysispuffer RLT Plus (Fa. Qiagen) in einem 2 ml Reaktionsgefäß stark geschüttelt wurden (FastPrep Homogenisator Fa. Qbiogene). Proben desselben Gewebes wurden ohne mechanischen Aufschluss allein einer chemischen Lyse in RLT Plus Puffer unterzogen. Die Isolation mit mechanischem Aufschluss ergab für DNA eine 5- bis 12-fach und für RNA eine 2- bis 4,5-fach höhere Ausbeute als ohne. Ein Unterschied zwischen 20 Schnitten einer Schnittdicke von 4 µm und 5 Schnitten einer Schnittdicke von 16 µm bestand beim mechanischem Aufschluss kaum, wurde aber bei der rein chemischen Lyse deutlich. Wie zu erwarten, ergaben hierbei die dünneren Schnitte eine höhere Ausbeute als die dickeren (Abb. 3-1).

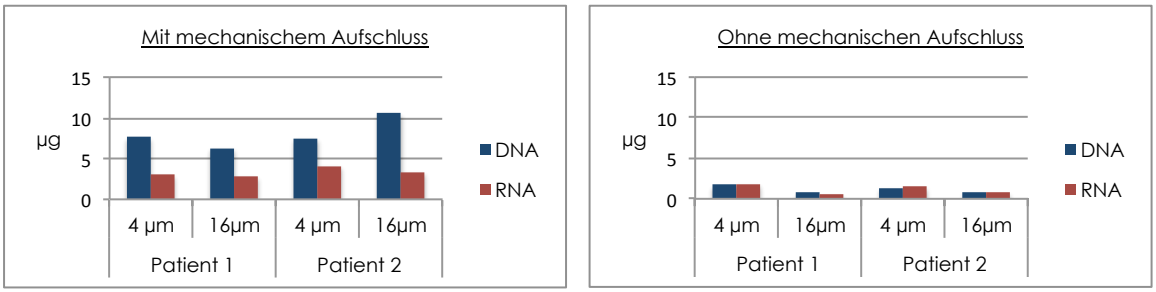


Abbildung 3-1: DNA- und RNA-Ausbeute (in µg) aus Gewebeschnitten verschiedener Schnittdicken mit und ohne mechanischen Aufschluss

Es wurde aus je 20 Gewebeschnitten einer Schnittdicke von 4 µm, bzw. 5 Gewebeschnitten mit einer Schnittdicke von 16 µm extrahiert. Der Aufschluss erfolgte mit dem FastPrep Homogenisator der Firma Qbiogene mit 100 Keramikperlen eines Durchmessers von 1,4 mm (Lysismatrixtube D, 5,5 m/s, 40 Sekunden).

Eine Analyse der Nukleinsäure-Integrität erfolgte für DNA wie auch RNA über eine chipbasierte Gelelektrophorese des Bioanalyzers der Firma Agilent. Die DNA der mechanisch aufgeschlossenen Gewebe erschien stärker fragmentiert als die der rein chemisch aufgeschlossenen Proben. Da die Analyse bei letzterer allerdings mit deutlich weniger Material durchgeführt

werden musste (da die Ausbeute geringer war), stellte sich das Peakogramm weniger deutlich dar, was nur eine grobe Beurteilung der Fragmentierung zulässt. Je weniger die DNA fragmentiert ist, desto deutlicher stellt sich ein einzelner Hauptpeak in der Mitte der x-Achse dar (Abb. 3-2).

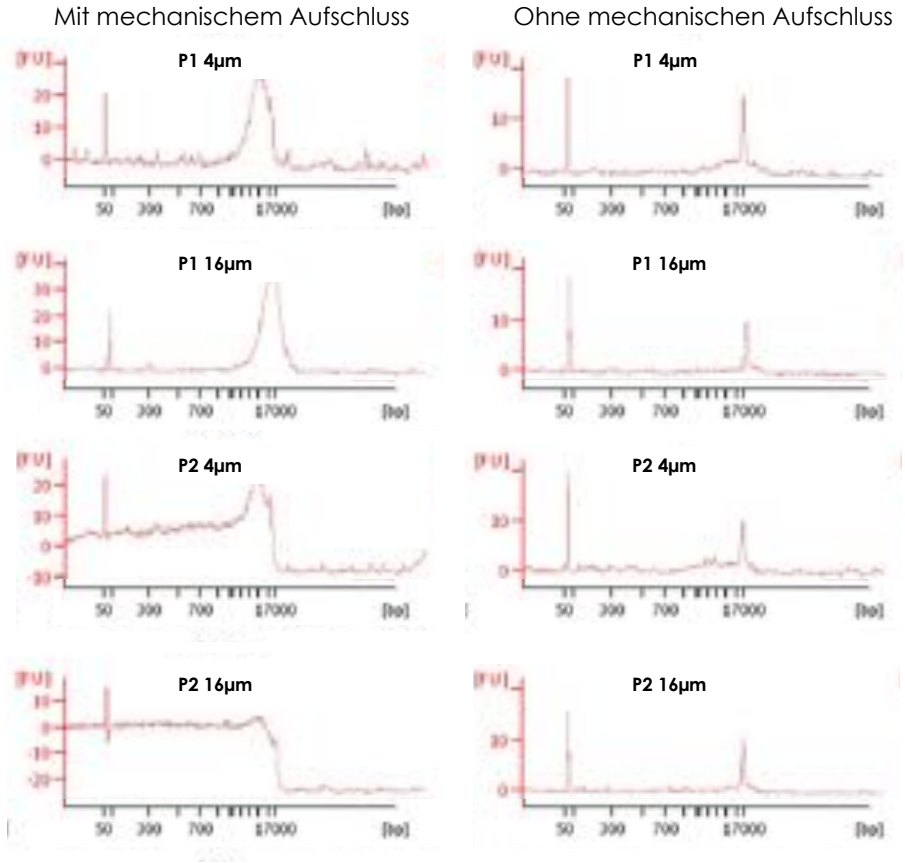


Abbildung 3-2: DNA-Integrität nach Extraktion mit und ohne mechanischen Gewebeaufschluss

Es wurde aus je 20 Gewebeschnitten einer Schnittdicke von 4 µm, bzw. 5 Gewebeschnitten mit einer Schnittdicke von 16 µm extrahiert. Der Aufschluss erfolgte mit dem FastPrep Homogenisator der Firma Qbiogene mit 100 Keramikperlen eines Durchmessers von 1,4 mm (Lysismatrixtube D, 5,5 m/s, 40 Sekunden). P1: Patient 1, P2: Patient 2.
Die Messung erfolgte durch eine Gelelektrophorese im Bioanalyzer der Firma Agilent (DNA 12000 Kit).
FU: Fluorescence units, bp: Basepairs

Die RNA nach Isolation mit und ohne mechanischen Aufschluss zeigte in beiden Fällen eine gute Qualität mit RIN- (RNA Integry Number) Werten von 8,2 bis 9 (Abb. 3-3). Die RIN-Werte sind ein Maß für den Fragmentierungsstatus der RNA und werden über einen Algorithmus anhand der Pikogramm-Daten berechnet. Auf einer Skala von 1 bis 10 steht 10 für komplett intakte RNA, während ein Wert von 1 eine vollständige Fragmentierung bedeutet.

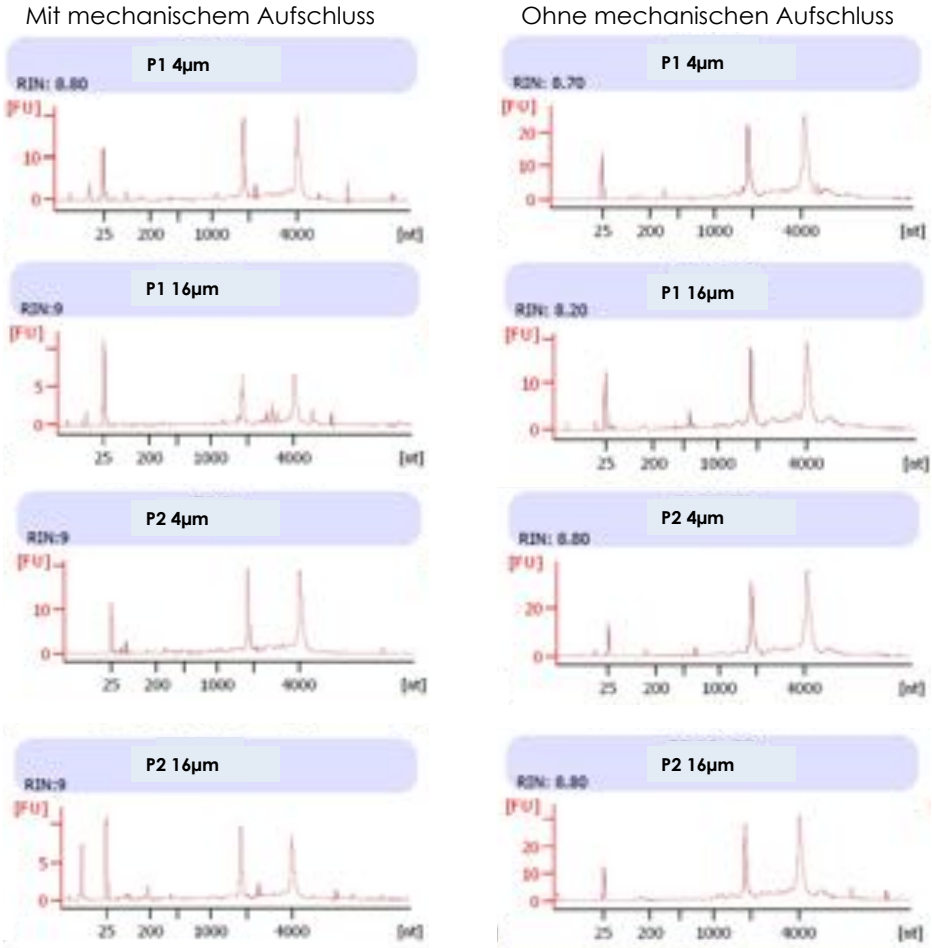


Abbildung 3-3: RNA Integrität nach Extraktion mit und ohne mechanischem Gewebeaufschluss

Es wurde aus je 20 Gewebeschnitten einer Schnittdicke von 4 µm bzw. 5 Gewebeschnitten mit einer Schnittdicke von 16 µm extrahiert. Der Aufschluss erfolgte mit dem FastPrep Homogenisator der Firma Qbiogene mit 100 Keramikperlen eines Durchmessers von 1,4 mm (Lysismatrixtube D, 5,5 m/s, 40 Sekunden) P1: Patient 1, P2: Patient 2.
Die Messung erfolgte durch eine Gelelektrophorese im Bioanalyzer der Firma Agilent (RNA 6000 Nano Kit). FU: Fluorescence units, nt: Nucleotide

<u>Fazit</u> Bei einem Aufschluss von Prostatagewebeschnitten zeigte eine Lyse des Gewebes ohne mechanischen Aufschluss eine gute Qualität der im Anschluss isolierten Nukleinsäuren, die Ausbeute war jedoch extrem gering.

<u>Einfluss des Gewebeaufschlussverfahrens auf die Nukleinsäure-Ausbeute und –Qualität</u>

Die Ermittlung des am besten geeigneten mechanischen Aufschlussverfahrens erfolgte über eine DNA - und RNA - Isolation von fünf Geweben, die jeweils mit 100 Keramikperlen (1,4 mm Durchmesser), einer Keramikkugel (6,35 mm Durchmesser) oder einem Stabhomogenisator aufgeschlossen wurden. Hierbei erwies sich der Gewebeaufschluss mittels Stabhomogenisator als besonders verlustreich. Zwischen den mit Perlen und Kugeln aufgeschlossenen Geweben

bestand kaum ein Unterschied bezüglich der Durchschnittsmengen, wohl aber bezüglich der Reproduzierbarkeit. Die Nukleinsäuremengen nach Aufschluss mittels Perlen stellten sich regelmäßiger dar, als bei den durch eine Kugel aufgeschlossenen Proben (Abb. 3-4).

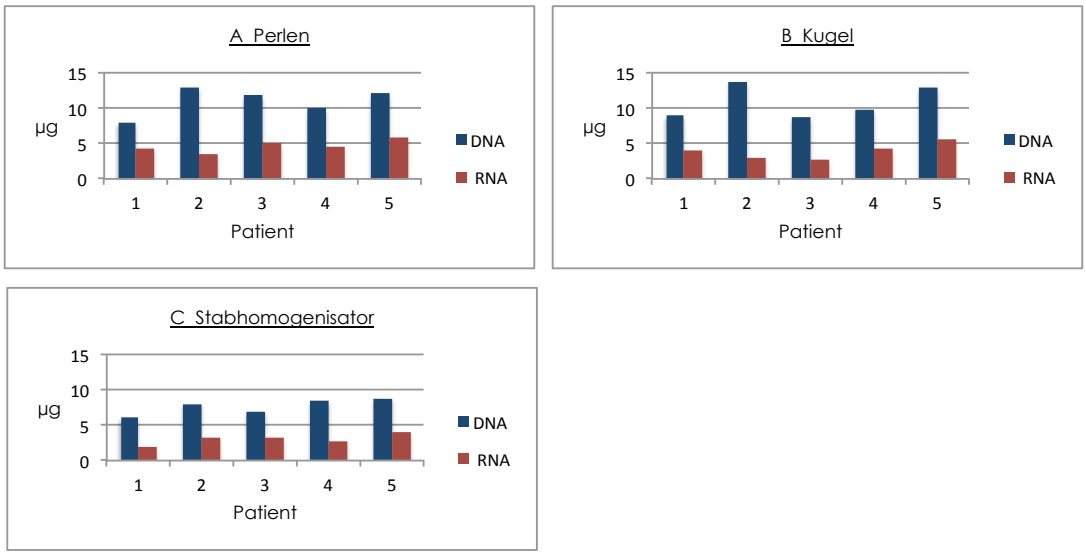


Abbildung 3-4: DNA- und RNA-Ausbeute (in µg) nach Gewebeaufschluss mit 100 Keramikperlen (A), einer Keramikkugel (B) und einem Stabhomogenisator (C).

Es wurde aus je 5 Gewebeschnitten einer Schnittdicke von 16 µm extrahiert.
A: Gewebeaufschluss mit 100 Keramikperlen eines Durchmessers von 1,4 mm im FastPrep Homogenisator der Firma Qbiogene (Lysismatrixtube D, 40 sec, 5,5 m/s)
B: Gewebeaufschluss mit 1 Keramikkugel eines Durchmessers von 6,35 mm im FastPrep Homogenisator der Firma Qbiogene (Lysismatrixtube A, 40 sec, 5,5 m/s)
C: Gewebeaufschluss mit einem Stabhomogenisator (Tissue Homogenizer, Fa. Omni International, Stufe 3)

Die Qualitätsprüfung der DNA erfolgte anhand einer Agarose Gelelektrophorese. Aufgrund des hohen Verlustes an DNA nach Aufschluss mittels Stabhomogenisator wurden nur die Proben weiter untersucht, die mittels Perlen bzw. Kugel aufgeschlossen wurden. Die DNA beider Gruppen zeigte generell eine Fragmentgröße von deutlich über 10 Kilobasen. DNA aus Geweben, die mittels Keramikperlen aufgeschlossen wurden zeigten eine geringe und über alle Proben gleichmäßiger verteilte DNA-Spur (Maß für Fragmentierung der DNA). Diese Spur war bei drei der fünf mittels Kugel aufgeschlossenen Gewebe stärker (höhere Fragmentierung der DNA) und bei zweien schwächer (geringere Fragmentierung der DNA) ausgeprägt als die Spuren der ersten Gruppe (Abb. 3-5).

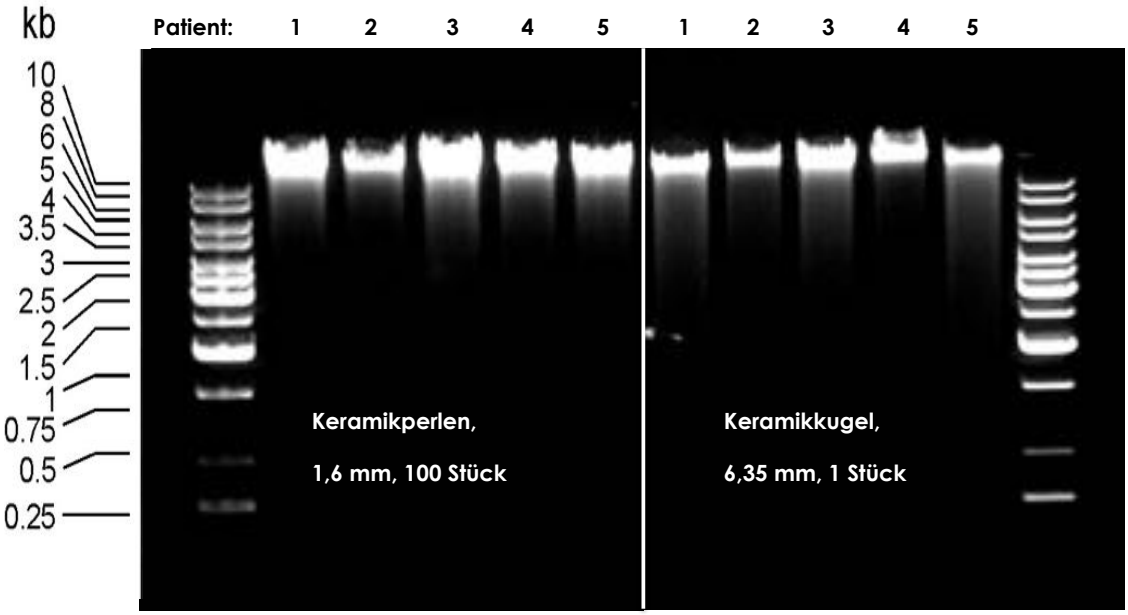


Abbildung 3-5: DNA Integrität in Abhängigkeit vom Gewebeaufschlussverfahren, Patient 1-5

Die Messung erfolgte über eine manuelle Agarose-Gelelektrophorese (1 %, 100 Volt, 60 min, je 300 ng DNA). kb: Länge der DNA in Kilobasen

Die RNA-Integrität wurde über Elektrophorese im Bioanalyzer (Fa. Agilent) ermittelt. Alle RNAs wiesen einen RIN-Wert ≥ 8 auf. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen war vernachlässigbar klein (Abb. 3-6).

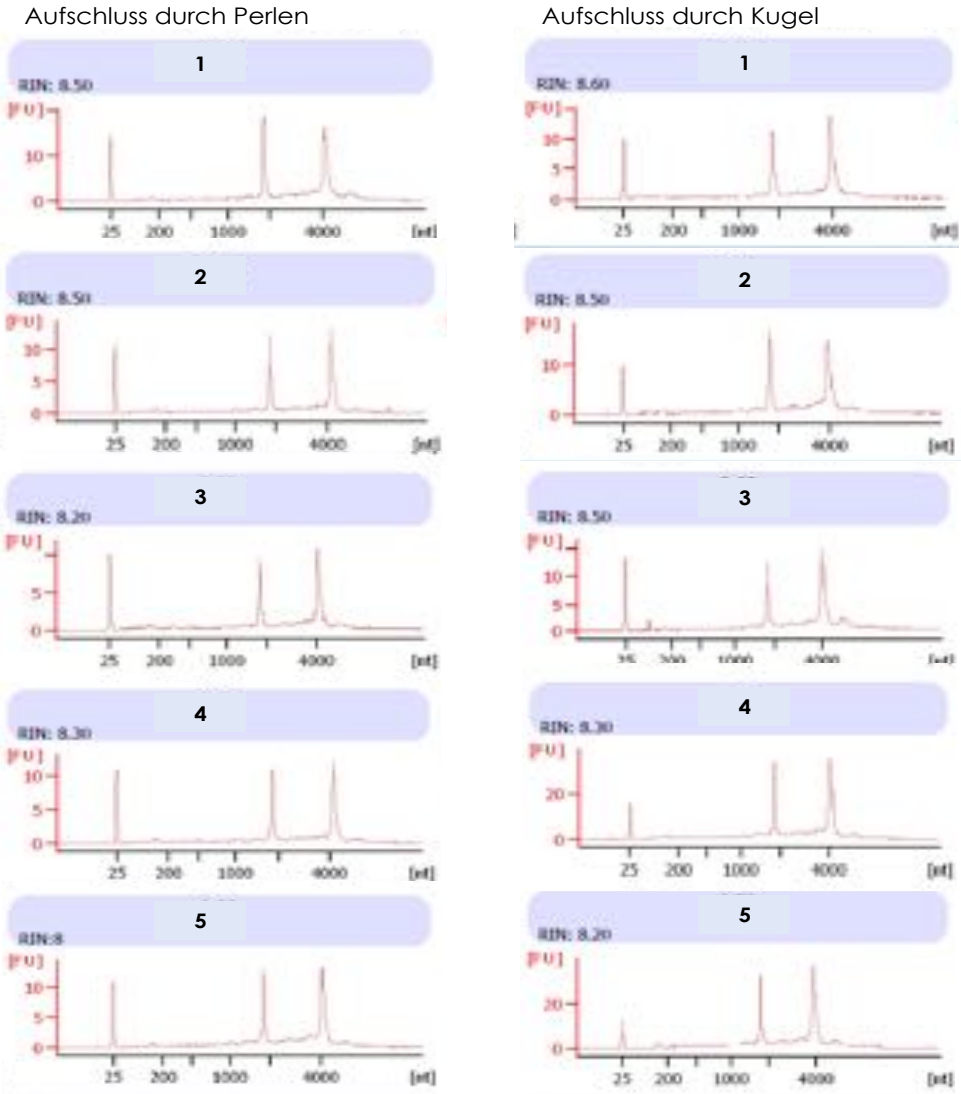


Abbildung 3-6: : RNA Integrität in Abhängigkeit vom Gewebeaufschlussverfahren, Patient 1 bis 5

Der Aufschluss des Gewebes erfolgte mit dem FastPrep Homogenisator der Firma Qbiogene (Lysismatrix-tube D, 5,5 m/s, 40 Sekunden)
Links: Aufschluss mit 100 Keramikperlen eines Durchmessers von 1,4 mm
Rechts: Aufschluss mit 1 Keramikkugel eines Durchmessers von 6,35 mm
Die Messung erfolgte durch eine Gelelektrophorese im Bioanalyzer der Firma Agilent (RNA 6000 Nano Kit) FU: Fluorescence units, nt: Nucleotides

Fazit:

Im Hinblick auf den Verlust und die Reproduzierbarkeit erwies sich der Gewebeaufschluss mittels 100 Keramikperlen eines Durchmessers von 1,4 mm gegenüber dem Aufschluss mittels Kugel und Stabhomogenisator als am günstigsten.

Validierung des Gewebaufschlusses für große Nukleinsäuremengen

Um zu prüfen, wie viel Gewebe benötigt wird, um mit dem favorisierten Verfahren genügend Nukleinsäuren isolieren zu können, wurden im nächsten Schritt Mengen an DNA und RNA isoliert, wie sie für die Sequenzierung mittels NGS für das ICGC notwendig sein würden. Mengen von 17-38 µg DNA und 12-32 µg RNA konnten durch Aufschluss von je 18-46 kryokonservierten Prostatagewebeschnitten einer Schnittdicke von 16 µm erreicht werden (Abb. 3-7).

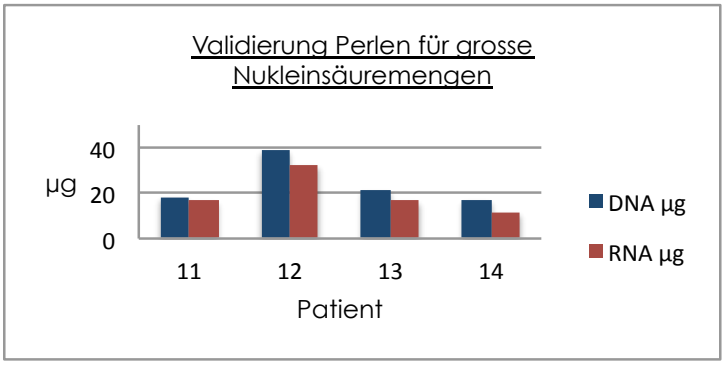


Abbildung 3-7: DNA- und RNA- Ausbeute (in µg) aus 18-46 16µm-Schnitten

Es wurde aus je 18-46 Gewebeschnitten einer Schnittdicke von 16µm extrahiert. Der Aufschluss erfolgte im FastPrep Homogenisator der Firma Qbiogene mit 100 Keramikperlen eines Durchmessers von 1,4 mm (Lysismatrixtube D, 5,5m/s, 40 sec).

Ein Gewebeschnitt einer Schnittdicke von 16 µm lieferte im Durchschnitt 0,86 µg DNA und 0,7 µg RNA. Die DNA-Integrität wurde anhand einer Elektrophorese im Bioanalyzer wie auch mittels Agarose Gelelektrophorese analysiert (Abb. 3-8 und 3-9). Beide Analysen zeigten hochgenomische DNA-Fragmente. Die Hauptbande stellte sich wieder im Bereich deutlich größer 10 Kilobasen dar, eine DNA-Spur war allerdings deutlich erkennbar. Die RNAs der Patienten zeigten RIN-Werte von 8,2 bis 9,4 (Abb. 3-10).

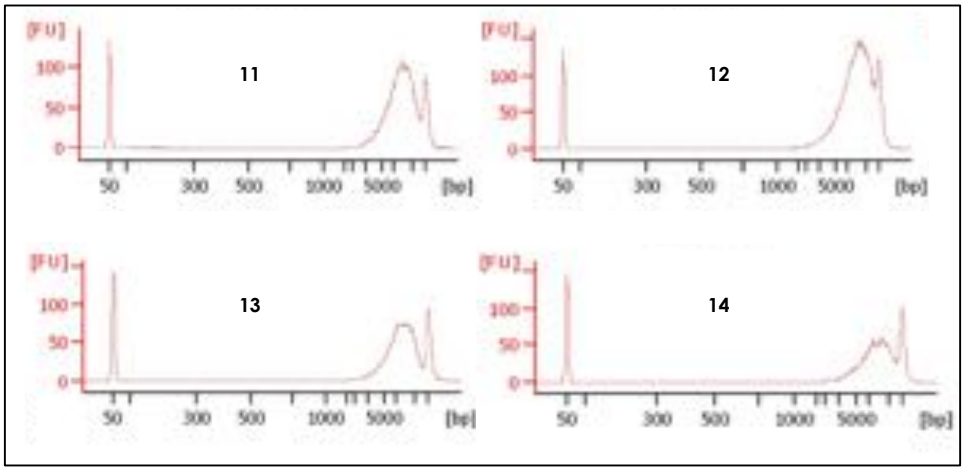


Abbildung 3-8: DNA-Integrität nach Gewebeaufschluss großer Gewebemengen mit 100 Keramikperlen (Patient 11 bis 14)

Es wurde aus je 18-46 Gewebeschnitten einer Schnittdicke von 16 µm extrahiert. Der Aufschluss erfolgte im FastPrep Homogenisator der Firma Qbiogene mit 100 Keramikperlen eines Durchmessers von 1,4 mm (Lysismatrixtube D, 5,5m/s, 40 sec). Um möglichst geringe DNA-Mengen für die Qualitätsbestimmung einzusetzen, wurde die Gelelektrophorese nicht manuell, sondern probehalber im Bioanalyzer der Firma Agilent durchgeführt (DNA 1200 Kit). FU: Fluorescence units, bp: basepairs

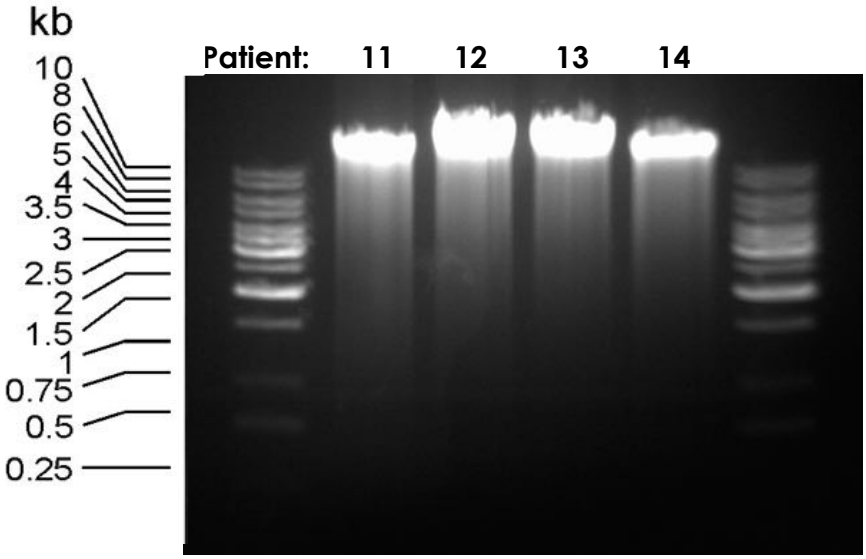


Abbildung 3-9: DNA-Integrität nach Gewebeaufschluss großer Gewebemengen mit 100 Keramikperlen

Die Messung erfolgte über eine manuelle Agarose-Gelelektrophorese (1 %, 100 Volt, 45 min, je 300 ng DNA). kb: Länge der DNA in Kilobasen.

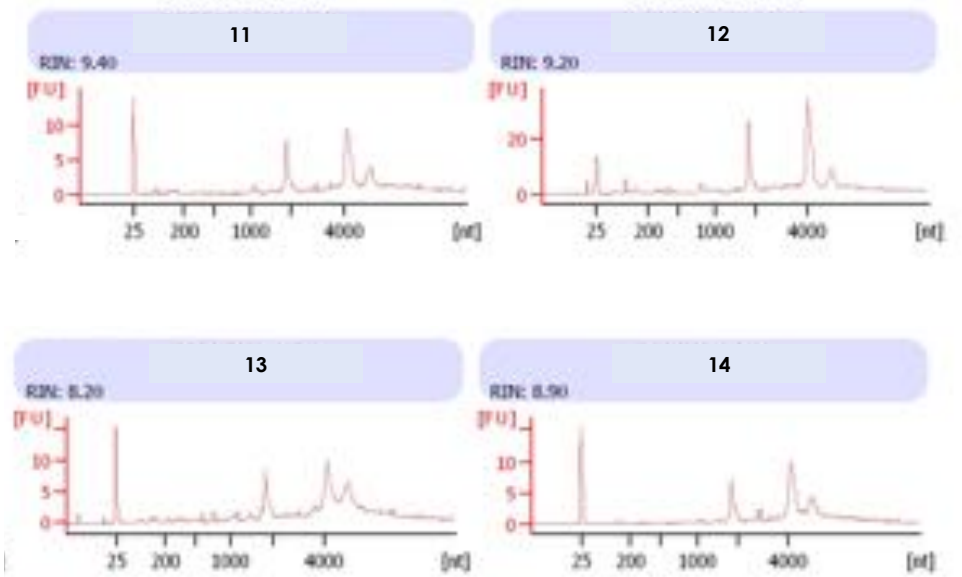


Abbildung 3-10: RNA-Integrität nach Gewebeaufschluss großer Gewebemengen mit 100 Keramikperlen (Patient 11-14)

Die Messung erfolgte durch eine Gelelektrophorese im Bioanalyzer der Firma Agilent (RNA 6000 Nano Kit). FU: Fluorescence units, nt: Nucleotides.

Fazit:

Es zeigte sich, dass sich die Ausbeuten an DNA und RNA eines Patienten nur geringfügig unterscheiden, die Ausbeuten zwischen verschiedenen Patienten jedoch deutlich variieren.

Eignung der isolierten Nukleinsäuren für das NGS

Der nächste und entscheidende Schritt in der Qualitätsanalyse der isolierten Nukleinsäuren bestand darin, deren Eignung für die verschiedenen Anwendungen des NGS, wie sie für das ICGC-Projekt vorgesehen waren, zu überprüfen. DNAs und RNAs des Tumorgewebes sowie DNA des Blutes derselben Patienten wurden hierzu an folgende Institute geschickt:

- Max Planck Institut für Molekularbiologie in Berlin (MPIMG):
  Tiefensequenzierung *(Deep Genome Sequencing)* von DNA und RNA
- Deutsches Krebsforschungszentrum in Heidelberg (DKFZ):
  Methylierungsanalysen der DNA mittels NGS
- European Molecular Biology Laboratory in Heidelberg (EMBL):
  Mate Pair Sequencing der DNA mit Insertgrößen von ≥ 5 kb zur Detektion großer genomischer Strukturvarianten.

Das Generieren der Libraries der DNA für eine Paired End Tiefensequenzierung funktionierte einwandfrei. Die RNAs erwiesen sich ebenfalls als geeignet, um eine cDNA Library zu erstellen und diese tiefensequenzieren zu können. Die Anreicherung methylierter DNA-Bereiche und die anschließende Tiefensequenzierung erfolgte problemlos. Die Erstellung der Library für das Mate Pair Sequencing gelang jedoch nur für die aus Blut isolierten DNAs. DNAs aus dem Tumorgewebe erwiesen sich hier als problematisch. Die Länge der Fragmente reichte nicht für eine hochqualitative Library aus. Es folgten daher weitere Optimierungen, um die Aufarbeitung der DNA derart anzupassen, dass auch die Analyse großer genomischer Strukturvarianten möglich sei.

Da nur die DNA-Fragmente der Tumorproben zu kurz für eine Mate-Pair-Sequenzierung waren, nicht aber die der Blutproben, wurde zunächst ein Vergleich der Qualitäten der DNAs aus Tumor und der aus dem Blut des jeweils gleichen Patienten in Form einer Agarose Gelelektrophorese angestellt. In Abb. 3-11 ist deutlich erkennbar, dass die Fragmentlängen der Blut-DNAs deutlich größer sind als die der Tumor-DNAs. Letztere wiesen außerdem deutlich stärkere DNA-Spuren im Gel auf, was auf eine generelle Fragmentierung hinweist. Diese Unterschiede waren zu erwarten, da eine Aufarbeitung des Blutes ohne jeglichen Gewebeaufschluss auskommt. Daher sollte die Qualität der Blut-DNA im Folgenden als Referenz dienen, um die Qualität der Tumor-DNAs denen des Blutes so weit wie möglich anzugleichen.

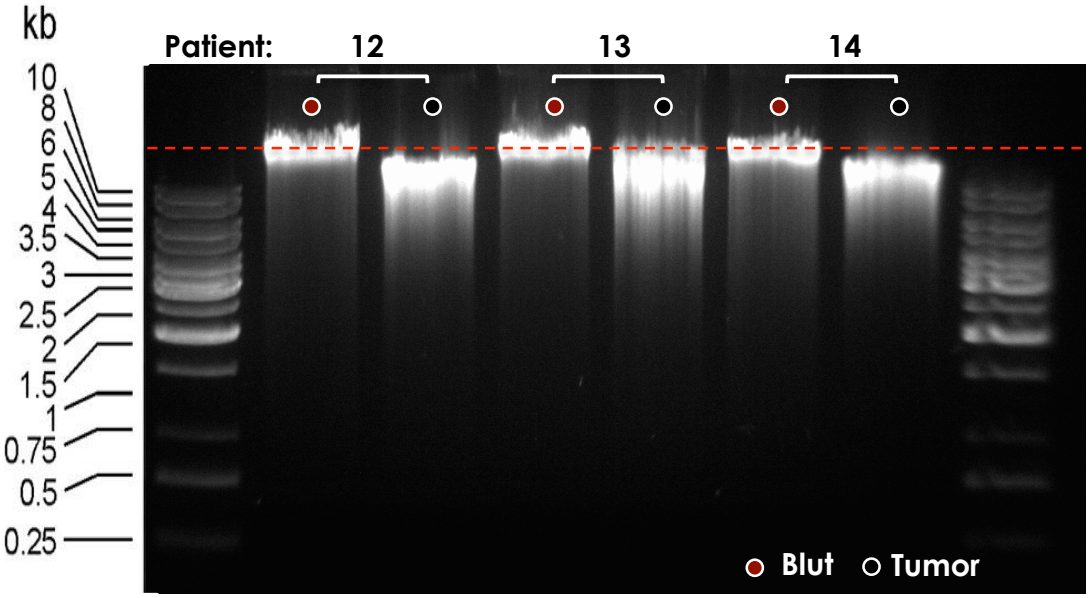


Abbildung 3-11: Integrität der DNA aus jeweils dem Blut (ohne mechanischen Aufschluss) sowie dem Tumor (Gewebeaufschluss mit 100 1,4 mm Keramikperlen) der Patienten 12 bis 14

Die Messung erfolgte über eine manuelle Agarose-Gelelektrophorese (1 %, 100 Volt, 4 min, je 200 ng DNA) kb: Länge der DNA in Kilobasen

Optimierung der DNA für genomische Strukturanalysen per Mate Pair Sequenzierung

Einfluss der Gewebeaufschlussdauer auf die Nukleinsäure-Ausbeute

Um den Einfluss der Gewebeaufschlussdauer auf die Ausbeute und Qualität der Nukleinsäuren zu untersuchen, wurden die Gewebe dreier Patienten über eine Dauer von jeweils 0, 10, 20, 30 und 40 Sekunden aufgeschlossen. Der Aufschluss erfolgte mit 100 Keramikperlen eines Durchmessers von 1,4 mm sowie einer Keramikkugel eines Durchmessers von 6,35 mm. Die in Abbildung 3-12 dargestellten DNA- und RNA-Mengen sind gemittelt. Während die Nukleinsäuremengen nach Aufschluss mit Perlen mit der Aufschlussdauer anstiegen, erwies sich der Aufschluss durch eine Kugel in Bezug auf die Ausbeute erneut als sehr unregelmäßig.

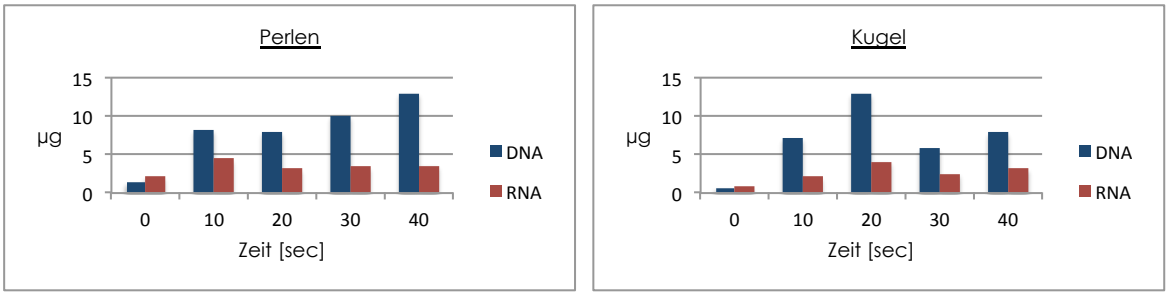


Abbildung 3-12: DNA- und RNA- Ausbeute (in µg) in Abhängigkeit von der Gewebeaufschlussdauer, Patient 15 bis 17

Es wurde aus je 5 Gewebeschnitten mit einer Schnittdicke von 16 µm extrahiert (die dargestellten Werte sind aus den Werten dreier Patienten gemittelt). Der Aufschluss erfolgte im FastPrep Homogenisator der Firma Qbiogene mit 100 1, 4 mm-Keramikperlen (Lysismatrixtube D) bzw. einer 6,35 mm Keramikkugel (Lysismatrixtube A) bei einer Geschwindigkeit von 5,5 m/s. sec: Sekunden

In Abbildung 3-13 sind die DNA-Banden der über unterschiedliche Zeiten aufgeschlossenen Gewebe dargestellt. Die mit Keramikperlen aufgeschlossenen Gewebe (links) zeigen einen geringeren Abfall der Fragmentlänge über die Zeit als die mit einer Keramikkugel aufgeschlossenen (rechts). Bei der in der Mitte dargestellten Positivkontrolle handelte es sich um die DNA eines Blutes, dessen Sequenzierung mittels NGS erfolgreich war. Die DNA-Spuren beider Gruppen stellten sich ab einer Zeit von 10 Sekunden deutlich stärker dar, als die der Positivkontrolle. Außerdem erreichten nur die Proben ohne Aufschluss (0 sec.) die Fragmentlänge der Blutprobe.

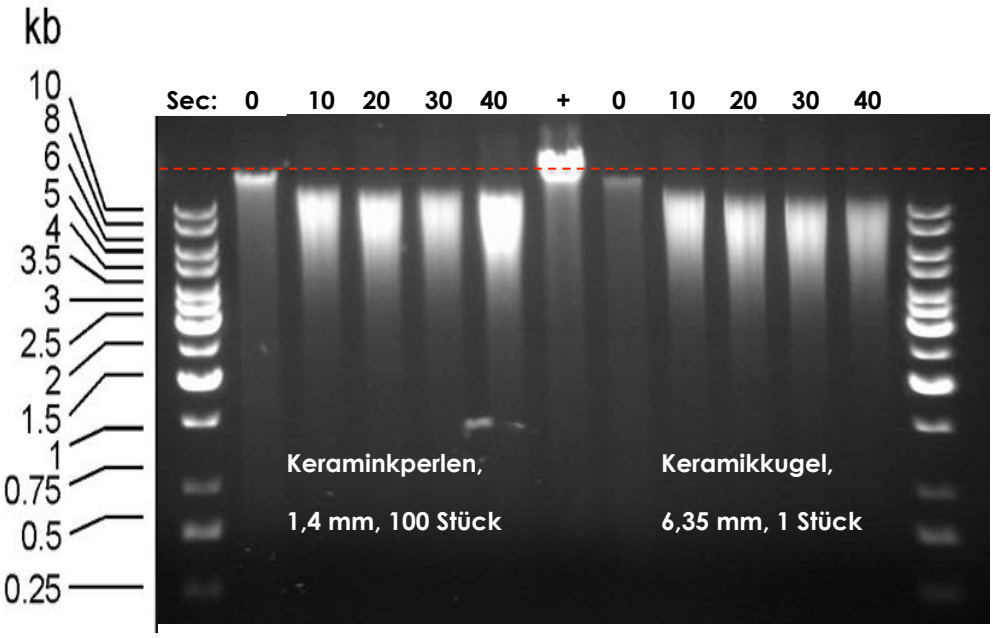


Abbildung 3-13: DNA-Integrität in Abhängigkeit von der Gewebeaufschlussdauer in Sekunden

Es wurde aus je 5 Gewebeschnitten einer Schnittdicke von 16 µm dreier verschiedener Patienten extrahiert. Als Positivkontrolle (+) diente DNA einer Blutprobe, deren Aufarbeitung ohne mechanischen Aufschluss erfolgte.

Links: Gewebeaufschluss mit 100 Keramikperlen eines Durchmessers von 1,4 mm im FastPrep Homogenisator der Firma Qbiogene (Lysismatrixtube D, 5,5 m/s)

Rechts: Gewebeaufschluss mit 1 Keramikkugel eines Durchmessers von 6,35 mm im FastPrep Homogenisator der Firma Qbiogene (Lysismatrixtube A, 5,5 m/s)

Die Messung erfolgte über eine manuelle Agarose-Gelelektrophorese (1 %, 100 Volt, 45 min, je 200 ng DNA). kb: Länge der DNA in Kliobasen

Einfluss der Gewebeaufschlussgeschwindigkeit und der Perlenmenge auf die Nukleinsäure-Ausbeute und -Qualität

Ein weiterer Ansatz, um die Scherkräfte während des Gewebeaufschlusses zu minimieren bestand darin, die Menge der Keramikperlen zu reduzieren. Es wurden hierzu Gewebe der gleichen drei Patienten wie zuvor aufgeschlossen und DNA wie auch RNA isoliert. Der Aufschluss erfolgte jeweils mit 100 sowie mit 25 Keramikperlen für 20 Sekunden bei einer Geschwindigkeit von je 0, 4, 5, 4,5, 5, und 5,5 m/s. Die Durchschnittswerte der Ausbeuten von DNA beider Gruppen lagen mit 7,1 und 7,8 µg relativ nahe beieinander. Die der RNA betrugen 3,0 µg in der Gruppe der mit 100 Perlen aufgeschlossenen Gewebe gegenüber 2,4 µg derer mit 25 Perlen (Abb. 3-14).

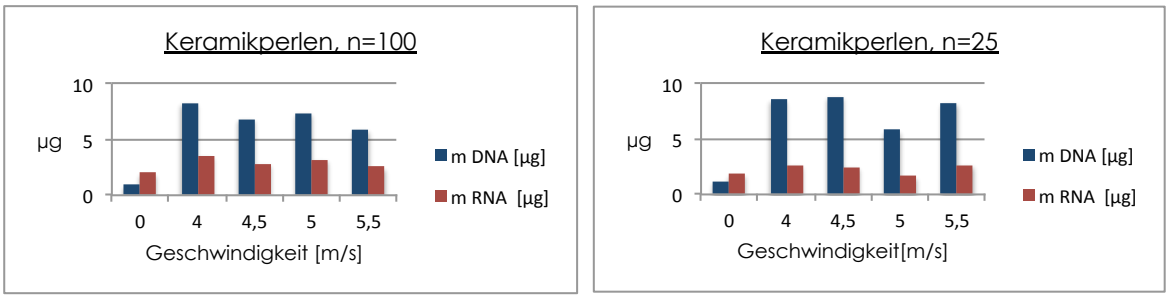


Abbildung 3-14: DNA- und RNA-Ausbeute (in µg) in Abhängigkeit von der zum Gewebeaufschluss verwendeten Perlenanzahl und der Aufschlussgeschwindigkeit in m/s, Patient 15 bis 17

Es wurde aus je 5 Gewebeschnitten mit einer Schnittdicke von 16 µm dreier Patienten extrahiert (die dargestellten Werte sind gemittelt). Der Aufschluss erfolgte im FastPrep Homogenisator der Firma Qbiogene mit 100 bzw. 25 1,4 mm-Keramikperlen (Lysismatrixtube D) bei einer Geschwindigkeit von 0 bis 5,5 m/s.

Die Qualitätsanalyse mittels Agarose Gelelektrophorese zeigte diesmal einen deutlichen Unterschied der Fragmentlängen der DNAs beider Gruppen. Die Länge der DNAs nach Aufschluss mit 100 Keramikperlen fielen bereits nach einer Aufschlussgeschwindigkeit von 4 m/s unter die der Positivkontrolle und verringerten sich weiter mit steigender Geschwindigkeit. Nach Aufschluss mit nur 25 Perlen konnten jedoch DNA-Längen erreicht werden, die knapp denen der Positivkontrolle entsprachen (Abb. 3-15).

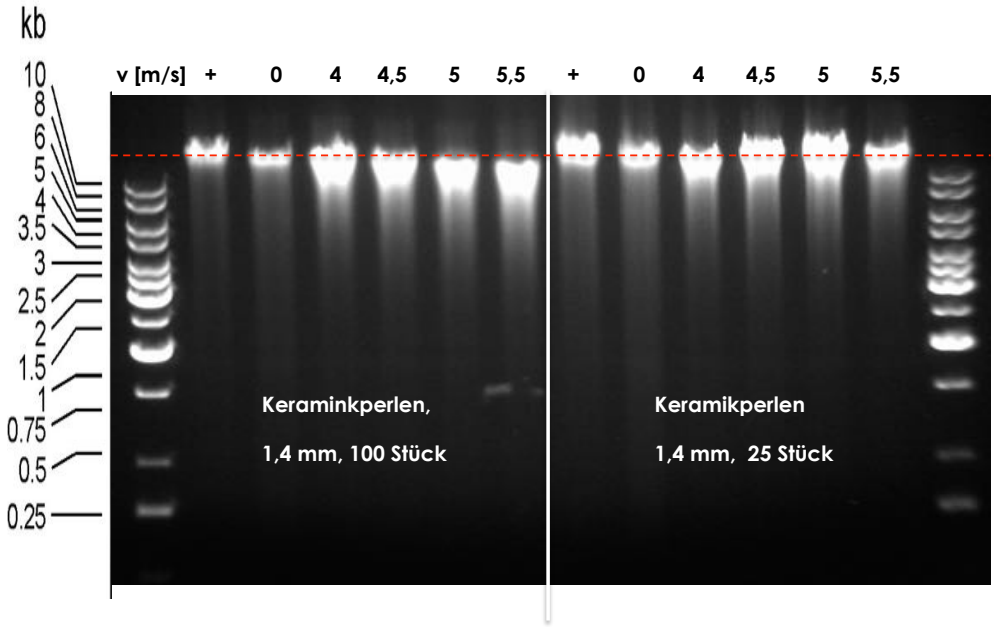


Abbildung 3-15: DNA- Integrität in Abhängigkeit der zum Gewebeaufschluss verwendeten Perlenanzahl und der Aufschlussgeschwindigkeit in m/s, Patient 15 bis 17

Die Messung erfolgte über eine manuelle Agarose-Gelelektrophorese (1 %, 100 Volt, 45 min, je 200 ng DNA). kb: Länge der DNA in Kilobasen

Zu Validierungszwecken der favorisierten Methode eines Gewebeaufschlusses mit 25 Keramikperlen, sollte die Gesamtprobenanzahl der auf diese Weise behandelten Gewebe erhöht werden. Hierzu wurden drei neue Patientengewebe im Doppelansatz bei einer Geschwindigkeit von 4 m/s während einer Dauer von 20 Sekunden aufgeschlossen. Je drei Gewebeschnitte einer Schnittdicke von 16 µm ergaben im Durschnitt 5,4 µg DNA und 3,9 µg RNA (Abb. 3-16).

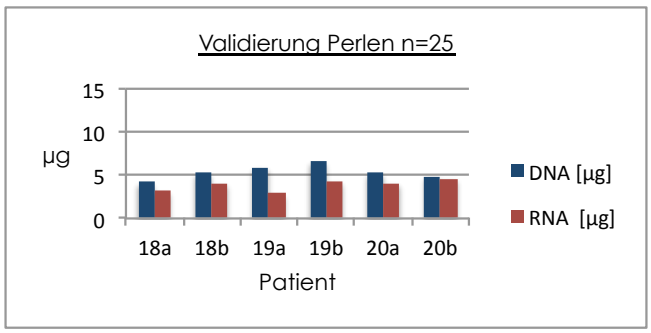


Abbildung 3-16: DNA- und RNA-Ausbeute (in µg) nach Gewebeaufschluss durch 25 1,4 mm Keramikperlen, Patient 18 bis19 im Doppelansatz

Es wurde aus je 3 Gewebeschnitten einer Schnittdicke von 16 µm extrahiert. Der Aufschluss erfolgte im FastPrep Homogenisator der Firma Qbiogene mit 25 Keramikperlen eines Durchmessers von 1,4 mm (Lysismatrixtube D, 4 m/s, 20 sec).

Eine Agarose Gelelektrophorese der drei Proben im Doppelansatz ließ erkennen, dass die Fragmentlängen der mit 25 Keramikperlen aufgeschlossenen Gewebe dem unteren Bereich der Hauptbande der Positivkontrolle entsprachen (Abb. 3-17).

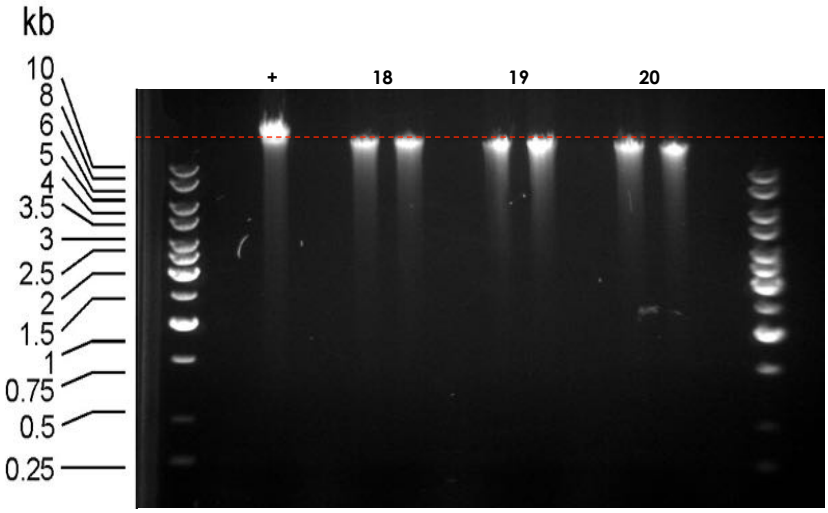


Abbildung 3-17: DNA Integrität nach Gewebeaufschluss mit 25 1,4 mm Keramikperlen, Patient 18 bis 20 im Doppelansatz

Die Messung erfolgte über eine manuelle Agarose-Gelelektrophorese (1 %, 100 Volt, 45 min, je 200 ng DNA). kb: Länge der DNA in Kilobasen

Die Validierung des Gewebeaufschlusses mittels 25 Keramikperlen bei einer Geschwindigkeit von 4 m/s während einer Dauer von 20 Sekunden für große Mengen an Nukleinsäuren erfolgte aus 18 bis 25 Gewebeschnitten vierer weiterer Patienten. Die durchschnittliche DNA Menge betrug 16,2 µg, die der RNA 1,9 µg (Abb. 3-18).

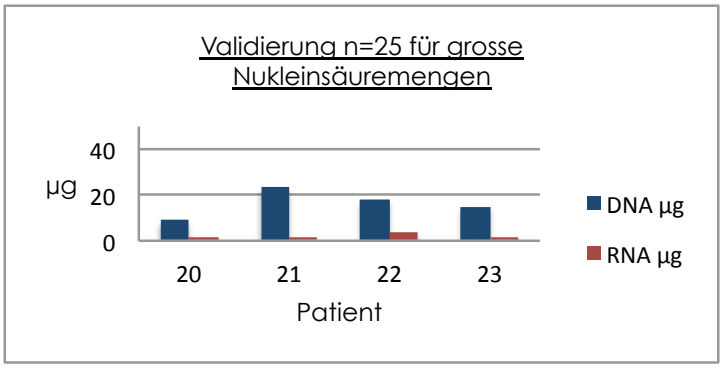


Abbildung 3-18: DNA- und RNA- Ausbeute (in µg) aus 18-25 16 µm-Schnitten nach Gewebeaufschluss mit 25 1,4 mm Keramikperlen

Der Aufschluss erfolgte im FastPrep Homogenisator der Firma Qbiogene mit 25 Keramikperlen eines Durchmessers von 1,4 mm (Lysismatrixtube D, 4 m/s, 20 sec).

Abbildung 3-19 zeigt den direkten Vergleich der DNA-Fragmentierung nach beiden Extraktionsmethoden, die im Folgenden „Starke Lyse“ (100 Keramikperlen, 5,5 m/s, 40 Sekunden) und „Sanfte Lyse“ (25 Keramikperlen, 4 m/s, 20 Sekunden) genannt werden. Es sind jeweils die DNAs eines Patienten nebeneinander dargestellt, links mit sanfter und rechts mit starker Lyse aufgeschlossen. Der Verlust der Fragmentlänge durch die starke Lyse ist deutlich erkennbar. Ein gründlicher Gewebeaufschluss ist für eine ausreichende Ausbeute an Nukleinsäuren notwendig, kann aber nur durch DNA-zerstörende Aufschlussverfahren erzielt werden. Die Ausbeuten bei einer sanften Lyse sind daher entscheidend geringer ausgefallen, als bei der starken Lyse. Es wurde deshalb erstere nur noch für denjenigen Teil der DNA angewendet, der für die genomischen Strukturanalysen per Mate Pair Sequenzierung benötigt wurde. Daher wurden die Proben jedes Patienten in verschiedene Fraktionen aufgeteilt und eine DNA-RNA-Parallelextraktion der ersten Fraktion mit sanfter Lyse durchgeführt. Wurde auf diese Weise genug hochgenomische DNA erhalten, um ein NGS per Mate Pairs (Analyse von genomischen Rearrangements) durchzuführen, wurden die folgenden Fraktionen mittels starker Lyse aufgearbeitet. Reichte die Ausbeute der ersten Fraktion nicht für eine Mate-Pair-Analyse aus, so wurden so viele folgende Fraktionen mit sanfter Lyse aufgearbeitet, bis die entsprechenden Mengen erlangt waren und auf die starke Lyse gewechselt werden konnte.

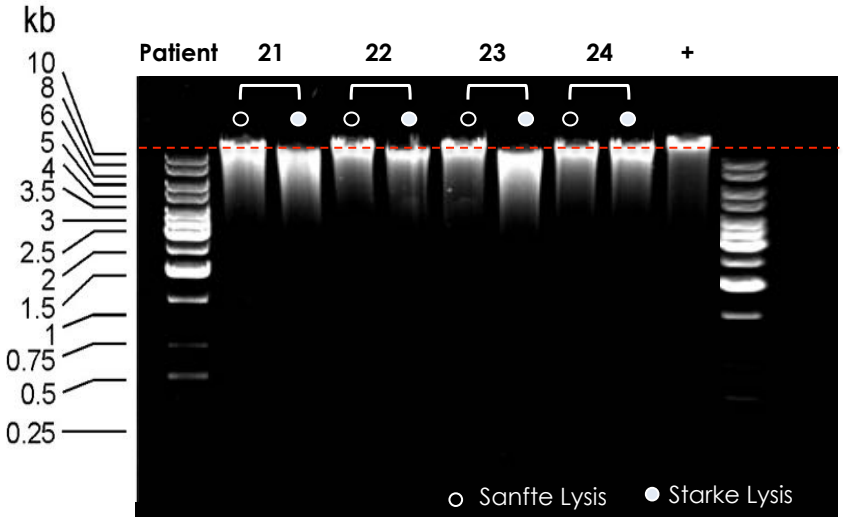


Abbildung 3-19: DNA-Integrität nach Gewebeaufschluss mit jeweils sanfter und starker Lysis

Die Messung erfolgte über eine manuelle Agarose-Gelelektrophorese (1 %, 100 Volt, 45 min, je 200 ng DNA). kb: Länge der DNA in Kilobasen

3.1.2 Eignung des etablierten Probenaufbereitungsverfahrens für die Mate-Pair-Sequenzierung

Mit dem oben beschriebenen Verfahren konnte die DNA von elf Prostatakarzinompatienten erfolgreich mittels der Mate-Pair-Sequenzierung auf strukturelle Veränderungen hin untersucht werden. Hierbei wurden 20 – 90 strukturelle Veränderungen (im Durchschnitt 45) pro Karzinomgenom detektiert, davon im Durchschnitt 23 Kopiezahlveränderungen und durchschnittlich 22 balancierte Translokationen (75).

Die auf diese Weise ermittelten Deletionsbereiche wurden mit den Daten von Arbeitsgruppen verglichen, die Prostatakarzinome mittels aCGH untersucht haben (84-86,98). Die in den anderen Studien rekurrent deletierten Bereiche konnten zum größten Teil in den per NGS analysierten PCA bestätigt werden. Abweichungen gab es bei den Regionen 3p13, 5q21, 17p13 und 21q22. Eine geringe Abweichung ergab sich für den Bereich 6q (Tab. 11).

Tabelle 11: Darstellung der Deletionsraten aller Chromosomenbereiche in den elf per NGS analysierten ICGC-Patienten

Chromosom	Bereich	Deletionsrate ICGC-Patienten	Deletionsrate Literatur (aCGH) [%]	Referenz	Abweichungen von der Literatur
1	p	9	–	–	–
2	**q**	**9**	**12 - 30**	**Sun / Taylor**	**(✔)**
3	p13	27	15-21	Krohn / Taylor	⇧
4		0	–	–	–
5		0	13 - 26	Sun / Taylor / Krohn	⇩
6	**q14 - q18**	**18**	**21 - 42**	**Lapointe / Sun / Taylor / Krohn**	**(✔)**
7	p13 - p11	9	–	–	–
8	**p21**	**36**	**26 -78**	**Lapointe / Sun / Taylor / Krohn**	**✔**
9		9	–	–	–
10	**q11 - q24**	**18**	**12 - 34**	**Lapointe / Sun / Taylor / Krohn**	**✔**
11		9	–	–	–
12	**p13 - p11**	**18**	**15 - 61**	**Lapointe / Taylor / Krohn**	**✔**
13	**q13 - q32**	**36**	**17 -52**	**Lapointe / Sun / Taylor / Krohn**	**✔**
14		0	–	–	–
15		0	–	–	–
16	**q23 - q24**	**27**	**18 - 37**	**Sun / Taylor / Krohn**	**✔**
17	p13	18	26	Taylor	⇩
18	p11 - q23	9	–	–	–
19		9	–	–	–
20		9	–	–	–
21	q22	72	20 (50)	Krohn (Tomlins*)	⇧
22		9	–	–	–
X		0	–	–	–
Y	q11 - q12	9	–	–	–

Eine bioinformatische Reanalyse und Visualisierung unserer Deletions-Daten mit den Daten sätzen zwei der oben erwähnten aCGH-Studien ist in den Abbildungen 3-20 bis 3-24 dargestellt. Hierzu wurden die Rohdaten der 218 mittels aCGH untersuchten PCA von Taylor et al. und zum anderen Daten der 72 innerhalb der eigenen Arbeitsgruppe untersuchten PCA genutzt (84, 98).

Abbildung 3-20: Vergleich der durch Mate-Pair -equenzierung erhaltenen Deletionsdaten von elf PCA im Vergleich zu aCGH-Ergebnissen anderer Kohorten

1: Taylor et al 2013 (84)
2: Krohn (98)
3: NGS-Datenset der ersten elf ICGC-Patienten

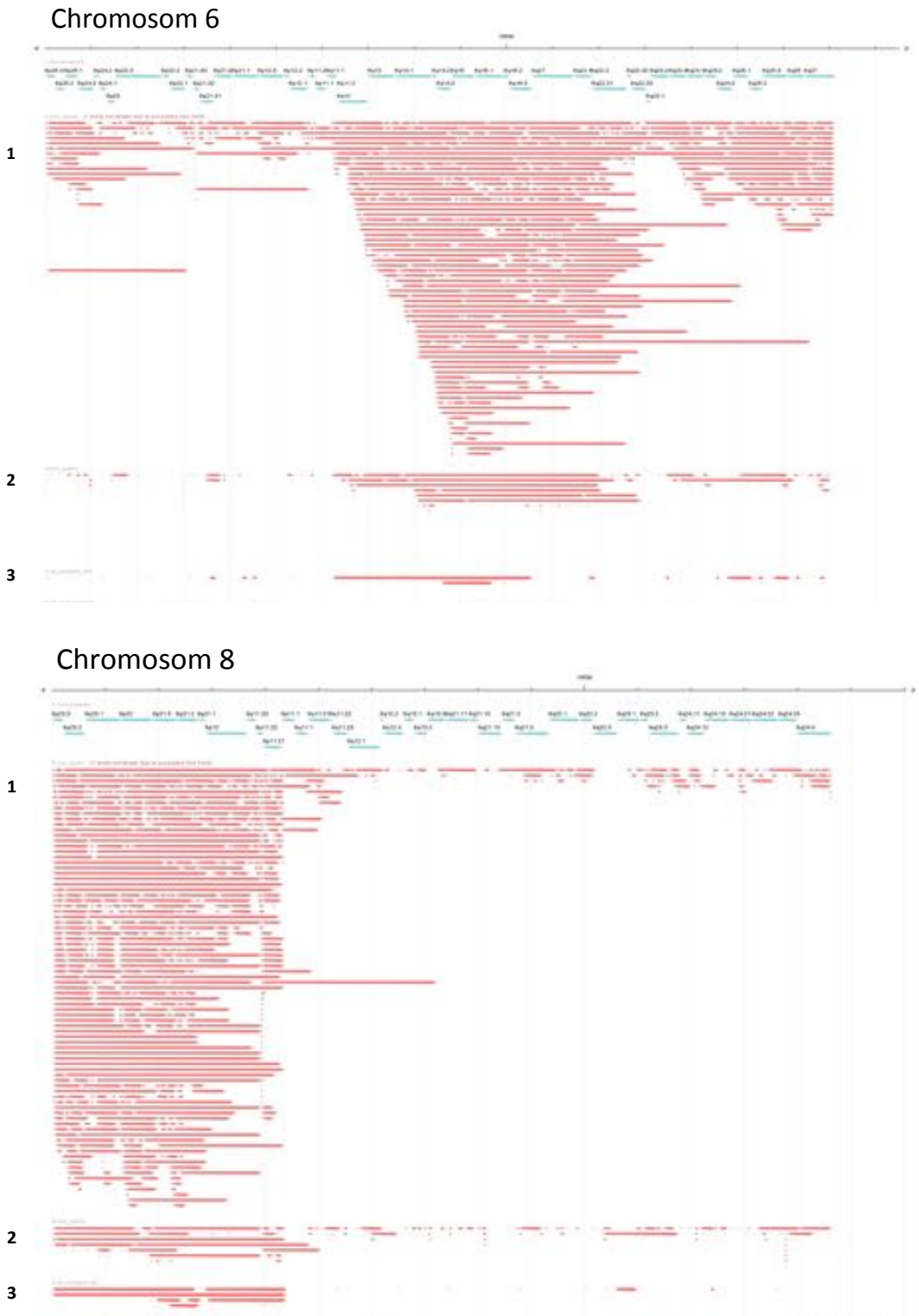


Abbildung 3-21: Vergleich der durch Mate-Pair-Sequenzierung erhaltenen Deletionsdaten von elf PCA im Vergleich zu aCGH-Ergebnissen anderer Kohorten (Fortsetzung)

1: Taylor et al 2013 (84)
2: Krohn (98)
3: NGS-Datenset der ersten elf ICGC-Patienten

Chromosom 12

Chromosom 13

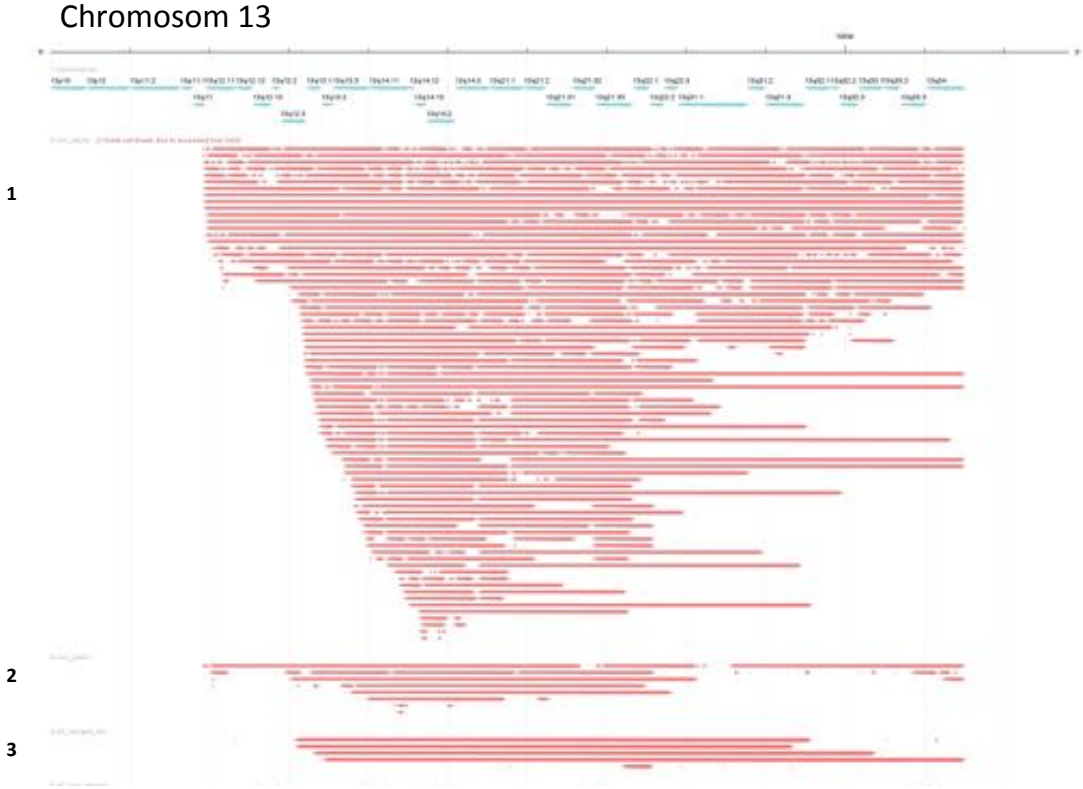


Abbildung 3-22: Vergleich der durch Mate-Pair-Sequenzierung erhaltenen Deletionsdaten von elf PCA im Vergleich zu aCGH-Ergebnissen anderer Kohorten (Fortsetzung)

1: Taylor et al 2013 (84) *3: NGS-Datenset der ersten elf ICGC-Patienten*

2: Krohn (98)

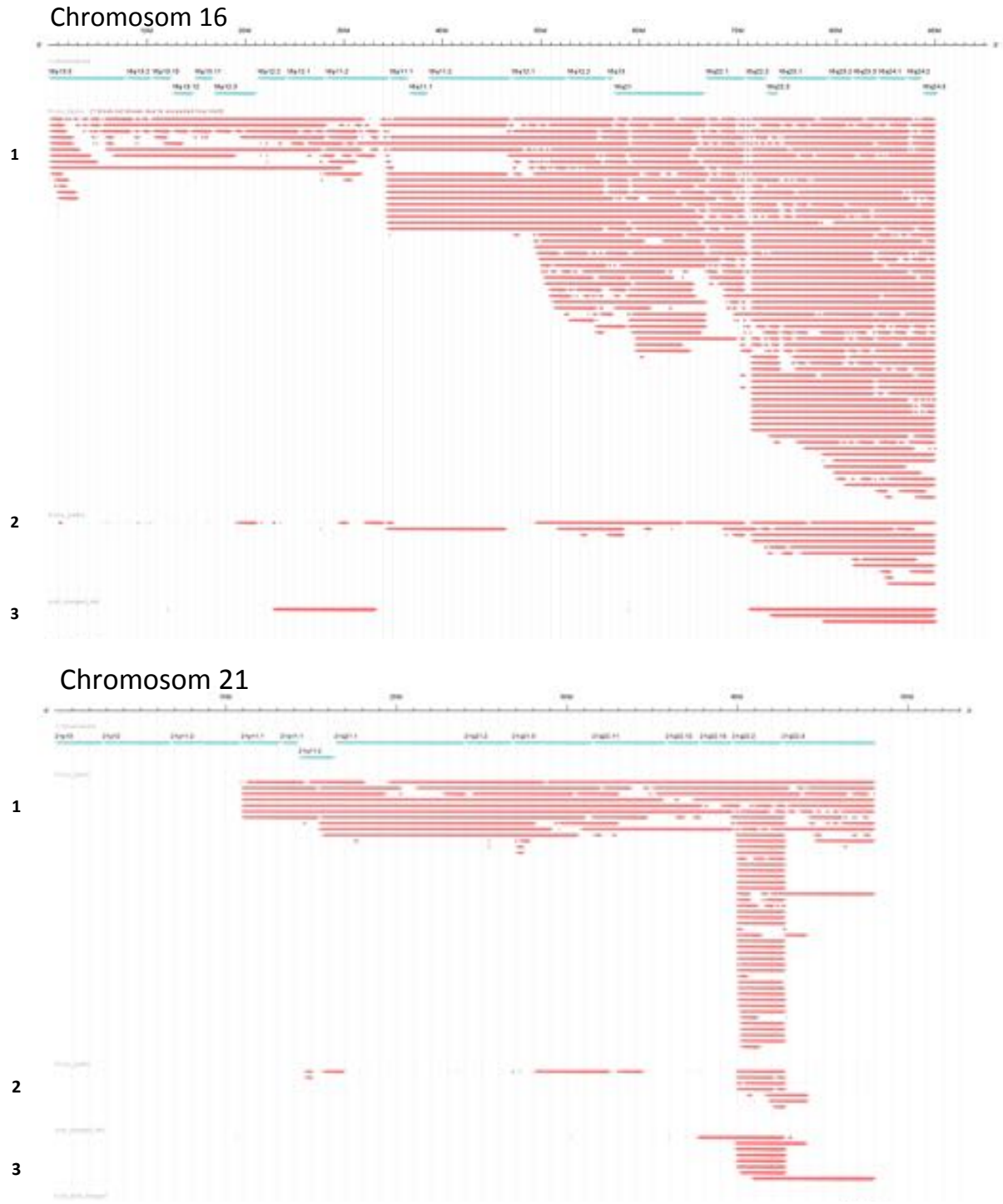


Abbildung 3-23: Vergleich der durch Mate-Pair-Sequenzierung erhaltenen Deletionsdaten von elf PCA im Vergleich zu aCGH-Ergebnissen anderer Kohorten (Fortsetzung)

1: Taylor et al 2013 (84) *3: NGS-Datenset der ersten elf ICGC-Patienten*

2: Krohn (98)

Abbildung 3-24: Vergleich der durch Mate-Pair-Sequenzierung erhaltenen Deletionsdaten von elf PCA im Vergleich zu aCGH-Ergebnissen anderer Kohorten (Fortsetzung)

1: Taylor et al 2013 (84) *3: NGS-Datenset der ersten elf ICGC-Patienten*
2: Krohn (98)

Eine umfassende Darstellung aller genetischen und strukturellen Veränderungen, die insgesamt in den ersten elf PCA-Genomen per NGS ermittelt werden konnten, ist in Abbildung 3-26 bis 3-28 in Form sogenannter Circos Plots dargestellt. Eine beispielhafte Darstellung eines Circos Plots ist in Abb. 3-25 dargestellt. Der äußere Kreis stellt die Chromosomen dar, mit den darunter liegenden Cytobanden. Der zweite Ring stellt veränderte Gene dar, die farblich unterteilt sind in *rot:* Gene, die nach einer Studie von Futreal et al. als Krebsgene bezeichnet werden (CancerCensus Genes, (127), *lila:* Gene, die nicht-synonyme Mutationen enthalten, *orange:* Gene, die durch Deletionen zerstört wurden, *hellblau:* Gene, die durch Insertionen zerstört wurden, *hellgrün:* Gene, die infolge von Translokationen zerstört wurden. Der von außen nach innen gezählt dritte Ring stellt Regionen veränderter Methylierungsmuster dar (Differenciated methylated regions, DRMs). Hierbei sind hypermethylierte Bereiche in grün und hypomethylierte Bereiche in rot dargestellt. Der vierte Ring stellt Kopiezahlveränderungen anhand von Read-Depth-Plots dar, welche ähnlich der aCGH-Plots Kopizahlveränderungen entlang eines Chromosoms auf einer x-Achse darstellen. Hierbei kann man sich das Chromosom in liegender Position entlang der x-Achse vorstellen. Erhöhte Kopiezahlen werden durch einen Ausschlag in positiver und verringerte Kopiezahlen als Ausschlag in negativer y-Richtung dargestellt. Der innere Kern des Circos-Plots Kreises zeigt die Translokationen (grün), Deletionen (orange), Inversionen (hellblau) und Duplikationen (grau) auf. Hierbei verbinden die Linien jeweils die Bruchpunkte, die z.B. bei den Translokationen häufig auf verschiedenen Chromosomen liegen.

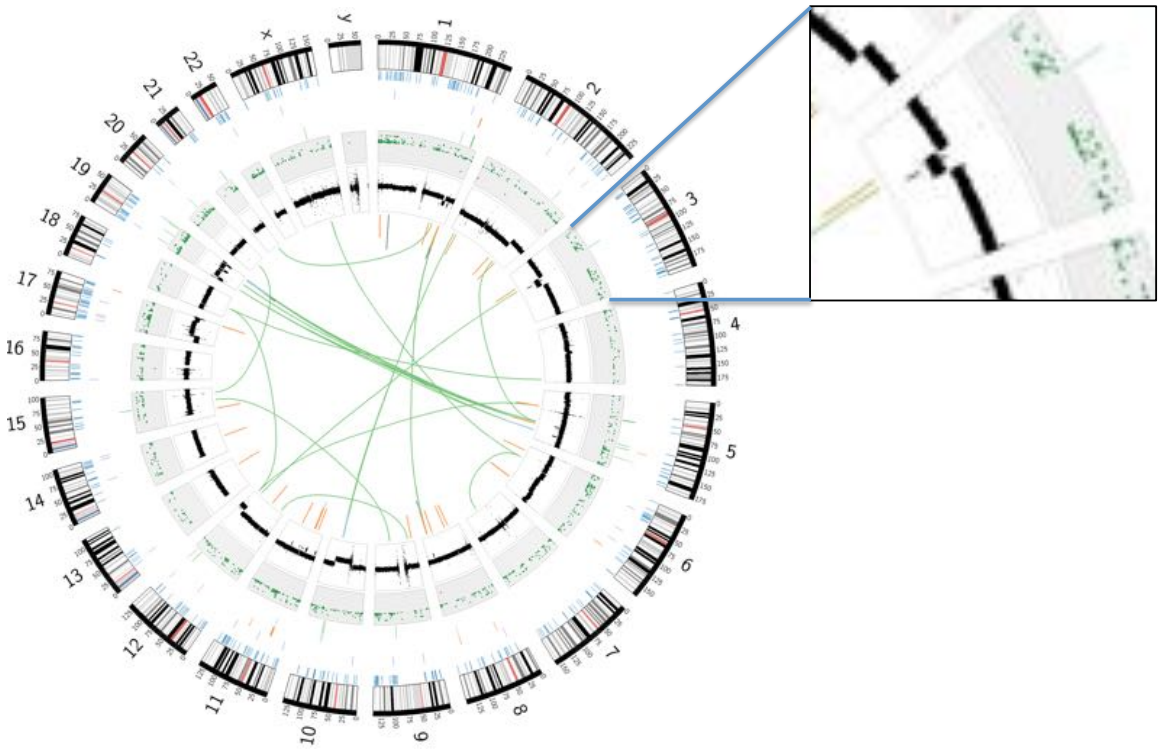
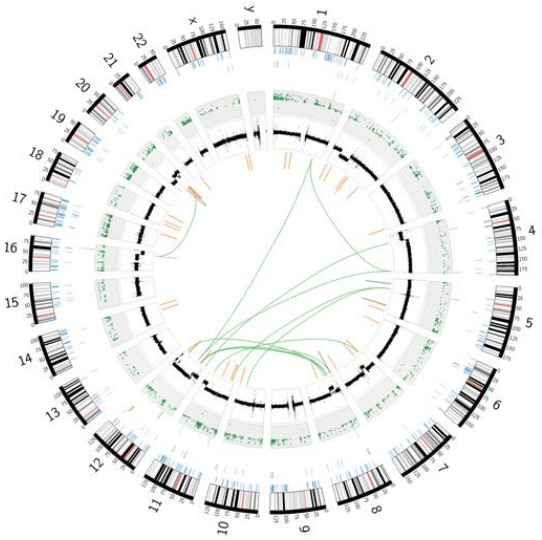
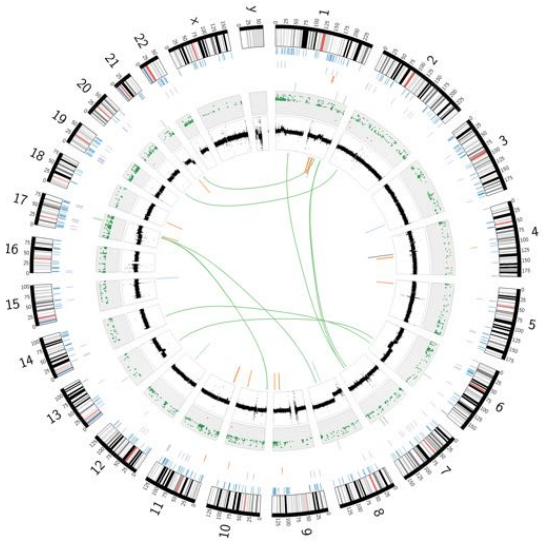


Abbildung 3-25: Darstellung eines Circos Plots

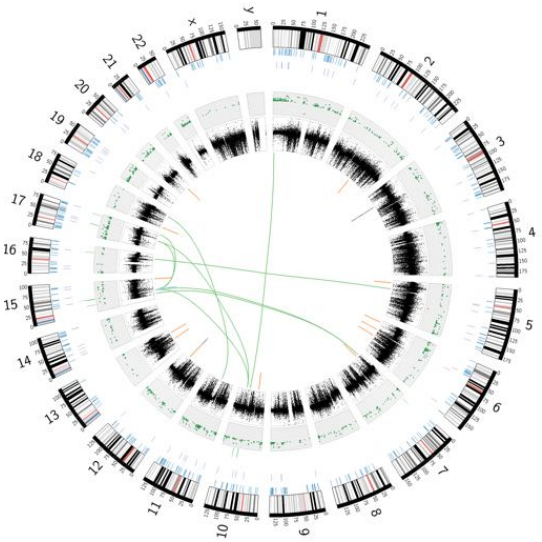
ICGC PCA1



ICGC PCA2



ICGC PCA3



ICGC PCA4

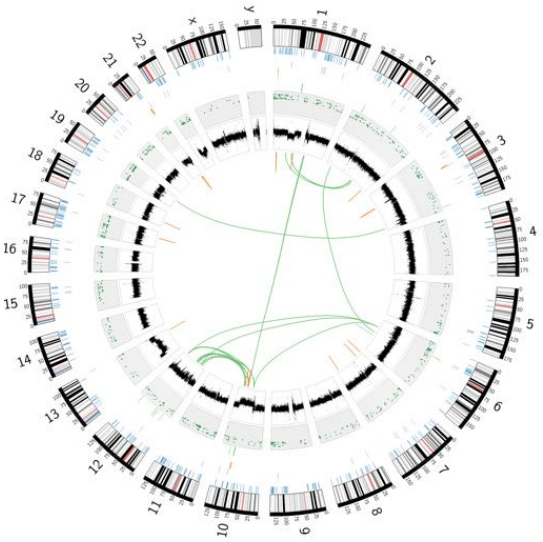
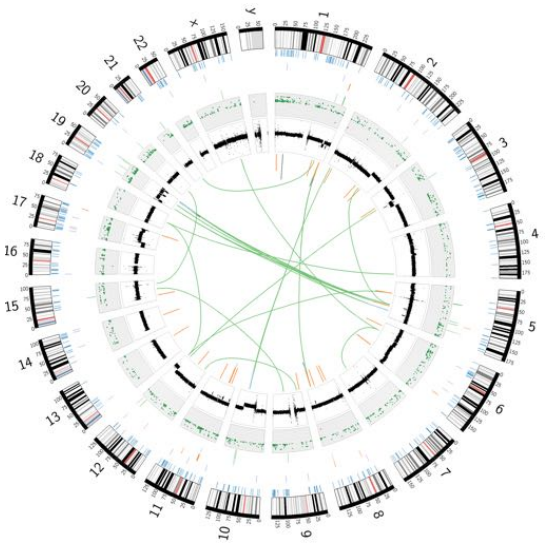
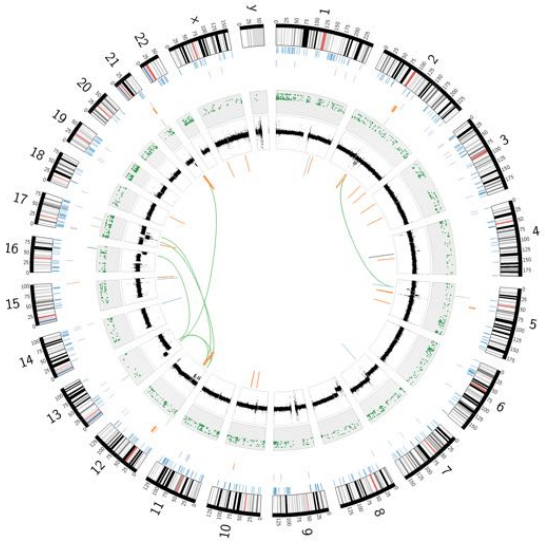


Abbildung 3-26: Darstellung der Circos Plots der elf per NGS analysierten ICGC-Patienten

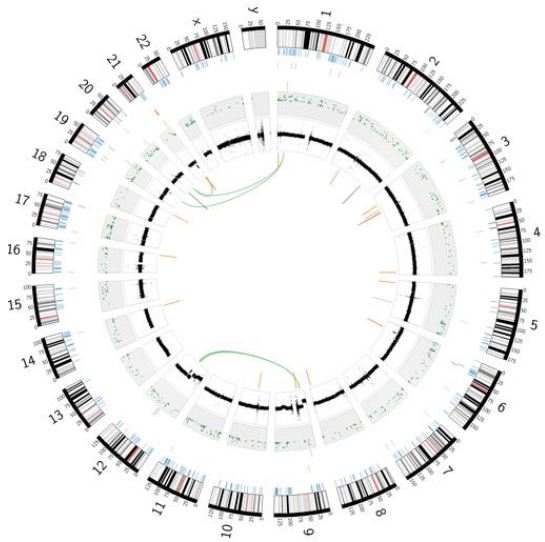
ICGC PCA5



ICGC PCA6



ICGC PCA7



ICGC PCA8

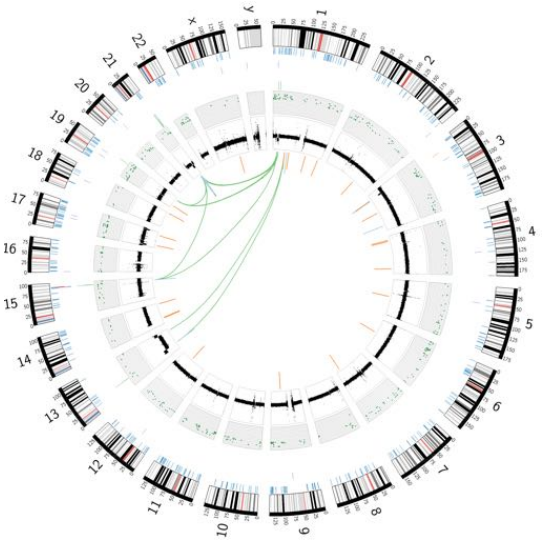
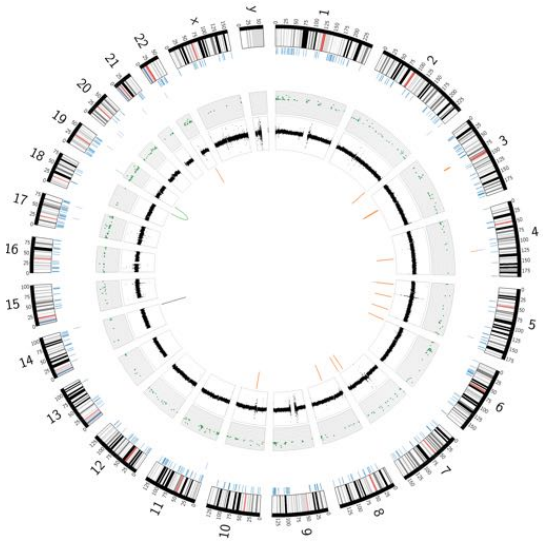
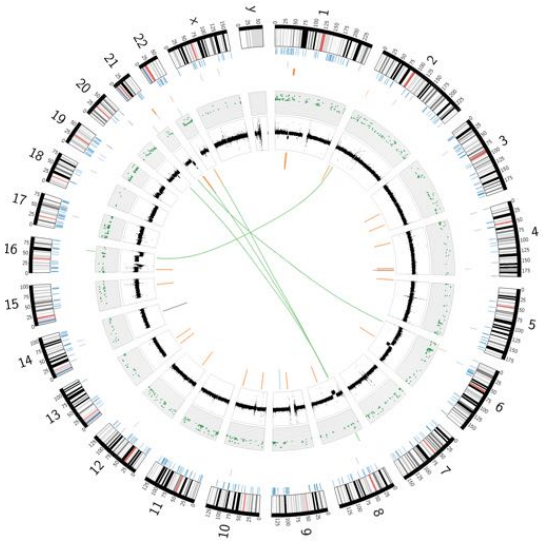


Abbildung 3-27: Darstellung der Circos Plots der elf per NGS analysierten ICGC-Patienten, Fortsetzung

ICGC PCA9



ICGC PCA10



ICGC PCA11

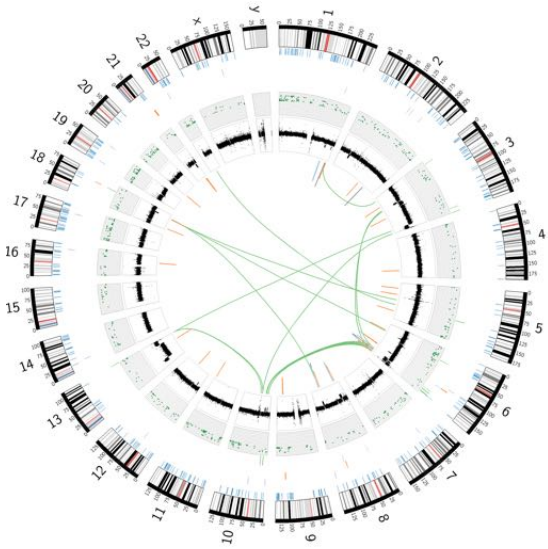


Abbildung 3-28: Darstellung der Circos Plots der elf per NGS analysierten ICGC-Patienten, Fortsetzung

Ein Beispiel für eine komplexe strukturelle Alteration innerhalb des untersuchten Patientenkollektivs ist in Abb 3-29 dargestellt. Es handelt sich hierbei um eine reziproke Translokation mit Inversion zwischen den Chromosomen 2 und 10. Hierbei kommt es zu einem Bruch im PTEN-Gen, wodurch ein Teil des PTEN sich löst und invers wieder in der ursprünglichen Position eingebaut wird. Zusätzlich transloziert ein weiterer Abschnitt des Gens auf Chromosom 2 und ein Teil des Chromosoms zwei wird an PTEN angelagert.

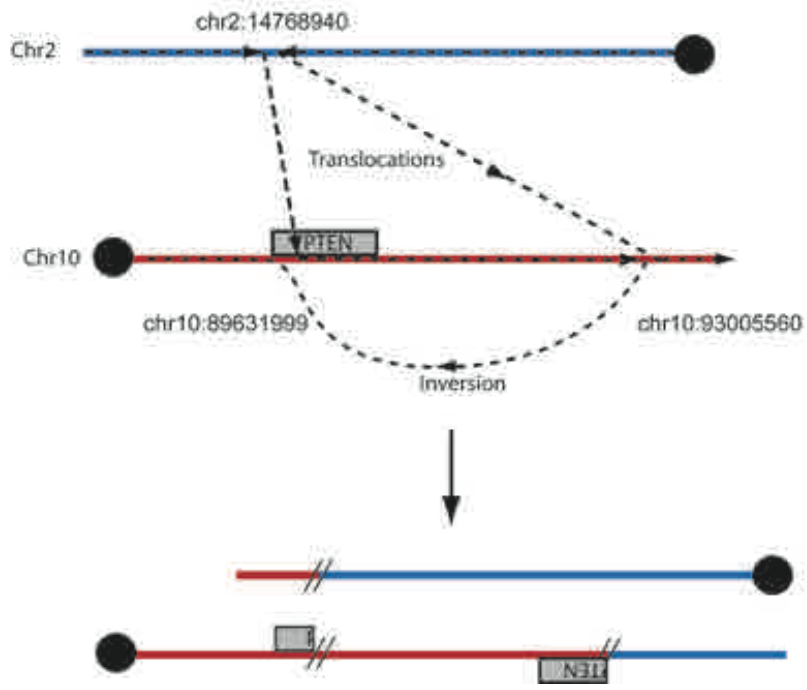


Abbildung 3-29: Schematische Darstellung einer der Varianten innerhalb der per NGS analysierten Patienten (75).

3.2 Untersuchung der molekularen Epidemiologie von 5q21-Deletionen an einem repräsentativen Set von Prostatakarzinomen

3.2.1 5q21 Deletionen in klinischen Prostatakarzinomen

In diesem Teil der vorliegenden Untersuchungen sollten zunächst statistisch aussagekräftige Daten zur Häufigkeit der 5q21-Deletionen beim PCA ermittelt werden. Hierzu wurden 12.427 PCA mittels Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierungen (FISH) mit einer selbst hergestellten Sonde gegen das, im Zentrum der minimal deletierten Region liegenden, *CHD1* durchgeführt. Als Referenz diente eine kommerzielle Zentromer-10-Sonde, da eine Zentromer-5-Sonde nicht erhältlich ist. Ein Tumor wurde als 5q21-deletiert gewertet, wenn mindestens 60 % der Tumorzellen einen Verlust eines oder beider 5q21(*CHD1*-) Signale aufwiesen. Dieser Wert wurde institutsintern durch einen Vergleich von aCGH- und FISH-Ergebnissen von 7 Tumoren ermittelt und festgelegt (95). Von 12.427 analysierten Tumoren waren 7.932 auswertbar. In 791 Fällen lag eine 5q21-Deletion vor (9,9 %). Diese ließen sich in 596 heterozygote (7,5 %) und 195 homozygote Deletionen (2,4 %) unterteilen. Abbildung 3-30 stellt Beispiele von Tumoren mit heterozygoter Deletion (a), ohne Deletion (b) sowie mit homozygoter Deletion (c) der 5q21-Region dar.

3.2.2 5q21-Deletionen in Prostatakarzinom-Vorstufen

Innerhalb des Patientenkollektivs konnten vier Prostatakarzinom-Großflächenschnitte identifiziert werden, bei denen eine hochgradige prostatische intraepitheliale Neoplasie (High-Grade PIN) in direkter Nachbarschaft zu einem Karzinom lag. Diese Großflächen wurden ebenfalls per FISH auf das Vorhandensein von 5q21-Deletionen hin untersucht. Zwei der vier Fälle wiesen eine 5q21-Deletion in der PIN wie auch im Karzinom auf.

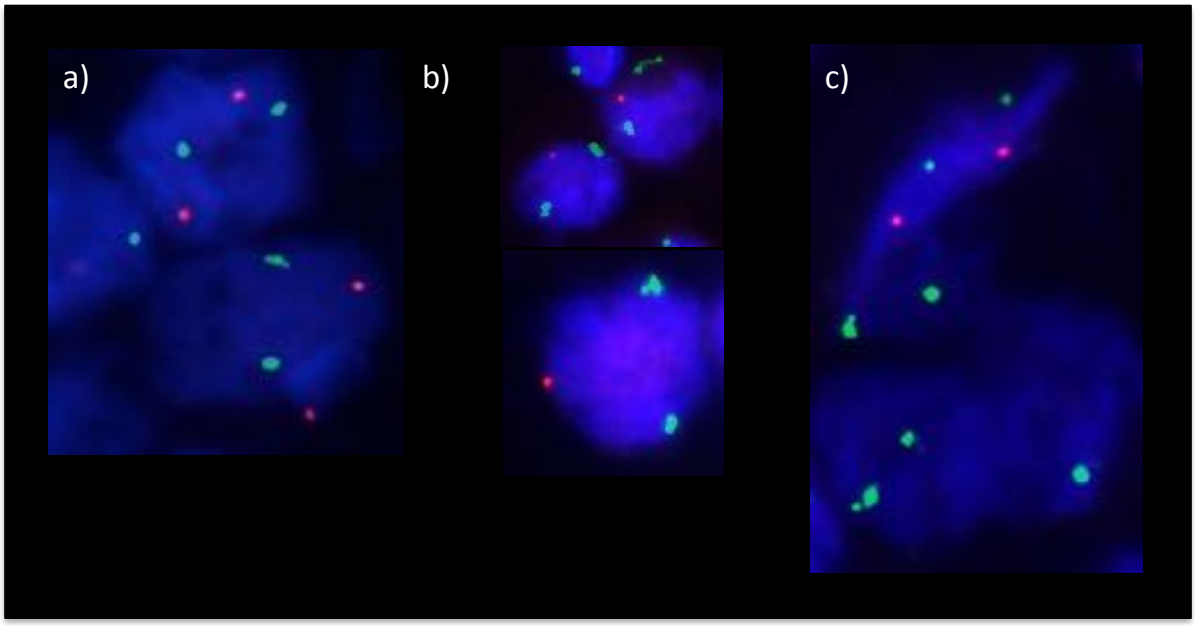


Abbildung 3-30: Mittels FISH dargestellter 5q21-Deletionsstatus beim Prostatakarzinom (PCA)

a) PCA ohne 5q21-Deletion: je Tumor-Zellkern sind 2 rote und 2 grüne Signale erkennbar

b) PCA mit heterozygot deletiertem 5q21: je Zellkern sind 2 grüne (Zentromer-) und ein rotes (CHD1-) Signal erkennbar

c) PCA mit homozygot deletiertem 5q21: je Tumor-Zellkern sind 2 grüne aber kein rotes Signal erkennbar. Im oberen Bereich des Bildes ist eine längliche, unveränderte Stromazelle (Referenzzelle) erkennbar, die einen normalen 5q21-Status (zwei grüne zwei rot Signale) aufweist.

3.3 Untersuchung der Klinischen Relevanz der 5q21-Inaktivierung

3.3.1 Assoziation von 5q21-Deletionen zu klinisch-pathologischen Parametern

Eine Korrelation der 5q21-Deletionsdaten wurde mittels Chi Quadrat Test ermittelt und zeigte eine deutliche Assoziation der 5q21-Deletion mit einem schlechten Tumorphänotyp. Das Auftreten von 5q21-Deletionen war signifikant mit fortgeschrittenem Tumorstadium ($p = 0{,}0097$) sowie hohem Gleason Grad assoziiert ($p < 0{,}0001$). Bei einer Unterteilung aller untersuchten Tumoren in ERG-positive und -negative Tumoren blieb die Signifikanz in beiden Untergruppen erhalten (Tab. 12).

Tabelle 12: Assoziation von 5q21-Deletionen mit dem Tumor-Phänotyp der analysierten Prostatakarzinome

		Alle Tumoren (n = 7141)				ERG-fusions-negative Tumoren (n = 3793)				ERG-fusions-positive Tumoren (n = 3332)			
		n (Anzahl)	hetero. del. [%]	homo. del. [%]	p-Wert	n (Anzahl)	hetero. del. [%]	homo. del. (%)	p-Wert	n (Anzahl)	hetero. del. [%]	homo. del. [%]	p-Wert
Alle Tumoren		7932	7.5	2.4		3793	11.4	4.8		3332	4.0	0.0	
Pathologisches Tumorstadium (pT)	pT2	5054	6.8	2.2	0.0097	2540	11.1	4.1	0.0555	1936	2.4	0.2	< 0,0001
	pT3a	1778	8.3	2.9		746	12.6	6.4		897	5.1	0.0	
	pT3b	1022	9.2	2.9		473	11.4	6.1		467	7.5	0.2	
	pT4	45	13.3	0.0		21	9.5	0.0		17	11.8	0.0	
Gleason Grad	≤ 3 + 3	1814	4.4	0.9	< 0,0001	827	7.9	1.6	<,0001	690	1.5	0.3	< 0,0001
	3 + 4	4441	7.0	2.1		2078	10.9	4.3		1981	3.5	0.1	
	4 + 3	1231	12.1	5.4		639	15.8	9.9		507	7.9	0.2	
	≥ 4 + 4	402	12.9	3.7		230	16.5	6.5		135	7.4	0.0	
Lymphknoten-befall (pN)	pN0	4463	8.6	2.8	0.4416	2170	12.8	5.4	0.1145	1909	4.7	0.1	0.4642
	pN > 0	493	7.5	3.7		225	8.9	7.6		230	5.7	0.4	
präoperativer PSA-Wert (ng/µl)	< 4	981	6.8	1.7	0.0780	404	11.1	4.2	0.7594	459	4.1	0.0	0.8970
	4 - 10	4715	7.3	2.4		2234	11.1	4.9		1996	4.0	0.2	
	10 - 20	1607	8.1	3.4		844	11.9	5.5		616	3.9	0.2	
	> 20	536	8.4	1.7		279	12.2	3.2		217	3.2	0.0	
Absetzungsrand	negative	6278	7.3	2.5	0.4416	2530	11.4	4.9	0.8494	2489	4.7	0.1	0.3908
	positive	1509	7.9	2.2		594	11.4	4.4		645	5.7	0.4	

Die Assoziation von 5q21-Deletionen zu phänotypischen Merkmalen der untersuchten Prostatakarzinome wurde sowohl in allen Tumoren wie auch den Untergruppen der ERG-positiven und ERG-negativen Prostatakarzinome dargestellt.

3.3.2 Assoziation von 5q21-Deletionen zur Patientenprognose

Zur Bestimmung der prognostischen Relevanz der 5q21-Deletion wurden 7.187 Tumoren mit klinisch-pathologischen Follow-Up-Daten mittels Log-Rank-Test analysiert, um eine Assoziation der Veränderung mit der Wahrscheinlichkeit eines PSA-Rezidivs zu prüfen. In einer univariaten Analyse war das Auftreten eines biochemischen Rezidivs (Wiederanstieg des PSA-Wertes) stark mit einer 5q21-Deletion assoziiert. Patienten mit deletierter 5q21-Region erlitten früher ein PSA Rezidiv als solche ohne Deletion, hierbei war der Unterschied zwischen hetero- und homozygoten Deletionen vernachlässigbar. Dieser Zusammenhang war innerhalb aller Tumoren wie auch der Untergruppe der ERG-negativen Tumoren signifikant ($p < 0{,}0001$) und in der Untergruppe der ERG-positiven erkennbar, jedoch nicht signifikant ($p = 0{,}1454$). Die Ergebnisse sind in Form von Kaplan-Meier-Kurven in Abbildung 3-31 dargestellt.

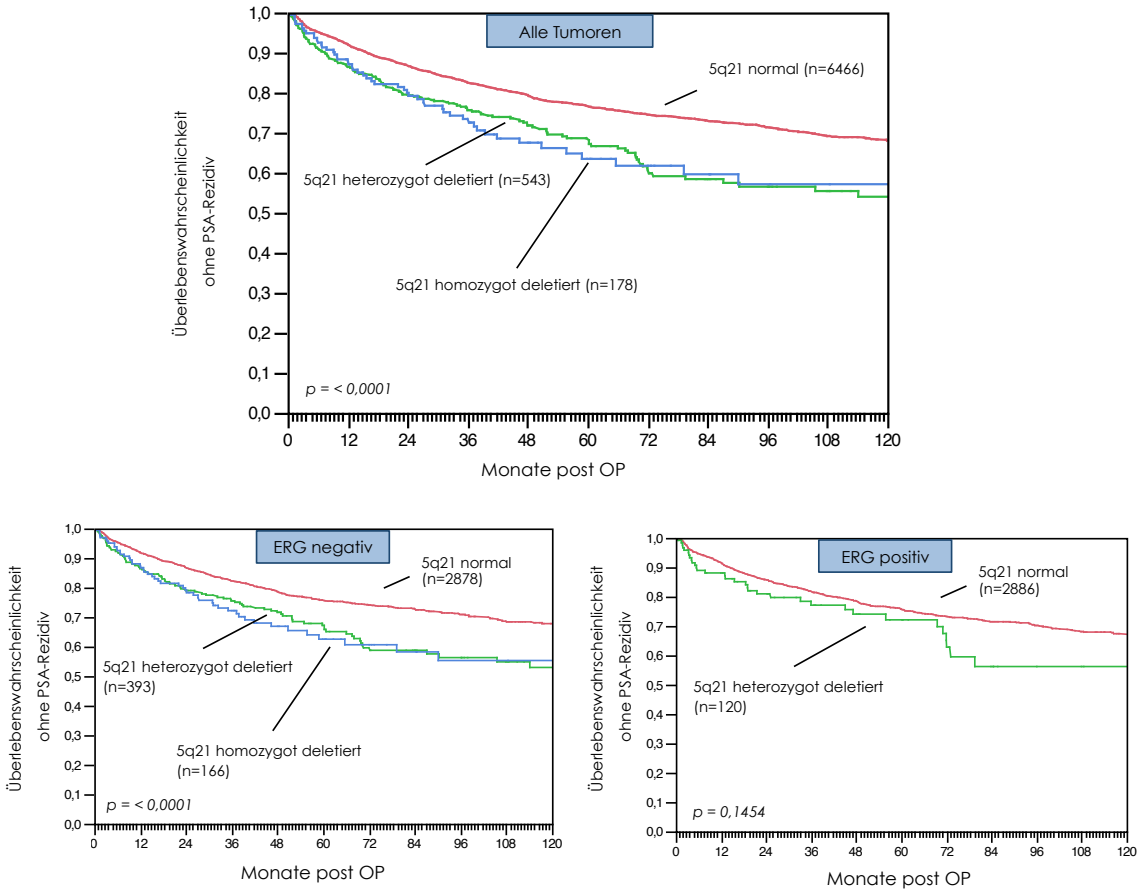


Abbildung 3-31: Einfluss der 5q21-Deletionen auf das Auftreten eines biochemischen Rezidivs

Wahrscheinlichkeit der Dauer eines rezidiv-freien Überlebens von Patienten mit und ohne 5q21 - Deletionen in allen Tumoren, ERG-negativen und ERG-positiven Tumoren in Monaten.

Um den Einfluss der 5q21-Deletion im Vergleich zu etablierten Prognosefaktoren zu testen, wurden zwei multivariate Analysen durchgeführt. Hierzu wurde zunächst in einem ersten Schritt einen diejenigen bekannten Prognoseparameter eingeschlossen, die zum Zeitpunkt der radikalen Prostatektomie (RPE) verfügbar sind. Dazu zählen der präoperative PSA-Wert, der Gleason-Grad, das pathologische Tumorstadium, der Status des Resektionsrandes (tumorfrei / mit Tumor) sowie der Lymphknotenstatus (tumorfrei / mit Tumor). In der zweiten Analyse wurden nur diejenigen Parameter einbezogen, die präoperativ oder anhand der Biopsie diagnostiziert werden können. Dies schließt den präoperativen PSA-Wert, den Gleason-Grad der Biopsie-Stanze und das klinische Tumorstadium ein. Zudem wurden beide Analysen sowohl in allen Tumoren wie auch in den Subgruppen der ERG-positiven wie ERG-negativen Tumoren durchgeführt.

Diese Analysen zeigten, dass der 5q21-Deletionsstatus in der Subgruppe der ERG-negativen Tumoren einen unabhängigen Prognosemarker darstellt, sowohl im präoperativen (Biopsie) wie auch im postoperativen (RPE) Scenario. In ERG-positiven Tumoren war die prognostische Relevanz der 5q21-Deletionen schwächer und nur noch im präoperativen Scenario unabhängig. Dementsprechend zeigte sich die 5q21-Deletion als unabhängiger Prognosefaktor im präoperativen Scenario, jedoch nicht im postoperativen Scenario, wenn alle Tumoren (ERG-pos und ERG-neg) untersucht wurden (Tab 13). Die Parameter, Subgruppen, Konfidenzintervalle und p-Werte der multivariaten Analyse sind in Tab 14 für alle Tumoren und die postoperativen Parameter ausführlich dargestellt.

Tabelle 13: Auflistung der p-Werte einer multivariaten Analyse (Cox-proportional Hazards) für typische prä- und postoperative Prognoseparameter des PCA aller, der ERG-pos und der ERG-neg Karzinome

Tumor Subset	Scenario	Auswertbar	p -Wert							
			Präoperativer PSA-Wert	Pathologisches Tumorstadium (pT)	Klinisches Tumorstadium (cT)	Gleason Grad RPE	Gleason Grad Biopsie	Lympfknoten-befall (pN)	Absetzungs-rand	5q21-Deletion
Alle Tumoren	RPE	4,371	< 0.0001	< 0.0001	-	< 0.0001	-	< 0.0001	0.0037	0.2275
	Biopsie	6,808	< 0.0001	-	< 0.0001	-	< 0.0001	-	-	0.0011
ERG-negative Tumoren	RPE	2,120	< 0.0001	< 0.0001	-	< 0.0001	-	0.0005	0.0875	0.0216
	Biopsie	3,288	< 0.0001	-	< 0.0001	-	< 0.0001	-	-	0.0006
ERG-positive Tumoren	RPE	1,878	0.0089	< 0.0001	-	< 0.0001	-	0.0641	0.0525	0.8617
	Biopsie	2,817	< 0.0001	-	< 0.0001	-	< 0.0001	-	-	0.0284

Tabelle 14: Ausführliche Darstellung der Ergebnisse der multivariaten Analyse am Beispiel des post-operativen Scenarios im gesamten Tumorkollektiv

	Parameter	RV	95 % KI	p-Wert
	pT3a vs. pT2	2,1	1,8 - 2,4	< 0,0001
Tumorstadium	pT3b vs. pT3a	1,7	1,3 - 1,7	< 0,0001
	pT4 vs. pT3b	1.5	1,0 - 2,1	0,0430
	3+4 vs. ≤3+3	1,9	1,5 - 2,5	< 0,0001
Gleason Grad	4+3 vs. 3+4	2,1	1,8 - 4,4	< 0,0001
	≥4+4 vs. 4+3	1.2	1,0 - 1,4	0,1042
Lymphknotenbefall	pN+ vs. pN0	1,5	1,3 - 1,8	< 0,0001
Resektionsrand	R1 vs. R0	1,2	1,1 - 1,4	0,0037
Präoperativer PSA	4-10 vs. <4	1,3	1,0 - 1,7	0,0309
	10-20 vs. 4-10	1,25	1,1- 1,4	0,0012
	>20 vs. 10-20	1,27	1,1 - 1,5	0,0039
5q21	deletiert vs. normal	1.1	0,9 - 1,3	0,2275

Cox-proportional-Hazard-Analyse, RV: Risikoverhältnis, KI: Konfidenzintervall

3.3.3 Assoziation von 5q21-Deletionen mit alternativen Endpunkten

Um weitere Anhaltspunkte einer klinischen Relevanz der 5q21-Deletionen zu erhalten, wurden die 5q21 - FISH - Daten mit neuen klinisch-biologischen Endpunkten korreliert. (Siehe Punkt 2.1.3 „Formalinfixiertes Gewebe“). Es bestand ein Datenpool von 2.158 Fällen, von denen sowohl der 5q21-Deletionsstatus wie auch der klinisch-biologische Endpunkt ermittelt werden konnte. Es wurden Endpunktgruppen erstellt, die die in Tab 15 dargestellten Eigenschaften erfüllten, wobei die Nummerierung der Gruppe mit der Bösartigkeit des Tumors steigt. Der 5q21-Deletionsstatus war signifikant mit der Verteilung auf die klinisch-biologische Endpunkt-gruppen assoziiert, wobei sich in den 5q21-deletierten Tumoren ein weitaus größerer Anteil der klinisch ungünstigen Gruppen wiederfand als in Tumoren mit normalem 5q21-Status (Abb. 3-32). So zeigten Karzinome mit einer 5q21-Deletion ein 2,4-fach höheres Risiko der Metastasierung als Karzinome mit normalem 5q21-Status (Gruppe 4, $p < 0,0001$). Dafür zeigten

5q21-deletierte Fälle eine 1,5-fache niedrigere Wahrscheinlichkeit, dass das Karzinom ein lokal begrenztes Wachstum zeigt und keine Invasivität aufweist (Gruppe 1, $p < 0{,}0001$).

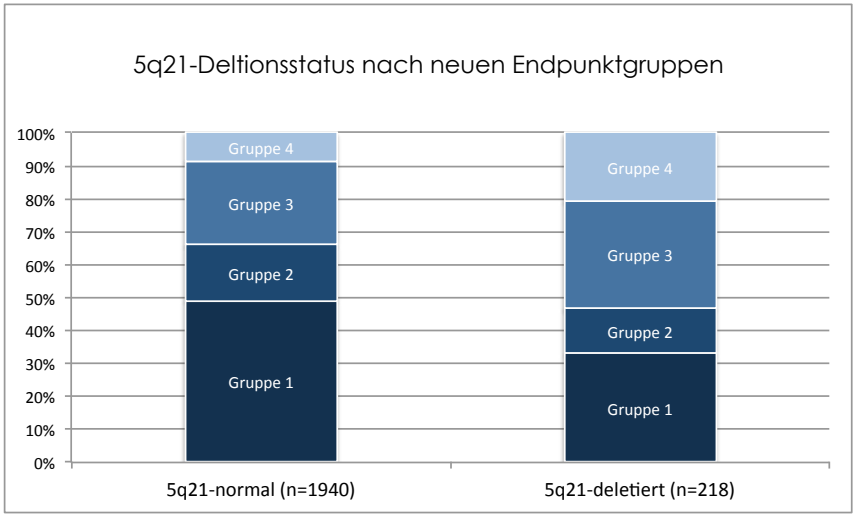


Abbildung 3-32: Verteilung der 5q21-deletierten und 5q21-normalen Tumoren auf die neuen klinisch-biologischen Endpunkte.

Je höher die Gruppennummer, desto ungünstiger der biologisch-klinische Status des Tumors (Tab 15)
p-Werte:

Gruppe 1: < 0,0001
Gruppe 2: 0,2440
Gruppe 3: 0,0200
Gruppe 4: < 0,0001

Tabelle 15: Einteilung der biologisch-klinischen Endpunktgruppen nach Tumoreigenschaften

Gruppe	Eigenschaft	Pathologie	Anzahl der Patienten	5q21-normal [%] (n=1940)	5q21-deletiert [%] (n=218)
1	Lokal begrenztes Karzinom, nicht invasiv	pT2 kein BCR	1.025	49.1	33.0
2	Lokal begrenztesKarzinom, invasiv	pT3a / pT3b kein BCR / reversibles BCR	357	16.9	13.8
3	Okkulte Karzinome*	Irreversibles BCR ohne Metastasen	564	25.4	32.6
4	Metastasierende Karzinome	Mit Lymphknoten- und / oder Fernmetastasen	212	8.6	20.6

** Okkultes Karzinom: Per Zufallsbefund entdecktes Karzinom*

Assoziation von 5q21-Deletionen und dem KI67-Labeling-Index

Aufgrund der ausschließlichen Nachweisbarkeit des KI67-Proteins in aktiven Phasen des Zellzyklus hat es sich als Marker für proliferativ aktive Zellen durchgesetzt (151,152). In einer vorangegangenen Arbeit der eigenen Arbeitsgruppe wurden KI67-IHC-Analysen des in der vorliegenden Arbeit untersuchten Tumorsets durchgeführt (151,153,154). Dieses Datenset wurde hier genutzt, um den KI67-Labeling-Index (KI67-LI: Anteil der KI67-positiven Tumorzellen) mit dem Vorhandensein einer 5q21-Deletion zu vergleichen. Die Analyse ergab eine Korrelation von Ki67-LI und 5q21-Deletionen. 5q21-deletierte Tumoren wiesen einen höheren Anteil an KI67-positiven Zellen auf als Tumoren mit normalem 5q-Status. Eine statistische Signifikanz zeigte sich hierbei für die Gruppe der ERG-negativen Tumoren wie auch bei der Analyse aller Tumoren, nicht aber in der Gruppe der ERG-positiven Tumoren (Tab. 16).

Tabelle 16: Assoziation von CHD1 mit KI67 LI in Gruppen von Tumoren gleichen Gleason Scores

		Gleason Score				
		≥3+3	**3+4**	**4+3**	**≥4+4**	**kombiniert**
Alle Tumoren	**n (Anzahl)**	1.088	2.812	709	221	4.859
	Ø Ki67LI: deletiert	3.1	3.1	4.5	5.3	3.7
	Ø Ki67LI: normal	2.2	2.9	3.6	4.7	2.9
	p-Wert	*0,0009*	*0,0642*	*0.0070*	*0.4621*	*0.0002*
ERG-negative Tumoren	**n (Anzahl)**	552	1.386	402	142	2.498
	Ø Ki67LI: deletiert	3,3	3,2	4,5	5.8	3,8
	Ø Ki67LI: normal	2.1	2,7	3,7	4,4	2,8
	p-Wert	*< 0,0001*	*0,0039*	*0,0503*	*0,0593*	*< 0,001*
ERG-positive Tumoren	**n (Anzahl)**	509	1.398	294	77	2.290
	Ø Ki67LI: deletiert	2,3	2,9	3,9	2,7	3.1
	Ø Ki67LI: normal	2,5	3,0	3,4	5,3	3,0
	p-Wert	*0,7541*	*0,7571*	*0,4243*	*0,3177*	*0,6511*

Der KI67 LI (KI67 Labeling Index) stellt den Anteil an KI67-positiven (und somit teilungsaktiven) Tumorzellen dar.

3.4 Expressionsanalysen von CHD1 in klinischen Tumoren

Da das *CHD1* in allen 5q21-Deletionen enthalten war und zusätzlich als Chromatin-Remodeler eine tumorsuppressive Rolle einnehmen könnte, sollte geprüft werden, ob sich eine Deletion der 5q21-Region auf das Expressionsniveau des CHD1 auswirkt. Hierzu wurden mRNA-Expressionsanalysen an 16 deletierten und 15 nicht deletierten (normalen) Tumorproben per qPCR durchgeführt. Der Deletionsstatus wurde mittels FISH erhoben. Es war eine deutliche Herab-regulierung der mRNA für *CHD1* in den deletierten Proben gegenüber den Proben mit einem normalen *CHD1* - Kopiezahlstatus erkennbar (p = 0,0396, Abb. 3-33 a). Zusätzlich wurde an drei deletierten wie auch drei nicht deletierten Proben ein Proteinnachweis des CHD1 per Western-blot durchgeführt. Bei zwei der drei deletierten Proben war deutlich weniger CHD1-Protein nachweisbar als in den Proben mit normalem *CHD1*-Status (Abb. 3-33 b).

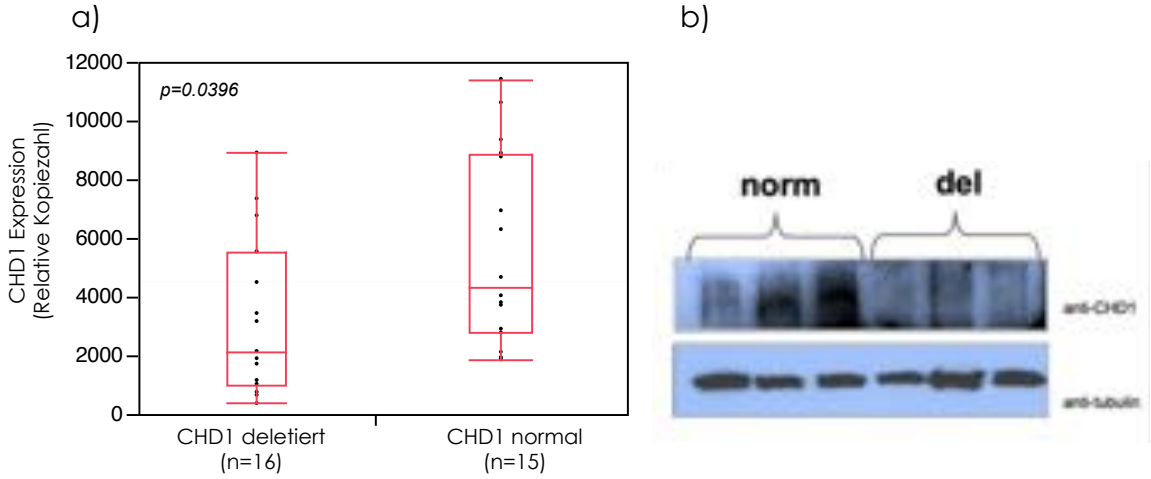


Abbildung 3-33: Einfluss der *CHD1*-Deletionen auf das mRNA- und Protein-Expressionsniveau

Expressionsniveau von CHD1 in CHD1-deletierten und -normalen Prostatakarzinomen mittels qPCR (a) und mittels Immunoblot (b). Der Deletionsstatus wurde mittels FISH bestimmt, die mRNA Expressionsanalysen erfolgten per qPCR im ABI Prism 7000 Detection System mit TaqMan-Sonden.

3.5 Assoziationen der 5q21-Deletion zu anderen molekularen Veränderungen des Prostatakarzinoms

Assoziation von 5q21-Deletionen zu TMPRSS2:ERG-Fusionen

Die erhaltenen 5q21-Deletionensdaten wurden mit einem bestehenden IHC-Expressionsdatensatz von ERG verglichen, um eine mögliche Assoziation zu *TMPRSS2:ERG*-Fusionen zu untersuchen. Da in Prostatazellen, die keine *TMPRSS2:ERG*-Fusion aufweisen, auch keine ERG-Expression stattfindet, wird ein positiver Expressionsstatus von ERG im Allgemeinen mit dem Vorhandensein einer *TMPRSS2:ERG*-Fusion gleichgesetzt (80). Das Auftreten von Deletionen des 5q21-Bereiches wurde vor allem in Tumoren beobachtet, die keine ERG-Expression aufwiesen. Während 16 % aller ERG-negativen Tumoren eine 5q21-Deletion aufwiesen, zeigten nur 4 % der ERG-positiven Tumoren ein solches Ereignis ($p < 0{,}0001$). Vor allem homozygote Deletionen konnten fast nur in ERG-negativen Tumoren nachgewiesen werden (Abb. 3-34).

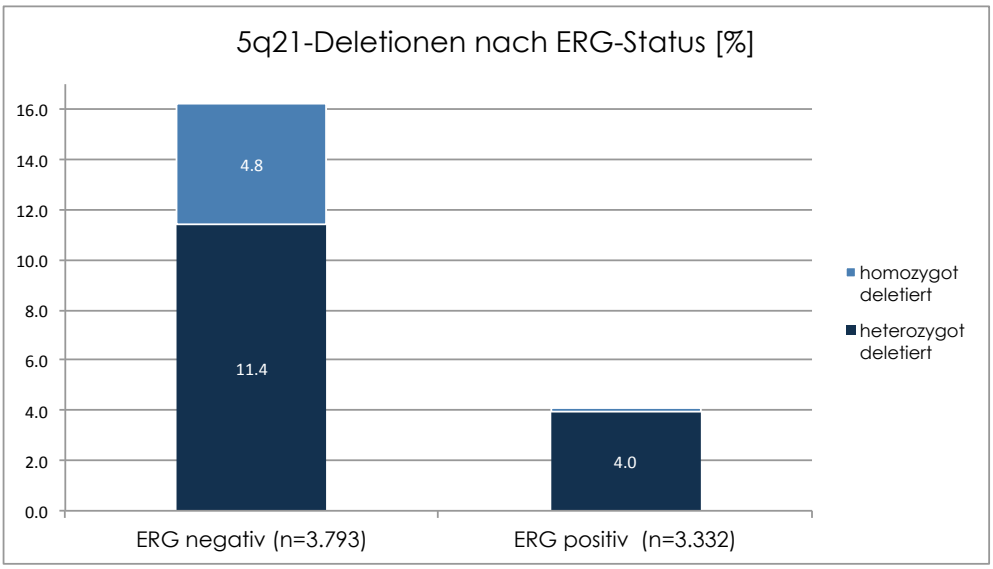


Abbildung 3-34: Assoziation von 5q21-Deletionen mit dem ERG-Expressionsstatus ($p < 0{,}0001$).

Assoziation von 5q21-Deletionen mit anderen deletierten Chromosomenbereichen:

Eine Korrelation der 5q21-Deletionen mit anderen häufig beim PCA deletierten Regionen wurde außerdem über den Vergleich mit bestehenden, per FISH ermittelten Datensätzen des Institutes für Pathologie gemacht. Signifikante Assoziationen fanden sich hierbei für die folgenden Bereiche: 2q, 6q, 10q, 12p, 13q, und 18q. Hierbei waren die Assoziationen in allen Tumoren wie auch im ERG-negativem Subset für alle Bereiche signifikant, im Subset der ERG-positiven Karzinome jedoch nur für drei von sechs Regionen (Tab. 17).

Tabelle 17: Assoziation von 5q21-Deletionen mit anderen Deletionsbereichen anhand von FISH-Datensätzen unserer bestehenden Datenbank

Deletion	Signifikant assoziiert in ERG negativen PCA (p - Wert)	Signifikant assoziiert in ERG positiven PCA (p - Wert)	Signifikant assoziiert in allen PCA (p - Wert)
2q	< 0,0001	0.0361	< 0,0001
6q	< 0,0001	-	< 0,0001
10q	0,0003	< 0,0001	0,0007
12p	< 0,0001	-	< 0,0001
13q	< 0,0001	0,0004	< 0,0001
18q	< 0,0001	-	< 0,0001

Assoziationen von anderen, häufig beim PCA veränderten Regionen mit dem Patientenalter

Die in dieser Arbeit erlangten 5q21-Deletionsdaten wie auch andere im Institut erhobenen FISH- und IHC-Daten wurden auf einen möglichen Zusammenhang mit dem Patientenalter hin untersucht. Es ergaben sich signifikante Assoziationen der Daten mit dem Patientenalter für Deletionen von 5q21, 6q15, Inaktivierungen von *PTEN* und *TMPRSS2:ERG*-Fusionen, letztere nachgewiesen über die Expression von ERG (via IHC) sowie über eine Break-Apart-FISH. Beide ERG-Veränderungen nahmen mit steigendem Patientenalter ab. Hingegen nahmen 5q21- und 6q15-Deletionen, wie auch Inaktivierungen von *PTEN* (10q23), mit steigendem Alter zu (Abb. 3-35).

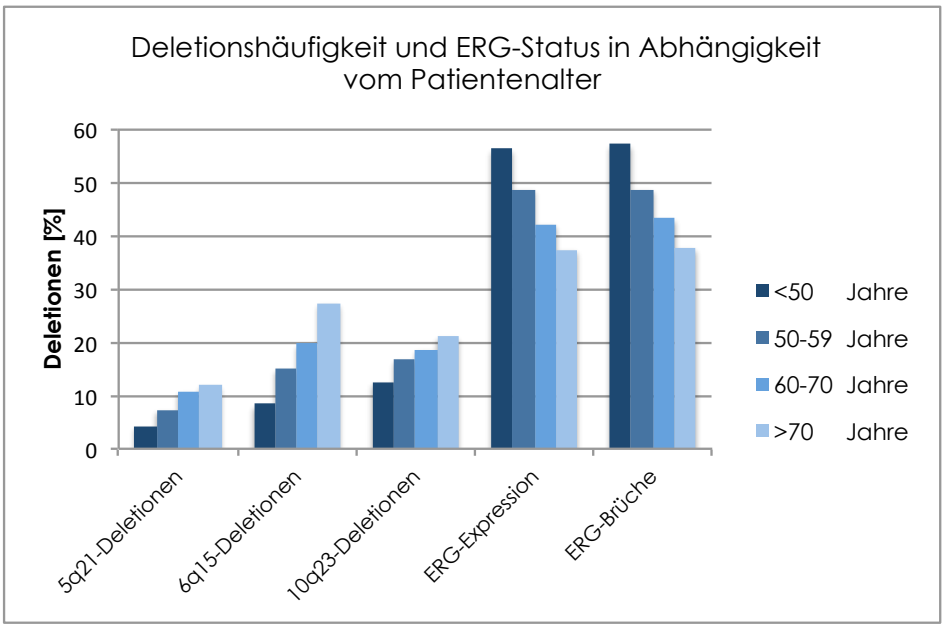


Abbildung 3-35: Prozentuale Häufigkeit verschiedener Deletionen sowie des ERG-Status in Abhängigkeit vom Patientenalter

3.6 Funktionelle Analysen zur Klärung der Tumorsuppressor-Rolle von CHD1

3.6.1 Etablierung von Testsystemen für funktionelle Analysen zum CHD1

Es wurden zunächst mehrere Prostatakarzinom-Zelllinien auf die Expression von AR, ERG und CHD1 mittels qPCR sowie einer Deletion von 5q21 mittels FISH hin untersucht. Die Zelllinien BPH-1, RWPE-1, PC3, DU145, LNCaP und VCaP zeigten alle eine CHD1 Expression und keine 5q21 Deletion. Sie wurden im Folgenden als *in vitro* Testsysteme für die funktionellen Untersuchungen verwendet. Eine AR-Expression konnte bei den AR-positiven Zelllinien LNCaP und VCaP nachgewiesen werden und eine ERG-Expression in der TMPRSS2:ERG fusionspositiven VCaP. Die AR-Expression der VCaP-Linie stellte sich knapp 7 mal stärker dar, als die der LNCaP, was aufgrund der bekannten AR-Amplifikation dieser Zelllinie zu erwarten war (Abb. 3-36).

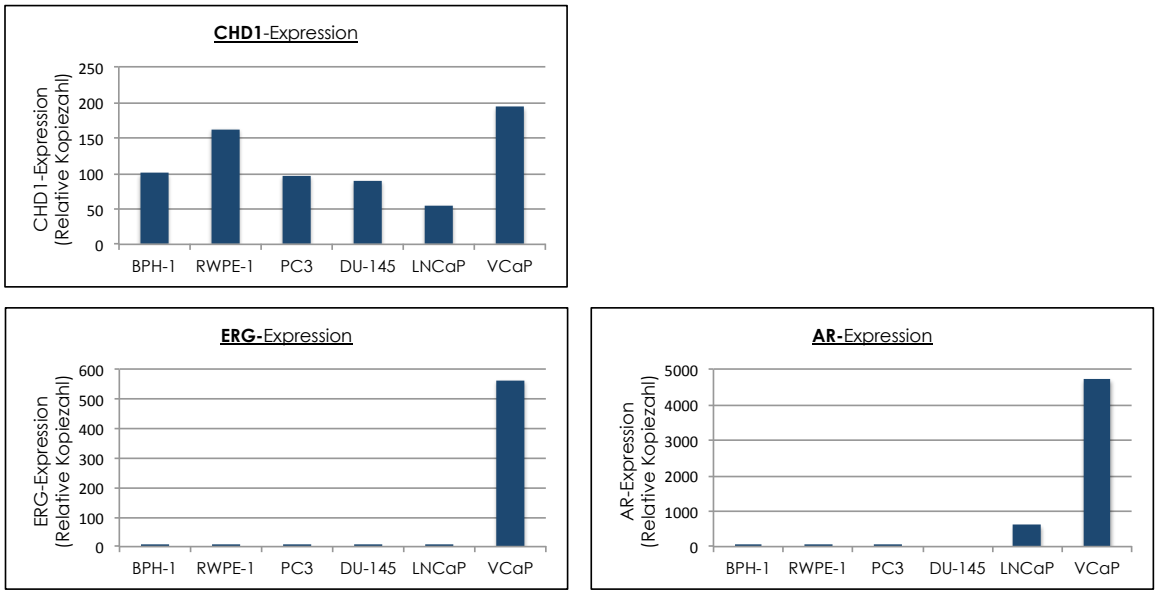


Abbildung 3-36: Expression von CHD1, AR und ERG in den getesteten PCA-Zelllinien

Level der mRNA-Expression per qPCR mit TaqMan-Sonden. Es handelt sich um relative Messwerte (Kopiezahlen) normalisiert anhand der GAPDH-mRNA-Kopiezahl

Um die Funktion des *CHD1* im Zellkulturmodell zu untersuchen, sollte das Gen überexprimiert bzw. depletiert (Herabregulation der Expression) werden. Um geeignete *CHD1*-Depletions - und - Überexpressionskonstrukte zu etablieren, wurden jeweils verschiedene Konstrukte auf Ihren Effekt auf die Expression getestet. Eine stabile Depletion sollte via Transduktion mittels shRNA über ein lentivirales Expressionssystem erfolgen. Hierzu wurden 5 shRNAs gegen *CHD1* in LNCaP-Zellen getestet. Konstrukt #09 erwies sich mit einer etwa 4-fachen Herabregulation als am besten geeignet. Gleiche Tests für eine Depletion von AR und ERG identifizierten Konstrukt #18 bzw. #317 als am effektivsten (Abb. 3-37).

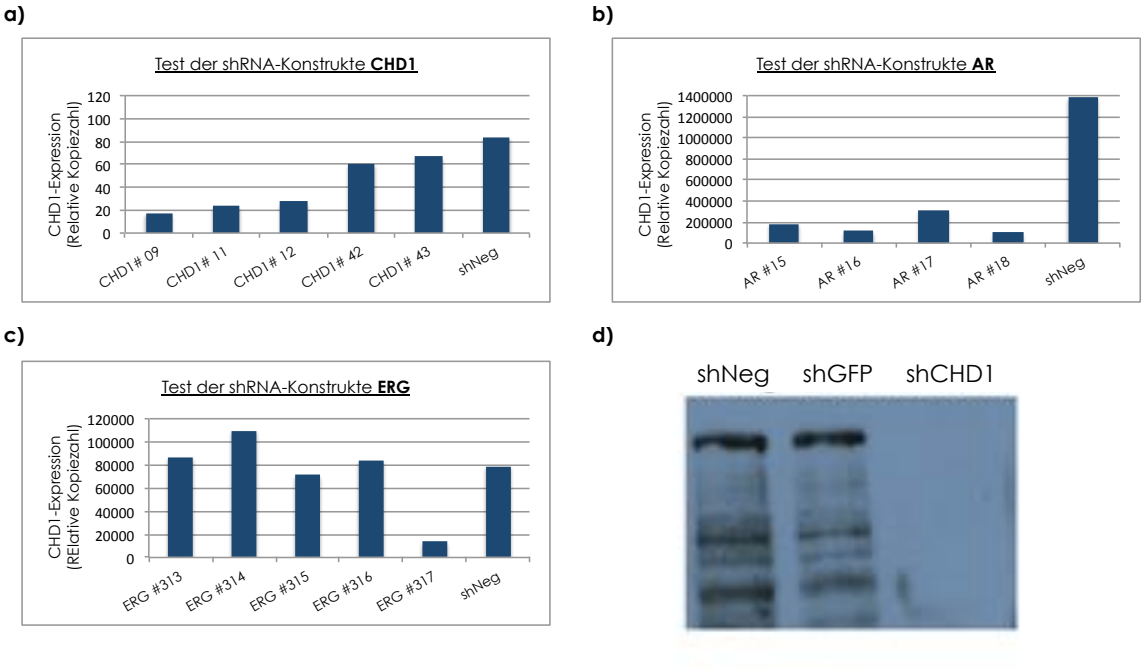


Abbildung 3-37: Effizienz der getesteten shRNA-Konstrukte zur Herabregulation von CHD1, AR und ERG

a) bis c): CHD1-, AR- und ERG-Expression nach Depletion mit unterschiedlichen shRNA-Konstrukten.Dargestellt sind die Level der mRNA-Expression per qPCR mit TaqMan-Sonden. Es handelt sich um relative Messwerte (Kopiezahlen) normalisiert anhand der GAPDH-mRNA-Kopiezahl.
d) Bestätigung der Depletion von CHD1 auf Proteinebene durch shRNA-Konstrukt #09 mittels Western-blot

Das auf einem pCMV6-XL4-Vektor basierende Überexpressionskonstrukt für *CHD1* wurde mittels qPCR und Westernblotanalyse auf seine Effizienz hin überprüft (Abb. 3-38). Die Konstrukte für *RB1* und *PTEN* wurden uns freundlicherweise von William Sellers vom Department of Adult Oncology der Harvard Medical School zur Verfügung gestellt und waren bereits etabliert.

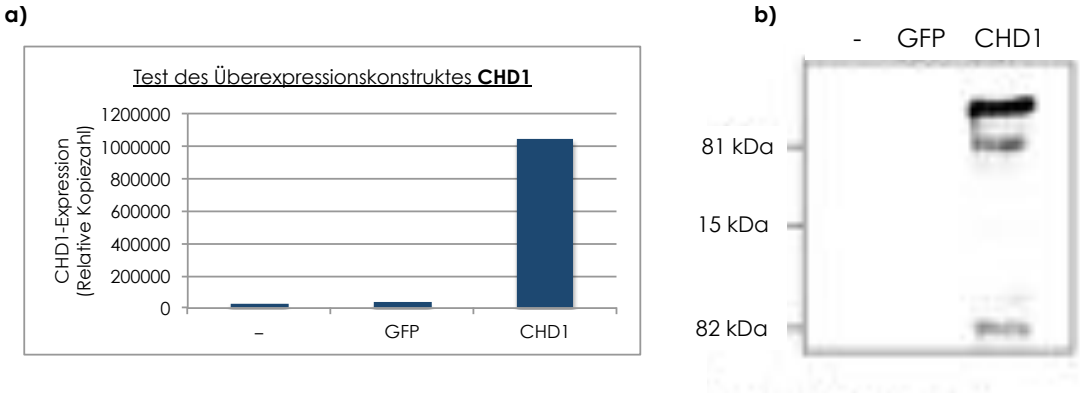


Abbildung 3-38: Test der Effizienz des Überexpressionskonstruktes für CHD1

Expressionsanalysen mittels qPCR mit TaqMan-Sonden (a) und Westernblot (b) nach Transfektion von PC-3-Zellen mit dem Überexpressionskonstrukt für CHD1 und zwei Negativkontrollen
-: nicht transfiziert, GFP: Vektor mit GFP-Konstrukt als Negativkontrolle, CHD1: CHD1-Überexpressionskonstrukt, kDa: Kilodalton

3.6.2 Einfluss von CHD1 auf das Wachstum von Prostatakarzinomzellen

Um die Vermutung zu prüfen, ob es sich bei *CHD1* um ein Tumorsuppressor-Gen handelt, wurden mit oben beschriebenen etablierten Deletions- und Überexpressionskonstrukten Koloniebildungsassays durchgeführt. Als Modellsysteme dienten BPH-1 als gutartige und PC-3 sowie DU145 als bösartige Prostata-Zelllinie. Für die Depletionsuntersuchungen wurden die Zellen mit shRNAs transfiziert, die spezifisch gegen *CHD1* und als Kontrolle gegen GFP sowie gegen die Tumorsupressoren *PTEN* und *RB1* gerichtet waren. Aufgrund der bekannten *PTEN*-Deletion in PC-3-Zellen wurde bei diesen eine shRNA gegen *mTOR* eingesetzt. Die Zellen wurden mit Puromycin selektiert, über 2 Wochen kultiviert und anschließend mit Methanol fixiert und mit Giemsa gefärbt. Die Auszählung ergab eine reduzierte Koloniebildung in Zellen mit depletiertem *CHD1* im Vergleich zur shGFP-Kontrolle in allen Zelllinien. Diese Reduktion war mit der der *PTEN* depletierten Zellen vergleichbar. Auch die Überexpression von *CHD1* bewirkte in allen drei Zelllinien eine reduzierte Koloniebildung, dies entsprach dem Verhalten sowohl von *PTEN* wie auch von *RB1*, jedoch in unterschiedlichem Ausmaß (Abb. 3-39).

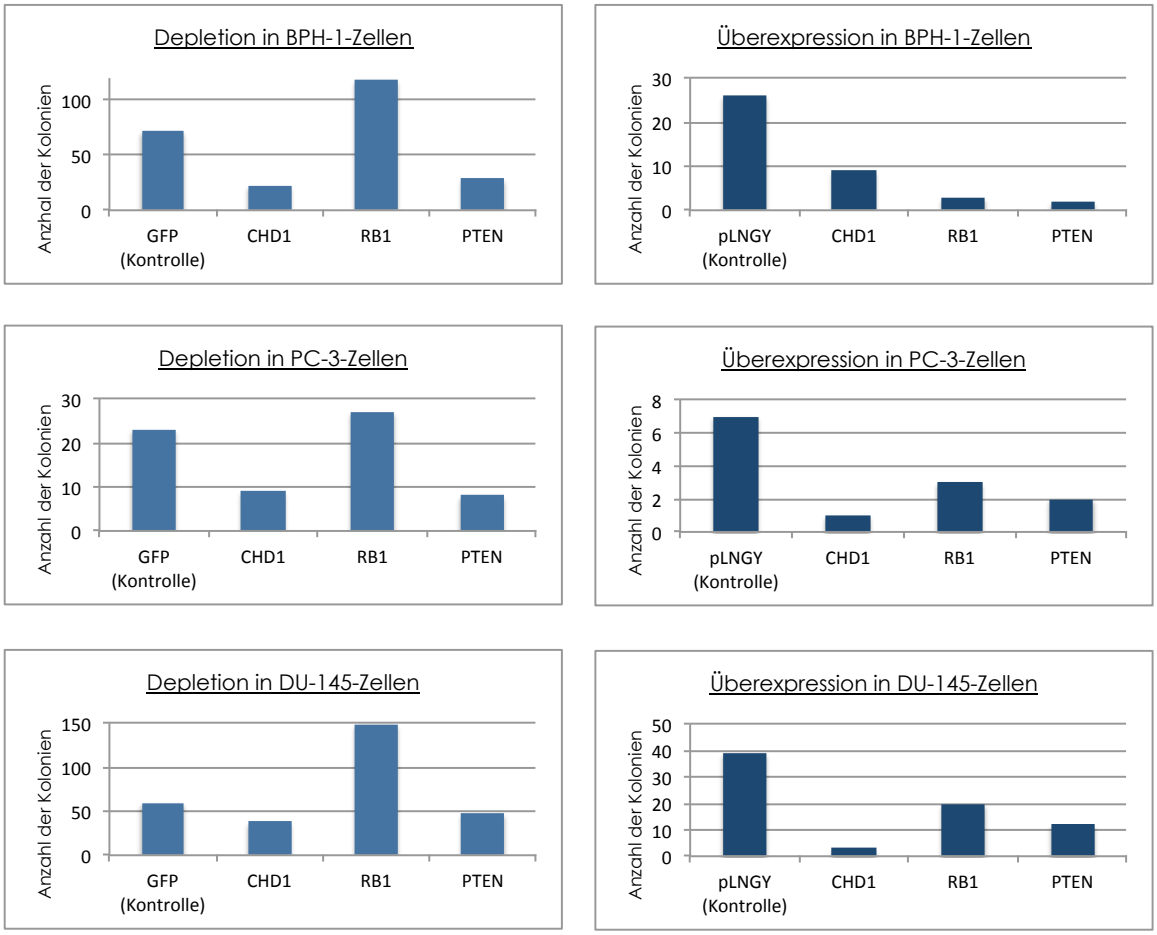


Abbildung 3-39: Anzahl der ausgezählten Kolonien in PCA-Zelllinien nach Gen-Depletion bzw. – Überexpression von *CHD1*, *RB1* und *PTEN*

3.6.3 Einfluss des CHD1 auf die Fähigkeit des adhäsionsunabhängigen Wachstums von PCA-Zelllinien (Soft Agar Assay)

Um die Auswirkung von CHD1 auf die Fähigkeit eines adhäsionsunabhängigen Wachstums zu untersuchen, wurden Soft-Agar-Assays mit CHD1-depletierten (shCHD1) und CHD1- normalen (shNeg) Zellen der malignen PC-3-Zellinie durchgeführt. Der Soft Agar hindert Zellen daran, sich an die Oberfläche des Zellkulturgefäßes anzuheften, ein Vorgang, der für benigne Prostatazellen elementar ist. Ein Wachstum in Soft Agar, das PC3-Zellen von sich aus mitbringen, ist daher ein Zeichen für maligne Eigenschaften von Zellen. PC-3-Zellen mit depletierter CHD1-Expression zeigten kein Wachstum im Softagar, während die Kontrollzellen im Durchschnitt 44 Zellkolonien hervorbrachten (Abb. 3-40).

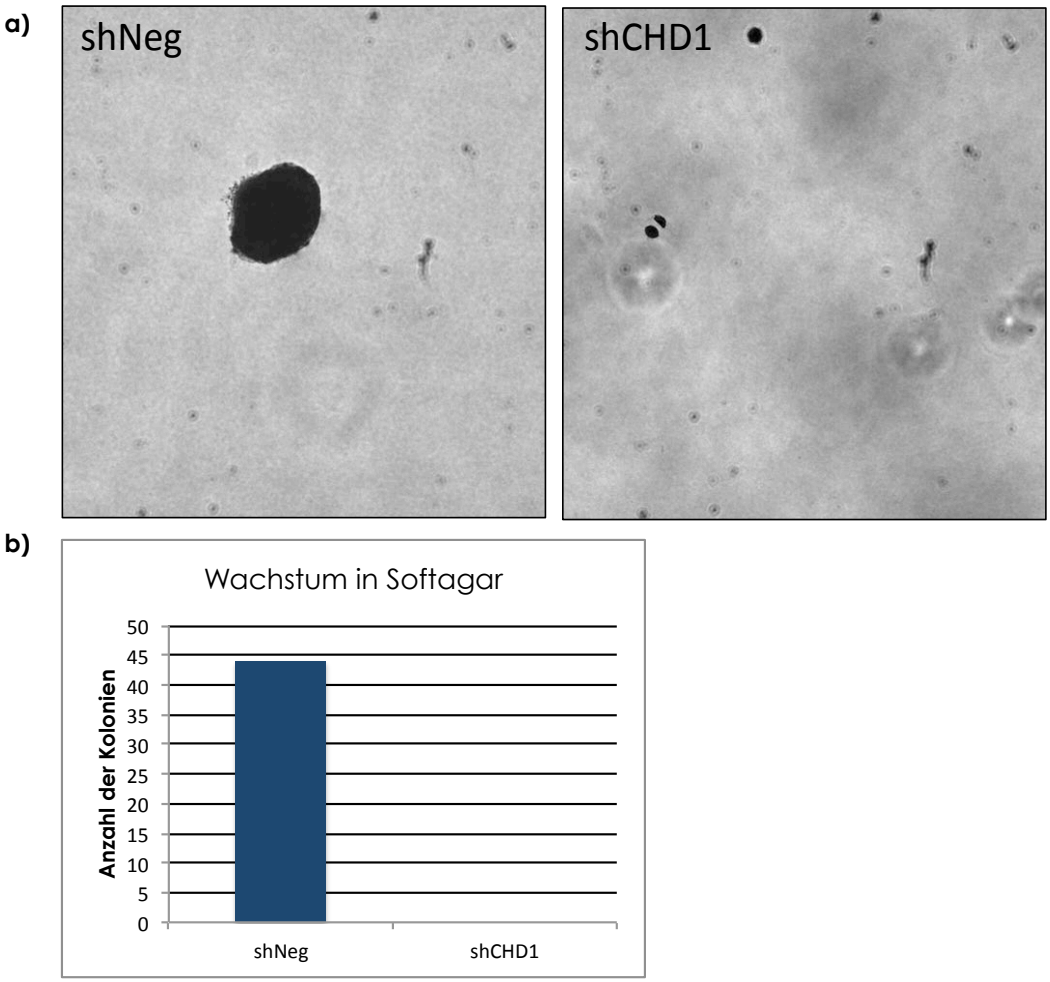


Abbildung 3-40: a) Beispielhafte Darstellung von Kolonien von CHD1-depletierten (shCHD1) und CHD1-normalen (shNeg) PC-3-Zellen in Softagar b) Anzahl der ausgebildeten Kolonien von CHD1-depletierten und CHD1-normalen PC-3-Zellen in Softagar

3.6.4 Einfluss des CHD1 auf die Fähigkeit der Migration von PCA-Zelllinien (Invasion Assay)

Der Invasion Assay dient zur Testung der invasiven Wachstumsfähigkeiten einzelner Zellen. Gemessen wird dies anhand der Zellen, die die Fähigkeit haben, eine mit einem Matrigel beschichtete Membran zu durchwandern. Invasion Assays wurden mit CHD1-depletierten (shCHD1) und CHD1-normalen (shNeg) Zellen der PC-3-Zellinie durchgeführt. Da PC-3-Zellen bereits maligne Eigenschaften besitzen, können sie die Membran passieren. Die Anzahl der migrierten Zellen war jedoch bei CHD1-depletierten PC-3-Zellen erheblich geringer (Abb. 3-41).

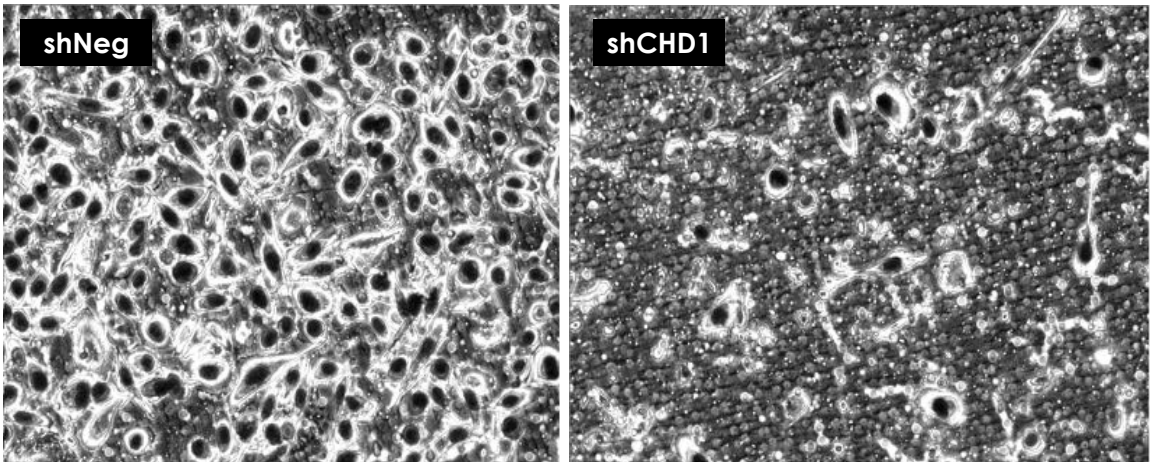


Abbildung 3-41: Beispielhafte Darstellung von Zellen, die die Matrix eines Invasion-Assays durchwandern konnten

3.7 Funktionelle Analysen zur Klärung der molekularen Konsequenzen der CHD1-Inaktivierung

3.7.1 Bedeutung der CHD1-Inaktivierung für die Entstehung von TMPRSS2:ERG-Fusionen

Das Auftreten von *CHD1*-Deletionen ist signifikant mit ERG-negativen Tumoren assoziiert. Um zu prüfen, ob eine CHD1-Deletion eine *TMPRSS2:ERG*-Fusion verhindert, wurden Doppelstrangbrüche in LNCaP-Zellen mit normalen wie auch depletierten CHD1-Status induziert und diese auf einen Bruch des *ERGs* hin untersucht. Die Induktion von Doppelstrangbrüchen erfolgte über eine Behandlung mit Doxorubicin und Dihydrotestosteron (DHT). Doxorubicin gehört zur Stoffgruppe der Anthracycline, die DNA-Doppelstrangbrüche erzeugen können. Das DHT, als Metabolit des Testosterons, wurde zur Aktivierung des AR-Signalweges eingesetzt, da die AR-Signaltransduktion eine wichtige Voraussetzung für die Entstehung von Translokationen ist (135, 136). Der Nachweis der Brüche im *ERG* erfolgte mittels einer Break-Apart-FISH-Sonde. Die Kontrollzellen zeigten mit 4,7 ± 0,3 *ERG*-Brüchen pro 100 Nuklei eine deutlich höhere Rate als die CHD1-depletierten Zellen, die in 0,3 ± 0,3 von 100 Nuklei ein gebrochenes *ERG* aufwiesen (p=0,0008). Ein mittels FISH nachgewiesener Bruch im *ERG* ist in Abb. 3-42 zu sehen.

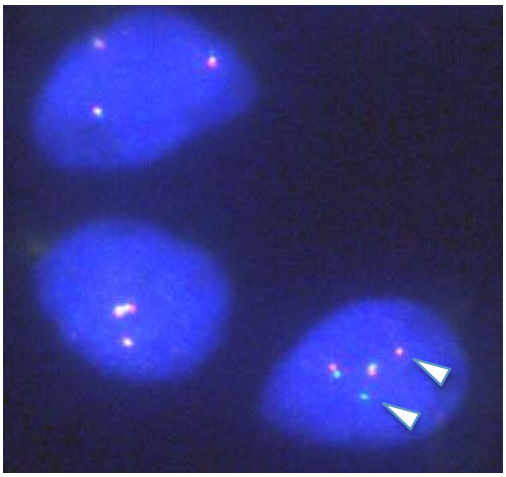


Abbildung 3-42: Nukleus mit einem Bruch im ERG in mit Doxorubicin und Dihydrotestosteron behandelten LNCaP-Zellen, nachgewiesen per FISH

Der Nachweis erfolgte über eine Zweifarben-Break-Apart-FISH: Eine grün-markierte Sonde markiert das 5'-Ende des ERG und eine orange-markierte Sonde das 3'-Ende. Ein Bruch ist im unteren rechten Zellkern zu sehen, die Pfeile markieren die durch den Bruch voneinander entfernt liegenden zwei Sonden des 5'- und 3'-Endes.

Induzierbarkeit von TMPRSS2:ERG-Fusionen in AR-negativen Prostatazelllinien

Um zu prüfen, ob eine Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen auch unabhängig vom AR-Status möglich ist, wurden oben beschriebene Versuche parallel in der AR-positiven LNCaP und den AR-negativen BPH-1, DU145 und PC-3 durchgeführt. Während in der AR-positiven Zelllinie LNCaP 4 % der Zellen einen Bruch im ERG aufwiesen, war dies bei den AR-negativen nur bei 0,5 bis 1,5 % der Fall (Abb. 3-43).

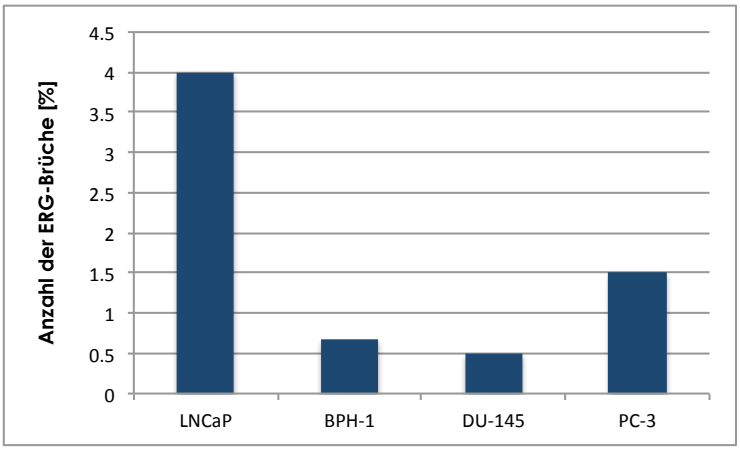


Abbildung 3-43: Anzahl der induzierbaren ERG-Brüche in einer AR-positiven (LNCaP) und drei AR-negativen PCA-Zelllinien

3.7.2 Einfluss von CHD1 auf den AR-Signalweg

Um den Effekt von CHD1 auf die AR-abhängige Transkription zu untersuchen, wurde die Expression verschiedener AR-abhängiger sowie AR-unabhängiger Gene in Abhängigkeit vom CHD1 untersucht. CHD1-depletierte Zellen sowie shGFP-Kontrollen wurden mit Dihydrotestosteron (DHT) stimuliert, um AR-abhängige Gene zu aktivieren. Nach 48 Stunden wurde die Expression einiger AR-abhängiger sowie AR-unabhängiger Gene per qPCR gemessen. Als AR-abhängig wurden *TMPRSS2, KLK4, FKBP5, SLC45A3* und *PPARγ* ausgewählt, als AR-unabhängig *SLC45A1* und *TP53*. Alle AR-abhängigen Gene zeigten nach DHT-Stimulation eine deutliche Einschränkung ihrer Expression in CHD1-depletierten Zelllinien gegenüber den CHD1-normalen shGFP-Kontrollen. Die nicht AR-abhängigen Gene *SLC45A1* und *TP53* zeigten keine Reaktion auf eine DHT-Stimulation, weder in CHD1-depletierten, noch in den Kontrollzellen (Abb. 3-44).

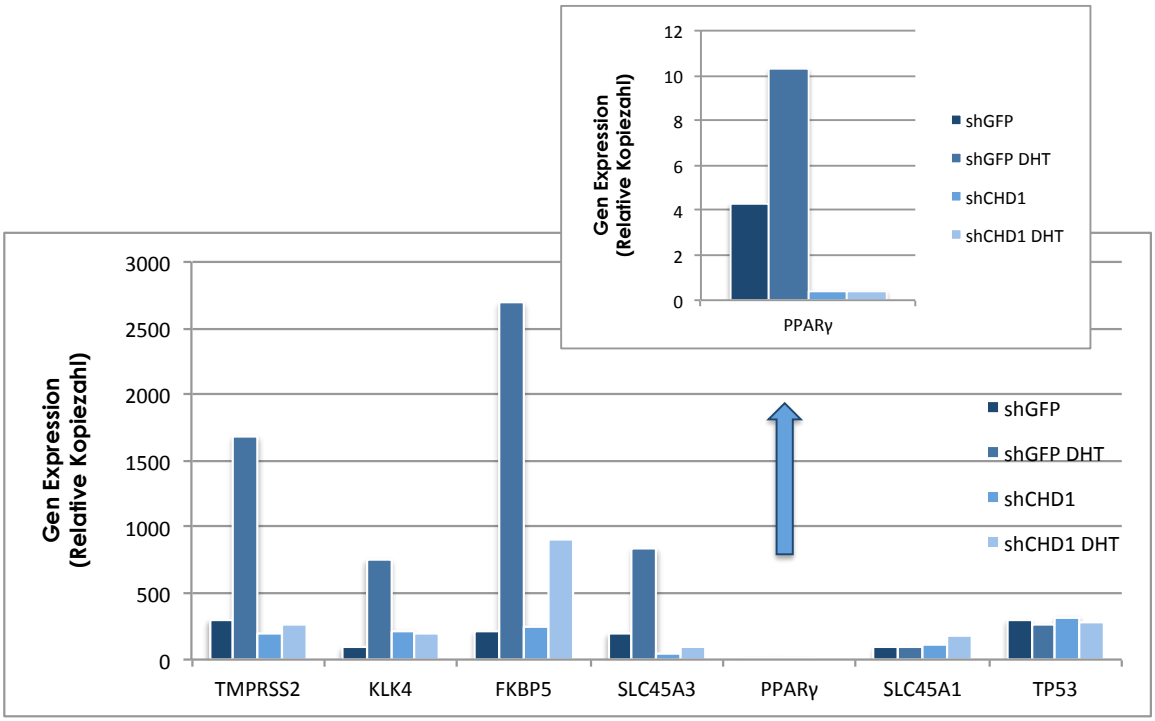


Abbildung 3-44: Abhängigkeit der Induzierbarkeit der Expression AR-abhängiger Gene vom CHD1-Depletionsstatus

Expression von AR-abhängigen Genen (TMPRSS2, KLK4, FKBP5, SLC45A3 und PPARγ) und AR-unabhängigen Genen (SLC45A1 und TP53) in mit DHT stimulierten und nicht stimulierten Prostatakarzinomzellen. CHD1-depletierte Zellen wurden durch „shCHD1" und die nicht depletierten Kontrollen mit „shGFP" betitelt. Es wurde die Expression relativ zu GAPDH per qPCR mit TaqMan-Sonden bestimmt.

Die Rolle von CHD1 bei der AR-Bindung an Promotoren AR-abhängiger Gene

Um zu prüfen, ob CHD1 die Bindung von AR an Promotoren der von AR regulierten Gene beeinflusst, wurden Chromatinimmunopräzipitationsexperimente (ChIP) durchgeführt, mit Hilfe derer bestehende Protein-DNA-Bindungen nachgewiesen werden können. Es wurden auf diese Weise die AR-abhängigen Promotoren von *TMPRSS2, PSA, FKBP5, ELK4* und *KLK2* analysiert. Das Experiment wurde an CHD1-depletierten und normalen LNCaP Zellen unter DHT-Stimulation durchgeführt. Für die Präzipitation wurden Antikörper gegen CHD1 und AR verwendet und die selektierten DNA-Bereiche per PCR mit Primern obengenannter Promotorenregionen nachgewiesen. Es konnte somit nur dann ein PCR-Produkt detektiert werden, wenn AR bzw. CHD1 an den Promotoren der untersuchten Gene gebunden hatte.

In den Kontrollzellen konnte AR an den Promotoren aller untersuchten Gene nachgewiesen werden. In den CHD1-depletierten Zellen war kein AR an den Promotoren von *TMPRSS2* und *PSA* nachweisbar, das AR-Signal an den Promotoren der restlichen Gene war wie folgt redu ziert: *FKBP5* (1,5-fach), *KLK2* (1,8-fach) und *ELK4* (5,5-fach). CHD1 konnte an keinem der Promotoren nachgewiesen werden.

Die Rolle von CHD1 bei der AR-vermittelten Signaltransduktion

Da kein mit dem AR co-bindendes CHD1 an den Promotoren AR-regulierter Gene nachweisbar war, sollte mittels weiterer ChIP-Analysen geprüft werden, ob CHD1 AR-Signale über direkte Interaktionen mit AR vermittelt. Hierzu wurde freies AR per Immunopräzipitation von DHT-stimulierten wie nicht-stimulierten Zellen isoliert und mittels PCR auf CHD1 hin untersucht. Es konnte kein an AR-gebundenes CHD1 nachgewiesen werden.

3.7.3 Der Einfluss von CHD1 auf die Expression anderer AR-responsiver Tumorsuppressoren

Um weitere Hinweise auf eine tumorsupprimierende Wirkung von CHD1 zu erhalten, wurde die Expression bekannter Tumorsupressoren (NKX3.1, FOXO1 und PPARγ) sowie des Dedifferenzierungsmarkers AMACR in CHD1-depletierten sowie normalen LNCaP-Zellen per qPCR bestimmt. Eine CHD1-Depletion bewirkte in DHT-stimulierten, wie auch nicht stimulierten Zellen eine Reduktion der Expression von NKX3.1, FOXO1 und PPARγ. Die Expression von AMACR war bei CHD1-depletierten gegenüber normalen LNCaP-Zellen erhöht und stieg durch eine Stimulation durch DHT nochmals an (Abb. 3-45).

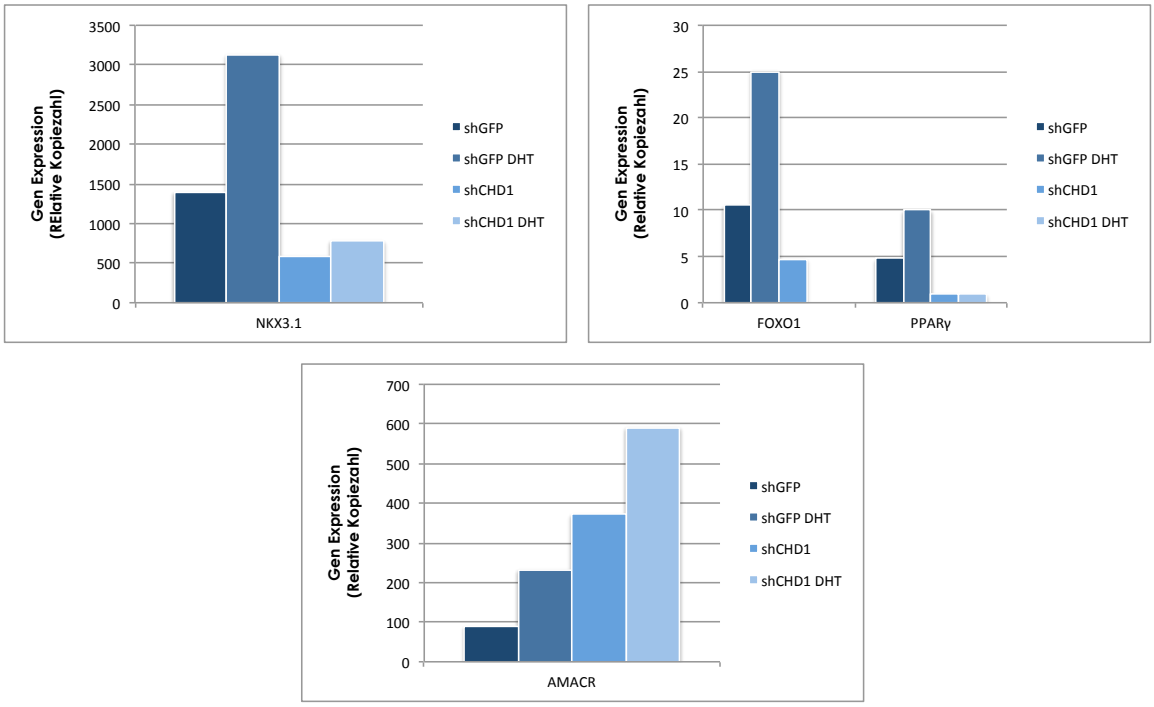


Abbildung 3-45: Der Einfluss von CHD1 auf die Expression anderer AR-responsiver Tumorsuppressoren sowie auf den Dedifferenzierungsmarker AMACR

Zusammenfassend hat sich das *CHD1* durch die geschilderten Untersuchungen als ein Gen erwiesen, das innerhalb der minimal deletierten Region der 5q21-Deletionen beim PCA liegt, eine Deletionshäufigkeit von 9,9 % aufweist und stark mit einem ERG-negativem Status assoziiert ist. Deletionen des *CHD1* sind signifikant mit fortgeschrittenem Tumorstadium und -grad sowie mit erhöhter Zellproliferation und frühem PSA-Rezidiv assoziiert. Eine Depletion wie auch die Überexpression von CHD1 in PCA-Zellkulturen führten zu einem verringerten Zellwachstum. Die Expression von AR-abhängigen Genen wurde durch eine CHD1-Depletion eingeschränkt. Mit AR an Promotoren co-bindendes CHD1 konnte jedoch an keinem der untersuchten AR-abhängigen Gene nachgewiesen werden. Auch an freies AR gebundenes CHD1 war nicht detektierbar.

4 DISKUSSION

4.1 Entwicklung eines DNA-Isolationsverfahrens zur Mate-Pair-Sequenzierung

Ein erstes Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines Verfahrens für die Isolation von DNA aus PCA-Gewebe zur Mate-Pair-Sequenzierung im Rahmen des ICGC-Konsortiums. Zum Zeitpunkt des Projektstartes (März 2011) kostete eine Mate-Pair-Sequenzierung eines einzigen Genoms rund 3.000 Euro, weshalb Fehlschläge nicht tragbar waren. Da die hier etablierte Methode den ersten Schritt innerhalb des kompletten NGS-Ablaufes darstellt, war es unabdingbar, eine außerordentliche und vor allem verlässliche Qualität der eingesetzten Nukleinsäuren zu gewährleisten. Es stellte sich heraus, dass Standardprotokolle für den Gewebeaufschluss (z.B. Stabhomogenisatoren) nicht geeignet waren, weil die DNA bei diesen Verfahren zu stark beschädigt wurde. Dementsprechend wurden diejenigen Parameter verändert, die am ehesten zum Erhalt möglichst intakter DNA bei gleichzeitig hoher Nukleinsäure-Ausbeute führen konnten. Hierbei handelte es sich um die Dicke der Gewebeschnitte sowie das enzymatische und das mechanische Aufschlussverfahren. Besonders dünne Schnitte, z.B. 4 µm, wie sie in der Histologie üblich sind, erleichtern die Freisetzung von Nukleinsäuren, da viele Zellkerne angeschnitten werden. Andererseits erhöht sich jedoch der Arbeits- und Zeitaufwand massiv, da extrem viele (d.h. mehrere hundert) Schnitte je Gewebeprobe hergestellt werden müssen. Das beste Verhältnis von DNA-Qualität, –Ausbeute und Arbeitsaufwand wurde in der vorliegenden Arbeit bei einer Schnittdicke von 16 µm erzielt. Zudem zeigte sich, dass durch ein zusätzliches kombiniertes enzymatisches und mechanisches Gewebeaufschlussverfahren die DNA-Ausbeute massiv erhöht werden konnte. Hier spielte insbesondere das mechanische Aufschlussverfahren eine Schlüsselrolle. Das „Standardverfahren" zum mechanischem Aufschluss von tierischem Gewebe mit rotierenden Messern zeigte sich als nicht geeignet, weil das Material nicht vollständig von den Messern gelöst werden konnte und daher ein Gewebeverlust entstand, der bei der limitierten Tumormenge der hier untersuchten frühen Tumoren nicht akzeptabel war. Deutlich überlegen war demgegenüber ein Aufschlussverfahren mit Keramikperlen. Hier konnten die Perlengröße, Perlenmenge und die Scherkräfte modifiziert werden. Die ausgedehnten Versuche erbrachten ein klares Optimum bei 25 Keramikperlen eines Durchmessers von 1,4 mm bei einer Geschwindigkeit von 4 m/s während einer Zeit von 20 Sekunden. Während eine höhere Perlenanzahl oder höhere Geschwindigkeit keine Verbesserung der Nukleinsäure-Ausbeute erbrachte, führte beides zu einer stärkeren Fragmentierung. Mit dem so optimierten Protokoll konnten bislang 200 PCA-Gewebeproben für das ICGC-Projekt erfolgreich bearbeitet werden (75).

Bisher wurden 39 Studien zur Mate-Pair-Sequenzierung von humanen Gewebeproben veröffentlicht, 29 von ihnen haben DNA aus Blut untersucht, was keinen mechanischen Aufschluss erfordert. Drei Studien haben DNA aus mikrodissiziertem Material verwendet. Hierbei werden

einzelne Zellen eines Gewebeschnittes per Laser isoliert, dieses Gewebe benötigt daher keinen mechanischen Aufschluss mehr. Die restlichen 7 Studien teilen sich folgendermaßen auf: Zwei der Studien haben Mammakarzinome untersucht, eine Kolonkarzinome, eine weitere sequenzierte Gewebe von Fehlgeburten, zwei Studien haben Lungenkarzinome analysiert und eine letzte Tumoren des Pharynx (Rachen) (128-134). Bedauerlicherweise hat keiner dieser Arbeitsgruppen das Vorgehen veröffentlicht, welches sich zum Gewebeaufschluss des jeweiligen, in ihrer Studie untersuchten Gewebes, als geeignet erwiesen hat. Das NGS und insbesondere die Mate-Pair-Sequenzierung ist eine noch relativ wenig verbreitete Methode, die jedoch rasanten Zuwachs erfährt. Es wäre daher von großer Hilfe für zukünftige Studien, eine Art Protokoll-Katalog zu erstellen, in dem die optimalen Verfahren für die jeweiligen Gewebearten protokolliert werden. Die hohe Anzahl von 200 Prostatakarzinomen, die auf Grundlage der in dieser Arbeit etablierten Methode per NGS sequenziert wurden, eignete sich in hohem Maße, ein Standardverfahren zu etablieren, mit Hilfe dessen DNA für Mate-Pair-Sequenzierungen aus PCA-Gewebe bereitgestellt werden kann.

Die ersten elf PCA-Genome, deren DNA auf die oben beschriebene Weise mittels Mate-Pair-Sequenzierung analysiert wurden (75), erbrachten Ergebnisse, die mit vorherigen Untersuchungen des PCA durch andere Methoden sehr gut übereinstimmen. Ein Vergleich der hier gefundenen Deletionen mit einer Studie von Taylor et al über 218 PCA, sowie mit Daten der eigenen Arbeitsgruppe über 72 PCA, die beide Kopiezahlveränderungen mittels aGCH untersucht haben (84,98), ergab hohe Übereinstimmungen der deletierten Regionen. Als einer der am häufigsten deletierten Bereiche des PCA fehlt der p-Arm des Chromosoms 8 in 26-78 % aller Prostatakarzinome (84-86,98). Die Deletionsrate von 36 % innerhalb des NGS-Kollektivs liegt hierbei im unteren Bereich. Die bisher genaueste Deletionsanalyse des Bereiches 10q24 wurde von Krohn et al. durchgeführt, die 2.262 PCA mittels FISH untersuchten und 20 % der Fälle als deletiert beschrieben. Dies deckt sich mit der innerhalb der ICGC-Proben detektierten Rate von 18 %. Ebenfalls 18 % der hier untersuchten Karzinome zeigen einen Verlust auf 12p, eine Region, für die bisher eine Deletionsrate von 15 – 61 % beschrieben wurde (84-86). Ein besonders großer Bereich von 13q12 bis 13q31 fehlt in unserem Patientenkollektiv in 45 % der Karzinome und deckt sich somit mit den 17-52 % der in der Literatur beschriebenen Rate (84-86). Auch der Anteil der 16q24-deletierten Tumoren unseres Kollektivs passt mit 27 % zu der von Sun et al., Taylor et al. und Krohn et al. detektierten Rate, die 18 - 37 % Deletionen dieser Region nachweisen konnten (84,86,98). Neben den hohen Übereinstimmungen gab es jedoch auch Abweichungen. Diese betrafen Deletionen von 3p und 6q, wobei 3p häufiger (27 % gegenüber 15 – 21 %) und 6q weniger häufig (18 % gegenüber 20 – 62 %) als in vorhergegangenen Studien gefunden wurden (84-86, 98). Dies hängt mit hoher Wahrscheinlichkeit damit zusammen, dass diese Veränderungen eine ausgesprochen stark positive (3p) bzw. negative (6q) Assoziation zur TMPRSS2:ERG-Fusion aufweisen (91, 142). Dass insgesamt 8 von

11 der per NGS sequenzierten PCA ERG-positiv waren, erklärt somit die höhere Rate an 3p-Deletionen und die geringere Rate an 6q-Deletionen.

TMPRSS2:ERG-Fusionen treten in 40 – 60 % der Prostatakarzinome auf (77). In den meisten Fällen entstehen sie durch eine Deletion der zwischen diesen Genen liegenden Region. Das hier untersuchte Kollektiv bestand ausschließlich aus jungen Patienten mit frühen Tumoren, mit dem Ziel Veränderungen ausfindig zu machen, die frühe Ereignisse in der Tumorgenese darstellen könnten. Eine Erklärung für den deutlich erhöhte Anteil der ERG-positiven Tumoren in dieser Patientenkohorte könnte in der vermuteten Androgenabhängigkeit der *TMPRSS2:ERG*-Fusion liegen. Zwei unabhängige Arbeitsgruppen, Lin et al. und Mani et al. haben diese These untersucht und kamen beide zu dem Schluss, dass die Entstehung der *TMPRSS2:ERG*-Fusion durch den Einfluss von Androgen und damit verbundenen chromosomalen Bewegungen begünstigt wird (135,136). So folgern Lin et al. aus ihren Ergebnissen, dass durch die Bindung von AR an intronischen Bindungsstellen chromosomale Umstrukturierungen ausgelöst werden, mit dem Ziel andere AR-Liganden in die Nähe des AR zu bringen. Durch diesen Vorgang können Doppelstrangbrüche begünstigt werden. Unter der Berücksichtigung, dass die Testosteronmengen bei Männern kontinuierlich mit dem Alter abnehmen (137,138), unterstützt die Beobachtung, dass *TMPRSS2:ERG*-Fusionen in unserem Kollektiv junger PCA-Patienten häufiger auftreten als in Vergleichskohorten älterer Patienten, diese These vollkommen. Auffällig ist, dass keiner der hier untersuchten Prostatakarzinome einen Verlust der sonst sehr häufig deletierten Region um 5q21 zeigt. Dies könnte im Umkehrschluss zu oben diskutierter Beobachtung ein Hinweis darauf sein, dass 5q21-Deletionen eine Veränderung darstellen, die entweder erst im höherem Patientenalter auftreten, oder aber ein spätes Ereignis im Tumorgeschehen darstellen. Neben chromosomalen Deletionen konnten außerdem 20-90 (im Durchsnitt 45) chromosomale Umstrukturierungen pro Patient detektiert werden, wobei es sich in den meisten Fällen um Translokationen handelte. Hierunter fielen auch komplexe Rearrangements wie z.B. die in Abb. 3-29 dargestellte aufwendige Translokation zwischen PTEN und einer Region auf Chromosom 2.

4.2 Untersuchungen des 5q21-Lokus des Prostatakarzinoms

Zur Untersuchung der Art und Häufigkeit von 5q21-(CHD1-)-Deletionen im Prostatakarzinom wurden im Rahmen dieser Arbeit 12.427 Tumoren mittels FISH analysiert. 5q21-Verluste konnten in 9,9 % der PCA nachgewiesen werden. Andere Studien haben mit Hilfe von CGH-Analysen Deletionsraten dieser Region von 13 bis 26 % detektiert (81,82,84,86) und liegen somit leicht über der in dieser Arbeit ermittelten Rate. Diese Diskrepanz könnte auf den unterschiedlichen methodischen Verfahren beruhen, die zur Durchführung der Studien gewählt wurden. Im Gegensatz zu den vorherigen Studien wurden die vorliegenden Ergebnisse mittels der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) ermittelt. Da bei dieser Methode einzelne Tumorzellen direkt am Gewebeschnitt analysiert werden, entfallen typische Messfehler, die bei der Analyse isolierter DNA auftreten können. Da es sich bei Tumorgewebeproben niemals um „reines" Tumorgewebe handelt, sondern unweigerlich auch nicht-Tumorzellen (Lymphozyten, Stromazellen, Endothel, Nerven, ect.) miterfasst werden, besteht die isolierte DNA immer auch zu einem gewissen Teil aus genetisch normaler DNA. In einem idealen Fall mit reinem (100 %) Tumorgewebe wäre bei einer heterozygoten Deletion eines beliebigen Genes das Verhältnis der Kopiezahlen eines heterozygot deletierten Genes zu einem nicht deletierten Gen 1:2, was einer Kopiezahlratio von 0,5 entspricht. In einer realen Probe jedoch, mit einem Tumorzellgehalt von beispielsweise 70 % oder gar nur 50 %, steigt die Ratio auf 0,65 bzw. 0,75. Aus diesem Grunde werden bei der Analyse von isolierter DNA meist weniger stringente Schwellenwerte verwendet, z. B. eine Ratio von ≤ 0,8 (anstatt der theoretischen 0,5) für heterozygote Deletionen. Dieses Vorgehen kann zu einer leichten Überschätzung der wahren Deletionsrate führen. Im Gegensatz dazu können bei der FISH-Analyse die Tumorzellen unter dem Mikroskop identifiziert und gezielt ausgewertet werden. Zusätzlich zur methodisch bedingten höheren Ge nauigkeit der FISH-Methode wurden bei der Auswertung der FISH-Daten zudem besonders stringente Kriterien angewandt. Um zu berücksichtigen, dass beim Vorgang des Zuschneidens der untersuchten Gewebeschnitte immer auch einige Zellkerne durchtrennt werden, und infolge dessen FISH-Signale verloren gehen, wurden Zellen nur dann als 5q21-deletiert gewertet, wenn mindestens 60 % der Tumorzellen eine Deletion aufwiesen. Dieser Cut-off-Wert wurde in einer vorherigen Studie der eigenen Arbeitsgruppe durch den Vergleich von PTEN-Deletionen ermittelt, die zum einen mittels aCGH, zum anderen mittels FISH detektiert wurden (83). Bei der 5q21-FISH-Analyse musste auf eine Referenzsonde eines anderen Chromosoms (Zentromer 10) zurückgegriffen werden, weil Zentromersonden für Chromosom 5 nicht hergestellt werden können bzw. nicht kommerziell erhältlich sind. In einer idealen FISH-Analyse wird zusätzlich zum untersuchten Gen-Lokus (hier: 5q21) auch das Zentromer des entsprechenden Chromosoms (hier Chromosom 5) untersucht, um spezifische Deletionen von 5q21 von unspezifischen Kopiezahlveränderungen (z.B. durch Monosomie oder Polyploidie des gesamten Chromosoms 5) unterscheiden zu können. In der vorliegenden Studie wurde als Referenz eine Zentromersonde für Chromosom 10 verwendet. Ein gravierender Messfehler durch die Ver-

wendung einer Zentromer-10-Sonde kann jedoch ausgeschlossen werden, weil Aneuploidie beim PCA äußerst selten auftritt (139,140).

In dem hier untersuchten Kollektiv traten heterozygote Deletiotionen (7,5 %) mehr als dreimal so häufig auf wie homozygote (2,4 %). Dieses Verhältnis steht in Einklang mit einer Studie von Taylor et al., die Kopiezahlveränderungen an 218 PCA untersuchten (84). Liu et al., die 244 PCA ausschließlich auf homozygote Deletionen untersucht haben, beschreiben eine Häufigkeit von 8,8 % homozygot deletierter Fälle (82). Lapointe, Sun und Huang et al. hingegen konnten in ihren CGH-Analysen keine homozygoten Deletionen dieser Region nachweisen (81,85,86). Dieser Umstand könnte abermals auf die abweichende Methodik zurückzuführen sein, mit der die Studien durchgeführt wurden. Vor allem durch die, bei der CGH kaum zu vermeidende Verunreinigung des Probenmaterials mit Normalgewebe, kann es leicht zu Nachweisproblemen homozygoter Deletionen kommen. Es ist natürlich auch denkbar, dass die im Vergleich zur vorliegenden Studie deutlich kleineren Patientenkollektive der vorherigen Studien weniger repräsentative Zusammensetzungen (z.B. hinsichtlich Tumorstadium und Gleason Grad) aufweisen als die hier untersuchte besonders große Kohorte von 12.426 Tumoren.

Die große Anzahl von Tumoren in dieser Studie erlaubte einen Vergleich der 5q21-Deletion mit der häufigsten Veränderung des Prostatakarzinoms, nämlich der *TMPRSS2:ERG*-Fusion. Bislang konnten mehrere Studien verschiedene Deletionen des PCA mit einem ERG-positiven bzw. ERG-negativen Status des Tumors korrelieren. So liegen 3p13-, PTEN- und TP53-Deletionen vermehrt in ERG-positiven Tumoren vor, während 6q-Deletionen vorwiegend den ERG-negativen PCA zugeordnet werden (62,64,83,84,91,141-143). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass auch die 5q21-Deletion den ERG-fusionsnegativen Tumoren zuzuordnen ist. Dieses Ergebnis passt gut zur Beobachtung von anderen Arbeitsgruppen an erheblich kleineren Kollektiven mit 50 bis 244 PCA, die zumindest eine geringere Rate von 5q21-Deletionen in ERG-positiven im Vergleich zu ERG-negativen Tumoren fanden (62,64,82,84).

Bemerkenswerterweise traten die seltenen homozygoten Deletionen praktisch ausschließlich in den fusionsnegativen PCA auf. Aufgrund der hohen Fallzahl dieser Studie konnte dieser Zusammenhang mit einer hohen statistischer Signifikanz aufgedeckt werden. Dieser überraschende Befund wurde zeitgleich zur vorliegenden Arbeit auch von einer anderen Arbeitsgruppe publiziert (82) und lässt die Vermutung zu, dass entweder der Verlust von 5q21 einen Selektionsvorteil für ERG-negative Tumoren darstellt, ERG eine 5q21-Deletion verhindert oder dass eine 5q21-Deletion ERG-Fusionen verhindert. Diese Vermutung wirft gleichzeitig die Frage auf, welches Gen innerhalb der 5q21-Region hierbei eine relevante Rolle, sowohl für den ERG-Status, wie auch für eine generelle tumorrelevante Funktion dieser Veränderung, spielen könnte.

Das mutmaßliche Tumorsuppressor-Gen (TSG) der 5q21-Deletion kann anhand verschiedener Kriterien eingegrenzt werden: Erstens müsste es in den 5q21-Deletionen aller Proben vorhanden sein. Zweitens sollte es eine Funktion haben, die mit einer Rolle als Tumorsuppressor vereinbar wäre. Drittens sollte eine Deletion der 5q21-Region eine Herabregulierung des Expressionsniveaus des entsprechenden Proteins zur Folge haben. Alle diese Kriterien treffen einzig auf das Gen *CHD1* zu. Reanalysen vorhergegangener Array-CGH-Untersuchungen konnten einen minimal deletierten Bereich über alle Proben eingrenzen, der nur die Gene *CHD1* und *RGMB* einschließt. Als Chromatinremodeler ist CHD1 entscheidend an der Verschiebung von Histonen zur Freilegung von zu transkribierenden DNA-Bereichen beteiligt und hält das Chromatin in einem offenen, der Transkription zugänglichen Status (107,113,116). Die meisten Vertreter der CHD-Familie konnten bislang mit einem Tumorgeschehen in Verbindung gebracht werden, dabei ist *CHD5* in mehreren Tumortypen deletiert und dem *CHD8* wurde sogar eine Funktion innerhalb der Transkription Androgen-abhängiger Gene im Prostatakarzinom nachgewiesen (120,122,144). Schließlich zeigten in der vorliegenden Studie via FISH identifizierte Tumoren mit 5q21-Deletionen in mRNA-Expressionsanalysen eine signifikante expressionelle Herabregulierung von *CHD1* gegenüber den Tumoren ohne 5q21-Verlust. Die weiteren funktionellen Analysen in PCA-Zelllinien bestätigten schließlich die Tumorsuppressorfunktionen von *CHD1*. In drei verschiedenen PCA-Zelllinien konnte eine drei bis zehnfache Reduktion des Zellwachstums der CHD1-überexprimierten Zellen gegenüber CHD1-unveränderten Zellen beobachtet werden, was dem Verhalten der als Vergleich mitgeführten RB1- (bekanntes TSG) und PTEN- (essentiellles TSG) deletierten Zellen entsprach. Weil die Depletion von CHD1 (genau wie die von PTEN) ebenfalls zu einer verringerten Zellproliferation führte, muss davon ausgegangen werden, dass es sich um ein *essentielles* TSG handelt. CHD1 hat offensichtlich tumorsuppressive Eigenschaften, weil die Überexpression das Wachstum von Tumorzellen hemmt, gewisse Level des Proteins sind aber für das Überleben der Zelle (auch der gesunden) notwendig, weshalb eine starke Depletion ebenfalls eine Wachstumshemmung zur Folge hat. Weil die Tumoren in der vorliegenden Studie in der Regel eine heterozygote 5q21-Deletion haben, scheinen sie diesen kritischen Level nicht zu unterschreiten. Es ist bislang unbekannt, wie eine verminderte CHD1-Aktivität auf molekularer Ebene die Tumorprogression begünstigt. Liu et al. vermuten jedoch, dass CHD1 aufgrund seiner Chromatinmodifizierenden Funktion einen gewissen protektiven Effekt auf die strukturelle Integrität des Genoms haben könnte, und der Verlust von *CHD1* mit erhöhter genetischer Instabilität assoziiert sein könnte (82). Zudem spielen möglicherweise additive oder kooperative Effekte durch gleichzeitige Inaktivierung von Genen in anderen Deletionsregionen hierbei eine Rolle. Dazu passt die Beobachtung aus der vorliegenden Studie, dass Tumoren mit 5q21-Deletionen eine Anreicherung anderer Deletionen (vor allem 2q, 6q, 10q, 12p, 13q und 18q) aufweisen. Es ist denkbar, dass in diesen Regionen Gene lokalisiert sind, die direkt oder indirekt mit *CHD1* bzw. dessen Verlust interagieren und so die Tumorprogression vorantreiben.

Um die Hypothesen zu prüfen, dass 5q21-Deletionen ERG-Fusionen verhindern, und das entscheidende Gen hierbei das *CHD1* ist, wurden DNA-Brüche in *CHD1*-normalen und *CHD1*-depletierten PCA-Zellkulturen induziert und die Anzahl der entstandenen *ERG*-Brüche per FISH ermittelt. Da die *TMPRSS:ERG*-Fusionen vor allem durch über AR-Signalkaskaden verursachte chromosomale Umstrukturierungen begünstigt werden (135,136), wurden die Strangbrüche sowohl mit dem Interkalans Doxorubicin als auch mit Dihydrotestosteron (DHT), induziert. DHT ist ein Metabolit des Testosterons, welches an den Androgenrezeptor bindet und damit Androgen-abhängige Prozesse stimuliert (145,146). Mit durchschnittlich 0,3 ERG-Brüchen pro 100 Nuklei zeigten CHD1-depletierte LNCaP-Zellen eine 15-fach geringere Neigung zu *ERG*-Rearrangements als CHD1-normale Kontrollzellen, die im Durchschnitt 4,7 Brüche zeigten. Um zu prüfen, ob dieser Zusammenhang direkt vom AR-Signaling abhängt, wurden die gleichen Versuche in AR-positiven und AR-negativen Zelllinien durchgeführt und zeigten eine 2,7 bis 8-fach geringere Anzahl von *ERG*-Brüchen in CHD1-depletierten zu CHD1-normalen Zellen. Um die hieraus abzuleitenden Vermutungen zu unterstützen, dass sowohl CHD1 wie auch AR eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von ERG-Brüchen spielen, wurden die zuvor beschriebenen Versuche nochmals parallel in der AR-positiven Zelllinie LNCaP wie auch in den drei AR-negativen Zelllinien BPH-1, DU145 und PC-3 durchgeführt. Die Anzahl der *ERG*-Brüche in den AR-negativen Zellen war gegenüber der in der AR-positiven Zelllinie um 2,7 bis 8-fach erniedrigt. Diese Beobachtung unterstreicht die Vermutung, dass CHD1 eine Rolle bei der Entstehung von *ERG*-Fusionen spielt und bestätigt gleichzeitig die von Mani et al. und Lin et al. aufgestellte Hypothese, dass AR-Signaling direkt an der Entstehung von chromosomalen Brüchen beteiligt ist (135,136).

Der Einfluss des CHD1 auf die Entstehung von *ERG*-Brüchen könnte somit möglicherweise auf eine Interaktion des CHD1 mit dem AR zurückzuführen sein. Es wurden daher Expressionsanalysen von mehreren AR-abhängigen wie auch AR-unabhängigen Genen in CHD-depletierten wie CHD1-normalen Zellen vor und nach DHT-Stimulation durchgeführt. AR-abhängige, CHD1-normale Zellen zeigten eine starke Überexpression der AR-abhängigen Gene nach DHT-Stimulation, während dieser Effekt bei CHD1-depletierten Zellen ausblieb oder stark verringert war. AR-unabhängige Zellen zeigten keine Veränderung ihres Expressionsmusters, weder in CHD1-normalen noch in CHD1-depletierten Zellen. CHD1 scheint somit einen Einfluss auf das AR-Signaling zu haben. Als Transkriptionsfaktor steuert AR die Transkription Androgen-abhängiger Gene durch die Bindung an deren Promotorregionen. Um zu untersuchen, ob CHD1 einen Einfluss auf diesen Mechanismus hat, wurden AR-spezifische Immunpräzipitationsexperimente an CHD1-normalen wie auch CHD1-depletierten LNCaP-Zellen durchgeführt. Die so selektierte DNA wurde in einer für die Promotorregion verschiedener AR-responsiver Gene spezifischer PCR analysiert. Die massiv verminderte AR-Bindung an den untersuchten Promotoren nach CHD1-Depletion belegt die Rolle von CHD1 bei der Regulation AR-abhängiger Gene. Weitere Experimente zeigten, dass CHD1 jedoch weder direkt an den AR,

noch an die Promotorenregionen AR-abhängiger Gene bindet. Aufgrund seiner Funktion als Chromatinremodeler erscheinen diese Befunde erwartet und plausibel. Durch die Translokation von Histonen legt CHD1 DNA-Bereiche frei(147-149), bei denen es sich offensichtlich auch um Promotorregionen AR-abhängiger Gene handeln kann. Der Einfluss von CHD1 auf das AR-Signaling beruht daher höchstwahrscheinlich vor allem auf der bekannten Chromatin-modifizierenden Funktion von CHD1.

Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass die *ERG*-Fusion ein frühes Ereignis innerhalb der Tumorgenese darstellt (150-152). Geht man davon aus, dass 5q21-Deletionen ERG-Rearrangements verhindern können, so müssten auch 5q21-Deletionen eine frühe Aberration bei der PCA-Entstehung darstellen. Um diese Hypothese zu testen, wurden Großflächenschnitte nach Vorstufen des Prostatakarzinoms, sogenannten High-Grade prostatischen intraepithelialen Neoplasien (HG-PIN) durchsucht, die neben einem 5q21-deletierten invasiven Prostatakarzinom lokalisiert waren. Zwei von vier solcher Fälle zeigten einen 5q21-Verlust sowohl in der HG-PIN als auch im Karzinom. Diese Beobachtung erhärtet die These, dass 5q21-Deletionen ein frühes Ereignis innerhalb der Tumorprogression darstellen können.

Dass ein frühes Ereignis innerhalb der Tumorentstehung nicht zwangsläufig bedeutet, dass diese Veränderung vermehrt in jungen Patienten auftritt, zeigt die Tatsache, dass keiner der per NGS untersuchten Tumoren junger Patienten eine 5q21-Deletion aufwies. Es könnte sich bei dieser Aberration also um ein Ereignis handeln, dass zwar früh während der Tumorgenese entsteht, dies aber vorwiegend in älteren Patienten. Tatsächlich zeigte sich eine signifikante Assoziation von 5q21-Deletionen und steigendem Patientenalter. Der gleiche Zusammenhang bestand interessanterweise auch für die im PCA häufig auftretenden 6q15- und 10q23-Deletionen. Im Gegensatz dazu waren *ERG*-Fusionen in umgekehrter Weise mit jungen Patienten assoziiert. Da das AR-Signaling eine bedeutende Rolle bei der Entstehung von strukturellen Veränderungen, und somit auch von *ERG*-Fusion, spielt (135), könnte diese Beobachtung darauf zurückzuführen sein, dass der Testosteronspiegel erwiesenermaßen bei jungen Männern höher ist als bei älteren (137,138). Tatsächlich wiesen die mittels NGS untersuchten Karzinome junger Patienten eine besonders große Anzahl von strukturellen Veränderungen in Androgen-regulierten Genen im Vergleich zu älteren Patienten auf (75). Die beim PCA häufig vorkommenden 5q21-, 6q15- und 10q23-Deletionen wurden hingegen bisher noch nicht als Androgen-abhängig beschrieben, und spielen offenbar vielmehr eine besondere Rolle bei der Entstehung des „klassischen“ Prostatakarzinoms älterer Männer (> 50 Jahre). Prostatakarzinome junger Patienten sind also offenbar eine eigene Klasse, die sich von den „klassischen“ PCA älterer Patienten genetisch unterscheiden.

Eine weitere Frage dieser Arbeit war, welche Rolle die 5q21-Deletion für die Aggressivität des Prostatakarzinoms und den klinischen Verlauf der Erkrankung spielt. Der Vergleich mit klinisch-

pathologischen Parametern zeigte, dass die 5q21-Deletion massiv mit fortgeschrittenen und entdifferenzierten Tumoren, erhöhter Tumorzellproliferation[1] sowie einer verkürzten Zeit bis zum biochemischen Rezidiv assoziiert ist.
Der postoperative Wiederanstieg des PSA-Wertes ist ein wichtiger Prognoseparameter, da dies ein Hinweis für nicht vollständig entfernte und proliferierende Tumorzellen oder aber das Vorhandensein von Metastasen sein kann. Eine prognostische Aussage, die sich allein auf das PSA-Rezidiv stützt, ist jedoch unsicher, da es auch dann zu einem Anstieg des PSA kommen kann, wenn gutartige Prostatazellen zurückbleiben (155). Andere, häufig in Karzinomstudien verwendete Endpunkte, wie z.B. die Überlebenszeit nach erfolgter Behandlung oder der tumorspezifische Tod, sind beim Prostatakarzinom eher ungeeignet, da dieser Tumor meist in hohem Alter auftritt. Mit einem mittleren Erkrankungsalter von 70 Jahren ist die Wahrscheinlichkeit von Begleiterkrankungen so hoch, dass es häufig schwierig zu beurteilen ist, ob der Patient allein an den Folgen des Karzinoms oder auch der Begleiterkrankungen gestorben ist (155). Aus diesem Grund wurden von der Martiniklinik in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathologie des UKE neue Studienendpunktgruppen generiert, die Tumoren nach wesentlichen biologisch-klinisch Charakteristika einteilen (siehe Kap. 3.3.3, Tab. 15). 5q21-Deletionen zeigten auch hierbei eine signifikante Assoziation zu aggressiven Tumoreigenschaften mit ungünstiger Prognose, wobei z.B. Karzinome mit einer 5q21-Deletion ein 2,4-fach höheres Risiko der Metastasierung aufwiesen, als Karzinome mit normalem 5q21-Status.

Diese Ergebnisse decken sich mit den Beschreibungen von Taylor et al., die 5q21-Deletionen mit einer negativen Patientenprognose assoziierten, sowie mit Sun et al., die mehr 5q21-Deletionen in fortgeschrittenen Tumoren fanden, als in wenig malignen Karzinomen (84,86). Zwei weitere Arbeitsgruppen konnten ihre 5q21-Deletionsdaten nicht in dieser Weise korrelieren: Huang et al. fanden keine Assoziation zu klinischen Parametern und Lapointe et al. beschrieben sogar eine Assoziation von 5q21-Deletionen zu einer positiven Prognose (81,85). Beide Arbeitsgruppen haben ihre Ergebnisse jedoch mit aCGH-Analysen und an deutlich kleineren Patientenkohorten generiert, so dass es hier aufgrund der oben genannten Ungenauigkeiten gegenüber der FISH wie auch aufgrund der geringeren statistischen Aussagekraft zu Differenzen kommen kann.

Interessanterweise wurde die Assoziation der 5q21-Deletion mit einem aggressiven Tumortyp und einer ungünstiger Patientenprognose in unserem Kollektiv vor allem durch die Gruppe der ERG-negativen Tumoren bestimmt, in denen 5q-Deletionen besonders häufig vorkommen. Die selteneren 5q-Deletionen in ERG-positiven Tumoren spielen demgegenüber keine relevante prognostische Rolle. Es ist denkbar, dass die 5q-Deletion in Anwesenheit von ERG keine Rolle spielt, weil ERG hier die „übergeordnete“ Position einnimmt. ERG ist ein Mitglied

1 Die Zellproliferation wurde mittels KI67-IHC-Analysen nachgewiesen. Das KI67 Antigen ist nur in aktiven

der ETS-Onkogen-Familie (156) das als Transkriptionsregulator vor allem in der Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen eine Rolle spielt (157) und Apoptose-inhibierend wirkt (158). Seine unnatürliche Expression in Prostatagewebe dereguliert zahlreiche Signalwege wie z.B. TGF-β[2] und WNT[3] und führt zu einem stark verändertem Expressionsmuster des Gewebes (162), so dass PCA-Zellen, die eine ERG-Expression zeigen, ohnehin schon stark dereguliert sind. Es ist also möglich, dass eine 5q21-Deletion in diesem molekularen Umfeld keinen für die Prognose entscheidenden Einfluss mehr hat, und daher nur in den ERG-negativen Tumoren signifikant mit den Charakteristiken eines aggressiven Tumortyps assoziiert ist.

Die besonderer Rolle der 5q21-Deletion in ERG-negativen Karzinomen wird auch durch die Ergebnisse der multivariaten Analyse unterstrichen. Hier zeigte sich, dass die 5q21-Deletion insbesondere in ERG-negativen Tumoren einen starken Prognosemarker darstellt – und zwar unabhängig sogar von den stärksten klassischen Prognosemarkern des PCA, nämlich dem definitiven Gleason Score, Tumorstatus und Nodalstatus, die erst nach der Operation bestimmt werden können. Im Gegensatz dazu zeigte sich die 5q21-Deletion in ERG-positiven Tumoren lediglich von den vergleichsweise schwachen, präoperativen Prognosemarkern unabhängig. Zu diesen zählen der Gleason Grad an der Biopsie sowie das klinische Tumorstadium, die jedoch nur unzureichend das Aggressionspotential eines Tumors widerspiegeln. Es muss allerdings betont werden, dass der Nachweis einer 5q21-Deletion in einer Biopsie einen durchaus hohen klinischen Nutzen haben könnte, da sie unabhängig von diesen präoperativen Prognosefaktoren und auch unabhängig vom ERG-Status des Tumors eine Aussage über die Tumoraggressivität erlaubt. Da dem Urologen zum Zeitpunkt der Tumordiagnose für die schwierige Entscheidung, ob eine radikale Prostatektomie durchgeführt werden soll oder nicht, ja lediglich die schwachen präoperativen Prognosefaktoren zur Verfügung stehen, könnte die 5q21-(CHD1) Deletion als zusätzlicher unabhängiger Prognoseparameter eine potentielle hohe Bedeutung zukommen.

---

[2] *Transforming growth factor beta (TGFB) signaling pathway, involviert in Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose (159)*

[3] *WNT: Wingless-type MMTV integration site family member pathway, essentiell für die Embryonalentwicklung und involviert in Zellproliferation, Zellmorphologie und Zellmigration (160, 161)*

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Besonderheit des Prostatakarzinoms (PCA) liegt in der starken Diskrepanz zwischen der hohen Prävalenz (Krankheitshäufigkeit) dieser Erkrankung und dem geringen Anteil der klinisch signifikanten Tumoren, also derer, die ein echtes Gesundheitsrisiko darstellen. Da es zur Zeit jedoch noch nicht möglich ist, die langsam wachsenden nicht unmittelbar bedrohlichen Karzinome von solchen zu unterscheiden, die einen malignen Verlauf einschlagen werden, hält sich als Standardtherapie die operative Entfernung der kompletten Prostata (Prostatektomie). Infolgedessen ist das PCA stark übertherapiert. Dies hat erhebliche Belastungen sowohl für den Patienten als auch für das Gesundheitssystem zur Folge. Der zentrale Fokus der Prostatakrebsforschung liegt daher auf der Identifizierung molekularer Prognosemarker, die eine Einschätzung der Tumorprogression anhand von PCA-Biopsien zulassen mit dem Ziel, die Anzahl operativer Eingriffe zu verringern. Die translationale Forschung, deren Ziel es ist, Grundlagenforschung direkt auf den klinischen Einsatz auszurichten, spielt aus diesem Grund gerade für das PCA eine entscheidende Rolle.

Die vorliegende Arbeit verfolgte daher das Ziel, im Sinne der translationalen Forschung einen möglichen Prognosemarker für das Prostatakarzinom zu identifizieren und seinen prognostischen Nutzen zu validieren. Zu diesem Zweck wurde zunächst eine Methode entwickelt, die es ermöglicht, Mate-Pair-Sequenzierungen von Komplettgenomen per „Next Generation Sequencing“ (NGS) am PCA durchzuführen. Hierzu wurde ein Verfahren etabliert, um DNA von sowohl besonders hoher Qualität als auch maximaler Ausbeute aus limitierten PCA-Gewebemengen zu isolieren. Die Herausforderung dieses Projektteils bestand darin, ein Gewebeaufschlussverfahren zu entwickeln, mit dessen Hilfe zum einen besonders große Mengen an Nukleinsäuren aus dem Gewebe isoliert werden können, zum anderen aber gleichzeitig die Integrität der DNA trotz mechanischer Belastung in hohem Maße erhalten bleibt.

Die systematische Ermittlung der optimalen Anzahl, Größe und materiellen Beschaffenheit des eingesetzten Aufschlussmaterials führte zu dem günstigsten Maß der eingesetzten Scherkräfte. So gelang es, eine Probenaufbereitungsmethode zu entwickeln, auf deren Grundlage bislang 200 PCA im Rahmen des ICGC- (International Cancer Genome Consortium) erfolgreich auf Strukturveränderungen der DNA hin untersucht werden konnten. Diese NGS-Analysen sind innerhalb translational ausgerichteter Forschungsprojekte als Screeningsphase bei der Suche nach Prognosemarkern einzustufen.

Der zweite Projektteil dieser Studie hatte zum Ziel, die verbreitete, aber noch nicht näher untersuchte 5q21-Deletion auf ihre Häufigkeit, klinische Relevanz und das Vorhandensein eines relevanten Tumorsuppressor-Gens (TSG) hin zu untersuchen. Anhand dieser Daten sollte eine mögliche Eignung dieser Veränderung als prognostischer Marker des PCA geprüft wer-

den. Hierzu wurden PCA-Gewebe von 12.426 in Form eines Tissue Micro Arrays mittels Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung auf das Vorhandensein einer 5q21-Deletion hin untersucht und mit klinisch-pathologischen Daten dieser Tumoren, sowie der Patientenprognose korreliert. Diese Analysen ergaben, dass knapp 10 % aller PCA von einer 5q21-Deletion betroffen sind, und dass diese Tumoren signifikant mit einem aggressiven Tumortyp wie auch einer negativen Patientenprognose assoziiert sind. Weitere Untersuchungen konnten den Chromatinremodeler *CHD1* (Chromodomain Helicase DNA Binding Protein 1) als das TSG dieser Region identifizieren.

Eine Korrelation mit dem Vorhandensein der häufigsten Veränderung des PCA, der *ERG*-Fusion, zeigte eine starke Assoziation von 5q21-Deletionen mit einem *ERG*-fusions-negativen Tumortyp. Eine nähere Untersuchung dieses Zusammenhangs in Zellkulturexperimenten zeigte auf, dass die 5q21-Deletion *ERG*-Fusionen verhindert. Die Vermutung, dass dieser Zusammenhang auf einer Interaktion mit dem AR- (Androgenrezeptor) Signaling beruht, führte zu weiteren funktionellen Analysen, die einen Einfluss von CHD1 auf die AR-Funktion nachweisen konnten. *ERG*-Fusionen gelten als ein frühes Ereignis innerhalb der Tumorprogression. Aufgrund der in dieser Studie nachgewiesenen Abhängigkeit der *ERG*-Fusion von der 5q21-(*CHD1*)-Deletion wurden weiterführende Analysen durchgeführt, die die 5q21-Deletion einem Zeitpunkt innerhalb des Tumorgeschehens bzw. einem gewissen Patientenalter zuordnen sollten. Es zeigten sich Hinweise, dass diese Veränderung ebenfalls ein frühes Ereignis innerhalb der Tumorprogression darstellt, sie aber offenbar bevorzugt in älteren Patienten, und somit in den „klassischen" PCA, auftritt. Eine Korrelation mit zusätzlichen molekularen Merkmalen ergab eine Assoziation von 5q21 (*CHD1*)-Deletionen mit einer erhöhten Proliferationsaktivität sowie dem Vorhandensein anderer häufiger Deletionen des PCA. Dieser Zusammenhang, wie auch die Assoziation mit einem bösartigem Tumorphänotyp und einer negativen Patientenprognose, war besonders in den ERG-negativen Tumoren ausgeprägt.

Die vorliegende Studie stellt ein Beispiel für die Anwendung moderner Hochdurchsatzverfahren für die Etablierung neuer Prognosemarker beim Prostatakarzinom dar. Im Rahmen des Projektes konnte – anhand der ICGC-Daten - sowohl ein Katalog der häufigsten Veränderungen bei Prostatakarzinomen aufgestellt werden, als auch eine dieser Veränderungen an mehreren tausend Prostatakarzinomproben und Zelllinien funktionell wie auch klinisch validiert werden. Die Studie verdeutlich damit - neben der Relevanz modernster Sequenziermethoden - auch die zentrale Rolle von ausreichend großen Probenkollektiven mit klinischen und pathologischen Verlaufsdaten in der Ära der Biomarker-Etablierung für Diagnose und Therapie maligner humaner Tumoren.

6 VERZEICHNIS DER VERWENDETEN LITERATUR

1. Lenfant C. Shattuck lecture--clinical research to clinical practice--lost in translation? N Engl J Med. 2003;349:868–74.

2. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärlund M, Schraml P, Leighton S, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. Nat Med. 1998;4:844–7.

3. Watson JD, Crick FHC. A structure for deoxyribose nucleic acid. 1953. Nature. 2003. pages 397–8–discussion396.

4. Maxam AM, Gilbert W. A new method for sequencing DNA. Proc Natl Acad Sci USA. 1977;74:560–4.

5. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA. 1977;74:5463–7.

6. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature. 2001;409:860–921.

7. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al. The sequence of the human genome. Science. 2001;291:1304–51.

8. Collins FS, Morgan M, Patrinos A. The Human Genome Project: lessons from large-scale biology. Science. 2003;300:286–90.

9. Wadman M. James Watson's genome sequenced at high speed. Nature. 2008.

10. Gerabek WE. Enzyklopädie Medizingeschichte. 2004. pages 575–9.

11. Eckart WU, Gradmann C. Ärzte Lexikon: Von der Antike bis zur Gegenwart. 2001. pages 223–4.

12. http://www.fallsammlung-radiologie.de/ro_prostatakarzinom.html. 2015.

13. Schlott T, Eiffert H, Schmidt-Schultz T, Gebhardt M, Parzinger H, Schultz M. Detection and analysis of cancer genes amplified from bone material of a Scythian royal burial in Arzhan near Tuva, Siberia. Anticancer Res. 2007;27:4117–9.

14. Schultz M, Parzinger H, Posdnjakov DV, Chikisheva TA, Schmidt-Schultz TH. Oldest known case of metastasizing prostate carcinoma diagnosed in the skeleton of a 2,700-year-old Scythian king from Arzhan (Siberia, Russia). Int J Cancer. 2007;121:2591–5.

15. Prates C. Prostate metastatic bone cancer in an Egyptian Ptolemaic mummy, a proposed radiological diagnosis. International Journal of Paleopathology. 2011;1:98–103.

16. Robert Koch Institut RKI GDEKIDG. Krebs in Deutschland 2007/2008. 8 ed. 2012.

17. Fornara P, Semjonow A, Wagner S. Das Prostatakarzinom: Diagnostik. In: Uroonkologie, H. Rübben. 2009. Seite 521-535.

18. Siesling S, van Dijck JAAM, Visser O, Coebergh JWW, Working Group of The Netherlands Cancer Registry. Trends in incidence of and mortality from cancer in The Netherlands in the period 1989-1998. Eur J Cancer. 2003;39:2521–30.

19. Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, Tiwari RC, Ghafoor A, et al. Cancer statistics, 2005. CA: A Cancer Journal for Clinicians. 2005;55:10–30.

20. Hsing AW, Devesa SS. Trends and patterns of prostate cancer: what do they suggest? Epidemiol Rev. 2001;23:3–13.

21. Hankey BF, Feuer EJ, Clegg LX, Hayes RB, Legler JM, Prorok PC, et al. Cancer surveillance series: interpreting trends in prostate cancer--part I: Evidence of the effects of screening in recent prostate cancer incidence, mortality, and survival rates. J Natl Cancer Inst. 1999;91:1017–24.

22. Walsh PC. Prostate cancer kills: strategy to reduce deaths. Urology. 1994;44:463–6.

23. Ries LA, Eisner MP, Kosary CL, Hankey BF. SEER Cancer Statistics Review 1975-2001. Nature. 2004.

24. Haenszel W, Kurihara M. Studies of Japanese migrants. I. Mortality from cancer and other diseases among Japanese in the United States. J Natl Cancer Inst. 1968;40:43–68.

25. Heidenreich A, Abrahamsson P-A, Artibani W, Catto J, Montorsi F, Van Poppel H, et al. Early Detection of Prostate Cancer: European Association of Urology Recommendation. Eur Urol. 2013.

26. Babaian RJ, Naya Y, Cheli C, Fritsche HA. The detection and potential economic value of complexed prostate specific antigen as a first line test. J Urol. 2006;175:897–901–discussion901.

27. Catalona WJ, Smith DS, Wolfert RL, Wang TJ, Rittenhouse HG, Ratliff TL, et al. Evaluation of percentage of free serum prostate-specific antigen to improve specificity of prostate cancer screening. JAMA. 1995;274:1214–20.

28. Lilja H, Oldbring J, Rannevik G, Laurell CB. Seminal vesicle-secreted proteins and their reactions during gelation and liquefaction of human semen. J Clin Invest. 1987;80:281–5.

29. Urban S. Überraschend alt: Prostatakrebs gab es schon vor 2700 Jahren. DKFZ: Einblick. 2012;:36–7.

30. Ryan CJ, Smith A, Lal P, Satagopan J, Reuter V, Scardino P, et al. Persistent prostate-specific antigen expression after neoadjuvant androgen depletion: an early predictor of relapse or incomplete androgen suppression. Urology. 2006;68:834–9.

31. Loeb S, Roehl KA, Antenor JAV, Catalona WJ, Suarez BK, Nadler RB. Baseline prostate-specific antigen compared with median prostate-specific antigen for age group as predictor of prostate cancer risk in men younger than 60 years old. Urology. 2006;67:316–20.

32. Luboldt HJ, Altwein JE, Bichler KH, Czaja D, Hüsing J, Fornara P, et al. [Early recognition of prostate carcinoma. Initial results of a prospective multicenter study in Germany. Project Group for Early Detection DGU-BDU Laboratory diagnosis Professional Circle]. Urologe A. 1999;38:114–23.

33. Heidenreich A, Bastian PJ, Bellmunt J, Bolla M, Joniau S, van der Kwast T, et al. EAU guidelines on prostate cancer. part 1: screening, diagnosis, and local treatment with curative intent-update 2013. Eur. Urol. 2014. pages 124–37.

34. Carter HB, Hamper UM, Sheth S, Sanders RC, Epstein JI, Walsh PC. Evaluation of transrectal ultrasound in the early detection of prostate cancer. J Urol. 1989;142:1008–10.

35. Blanc M, Sacrini A, Avogadro A, Gattamorta M, Lazzerini F, Gattoni F, et al. [Prostatic volume: suprapubic versus transrectal ultrasonography in the control of benign prostatic hyperplasia]. Radiol Med. 1998;95:182–7.

36. Roehrborn CG, Sech S, Montoya J, Rhodes T, Girman CJ. Interexaminer reliability and validity of a three-dimensional model to assess prostate volume by digital rectal examination. Urology. 2001;57:1087–92.

37. Brawer M, Parson R, Donnell M, Costa M, Scheil B. Modeling the impact of prostate cancer early diagnosis on managed care plans. Clin Lab Manage Rev. 1997;11:107–12.

38. Whitmore WF. Proceedings: The natural history of prostatic cancer. Cancer. 1973;32:1104–12.

39. Kundu SD, Roehl KA, Eggener SE, Antenor JAV, Han M, Catalona WJ. Potency, continence and complications in 3,477 consecutive radical retropubic prostatectomies. J Urol. 2004;172:2227–31.

40. Toellner R. Illustrierte Geschichte der Medizin. 1982. pages 1394–447.

41. Heidenreich A, Bastian PJ, Bellmunt J, Bolla M, Joniau S, van der Kwast T, et al. EAU guidelines on prostate cancer. Part II: Treatment of advanced, relapsing, and castration-resistant prostate cancer. Eur. Urol. 2014. pages 467–79.

42. Steffens J, Echtle D, Kalem T. Endourologie. 2003. pages 22–3.

43. Schlomm T, Heinzer H, Steuber T, Salomon G, Engel O, Michl U, et al. Full functional-length urethral sphincter preservation during radical prostatectomy. Eur Urol. 2011;60:320–9.

44. Schlomm T, Huland H, Graefen M. Improving outcome of surgical procedures is not possible without adequate quality measurement. Eur Urol. 2014;65:1017–9.

45. Graefen M, Beyer B, Schlomm T. Outcome of radical prostatectomy: is it the approach or the surgical expertise? Eur Urol. 2014;66:457–8.

46. Vickers AJ, Bianco FJ, Serio AM, Eastham JA, Schrag D, Klein EA, et al. The surgical learning curve for prostate cancer control after radical prostatectomy. J Natl Cancer Inst. 2007;99:1171–7.

47. Peschel RE, Colberg JW. Surgery, brachytherapy, and external-beam radiotherapy for early prostate cancer. Lancet Oncol. 2003;4:233–41.

48. Jani AB, Hellman S. Early prostate cancer: clinical decision-making. Lancet. 2003;361:1045–53.

49. Wirth MP, Herrmann T, Alken P, Kovacs G, M x000FC ller H, Hakenberg OW, et al. Empfehlungen zur Durchführung der alleinigen, permanenten, interstitiellen Brachytherapie beim lokal begrenzten Prostatakarzinom. Der Urologe A. 2002;41:369–73.

50. Wirth M, Fröhner M. Das Prostatakarzinom: Therapie des lokal begrenzten Prostatakarzinoms. In: Uroonkologie, H. Rübben. 2009. Seite 537-554.

51. Allaf ME, Carter HB. Update on watchful waiting for prostate cancer. Curr Opin Urol. 2004;14:171–5.

52. Denis LJ, Murphy GP, Schröder FH. Report of the consensus workshop on screening and global strategy for prostate cancer. Cancer. 1995. pages 1187–207.

53. Sweat SD, Bergstralh EJ, Slezak J, Blute ML, Zincke H. Competing risk analysis after radical prostatectomy for clinically nonmetastatic prostate adenocarcinoma according to clinical Gleason score and patient age. J Urol. 2002;168:525–9.

54. Denis L, Murphy GP. Overview of phase III trials on combined androgen treatment in patients with metastatic prostate cancer. Cancer. 1993;72:3888–95.

55. Huggins C, C H. Studies on Prostatic Cancer. I. The Effect of Castration, of Estrogen and of Androgen Injection on Serum Phosphatases in Metastatic Carcinoma of the Prostate. Cancer Research. 1941;:293–7.

56. Noble RL. Sex steroids as a cause of adenocarcinoma of the dorsal prostate in Nb rats, and their influence on the growth of transplants. Oncology. 1977;34:138–41.

57. Wu CP, Gu FL. The prostate in eunuchs. Prog Clin Biol Res. 1991;370:249–55.

58. Sweeney CJ, Chen Y-H, Carducci M, Liu G, Jarrard DF, Eisenberger M, et al. Chemohormonal Therapy in Metastatic Hormone-Sensitive Prostate Cancer. N Engl J Med. 2015;373:737–46.

59. Epstein JI. Radical prostatectomy: processing, staging, and prognosis. Parts I and II. Int J Surg Pathol. 2010;18:118S–123S.

60. Mellinger GT, Gleason D, Bailar J. The histology and prognosis of prostatic cancer. J Urol. 1967;97:331–7.

61. Bott SRJ, Birtle AJ, Taylor CJ, Kirby RS. Prostate cancer management: 2. An update on locally advanced and metastatic disease. Postgrad Med J. 2003;79:643–5.

62. Barbieri CE, Baca SC, Lawrence MS, Demichelis F, Blattner M, Theurillat J-P, et al. Exome sequencing identifies recurrent SPOP, FOXA1 and MED12 mutations in prostate cancer. Nat Genet. 2012;44:685–9.

63. 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. Nature Publishing Group; 2010;:1–7.

64. Grasso CS, Wu Y-M, Robinson DR, Cao X, Dhanasekaran SM, Khan AP, et al. The mutational landscape of lethal castration-resistant prostate cancer. Nature. 2012;487:239–43.

65. Blattner M, Lee DJ, O'Reilly C, Park K, MacDonald TY, Khani F, et al. SPOP mutations in prostate cancer across demographically diverse patient cohorts. Neoplasia. 2014;16:14–20.

66. Barbieri CE, Demichelis F, Rubin MA. Molecular genetics of prostate cancer: emerging appreciation of genetic complexity. Histopathology. 2011;60:187–98.

67. Grignon DJ, Caplan R, Sarkar FH, Lawton CA, Hammond EH, Pilepich MV, et al. p53 status and prognosis of locally advanced prostatic adenocarcinoma: a

study based on RTOG 8610. J Natl Cancer Inst. 1997;89:158–65.

68. Koivisto P, Kononen J, Palmberg C, Tammela T, Hyytinen E, Isola J, et al. Androgen receptor gene amplification: a possible molecular mechanism for androgen deprivation therapy failure in prostate cancer. Cancer Research. 1997;57:314–9.

69. Visakorpi T, Hyytinen E, Koivisto P, Tanner M, Keinänen R, Palmberg C, et al. In vivo amplification of the androgen receptor gene and progression of human prostate cancer. Nat Genet. 1995;9:401–6.

70. Culig Z, Hobisch A, Hittmair A, Peterziel H, Cato AC, Bartsch G, et al. Expression, structure, and function of androgen receptor in advanced prostatic carcinoma. Prostate. 1998;35:63–70.

71. Gregory CW, Hamil KG, Kim D, Hall SH, Pretlow TG, Mohler JL, et al. Androgen receptor expression in androgen-independent prostate cancer is associated with increased expression of androgen-regulated genes. Cancer Research. 1998;58:5718–24.

72. Avila DM, Zoppi S, McPhaul MJ. The androgen receptor (AR) in syndromes of androgen insensitivity and in prostate cancer. J Steroid Biochem Mol Biol. 2001;76:135–42.

73. Bubendorf L, Kononen J, Koivisto P, Schraml P, Moch H, Gasser TC, et al. Survey of gene amplifications during prostate cancer progression by high-throughout fluorescence in situ hybridization on tissue microarrays. Cancer Research. 1999;59:803–6.

74. Petrylak DP. Chemotherapy for advanced hormone refractory prostate cancer. Urology. 1999;54:30–5.

75. 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;23:159–70.

76. Berger MF, Lawrence MS, Demichelis F, Drier Y, Cibulskis K, Sivachenko AY, et al. The genomic complexity of primary human prostate cancer. Nature. Nature Publishing Group; 2012;470:214–20.

77. Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, Dhanasekaran SM, Mehra R, Sun X-W, et al. Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. Science. 2005;310:644–8.

78. Kumar A, Shendure J, Nelson PS. Genome interrupted: sequencing of prostate cancer reveals the importance of chromosomal rearrangements. Genome Med. 2011;3:23.

79. Kumar-Sinha C, Tomlins SA, Chinnaiyan AM. Recurrent gene fusions in prostate cancer. Nat Rev Cancer. 2008;8:497–511.

80. Park K, Tomlins SA, Mudaliar KM, Chiu Y-L, Esgueva R, Mehra R, et al. Antibody-based detection of ERG rearrangement-positive prostate cancer. Neoplasia. 2010;12:590–8.

81. 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;31:4164–70.

82. 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. Nature Publishing Group; 2011;31:3939–48.

83. Krohn A, Diedler T, Burkhardt L, Mayer P-S, 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;181:401–12.

84. Taylor BS, Schultz N, Hieronymus H, Gopalan A, Xiao Y, Carver BS, et al. Integrative genomic profiling of human prostate cancer. Cancer Cell. 2010;18:11–22.

85. Lapointe J, Li C, Giacomini CP, Salari K, Huang S, Wang P, et al. Genomic Profiling Reveals Alternative Genetic Pathways of Prostate Tumorigenesis. Cancer Research. 2007;67:8504–10.

86. 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;67:692–700.

87. Kim JW, Cheng Y, Liu W, Li T, Yegnasubramanian S, Zheng SL, et al. Genetic and epigenetic inactivation of LPL gene in human prostate cancer. Int J Cancer. 2009;124:734–8.

88. Narita S, Tsuchiya N, Wang L, Matsuura S, Ohyama C, Satoh S, et al. Association of lipoprotein lipase gene polymorphism with risk of prostate cancer in a Japanese population. Int J Cancer. 2004;112:872–6.

89. Wang JY, Knudsen ES, Welch PJ. The retinoblastoma tumor suppressor protein. Adv Cancer Res. 1994;64:25–85.

90. Sellers WR, Kaelin WG. Role of the retinoblastoma protein in the pathogenesis of human cancer. J Clin Oncol. 1997;15:3301–12.

91. Kluth M, Hesse J, Heinl 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;26:975–83.

92. Eichenauer T. Identifizierung von neuen tumorrelevanten Genen: Eine genomweite Suche nach Onkogenen und Tumorsuppressorgenen bei 72 Prostatakarzinomen und 5 Zelllinien mit hochauflösender SNP-Array Technologie. Dissertation. 2011.

93. Severyn CJ, Shinde U, Rotwein P. Molecular biology, genetics and biochemistry of the repulsive guidance molecule family. Biochem J. 2009;422:393–403.

94. Petros TJ, Bryson JB, Mason C. Ephrin-B2 elicits differential growth cone collapse and axon retraction in retinal ganglion cells from distinct retinal regions. Dev Neurobiol. 2010;70:781–94.

95. Triplett JW, Feldheim DA. Eph and ephrin signaling in the formation of topographic maps. Semin Cell Dev Biol. 2012;23:7–15.

96. Marquardt T, Shirasaki R, Ghosh S, Andrews SE, Carter N, Hunter T, et al. Coexpressed EphA receptors and ephrin-A ligands mediate opposing actions on growth cone navigation from distinct membrane domains. Cell. 2005;121:127–39.

97. Lemke G. A coherent nomenclature for Eph receptors and their ligands. Mol Cell Neurosci. 1997;9:331–2.

98. Krohn A. Identifizierung, funktionelle Charakterisierung und Tumor-Relevanz häufiger Kopiezahl Veränderungen beim humanen Prostatakarzinom. Department of Pathology, University Medical School Hamburg Eppendorf; 2014.

99. Brehm A, Tufteland KR, Aasland R, Becker PB. The many colours of chromodomains. Bioessays. 2004;26:133–40.

100. Roth SY, Denu JM, Allis CD. Histone acetyltransferases. Annu Rev Biochem. 2001;70:81–120.

101. Neely KE, Workman JL. Histone acetylation and chromatin remodeling: which comes first? Mol Genet Metab. 2002;76:1–5.

102. Singh PB, Miller JR, Pearce J, Kothary R, Burton RD, Paro R, et al. A sequence motif found in a Drosophila heterochromatin protein is conserved in animals and plants. Nucleic Acids Research. 1991;19:789–94.

103. Brehm A, Längst G, Kehle J, Clapier CR, Imhof A, Eberharter A, et al. dMi-2 and ISWI chromatin remodelling factors have distinct nucleosome binding and mobilization properties. EMBO J. 2000;19:4332–41.

104. Bouazoune K, Kingston RE. Assembly, remodelled. Elife. 2013;2:e01270.

105. Flanagan JF, Mi L-Z, Chruszcz M, Cymborowski M, Clines KL, Kim Y, et al. Double chromodomains cooperate to recognize the methylated histone H3 tail. Nature. 2005;438:1181–5.

106. Hall JA, Georgel PT. CHD proteins: a diverse family with strong ties. Biochem Cell Biol. 2007;85:463–76.

107. Woodage T, Basrai MA, Baxevanis AD, Hieter P, Collins FS. Characterization of the CHD family of proteins. Proc Natl Acad Sci USA. 1997;94:11472–7.

108. Wade PA, Jones PL, Vermaak D, Wolffe AP. A multiple subunit Mi-2 histone deacetylase from Xenopus laevis cofractionates with an associated Snf2 superfamily ATPase. Curr Biol. 1998;8:843–6.

109. Wade PA, Gegonne A, Jones PL, Ballestar E, Aubry F, Wolffe AP. Mi-2 complex couples DNA methylation to chromatin remodelling and histone deacetylation. Nat Genet. 1999;23:62–6.

110. Delmas V, Stokes DG, Perry RP. A mammalian DNA-binding protein that contains a chromodomain and an SNF2/SWI2-like helicase domain. Proc Natl Acad Sci USA. 1993;90:2414–8.

111. Stokes DG, Perry RP. DNA-binding and chromatin localization properties of CHD1. Mol Cell Biol. 1995;15:2745–53.

112. Stokes DG, Tartof KD, Perry RP. CHD1 is concentrated in interbands and puffed regions of Drosophila polytene chromosomes. Proc Natl Acad Sci USA. 1996;93:7137–42.

113. Simic R, Lindstrom DL, Tran HG, Roinick KL, Costa PJ, Johnson AD, et al. Chromatin remodeling protein Chd1 interacts with transcription elongation factors and localizes to transcribed genes. EMBO J. 2003;22:1846–56.

114. Pray-Grant MG, Daniel JA, Schieltz D, Yates JR, Grant PA. Chd1 chromodomain links histone H3 methylation with SAGA- and SLIK-dependent acetylation. Nature. 2005;433:434–8.

115. Persson J, Ekwall K. Chd1 remodelers maintain open chromatin and regulate the epigenetics of differentiation. Exp Cell Res. 2010;316:1316–23.

116. Gaspar-Maia A, Alajem A, Polesso F, Sridharan R, Mason MJ, Heidersbach A, et al. Chd1 regulates open chromatin and pluripotency of embryonic stem cells. Nature. 2009;460:863–8.

117. Gu X, Xue J-Q, Zhu X, Ye M-S, Zhang W-H. Aberrant promoter methylation of the CHD1 gene may contribute to the pathogenesis of breast cancer: a meta-analysis. Tumour Biol. 2014;35:9395–404.

118. Yao H, Pan J, Wu C, Shen H, Xie J, Wang Q, et al. Transcriptome sequencing reveals CHD1 as a novel fusion partner of RUNX1 in acute myeloid leukemia with t(5;21)(q21;q22). Mol Cancer. 2015;14:81.

119. Nagarajan P, Onami TM, Rajagopalan S, Kania S, Donnell R, Venkatachalam S. Role of chromodomain helicase DNA-binding protein 2 in DNA damage response signaling and tumorigenesis. Oncogene. 2009;28:1053–62.

120. Bagchi A, Papazoglu C, Wu Y, Capurso D, Brodt M, Francis D, et al. CHD5 is a tumor suppressor at human 1p36. Cell. 2007;128:459–75.

121. Pleasance ED, Stephens PJ, O'Meara S, McBride DJ, Meynert A, Jones D, et al. A small-cell lung cancer genome with complex signatures of tobacco exposure. Nature. 2010;463:184–90.

122. Menon T, Yates JA, Bochar DA. Regulation of androgen-responsive transcription by the chromatin remodeling factor CHD8. Mol Endocrinol. 2010;24:1165–74.

123. Kim MS, Chung NG, Kang MR, Yoo NJ, Lee SH. Genetic and expressional alterations of CHD genes in gastric and colorectal cancers. Histopathology. 2011;58:660–8.

124. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. Science. 2005;307:1098–101.

125. Everett RD, Parada C, Gripon P, Sirma H, Orr A. Replication of ICP0-null mutant herpes simplex virus type 1 is restricted by both PML and Sp100. J Virol. 2008;82:2661–72.

126. Ramaswamy S, Nakamura N, Vazquez F, Batt DB, Perera S, Roberts TM, et al. Regulation of G1 progression by the PTEN tumor suppressor protein is linked to inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. Proc Natl Acad Sci USA. 1999;96:2110–5.

127. Futreal PA, Coin L, Marshall M, Down T, Hubbard T, Wooster R, et al. A census of human cancer genes. Nat Rev Cancer. 2004;4:177–83.

128. Aubry M-C, Roden A, Murphy SJ, Vasmatzis G, Johnson SH, Harris FR, et al. Chromosomal rearrangements and copy number abnormalities of TP63 correlate with p63 protein expression in lung adenocarcinoma. Mod Pathol. 2015;28:359–66.

129. Inaki K, Menghi F, Woo XY, Wagner JP, Jacques P-É, Lee YF, et al. Systems consequences of amplicon formation in human breast cancer. Genome Res. 2014;24:1559–71.

130. Liang D, Peng Y, Lv W, Deng L, Zhang Y, Li H, et al. Copy number variation sequencing for comprehensive diagnosis of chromosome disease syndromes. J Mol Diagn. 2014;16:519–26.

131. Nord KH, Lilljebjörn H, Vezzi F, Nilsson J, Magnusson L, Tayebwa J, et al. GRM1 is upregulated through gene fusion and promoter swapping in chondromyxoid fibroma. Nat Genet. 2014;46:474–7.

132. Gao G, Johnson SH, Kasperbauer JL, Eckloff BW, Tombers NM, Vasmatzis G, et al. Mate pair sequencing of oropharyngeal squamous cell carcinomas reveals that HPV integration occurs much less frequently than in cervical cancer. J Clin Virol. 2014;59:195–200.

133. Valouev A, Weng Z, Sweeney RT, Varma S, Le Q-T, Kong C, et al. Discovery of recurrent structural variants in nasopharyngeal carcinoma. Genome Res. 2014;24:300–9.

134. Jiao X, Hooper SD, Djureinovic T, Larsson C, Wärnberg F, Tellgren-Roth C, et al. Gene rearrangements in hormone receptor negative breast cancers revealed by mate pair sequencing. BMC Genomics. 2013;14:165.

135. Mani R-S, Tomlins SA, Callahan K, Ghosh A, Nyati MK, Varambally S, et al. Induced chromosomal proximity and gene fusions in prostate cancer. Science. 2009;326:1230.

136. Lin C, Yang L, Tanasa B, Hutt K, Ju B-G, Ohgi K, et al. Nuclear receptor-induced chromosomal proximity and DNA breaks underlie specific translocations in cancer. Cell. 2009;139:1069–83.

137. Liu PY, Beilin J, Meier C, Nguyen TV, Center JR, Leedman PJ, et al. Age-related changes in serum testosterone and sex hormone binding globulin in Australian men: longitudinal analyses of two geographically separate regional cohorts. J Clin Endocrinol Metab. 2007;92:3599–603.

138. Mohr BA, Guay AT, O'Donnell AB, McKinlay JB. Normal, bound and nonbound testosterone levels in normally ageing men: results from the Massachusetts Male Ageing Study. Clin Endocrinol (Oxf). 2005;62:64–73.

139. Badalament RA, O'Toole RV, Young DC, Drago JR. DNA ploidy and prostate-specific antigen as prognostic factors in clinically resecTabelle prostate cancer. Cancer. 1991;67:3014–23.

140. Haugen OA, Mjølnerød O. DNA-ploidy as prognostic factor in prostatic carcinoma. Int J Cancer. 1990;45:224–8.

141. Lapointe Supp Abbildung 1. 2007;:1–1.

142. 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;231:130–41.

143. 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 pros-

tate cancer. Int J Cancer. 2014;135:1369–80.

144. Beroukhim R, Getz G, Nghiemphu L, Barretina J, Hsueh T, Linhart D, et al. Assessing the significance of chromosomal aberrations in cancer: methodology and application to glioma. Proc Natl Acad Sci USA. 2007;104:20007–12.

145. Gottlieb B, Lombroso R, Beitel LK, Trifiro MA. Molecular pathology of the androgen receptor in male (in)fertility. Reprod Biomed Online. 2005;10:42–8.

146. Meehan KL, Sadar MD. Androgens and androgen receptor in prostate and ovarian malignancies. Front Biosci. 2003;8:d780–800.

147. Smolle M, Venkatesh S, Gogol MM, Li H, Zhang Y, Florens L, et al. Chromatin remodelers Isw1 and Chd1 maintain chromatin structure during transcription by preventing histone exchange. Nat Struct Mol Biol. 2012;19:884–92.

148. Walfridsson J, Khorosjutina O, Matikainen P, Gustafsson CM, Ekwall K. A genome-wide role for CHD remodelling factors and Nap1 in nucleosome disassembly. EMBO J. 2007;26:2868–79.

149. Marfella CGA, Imbalzano AN. The Chd family of chromatin remodelers. Mutat Res. 2007;618:30–40.

150. Klezovitch O, Risk M, Coleman I, Lucas JM, Null M, True LD, et al. A causal role for ERG in neoplastic transformation of prostate epithelium. Proc Natl Acad Sci USA. 2008;105:2105–10.

151. 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;31:882–8.

152. Clark JP, Cooper CS. ETS gene fusions in prostate cancer. Nat Rev Urol. 2009;6:429–39.

153. 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 Research. 2013;73:2795–805.

154. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. J Cell Physiol. 2000;182:311–22.

155. Bruce JY, Lang JM, McNeel DG, Liu G. Current controversies in the management of biochemical failure in prostate cancer. Clin Adv Hematol Oncol. 2012;10:716–22.

156. Adamo P, Ladomery MR. The oncogene ERG: a key factor in prostate cancer. Oncogene. 2015.

157. Murakami K, Mavrothalassitis G, Bhat NK, Fisher RJ, Papas TS. Human ERG-2 protein is a phosphorylated DNA-binding protein--a distinct member of the ets family. Oncogene. 1993;8:1559–66.

158. Yi H, Fujimura Y, Ouchida M, Prasad DD, Rao VN, Reddy ES. Inhibition of apoptosis by normal and aberrant Fli-1 and erg proteins involved in human solid tumors and leukemias. Oncogene. 1997;14:1259–68.

159. Wrana JL, Attisano L, Cárcamo J, Zentella A, Doody J, Laiho M, et al. TGF beta signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. Cell. 992;71:1003–14.

160. Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. Annu Rev Cell Dev Biol. 2004;20:781–810.

161. Komiya Y, Habas R. Wnt signal transduction pathways. Organogenesis. 2008;4:68–75.

162. 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.

7 ANHANG

7.1 Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1-1: Vereinfachte Darstellung der Libraryerstellung für die Mate-Pair-Sequenzierung 10
Abbildung 1-2: Anatomische Darstellung der Prostata mit Harnblase (12) 12
Abbildung 1-3: Schematische Darstellung der TMPRSS2:ERG-Fusion 21
Abbildung 1-4: Zusammenfassung von Kopiezahlveränderungen von 64 PCA 22
Abbildung 1-5: Architektur der 5q21-Deletionen beim Prostatakarzinom (Reanalyse der Daten von Taylor et al.) 24
Abbildung 1-6: Architektur und Ausdehnung der 5q21 Deletionen basierend auf institutsinternen Daten, dargestellt mittels „Heat-Map"-Analyse 25
Abbildung 1-7: Schematische Darstellung der Domainen des humanen CHD1 27
Abbildung 2-1: Komplettzuschnitt einer Prostata für die Kryokonservierung (Institut für Pathologie des UKE Hamburg) 31
Abbildung 2-2: Aufbau des in dieser Arbeit verwendeten TMAs über 12.427 Patienten 33
Abbildung 3-1: DNA- und RNA-Ausbeute (in µg) aus Gewebeschnitten verschiedener Schnittdicken mit und ohne mechanischen Aufschluss 54
Abbildung 3-2: DNA-Integrität nach Extraktion mit und ohne mechanischen Gewebeaufschluss 55
Abbildung 3-3: RNA Integrität nach Extraktion mit und ohne mechanischem Gewebeaufschluss 56
Abbildung 3-4: DNA- und RNA-Ausbeute (in µg) nach Gewebeaufschluss mit 100 Keramikperlen (A), einer Keramikkugel (B) und einem Stabhomogenisator (C) 57
Abbildung 3-5: DNA Integrität in Abhängigkeit vom Gewebeaufschlussverfahren, Patient 1-5 58
Abbildung 3-6: : RNA Integrität in Abhängigkeit vom Gewebeaufschlussverfahren, Patient 1 bis 5 59
Abbildung 3-7: DNA- und RNA- Ausbeute (in µg) aus 18-46 16µm-Schnitten 60
Abbildung 3-8: DNA-Integrität nach Gewebeaufschluss großer Gewebemengen mit 100 Keramikperlen (Patient 11 bis 14) 61
Abbildung 3-9: DNA-Integrität nach Gewebeaufschluss großer Gewebemengen mit 100 Keramikperlen 61
Abbildung 3-10: RNA-Integrität nach Gewebeaufschluss großer Gewebemengen mit 100 Keramikperlen (Patient 11-14) 62
Abbildung 3-11: Integrität der DNA aus jeweils dem Blut (ohne mechanischen Aufschluss) sowie dem Tumor (Gewebeaufschluss mit 100 1,4 mm Keramikperlen) der Patienten 12 bis 14 63
Abbildung 3-12: DNA- und RNA- Ausbeute (in µg) in Abhängigkeit von der Gewebeaufschlussdauer, Patient 15 bis 17 64
Abbildung 3-13: DNA-Integrität in Abhängigkeit von der Gewebeaufschlussdauer in Sekunden 65
Abbildung3-14: DNA- und RNA-Ausbeute (in µg) in Abhängigkeit von der zum Gewebeaufschluss verwendeten Perlenanzahl und der Aufschlussgeschwindigkeit 66
Abbildung 3-15: DNA- Integrität in Abhängigkeit der zum Gewebeaufschluss verwendeten Perlenanzahl und der Aufschlussgeschwindigkeit in m/s, Patient 15 bis 17 67
Abbildung 3-16: DNA- und RNA-Ausbeute (in µg) nach Gewebeaufschluss durch 25 1,4 mm Keramikperlen, Patient 18 bis19 im Doppelansatz 67

Abbildung 3-17: DNA Integrität nach Gewebeaufschluss mit 25 1,4 mm Keramikperlen, Patient 18 bis 20 im Doppelansatz 68
Abbildung 3-18: DNA- und RNA- Ausbeute (in µg) aus 18-25 16 µm-Schnitten nach Gewebeaufschluss mit 25 1,4 mm Keramikperlen 68
Abbildung 3-19: DNA-Integrität nach Gewebeaufschluss mit jeweils sanfter und starker Lysis 69
Abbildung 3-20: Vergleich der durch Mate Pair Sequenzierung erhaltenen Deletionsdaten von elf PCA im Vergleich zu aCGH-Ergebnissen anderer Kohorten 72
Abbildung 3-21: Vergleich der durch Mate Pair Sequenzierung erhaltenen Deletionsdaten von elf PCA im Vergleich zu aCGH-Ergebnissen anderer Kohorten (Fortsetzung) 73
Abbildung 3-22: Vergleich der durch Mate Pair Sequenzierung erhaltenen Deletionsdaten von elf PCA im Vergleich zu aCGH-Ergebnissen anderer Kohorten (Fortsetzung) 74
Abbildung 3-23: Vergleich der durch Mate Pair Sequenzierung erhaltenen Deletionsdaten von elf PCA im Vergleich zu aCGH-Ergebnissen anderer Kohorten (Fortsetzung) 75
Abbildung 3-24: Vergleich der durch Mate Pair Sequenzierung erhaltenen Deletionsdaten von elf PCA im Vergleich zu aCGH-Ergebnissen anderer Kohorten (Fortsetzung) 76
Abbildung 3-25: Darstellung eines Circos Plots 77
Abbildung 3-26: Darstellung der Circos Plots der elf per NGS analysierten ICGC-Patienten 78
Abbildung 3-27: Darstellung der Circos Plots der elf per NGS analysierten ICGC-Patienten, Fortsetzung. 79
Abbildung 3-28: Darstellung der Circos Plots der elf per NGS analysierten ICGC-Patienten, Fortsetzung. 80
Abbildung 3-29: Schematische Darstellung einer der Varianten innerhalb der per NGS analysierten Patienten (75). 81
Abbildung 3-30: Mittels FISH dargestellter 5q21-Deletionsstatus beim Prostatakarzinom (PCA) 83
Abbildung 3-31: Einfluss der *CHD1*-Deletionen auf das Auftreten eines biochemischen Rezidivs 85
Abbildung 3-32: Verteilung der 5q21-deletierten und 5q21-normalen Tumoren auf die neuen klinisch-biologischen Endpunkte 88
Abbildung 3-33: Einfluss der *CHD1*-Deletionen auf das mRNA- und Protein-Expressionsniveau 91
Abbildung 3-34: Assoziation von 5q21-Deletionen mit dem ERG-Expressionsstatus ($p < 0,0001$) 92
Abbildung 3-35: Prozentuale Häufigkeit verschiedener Deletionen sowie des ERG-Status in Abhängigkeit vom Patientenalter 94
Abbildung 3-36: Expression von CHD1, AR und ERG in den getesteten PCA-Zelllinien 95
Abbildung 3-37: Effizienz der getesteten shRNA-Konstrukte zur Herabregulation von CHD1, AR und ERG 96
Abbildung 3-38: Test der Effizienz des Überexpressionskonstruktes für CHD1 97
Abbildung 3-39: Anzahl der ausgezählten Kolonien in PCA-Zelllinien nach Gen-Depletion bzw. – Überexpression von *CHD1*, *RB1* und *PTEN* 98
Abbildung 3-40: a) Beispielhafte Darstellung von Kolonien von CHD1-depletierten (shCHD1) und CHD1-normalen (shNeg) PC-3-Zellen in Softagar. b) Anzahl der ausgebildeten Kolonien von CHD1-depletierten und CHD1-normalen PC-3-Zellen in Softagar. 99
Abbildung 3-41: Beispielhafte Darstellung von Zellen, die die Matrix eines Invasion-Assays durchwandern konnten 100
Abbildung 3-42: Nukleus mit einem Bruch im ERG in mit Doxorubicin und Dihydrotestosteron behandelten LNCaP-Zellen, nachgewiesen per FISH 101
Abbildung 3-43: Anzahl der induzierbaren ERG-Brüche in einer AR-positiven (LNCaP) und drei AR-negativen PCA-Zelllinien 102

Abbildung 3-44: Abhängigkeit der Induzierbarkeit der Expression AR-abhängiger Gene vom CHD1-Depletionsstatus 103
Abbildung 3-45: Der Einfluss von CHD1 auf die Expression bekannter Tumorsuppressoren sowie auf den Dedifferenzierungsmarker AMACR 105

7.2 Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1: Häufigste Deletionen beim Prostatakarzinom. Vergleich der Ergebnisse von Lapointe et al (85), Sun et al. (Metaanalyse) (86), Taylor et al. (84) sowie der eigenen Arbeitsgruppe (98). 22
Tabelle 2: Beschreibung des kryokonservierten Gewebekollektives 30
Tabelle 3: Übersicht des in dieser Arbeit verwendeten FFPE-Gewebekollektives 34
Tabelle 4: Einteilung der klinisch-pathologischen Endpunktgruppen nach Tumoreigenschaften 35
Tabelle 5: Verwendete Oligonukleotide 38
Tabelle 6: Für die Westernblots verwendete Antikörper 38
Tabelle 7: Getestete shRNA-Konstrukte für die Gen-Depletion 39
Tabelle 8: Verwendete Konstrukte zur Überexpression von CHD1, RB1 (144,147), PTEN (147,148) und eYFP (95,148) 40
Tabelle 9: Verwendete q-PCR-Sonden (TaqMan) 40
Tabelle 10: Thermoprofil der q-PCR 48
Tabelle 11: Darstellung der Deletionsraten aller Chromosomenbereiche in den elf per NGS analysierten ICGC-Patienten 71
Tabelle 12: Assoziation von 5q21-Deletionen mit dem Tumor-Phänotyp der analysierten Prostatakarzinome 84
Tabelle 13: Auflistung der p-Werte einer multivariaten Analyse (Cox-proportional Hazards) für typische prä- und postoperative Prognoseparameter des PCA aller, der ERG-pos und der ERG-neg Karzinome . 86
Tabelle 14: Ausführliche Darstellung der Ergebnisse der multivariaten Analyse am Beispiel des post-operativen Scenarios im gesamten Tumorkollektiv 87
Tabelle 15: Einteilung der biologisch-klinischen Endpunktgruppen nach Tumoreigenschaften 89
Tabelle 16: Assoziation von CHD1 mit KI67 LI in Gruppen von Tumoren gleichen Gleason Scores 90
Tabelle 17: Assoziation von 5q21-Deletionen mit anderen Deletionsbereichen anhand von FISH-Datensätzen unserer bestehenden Datenbank 93

7.3 Verwendete Materialien und Reagenzien

Material

Bezeichnung	Firma
QIAshredder	Qiagen, Venlo, Niederlande
0,2µm Filtereinheiten	VWR
0,2ml 8er-Strips PCR-Gefäße	Brand
0,2ml PCR-Gefäße	Brand
0,5ml SafeSeal Reaktions-Gefäße	Sarstedt
1,5ml SafeSeal Reaktions-Gefäße	Sarstedt
1,8ml Cryoröhrchen	VWR
10µl Biosphere Filtertips	Sarstedt
100µl Biosphere Filtertips	Sarstedt
1000µl Biosphere Filtertips	Sarstedt
10ml serologische Pipetten	Falcon
15ml Reaktions-Gefäße	Falcon
2,5µl Biosphere Filtertips	Sarstedt
200µl Biosphere Filtertips	Sarstedt
25ml serologische Pipetten	Falcon
2ml 96er Deep Well Storage Platte	VWR
2ml SafeSeal Reaktions-Gefäße	Sarstedt
2ml Sammel-Gefäße	Quiagen
33mm Millex Filter Units	Millipore
50ml Reaktions-Gefäße	Greiner Bio-One, Frickenhausen
5ml serologische Pipetten	Falcon
8er PCR-Streifen	VWR
9cm Petrischalen	VWR
BD BioCoat™ Control 8,0 µm PET Membran	BD, Franklin Lakes, USA
BD BioCoat™ Matrigel™ Invasion Chamber	BD, Franklin Lakes, USA
Cellometer Einmal-Zählkammern	Peqlab
CHT-4-SD Cell Counting Chamber	Nexcelom Bioscience, Lawrence, USA

Material (Fortsetzung)

Bezeichnung	Firma
Deckel-Streifen für 0,2ml 8er-Strips PCR-Gefäße	Brand
Deckgläser No.1 (18 x 18mm)	Marienfeld
Deckgläser No.1 (24 x 60mm)	Marienfeld
Fixogum 50 g	Marabu, Tamm
Genome-Wide Human SNP Array 6.9	Affymetrix
MicroAmp® 96- & 384-Well Klebefolie	Applied Biosystems
MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaktions-Platte	Applied Biosystems
Paraffin Tape Slides	H.C.E.-GmbH, Saarbrücken
Rotor Adaptoren	Quiagen
Safe-Lock Reaktionsgefäße, amber, 0,5 ml, VE= 500 Stück	Eppendorf, Hamburg
Safe-Lock Reaktionsgefäße, amber, 1,5 ml (VE=1000 Stk.)	Eppendorf, Hamburg
TapeWindows	H.C.E.-GmbH, Saarbrücken
Tough-Spots (9,5mm)	VWR
Zellkultur Flaschen (T25, T75, T175)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkultur Platten (6-, 12-, 24-Well)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkultur Schalen (10 cm)	BD, Franklin Lakes, USA

Reagenzien

Bezeichnung	Firma
0,25% Trypsin-EDTA (1x)	Invitrogen, Carlsbad, USA
20x SSC	Abbot, Ludwigshafen
Agarose	Sigma-Aldrich, München
Agencourt AMPure XP	Beckman-Coulter
Ammonium Hydroxid (27-30%)	VWR
Ampicillin Natriumsalz	Sigma-Aldrich, München
Ampli Taq Gold PCR Master Mix	Applied Biosystems
Anti-Streptavidin Antikörper, biotinyliert	Vector Laboratories
Cell Extraction Buffer	Invitrogen, Carlsbad, USA
CEP 10 Spectrum Aqua	Abbot, Ludwigshafen
CEP 10 Spectrum Green	Abbot, Ludwigshafen
CEP 3 Spectrum Aqua Orange	Abbot, Ludwigshafen
CEP 6 SpectrumAqua Probe	Abbot, Ludwigshafen
CEP 6 SpectrumOrange Probe	Abbot, Ludwigshafen
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich, München
Chloroform	Merck
COT Human DNA	Roche, Grenzach-Wyhlen
Defined Keratinocyte-SFM (1x), Liquid	Invitrogen, Carlsbad, USA
Denhardt´s Lösung (50x)	Sigma-Aldrich
Dextransulfat (Natriumsalz)	Roth, Karlsruhe
DHT (5α-Androstan-17β-ol-3-one)	Sigma-Aldrich
Diethyl Pyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich
Diethylpyrocarbonat (DEPC)-Wasser	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, München
DMEM (1x), liquid (High Glucose)	Invitrogen, Carlsbad, USA
DNA Loading Dye (6X)	Thermo Fisher Scientific
dNTP Set (100mM)	Promega
D-PBS w/o Ca/Mg	Gibco
EB Puffer	Quiagen
Ethanol 70%	VWR, Darmstadt
Ethanol 80% (vergällt)	VWR, Darmstadt
Ethanol 96% (vergällt)	VWR, Darmstadt
Ethanol absolut	Merck
Ethanol Ph Eur (1 Liter)	VWR, Darmstadt

Reagenzien (Fortsetzung)

Bezeichnung	Firma
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich
ExoSap-IT®	Affymetrix USB
Fetal Bovine Serum Gold	Gibco, Carslbad, USA
Fixogum	Marabu
Flüssig-Stickstoff	TMG
Formamid pro analysi	Merck, Darmstadt
GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder, ready-to-use	Thermo Fisher Scientific
GeneRuler 50bp DNA Ladder, ready-to-use	Thermo Fisher Scientific
Genome-Wide Human SNP Array 6.0	Affymetrix
Giemsa Azur-Eosin-Methylenblaulösung	Merck, Darmstadt
Glycerol, wasserfrei	Sigma-Aldrich
Green dUTP (50nmol, lyophylisiert)	Abbot, Ludwigshafen
Herring Sperm DNA (10µg/µl)	Promega
Immersol TM 518 F	Zeiss, Oberkochen
Isopropanol 100%	Merck, Darmstadt
Kristallviolett	Sigma-Aldrich, München
LB broth, Miller	Sigma-Aldrich, München
Lipofectamin®2000	Invitrogen, Carlsbad, USA
MEM NEAA 100x	Invitrogen, Carlsbad, USA
MEM Non Essential Amino Acids (100X)	Gibco
MES Natriumsalz	Sigma-Aldrich
MES-Hydrat	Sigma-Aldrich
Methanol	Merck, Darmstadt
Mounting Medium with DAPI (VECTASHIELD)	Vector Laboratories
Natrium Pyruvat MEM (100nM)	Gibco
Natrium-Acetat (3M)	AppliChem
Natriumchlorid Lösung (5M)	Sigma-Aldrich
Natriumhydroxid	Sigma-Aldrich, München
Nick Translations Reagent Kit	Abbot, Ludwigshafen
NP-40	Abbot, Ludwigshafen
Nsp I Restriktionsenzym	New England BioLabs
NucleoBond® BAC 100	Macherey-Nagel, Düren
nukleasefreies Wasser	Sigma-Aldrich, München
Opti-MEM®I (1x)	Invitrogen, Carlsbad, USA

Reagenzien (Fortsetzung)

Bezeichnung	Firma
Orange dUTP (50 nmol, lyophylisiert)	Abbot, Ludwigshafen
PenStrep	Invitrogen, Carlsbad, USA
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, München
phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Invitrogen, Carlsbad, USA
Polybren	Sigma-Aldrich, München
Polyethylenimin	Polysciences, Eppelheim
Pretreatment Reagent 500 ml	Abbot, Ludwigshafen
Protease Buffer 500 ml	Abbot, Ludwigshafen
Protease I 500 mg	Abbot, Ludwigshafen
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich, München
Puromycin	Sigma-Aldrich
Puromycindihydrochlorid	Sigma-Aldrich, München
QIAquick Nucleotide Removal Kit (50)	Qiagen, Venlo, Niederlande
QX Alignment Marker 15bp/1kb	Quiagen
QX DNA Size Marker 50-800bp	Quiagen
Reinigungsbenzin	Biesterfeld Chemiedistribution GmbH
RNaseZAP	Sigma-Aldrich
RPMI Medium 1640 (1x)+GlutaMAX™-I	Invitrogen, Carlsbad, USA
Sodium Pyruvat	Invitrogen, Carlsbad, USA
Spectrum Green dUTP (50nmol, lyophylisiert)	Abbot, Ludwigshafen
Spectrum Orange dUTP (50nmol, lyophylisiert)	Abbot, Ludwigshafen
SSC (20x)	Abbot, Ludwigshafen
SSPE (20x)	Sigma-Aldrich
Streptavidin, R-Phycoerythrin Konjugat (SAPE)	Invitrogen
Sty I Restriktionsenzym	New England BioLabs
T4 DNA Ligase	New England BioLabs
TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG	Applied Biosystems
Tetramethylammoniumchlorid (TMACL)	Sigma-Aldrich
Tris Acetate-EDTA buffer (10x)	Sigma-Aldrich
Tris EDTA Puffer	Sigma-Aldrich
TRIzol® Reagent	Invitrogen
Trypsin (2,5%)	Invitrogen
Tween-20 (10%)	Biorad
Xylol	J. T. Baker, Center Valley, USA
β-Mercaptoethanol	Fluka, München

7.4 Verwendete Geräte

Geräte

Gerät	Firma
7900HT Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems®
Bioanalyzer 2100	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Bioanlayzer Chip Vortexer (IKA MS 3)	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
CellometerTM Auto T4	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
DNA/RNA UV-Cleaner UVT-S-AR	Grant, Cambridgeshire
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
Heracell™ 240i CO2 Inkubator	Heraeus Thermo Scientific, Hanau
Heraeus HB 2448 (Sicherheitswerkbank S1)	Heraeus Thermo Scientific, Hanau
Herasafe™ (Sicherheitswerkbank S2)	Heraeus Thermo Scientific, Hanau
HLC Vakuum-Sicherheits-Absaugsysteme	Ditabis, Pforzheim
Inkubator	GFL (Gesellschaft für Labortechnik GmbH), Burgw
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 Zentrifuge)	Eppendorf, Hamburg
Rotor- JA-14 (Beckmann Zentrifuge)	Beckmann, Krefeld
Rotor- JA-20 (Beckmann Zentrifuge)	Beckmann, Krefeld
Sanyo co2 incubator	Sanyo, Moriguchi, Japan
Sartorius BP 2100 S (Laborwaage)	Sartorius, Göttingen
Shaker S4	Elmi, Riga, Lettland
Thermobrite ™	Abbot, Ludwigshafen
Thermomixer® compact	Eppendorf, Hamburg

Geräte (Fortsetzung)

Gerät	Firma
Trockenschrank	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach
Vac-Man® Laboratory Vacuum Manifold	Promega, Madison, USA
Vakuumpumpe, biovac 102	ILMVAC, Ilmenau
Vakuumzentrifuge, Concentrator Plus	Eppendorf, Hamburg
Wasserbäder	GFL (Gesellschaft für Labortechnik GmbH), 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

7.5 Verzeichnis der wichtigsten Abkürzungen

Abkürzung	Erläuterung
aCGH	Array-CGH
AJCC	New American Joint Committee on Cancer
AMACR	Alpha-methylacyl-CoA racemase
ANOVA	Analysis of variance
AR	Androgenrezeptor
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
BAC	Bacterial artificial chromosomes
bp	Basenpaare
BPH	Benigne prostatische Hyperplasie
CGH	Comparative genomic hybridization
CHD1	Chromodomain-Helikase-DNA-Binding-Protein1
ChIP	Chromatinimmunopräzipitation
CR	Chromatinremodeler
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
dH_2O	destilliertes Wasser
DHT	Dihydrotestosteron
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum in Heidelberg
DMEM Medium	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DRM	Differenciated methylated regions
DRU	Digital rektale Untersuchung
EDTA	Chelatbildner Ethylendiamintetraazetat
EMBL	European Molecular Biology Labaratory
ERG-	Erg-negativ (nicht ERG-exprimierend)
ERG+	Erg-positiv (ERG-exprimierend)
eYFP	Enhanced yellow fluorescent protein
FCS	Fetal Bovine Serum
FFPE	Formalin fixed and paraffin embedded
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FU	Fluorescence units
GISTIC	Genomic Identification of Significant Targets in Cancer
H3K4me	Methyliertes Lysin4 des Histons H3
HAT	Histon-Acetyltransferasen
HDAC	Histon-Deacetylasen
HEK293	Human Embryonic Kidney
HG-PIN	High-Grade prostatische Intraepitheliale Neoplasie
HGP	Human Genome Project

VERZEICHNIS DER WICHTIGSTEN ABKÜRZUNGEN (FORTSETZUNG)

Abkürzung	Erläuterung
HMT	Histon-Methyltransferasen
ICGC	International Cancer Genome Consortium
IHC	Immunhistochemie
K-SFM-Vollmedium	Keratinocyte serum-free medium
kb	Kilobaseb
kbp	Kilobasenpaare
KI67-LI	KI67-Labeling-Index: Anteil der KI67-positiven Tumorzellen
LB-Medium	Lysogeny-broth Medium
MIT	Massachusetts Institute of Technology
MPIMG	Max Planck Institut für Molekularbiologie in Berlin
NCI	National Cancer Institute
NGS	Next Generation-Sequencing
NIH	National Institutes of Health
NS	Nukleinsäuren
nt	Nukleotide
PCA	Prostatakarzinom
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PSA	Prostataspezifisches Antigen
pT	Pathologisches Tumorstadium
RIN	RNA Integry Number
RPMI-Vollmedium	Roswell Park Memorial Institute Medium (Produkt vom Institut entwickelt)
RT	Raumtemperatur
sh-RNA	Small hairoin ribonucleic acid
shGFP	GFP spezifische sh-RNA
shNeg	sh-RNA Negativkontrolle
SNP	Single nucleotide polymorphism
SNV	Single Nucteotide Variantions
SPORE	Specialized Programs of Research Excellence
STR	Short Tandem Repeats
SV	Structual Variations
Taq	Thermus aquaticus
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TMA	Tissue Micro Array
TNM-System	Klassifikation zur Einteilung von Tumoren in Stadien. T = Tumorausdehnung, N = Nodalstatus , M = Metastasen
TRC	The RNAi Consortium of the Broad Institute of MIT and Harvard
TRUS	Transrektaler Ultraschall
UICC	Union internationale contre le cancer
WGS	Whole Genome Sequencing

7.6 Zusätzliche Protokolle

RNA-ISOLATION AUS PROSTATAZELLLINIEN

Materialien

- Kit NucleoSpin®RNA II (Machery-Nagel, REF 740955.250)

Reagenzien

- Trizol®
- Chloroform
- Ethanol 80 %
- Ethanol absolut

Lösungen

- rDNase-Lösung: rDNase + 540 µl RNase-free H_2O
- RA3-Buffer: ad 100ml Ethanol absolut
- DNase-Lösung: Pro Probe: 10µl reconstituted rDNase + 90µl Reaction Buffer for rDNase

Beschreibung des Vorgehens

- Zellernte
  - Zellen in Trizol® aufnehmen
  - 6-Well-Platte 800 µl Trizol®/ Well
  - 12-Well-Platte 400 µl I Trizol® / Well
  - Zelllysat direkt verwenden oder bei -80 °C lagern
- Chloroformfällung
  - Trizol® -Lysat mit Chloroform versetzen (4:1)
  - 15 sec. Vortexen
  - Zentrifugieren: 15 min. full speed (15.300 rpm, Sigma 2k15 Zentrifuge)
  - Obere Phase abpipettieren und in ein Collection Tube geben
- EtOH-Fällung
  - Obere Phase 1:1 mit Ethanol 80 % mischen
  - Filtersäulen auf den Vac-Man®Laboratory stecken und Ethanol-Lysat-Gemisch durchlaufen lassen
- Entsalzung
  - 400 µl MDB-Puffer auf die Säule geben und durchlaufen lassen
  - Filter auf neues Collection Tube setzen und 1 min. bei full speed trocken zentrifugieren
- DNA Verdau
  - DNase-Lösung vortexen
  - 95µl DNase-Lösung direkt auf den Filter pipettieren
  - 15 Min. bei RT inkubieren
- Waschen und trocknen
  - Filtersäulen auf den Vac-Man®Laboratory stecken
  - Nacheinanander 300 µl RA2 Puffer, 600 µl RA3 Puffer, 300 µl RA3 Puffer durchlaufen lassen
  - 1 min full speed trocken zentrifugieren
- Elution
  - Filter in 1,5 ml Eppis stecken
  - 40 µl RNase-free H_2O direkt auf den Filter pipettieren
  - 5 min bei RT inkubieren
  - 1 min full speed zentrifugieren

PRODUKTION VON LENTIVIRALEN PARTIKELN

Materialien

- 10 cm Zellkulturplatten
- isolierte shRNA-Konstrukte
- Phoenix cells
- Membranfilter (33 mm Millex Filter Units, Millipore)
- pRRE, pRev, VSV-G

Reagenzien

- DMEM (1X), liquid (High Glucose)
- MEM NEAA 100x
- Sodium Pyruvate
- Pen Strep
- FCS, Heat-Inactivated, US Origin
- Polyethylenimine (PEI), Linear (1mg/ml)

Lösungen

Medium für HEK293T Zellen

- 500 ml DMEM (1x) liquid (High Glucose) Medium
- 50 ml Fetal Bovine Serum (FCS), Heat-Inactivated
- 5,5 ml Sodium Pyruvate
- 5,5 ml MEM NEAA 100x
- 5,5 ml Pen Strep

Beschreibung des Vorgehens

Tag 1: pro 10 cm Zellkulturplatte 5 x 10^6 Zellen in 10 ml Vollmedium aussäen
Tag 2: Vollmedium austauschen

Transduktionsmix ansetzen (Angabe für eine Zellkulturplatte):

DMEM :	1 ml
Vektor-Plasmid:	12 µg
pRRE :	3 µg
pRev :	3 µg
VSV-G:	1,5 µg
PEI:	40 µl (zum Schluss)

Transduktionsmix 10 min bei RT inkubieren
1 ml Transdukionsmix vorsichtig ins Medium / auf die Zellen pipettieren
Inkubation der Zellen: 10-12 Stunden.

Tag 3: Vollmedium austauschen
Tag 4: Virusernte:

- Medium mit einer Einmalspritze aufnehmen
- Membranfilter aufsetzen
- Virussuspension in 2 ml Tubes geben
- Lagerung: --80 °C

LENTIVIRALE TRANSDUKTION

Materialien

- 6-Well-Platten
- Lentiviraler Virus
- Zelllinien

Reagenzien

- RPMI Medium 1640 (1x) + GlutaMAX™- I
- MEM NEAA 100x
- Sodium Pyruvate
- Pen Strep
- Puromycin dihydrochloride
- Fetal Bovine Serum Gold
- Polybren

Lösungen

Vollmedium für Prostatazelllinien

- 500 ml RPMI Medium 1640 (1x)+ GlutaMAX™- I
- 50 ml FCS, Heat-Inactivated, US Origin
- 5,5 ml Sodium Pyruvate
- 5,5 ml MEM NEAA 100x
- 5,5 ml Pen Strep
- Transduktionsmedium

- 50 ml Vollmedium
- 50 µl Polybrene (Stock 10 mg/ml)
- Puromycin-Lösung (10 µg/µl)

- 100 mg Puromycin dihydrochloride
- 10 ml dest. H2O
- Selektionsmedium (1,5 µg/µl)

- 566,5 ml Vollmedium
- 84,9 µl Puromycin-Lösung (10 µg/µl)

Beschreibung des Vorgehens

Tag 1:	Pro Well 2 x 10^5 Zellen in 2 ml Vollmedium aussäen
Tag 2/3:	Zellen bis zu einer Konfluenz von 70 % bis 80 % wachsen lassen Vollmedium gegen Transduktionsmedium austauschen 400 µl Virus auf die Zellen pipettieren Inkubation der Zellen: 12-16 Stunden
Tag 3/4:	Transduktionsmedium gegen Vollmedium austauschen Selektion: 24-36 Stunden nach der Transduktion Vollmedium gegen Selektionsmedium austauschen
	Selektion der transduzierten Zellen 4-6 Tage, Mediumwechsel: alle 2 Tage

TRANSFEKTION MIT LIPOFEKTAMIN

Materialien

- 6-Well-Platten
- isolierte Plasmide (shRNA-Konstrukte bzw. Überexpressionskonstrukte)
- Zelllinien

Reagenzien

- RPMI Medium 1640 (1x) + GlutaMAX™- I
- Opti-MEM® I (1x)
- MEM NEAA 100x
- Sodium Pyruvate
- Pen Strep
- Puromycin dihydrochloride
- Fetal Bovine Serum Gold
- Lipofectamine[R] 2000 (1 mg/ml)

Lösungen

- Vollmedium für Prostatazelllinien

- 500 ml RPMI Medium 1640 (1x)+ GlutaMAX™- I
- 50 ml Fetal Bovine Serum Gold (FCS)
- 5,5 ml Sodium Pyruvate
- 5,5 ml MEM NEAA 100x
- 5,5 ml Pen Strep
- Puromycin-Lösung (10 µg/µl)

- 100 mg Puromycin dihydrochloride
- 10 ml dest. H2O
- Selektionsmedium (1,5 µg/µl)

- 566,5 ml Vollmedium
- 84,9 µl Puromycin-Lösung (10 µg/µl)

Beschreibung des Vorgehens

Tag 1: Pro Well $2x10^5$ Zellen in 2 ml Vollmedium aussäen

Tag 2/3: Zellen bis zu einer Konfluenz von 70 % bis 80 % wachsen lassen
Vollmedium gegen OPTIMEM-Medium austauschen
Transfektionsmix herstellen (Ansatz pro Well)

Plasmid:	4 µg
OPTIMEM:	100 µl
Lipofectamin[R] 2000:	8 µl

Transfektionsmix 20 min bei RT inkubieren
pro Well 100 µl Transfektionsmix pipettieren
Inkubation der Zellen: max. 10 Stunden
Medium gegen Vollmedium austauschen

Tag 3/4: Selektion: 36 Stunden nach der Transfektion
Vollmedium gegen Selektionsmedium austauschen

Selektion der transfezierten Zellen 4-6 Tage, Mediumwechsel: alle 2 Tage

PROTEINISOLATION AUS ZELLKULTUREN

Materialien

- Prostatazelllinie in 6-Well-Platten, Zellzahl: 2x10^6
- Cell Scraper
- Eis
- Deckel von Styroporbox
- Absaugpumpe
- Pipetten und Spitzen
- 2mL Tubes

Reagenzien

- Cell Extraction Buffer (Invitrogen, FNN0011)
- Phenymethylsulfonyl Fluoride (PMSF) (Sigma-Aldrich, P7626)
- Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich, P2714)
- Dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma-Aldrich, D2650-5X5ML)
- Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) (Invitrogen, 14190-169); auf Eis

Lösungen

- Cell Extraction Buffer aliquotiert à 5 ml; Lagerung bei -20 °C
- 10x Protease Inhibitor Cocktail
    - Serum in 10 ml Cell Extraction Buffer lösen
    - in 1,5 ml Tubes aliquotieren, Lagerung bei -20 °C
- 0,1M PMSF-Lösung
    - 8,85 mg PMSF
    - 500 µl DMSO
    - Lagerung bei -20 °C für max. 6 Wochen
- Working Cell Extraction Buffer (2,5ml Ansatz)
    - 12,5 µl 10x Protease Inhibitor Cocktail
    - 25,5 µl 0,1M PMSF-Lösung
    - 2462 µl Cell Extraction Buffer
    - Lagerung: max. 24 Stunden bei 4 °C

Beschreibung des Vorgehens

- Lösungen auf Eis ansetzen
- 6-Well-Platte auf Eis stellen
- Medium absaugen
- 2x mit je 1ml eiskaltem PBS waschen
- 500 µl Working Cell Extraction Buffer zu den Zellen geben
- mit dem Cell scraper die Zellen lösen
- Lösung in 2 ml Tubes überführen
- 10 Minuten auf Eis inkubieren
- vortexen
- 10 Minuten auf Eis inkubieren
- 10 Minuten bei 4 °C und 14.000 rpm zentrifugieren
- Überstand in ein neues Tube überführen und Proteinkonzentration messen

WESTERNBLOT

Materialien

- Mini-Protean Casting Frame
- Mini-Protean Casting Stand
- Mini-Protean Casting Stand Gaskets
- Shortplates
- Spacerplates with 1mm integrated spacer
- SuperSignal West Dura
- Gel-Blotting-Papiere
- Transfermembran Nitrocellulose, Protran
- Heizblock
- Proteinlysat
- Transblot SD
- Röntgenkassette

Reagenzien

- 30 % Acrylamide/bis, 29:1
- Blotting-Grade Blocker nonfat dry milk
- Methanol
- Tris
- SDS
- NaCl
- Glycin
- Tween^{R} 20
- Röntoroll REF Entwickler
- Superfix Fixierer f. Röntgenfilme MRP

Lösungen

- Laemmli-Puffer
- Tris pH 6,8
- Tris pH 8,8
- 10% SDS
- 10x TBS
- TBST
- 3% Blocking Solution
- 10x SDS Laufpuffer
- Transfer Puffer (Towbin Puffer)
- Ponceau S

Beschreibung des Vorgehens

Gießen der Gele:
Für 2 Minigele angegebene Volumen in vorbereitete Glaskammern pipettieren und aushärten lassen

Trenngel: mit 10 µl TEMED und 120 µl 10 % APS

∑15 ml	5% (ml)	7,5%(ml)	10%(ml)	12,5%	15%	20%
Acrylamid 30% (29+1)	2,5	3,75	5,0	6,25	7,5	10
H_2O	8,6	7,35	6,1	4,85	3,6	1,1
1,5M Tris pH 8,8	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75
10 % SDS	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15

Sammelgel: mit 12 µl TEMED und 12 µl 10 % APS

∑ 4ml	3%	4,5%
Acrylamid 30% (29+1)	0,4 ml	0,6
H_2O	3,0	2,8
1,5M Tris pH 8,8	0,5	0,5
10% SDS	0,04	0,04

Gelelektrophorese

- Gele in die Gelkammer einsetzen
- Innere und äußere Gelkammer mit 1x SDS Laufpuffer auffüllen
- Proben für 5 min bei 99 °C erhitzen
- 20 µl Proben in Geltaschen pipettieren
- Lauf: 2 Stunde bei 80V

Semidry Transfer (Blotten)

Vorbereitungen

- 6 Blottingpaper pro Gel in Transfer Puffer tränken
- Nitrocellulose Membran in Transfer Puffer tränken
- Gel aus Glaskammer entfernen
- Blotting-Sandwich zusammen legen
- 3 Blottingpaper
- Gel
- Nitrocellulose Membran
- 3 Blottingpaper

Blotten

- Blotting-Sandwich auf die Platte legen (Nitrocellulose Membran zur Platte)
- Luftblasen entfernen
- Blot: bei 12 V für 1,5 Stunden
- Transfer prüfen: Färbung mit Ponceau S

Blocken der Membran

- Blocking Solution (3 %) auf die Membran geben
- Inkubation: 30 min bei RT

Inkubation mit dem primären Antikörper

- Verdünnung: 1:1000 mit 3 % Blocking Solution
- Inkubation: 2 Stunden bei RT
- 3x TBST für 5 min waschen

Sekundärer Antikörper

- Verdünnung: 1:10.000 mit 3 % Blocking Solution
- Inkubation: 30 min bei RT
- 3x TBST für 5min waschen

Detektion

- Super Signal West Dura 1:1 mischen (500µl + 500µl)
- Membran bedecken
- Inkubation: 5 min bei RT
- Membran in Röntgenkassette legen und mit Röntgenfilm abdecken
- Inkubation: über Nacht

Röntgenfilm entwickeln

- Röntgenfilm in Entwicklerlösung schwenken
- Röntgenfilm in Fixiererlösung schwenken
- Röntgenfilm mit H_2O abspülen und trocknen lassen

COLONY FORMATION ASSAY

Materialien

- siehe Protokoll: Transfektion mit Lipofectamin

Reagenzien

- Methanol
- Giemsa
- siehe Protokoll: Transfektion mit Lipofectamin

Lösungen

- siehe Protokoll: Transfektion mit Lipofectamin

Beschreibung des Vorgehens

Kontrollen Depletion: shGFP, shNeg, shPTEN oder shmTOR, shRB1, Leerwell
Kontrollen Überexpression

- Colony-Formation-Assay
- Pro Well $2x10^5$ Zellen in Vollmedium aussäen
- Zellen mit Lipofectamin transfizieren (siehe Protokoll: Transfektion mit Lipofectamin)
- Selektion: alle 2 Tage Mediumwechsel
- Kolonien circa 10 Tage wachsen lassen
- Kolonien färben:
  - Selektionsmedium absaugen
  - 1x mit PBS waschen
  - 1,5 ml Methanol pro Well pipettieren
  - 2-3 min inkubieren
  - Methanol absaugen
  - 1 ml Giemsa pro Well pipettieren
  - 2 min inkubieren
  - Platten in einer Schüssel mit Wasser waschen und trocknen

Auswertung

- Zellkolonien ab einem Durchmesser von 1 mm makroskopisch zählen
- Einfaktorielle ANOVA-Analyse zur Bestimmung der Unterschiede in den Kolonie-zahlen

SOFTAGAR COLONY FORMATION ASSAY

Materialien

- 6-Well-Platten
- Stabil transduzierte Zelllinien

Reagenzien

- RPMI Medium 1640 (1x) + GlutaMAX™- I
- MEM NEAA 100x
- Sodium Pyruvate
- Pen Strep
- Puromycin dihydrochloride
- Fetal Bovine Serum Gold
- Agarose Typ VII (#A9045-5G, Sigma-Aldrich)
- Kristallviolett (0,005 %ige Lösung)

Lösungen

- Vollmedium für Prostatazelllinien

- 500 ml RPMI Medium 1640 (1x)+ GlutaMAX™- I
- 50 ml Fetal Bovine Serum Gold (FCS)
- 5,5 ml Sodium Pyruvate
- 5,5 ml MEM NEAA 100x
- 5,5 ml Pen Strep
- Puromycin-Lösung (10 µg/µl)

- 100 mg Puromycin dihydrochloride
- 10 ml dest. H2O
- Selektionsmedium (1,5 µg/µl)

- 566,5 ml Vollmedium
- 84,9 µl Puromycin-Lösung (10 µg/µl)

Beschreibung des Vorgehens

- Grundagar herstellen (Angabe für 10 Wells):
- 2 ml FCS

- ml 1,2 % Agarose in H2O

- ml Selektionsmedium

- 2 ml Grundagar pro Well pipettieren
- 1 Stunde bei RT aushärten
- Überschichtungsagar herstellen:
- 1,5 ml FCS

- 6,75 ml 0,7% Agarose in H_2O

- 6,75 ml Vollmedium

- 1 x 10^5 Zellen (Pellet)

- 2 ml Überschichtungsagar auf Grundagar pipettieren verteilen
- 1 Stunde bei RT aushärten
- Inkubation: 14 Tage
- Kristallviolett-Färbung:
- 500 µl Kristallviolett-Lösung pro Well pipettieren
- Inkubation: 1 Stunden bei RT
- Auswertung: Zellkolonien makroskopisch und mikroskopisch auszählen

7.7 Aus dieser Arbeit hervorgegangene Publikationen

Integrative genomic analyses reveal an androgen-driven somatic alteration landscape in early-onset prostate cancer.

Weischenfeldt J, Simon R, Feuerbach L, Schlangen K, Weichenhan D, Minner S, Wuttig D, Warnatz HJ, Stehr H, Rausch T, Jäger N, Gu L, Bogatyrova O, Stütz AM, Claus R, Eils J, Eils R, Gerhäuser C, Huang PH, Hutter B, Kabbe R, Lawerenz C, Radomski S, Bartholomae CC, Fälth M, Gade S, Schmidt M, Amschler N, Haß T, Galal R, Gjoni J, Kuner R, Baer C, Masser S, von Kalle C, Zichner T, Benes V, Raeder B, Mader M, Amstislavskiy V, Avci M, Lehrach H, Parkhomchuk D, Sultan M, Burkhardt L, Graefen M, Huland H, Kluth M, Krohn A, Sirma H, Stumm L, Steurer S, Grupp K, Sültmann H, Sauter G, Plass C, Brors B, Yaspo ML, Korbel JO, Schlomm T.
Cancer Cell. 2013 Feb 11;23(2):159-70. doi: 10.1016/j.ccr.2013.01.002. *PMID: 23410972*

CHD1 is a 5q21 tumor suppressor required for ERG rearrangement in prostate cancer.

Burkhardt L, Fuchs S, Krohn A, Masser S, Mader M, Kluth M, Bachmann F, Huland H, Steuber T, Graefen M, Schlomm T, Minner S, Sauter G, Sirma H, Simon R.
Cancer Res. 2013 May 1;73(9):2795-805. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-1342. Epub 2013 Mar 14. *PMID: 23492366*

7.8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. Guido Sauter dafür bedanken, dass er es mir ermöglicht hat, die Arbeiten für die vorliegende Dissertation an seinem Institut durchzuführen, sowie für seine konstruktive Kritik und die mit ihm geführten anregenden Diskussionen. Mein besonderer Dank gilt darüber hinaus Herrn PD Dr. Ronald Simon für die Betreuung dieser Arbeit und der unermüdlichen fachlichen wie auch moralischen Unterstützung während meiner Zeit am Institut für Pathologie. Frau Professor Dr. Julia Kehr danke ich für die freundliche Bereitschaft, das Zweitgutachten meiner Dissertation zu übernehmen. Mein Dank gilt außerdem Herrn Dr. Hüseyin Sirma für die Anleitung und Betreuung aller im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Zellkulturversuche. Sarah Fuchs wie auch Anne Meyer danke ich für die Zusammenarbeit im 5q-Projekt.
Besonders dankbar bin ich meinen Kollegen, insbesondere Martina Kluth, die mir während all der Zeit in fachlicher und freundschaftlicher Weise zur Seite standen und damit erheblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

7.9 Eidestattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbstständig und ohne andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst habe. Alle wörtlich oder oder inhaltlich aus anderen Werken übernommenen Stellen sind als solche gekennzeichnet.

Hamburg, den