

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Institut für Pathologie: Molekularpathologie

Direktor: Professor Dr. med. Guido Sauter

Unter Anleitung von Lia Burkhardt

Bedeutung der *CHD1*-Deletion auf Chromosom 5q21 zur
Stratifizierung von Prostatakarzinomen in klinisch
relevanten Subgruppen

Dissertation

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

vorgelegt von:

Anne Meyer

Aus Berlin

Hamburg 2015

Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 16.02.2016

Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

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

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. T. Schlomm

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	2
1 Einleitung	4
2 Material und Methoden	8
2.1 Gewebekollektiv	8
2.2 Prostata-Prognose-Array (Tissue Micorarray/TMA).....	8
2.3 <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>) Plasmide	10
2.4 Reagenzien und Kits.....	10
2.5 Geräte	11
2.6 Verbrauchsmaterialien	12
2.7 Software und Datenbanken	12
2.8 Herstellung der FISH-Sonden.....	12
2.8.1 Plasmid-Isolierung aus <i>E. coli</i> DH10B	12
2.8.2 Nick Translation	14
2.8.3 Sondenaufreinigung.....	15
2.9 Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung (FISH).....	16
2.10 Auswertung	18
2.10.1 Mikroskopische Auswertung.....	18
2.10.2 Statistische Auswertung	20
3 Ergebnisse	21
3.1 Auswertbarkeit	21
3.2 Korrelation der <i>CHD1</i> -Deletion mit klinisch-pathologischen Daten.....	21
3.3 Prognostische Relevanz der <i>CHD1</i> -Deletion.....	24
3.4 Korrelation der <i>CHD1</i> -Deletion mit dem <i>ERG</i> -Fusions-Status	26
3.5 Korrelation der <i>CHD1</i> -Deletion mit den neuen klinisch-biologischen Endpunkten	27
4 Diskussion	31
5 Zusammenfassung.....	36
 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	 38
Abkürzungsverzeichnis	39
Literaturverzeichnis	41

Danksagung	44
Lebenslauf.....	45
Eidesstattliche Erklärung	46

1 Einleitung

Das Prostatakarzinom gilt in Deutschland mit 26 % aller Krebserkrankungen als der häufigste maligne Tumor, sowie mit 10 % als die dritthäufigste krebssbedingte Todesursache des Mannes. Nach einem stetigen Anstieg betrug die Zahl der Neuerkrankungen im Jahr 2008 63.400, wohingegen die Mortalitätsrate leicht abnehmend war. Teils scheint dies auf die Einführung des prostataspezifischen Antigen (PSA)-Tests als Screeningmethode zurückzuführen, wodurch Tumoren vermehrt und frühzeitig entdeckt werden, sowie auf die inzwischen höhere Lebenserwartung. Im Jahr 2008 lag das mittlere Erkrankungsalter bei 70 Jahren, wonach das Prostatakarzinom zu den Erkrankungen des älteren Mannes gerechnet werden kann [1]. Da die Mehrzahl der Tumoren eher „gutartig“ ist, entwickeln die wenigsten Patienten Symptome oder sterben an dieser Krankheit. Eine kleine Gruppe der Tumoren ist jedoch hoch aggressiv und führt in der Regel zu einem lebensbedrohlichen Krankheitsverlauf für den Patienten. Demnach ist ein primäres Ziel der Prostatakrebsforschung, aggressive Tumore mit klinischer Relevanz von asymptomatischen Tumoren zu unterscheiden, um Patienten mit lebensbedrohlichen Tumoren frühzeitig eine geeignete Therapie zukommen zu lassen.

Zur Vorsorgeuntersuchung im Rahmen der Früherkennung von Prostatakarzinomen wird Männern ab 40 Jahren mit einer Lebenserwartung von mehr als 10 Jahren geraten. Sie umfasst die digitale rektale Untersuchung (DRU) und die quantitative Bestimmung des PSA-Werts. Als bildgebende Komponente kann die transrektale Ultraschalluntersuchung ergänzend durchgeführt werden. Eine Prostatastanziobiopsie als weiterführende Diagnostik sollte bei einem PSA-Wert von ≥ 4 ng/ml als erstmaliges, kontrolliertes Messergebnis, bei einem verdächtigen PSA-Anstieg der Verlaufskontrollmessungen im Rahmen der Vorsorgeuntersuchungen sowie bei einem karzinomverdächtigen Tastbefund in der DRU empfohlen werden [2]. Wird ein Prostatakarzinom diagnostiziert, sollte eine Therapie unter Berücksichtigung des Patientenwunsches und nach Aufklärung über Nutzen und Risiken geplant werden. Die Prognose des Prostatakarzinoms erfolgt durch Bestimmung des Gleason-Scores, des TNM-Stadiums und des R-Status [2]. Der Gleason-Grad beschreibt den histologischen Aufbau und Differenzierungsgrad der Prostatadrüsen, eingeteilt von Gleason-Grad 1 für eine sehr gut differenzierte Drüsenstruktur bis Gleason-Grad 5 für eine sehr niedrig differenzierte Drüsenstruktur [3]. Aus dem primär und sekundär vorherrschenden Gleason-Grad wird der

Gleason-Score gebildet. Die Zuordnung des TNM-Stadiums erfolgt nach der aktuellen UICC-Klassifikation. Darin wird die Ausdehnung des Primärtumors (T), der metastatische Befall regionärer Lymphknoten (N) und das Vorkommen von Fernmetastasen beurteilt [4]. Um den R-Status zu erheben prüft der Pathologe den chirurgischen Resektionsrand des Prostatektomiepräparats auf Tumorfreiheit [2]. Zur Klassifizierung des Prostatakarzinoms und entsprechender Prognosestellung sind somit sowohl pathohistologische als auch klinische Daten von Bedeutung. Leider reichen die bis heute etablierten prognostischen Parameter nicht aus, um hochaggressive von asymptomatischen Tumoren sicher zu unterscheiden. Aus diesem Grund ist es notwendig weitere molekulare Marker zu identifizieren, die es ermöglichen die prognostische Aussagekraft der etablierten Parameter zu unterstützen. Molekulare Marker wie z.B. CHD1 [5], MAP3K7 [6], PTEN [7] und p53 [8] werden aktuell in der Literatur als Erweiterung zu den klassischen Prognosefaktoren diskutiert. Die aktuell verwendeten prognostischen Parameter wie pT-Stadium, pN-Stadium, Gleason-Grad, R-Status und in der Fachliteratur besprochene, potentielle molekulare Marker haben allerdings das gemeinsame Problem, dass sie postoperativ erhoben werden oder aber sich auf Endpunkte mit geringer klinischer Auswirkung wie zum Beispiel das PSA-Rezidiv beziehen.

Die Mehrzahl an Studien zur Untersuchung potentiell neuer Prognosefaktoren beruht auf dem Vergleich einer veränderten Genexpression oder der Deletion eines Chromosomenabschnitts mit der Wahrscheinlichkeit zukünftig ein PSA-Rezidiv zu erleiden. Knapp ein Drittel aller prostatektomierten Patienten zeigt ein PSA-Rezidiv. Dies manifestiert sich selten in einer messbaren Tumorprogression und es versterben nur wenige dieser Patienten an den Folgen ihres Prostatakarzinoms [9-11]. Ein ebenfalls entscheidender Nachteil der erwähnten Studien liegt darin, dass das untersuchte Material aus radikalen Prostatektomien stammt und somit zu einem Zeitpunkt gewonnen wurde, zu dem keine therapeutischen Alternativen für den Patienten mehr möglich sind. Vorteilhaft wäre die Erforschung und Validierung potentieller Prognosefaktoren an präoperativ entnommenen Stanzbiopsien. Deren Nachteil ist allerdings, dass das Untersuchungsmaterial deutlich reduziert ist, somit die Studienzahl erheblich begrenzt ist, und dass häufig keine Verlaufsdaten vorliegen. In Folge dessen werden Prostatektomiepräparate primär aus praktischen Gründen weiterhin als Studienmaterial bei der Untersuchung molekularer Prognosefaktoren benötigt werden. Eine Möglichkeit zur Verbesserung der Aussagekraft von Studien wäre jedoch neben dem PSA-Rezidiv weitere Studienendpunkte zu etablieren.

Die Arbeitsgruppe am Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf (UKE) hat vor Kurzen ein System von alternativen klinisch-biologischen Endpunkten vorgelegt. Dieses System baut auf einer Datenbank aus fast 15.000 Patienten auf, welche nach Diagnose

eines Prostatakarzinoms prostatektomiert wurden. Jene Patienten wurden anschließend einer der folgenden sechs Gruppen zugeordnet (dargestellt in Tabelle 1).

Tabelle 1: Einteilung der Prostatakarzinom-Patienten nach alternativen klinisch-biologischen Endpunkten

Endpunkt	Staging nach pTNM	postoperatives PSA-Rezidiv nach 5 Jahren
1	lokal begrenztes Prostatakarzinom (pT2)	negativ, Patient gilt klinisch als geheilt
2	Prostatakarzinom mit Kapseldurchbruch (pT3a)	negativ, Patient gilt klinisch als geheilt
3	Prostatakarzinom (pT2) ohne nachgewiesene Metastasierung (M0)	positiv, V.a. klinisch nicht relevantes Lokalrezidiv oder nicht nachgewiesene Metastasierung
4	Prostatakarzinom ohne nachgewiesene Metastasierung (M0)	positiv, PSA-Rezidiv nach lokaler Radiotherapie rückläufig, V.a. radiosensibles Lokalrezidiv ohne Metastasierung
5	Prostatakarzinom mit Lymphknotenmetastasen (N1 oder M1a)	positiv
6	Prostatakarzinom mit Fernmetastasen (M1b,c)	positiv

Gelänge es nun die Prostatakrebspatienten zeitnah nach ihrer initialen Stanzbiopsie zuverlässig einer der sechs Endpunktgruppen zuzuordnen, würde dies erheblich zur Verbesserung einer individuellen Therapie beitragen. Bezüglich neuer Prognoseparameter für das Prostatakarzinom sind Deletionen von Chromosomenabschnitten, welche bei der Tumorgenese eine Rolle spielen, von besonderem Interesse. Die Arbeitsgruppe am UKE wies bereits nach, dass Deletionen im Bereich 3p13 [12], 6q15 [6], 10q23 [7] und 17p13 [8] mit einem gesteigerten Risiko eines PSA-Rezidivs assoziiert sind. Amplifikationen auf Chromosom 8q scheinen ebenfalls das Risiko eines PSA-Rezidivs zu erhöhen [13].

Deletionen im chromosomalen Bereich von 5q21 zählen mit einer Deletionsfrequenz von 12-26 % zu den häufigsten genetischen Veränderungen des Prostatakarzinoms [12, 14-18]. Ein für das Prostatakarzinom potentiell relevantes Gen innerhalb dieser Region ist das Gen *CHD1*, welches für das chromodomain helicase DNA binding protein 1 (CHD1) kodiert [15-17]. CHD1 spielt eine Rolle bei der Anordnung, Umverteilung und Entfernung von Nukleosomen am DNA-Doppelstrang. Es ermöglicht damit die Doppelhelix in einem entfalteten und damit transkriptionsbereiten Zustand zu halten [19]. Somit ist das Protein CHD1 von essenzieller Bedeutung für das Chromatinremodelling. Eine Relevanz einiger CHD-Subtypen konnte bereits bei anderen Tumorerkrankungen nachgewiesen werden. CHD2 hat vermutlich tumorsuppressive Eigenschaften und wird mit der DNA-Reparatur während der Entwicklung eines Lymphoms in Verbindung gebracht [20]. Als bereits bekannter Tumorsuppressor ist CHD5 an der Kontrolle der Zellproliferation und Apoptose im Rahmen der p19-p53-Signalkaskade beteiligt [21, 22]. Eine *CHD7*-Mutation wurde in einer Lungenkrebs-Zelllinie gefunden. In Magen- und Darmtumoren konnten sowohl Deletionen als auch heterozygote frameshift Mutationen von *CHD1*, *CHD2*, *CHD3*, *CHD4*, *CHD7* und *CHD8* detektiert werden [23]. CHD8 wird darüber hinaus mit der Regulation der androgenrezeptorabhängigen Transkription in Prostatakarzinomen assoziiert [24].

In einer vorherigen Studie von Burkhardt *et al.* konnten für CHD1 bereits tumorsuppressive Eigenschaften *in vitro* nachgewiesen werden. Des Weiteren korrelierte der *CHD1*-Deletionsstatus signifikant mit der Prognose und einem schlechtem Phänotyp des Prostatakarzinoms [5]. Das Patientenkollektiv der bereits durchgeführten Studie ist jedoch zu gering, um die neu vorgelegten, biologischen Endpunkte statistisch aussagekräftig mit dem *CHD1*-Deletionsstatus zu vergleichen. Aufgrund dessen war das Ziel dieser Dissertation eine möglichst große Anzahl weiterer Patienten auf das Vorliegen einer *CHD1*-Deletion mittels Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) zu untersuchen und damit die Studienfallzahl zu erhöhen. Im Anschluss sollte der Frage nachgegangen werden, ob die Detektion einer *CHD1*-Deletion es ermöglicht, die Patienten im Rahmen der Risikoabschätzung einer der oben genannten Endpunktgruppen zuzuordnen.

2 Material und Methoden

2.1 Gewebekollektiv

Für die Analyse der *CHD1*-Deletionen mittels FISH wurde ein am Institut für Pathologie etablierter Prostata-Prognose-Array (Tissue-Microarray, TMA) verwendet. Ein Subset dieses TMAs wurde bereits in einer vorherigen Studie von Burkhardt *et al.* mittels FISH zur Untersuchung der prognostischen Relevanz der *CHD1*-Deletionen beim Prostatakarzinom analysiert [5]. Um die oben genannte Fragestellung zu bearbeiten, wurden in der vorliegenden Studie die von Burkhardt *et al.* erhobenen Daten um mehr als 5.000 Prostatakarzinome ergänzt.

2.2 Prostata-Prognose-Array (Tissue Micorarray/TMA)

Der TMA ist zusammengesetzt aus 11.152 Prostatakarzinomproben. Diese stammen aus Prostatektomiepräparaten, die in der Zeit von 1992 bis 2011 am Institut für Urologie und in der Martiniklinik am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf entnommen wurden. Die in Formalin fixierten Prostatektomiepräparate wurden geschnitten und in circa 2 x 3 cm große Paraffinblöcke eingelegt. Im Anschluss wurde ein repräsentativer Tumorblick pro Ektomiepräparat von einem Pathologen ausgewählt und eine Prostata-tumorstanze mit einem Durchmesser von 0,6 mm für die Herstellung des TMAs entnommen. Die entnommene Stanze wurde daraufhin in einen neuen Paraffinblock gesetzt. Der TMA besteht insgesamt aus 24 TMA-Blöcken mit 144 bis 522 Tumorgewebestücken. Die klinisch-pathologischen Daten, sowie das Alter der Patienten bei der Prostatektomie und die vorhandenen Follow-up Daten sind in der folgenden Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2: Zusammensetzung des Prostata-Prognose-Array

	Anzahl der Patienten	
	Patientenkollektiv auf dem Prostata- Prognose-Array (n=11.152)	Biochemisches Rezidiv innerhalb der Kategorien (n=1.824)
Verlaufsbeobachtung (Monate)		
Median	53,4	-
Mittelwert	36,8	-
Alter (Jahre)		
<50	318	49
50-60	2.768	460
60-70	6.548	1.081
>70	1.439	232
Präoperativer PSA-Wert (ng/ml)		
<4	1.407	142
4-10	6.735	827
10-20	2.159	521
>20	720	309
Tumorstadium (AJCC 2002)		
pT2	7.370	570
pT3a	2.409	587
pT3b	1.262	618
pT4	63	49
Gleason-Score		
≤3+3	2.859	193
3+4	1.565	573
4+3	6.183	849
≥4+4	482	208
Lymphknotenmetastasen		
pN0	6.117	1.126
pN+	561	291
Resektionsrand		
R0	8.984	1.146
R1	1.970	642
Anmerkung: Die Anzahl in den verschiedenen Kategorien entspricht nicht immer dem vollen Patientenkollektiv von 11.152, da gegebenenfalls Daten fehlen. Abkürzung: AJCC, American Joint Committee on Cancer.		

2.3 *Escherichia coli* (*E. coli*) Plasmide

Zur Herstellung der Fluoreszenz-markierten DNA-Stränge (FISH-Sonden) wurden mit BACs (bacterial artificial chromosome) transformierte *E. coli* DH10B von der Firma SourceBioscience (Cambridge, UK) verwendet. Für die Untersuchung der *CHD1*-Deletion wurden die DH10B-Klone RP11-533M23 und RP11-422M08 ausgewählt.

2.4 Reagenzien und Kits

Im Folgenden sind alle für die Arbeit verwendeten Reagenzien und Kits aufgelistet (Tabelle 3).

Tabelle 3: Reagenzien und Kits

Reagenzien / Kits	Firma
Ethanol Ph Eur (1 Liter)	VWR, Darmstadt
nukleasefreies Wasser	Sigma-Aldrich, München
Isopropanol 100%	Merck, Darmstadt
Orange dUTP (50 nmol, lyophilisiert)	Abbot, Ludwigshafen
Ethanol 96% (vergällt)	VWR, Darmstadt
COT Human DNA	Roche, Grenzach-Wyhlen
Mounting Medium with DAPI (VECTASHIELD)	Vector Laboratories
NP-40	Abbot, Ludwigshafen
20x SSC	Abbot, Ludwigshafen
Pretreatment Reagent 500 ml	Abbot, Ludwigshafen
Protease Buffer 500 ml	Abbot, Ludwigshafen
Protease I 500 mg	Abbot, Ludwigshafen
Xylol	J. T. Baker, Center Valley, USA
Ethanol 80% (vergällt)	VWR, Darmstadt
Formamid pro analysi	Merck, Darmstadt
Dextransulfat (Natriumsalz)	Roth, Karlsruhe
Immersol F580®	Zeiss, Oberkochen
Reinigungsbenzin	Biesterfeld Chemiedistribution GmbH
Nick Translations Reagent Kit	Abbot, Ludwigshafen

Reagenzien / Kits	Firma
NucleoBond® BAC 100	Macherey-Nagel, Düren
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich, München
LB broth, Miller	Sigma-Aldrich, München
CEP 3 Spectrum Orange	Abbot, Ludwigshafen

2.5 Geräte

In Tabelle 4 sind alle für die Arbeit verwendeten Geräte aufgelistet.

Tabelle 4: Geräte

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

2.6 Verbrauchsmaterialien

Im Folgenden sind die den normalen Laborbedarf übersteigenden Verbrauchsmaterialien aufgelistet (Tabelle 5).

Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien

Material	Firma
Safe-Lock Reaktionsgefäße, amber, 0,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Safe-Lock Reaktionsgefäße, amber	Eppendorf, Hamburg
Deckgläser No.1 24 x 60 mm	Marienfeld, Lauda Königshofen
Fixogum	Marabu, Tamm

2.7 Software und Datenbanken

Ensembl: Auswahl der DH10B-Klone zur Herstellung der FISH-Sonden.

JMP 9.0.2: statistische Auswertung der FISH-Analyse

Excel Version 14.1.4: Erstellen von Balkendiagrammen und Tabellen

PowerPoint Version 14.1.4: Erstellen von Abbildungen

2.8 Herstellung der FISH-Sonden

Die Herstellung der FISH-Sonden erfolgte nach einem am Institut für Pathologie etablierten und standardisierten Protokoll.

2.8.1 Plasmid-Isolierung aus *E. coli* DH10B

Für die Herstellung der FISH-Sonden mit Hilfe der Nick Translation ist die Isolierung von reiner Plasmid-DNA notwendig. Dazu wird die Plasmid-DNA von der chromosomalen DNA und weiteren unerwünschten Zellbestandteilen getrennt. Die Isolierung der Plasmid-DNA mit dem NucleoBond® BAC 100 Kit von der Firma Machery-Nagel (Düren, Deutschland) wurde wie folgt beschrieben durchgeführt.

1. Kultivierung der *E. coli* DH10B-Klone

- Ansetzen der Vorkultur: 10 ml LB-Medium, 30 µl Chloramphenicol 3,4 % und mehrere kleine Bakterienkolonien (mit Pipettenspitze aufnehmen)
- Inkubation der Vorkultur bei 37 °C und 190 rpm für 8 Stunden bis zu einer leichten Trübung des LB-Mediums

- Ansetzen der Hauptkultur: 250 ml LB-Medium, 750 µl Chloramphenicol 3,4 % und 2 ml Vorkultur
- Inkubation der Hauptkultur bei 37 °C und 190 rpm für 16 Stunden bis zu einer leichten Trübung des LB-Mediums

2. Herstellung des Bakterienpellets

- Komplette Hauptkultur in ein 250 ml Zentrifugengefäß überführen
- Zentrifugation: 4 °C, 6.000 g, 15 Minuten
- Überstand verwerfen
- Zentrifugenröhrchen auf den Kopf stellen zur vollständigen Entfernung des LB-Mediums

3. Resuspension des Bakterienpellets

- RNase A zum S1-Buffer geben
- 24 ml S1-Buffer auf das Bakterienpellet pipettieren
- Bakterienpellet durch mehrmaliges hoch und runter pipettieren resuspendieren

4. Bakterienlyse / Ausfällung unerwünschter Bestandteile

- 24 ml S2-Buffer zur Bakteriensuspension pipettieren
- Inkubation: 4 Minuten bei Raumtemperatur
- 24 ml S3-Buffer zur Bakteriensuspension pipettieren
- Suspension homogenisieren durch langsame kreisende Bewegung der Zentrifugengefäße (circa 15 Umdrehungen)
- Inkubation: 5 Minuten auf Eis
- Filter mit dH₂O befeuchten
- Überstand filtrieren und Filtrat in einem Erlenmeyerkolben auffangen

5. Isolierung der Plasmid-DNA

- 6 ml N2-Buffer auf die Anionenaustauscher-Säule pipettieren (Equilibrierung der Säule)
- Filtrat auf die Säule geben (Bindung der Plasmid-DNA an die Säule)
- Zweimaliges Waschen der Säule mit je 18 ml N3-Buffer

- N5-Buffer auf 50 °C erwärmen und 15 ml N5-Buffer auf die Säule pipettieren (Eluierung der Plasmid-DNA)
- 11 ml Isopropanol 100 % zum Eluat pipettieren
- Zentrifugation: 4 °C, 16.500 g, 30 Minuten (Ausfällung der Plasmid-DNA)
- Überstand verwerfen
- 5 ml Ethanol 70 % zum DNA-Pellet pipettieren
- Zentrifugation: 4 °C, 16.500 g, 10 Minuten (Waschen der Plasmid-DNA)
- Überstand verwerfen
- 150 µl Nuklease-freies Wasser direkt auf das Pellet geben
- Inkubation über Nacht bei 4 °C (Lösen der Plasmid-DNA)

6. Bestimmung der DNA-Konzentration mit dem Peqlab NanoDrop® ND-1000 UV/Vis-Spektralphotometer.

- 1,5 µl RNase-freies Wasser bei 260 nm messen (Leerwell)
- 1,5 µl der DNA-Probe bei 260 nm messen
- Absorption von 1 entspricht einem DNA-Gehalt von 50 µg/ml

2.8.2 Nick Translation

Die Nick Translation dient der Herstellung der FISH-Sonden. Die FISH-Sonden werden nach ihrer Aufreinigung (siehe Punkt 2.8.3) zur Detektion von spezifischen DNA-Sequenzen in der FISH verwendet. Zur Durchführung der Nick Translation wurde das Nick Translation Reagent Kit der Firma Abbott (Illinois, USA) wie folgt verwendet.

1. Plasmid-DNA-Verdünnung

- Plasmid-DNA mit Nuklease-freiem Wasser auf eine Konzentration von 1 µg / 17,5 µl in einem braunen Reagiergefäß verdünnen

2. Nick Translation Masteransatz herstellen (Angabe für eine Probe)

- 5 µl Nick Translation Buffer
- 10 µl 0,1 mM dNTPs
- 5 µl 0,1 mM dTTPs
- 2,5 µl 0,2 mM Orange dUTPs
- 10 µl Nick Translation Enzym (DNA-Polymerase I, DNase I)
- vortexen

3. Nick Translation Ansatz herstellen (Angabe für eine Probe)

- 32,5 µl Nick Translation Masteransatz
- 17,5 µl Plasmid-DNA-Verdünnung
- vortexen und bei 2.000 g für 1 Minute zentrifugieren

4. Nick Translation starten (Primus, Firma ALS, Jena, Deutschland)

- Inkubation: 8 Stunden bei 15 °C
- Abstoppen der Reaktion: 10 Minuten bei 72 °C
- Lagerung: bei -4 °C

2.8.3 Sondenaufreinigung

Die Aufreinigung der FISH-Sonden ist notwendig, um unerwünschte Bestandteile wie ungebundene Nukleotide oder Salze zu entfernen. Die Sondenaufreinigung wurde mit dem QIAquick® Nucleotide Removal Kit der Firma Qiagen (Venlo, Niederlande) wie folgt durchgeführt.

1. Vorbereitung der Buffer

- PNI-Buffer mit 19 ml 100 %igem Isopropanol verdünnen
- PE-Buffer mit 30 ml 100 %igem Ethanol verdünnen

2. Sondenaufreinigung

- FISH-Sonde (siehe Punkt 2.8.2) 500 µl PNI-Buffer zusetzen und mischen
- Lösung auf den Filter des QIAquick spin column pipettieren
- Zentrifugation: Raumtemperatur, 3.800 g, 1 Minute
- Eluat verwerfen
- 750 µl PE-Buffer auf den Filter pipettieren
- Zentrifugation: Raumtemperatur, 3.800 g, 1 Minute
- Eluat verwerfen
- Zentrifugation: Raumtemperatur, 17.900 g, 1 Minute (Filter muss trocken sein)
- QIAquick spin column auf ein braunes Eppendorf-Tube setzen
- 60 µl DNase-freies Wasser direkt auf den Filter pipettieren
- Inkubation: 1 Minute bei Raumtemperatur

- Zentrifugation: Raumtemperatur, 17.900 g, 1 Minute (Eluierung der FISH-Sonde)

3. Aufkonzentrierung der FISH-Sonde

- Vakuumzentrifuge: 45 °C, 20 Minuten
- Beide FISH-Sonden in ein gemeinsames braunes Reagiergefäß pipettieren
- Vakuumzentrifuge: 45 °C, 20 Minuten
- CHD1-FISH-Sonde bis zur FISH bei -20 °C lagern

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

Die FISH dient der Detektion von spezifischen DNA-Sequenzen direkt am Gewebe. In der Tumorforschung wird die FISH zur Untersuchung von Deletionen (Gen-Verluste), Amplifikationen (Gen-Vermehrung) oder Translokationen (Gen-Brüche und Gen-Fusionen) verwendet. Zur Durchführung der FISH an Formalin-fixierten, paraffin-eingebetteten TMAs ist eine Vorbehandlung des Gewebes zur Entparaffinierung und zum Proteinabbau erforderlich. Erst dann ist eine Hybridisierung der FISH-Sonden an die Ziel-DNA möglich. Abschließend werden nicht gebundene Nukleotidstränge durch einen stringenten Waschprozess entfernt. Die Durchführung der FISH erfolgte nach einem am Institut für Pathologie etablierten standardisierten Protokoll, welches im Folgenden aufgeführt ist.

1. Vorbehandlung der TMAs

1.1 Entparaffinierung

- TMAs dreimal für 10 Minuten in Xylol stellen (Lösung des Paraffins)
- TMAs zweimal für 5 Minuten in 96 %igen Ethanol stellen (Verdrängung des Xylols)
- TMAs auf einer Heizplatte bei 48 °C für 3 Minuten trocknen

1.2 Proteinverdau

- Pretreatment-Lösung auf 80 °C erwärmen und TMAs für 15 Minuten inkubieren (Bruch der Formalin-bedingten Protein-Protein-Vernetzungen)
- TMAs zweimal für 1 Minute in dH₂O waschen
- Proteaselösung auf 37 °C erwärmen und TMAs für 150 Minuten inkubieren
- TMAs zweimal für 1 Minute in dH₂O waschen

1.3 Entwässerung der TMAs

- TMAs für je 3 Minuten in Ethanol 70 %, Ethanol 80 % und Ethanol 96 % stellen
- TMAs auf einer Heizplatte bei 48 °C für 3 Minuten trocknen

2. DNA-Denaturierung und FISH-Sonden Hybridisierung

- Herstellung des Hybridisierungsansatzes
14 µl Basismix (15 ml Formamid, 4,5 ml 20xSSC, 3,0 g Dextransulfat)
2 µl Cot-DNA
4 µl *CHD1*-Sonde
0,5 µl grün-fluoreszierende Centromer 10-Sonde
kurz vortexen und bei 2.500 g für 10 Sekunden zentrifugieren
- Hybridisierungsansatz auf die TMAs pipettieren und mit Deckgläschen eindecken
- Deckgläschen mit Fixogum versiegeln, Fixogum für 10 Minuten trocknen
- DNA-Denaturierung: TMAs bei 72 °C im Hybrit für 10 Minuten
- Hybridisierung der FISH-Sonden: bei 37 °C für 40 Stunden

3. Waschen der TMAs

- Hybridisierungswaschpuffer herstellen
100 ml 20xSSC
3 ml NP40
mit H₂O ad 1000 ml
pH-Wert: 7,25
- Zwei Küvetten mit Hybridisierungswaschpuffer füllen: 1. Küvette bei Raumtemperatur, 2. Küvette bei 72 °C ins Wasserbad
- Fixogum von den Deckgläschen entfernen und TMAs bei Raumtemperatur in Hybridisierungswaschpuffer stellen (Deckgläschen lösen sich)
- TMAs für 2 Minuten in 72 °C heißen Hybridisierungswaschpuffer stellen
- TMAs kurz in dH₂O waschen
- TMAs im Dunkeln für 10 Minuten trocknen
- 1 Tropfen DAPI auf die TMAs pipettieren und luftblasenfrei mit einem Deckgläschen eindecken
- TMAs bis zur mikroskopischen Auswertung bei -20 °C lagern

2.10 Auswertung

2.10.1 Mikroskopische Auswertung

Für die FISH-Analyse wurde ein Lichtmikroskop von der Firma Zeiss (Oberkochen, Deutschland) mit den entsprechenden Fluoreszenzfiltern (AHF) verwendet. Als nicht auswertbar wurden alle Gewebespots bewertet, bei denen aufgrund einer unzureichenden Hybridisierung ein zu schwaches oder kein *CHD1*-Signal in den Tumorzellen und Referenzzellkernen (z.B. Stromazellkerne) sichtbar war.

Eine normale *CHD1*-Kopiezahl wurde definiert als die gleiche Anzahl an *CHD1*-Signalen (orange Signale) und Zentromer 10-Signalen (grüne Signale) in den Tumorzellkernen (siehe Abb. 1). Eine heterozygote *CHD1*-Deletion lag definitionsgemäß vor, wenn in $\geq 60\%$ der Tumorzellkerne weniger *CHD1*-Signale als Zentromer 10-Signale detektiert wurden (siehe Abb. 2). Eine homozygote *CHD1*-Deletion wurde definiert als das vollständige Fehlen von *CHD1*-Signalen in den Tumorzellkernen bei Vorhandensein von *CHD1*-Signalen in den Referenzzellkernen sowie Zentromer 10-Signalen in den Tumor- und Referenzzellkernen (siehe Abb. 3).

Abb. 1: Normale *CHD1*-Kopiezahl mit zwei orangen *CHD1*-Signalen und zwei grünen Zentromer 10-Signalen

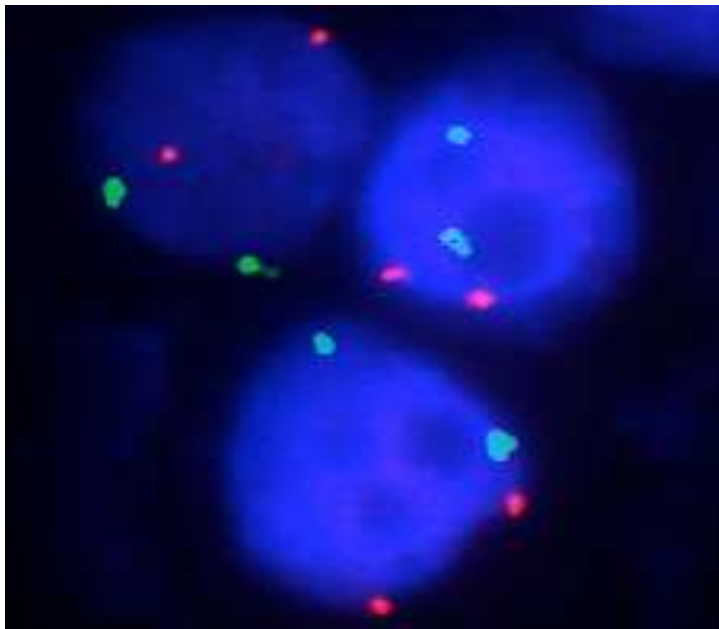


Abb. 2: Heterozygote *CHD1*-Deletion mit keinem oder einem orangen *CHD1*-Signal und ein bis zwei grünen Zentromer 10-Signalen

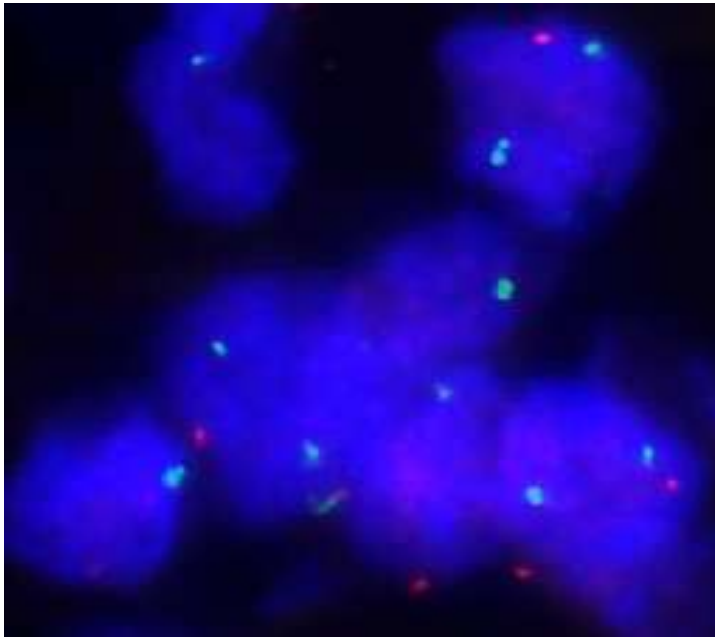
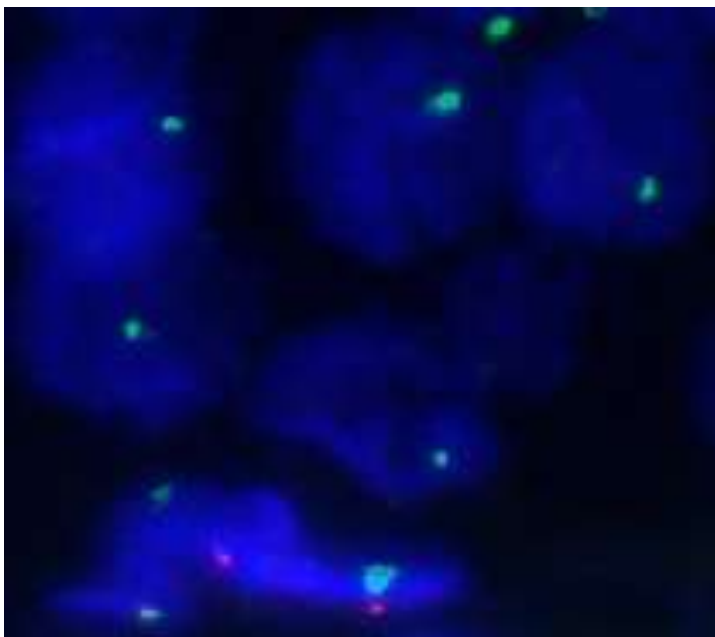


Abb. 3: Homozygote *CHD1*-Deletion mit fehlenden orangen *CHD1*-Signalen in den Tumorzellkernen bei vorhandenem *CHD1*-Signal in den Stromazellkernen und grünen Zentromer 10-Signalen in den Stroma-und Tumorzellkernen



2.10.2 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse der FISH-Auswertung wurde mit dem Programm JMP 9.0.2. durchgeführt. Zur Ermittlung der prognostischen Relevanz der *CHD1*-Deletionen wurde ein Log-Rank-Test verwendet. Außerdem wurde eine Kaplan-Meier-Kurve erstellt. Die Korrelation der *CHD1*-Deletion mit den klinischen-pathologischen Parametern und dem *TMPRSS2:ERG*-Fusionsstatus wurde mit einem Chi-Quadrat-Test bestimmt. Der Chi-Quadrat-Test wurde ebenfalls zur Assoziation der *CHD1*-Deletion mit den neuen klinisch-biologischen Endpunkten verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Auswertbarkeit

In der vorangegangenen Studie von Burkhardt *et al.* (2013) wurden 3.261 Tumore untersucht, von denen 2.093 in die Auswertung eingingen. Darauf aufbauend erfolgte die Untersuchung weiterer 7.895 Proben. Von diesen wurden 2.758 (34,9 %) aufgrund unzureichender Hybridisierung oder nicht ausreichend vorhandenem Tumorgewebe der Auswertung entzogen. So ergab sich für die folgenden Berechnungen und Korrelationsanalysen ein Gesamt-Probenkollektiv von 7.230 auswertbaren Gewebesspots.

3.2 Korrelation der *CHD1*-Deletion mit klinisch-pathologischen Daten

Mittels der FISH Analyse wurde in 701 (9,7 %) der 7.230 auswertbaren Prostatakarzine eine *CHD1*-Deletion nachgewiesen. Der Anteil an heterozygoten Deletionen betrug dabei 7,3 % (525/7.230) und an homozygoten Deletionen 2,4 % (176/7.230). Um die statistische Signifikanz der Werte zu beurteilen, wurde der Chi-Quadrat-Test verwendet. Demnach ergab sich sowohl für die heterozygoten als auch die homozygoten Deletionen eine signifikante Assoziation im Bezug auf ein fortgeschrittenes Tumorstadium ($p=0,0034$) und einen erhöhten Gleason-Score ($p<0,0001$). Keinen signifikanten Zusammenhang hingegen zeigten *CHD1*-Deletionen mit dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen, einem erhöhten präoperativen PSA-Wert und einer R1-Tumorresektion (siehe Tabelle 6.1). Sowohl der Anteil an heterozygoten *CHD1*-Deletionen als auch der Anteil an homozygoten *CHD1*-Deletionen stieg mit dem Gleason-Score und dem pT-Stadium an. In einer weiteren Analyse, in der die heterozygoten und homozygoten *CHD1*-Deletionen als Deletionen insgesamt zusammengefasst wurden, zeigte sich ebenfalls ein signifikanter Anstieg der Deletionsrate mit steigendem Gleason-Score ($p<0,0001$) und pT-Stadium ($p=0,0015$). Eine Assoziation mit dem Metastasierungsstatus der Lymphknoten, dem präoperativen PSA-Wert und dem R-Status konnte auch in dieser Analyse nicht gefunden werden (siehe Tabelle 6.2).

Tabelle 6.1: Korrelation der *CHD1*-Deletion (unterteilt in normalen, heterozygot und homozygot deletierten Genstatus) mit klinisch-pathologischen Daten. normal: keine *CHD1*-Kopiezahlveränderung; het del: heterozygote *CHD1*-Deletion, Verlust eines *CHD1*-Alleles; homo del: homozygote *CHD1*-Deletion, Verlust beider *CHD1*-Allele.

		auswertbar (n)	normal (%)	het del (%)	homo del (%)	p-Wert
alle Tumore		7.230	6.529 (90,3)	525 (7,3)	176 (2,4)	
Tumorstadium	pT2	4.617	4.217 (91,3)	294 (6,4)	106 (2,3)	0,0034
	pT3a	1.634	1.453 (88,9)	138 (8,5)	43 (2,6)	
	pT3b	901	792 (87,9)	83 (9,2)	26 (2,9)	
	pT4	45	39 (86,7)	6 (13,3)	0 (0,0)	
Gleason-Score	≤3+3	1.749	1.657 (94,7)	76 (4,4)	16 (0,9)	<0,0001
	3+4	4.023	3.673 (91,3)	267 (6,6)	83 (2,1)	
	4+3	1.067	876 (82,1)	132 (12,4)	59 (5,5)	
	≥4+4	347	287 (82,7)	45 (13,0)	15 (4,3)	
Lymphknoten- metastasen	N0	4.004	3.558 (88,9)	332 (8,3)	114 (2,8)	0,3604
	N+	410	361 (88,0)	32 (7,8)	17 (4,2)	
präoperativer PSA-Wert (ng/μl)	<4	884	809 (91,5)	59 (6,7)	16 (1,8)	0,1309
	4-10	4.308	3.905 (90,7)	302 (7,0)	101 (2,3)	
	10-20	1.458	1.295 (88,8)	114 (7,8)	49 (3,4)	
	>20	488	438 (89,8)	41 (8,4)	9 (1,8)	
Resektions- rand	R0	5.735	5.186 (90,4)	407 (7,1)	142 (2,5)	0,7130
	R1	1.363	1.230 (90,2)	103 (7,6)	30 (2,2)	

Tabelle 6.2: Korrelation der *CHD1*-Deletion (unterteilt in normalen und deletierten Genstatus) mit klinisch-pathologischen Daten. normal: keine *CHD1*-Kopiezahlveränderung; Deletion: homozygote oder heterozygote *CHD1*-Deletion.

		auswertbar (n)	normal (%)	Deletion (%)	p-Wert
alle Tumore		7.230	6.529 (90,3)	701 (9,7)	
Tumorstadium	pT2	4.617	4.217 (91,3)	400 (8,7)	0,0015
	pT3a	1.634	1.453 (88,9)	181 (11,1)	
	pT3b	901	792 (87,9)	109 (12,1)	
	pT4	45	39 (86,7)	6 (13,3)	
Gleason-Score	≤3+3	1.749	1.657 (94,7)	92 (5,3)	<0,0001
	3+4	4.023	3.673 (91,3)	350 (8,7)	
	4+3	1067	876 (82,1)	191 (17,9)	
	≥4+4	347	287 (82,7)	60 (17,3)	
Lymphknoten-metastasen	N0	4.004	3.558 (88,9)	446 (11,1)	0,6225
	N+	410	361 (88,0)	49 (12,0)	
präoperativer PSA-Wert (ng/μl)	<4	884	809 (91,5)	75 (8,5)	0,1220
	4-10	4.308	3.905 (90,7)	403 (9,3)	
	10-20	1.458	1.295 (88,8)	163 (11,2)	
	>20	488	438 (89,8)	50 (10,2)	
Resektionsrand	R0	5.735	5.186 (90,4)	549 (9,6)	0,8352
	R1	1.363	1.230 (90,2)	133 (9,8)	

3.3 Prognostische Relevanz der *CHD1*-Deletion

Zur Untersuchung der prognostischen Relevanz der *CHD1*-Deletion wurde das Auftreten eines PSA-Rezidivs als Studienendpunkt verwendet. Das PSA-Rezidiv-freie Überleben bezogen auf den *CHD1*-Status wurde mittels des Kaplan-Meier-Verfahrens für 6.252 Patienten dargestellt. Die prognostische Relevanz der *CHD1*-Deletion wurde mittels Log-Rank-Test ermittelt, indem Patienten mit Tumoren ohne *CHD1*-Deletion mit Patienten deren Tumore eine *CHD1*-Deletion aufwiesen verglichen wurden. Das Vorhandensein einer *CHD1*-Deletion im Tumor ergab für jene Patienten eine signifikant schlechtere Prognose gegenüber denjenigen mit Tumoren ohne eine *CHD1*-Kopiezahlveränderung ($p < 0,0001$, siehe Abb. 4). Ob von der *CHD1*-Deletion ein Allel (heterozygot) oder zwei Allele (homozygot) betroffen waren, hatte keinen Einfluss auf das Auftreten eines PSA-Rezidivs und damit auf die Patientenprognose.

Die Art der Deletion, eine homozygote im Vergleich zu einer heterozygoten Deletion, zeigte ebenfalls keine Auswirkungen auf die Prognose (siehe Abb. 5).

Abb. 4: Prognostische Relevanz der *CHD1*-Deletion. normal: keine *CHD1*-Kopiezahlveränderung; Deletion: homozygote oder heterozygote *CHD1*-Deletion.

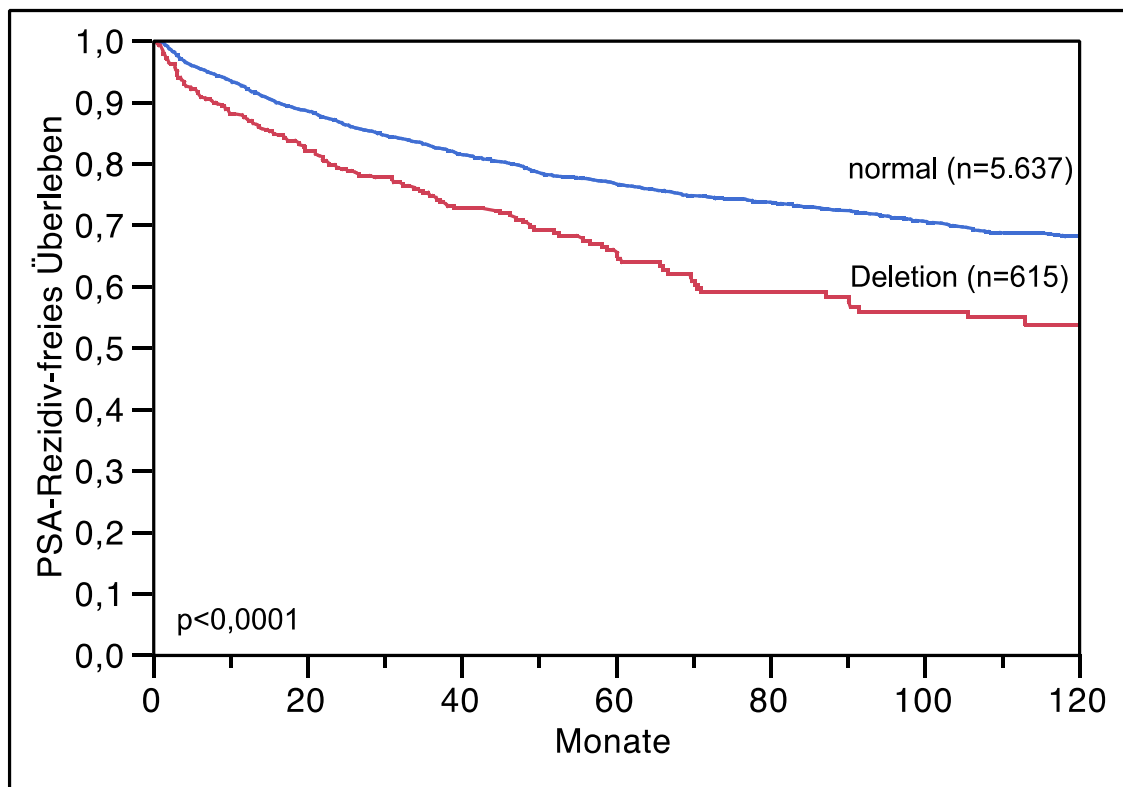
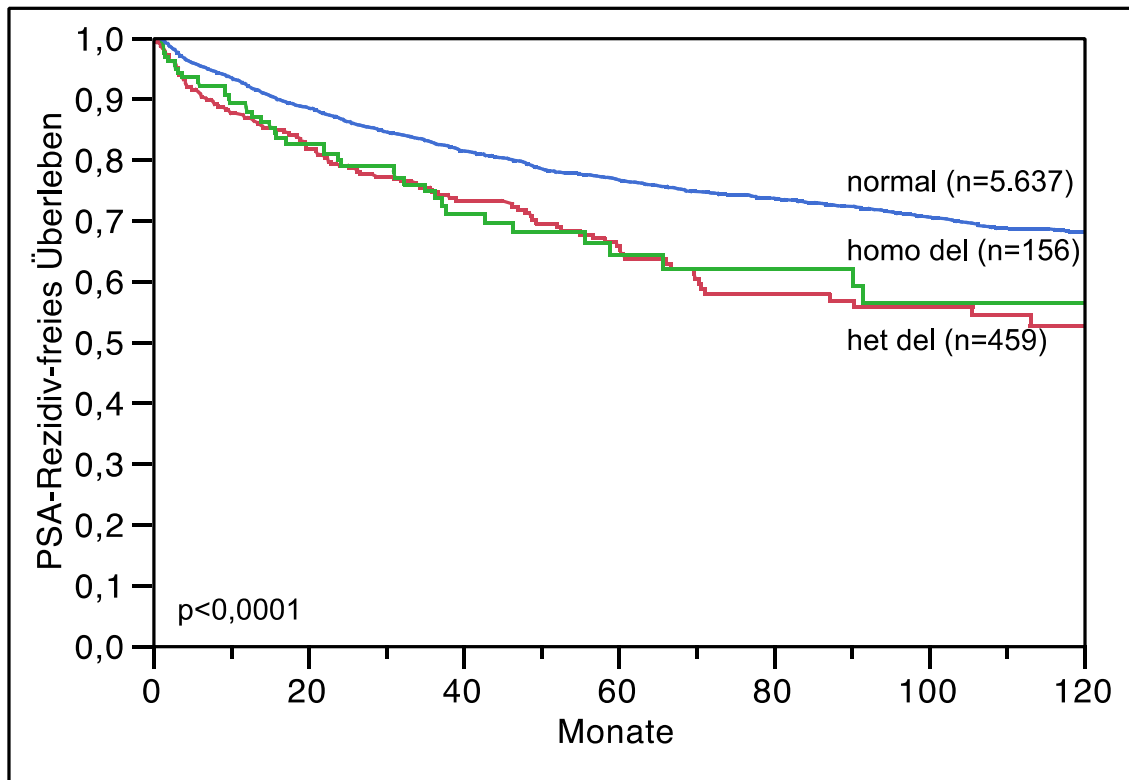


Abb. 5: Prognostische Relevanz der homozygoten und heterozygoten *CHD1*-Deletion. normal: keine *CHD1*-Kopiezahlveränderung; homo del: homozygote Deletion, Verlust beider *CHD1*-Allele; het del: heterozygote Deletion, Verlust eines *CHD1*-Alleles.



3.4 Korrelation der *CHD1*-Deletion mit dem *ERG*-Fusions-Status

In einer vorherigen Studie der Arbeitsgruppe wurde der *ERG*-Fusionsstatus der in der Studie verwendeten Prostatakarzinome anhand der *ERG*-Expression immunhistochemisch bestimmt [25]. Von diesen Daten ließen sich 6.472 Fälle mit dem zu dem jeweiligen Patienten erhobenen *CHD1*-Deletionsstatus korrelieren. Um die Assoziation zwischen dem *ERG*-Fusionsstatus und dem Vorhandensein einer *CHD1*-Deletion zu bestimmen, wurde der Chi-Quadrat-Test angewendet. Dieser zeigte eine signifikante Korrelation der *CHD1*-Deletion mit *ERG*-negativen Tumoren ($p < 0,0001$). Die *CHD1*-deletierten Fälle traten wesentlich häufiger bei *ERG*-negativen (82,0 %) im Vergleich zu *ERG*-positiven Tumoren (18,0 %) auf (siehe Abb. 6). Im Gegensatz dazu war bei Patienten mit normaler *CHD1*-Kopiezahl das Vorkommen von *ERG*-negativen (50,2 %) gegenüber *ERG*-positiven Tumoren (49,8 %) annähernd identisch (siehe Abb. 6). Unterscheidet man die *CHD1*-Deletionen weiter in homozygote und heterozygote Deletionen, so korrelieren 76,5 % der heterozygot-deletierten Fälle mit einem negativen und nur 23,5 % mit einem positiven *ERG*-Fusionsstatus. Eine noch deutlichere Tendenz zu den *ERG*-Negativen zeigen homozygote Deletionen (siehe Abb. 7).

Abb. 6: Korrelation der *CHD1*-Deletion mit dem *ERG*-Fusionsstatus. normal: keine *CHD1*-Kopiezahlveränderung; Deletion: homozygote oder heterozygote *CHD1*-Deletion.

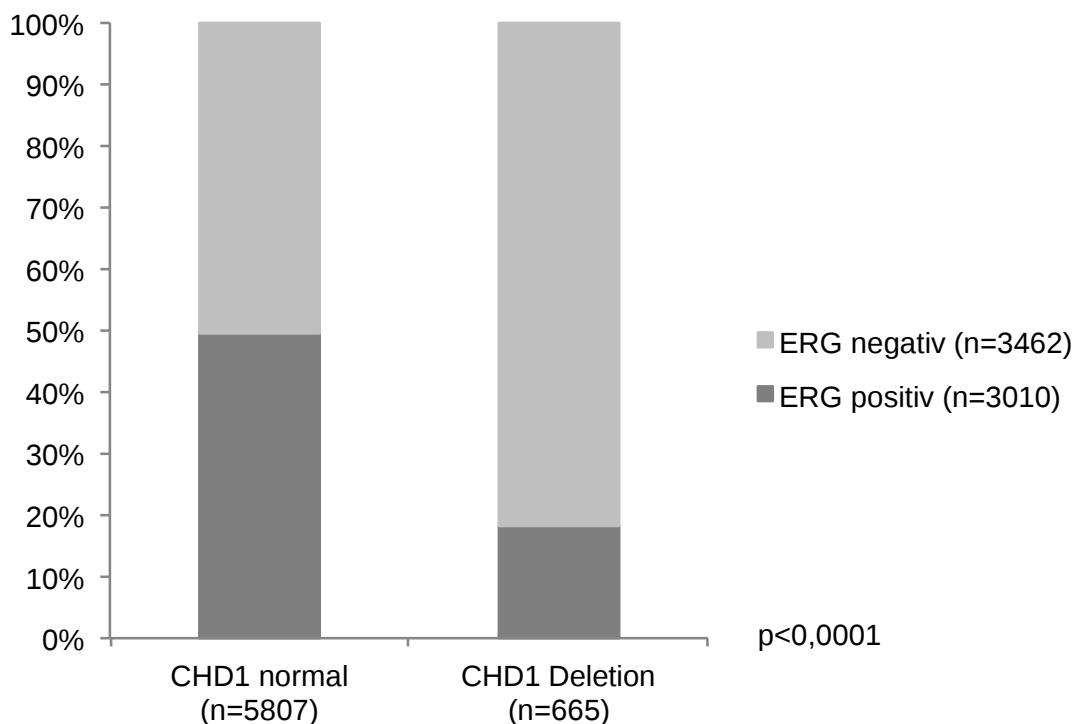
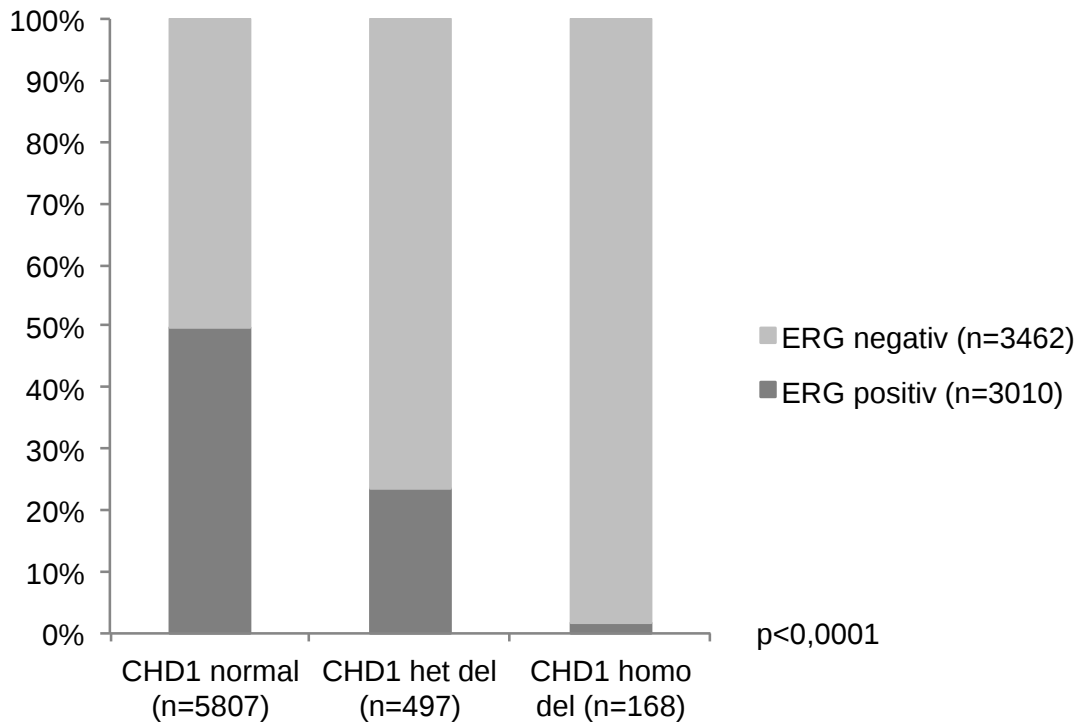


Abb. 7: Korrelation heterozygoter und homozygoter *CHD1*-Deletionen mit dem *ERG*-Fusionsstatus. normal: keine *CHD1*-Kopiezahlveränderung; het del: heterozygote Deletion, Verlust eines *CHD1*-Alleles; homo del: homozygote Deletion, Verlust beider *CHD1*-Allele.

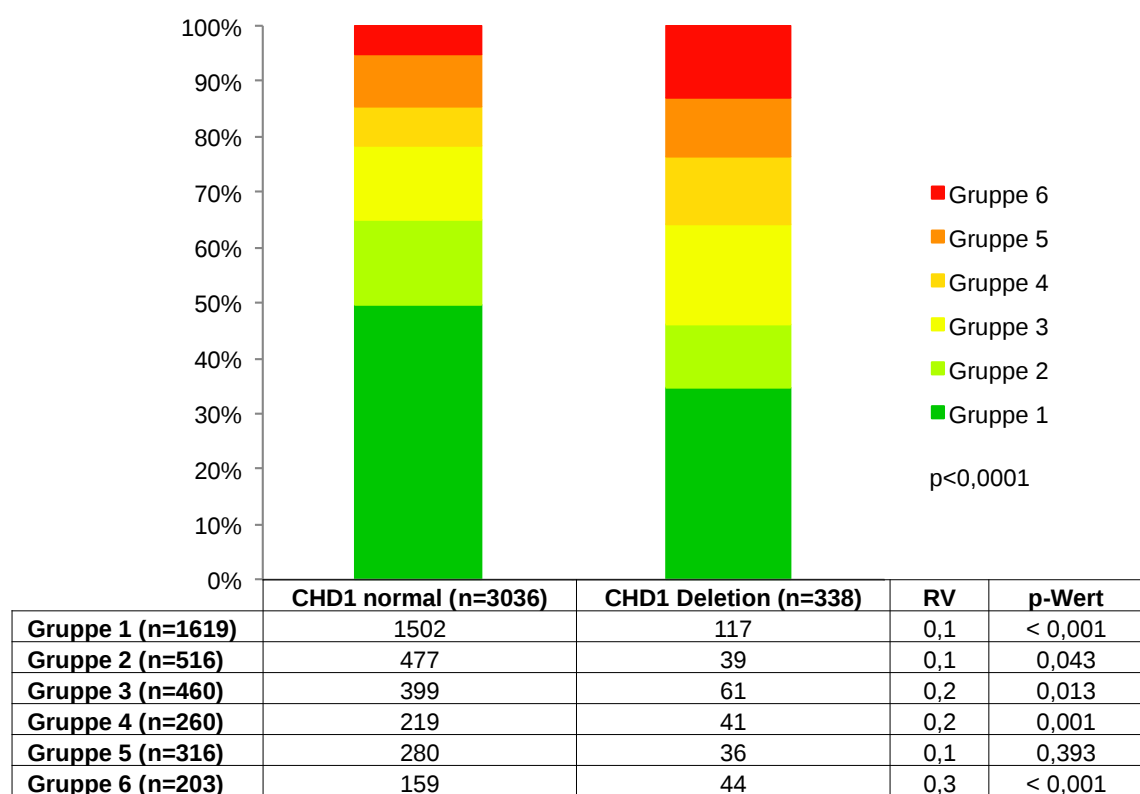


3.5 Korrelation der *CHD1*-Deletion mit den neuen klinisch-biologischen Endpunkten

Die Korrelation der *CHD1*-Deletion mit den sechs neuen klinisch-biologischen Endpunkten wurde mit dem Chi-Quadrat-Test überprüft. Die Grundlage dafür bildete ein Datenpool von 3.374 Fällen, für welche sowohl der *CHD1*-Kopiezahlstatus als auch der klinisch-biologische Endpunkt ermittelt werden konnte. Die Analyse aller Tumoren zeigte eine eindeutig signifikante Assoziation zwischen dem *CHD1*-Kopiezahlstatus und der Verteilung der sechs getesteten Endpunkte ($p < 0,0001$). In den Tumoren mit einer *CHD1*-Deletion war insbesondere die Anzahl der Patienten mit einem schlechten Phänotyp des Karzinoms deutlich höher als in den Tumoren mit einem normalen Kopiezahlstatus. Der Nachweis einer *CHD1*-Deletion in den Tumoren führte zu einem um das mindestens 1,7-fache höhere Risiko eines Lokalrezidivs (Gruppe 4) oder einer hämatogenen Metastasierung (Gruppe 6) im Vergleich zu den Tumoren ohne *CHD1*-Deletion ($p \leq 0,001$). Die Wahrscheinlichkeit, dass ein Tumor einen eher günstigen Phänotyp zeigt, war hingegen beim Nachweis einer *CHD1*-Deletion deutlich geringer. Tu-

more mit einer *CHD1*-Deletion wiesen nur 0,7-mal so häufig ein auf die Prostata begrenztes Wachstum auf im Vergleich zu Tumoren ohne *CHD1*-Deletion ($p < 0,001$). Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Abbildung 8 dargestellt.

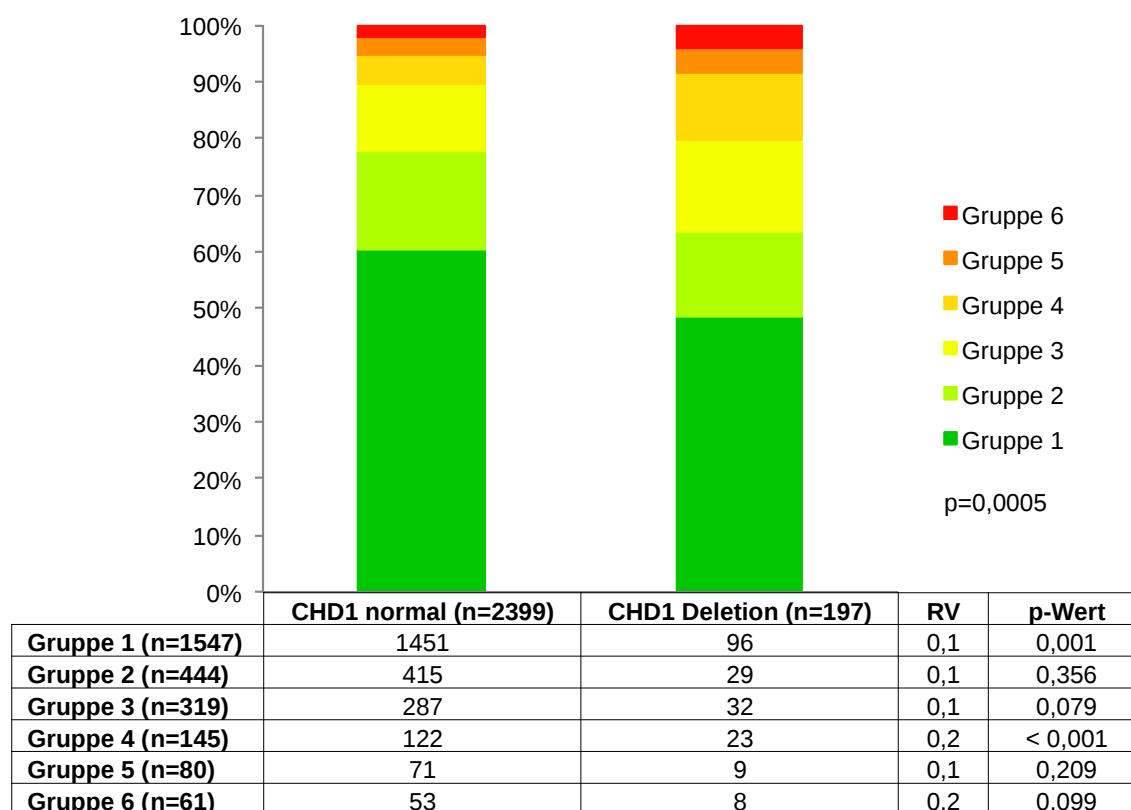
Abb. 8: Korrelation der *CHD1*-Deletion mit den neuen klinisch-biologischen Endpunkten in allen Tumoren. RV: Risikoverhältnis; Gruppe 1: lokal begrenztes Prostatakarzinom (pT2), Gruppe 2: Kapselüberschreitende Prostatakarzinome (pT3a), Gruppe 3: nicht klinisch relevantes Lokalrezidiv, Gruppe 4: reversibles Lokalrezidiv nach Bestrahlung, Gruppe 5: lymphogene Metastasierung zum Zeitpunkt der Ektomie, Gruppe 6: hämatogene Metastasierung.



Um zu prüfen, ob die Assoziation der *CHD1*-Deletion mit den klinisch-biologischen Endpunkten vom Gleason-Score, einem der wichtigsten prognostischen Parameter beim Prostatakarzinom, beeinflusst wird, wurde außerdem eine Analyse in den Untergruppen der Tumoren mit einem geringen Gleason-Score ($\leq 3+4$) und einem hohen Gleason-Score ($\geq 4+3$) durchgeführt. Diese Analyse ergab, dass der Zusammenhang der *CHD1*-Deletion mit den neuen klinisch-biologischen Endpunkten zum größten Teil auf der Gruppe der Tumoren mit einem geringen Gleason-Score basiert.

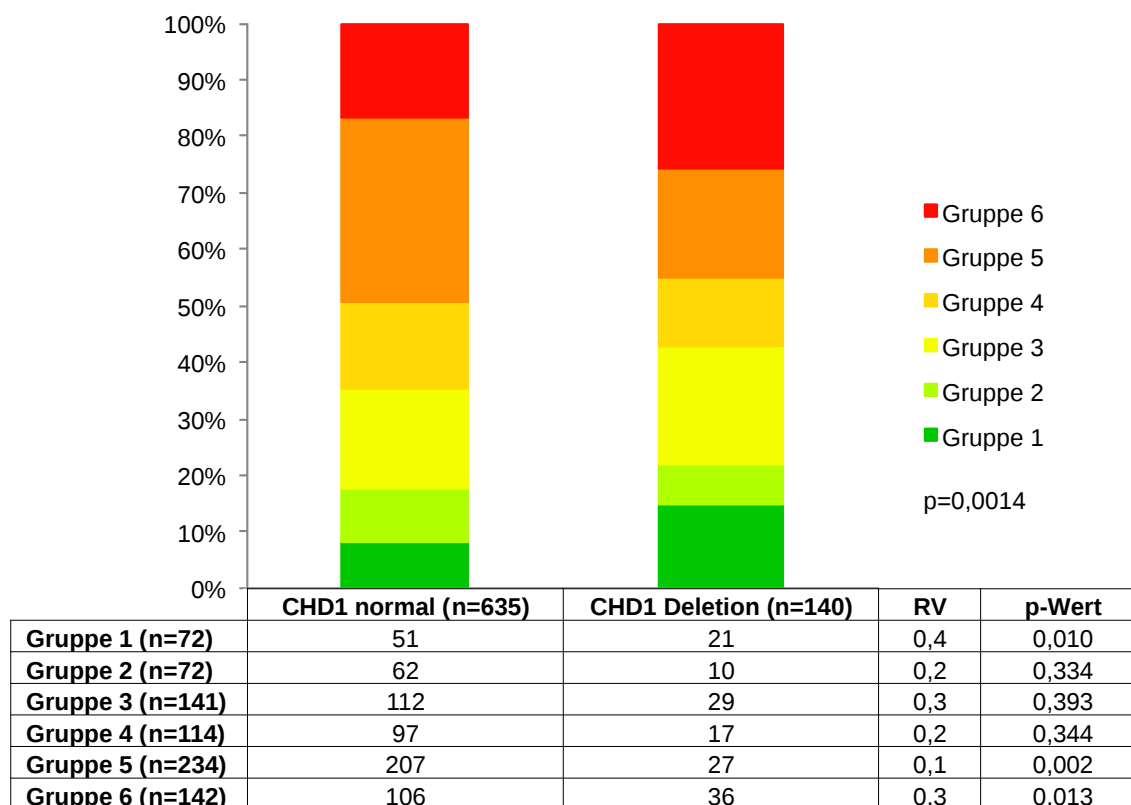
So zeigte sich in den Tumoren mit einem geringen Gleason-Score ebenfalls eine signifikante Assoziation des *CHD1*-Kopiezahlstatus mit der Verteilung der neuen Endpunkte ($p=0,0005$; siehe Abb. 9). In der Gruppe der Tumoren mit einer *CHD1*-Deletion war das Risiko für den Patienten für einen Tumor mit einem ungünstigen Phänotyp und damit einer schlechten Prognose (Gruppe 4-6) um das mindestens 1,5-fache höher als für Patienten deren Tumoren keine *CHD1*-Deletion aufwiesen. Aufgrund der geringen Fallzahl in Gruppe 5 und 6 war dieser Unterschied nur in der Gruppe 4 signifikant ($p<0,001$ für Gruppe 4, $p\leq 0,300$ für Gruppe 5 und 6). Die Wahrscheinlichkeit eines lokal wachsenden Tumors hingegen war bei Karzinomen mit einer *CHD1*-Deletion um das 0,8-fache weniger häufig als bei Tumoren ohne *CHD1*-Deletion ($p=0,001$).

Abb. 9: Korrelation der *CHD1*-Deletion mit den neuen klinisch-biologischen Endpunkten in Tumoren mit einem Gleason-Score $\leq 3+4$. RV: Risikoverhältnis; Gruppe 1: lokal begrenztes Prostatakarzinom (pT2), Gruppe 2: Kapselüberschreitende Prostatakarzinome (pT3a), Gruppe 3: nicht klinisch relevantes Lokalrezidiv, Gruppe 4: reversibles Lokalrezidiv nach Bestrahlung, Gruppe 5: lymphogene Metastasierung zum Zeitpunkt der Ektomie, Gruppe 6: hämatogene Metastasierung.



Die Analyse der Tumoren mit einem hohen Gleason-Score zeigte ebenfalls eine signifikante Assoziation des *CHD1*-Kopiezahlstatus mit der Verteilung der klinisch-biologischen Endpunkte ($p=0,0014$; siehe Abb. 10). Allerdings beruhte dieser Zusammenhang vor allem auf der Verteilung der Endpunktgruppen 1 und 6. Das Risiko einer hämatogen Metastasierung war beim Nachweis einer *CHD1*-Deletion im Tumor um das 1,5-fache höher als bei Tumoren mit einem normalen *CHD1*-Kopiezahlstatus ($p=0,013$). Bemerkenswert ist allerdings, dass in der Gruppe der Tumoren mit einer *CHD1*-Deletion auch die Wahrscheinlichkeit eines auf die Prostata begrenzten Karzinoms um das 1,9-fache höher war als bei Tumoren ohne *CHD1*-Deletion ($p=0,010$).

Abb. 10: Korrelation der *CHD1*-Deletion mit den neuen klinisch-biologischen Endpunkten in Tumoren mit einem Gleason-Score $\geq 4+3$. RV: Risikoverhältnis; Gruppe 1: lokal begrenztes Prostatakarzinom (pT2), Gruppe 2: Kapselüberschreitende Prostatakarzinome (pT3a), Gruppe 3: nicht klinisch relevantes Lokalrezidiv, Gruppe 4: reversibles Lokalrezidiv nach Bestrahlung, Gruppe 5: lymphogene Metastasierung zum Zeitpunkt der Ektomie, Gruppe 6: hämatogene Metastasierung.



4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels FISH die prognostische Relevanz der *CHD1* (5q21)-Deletion beim Prostatakarzinom mit Hilfe von sechs neu definierten klinischen Endpunkten, welche wesentliche biologische Charakteristika des Prostatakarzinoms beinhalten, untersucht.

Zu diesem Zweck wurde der *CHD1*-Deletionsstatus mittels FISH an einem Subset aus mehr als 7.500 Tumoren des Gewebemikroarrays (TMAs) des Instituts für Pathologie bestimmt. Die 5.137 analysierbaren Tumoren wurden dann zur Erhöhung der Fallzahl durch 2.093 Tumoren aus einer vorherigen Studie von Burkhardt *et al.*, die an einem anderen Teil des TMAs durchgeführt wurde [5], auf 7.230 Tumoren für die weiteren Analysen ergänzt. Insgesamt konnte eine *CHD1*-Deletion in 9,7 % aller untersuchten Prostatakarzinome nachgewiesen werden. Der Anteil der heterozygoten *CHD1*-Deletionen war dabei mit 7,3 % dreimal so hoch wie der Anteil an homozygoten *CHD1*-Deletionen mit 2,4 %. Damit stehen die Ergebnisse in Einklang mit der *CHD1*-Deletionsrate von 8,9 % in der Studie von Burkhardt *et al.*, in der 6,7 % der Tumoren eine heterozygote *CHD1*-Deletion und 2,0 % der Tumoren eine homozygote *CHD1*-Deletion aufwiesen [5]. Die in der vorliegende Studie ermittelte *CHD1*-Deletionsrate ist etwas geringer als die *CHD1*-Deletionsrate in vorherigen Studien, die mittels herkömmlicher oder Array-basierter komparativer genomischer Hybridisierung (CGH) eine *CHD1*-Deletion in 12 % bis 26 % der 64 bis 827 untersuchten Tumoren nachweisen konnten [12, 14-18]. Es ist annehmbar, dass die etwas geringere *CHD1*-Deletionsrate in der vorliegenden Studie zum einen auf den stringenten Kriterien zur Definition einer *CHD1*-Deletion beruht und zum anderen durch die Verwendung der FISH als Analyse-methode. Die FISH gilt als Goldstandard zur Analyse von Gen-Kopiezahlveränderungen, da sie im Vergleich zur CGH und aCGH die Bestimmung der Gen-Kopiezahlen direkt am Gewebe ermöglicht. Damit sind Messfehler, die durch Polyploidie oder einem Anteil von normalen Gewebe in der Tumorprobe verursacht werden können, für diese Methode nicht relevant [26]. Die in der Studie verwendeten stringenten Kriterien gaben vor, dass eine *CHD1*-Deletion durch weniger *CHD1*-Signale als Zentromer 10 Signale in ≥ 60 % der analysierbaren Tumorzellkerne definiert ist. Bei Vorliegen einer homozygoten Deletion mussten zusätzlich *CHD1*-Signale in anliegenden normalen Zellkernen sichtbar sein. Der verwendete Grenzwert wurde innerhalb der Arbeitsgruppe in einer vorherigen *PTEN*-Deletionsstudie von Krohn *et al.* definiert, in der 7 Tumoren mit einer heterozygoten oder homozygoten *PTEN*-Deletion mittels SNP- und FISH-Analyse untersucht wurden. Übereinstimmende Ergebnisse von 100 % in den beiden Analysen wurden erzielt, wenn mindestens 60 % der Tumorzellkerne eine *PTEN*-Deletion zeigten [7]. Da die Mehrzahl (88,5 %) der heterozygot *CHD1*-deletierten Tumorzellkerne in der Studie von Burkhardt *et al.* nur eine *CHD1*-

Kopiezahl zeigten [5] und Aneuploidien eher selten beim Prostatakarzinom vorkommen [27, 28], kann außerdem nahezu ausgeschlossen werden, dass die Verwendung der Zentromer 10 Sonde als Referenzsignal zu falsch positiven oder negativen Befunden geführt hat.

Sowohl in der vorliegenden Studie als auch in der Studie von Burkhardt *et al.* [5] war die Rate der heterozygot *CHD1*-deletierten Tumoren mit 7,3 % und 6,7 % deutlich höher als die Rate der homozygot *CHD1*-deletierten Tumoren mit 2,4 % und 2,0 %. Diese Ergebnisse unterscheiden sich von den meisten anderen Studien, in denen in der Regel mittels CGH und aCGH keine homozygoten *CHD1*-Deletionen gefunden wurden [14-16]. In nur einer Studie wurde eine wesentlich höhere Rate an homozygoten *CHD1*-Deletionen von 8,8 % in 244 untersuchten Prostatatumoren angegeben. Allerdings wurden in dieser Studie ausschließlich homozygote Deletionen beim Prostatakarzinom untersucht und daher die Rate an heterozygot *CHD1*-deletierter Tumoren nicht angegeben [18]. Die unterschiedlichen Ergebnisse sind vermutlich zum einen zurückzuführen auf die Verwendung von Analysemethoden bei denen es zu einer fehlenden Detektion von homozygoten Deletionen durch die Verunreinigung der Tumorproben mit normalen Prostatagewebe kommen kann und zum anderen durch die Zusammensetzung des Tumorgewebekollektivs. Mit der vorliegenden Studie vergleichbare Ergebnisse wurden in den Untersuchungen von Taylor *et al.* erzielt. Hier war die *CHD1*-Deletionsrate mit insgesamt 26 % zwar wesentlich höher als in der vorliegenden Arbeit, aber heterozygote *CHD1*-Deletionen wurden mit 19,6 % wie auch in der vorliegenden Studie dreimal häufiger als homozygote *CHD1*-Deletionen mit 6,7 % nachgewiesen [17].

Insgesamt zeigten die *CHD1*-Deletionen eine deutliche Korrelation zu einem hohem Gleason-Score ($p < 0,0001$), einem fortgeschrittenem Tumorstadium ($p = 0,0015$) und der Wahrscheinlichkeit eines PSA-Rezidivs ($p < 0,0001$). Es ist daher annehmbar, dass die Deregulierung von *CHD1* eine wesentliche Rolle während der Tumorprogression spielt. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie stehen in Einklang mit den Resultaten aus der Studie von Burkhardt *et al.* und zwei weiteren früheren Studien anderer Arbeitsgruppen. Taylor *et al.* zeigten eine klare Assoziation der 5q21-Deletion mit einer schlechten Prognose [17] und Sun *et al.* fanden höhere 5q21-Deletionsraten in fortgeschrittenen Tumoren [16]. Keine Assoziation der *CHD1*-Deletion zur Prognose des Patienten fanden jedoch Huang *et al.* [14]. Lapointe *et al.* ordneten die 5q21-Deletion sogar Tumoren mit einer guten Prognose zu [15]. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie werden zusätzlich unterstützt durch erste *in-vitro*- und *in-vivo*-Untersuchungen. In den *in-vitro*-Studien resultierte sowohl die reduzierte [5, 14] als auch die gesteigerte *CHD1*-Expression [5] in verschiedenen benignen und malignen Prostatazelllinien in einer verminderten Wachstumsfähigkeit der Zellen. Dies deutet darauf hin, dass *CHD1* ähnlich wie das bekannte Tumorsuppressorgen *PTEN* zu den essentiellen Tumorsuppressorgenen zählt. Versuche mit *CHD1*-depletierten Xenokraft Modellen

zeigten außerdem, dass es bedingt durch eine reduzierte *CHD1*-Expression nicht zu einer Tumorentstehung kommt, aber dass die reduzierte *CHD1*-Expression das Potential eines invasiven Zellwachstums von Tumorzellen stark erhöht [18]. Die Ergebnisse dieser Studien lassen darauf schließen, dass die Zelle ein bestimmtes *CHD1*-Expressionsniveau benötigt, um ihr Zellüberleben zu sichern. Die Überlebens- und Proliferationsfähigkeit einer Prostatatumorzelle bei vorhandener *CHD1*-Deletion scheint daher abhängig vom aktuellen *CHD1*-Expressionsniveau zu sein. Es ist aber auch denkbar, dass bisher unbekannte Mechanismen existieren, die das Überleben der Tumorzellen mit einer *CHD1*-Deletion sichern. Insbesondere das Vorhandensein von homozygoten *CHD1*-Deletionen deutet auf einen Mechanismus hin der ähnlich wie bei einer homozygoten *PTEN*-Deletion in Kombination mit einem *TP53*-Defekt das Sterben der Tumorzellen verhindert [29].

Zusätzlich zur Assoziation der *CHD1*-Deletion mit dem Phänotyp des Prostatakarzinoms wurde in der vorliegenden Arbeit die Korrelation der *CHD1*-Deletion mit dem *TMPRSS2:ERG*-Status untersucht. Die durch eine Deletion auf Chromosom 21 hervorgerufene Fusion zwischen dem androgen-regulierten Gen *TMPRSS2* und dem onkogenen Transkriptionsfaktor *ERG* kommt in circa 50 % aller Prostatatumoren vor und ist damit die bisher häufigste genomische Veränderung des Prostatakarzinoms. Bedingt durch die Fusion gelangt *ERG* unter die Kontrolle des *TMPRSS2*-Promotors und wird dadurch in den betroffenen Tumorzellen exprimiert [30, 31]. Der immunhistochemische Nachweis der *ERG*-Expression ermöglicht die Einteilung der Prostatakarzinome in die zwei Untergruppen *ERG*-positive (mit Fusion) und *ERG*-negative (ohne Fusion) Tumoren. Vorherige Studien am Institut für Pathologie konnten bereits einige der häufigsten Deletionen des Prostatakarzinoms der Untergruppe der *ERG*-positiven Tumoren (*PTEN*, *TP53* und 3p13) und der Untergruppe der *ERG*-negativen Tumoren (6q15) zuordnen [6-8, 12, 15, 17]. In der vorliegenden Arbeit konnte die *CHD1*-Deletion fünfmal häufiger in *ERG*-negativen als in *ERG*-positiven Tumoren nachgewiesen werden. Insbesondere die homozygoten *CHD1*-Deletionen traten nahezu exklusiv in den *ERG*-negativen Tumoren auf. Diese Ergebnisse stimmen überein mit der Studie von Burkhardt *et al.* in der ebenfalls eine starke Assoziation der *CHD1*-Deletion zu *ERG*-negativen Tumoren gefunden wurde [5]. Darüber hinaus werden die Ergebnisse der Studie durch vorherige Studien bestätigt, die ebenfalls eine Korrelation der *CHD1*-Deletion mit einem negativen *ERG*-Status feststellten [17, 18, 32, 33]. Es ist vorstellbar, dass die *CHD1*-Deletion zu einem Selektionsvorteil in *ERG*-negativen Tumorzellen im Vergleich zu *ERG*-positiven Tumorzellen führt. Es ist aber auch denkbar, dass die *CHD1*-Deletion die Entstehung der *TMPRSS2:ERG*-Fusion und damit eventuell auch anderer genomischer Veränderungen verhindert. In der Studie von Burkhardt *et al.* wurden mittels Doxorubicin und Dihydrotestosteron Strangbrüche in der Prostatakarzinomzelllinie LNCaP induziert. Eine reduzierte *CHD1*-Expression führte in diesem *in-vitro*-Versuch zu einer signifikanten Reduktion der DNA-Brüche im *ERG*-Gen, die in der Regel zu einer Fusion mit dem Gen *TMPRSS2* führen. Damit konnte gezeigt werden,

dass *CHD1* eine zentrale Rolle bei der Entstehung der *TMPRSS2:ERG*-Fusion spielt. Allerdings wurde in dieser Studie ebenfalls gezeigt, dass die *CHD1*-Deletion unabhängig vom *ERG*-Fusionsstatus in den ERG negativen und ERG positiven Tumoren die Wahrscheinlichkeit eines frühen PSA-Rezidivs stark erhöht [5]. Diese Ergebnisse verdeutlichen die prognostische Relevanz der *CHD1*-Deletion zusätzlich.

Die starke Assoziation der *CHD1*-Deletion mit der Wahrscheinlichkeit eines PSA-Rezidivs in der vorliegenden Arbeit verdeutlicht das hohe Potential des *CHD1*-Kopiezahlstatus als potentiellen prognostischen Marker zur Identifizierung von Patienten mit aggressiven Karzinomen. Allerdings müssen bei der Beurteilung dieser Ergebnisse einige Einschränkungen bezüglich der Verwendung des PSA-Rezidivs als Studienendpunkt berücksichtigt werden. Der Anstieg des PSA-Wertes im Serum kann zum einen auf nicht entfernte Tumorzellen am Nervenstrang oder lymphogene bzw. hämatogene Metastasen zurückgeführt werden, zum anderen wird PSA aber auch von benignen Prostatazellen produziert, die eventuell noch am Nervenstrang lokalisiert sind [2]. Dies bedeutet, dass ein PSA-Rezidiv zwar auf eine schlechte Prognose für den Patienten hindeutet, aber eine eindeutige individuelle prognostische Aussage anhand eines Rezidivs nicht abgeleitet werden kann. Dazu kommt, dass circa 30 % aller Patienten innerhalb der ersten 8 bis 10 Jahre nach der Prostatektomie ein biochemisches Rezidiv erleiden. Einen lebensbedrohlichen Krankheitsverlauf entwickeln aber nur circa 10 % der Patienten nach dem Auftreten des PSA-Rezidivs [10, 34]. Des Weiteren weisen Patienten mit PSA-Rezidiv eine ähnliche Überlebensrate von 88 % im Vergleich zu Patienten ohne PSA-Rezidiv (93 %) auf [35]. Basierend darauf ist es empfehlenswert die prognostische Aussagekraft eines potentiellen molekularen Markers anhand weiterer Studienendpunkte über das PSA-Rezidiv hinaus zu validieren. Zu den häufig verwendeten Studienendpunkten in Karzinomstudien zählen neben einem möglichen biochemischen Rezidiv das allgemeine Überleben der Patienten nach der Therapie und der Tumor-spezifische Tod der Patienten nach erfolgter Behandlung [36]. Die Verwendung dieser Endpunkte in Studien zum Prostatakarzinom ist jedoch als schwierig zu bewerten. Das mittlere Erkrankungsalter der Patienten liegt beim Prostatakarzinom bei 70 Jahren. Dies bedeutet, dass die Wahrscheinlichkeit von Begleiterkrankungen, die nicht auf das Karzinom zurückzuführen sind, wie zum Beispiel Herz-Kreislauf-Erkrankungen, im Verlauf der Tumorerkrankung mit dem Alter des Patienten ansteigt. Daher ist es häufig schwierig zu beurteilen, ob Patienten an den Folgen der Karzinom-erkrankung oder an den Folgen einer anderen Erkrankung verstorben sind. Zudem haben Studien gezeigt, dass Patienten mit einem PSA-Rezidiv erst mehrere Jahre nach der Ektomie und dem Auftreten des Rezidivs einen lebensbedrohlichen Krankheitsverlauf entwickeln. Basierend darauf ist anzunehmen, dass Patienten bereits an den Folgen einer Begleiterkrankung versterben bevor eine mögliche Metastasierung zum Tod der Patienten führt. Aus diesem Grund ist die Anzahl der Patienten, die aufgrund der Prostatakarzinom-Erkrankung versterben, sehr gering. Dies macht deutlich, dass weitere Studienendpunkte notwendig sind, die den Krankheitsverlauf bei Vorlie-

gen eines Prostatakarzinoms besser widerspiegeln und damit die Aussagekraft des PSA-Rezidivs zur Identifizierung von prognostischen Markern unterstützen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher die prognostische Aussagekraft der *CHD1*-Deletion anhand sechs neuer klinisch-biologischer Endpunktgruppen zu prüfen. Diese neuen Endpunktgruppen wurden von der Martini-Klinik und dem Institut für Pathologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf entwickelt und umfassen die wesentlichen biologischen Charakteristika der Prostatakarzinome. Die neuen klinisch-biologischen Endpunktgruppen sind zusammengesetzt aus: Gruppe 1: lokal begrenztes Prostatakarzinom (pT2), Gruppe 2: über die Prostata hinausgehende Karzinome (pT3a), Gruppe 3: nicht klinisch relevantes Lokalrezidiv, Gruppe 4: reversibles Lokalrezidiv nach Bestrahlung, Gruppe 5: lymphogene Metastasierung zum Zeitpunkt der Ekтомie und Gruppe 6: hämatogene Metastasierung zum Diagnosezeitpunkt. Die Analyse dieser Endpunkte zeigte eine deutliche Assoziation der *CHD1*-Deletion mit den phänotypisch ungünstigen Karzinomen, welche eine schlechte Prognose für den Patienten bedingen. Bei einer nachgewiesenen *CHD1*-Deletion in den Karzinomzellen war das Risiko eines Lokalrezidivs und einer hämatogenen Metastasierung um mindestens 1,7-fach höher als bei Tumoren mit einem normalen *CHD1*-Status. Die Wahrscheinlichkeit eines auf die Prostata begrenzten Tumors hingegen war beim Nachweis einer *CHD1*-Deletion im Tumor etwas geringer als bei Tumoren ohne *CHD1*-Deletion. Die Analyse in den Untergruppen der Tumoren mit einem geringem Gleason-Score ($\leq 3+4$) und einem hohem Gleason-Score ($\geq 4+3$) zeigte jedoch, dass diese Assoziation im Wesentlichen durch die Gruppe der Tumoren mit einem geringen Gleason-Score bedingt war, da hier eine vergleichbare Verteilung der klinisch-biologischen Endpunktgruppen gemessen wurde. Tumore mit einem hohen Gleason-Score und einer nachgewiesenen *CHD1*-Deletion konnten allerdings sowohl eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für eine hämatogene Metastasierung als auch für ein lokal begrenztes Karzinomwachstum und damit einen eher günstigen Phänotyp aufwiesen. Aus diesem Grund müsste eine Verwendung der *CHD1*-Deletion als molekularer Marker in der Untergruppe der Tumoren mit einem hohen Gleason-Score ausgeschlossen werden.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass die *CHD1*-Deletion als eine der häufigsten Deletionen klar mit einem schlechten Phänotyp des Prostatakarzinoms assoziiert ist. Darüber hinaus besitzt die *CHD1*-Deletion eine deutliche prognostische Relevanz beim Prostatakarzinom gemessen am PSA-Rezidiv. Durch die Analyse der neuen klinisch-biologischen Endpunkte konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass der Nachweis einer *CHD1*-Deletion insbesondere in der Gruppe der Karzinome mit einer eher günstigen Prognose (Gleason Score $\leq 3+4$) dazu beiträgt, Patienten zu identifizieren, die aufgrund der Aggressivität der Prostatakarzinome eine eindeutig schlechte Prognose aufweisen. Es besteht somit die begründete Hoffnung, dass der Nachweis des *CHD1*-Kopiezahlstatus alleine oder in Kombination mit anderen genomischen Veränderungen zu einer Verbesserung der Diagnostik und damit der individuellen Therapieentscheidung beitragen kann.

5 Zusammenfassung

Das Prostatakarzinom ist die häufigste Krebserkrankung und zudem einer der häufigsten Tumor-assoziierten Todesursachen des Mannes in den Industrieländern. Die Mehrzahl der Karzinome ist allerdings eher indolent und wächst nur sehr langsam. Basierend darauf sind die meisten Prostatakarzinomerkrankungen zeitlebens symptomlos und die Patienten versterben aufgrund einer anderen altersbedingten Erkrankung. Problematisch ist daher eher eine kleine Gruppe von hoch aggressiven Karzinomen, die zu einem lebensbedrohlichen Verlauf der Erkrankung führen und zwingend einer Therapie bedürfen. Die heute etablierten Prognoseparameter, wie zum Beispiel der Gleason-Score oder das Tumorstadium reichen jedoch nicht aus, um diese hoch aggressiven Karzinome sicher zu identifizieren. Daher werden heute häufig Patienten einer aggressiven kurativen Therapie zugeführt, die eigentlich nicht notwendig wäre. Es besteht jedoch die Hoffnung, dass die Identifizierung von prognostisch-relevanten molekularen Markern dazu führt, die heute etablierten Parameter bei der initialen Diagnose des Prostatakarzinoms zu unterstützen und somit eine individuelle Diagnose und Therapie für den Patienten zu ermöglichen. Ein vielversprechender Marker ist hier die *CHD1*-Deletion die in circa 10 % aller Prostatakarzinome vorkommt und bereits mit der erhöhten Wahrscheinlichkeit eines PSA-Rezidivs assoziiert werden konnte.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die prognostische Relevanz der *CHD1*-Deletion über das Auftreten eines PSA-Rezidivs hinaus anhand des klinisch-biologischen Verhaltens der Karzinome zu charakterisieren. Dazu wurde ein im TMA-Format vorliegendes Prostatakarzinomkollektiv von über 11.000 Fällen in sechs neue klinisch-biologische Endpunktgruppen eingeteilt, welche die wesentlichen biologischen Charakteristika der Karzinome wie das lokal begrenzte Wachstum, das über die Prostata hinausgehenden Wachstum, die Entwicklung eines Lokalrezidivs und die lymphogene bzw. hämatogene Metastasierung beinhalten. Der mittels Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung ermittelte *CHD1*-Kopiezahlstatus zeigte in 701 (9,7 %) der 7.230 auswertbaren Prostatakarzinome eine *CHD1*-Deletion. In 7,3 % zeigte sich dabei eine heterozygote und in 2,4 % eine homozygote *CHD1*-Deletion. Die *CHD1*-Deletion war signifikant assoziiert mit einem erhöhten Gleason Score ($p < 0,0001$) und einem fortgeschrittenem Tumorstadium ($p = 0,0034$), sowie einem *ERG*-negativen Status der Prostatakarzinome ($p < 0,0001$). In der Analyse aller Karzinome zeigte die *CHD1*-Deletion eine deutlich signifikante Assoziation zu der Verteilung der neuen klinisch-biologischen Endpunkte. Karzinome mit einer *CHD1*-Deletion zeigten dabei ein erhöhtes Risiko für Karzinome mit einem ungünstigen Phänotyp, wie einem klinisch relevanten Lokalrezidiv und einer hämatogenen Metastasierung ($p \leq 0,001$). Dieser Zusammenhang basierte jedoch vor allem auf den Karzinomen mit einem niedrigen Gleason Grad ($\leq 3+4$; $p = 0,0005$). In den Tumoren mit einem hohen Gleason Grad ($\geq 4+3$) konnte durch den

Nachweis einer *CHD1*-Deletion keine Unterscheidung in Karzinome mit einem günstigen und einem schlechtem Tumorphänotyp mehr erfolgen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen damit, dass der Nachweis einer *CHD1*-Deletion insbesondere in den Karzinomen mit einer eigentlich histopathologisch guten Prognose (Gleason Grad $\leq 3+4$) geeignet ist, um die Identifizierung von Tumoren mit einem aggressiven Phänotyp zu unterstützen.

Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

- Tabelle 1: Einteilung der Prostatakarzinom-Patienten nach alternativen klinisch-biologischen Endpunkten
- Tabelle 2: Zusammensetzung des Prostata-Prognose-Array
- Tabelle 3: Reagenzien und Kits
- Tabelle 4: Geräte
- Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien
- Tabelle 6.1: Korrelation der *CHD1*-Deletion (unterteilt in normalen, heterozygot und homozygot deletierten Genstatus) mit klinisch-pathologischen Daten
- Tabelle 6.2: Korrelation der *CHD1*-Deletion (unterteilt in normalen und deletierten Genstatus) mit klinisch-pathologischen Daten
-
- Abb. 1: Normale *CHD1*-Kopiezahl mit zwei orangen *CHD1*-Signalen und zwei grünen Zentromer 10-Signalen
- Abb. 2: Heterozygote *CHD1*-Deletion mit keinem oder einem orangen *CHD1*-Signal und ein bis zwei grünen Zentromer 10-Signalen
- Abb. 3: Homozygote *CHD1*-Deletion mit fehlenden orangen *CHD1*-Signalen in den Tumorzellkernen bei vorhandenem *CHD1*-Signal in den Stromazellkernen und grünen Zentromer 10-Signalen in den Stroma- und Tumorzellkernen
- Abb. 4: Prognostische Relevanz der *CHD1*-Deletion
- Abb. 5: Prognostische Relevanz der homozygoten und heterozygoten *CHD1*-Deletion
- Abb. 6: Korrelation der *CHD1*-Deletion mit dem *ERG*-Fusionsstatus
- Abb. 7: Korrelation heterozygoter und homozygoter *CHD1*-Deletionen mit dem *ERG*-Fusionsstatus
- Abb. 8: Korrelation der *CHD1*-Deletion mit den neuen klinisch-biologischen Endpunkten in allen Tumoren
- Abb. 9: Korrelation der *CHD1*-Deletion mit den neuen klinisch-biologischen Endpunkten in Tumoren mit einem Gleason-Score $\leq 3+4$
- Abb. 10: Korrelation der *CHD1*-Deletion mit den neuen klinisch-biologischen Endpunkten in Tumoren mit einem Gleason-Score $\geq 4+3$

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ad	auffüllen auf
BAC	bacterial artificial chromosome/ künstliches Bakterienchromosom
CHD1	chromodomain helicase DNA binding protein 1
c	Centi
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dH ₂ O	destilliertes Wasser
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DNA	deoxyribonucleic acid / Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
DRU	digitale rektale Untersuchung
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ERG	ETS-related gene
FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
FISH-Sonden	Fluoreszenz-markierte DNA-Stränge
g	Erdbeschleunigungskonstante $\approx 9,81$ m/s
het del	heterozygote Deletion
homo del	homozygote Deletion
LB	Lysogeny Broth
l	Liter
M	Mol
MAP3K7	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7
m	Meter
m	Milli
n	Anzahl der untersuchten/ analysierbaren Fälle/ Patienten
n	nano

NP40	Nonylphenoethoxylat 40
p	pathologisch
pH	pondus Hydrogenii
PBS	phosphate buffered saline / phosphatgepufferte Salzlösung
PSA	prostataspezifisches Antigen
PTEN	phosphatase and tensin homolog
RNase	Ribonuklease
rpm	revolutions per minute / Umdrehungen pro Minute
R-Status	Status des Resektionsrandes
SSC	Sodium/ Sodiumcitrat
TMA	Tissue-Microarray / Gewebemikroarray
TMPRSS2	transmembrane protease, serine 2
TNM	Tumor-, Nodus- und Metastasen-Stadium
TP53	tumor protein 53
UKE	Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf
°C	Grad Celsius
μ	mikro

Literaturverzeichnis

1. Rohde V, Katalinic A, Wasem J, Aidelburger P: **Gesundheitsberichterstattung des Bundes; Heft 36: Prostataerkrankungen**; 2007.
2. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft DK, AWMF): **Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms**. In., vol. Kurzversion 3.0, 2014 AWMF. <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Leitlinien.7.0.html>; Registernummer: 043/022OL.
3. Gleason DF: **Histologic grading of prostate cancer: a perspective**. *Hum Pathol* 1992, **23**(3):273-279.
4. Sobin L. GM, Wittekind C.: **TNM classification of malignant tumours** vol. 7: International Union Against Cancer (UICC); 2009.
5. Burkhardt L, Fuchs S, Krohn A, Masser S, Mader M, Kluth M, Bachmann F, Huland H, Steuber T, Graefen M *et al*: **CHD1 is a 5q21 tumor suppressor required for ERG rearrangement in prostate cancer**. *Cancer research* 2013, **73**(9):2795-2805.
6. Kluth M, Hesse J, Heini A, Krohn A, Steurer S, Sirma H, Simon R, Mayer PS, Schumacher U, Grupp K *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**(7):975-983.
7. Krohn A, Diedler T, Burkhardt L, Mayer PS, De Silva C, Meyer-Kornblum M, Kotschau D, Tennstedt P, Huang J, Gerhauser C *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**(2):401-412.
8. Kluth M, Harasimowicz S, Burkhardt L, Grupp K, Krohn A, Prien K, Gjoni J, Hass T, Galal R, Graefen M *et al*: **Clinical significance of different types of p53 gene alteration in surgically treated prostate cancer**. *International journal of cancer Journal international du cancer* 2014, **135**(6):1369-1380.
9. Simmons MN, Stephenson AJ, Klein EA: **Natural history of biochemical recurrence after radical prostatectomy: risk assessment for secondary therapy**. *European urology* 2007, **51**(5):1175-1184.
10. Punnen S, Cooperberg MR, D'Amico AV, Karakiewicz PI, Moul JW, Scher HI, Schlomm T, Freedland SJ: **Management of biochemical recurrence after primary treatment of prostate cancer: a systematic review of the literature**. *European urology* 2013, **64**(6):905-915.
11. Rosenbaum E, Partin A, Eisenberger MA: **Biochemical relapse after primary treatment for prostate cancer: studies on natural history and therapeutic considerations**. *J Natl Compr Canc Netw* 2004, **2**(3):249-256.
12. Krohn A, Seidel A, Burkhardt L, Bachmann F, Mader M, Grupp K, Eichenauer T, Becker A, Adam M, Graefen M *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**(1):130-141.

13. El Gammal AT, Bruchmann M, Zustin J, Isbarn H, Hellwinkel OJ, Kollermann J, Sauter G, Simon R, Wilczak W, Schwarz J *et al*: **Chromosome 8p deletions and 8q gains are associated with tumor progression and poor prognosis in prostate cancer**. *Clin Cancer Res* 2010, **16**(1):56-64.
14. 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**(37):4164-4170.
15. Lapointe J, Li C, Giacomini CP, Salari K, Huang S, Wang P, Ferrari M, Hernandez-Boussard T, Brooks JD, Pollack JR: **Genomic profiling reveals alternative genetic pathways of prostate tumorigenesis**. *Cancer research* 2007, **67**(18):8504-8510.
16. Sun J, Liu W, Adams TS, Sun J, Li X, Turner AR, Chang B, Kim JW, Zheng SL, Isaacs WB *et al*: **DNA copy number alterations in prostate cancers: a combined analysis of published CGH studies**. *Prostate* 2007, **67**(7):692-700.
17. Taylor BS, Schultz N, Hieronymus H, Gopalan A, Xiao Y, Carver BS, Arora VK, Kaushik P, Cerami E, Reva B *et al*: **Integrative genomic profiling of human prostate cancer**. *Cancer Cell* 2010, **18**(1):11-22.
18. Liu W, Lindberg J, Sui G, Luo J, Egevad L, Li T, Xie C, Wan M, Kim ST, Wang Z *et al*: **Identification of novel CHD1-associated collaborative alterations of genomic structure and functional assessment of CHD1 in prostate cancer**. *Oncogene* 2012, **31**(35):3939-3948.
19. Gaspar-Maia A, Alajem A, Polesso F, Sridharan R, Mason MJ, Heidersbach A, Ramalho-Santos J, McManus MT, Plath K, Meshorer E *et al*: **Chd1 regulates open chromatin and pluripotency of embryonic stem cells**. *Nature* 2009, **460**(7257):863-868.
20. 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**(8):1053-1062.
21. Bagchi A, Papazoglu C, Wu Y, Capurso D, Brodt M, Francis D, Bredel M, Vogel H, Mills AA: **CHD5 is a tumor suppressor at human 1p36**. *Cell* 2007, **128**(3):459-475.
22. Bagchi A, Mills AA: **The quest for the 1p36 tumor suppressor**. *Cancer research* 2008, **68**(8):2551-2556.
23. 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**(5):660-668.
24. Menon T, Yates JA, Bochar DA: **Regulation of androgen-responsive transcription by the chromatin remodeling factor CHD8**. *Molecular endocrinology* 2010, **24**(6):1165-1174.
25. Weischenfeldt J, Simon R, Feuerbach L, Schlangen K, Weichenhan D, Minner S, Wuttig D, Warnatz HJ, Stehr H, Rausch T *et al*: **Integrative genomic analyses reveal an androgen-driven somatic alteration landscape in early-onset prostate cancer**. *Cancer Cell* 2013, **23**(2):159-170.
26. Kallioniemi A, Visakorpi T, Karhu R, Pinkel D, Kallioniemi OP: **Gene Copy Number Analysis by Fluorescence in Situ Hybridization and Comparative Genomic Hybridization**. *Methods* 1996, **9**(1):113-121.
27. Badalament RA, O'Toole RV, Young DC, Drago JR: **DNA ploidy and prostate-specific antigen as prognostic factors in clinically resectable prostate cancer**. *Cancer* 1991, **67**(12):3014-3023.

28. Haugen OA, Mjølnerød O: **DNA-ploidy as prognostic factor in prostatic carcinoma.** *International journal of cancer Journal international du cancer* 1990, **45**(2):224-228.
29. Chen Z, Trotman LC, Shaffer D, Lin HK, Dotan ZA, Niki M, Koutcher JA, Scher HI, Ludwig T, Gerald W *et al*: **Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis.** *Nature* 2005, **436**(7051):725-730.
30. Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, Dhanasekaran SM, Mehra R, Sun XW, Varambally S, Cao X, Tchinda J, Kuefer R *et al*: **Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer.** *Science* 2005, **310**(5748):644-648.
31. Minner S, Enodien M, Sirma H, Luebke AM, Krohn A, Mayer PS, Simon R, Tennstedt P, Müller J, Scholz L *et al*: **ERG status is unrelated to PSA recurrence in radically operated prostate cancer in the absence of antihormonal therapy.** *Clin Cancer Res* 2011, **17**(18):5878-5888.
32. Barbieri CE, Baca SC, Lawrence MS, Demichelis F, Blattner M, Theurillat JP, White TA, Stojanov P, Van Allen E, Stransky N *et al*: **Exome sequencing identifies recurrent SPOP, FOXA1 and MED12 mutations in prostate cancer.** *Nature genetics* 2012, **44**(6):685-689.
33. Grasso CS, Wu YM, Robinson DR, Cao X, Dhanasekaran SM, Khan AP, Quist MJ, Jing X, Lonigro RJ, Brenner JC *et al*: **The mutational landscape of lethal castration-resistant prostate cancer.** *Nature* 2012, **487**(7406):239-243.
34. Bruce JY, Lang JM, McNeel DG, Liu G: **Current controversies in the management of biochemical failure in prostate cancer.** *Clinical advances in hematology & oncology : H&O* 2012, **10**(11):716-722.
35. Jhaveri FM, Zippe CD, Klein EA, Kupelian PA: **Biochemical failure does not predict overall survival after radical prostatectomy for localized prostate cancer: 10-year results.** *Urology* 1999, **54**(5):884-890.
36. Biooncology: **Clinical Endpoints: Advantages and Limitations.** In. <http://www.biooncology.com/clinical-trials/clinical-endpoints/advantages-limitations>; Genentech by Roche; 2015.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Professor Sauter für die Möglichkeit am Institut für Pathologie zu promovieren bedanken. Seinem enormen Fachwissen und seinem immerwährenden Forschungsgeist ist es zu verdanken, dass diese Arbeit verwirklicht werden konnte.

Ganz herzlich danke ich auch allen Personen im Institut für Pathologie, die hier keine namentliche Erwähnung finden, aber an der Verwirklichung dieses Projektes Anteil hatten und mit denen ich während meiner Zeit im Institut so gut zusammenarbeiten durfte.

Ich danke Lia Burkhardt für die Anleitung meiner Dissertation und ihre gute Betreuung. Mein besonderer Dank gilt Martina Kluth für ihre schier grenzenlose Unterstützung, sowohl fachlich als auch privat, Bianca Kelp, dass sie mit mir ihr Büro, das Labor und so viel mehr geteilt hat, Ronald Simon für seine fachliche Kompetenz, seine Erklärungen und die Möglichkeit zur Diskussion sowie Sawinee Masser für ihre Fürsorge und Aufmunterung jeder Art.

Im Besonderen danke ich meinen Eltern und meiner Familie für ihren immerwährenden Rückhalt und dafür, dass sie mir mein Studium ermöglicht und mich während dieser Zeit und der Promotion immer unterstützt haben.

Diese Arbeit möchte ich meinem Vater widmen. Danke, dass Du immer an mich geglaubt hast.

Lebenslauf

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

Eidesstattliche Erklärung

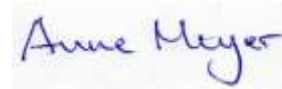
Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Hamburg, 24.09.2015

Ort, Datum



Unterschrift