

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Pathologie

Arbeit unter der Anleitung von Prof. Dr. med. G. SAUTER

βIII-Tubulin Überexpression ist ein unabhängiger Prediktor für die Progression des Prostatakarzinoms und eng verbunden mit ERG-Fusion und PTEN-Deletion

Dissertation

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

vorgelegt von:

Philipp Weigand
aus Aschaffenburg

Hamburg 2015

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 08.11.2016**

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

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

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Hans-Jürgen Kreienkamp

~~Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in:~~

Inhaltsverzeichnis

1	Publikation Originalarbeit	4
2	Darstellung der Publikation.....	13
2.1	Einleitung.....	13
2.2	Material und Methoden.....	15
2.2.1	Patientenkollektiv.....	15
2.2.2	Immunhistochemie	15
2.2.3	Statistik.....	16
2.3	Ergebnisse	16
2.3.1	Expression von β III-Tubulin im Prostatakarzinom.....	16
2.3.2	Assoziation mit TMPRSS2:ERG Fusionsstatus und ERG Proteinexpression.....	16
2.3.3	Assoziationen zum Tumorphänotyp	17
2.3.4	Assoziationen zu anderen wichtigen Deletionen.....	17
2.3.5	Assoziationen zu PSA-Rezidiv	17
2.3.6	Multivariate Analyse	17
2.4	Diskussion.....	18
2.5	Zusammenfassung.....	22
2.6	Literaturverzeichnis.....	23
3	Erklärung des Eigenanteils	28
4	Danksagung.....	30
5	Lebenslauf.....	31
6	Eidesstattliche Erklärung.....	32



BIOMARKERS, GENOMICS, PROTEOMICS, AND GENE REGULATION

β III-Tubulin Overexpression Is an Independent Predictor of Prostate Cancer Progression Tightly Linked to *ERG* Fusion Status and *PTEN* Deletion

Maria C. Tsourlakis,* Philipp Weigand,* Katharina Grupp,*[†] Martina Kluth,* Stefan Steurer,* Thorsten Schlomm,*[§] Markus Graefen,[‡] Hartwig Huland,[‡] Georg Salomon,[‡] Thomas Steuber,[‡] Waldemar Wilczak,* Hüseyin Sirma,* Ronald Simon,* Guido Sauter,* Sarah Minner,* and Alexander Quaas*

From the Institute of Pathology,* the General, Visceral and Thoracic Surgery Department and Clinic,[†] the Martini-Clinic,[‡] and the Prostate Cancer Center, Section for Translational Prostate Cancer Research, the Department of Urology,[§] University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

Accepted for publication
November 6, 2013.

Address correspondence to
Maria C. Tsourlakis, M.D.,
Institute of Pathology, University
Medical Center Hamburg-
Eppendorf, Martinistrasse 52,
20246 Hamburg, Germany.
E-mail: m.tsourlakis@ukc.de.

Evidence suggests that class III β -tubulin (β III-tubulin) may represent a prognostic and predictive molecular marker in prostate cancer. β III-Tubulin expression was determined by IHC in 8179 prostate cancer specimens in a TMA format. Results were compared with tumor phenotype, biochemical recurrence, v-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog (*ERG*) status, and deletions on *PTEN*, 3p13, 5q21, and 6q15. β III-Tubulin expression was detectable in 25.6% of 8179 interpretable cancers. High β III-tubulin expression was strongly associated with both *TMPRSS2:ERG* rearrangement and *ERG* expression ($P < 0.0001$ each). High β III-tubulin expression was tightly linked to high Gleason grade, advanced pT stage, and early prostate-specific antigen (PSA) recurrence in all cancers ($P < 0.0001$ each), but also in the subgroups of *ERG*-negative and *ERG*-positive cancers. When all tumors were analyzed, the prognostic role of β III-tubulin expression was independent of Gleason grade, pT stage, pN stage, surgical margin status, and preoperative PSA. Independent prognostic value became even more evident if the analysis was limited to preoperatively available features, such as biopsy specimen Gleason grade, preoperative PSA, cT stage, and β III-tubulin expression ($P < 0.0001$ each). β III-Tubulin expression was associated with *PTEN* ($P < 0.0001$) when all tumors were analyzed, but also in the subgroups of *ERG*-negative and *ERG*-positive cancers. β III-Tubulin expression is an independent prognostic parameter. The significant associations with key genomic alterations of prostate cancer, such as *TMPRSS2:ERG* fusions and *PTEN* deletions, suggest interactions with several pivotal pathways involved in prostate cancer. (*Am J Pathol* 2014, 184: 609–617; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.11.007>)

Prostate cancer is the most common malignancy in men in Western societies.¹ Most prostate cancers behave in an indolent manner, but a subset is highly aggressive.² Despite recent advances in research, the only established pretreatment prognostic parameters include Gleason grade and tumor extent on biopsy specimens, preoperative prostate-specific antigen (PSA), and clinical stage. Because these data are statistically powerful but not sufficient for optimal individual treatment decisions, a better understanding of the biological features of the disease may eventually lead to better prognostic biomarkers.

Microtubules are multifunctional cytoskeletal proteins involved in crucial cellular roles, including maintenance of cell shape, intracellular transport, meiosis, and mitosis.

Microtubules are composed of polymers of α - and β -tubulin heterodimers. Both α - and β -tubulins exist as multiple isoforms with a complex pattern of distribution among different tissues, as previously reviewed.³ Class III β -tubulin (β III-tubulin; alias TUBB3) is a microtubule protein, normally expressed in cells of neuronal origin.⁴ Expression of β III-tubulin has also been described in several extraneuronal cells, such as melanocytes, spermatozoa, follicular lymphoid cells, and neuroendocrine cells of the fetal respiratory tract

This study was supported by German Cancer Aid grant 109505. M.C.T. and P.W. contributed equally to this work. Disclosures: None declared.

Table 1 Clinicopathological Features of 11,152 Arrayed Prostate Cancers

Features	No. of patients	
	Study cohort on TMA (<i>n</i> = 11,152)	Biochemical relapse among categories (<i>n</i> = 1824)
Follow-up (months)		
Mean	53.4	
Median	36.8	
Age (years)		
<50	318	49
50–60	2768	460
60–70	6548	1081
>70	1439	232
Pretreatment PSA (ng/mL)		
<4	1407	142
4–10	6735	827
10–20	2159	521
>20	720	309
Tumor stage		
pT2	7370	570
pT3a	2409	587
pT3b	1262	618
pT4	63	49
Gleason grade		
≤3 + 3	2859	193
3 + 4	6183	849
4 + 3	1565	573
≥4 + 4	482	208
Lymph node metastasis		
pN0	6117	1126
pN+	561	291
Surgical margin		
Negative	8984	1146
Positive	1970	642

Data are given as number of patients unless otherwise indicated. Numbers do not always add up to 11,152 in the different categories because of cases with missing data.

epithelium.⁵ It was found overexpressed in several solid tumors, including non–small cell lung cancer,⁶ ovarian cancer,^{7,8} urothelial carcinoma of the bladder,⁹ and head and neck squamous cell carcinoma.¹⁰ High levels of β III-tubulin expression were also described to be associated with poor clinical outcome in various cancers, including non–small cell lung cancer, ovarian cancer, and urothelial carcinoma of the bladder.^{6,7,9} Other studies described a link between β III-tubulin overexpression and reduced response to taxane-based microtubule-targeting anticancer drugs.^{8,11–13}

There are several lines of evidence suggesting that β III-tubulin may represent a suitable prognostic and, perhaps, predictive molecular marker in prostate cancer. Studies analyzing 258¹⁴ and 284¹⁵ prostate cancers treated by radical prostatectomy suggested associations with unfavorable tumor phenotype and biochemical relapse.^{14,15} In prostate cancer cell lines, functional overexpression or knockdown of β III-tubulin modulated sensitivity to taxane medication.¹⁴

In the present study, we used our pre-existing prostate cancer TMA¹⁶ containing 11,152 prostate cancer specimens,

including various molecularly defined subgroups, to investigate the clinical relevance of β III-tubulin and to compare β III-tubulin with other molecular and prognostic features. The results of this study show that high β III-tubulin expression linked to *PTEN* loss and v-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog (ERG) activation is a strong and independent predictor of early PSA recurrence in prostate cancers.

Materials and Methods

Patients

Radical prostatectomy specimens were available from 11,152 patients with prostatic adenocarcinomas undergoing surgery between 1992 and 2011 at the Department of Urology and the Martini Clinics at the University Medical Center Hamburg-Eppendorf (Hamburg, Germany). Follow-up data were available for a total of 9695 patients with a median follow-up of 36.8 months (range, 1 to 228 months) (Table 1). None of the patients received neo-adjuvant or adjuvant therapy. The PSA values were measured after surgery, and PSA recurrence was defined as a postoperative PSA of 0.2 ng/mL and increasing at first of appearance. All prostate specimens were analyzed according to a standard procedure, including a complete embedding of the entire prostate for histological analysis.¹⁷ The TMA manufacturing process was described earlier in detail.¹⁸ In short, one 0.6-mm core was taken from a randomly selected tumor block containing a particularly large tumor mass reflecting the Gleason grade of the pathological diagnosis from each patient. The tissues were distributed among 24 TMA blocks, each containing 144 to 522 tumor samples. For internal controls, each TMA block also contained various control tissues, including normal prostate tissue. The molecular database attached to this TMA contained results on ERG expression in 9628, *ERG* break-apart fluorescence *in situ* hybridization (FISH) analysis in 6106,¹⁹ and deletion status of *CHD1* (5q21) in 3022 (blocks 1 to 7 of the TMA),²⁰ *MAP3K7* (6q15) in 3528 (blocks 1 to 10 of the TMA),²¹ *PTEN* (10q23) in 6115 (blocks 1 to 24 of the TMA),²² and *FOXPI* (3p13) in 1290 cancers²³ (blocks 1 to 7 of the TMA). The use of tissues and clinical data were according to the Hamburger Krankenhaus Gesetz (§12) and approved by our local ethical committee.

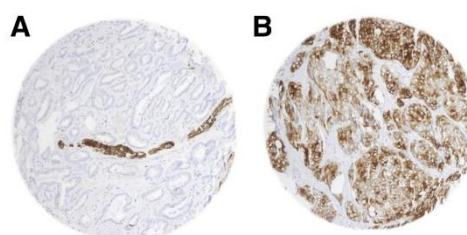


Figure 1 Representative images of β III-tubulin immunostaining. **A:** Negative staining in prostate cancer and positive staining in nerves. **B:** Positive staining in prostate cancer.

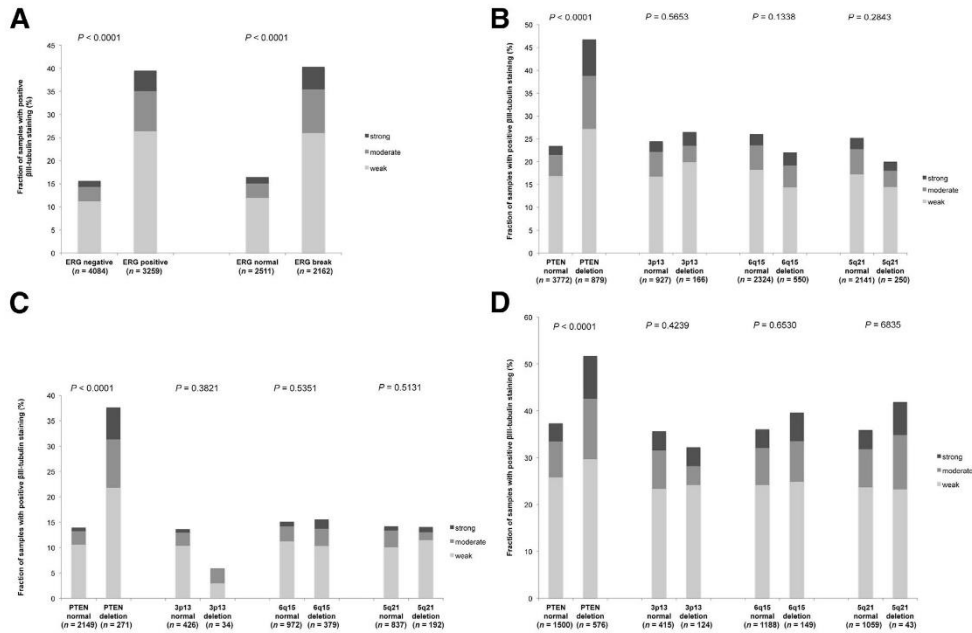


Figure 2 Relationship of βIII-tubulin expression with ERG fusion probed by IHC and FISH (A), βIII-tubulin expression versus *PTEN*, 3p13, 6q15, and 5q21 deletions probed by FISH analysis in all cancers (B), ERG-negative cancers (C), and ERG-positive cancers (D).

IHC Data

Freshly cut TMA sections were immunostained on 1 day and in one experiment. Primary antibody specific for βIII-tubulin (rabbit monoclonal antibody, dilution 1:150; Epitomics Inc., Burlingame, CA) was applied, and slides were

Table 2 Associations between βIII-Tubulin Expression Results and Cancer Phenotype in All Cancers

Parameter	No. Evaluable	IHC result (%)				P value
		Negative	Weak	Moderate	Strong	
All cancers	8179	74.37	17.73	5.34	2.56	
Tumor stage						
pT2	5195	79.5	15.32	3.93	1.25	
pT3a	1905	69.82	20.1	6.56	3.52	
pT3b	988	57.49	25.2	9.82	7.49	
pT4	52	51.92	26.92	15.38	5.77	<0.0001
Gleason grade						
≤3 + 3	1893	83.94	12.89	2.8	0.37	
3 + 4	4647	74.26	18.31	5.23	2.19	
4 + 3	123	64.39	21.22	8.7	5.69	
≥4 + 4	360	60.28	23.61	7.78	8.33	<0.0001
Lymph node metastasis						
N0	4624	72.28	18.92	5.8	3.01	
N+	438	53.88	28.31	11.42	6.39	<0.0001
Surgical margin						
Negative	6449	75.62	16.92	5.29	2.17	
Positive	1582	69.6	20.73	5.69	3.98	<0.0001

deparaffinized and exposed to heat-induced antigen retrieval for 5 minutes in an autoclave at 121°C in pH 7.8 Tris-EDTA-citrate buffer. Bound antibody was then visualized using the EnVision Kit (Dako, Glostrup, Denmark). Staining intensity seen in nerves and axons served as a positive control, as previously described.¹⁴ The staining intensity (0, 1, 2, 3) and the fraction of positive tumor cells were recorded for each tissue spot. A final score was built from these two parameters according to the following, as previously described^{24,25}: negative scores had a staining intensity of 0; weak scores, a staining intensity of 1 in ≤70% of tumor cells or 2 in ≤30% of tumor cells; moderate scores, a staining intensity of 1 in >70% of tumor cells, a staining intensity of 2 in >30% and ≤70% of tumor cells, or a staining intensity of 3 in ≤30% of tumor cells; and strong scores, a staining intensity of 2 in >70% of tumor cells or a staining intensity of 3 in >30% of tumor cells.

Statistics

Statistical calculations were performed with JMP 9 software (SAS Institute Inc., Cary, NC). Contingency tables and the χ² test were performed to search for associations between molecular parameters and tumor phenotype. Survival curves were calculated according to Kaplan-Meier. The log-rank test was applied to detect significant survival differences between groups. Cox proportional

Table 3 Associations between β III-Tubulin Expression Results and ERG-Negative Cancer Phenotype

Parameter	No. evaluable	IHC result (%)				P value
		Negative	Weak	Moderate	Strong	
All cancers	4084	84.4	11.17	3.16	1.27	
Tumor stage						
pT2	2694	88.72	8.69	2.12	0.48	
pT3a	861	82.11	12.78	3.48	1.63	
pT3b	494	65.38	21.66	7.89	5.06	
pT4	22	68.18	18.18	13.64	0	<0.0001
Gleason grade						
≤3 + 3	883	92.53	5.44	1.81	0.23	
3 + 4	2291	85.38	11	2.71	0.92	
4 + 3	668	76.35	15.87	5.24	2.54	
≥4 + 4	225	66.67	21.78	6.22	5.33	<0.0001
Lymph node metastasis						
N0	2364	83.38	11.93	3.34	1.35	
N+	216	60.65	25.93	9.26	4.17	<0.0001
Surgical margin						
Negative	3226	85.21	10.57	3.07	1.15	
Positive	781	80.92	13.57	3.71	1.79	0.0308

hazards regression analysis was performed to test the statistical independence and significance between pathological, molecular, and clinical variables. Separate analyses were performed using different sets of parameters available either before or after prostatectomy.

Results

β III-Tubulin Expression in Prostate Cancer

A total of 8179 (73.3%) of tumor samples were interpretable in our TMA analysis. Reasons for noninformative cases (2973 spots; 26.7%) included lack of tissue samples or absence of unequivocal cancer tissue in the TMA spot. β III-Tubulin immunostaining was predominantly localized in the cytoplasm of invasive prostate cancers and, in some rare cases, in the normal-appearing prostate epithelium from patients with cancer. Positive β III-tubulin immunostaining was seen in 2096 (25.6%) of our 8179 interpretable prostate cancers and was considered weak in 17.7%, moderate in 5.3%, and strong in 2.5% of cancers. Representative images of negative and positive β III-tubulin immunostainings are given in Figure 1.

Association with *TMPRSS2:ERG* Fusion Status and ERG Protein Expression

To evaluate whether β III-tubulin expression is associated with ERG status in prostate cancers, we used data from previous studies.¹⁹ Data on *TMPRSS2:ERG* fusion status, obtained by FISH, were available from 4673 patients, and by immunohistochemistry (IHC), from 7343 patients. Data on both ERG FISH and IHC were available from 5942 cancers, and an identical result (ERG IHC positive and break by FISH)

was found in 5670 (95.4%) of 5942 cancers. High-level β III-tubulin staining was tightly linked to *TMPRSS2:ERG* rearrangement and ERG expression in prostate cancers ($P < 0.0001$ each) (Figure 2A). For example, moderate or strong β III-tubulin immunostaining was seen in 14.4% of cancers with *TMPRSS2:ERG* fusion detected by FISH but found in only 4.5% of cancers without such rearrangements ($P < 0.0001$).

Associations with Tumor Phenotype

Increased β III-tubulin expression was significantly linked to high Gleason grade, advanced pathological tumor stage, and positive nodal status, if all tumors were jointly analyzed ($P < 0.0001$ each) (Table 2), but also in the subgroup of ERG-negative cancers ($P < 0.0001$ each) (Table 3) and ERG-positive cancers [$P < 0.0001$ for pathological tumor stage (pT) and Gleason grade, and $P = 0.0137$ for nodal status] (Table 4).

Associations with Other Key Genomic Deletions

Earlier studies had provided evidence for distinct molecular subgroups of prostate cancers defined by *TMPRSS2:ERG* fusions and several genomic deletions. We and others had described a strong link of *PTEN* and 3p13 deletions to ERG positivity and of 5q21 and 6q15 deletions to ERG negativity.^{21,22,26–28} To study, whether β III-tubulin expression might be particularly linked to one of these genomic deletions, β III-tubulin data were compared with pre-existing findings on *PTEN* (10q23), *FOXP1* (3p13), *MAP3K7* (6q15), and *CHD1* (5q21) deletions. In the analysis of all tumors, *PTEN* deletions were significantly linked to high β III-tubulin expression ($P < 0.0001$) (Figure 2B). These associations were retained in

Table 4 Associations between β III-Tubulin Expression Results and ERG-Positive Cancer Phenotype

Parameter	No. evaluable	IHC result (%)				P value
		Negative	Weak	Moderate	Strong	
All cancers	3259	60.48	26.36	8.71	4.45	
Tumor stage						
pT2	1934	65.62	24.77	7.19	2.43	
pT3a	880	56.82	27.61	9.77	5.8	
pT3b	404	45.54	30.45	13.12	10.89	
pT4	23	39.13	34.78	13.04	13.03	<0.0001
Gleason grade						
≤3 + 3	728	72.8	21.98	4.67	0.55	
3 + 4	1929	59.82	27.58	8.76	3.84	
4 + 3	468	47.65	28.21	13.68	10.47	
≥4 + 4	110	46.36	25.45	11.82	16.36	<0.0001
Lymph node metastasis						
N0	1847	57.34	27.72	9.47	5.47	
N+	185	46.49	30.27	15.14	8.11	0.0137
Surgical margin						
Negative	2536	62.34	25.24	8.68	3.75	
Positive	668	54.49	29.94	8.83	6.74	0.0002

ERG-negative ($P < 0.0001$) (Figure 2C) and ERG-positive ($P < 0.0001$) (Figure 2D) cancers. All other deletions analyzed were unrelated to βIII-tubulin expression both in all cancers and in subgroup analyses.

Associations with PSA Recurrence

Follow-up data were available for 7192 patients with interpretable βIII-tubulin immunostaining on the TMA. The suitability of our follow-up data is confirmed by the strong association between Gleason grade and early PSA recurrence (Figure 3A). There was a statistically significant association between high βIII-tubulin expression and early PSA recurrence if all tumors were analyzed ($P < 0.0001$) (Figure 3B), but also in the subgroups of ERG-negative, ERG-positive, PTEN-nondeleted, and PTEN-deleted cancers ($P < 0.0001$ each) (Figure 3, C–F).

Multivariate Analysis

Four multivariate analyses were performed evaluating the clinical relevance of βIII-tubulin expression in different scenarios (Table 5). Scenario 1 was using all postoperatively available parameters, including pathological tumor stage, pathological lymph node status (pN), surgical margin status, preoperative PSA value, and pathological Gleason grade obtained after the morphological evaluation of the entire resected prostate. Scenario 2 was using all postoperatively available parameters, with exception of nodal status. The rationale for this approach was that the indication and extent of lymph node dissection is not standardized in the surgical therapy of prostate cancer and that including pN in multivariate analysis can markedly increase case numbers. Two additional scenarios had to purpose to model the preoperative situation. Scenario 3 included βIII-tubulin expression, preoperative PSA, clinical

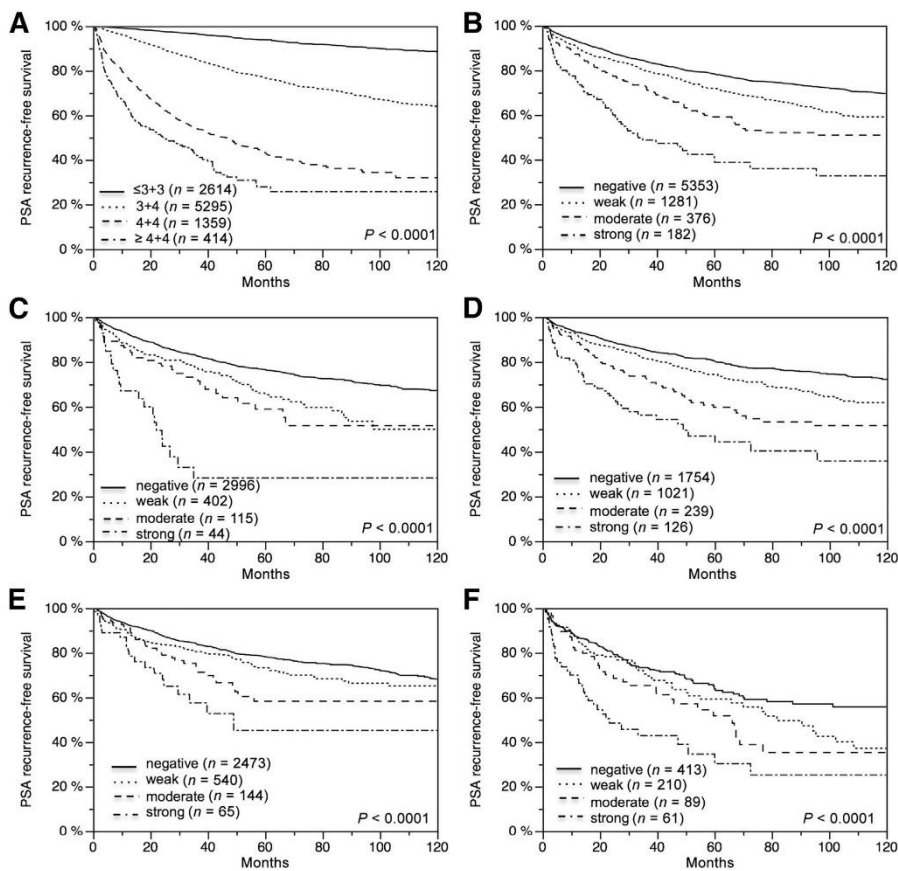


Figure 3 A: Relationship of Gleason grade with biochemical recurrence ($n = 9682$). Association of βIII-tubulin immunostaining intensity with biochemical recurrence in all prostate cancers ($n = 7192$) (B), ERG-negative prostate cancers ($n = 3557$) (C), ERG-positive prostate cancers ($n = 2870$) (D), PTEN-nondeleted cancers ($n = 3222$) (E), and PTEN-deleted cancers ($n = 773$) (F).

Table 5 Multivariate Analysis

Parameter	Scenario	N	P value (RR)							
			Gleason, radical prostatectomy	PSA, preoperative	Pathological tumor stage (pT)	Lymph node status (pN)	Surgical margin (R)	Gleason, preoperative biopsy	Clinical tumor stage (cT)	β III-Tubulin expression on TMA
			$\geq 4 + 4$ vs $\leq 3 + 3$	20 vs < 4 ng/mL	pT4 vs pT2	pN+ vs pN0	R1 vs R0	$\geq 4 + 4$ vs $\leq 3 + 3$	cT3a vs cT1c	Strong vs negative
All cancers	1	4323	< 0.0001 (2.4)	< 0.0001 (1.75)	< 0.0001 (4.45)	< 0.0001 (1.51)	< 0.0001 (1.36)	—	—	0.0008 (1.68)
	2	7027	< 0.0001 (6.09)	< 0.0001 (2.14)	< 0.0001 (5.21)	—	< 0.0001 (1.44)	—	—	< 0.0001 (1.88)
	3	6882	< 0.0001 (12.55)	< 0.0001 (3.25)	—	—	—	—	< 0.0001 (2.09)	< 0.0001 (1.61)
	4	6774	—	< 0.0001 (4.02)	—	—	—	< 0.0001 (4.16)	< 0.0001 (1.46)	< 0.0001 (2.5)
ERG negative	1	2176	< 0.0001 (4.01)	0.0002 (1.73)	< 0.0001 (5.03)	< 0.0001 (1.77)	0.0296 (1.24)	—	—	0.1219 (1.82)
	2	3475	< 0.0001 (6.3)	< 0.0001 (2.03)	< 0.0001 (7.25)	—	0.0021 (1.31)	—	—	0.0071 (2.35)
	3	3435	< 0.0001 (11.79)	< 0.0001 (3.05)	—	—	—	—	< 0.0001 (1.6)	0.0005 (2.9)
	4	3387	—	< 0.0001 (3.82)	—	—	—	< 0.0001 (3.77)	< 0.0001 (1.41)	0.0001 (3.2)
ERG positive	1	1742	< 0.0001 (7.02)	0.0079 (1.66)	< 0.0001 (4.74)	0.1016 (1.25)	0.0042 (1.35)	—	—	0.0181 (1.65)
	2	2802	< 0.0001 (7.48)	0.0002 (1.92)	< 0.0001 (5.21)	—	0.0001 (1.43)	—	—	0.003 (1.76)
	3	2719	< 0.0001 (16.51)	< 0.0001 (3.2)	—	—	—	—	< 0.0001 (1.84)	0.0012 (1.79)
	4	2671	—	< 0.0001 (3.70)	—	—	—	< 0.0001 (4.58)	< 0.0001 (1.6)	< 0.0001 (2.31)

—, parameter not included in the respective scenario; RR, risk ratio.

tumor stage (cT stage), and Gleason grade obtained on the prostatectomy specimen. Because postoperative determination of a tumor Gleason grade is better than the preoperatively determined Gleason grade (subjected to sampling errors and consequently under-grading in more than one third of cases²⁹), another multivariate analysis was added. Scenario 4 used the preoperative Gleason grade obtained on the original biopsy specimen, which was combined with preoperative PSA, cT stage, and β III-tubulin expression.

If all tumors were analyzed, all scenarios suggest a tendency of β III-tubulin to represent an independent predictor of prognosis. Separate analysis of ERG-positive and ERG-negative cancers revealed that β III-tubulin expression has independent prognostic relevance in ERG-positive cancers in all scenarios. In ERG-negative cancers, β III-tubulin was identified as an independent predictor of prognosis in scenarios 2, 3, and 4.

Discussion

The results of our study identify high β III-tubulin expression as a strong prognostic feature in prostate cancers. The IHC experiments revealed positive β III-tubulin staining in 25.6% of prostate cancers. Two earlier studies analyzing 284¹⁵ and 258¹⁴ prostate cancers on a TMA by IHC had reported β III-tubulin positivity in 11.6%¹⁵ and 16.7%¹⁴ of prostate cancers. These authors had used three 1-mm¹⁵ and four 0.6-mm¹⁴ cores per cancer in their studies. Because the frequency of β III-tubulin expression detected in our study using TMAs constructed from one 0.6-mm core per patient is somewhat higher than in these studies, a methodological restriction related to our TMA approach is unlikely. By using the same TMA or smaller subsets of it, we had earlier reproduced the substantial prognostic impact of all previously well-established prognostic markers, such as *PTEN*²² or *TP53*¹⁷ inactivation and the Ki67 labeling index.³⁰ We had

also used this TMA platform for the successful identification of various other prognostic features in prostate cancer.^{24,31–33}

β III-Tubulin immunostaining was significantly associated with unfavorable tumor phenotype and early PSA recurrence in our patients. This was in line with earlier reports describing a significant association between high β III-tubulin expression and high Gleason score,^{14,15} advanced pathological tumor stage,¹⁴ positive lymph node status,¹⁴ and high risk for biochemical recurrence.¹⁴ Because β III-tubulin renders the microtubules unstable and, therefore, more dynamic,^{34,35} it appears conceivable that β III-tubulin contributes to tumor aggressiveness by enhancing cell motility and migration required for tumor growth and metastasis. Cell culture experiments revealed that drugs inhibiting cell migration are ineffective in the presence of high β III-tubulin levels.³⁶

Many patients included in our project in conjunction with an extensive molecular database attached to our cohort enabled us to further expand our analysis to molecularly defined subgroups. More than half of prostate cancers, particularly in young patients, carry gene fusions linking the androgen-regulated *TMPRSS2* with transcription factors of the *ETS* family.^{37,38} As a result of this rearrangement, the expression of ERG becomes androgen regulated and massively overexpressed. Our data demonstrate that high β III-tubulin expression was markedly more frequent in ERG-positive than in ERG-negative cancers. Finding this association by two independent approaches for ERG fusion detection (IHC/FISH) largely excludes a false-positive association, caused by nonfunctional tissue. This association suggests a selection advantage for tumor cells with expression of both β III-tubulin and ERG and raises the possibility that both genes might act cooperatively. In fact, a role of ERG for cell motility has been suggested before.^{39,40} In endothelial cells, ERG increases cell migration and lamellipodia formation by up-regulation of the histone deacetylase HDAC6, which is required for tubulin acetylation and consequent destabilization of microtubules.³⁹ It

might be speculated that ERG and βIII-tubulin jointly affect cell motility through enhancement of microtubule dynamics.

A further aim of this study was to determine whether βIII-tubulin expression is linked to key genomic deletions known to be associated with *ERG* fusion status. Certain chromosomal deletions are tightly linked to either positive or negative ERG status. In particular, deletions at 3p13 and 10q23 were found to be associated with ERG-positive cancers, whereas 5q21 and 6q15 were linked to ERG-negative cancers.^{21,22,26–28} In earlier studies, we had identified biomarkers that were significantly linked to some of these genomic defined subgroups. For example, CRISP3 overexpression is strongly associated with *PTEN*-deleted, ERG-positive prostate cancer.⁴¹

A strong link between βIII-tubulin expression and presence of *PTEN* deletions was found in this study, which was independent from the known association between *PTEN* deletions and ERG fusions. This suggests that *PTEN* loss might provide a selection advantage for tumor cells with elevated βIII-tubulin levels. A functional link between *PTEN* loss and microtubule architecture has been shown recently. Vitolo et al⁴² reported that *PTEN* inactivation induces tubulin-based microtentacles that facilitate cell reattachment and suggested that such cytoskeletal changes could have an impact on tumor biological features. It remains, however, speculative if βIII-tubulin could also participate in this mechanism. Alternatively, aberrant expression of βIII-tubulin in *PTEN*-deleted prostate cancer cells might be related to tumor dedifferentiation. For example, a previous study has shown that *PTEN* loss in mice induces rapid dedifferentiation and results in down-regulation of prostate-specific genes, such as *MSMB*, *TGM4*, and *SBP*.⁴³ Thus, it is conceivable that aberrant expression of βIII-tubulin might reflect the transcriptional reprogramming in *PTEN*-deleted cancers linked to tumor dedifferentiation. By identifying ERG and *PTEN* as two key alterations linked to βIII-tubulin expression, our study provides important insights into the pathways leading to aberrant βIII-tubulin expression in prostate cancer.

Our data showing strong prognostic relevance of βIII-tubulin in prostate cancers raise the possibility of βIII-tubulin representing a biomarker with a potential clinical utility. This notion is further supported by the fact that our approach of analyzing molecular features on a minute TMA specimen, measuring 0.6 mm in diameter, closely models the molecular analyses of core needle biopsy specimens, in which comparable amounts of tissues are evaluated. Multivariate analyses were, therefore, performed to further evaluate the relevance of βIII-tubulin measurement.

Several issues need to be considered to comprehend data obtained in multivariate analyses involving tissues derived from prostatectomy specimens. First, it is obvious that multivariate analysis, including all strong prognostic features available after surgery (eg, pT, pN, surgical margin, or the validated Gleason grade) make it difficult for any biomarker to be established as an independent predictor of prognosis.

The inclusion of the pN category also represents a particular issue, because it can substantially reduce the number of cases included in a study. This is because lymph node dissection is not routinely performed in prostate cancer surgery. Postoperative analyses use many parameters, which are unavailable at that moment in time, when decisions are made on patient therapy. Competing parameters for a clinically useful prognostic biomarker would, thus, rather include parameters that are available before surgery, such as the (unvalidated) Gleason grade obtained on a core needle biopsy specimen, the preoperative PSA value, and the clinical T category. In principle, potential prognostic biomarkers should, thus, be evaluated on preoperative needle biopsy specimens. From a practical point of view, such analyses are hardly feasible, also because the precious core needle biopsy specimens would be exhausted after only a few studies. In this project, multiple models were applied for multivariate analyses to compensate as much as possible for these inherent limitations. That independent association of high-level βIII-tubulin staining with early PSA recurrence in prostate cancers was found in all analyzed scenarios, including various combinations of preoperatively and postoperatively available parameters, strongly argues for βIII-tubulin representing a biomarker with clinical relevance in prostate cancers.

In summary, our study identified a strong link of high βIII-tubulin expression with early PSA recurrence in prostate cancers, which was independent of grade, stage, margin status, lymph node involvement, and preoperative PSA level. The even stronger independent prognostic impact of βIII-tubulin expression in settings using only parameters that are preoperatively available may suggest that βIII-tubulin expression analysis (either alone or in combination with other molecular parameters) might result in clinically useful information in prostate cancer.

Acknowledgments

We thank Christina Koop, Julia Schumann, Sünje Seekamp, and Inge Brandt for excellent technical support.

References

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D: Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011, 61:69–90
2. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P: Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005, 55:74–108
3. Orr GA, Verdier-Pinard P, McDaid H, Horwitz SB: Mechanisms of Taxol resistance related to microtubules. *Oncogene* 2003, 22: 7280–7295
4. Katsetos CD, Herman MM, Mork SJ: Class III beta-tubulin in human development and cancer. *Cell Motil Cytoskeleton* 2003, 55:77–96
5. Katsetos CD, Draberova E, Legido A, Dumontet C, Draber P: Tubulin targets in the pathobiology and therapy of glioblastoma multiforme, I: class III beta-tubulin. *J Cell Physiol* 2009, 221:505–513
6. Koh Y, Jang B, Han SW, Kim TM, Oh DY, Lee SH, Kang CH, Kim DW, Im SA, Chung DH, Kim YT, Kim TY, Kim YW, Kim JH, Heo DS, Bang YJ: Expression of class III beta-tubulin correlates with

- unfavorable survival outcome in patients with resected non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2010, 5:320–325
7. Ferrandina G, Zannoni GF, Martinelli E, Paglia A, Gallotta V, Mozzetti S, Scambia G, Ferlini C: Class III beta-tubulin over-expression is a marker of poor clinical outcome in advanced ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res* 2006, 12:2774–2779
 8. Hetland TE, Helleslyt E, Florenes VA, Trope C, Davidson B, Kaem J: Class III beta-tubulin expression in advanced-stage serous ovarian carcinoma effusions is associated with poor survival and primary chemoresistance. *Hum Pathol* 2011, 42:1019–1026
 9. Choi JW, Kim Y, Lee JH, Kim YS: Expression of β -tubulin isotypes in urothelial carcinoma of the bladder. *World J Urol* 2012. <http://dx.doi.org/10.1007/s00345-012-0993-z> [Epub ahead of print]
 10. Koh Y, Kim TM, Jeon YK, Kwon TK, Hah JH, Lee SH, Kim DW, Wu HG, Rhee CS, Sung MW, Kim CW, Kim KH, Heo DS: Class III beta-tubulin, but not ERCC1, is a strong predictive and prognostic marker in locally advanced head and neck squamous cell carcinoma. *Ann Oncol* 2009, 20:1414–1419
 11. Zhang HL, Ruan L, Zheng LM, Whyte D, Tzeng CM, Zhou XW: Association between class III beta-tubulin expression and response to paclitaxel/vinorelbine-based chemotherapy for non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *Lung Cancer* 2012, 77:9–15
 12. Chen X, Wu J, Lu H, Huang O, Shen K: Measuring beta-tubulin III, Bcl-2, and ERCC1 improves pathological complete remission predictive accuracy in breast cancer. *Cancer Sci* 2012, 103:262–268
 13. Zheng WE, Chen H, Yuan SF, Wu LL, Zhang W, Sun HY, Chen WJ: Overexpression of β III-tubulin and survivin associated with drug resistance to docetaxel-based chemotherapy in advanced gastric cancer. *J BUON* 2012, 17:284–290
 14. Ploussard G, Terry S, Maille P, Allory Y, Sirab N, Kheuang L, Soyeux P, Nicolaiw N, Coppolani E, Paule B, Salomon L, Culine S, Buttyan R, Vacherot F, de la Taille A: Class III beta-tubulin expression predicts prostate tumor aggressiveness and patient response to docetaxel-based chemotherapy. *Cancer Res* 2010, 70:9253–9264
 15. Egevad L, Valdman A, Wiklund NP, Seve P, Dumontet C: Beta-tubulin III expression in prostate cancer. *Scand J Urol Nephrol* 2010, 44:371–377
 16. Grupp K, Diebel F, Sirma H, Simon R, Breitmeyer K, Steurer S, Hube-Magg C, Prien K, Pham T, Weigand P, Michl U, Heinzer H, Kluth M, Minner S, Tsourlakis MC, Izbicki JR, Sauter G, Schlomm T, Wilczak W: SPINK1 expression is tightly linked to 6q15- and 5q21-deleted ERG-fusion negative prostate cancers but unrelated to PSA recurrence. *Prostate* 2013, 73:1690–1698
 17. Schlomm T, Iwers L, Kirstein P, Jessen B, Kolleremann J, Minner S, Passow-Drolet A, Mirlacher M, Milde-Langosch K, Graefen M, Haese A, Steuber T, Simon R, Huland H, Sauter G, Erbersdobler A: Clinical significance of p53 alterations in surgically treated prostate cancers. *Mod Pathol* 2008, 21:1371–1378
 18. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP: Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 1998, 4:844–847
 19. Minner S, Enodien M, Sirma H, Luebke AM, Krohn A, Mayer PS, Simon R, Tennstedt P, Muller J, Scholz L, Brase JC, Liu AY, Schluter H, Pantel K, Schumacher U, Bokemeyer C, Steuber T, Graefen M, Sauter G, Schlomm T: ERG status is unrelated to PSA recurrence in radically operated prostate cancer in the absence of antihormonal therapy. *Clin Cancer Res* 2011, 17:5878–5888
 20. 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: CHD1 is a 5q21 tumor suppressor required for ERG rearrangement in prostate cancer. *Cancer Res* 2013, 73:2795–2805
 21. Kluth M, Hesse J, Heini A, Krohn A, Steurer S, Sirma H, Simon R, Mayer PS, Schumacher U, Grupp K, Izbicki JR, Pantel K, Dikomey E, Korbel JO, Plass C, Sauter G, Schlomm T, Minner S: Genomic deletion of MAP3K7 at 6q12-22 is associated with early PSA recurrence in prostate cancer and absence of TMPRSS2:ERG fusions. *Mod Pathol* 2013, 26:975–983
 22. Krohn A, Diederl T, Burkhardt L, Mayer PS, De Silva C, Meyer-Koblum M, Kotschau D, Tennstedt P, Huang J, Gerhauser C, Mader M, Kurtz S, Sirma H, Saad F, Steuber T, Graefen M, Plass C, Sauter G, Simon R, Minner S, Schlomm T: 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, 181:401–412
 23. Krohn A, Seidel A, Burkhardt L, Bachmann F, Mader M, Grupp K, Eichenauer T, Becker A, Adam M, Graefen M, Huland H, Kurtz S, Steurer S, Tsourlakis MC, Minner S, Michl U, Schlomm T, Sauter G, Simon R, Sirma H: Recurrent deletion of 3p13 targets multiple tumour suppressor genes and defines a distinct subgroup of aggressive ERG fusion-positive prostate cancers. *J Pathol* 2013, 231:130–141
 24. Minner S, Wittmer C, Graefen M, Salomon G, Steuber T, Haese A, Huland H, Bokemeyer C, Yekebas E, Dierlamm J, Balabanov S, Kilic E, Wilczak W, Simon R, Sauter G, Schlomm T: High level PSMA expression is associated with early PSA recurrence in surgically treated prostate cancer. *Prostate* 2011, 71:281–288
 25. Tsourlakis MC, Walter E, Quaes A, Graefen M, Huland H, Simon R, Sauter G, Steurer S, Schlomm T, Minner S: High N-r-CAM expression is associated with favorable phenotype and late PSA recurrence in prostate cancer treated by prostatectomy. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2013, 16:159–164
 26. Berger MF, Lawrence MS, Demicheli F, Drier Y, Cibulskis K, Sivachenko AY, et al: The genomic complexity of primary human prostate cancer. *Nature* 2011, 470:214–220
 27. 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 Res* 2007, 67:8504–8510
 28. Taylor BS, Schultz N, Hieronymus H, Gopalan A, Xiao Y, Carver BS, Arora VK, Kaushik P, Cerami E, Reva B, Antipin Y, Mitsiades N, Landers T, Dolgalev I, Major JE, Wilson M, Socci ND, Lash AE, Heguy A, Eastham JA, Scher HI, Reuter VE, Scardino PT, Sander C, Sawyers CL, Gerald WL: Integrative genomic profiling of human prostate cancer. *Cancer Cell* 2010, 18:11–22
 29. Epstein JI, Feng Z, Trock BJ, Pierorazio PM: Upgrading and downgrading of prostate cancer from biopsy to radical prostatectomy: incidence and predictive factors using the modified Gleason grading system and factoring in tertiary grades. *Eur Urol* 2012, 61:1019–1024
 30. Tennstedt P, Koster P, Bruchmann A, Mirlacher M, Haese A, Steuber T, Sauter G, Huland H, Graefen M, Schlomm T, Minner S, Simon R: The impact of the number of cores on tissue microarray studies investigating prostate cancer biomarkers. *Int J Oncol* 2012, 40:261–268
 31. Minner S, Jessen B, Stiedenroth L, Burandt E, Kolleremann J, Mirlacher M, Erbersdobler A, Eichelberg C, Fisch M, Brummendorf TH, Bokemeyer C, Simon R, Steuber T, Graefen M, Huland H, Sauter G, Schlomm T: Low level HER2 overexpression is associated with rapid tumor cell proliferation and poor prognosis in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2010, 16:1553–1560
 32. Müller J, Ehlers A, Burkhardt L, Sirma H, Steuber T, Graefen M, Sauter G, Minner S, Simon R, Schlomm T, Michl U: Loss of pSer2448-mTOR expression is linked to adverse prognosis and tumor progression in ERG-fusion-positive cancers. *Int J Cancer* 2013, 132:1333–1340
 33. Minner S, Kraetzig F, Tachezy M, Kilic E, Graefen M, Wilczak W, Bokemeyer C, Huland H, Sauter G, Schlomm T: Low activated leukocyte cell adhesion molecule expression is associated with advanced tumor stage and early prostate-specific antigen relapse in prostate cancer. *Hum Pathol* 2011, 42:1946–1952
 34. Ranganathan S, Benetatos CA, Colarusso PJ, Dexter DW, Hudes GR: Altered beta-tubulin isotype expression in paclitaxel-resistant human prostate carcinoma cells. *Br J Cancer* 1998, 77:562–566
 35. Ranganathan S, Dexter DW, Benetatos CA, Hudes GR: Cloning and sequencing of human betaIII-tubulin cDNA: induction of betaIII

- isotype in human prostate carcinoma cells by acute exposure to anti-microtubule agents. *Biochim Biophys Acta* 1998, 1395:237–245
36. Ganguly A, Yang H, Cabral F: Class III beta-tubulin counteracts the ability of paclitaxel to inhibit cell migration. *Oncotarget* 2011, 2: 368–377
 37. Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, Dhanasekaran SM, Mehra R, Sun XW, Varambally S, Cao X, Tchinda J, Kuefer R, Lee C, Montie JE, Shah RB, Pienta KJ, Rubin MA, Chinnaiyan AM: Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science* 2005, 310:644–648
 38. 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, 23:159–170
 39. Birdsey GM, Dryden NH, Shah AV, Hannah R, Hall MD, Haskard DO, Parsons M, Mason JC, Zvelebil M, Gottgens B, Ridley AJ, Randi AM: The transcription factor Erg regulates expression of histone deacetylase 6 and multiple pathways involved in endothelial cell migration and angiogenesis. *Blood* 2012, 119: 894–903
 40. Chow A, Amemiya Y, Sugar L, Nam R, Seth A: Whole-transcriptome analysis reveals established and novel associations with TMPRSS2: ERG fusion in prostate cancer. *Anticancer Res* 2012, 32:3629–3641
 41. Grupp K, Kohl S, Sirma H, Simon R, Steurer S, Becker A, Adam M, Izbicki J, Sauter G, Minner S, Schlomm T, Tsourlakis MC: Cysteine-rich secretory protein 3 overexpression is linked to a subset of PTEN-deleted ERG fusion-positive prostate cancers with early biochemical recurrence. *Mod Pathol* 2013, 26:733–742
 42. Vitolo MI, Boggs AE, Whipple RA, Yoon JR, Thompson K, Matrone MA, Cho EH, Balzer EM, Martin SS: Loss of PTEN induces microtentacles through PI3K-independent activation of cofilin. *Oncogene* 2013, 32:2200–2210
 43. Thielen JL, Volzing KG, Collier LS, Green LE, Largaespada DA, Marker PC: Markers of prostate region-specific epithelial identity define anatomical locations in the mouse prostate that are molecularly similar to human prostate cancers. *Differentiation* 2007, 75:49–61

2 Darstellung der Publikation

2.1 Einleitung

Das Prostatakarzinom ist weltweit die zweithäufigste, in den Ländern der westlichen Welt sogar die häufigste Malignomerkrankung des Mannes.¹ Dabei ist es die sechsthäufigste Krebstodesursache.¹ 14% aller neu diagnostizierten Krebsdiagnosen weltweit entfallen auf das Prostatakarzinom.¹ Dreiviertel davon betreffen Männer im Alter von 65 Jahren und älter.² Die Inzidenz der Erkrankung variiert weltweit sehr stark. Sie ist dabei auch abhängig vom Screening asymptomatischer Patienten, da hierdurch Prostatakarzinome entdeckt werden, die sonst vielleicht lebenslang unbemerkt geblieben wären.² Dies ist möglich, da der klinische Verlauf der Erkrankung sehr heterogen ist. Ein großer Teil der Karzinome wächst langsam und indolent, manche jedoch zeigen einen klinisch aggressiven und metastasierenden Verlauf.² Ziel in der Praxis ist es, dem individuellen Patienten mit seiner Erkrankung die richtige Therapie zukommen zu lassen. Trotz jüngster Fortschritte in der Forschung bestehen die gesicherten präoperativen prognostischen Marker weiterhin nur aus klinischem Stadium, präoperativem Prostata spezifischem Antigen (PSA)-Wert, Tumorausbreitung in der Biopsie und der mikroskopischen Tumormorphologie, dem sog. Gleason Grad. Diese Daten sind zwar statistisch sehr aussagekräftig, jedoch allein nicht ausreichend für die Planung einer optimalen und individuellen Behandlung. Aus diesem Grund werden dringend neue präoperativ verfügbare prognostische Marker gesucht, die dabei helfen sollen bereits frühzeitig relativ harmlose von aggressiven Karzinomen zu unterscheiden.³ Zur besseren Einordnung des klinischen Verlaufs als auch zur Optimierung der individuellen Therapie sind neue molekulare Parameter daher von entscheidender Bedeutung.

Ein zentraler Ansatz für ein besseres Verständnis der Tumorbilogie ist die Erforschung von genetischen Aberrationen im Prostatakarzinom. Es konnte gezeigt werden, dass die Deletion von PTEN, einem Tumorsuppressorgen, mit einem aggressiveren Krankheitsverlauf assoziiert ist.⁴ Auch Translokationen spielen in der Genetik des Prostatakarzinoms eine große Rolle. TMPRSS2 ist ein Gen auf Chromosom 21q22.2, das für eine membrangebundene Serinprotease kodiert und dessen Aktivität durch Androgene reguliert wird.⁵ ERG (ETS-related gene), auf Genlocus 21q22.3 gelegen, gehört zur Familie der ETS (E-twenty six)-

Transkriptionsfaktoren.⁶ Die TMPRSS2:ERG-Fusion kann in knapp der Hälfte aller Prostatakarzinome nachgewiesen werden.⁷

Mikrotubuli sind kleine Proteine, die in der Zelle an vielen wichtigen Aufgaben beteiligt sind. Dazu gehört der Aufbau des Zytoskeletts und die Aufrechterhaltung der Zellstruktur, aber auch Mitose und Meiose sowie der intrazelluläre Transport von Makromolekülen und Organellen.⁸ Sie sind aus α - und β -Tubulin-Heterodimeren aufgebaut, die sich zu einem Polymer zusammenfügen und auf diese Weise zylindrische Rohre formen.⁸ Dieser Prozess ist hochdynamisch, da am einen Ende des Tubulus stetig neue Tubulindimere assoziiert werden, während sie am anderen Ende bereits wieder dissoziieren.⁹ Das bedeutet, dass Mikrotubuli gleichzeitig wachsen und schrumpfen und sich so in einem Zustand dynamischer Instabilität befinden.⁸ Insgesamt wurden sechs verschiedene α - und sieben verschiedene β -Tubuline identifiziert,¹⁰ die sich jeweils in ihrer Aminosäuresequenz unterscheiden und auf verschiedenen Genen codiert sind.⁹ Die Expression der einzelnen Isotypen unterliegt einem komplexen Verteilungsmuster in den verschiedenen Geweben.⁸ Klasse III β -Tubulin (auch β III-Tubulin oder TUBB3) ist ein mikrotubuläres Protein, das normalerweise in Zellen neuronalen Ursprungs exprimiert wird.¹⁰ Die Biosynthese von β III-Tubulin wurde aber auch in verschiedenen extraneuronalen Zellen beschrieben, wie Melanozyten, Spermien, folliculären Lymphozyten und neuroendokrinen Zellen des fetalen respiratorischen Epithels.⁹ Man fand außerdem eine Überexpression in verschiedenen soliden Tumoren, wie im nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom,¹¹ dem Ovarialkarzinom,^{12,13} dem Urothelkarzinom der Harnblase¹⁴ und dem Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereiches (SCCHN).¹⁵ In der Literatur wurde auch ein Zusammenhang zwischen einer hohen Expression von β III-Tubulin und einem schlechten klinischen Verlauf bei verschiedenen Krebsarten beschrieben, darunter das nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom, das Ovarialkarzinom und das Urothelkarzinom der Harnblase.^{11,13,14} Andere Studien schildern eine Verbindung zwischen β III-Tubulin-Überexpression und vermindertem Ansprechen auf Krebsmedikamente aus der Gruppe der Taxane, welche den Mikrotubulistoffwechsel angreifen.^{14, 16-18}

Es weist einiges darauf hin, dass β III-Tubulin ein geeigneter prognostischer und vielleicht auch prädiktiver molekularer Marker für das Prostatakarzinom sein könnte. Erste Studien postulierten nach der Untersuchung von 258¹⁹ und 284²⁰

Prostatakarzinomen Assoziationen mit ungünstigem Tumorphänotyp und biochemischem Rezidiv. In Prostatakarzinom-Zelllinien zeigte sich bei induzierter Überexpression oder Knockdown von β III-Tubulin auch tatsächlich eine veränderte Sensitivität gegenüber Taxan-Medikamenten.¹⁹

In dieser Studie benutzten wir unsere Tissue Micro Arrays (TMA)²¹ aus 11.152 Prostatakarzinomgewebeproben, unterteilt in verschiedene molekulare Subgruppen, um die klinische Relevanz von β III-Tubulin zu untersuchen und um die β III-Tubulin-Expression mit anderen molekularen und prognostischen Markern zu vergleichen. Die Resultate dieser Studie zeigen, dass eine hohe β III-Tubulin-Expression verbunden mit einem PTEN-Verlust und einer ERG-Aktivierung ein starker und unabhängiger Prädiktor für ein frühes PSA-Rezidiv im Prostatakarzinom ist.

2.2 Material und Methoden

2.2.1 Patientenkollektiv

Es lagen Gewebeproben radikaler Prostatektomiepräparate von 11.152 Patienten mit Adenokarzinomen der Prostata vor, die zwischen 1992 und 2011 an der Klinik für Urologie und der Martini-Klinik am Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf operiert wurden. Dazu gab es Follow-up-Daten von insgesamt 9.695 Patienten mit einer Follow-up Zeit von 1 bis 228 Monaten (Median 36.8 Monate). Das PSA wurde postoperativ bestimmt. Ein PSA-Rezidiv wurde bei 0,2 ng/ml und ansteigendem Wert nach erstmaliger Messung definiert. Die Prostataprobe wurden nach einem Standardprozedere analysiert, einschließlich Einbettung der kompletten Prostata zur histologischen Untersuchung.²² Zur Herstellung eines TMA wird auf die Literatur verwiesen.²³ Angegliedert an die TMAs ist eine molekulare Datenbank, die Ergebnisse über ERG-Expression in 9.628, ERG-Rearrangement (Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)) in 6.106²⁴ und den Deletionsstatus von 5q21 (CHD1) in 3.022 (Blöcke 1-7 des TMA),²⁵ 6q15 (MAP3K7) in 3.528 (Blöcke 1-10 des TMA),²⁶ 10q23 (PTEN) in 6.115 (Blöcke 1-24 des TMA)²⁷ und 3q13 (FOXP1) in 1.290 Krebsproben²⁸ (Blöcke 1-7 des TMA) enthält. Die Nutzung der Gewebeproben und klinischen Daten fand gemäß Hamburger Krankenhaus Gesetz (§12 HmbKHG) statt und wurde von unserer örtlichen Ethikkommission genehmigt.

2.2.2 Immunhistochemie

Alle frisch geschnittenen TMA-Schnitte wurden in einem experimentellen Ablauf gefärbt. Es wurde ein primärer Antikörper, spezifisch für β III-Tubulin (monoklonale

Kaninchenantikörper, Verdünnung 1:150, Epitomics Inc., Burlingame, CA) aufgetragen, die TMA-Schnitte entparaffiniert und zur Hitze-induzierten Antigen-Demaskierung für 5 Minuten in einem Autoklaven bei 121°C in Tris-EDTA-Citrat Puffer mit pH 7,8 behandelt. Die gebundenen Antikörper wurden mit Hilfe des EnVision Kit (Dako, Glostrup, Dänemark) sichtbar gemacht. Die Färbung von Nerven und Axonen diente als Positivkontrolle.¹⁹ Der Anteil positiver Tumorzellen und die Färbungsintensität (0, 1, 2, 3) wurden für jeden Gewebespot erfasst. Aus diesen beiden Parametern bildete sich ein Score, dessen genaue Zusammensetzung kürzlich in der Literatur beschrieben wurde.^{29, 30}

2.2.3 Statistik

Statistische Berechnungen wurden mit der Software JPM 9 (SAS Institute Inc., Cary, NC) durchgeführt. Wir erstellten Kontingenztafeln und den χ^2 -Test um nach Assoziationen zwischen molekularen Parametern und Tumorphänotyp zu suchen. Überlebenskurven wurden nach Kaplan-Meier erstellt. Wir verwendeten den Log-Rank-Test um signifikante Überlebensunterschiede zwischen den Gruppen zu erfassen. Die proportionale Hazardregression nach Cox wurde durchgeführt, um die statistische Unabhängigkeit und Signifikanz zwischen molekularen, pathologischen und klinischen Variablen zu testen.

2.3 Ergebnisse

2.3.1 Expression von β III-Tubulin im Prostatakarzinom

Aufgrund von u.a. fehlendem Gewebe oder eindeutigem Tumor waren „nur“ 8.179 (73,3%) von 11.152 TMA-Spots auswertbar

β III-Tubulin färbte sich vor allem im Zytoplasma von invasiv wachsenden Prostatakarzinomen. Insgesamt waren 2.096 (25,6%) der 8.179 auswertbaren Spots positiv (17,7% schwach, 5,3% mäßig, 2,5% stark).

2.3.2 Assoziation mit TMPRSS2:ERG Fusionsstatus und ERG Proteinexpression

Unter Einbezug von Daten aus vorherigen Studien²⁴ fanden wir einen engen Zusammenhang zwischen hoher β III-Tubulin-Expression und TMPRSS2:ERG-Rearrangement sowie β III-Tubulin- und ERG-Expression im Prostatakarzinom ($p < 0,0001$ jeweils).

2.3.3 Assoziationen zum Tumorphänotyp

Es bestand ein signifikanter Zusammenhang der Expression von β III-Tubulin mit hohem Gleason Grad, fortgeschrittenem pathologischem Tumorstadium und positivem Lymphknotenstatus im Gesamtkollektiv ($p < 0,0001$ jeweils) und in den Subgruppen der ERG-negativen ($p < 0,0001$ jeweils) und ERG-positiven Karzinomen ($p < 0,0001$ für pT und Gleason Grad, $p = 0,0137$ für Lymphknotenstatus).

2.3.4 Assoziationen zu anderen wichtigen Deletionen

In der Literatur wird eine starke Assoziation von PTEN- und 3p13-Deletionen zu positivem ERG-Status und von 5q21- und 6q15-Deletionen zu negativem ERG-Status beschrieben.^{26, 27, 31-33} Wir konnten ausschließlich einen Zusammenhang von hoher β III-Tubulin-Expression zu PTEN-Deletionen (10q23) feststellen, sowohl im Gesamtkollektiv als auch in den Subgruppen der ERG-positiven und ERG-negativen Karzinomen ($p < 0,0001$ jeweils, Abbildungen 2B-D).

2.3.5 Assoziationen zu PSA-Rezidiv

Bei 7.192 Patienten mit aussagekräftiger β III-Tubulin-Färbung standen Follow-up Daten zur Verfügung, deren Eignung für Prognosestudien die starke Assoziation von Gleason Grad und frühem PSA-Rezidiv zeigt ($p < 0,0001$). Wir fanden eine signifikante Assoziation zwischen hoher Expression von β III-Tubulin und frühem PSA-Rezidiv sowohl für das Gesamtkollektiv als auch einzeln für ERG-positive, ERG-negative und Karzinome mit oder ohne PTEN-Deletion ($p < 0,0001$ jeweils).

2.3.6 Multivariate Analyse

Wir berechneten vier verschiedene klinische Szenarien mittels multivariater Analyse. Die ersten beiden enthielten alle postoperativ verfügbaren Parameter. Im zweiten fehlte davon der Lymphknotenstatus. Szenario 3 und 4 simulierten die präoperative Situation. Sie enthielten jene Parameter, die vor einem chirurgischen Eingriff verfügbar sind. Das dritte Szenario beinhaltete den Gleason Grad, der für das Prostatektomiepräparat ermittelt wurde (aufgrund von u.a. Fehlern bei der Entnahme von Biopsien ist dieser Gleason Grad genauer),³⁴ das vierte den Gleason Grad ermittelt aus der präoperativen Biopsie. In der Analyse aller Tumoren zeigten alle vier Szenarien β III-Tubulin als unabhängigen Prognoseparameter, ebenso bei positivem ERG-Status. Bei Prostatakarzinomen mit negativem ERG-Status erwies sich β III-Tubulin in den Szenarien 2, 3 und 4 als unabhängiger Prognoseparameter.

2.4 Diskussion

Die Resultate unserer Studie zeigen, dass eine hohe β III-Tubulin-Expression ein sehr starker prognostischer Marker für das Prostatakarzinom ist.

Bei unseren immunhistologischen Färbungen fanden wir in 25,6% der Karzinome eine Positivität auf β III-Tubulin. Zwei frühere Studien, die 284²⁰ und 258¹⁹ Prostatakarzinomproben in einem TMA immunhistochemisch untersuchten, berichteten in 11,6%²⁰ und 16,7%¹⁹ eine positive Färbung von β III-Tubulin. Diese Autoren hatten drei 1mm²⁰ und vier 0,6mm¹⁹ große Stanzkerne pro Karzinom in ihren Experimenten benutzt. Für den TMA unserer Studie wurde ein einziger 0,6mm großer Stanzkern verwendet. Dieser stammte aus einem zufällig ausgewählten Tumorblock. Die von uns entdeckte gering höhere Rate an positiver β III-Tubulin-Färbung macht eine methodische Einschränkung durch unsere Art der TMA Konstruktion unwahrscheinlich. Mit dem gleichen TMA, oder kleineren Teilsätzen davon, hat die Prostatakarzinom Forschungsgruppe am UKE früher bereits die wesentliche prognostische Bedeutung aller etablierten prognostischen Marker wie PTEN-²⁷ oder TP53-Inaktivierung²² und Ki67-Labeling Index³⁵ reproduziert. Darüber hinaus wurden mit dieser TMA Plattform bereits erfolgreich weitere (neue) prognostische Marker für das Prostatakarzinom entdeckt.^{29, 36-38}

Die Expression von β III-Tubulin war in unserer Studie signifikant mit ungünstigem Tumorphänotyp und frühem PSA-Rezidiv assoziiert. Dies passt zu früheren Beschreibungen eines Zusammenhangs zwischen hoher β III-Tubulin-Expression und hohem Gleason Grad,^{19,20} fortgeschrittenem pathologischem Tumorstadium,¹⁹ positivem Lymphknotenstatus¹⁹ und hohem Risiko für ein biochemisches Rezidiv.¹⁹ β III-Tubulin a- und dissoziiert schneller als andere Tubulindimere am Mikrotubulus, wodurch es die Mikrotubuli der Zelle destabilisiert und sie so dynamischer macht.^{39, 40} Auf dieser Grundlage ist es vorstellbar, dass β III-Tubulin die Tumoraggressivität erhöht indem es die für Tumorwachstum und Metastasenbildung benötigte Zellmotilität und -migration steigert. Experimente an Zellkulturen zeigten die Ineffektivität von Zellmigration inhibierenden Medikamenten in der Gegenwart von hohen β III-Tubulin-Spiegeln.⁴¹

Die große Zahl der in unsere Studie eingeschlossenen Patienten in Verbindung mit der sehr umfangreichen damit verknüpften molekularen Datenbank ermöglichte es uns, die Analyse auf molekulare Subgruppen im Prostatakarzinom auszuweiten. Mehr

als die Hälfte der Prostatakarzinome, besonders bei jungen Patienten, enthalten Genfusionen in denen das Androgen-regulierte TMPRSS2 mit Transkriptionsfaktoren der ETS Familie, darunter ERG (21q22.3), verbunden wird.^{6, 42} Dies geschieht durch die Fusion des gesamten Exon 1 von TMPRSS2 entweder mit dem Anfang von Exon 4 (TMPRSS2:ERGa) oder dem Anfang von Exon 2 (TMPRSS2:ERGb) von ERG.⁶ Als Folge dieses Rearrangements steht die Expression von ERG unter dem Einfluss von Androgenen, woraus eine massive Überexpression resultiert.⁶ Wie unsere Daten zeigen, fand sich viel häufiger eine hohe Expression von β III-Tubulin in ERG-positiven als in ERG-negativen Tumoren. Nachdem wir diesen Zusammenhang durch zwei unterschiedliche Herangehensweisen zur Detektion von ERG-Fusionen (Immunhistochemie/FISH) entdeckt haben, ist eine falsch positive Assoziation aufgrund eines Ausfalls nahezu ausgeschlossen. Vielmehr lässt diese Assoziation einen Selektionsvorteil von Tumorzellen vermuten, die beides, β III-Tubulin und ERG, exprimieren. Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass beide Gene zusammenarbeiten könnten. Tatsächlich wurde in der Literatur bereits ein Effekt von ERG auf die Zellmotilität vermutet.^{43, 44} Die Klasse II Histondeacetylase HDAC6 acetyliert Tubulin in Endothelzellen, wodurch es zu einer Destabilisierung der Mikrotubuli kommt.⁴³ ERG reguliert die Expression von HDAC6 und kommt es zu einer vermehrten Expression steigert es so die Deacetylierung von Tubulin, worauf dieses seine Stabilität verliert und die Bildung von Lamellipodien und die Zellmigration erleichtert werden.⁴³ Es wurde dabei auch gezeigt, dass HDAC6 die Angiogenese unterstützt und Einfluss auf die Dynamik des Aktinstoffwechsels hat, dem zweiten Element des Zytoskeletts.⁴³ So kann vermutet werden, dass durch die Steigerung der Mikrotubulidynamik ERG und β III-Tubulin gemeinsam die Zellmotilität beeinflussen.

Ein weiteres Ziel dieser Studie war die Untersuchung der Frage, ob eine Verbindung zwischen der Expression von β III-Tubulin und anderen wichtigen Deletionen besteht, die bekanntermaßen mit einem ERG-Fusionsstatus assoziiert sind. Bestimmte chromosomale Aberrationen sind eng verknüpft mit entweder positivem oder negativem ERG-Status. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Deletionen an den Stellen 3p13 (FOXP1) und 10q23 (PTEN) mit ERG-positiven Tumoren assoziiert sind, während Deletionen an den Stellen 5q21 (CHD1) und 6q15 (MAP3K7) mit ERG-negativen Karzinomen assoziiert sind.^{26, 27, 31-33} In früheren Analysen identifizierten wir Biomarker, die mit einigen dieser genomischen Subgruppen signifikant verbunden

waren. Zum Beispiel ist eine Überexpression von CRISP3 stark assoziiert mit ERG-positiven Prostatakarzinomen, die eine PTEN-Deletion aufweisen.⁴⁵

In unseren Untersuchungen fanden wir weiter einen starken Zusammenhang zwischen der Expression von β III-Tubulin und dem Vorhandensein von PTEN-Deletionen. Diese Verbindung war unabhängig von der bekannten Assoziation zwischen PTEN-Deletion und ERG-Fusion. Dies legt die Vermutung nahe, dass auch der Verlust des Tumorsuppressorgens PTEN einen Selektionsvorteil für Tumorzellen mit hohem β III-Tubulinspiegel darstellen könnte. Eine funktionelle Verbindung zwischen der Deletion von PTEN und der Mikrotubuliarchitektur in Epithelzellen der Mamma wurde tatsächlich gezeigt. Vitolo et al.⁴⁶ berichteten, dass eine Inaktivierung von PTEN zu einer Induktion von langen und dynamischen Tubulin-basierten Mikrotentakel führt. Diese helfen bei der Freisetzung der Zelle vom Extrazellulärraum, aber erleichtern ebenso ein Wiederanheften. Solche zytoskelettalen Veränderungen, so vermuteten die Autoren, könnten Einfluss auf die Tumorbilogie, und speziell auf die Metastasenbildung, haben. Dennoch bleibt es spekulativ, ob β III-Tubulin Teil dieser Mechanismen sein könnte, da die Klärung dieser Frage kein Ziel der Studie war. Auf der anderen Seite könnte eine hohe β III-Tubulin-Expression in Prostatakarzinomzellen mit PTEN-Verlust mit einer Entdifferenzierung des Tumors verbunden sein. So konnte beispielsweise in einer Studie gezeigt werden, dass der Verlust von PTEN in Mäusen eine schnelle Entdifferenzierung induziert und in einer Herunterregulierung prostataspezifischer Gene resultiert, wie u.a. MSMB, TGM4 und SBP.⁴⁷ Es scheint daher vorstellbar, dass eine abweichende Expression von β III-Tubulin das transkriptionelle Umprogrammieren in Krebszellen mit PTEN-Deletion widerspiegeln könnte, verbunden mit einer Tumorentdifferenzierung.

Unsere Daten zeigen die starke prognostische Relevanz von β III-Tubulin im Prostatakarzinom. Dies ergibt die Möglichkeit, dass β III-Tubulin ein Biomarker mit klinischem Nutzen sein könnte. Diese Idee wird vor allem auch durch Multivariate Analysen weiter gestützt.

Mehrere Sachverhalte müssen für das Verständnis der durch die Multivariaten Analysen erhaltenen Daten bedacht werden. Erstens ist es offensichtlich, dass eine Multivariate Analyse, die alle vorhandenen starken prognostischen Parameter enthält, welche nach einer Operation vorhanden sind (darunter pT, pN, Resektionsrand oder der validierte Gleason Grad), es jedem Biomarker schwermacht als unabhängiger

Prognoseparameter etabliert zu werden. Der Einschluss der pN-Kategorie ist außerdem ein besonderer Aspekt, da sie die Anzahl in die Studie eingeschlossener Fälle substantiell verringern kann. Der Grund dafür ist, dass eine Lymphknotenresektion gerade bei lowgrade Tumoren nicht routinemäßig bei der Operation des Prostatakarzinoms durchgeführt wird. Zweitens: Postoperative Analysen nutzen viele Parameter, die in dem Moment, in dem die Entscheidung zur Therapie des Patienten fällt, nicht vorhanden sind. Konkurrierende Parameter für einen klinisch nützlichen und prognostischen Biomarker sind also eher Parameter, die vor einer Operation verfügbar sind. Dazu gehören der (unvalidierte) Gleason Grad, gewonnen aus einer Nadelbiopsie, der präoperative PSA-Wert und die klinische T-Kategorie. Im Grunde sollten mögliche prognostische Biomarker daher eigentlich an präoperativen Nadelbiopsien getestet werden. In der Praxis sind solche Analysen schwer zu realisieren, auch weil die wertvolle Nadelbiopsie nach nur wenigen Studien aufgebraucht wäre. In diesem Projekt wendeten wir verschiedene Modelle für die Multivariate Analyse an, um solche vorgegebenen Einschränkungen so gut wie möglich zu kompensieren. Die unabhängige Assoziation der Färbung hoher β III-Tubulin-Level mit dem frühen PSA-Rezidiv in Prostatakarzinomen wurde in allen untersuchten Szenarien gefunden, darunter auch einige Kombinationen von prä- und postoperativ verfügbaren Parametern. Dies spricht stark dafür, dass β III-Tubulin ein Biomarker mit klinischer Relevanz für das Prostatakarzinom darstellt.

Zusammenfassend stellte unsere Studie eine starke Verbindung zwischen hoher β III-Tubulin-Expression und frühem PSA-Rezidiv im Prostatakarzinom fest. Dies war unabhängig von Grad und Stadium des Tumors, Status des Resektionsrandes, Lymphknotenbeteiligung und präoperativem PSA-Wert. Eine noch stärkere unabhängige prognostische Bedeutung erlangte die Expression von β III-Tubulin in Szenarien, die nur präoperativ vorhandene Parameter nutzten. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Analyse der β III-Tubulin-Expression (entweder allein oder in Kombination mit anderen molekularen Parametern) in Zukunft zu klinisch nützlichen Informationen über das Prostatakarzinom führen könnte.

2.5 Zusammenfassung

Es gibt Anhaltspunkte dafür, dass β III-Tubulin (III β -Tubulin) ein prognostischer und prädiktiver molekularer Marker für das Prostatakarzinom sein könnte. Die β III-Tubulin-Expression wurde daher bei 8179 Prostatakarzinomproben im TMA-Format durch Immunhistochemie bestimmt. Die Ergebnisse wurden mit Daten zu Tumorphänotyp, biochemischem Rezidiv, ERG-Status und genomischen Deletionen von PTEN, 3p13, 5q21 und 6q15 verglichen. Eine β III-Tubulin-Expression war in 25,6% der 8179 Proben nachweisbar. Eine hohe β III-Tubulin-Expression war stark assoziiert sowohl mit TMPRSS2:ERG-Rearrangement als auch mit ERG-Expression ($p < 0,0001$ jeweils). Eine hohe β III-Tubulin-Expression war stark verknüpft mit einem hohen Gleason Grad, fortgeschrittenem pT-Stadium und frühem PSA-Rezidiv in allen Karzinomen ($p < 0,0001$ jeweils), sowie auch in den Untergruppen der ERG-negativen und ERG-positiven Karzinome. Nach der Analyse aller Tumore war die prognostische Rolle der β III-Tubulin-Expression unabhängig von Gleason Grad, pT-Stadium, pN-Stadium, Status des Resektionsrandes und präoperativem PSA-Wert. Der unabhängige prognostische Wert kam umso mehr zum Tragen, als die Analyse auf die präoperativ verfügbaren Werte wie Gleason Grad der Gewebebiopsie, präoperativen PSA-Wert, cT-Stadium und β III-Tubulin-Expression begrenzt wurde ($p < 0,0001$ jeweils). Die Expression von β III-Tubulin war mit PTEN assoziiert ($p < 0,0001$), sowohl bei der Analyse aller Tumoren, als auch in den Untergruppen der ERG-negativen und ERG-positiven Karzinome. Die β III-Tubulin-Expression ist ein unabhängiger prognostischer Parameter. Die signifikanten Assoziationen mit molekularen Schlüssel-Veränderungen im Prostatakarzinom, wie TMPRSS2:ERG-Fusion und PTEN-Deletion, lassen eine Interaktion mit mehreren entscheidenden Prozessen vermuten, die im Prostatakarzinom ablaufen.

2.6 Literaturverzeichnis

- 1 A. Jemal, F. Bray, M. M. Center, J. Ferlay, E. Ward, and D. Forman, 'Global Cancer Statistics', *CA Cancer J Clin*, 61 (2011), 69-90.
- 2 D. M. Parkin, F. Bray, J. Ferlay, and P. Pisani, 'Global Cancer Statistics, 2002', *CA Cancer J Clin*, 55 (2005), 74-108.
- 3 A. Amaro, A. I. Esposito, A. Gallina, M. Nees, G. Angelini, A. Albini, and U. Pfeffer, 'Validation of Proposed Prostate Cancer Biomarkers with Gene Expression Data: A Long Road to Travel', *Cancer Metastasis Rev* (2014).
- 4 C. M. Barnett, M. C. Heinrich, J. Lim, D. Nelson, C. Beadling, A. Warrick, T. L. Neff, C. Higano, M. Garzotto, D. Qian, C. L. Corless, G. V. Thomas, and T. M. Beer, 'Genetic Profiling to Determine Risk of Relapse Free Survival in High-Risk Localized Prostate Cancer', *Clin Cancer Res* (2013).
- 5 B. Lin, C. Ferguson, J. T. White, S. Wang, R. Vessella, L. D. True, L. Hood, and P. S. Nelson, 'Prostate-Localized and Androgen-Regulated Expression of the Membrane-Bound Serine Protease Tmprss2', *Cancer Res*, 59 (1999), 4180-4.
- 6 S. A. Tomlins, D. R. Rhodes, S. Perner, S. M. Dhanasekaran, R. Mehra, X. W. Sun, S. Varambally, X. Cao, J. Tchinda, R. Kuefer, C. Lee, J. E. Montie, R. B. Shah, K. J. Pienta, M. A. Rubin, and A. M. Chinnaiyan, 'Recurrent Fusion of Tmprss2 and Ets Transcription Factor Genes in Prostate Cancer', *Science*, 310 (2005), 644-8.
- 7 S. A. Tomlins, B. Laxman, S. M. Dhanasekaran, B. E. Helgeson, X. Cao, D. S. Morris, A. Menon, X. Jing, Q. Cao, B. Han, J. Yu, L. Wang, J. E. Montie, M. A. Rubin, K. J. Pienta, D. Roulston, R. B. Shah, S. Varambally, R. Mehra, and A. M. Chinnaiyan, 'Distinct Classes of Chromosomal Rearrangements Create Oncogenic Ets Gene Fusions in Prostate Cancer', *Nature*, 448 (2007), 595-9.
- 8 G. A. Orr, P. Verdier-Pinard, H. McDaid, and S. B. Horwitz, 'Mechanisms of Taxol Resistance Related to Microtubules', *Oncogene*, 22 (2003), 7280-95.
- 9 C. D. Katsetos, E. Draberova, A. Legido, C. Dumontet, and P. Draber, 'Tubulin Targets in the Pathobiology and Therapy of Glioblastoma Multiforme. I. Class Iii Beta-Tubulin', *J Cell Physiol*, 221 (2009), 505-13.
- 10 C. D. Katsetos, M. M. Herman, and S. J. Mork, 'Class Iii Beta-Tubulin in Human Development and Cancer', *Cell Motil Cytoskeleton*, 55 (2003), 77-96.
- 11 Y. Koh, B. Jang, S. W. Han, T. M. Kim, D. Y. Oh, S. H. Lee, C. H. Kang, D. W. Kim, S. A. Im, D. H. Chung, Y. T. Kim, T. Y. Kim, Y. W. Kim, J. H. Kim, D. S. Heo, and Y. J. Bang, 'Expression of Class Iii Beta-Tubulin Correlates with Unfavorable Survival Outcome in Patients with Resected Non-Small Cell Lung Cancer', *J Thorac Oncol*, 5 (2010), 320-5.
- 12 T. E. Hetland, E. Hellesylt, V. A. Florenes, C. Trope, B. Davidson, and J. Kaern, 'Class Iii Beta-Tubulin Expression in Advanced-Stage Serous Ovarian Carcinoma Effusions Is Associated with Poor Survival and Primary Chemoresistance', *Hum Pathol*, 42 (2011), 1019-26.
- 13 G. Ferrandina, G. F. Zannoni, E. Martinelli, A. Paglia, V. Gallotta, S. Mozzetti, G. Scambia, and C. Ferlini, 'Class Iii Beta-Tubulin Overexpression Is a Marker of Poor Clinical Outcome in Advanced Ovarian Cancer Patients', *Clin Cancer Res*, 12 (2006), 2774-9.
- 14 J. W. Choi, Y. Kim, J. H. Lee, and Y. S. Kim, 'Expression of Beta-Tubulin Isotypes in Urothelial Carcinoma of the Bladder', *World J Urol* (2012).

- 15 Y. Koh, T. M. Kim, Y. K. Jeon, T. K. Kwon, J. H. Hah, S. H. Lee, D. W. Kim, H. G. Wu, C. S. Rhee, M. W. Sung, C. W. Kim, K. H. Kim, and D. S. Heo, 'Class Iii Beta-Tubulin, but Not Ercc1, Is a Strong Predictive and Prognostic Marker in Locally Advanced Head and Neck Squamous Cell Carcinoma', *Ann Oncol*, 20 (2009), 1414-9.
- 16 H. L. Zhang, L. Ruan, L. M. Zheng, D. Whyte, C. M. Tzeng, and X. W. Zhou, 'Association between Class Iii Beta-Tubulin Expression and Response to Paclitaxel/Vinorelbine-Based Chemotherapy for Non-Small Cell Lung Cancer: A Meta-Analysis', *Lung Cancer*, 77 (2012), 9-15.
- 17 X. Chen, J. Wu, H. Lu, O. Huang, and K. Shen, 'Measuring Beta-Tubulin Iii, Bcl-2, and Ercc1 Improves Pathological Complete Remission Predictive Accuracy in Breast Cancer', *Cancer Sci*, 103 (2012), 262-8.
- 18 W. E. Zheng, H. Chen, S. F. Yuan, L. L. Wu, W. Zhang, H. Y. Sun, and W. J. Chen, 'Overexpression of Betaiii-Tubulin and Survivin Associated with Drug Resistance to Docetaxel-Based Chemotherapy in Advanced Gastric Cancer', *J BUON*, 17 (2012), 284-90.
- 19 G. Ploussard, S. Terry, P. Maille, Y. Allory, N. Sirab, L. Kheuang, P. Soyeux, N. Nicolaiew, E. Coppolani, B. Paule, L. Salomon, S. Culine, R. Buttyan, F. Vacherot, and A. de la Taille, 'Class Iii Beta-Tubulin Expression Predicts Prostate Tumor Aggressiveness and Patient Response to Docetaxel-Based Chemotherapy', *Cancer Res*, 70 (2010), 9253-64.
- 20 L. Egevad, A. Valdman, N. P. Wiklund, P. Seve, and C. Dumontet, 'Beta-Tubulin Iii Expression in Prostate Cancer', *Scand J Urol Nephrol*, 44 (2010), 371-7.
- 21 K. Grupp, F. Diebel, H. Sirma, R. Simon, K. Breitmeyer, S. Steurer, C. Hube-Magg, K. Prien, T. Pham, P. Weigand, U. Michl, H. Heinzer, M. Kluth, S. Minner, M. C. Tsourlakis, J. R. Izbicki, G. Sauter, T. Schlomm, and W. Wilczak, 'Spink1 Expression Is Tightly Linked to 6q15- and 5q21-Deleted Erg-Fusion Negative Prostate Cancers but Unrelated to Psa Recurrence', *Prostate*, 73 (2013), 1690-8.
- 22 T. Schlomm, L. Iwers, P. Kirstein, B. Jessen, J. Kollermann, S. Minner, A. Passow-Drolet, M. Mirlacher, K. Milde-Langosch, M. Graefen, A. Haese, T. Steuber, R. Simon, H. Huland, G. Sauter, and A. Erbersdobler, 'Clinical Significance of P53 Alterations in Surgically Treated Prostate Cancers', *Mod Pathol*, 21 (2008), 1371-8.
- 23 J. Kononen, L. Bubendorf, A. Kallioniemi, M. Barlund, P. Schraml, S. Leighton, J. Torhorst, M. J. Mihatsch, G. Sauter, and O. P. Kallioniemi, 'Tissue Microarrays for High-Throughput Molecular Profiling of Tumor Specimens', *Nat Med*, 4 (1998), 844-7.
- 24 S. Minner, M. Enodien, H. Sirma, A. M. Luebke, A. Krohn, P. S. Mayer, R. Simon, P. Tennstedt, J. Muller, L. Scholz, J. C. Brase, A. Y. Liu, H. Schluter, K. Pantel, U. Schumacher, C. Bokemeyer, T. Steuber, M. Graefen, G. Sauter, and T. Schlomm, 'Erg Status Is Unrelated to Psa Recurrence in Radically Operated Prostate Cancer in the Absence of Antihormonal Therapy', *Clin Cancer Res*, 17 (2011), 5878-88.
- 25 L. Burkhardt, S. Fuchs, A. Krohn, S. Masser, M. Mader, M. Kluth, F. Bachmann, H. Huland, T. Steuber, M. Graefen, T. Schlomm, S. Minner, G. Sauter, H. Sirma, and R. Simon, 'Chd1 Is a 5q21 Tumor Suppressor Required for Erg Rearrangement in Prostate Cancer', *Cancer Res*, 73 (2013), 2795-805.
- 26 M. Kluth, J. Hesse, A. Heini, A. Krohn, S. Steurer, H. Sirma, R. Simon, P. S. Mayer, U. Schumacher, K. Grupp, J. R. Izbicki, K. Pantel, E. Dikomey, J. O.

- Korbel, C. Plass, G. Sauter, T. Schlomm, and S. Minner, 'Genomic Deletion of Map3k7 at 6q12-22 Is Associated with Early Psa Recurrence in Prostate Cancer and Absence of Tmprss2:Erg Fusions', *Mod Pathol*, 26 (2013), 975-83.
- 27 A. Krohn, T. Diedler, L. Burkhardt, P. S. Mayer, C. De Silva, M. Meyer-Kornblum, D. Kotschau, P. Tennstedt, J. Huang, C. Gerhauser, M. Mader, S. Kurtz, H. Sirma, F. Saad, T. Steuber, M. Graefen, C. Plass, G. Sauter, R. Simon, S. Minner, and T. Schlomm, 'Genomic Deletion of Pten Is Associated with Tumor Progression and Early Psa Recurrence in Erg Fusion-Positive and Fusion-Negative Prostate Cancer', *Am J Pathol*, 181 (2012), 401-12.
- 28 A. Krohn, A. Seidel, L. Burkhardt, F. Bachmann, M. Mader, K. Grupp, T. Eichenauer, A. Becker, M. Adam, M. Graefen, H. Huland, S. Kurtz, S. Steurer, M. C. Tsourlakis, S. Minner, U. Michl, T. Schlomm, G. Sauter, R. Simon, and H. Sirma, 'Recurrent Deletion of 3p13 Targets Multiple Tumour Suppressor Genes and Defines a Distinct Subgroup of Aggressive Erg Fusion-Positive Prostate Cancers', *J Pathol*, 231 (2013), 130-41.
- 29 S. Minner, C. Wittmer, M. Graefen, G. Salomon, T. Steuber, A. Haese, H. Huland, C. Bokemeyer, E. Yekebas, J. Dierlamm, S. Balabanov, E. Kilic, W. Wilczak, R. Simon, G. Sauter, and T. Schlomm, 'High Level PsmA Expression Is Associated with Early Psa Recurrence in Surgically Treated Prostate Cancer', *Prostate*, 71 (2011), 281-8.
- 30 M. C. Tsourlakis, E. Walter, A. Quaas, M. Graefen, H. Huland, R. Simon, G. Sauter, S. Steurer, T. Schlomm, and S. Minner, 'High Nr-Cam Expression Is Associated with Favorable Phenotype and Late Psa Recurrence in Prostate Cancer Treated by Prostatectomy', *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 16 (2013), 159-64.
- 31 M. F. Berger, M. S. Lawrence, F. Demichelis, Y. Drier, K. Cibulskis, A. Y. Sivachenko, A. Sboner, R. Esgueva, D. Pflueger, C. Sougnez, R. Onofrio, S. L. Carter, K. Park, L. Habegger, L. Ambrogio, T. Fennell, M. Parkin, G. Saksena, D. Voet, A. H. Ramos, T. J. Pugh, J. Wilkinson, S. Fisher, W. Winckler, S. Mahan, K. Ardlie, J. Baldwin, J. W. Simons, N. Kitabayashi, T. Y. MacDonald, P. W. Kantoff, L. Chin, S. B. Gabriel, M. B. Gerstein, T. R. Golub, M. Meyerson, A. Tewari, E. S. Lander, G. Getz, M. A. Rubin, and L. A. Garraway, 'The Genomic Complexity of Primary Human Prostate Cancer', *Nature*, 470 (2011), 214-20.
- 32 J. Lapointe, C. Li, C. P. Giacomini, K. Salari, S. Huang, P. Wang, M. Ferrari, T. Hernandez-Boussard, J. D. Brooks, and J. R. Pollack, 'Genomic Profiling Reveals Alternative Genetic Pathways of Prostate Tumorigenesis', *Cancer Res*, 67 (2007), 8504-10.
- 33 B. S. Taylor, N. Schultz, H. Hieronymus, A. Gopalan, Y. Xiao, B. S. Carver, V. K. Arora, P. Kaushik, E. Cerami, B. Reva, Y. Antipin, N. Mitsiades, T. Landers, I. Dolgalev, J. E. Major, M. Wilson, N. D. Socci, A. E. Lash, A. Heguy, J. A. Eastham, H. I. Scher, V. E. Reuter, P. T. Scardino, C. Sander, C. L. Sawyers, and W. L. Gerald, 'Integrative Genomic Profiling of Human Prostate Cancer', *Cancer Cell*, 18 (2010), 11-22.
- 34 J. I. Epstein, Z. Feng, B. J. Trock, and P. M. Pierorazio, 'Upgrading and Downgrading of Prostate Cancer from Biopsy to Radical Prostatectomy: Incidence and Predictive Factors Using the Modified Gleason Grading System and Factoring in Tertiary Grades', *Eur Urol*, 61 (2012), 1019-24.
- 35 P. Tennstedt, P. Koster, A. Bruchmann, M. Mirlacher, A. Haese, T. Steuber, G. Sauter, H. Huland, M. Graefen, T. Schlomm, S. Minner, and R. Simon, 'The

- Impact of the Number of Cores on Tissue Microarray Studies Investigating Prostate Cancer Biomarkers', *Int J Oncol*, 40 (2012), 261-8.
- 36 S. Minner, B. Jessen, L. Stiedenroth, E. Burandt, J. Kollermann, M. Mirlacher, A. Erbersdobler, C. Eichelberg, M. Fisch, T. H. Brummendorf, C. Bokemeyer, R. Simon, T. Steuber, M. Graefen, H. Huland, G. Sauter, and T. Schlomm, 'Low Level Her2 Overexpression Is Associated with Rapid Tumor Cell Proliferation and Poor Prognosis in Prostate Cancer', *Clin Cancer Res*, 16 (2010), 1553-60.
- 37 S. Minner, F. Kraetzig, M. Tachezy, E. Kilic, M. Graefen, W. Wilczak, C. Bokemeyer, H. Huland, G. Sauter, and T. Schlomm, 'Low Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule Expression Is Associated with Advanced Tumor Stage and Early Prostate-Specific Antigen Relapse in Prostate Cancer', *Hum Pathol*, 42 (2011), 1946-52.
- 38 J. Muller, A. Ehlers, L. Burkhardt, H. Sirma, T. Steuber, M. Graefen, G. Sauter, S. Minner, R. Simon, T. Schlomm, and U. Michl, 'Loss of Pser2448-Mtor Expression Is Linked to Adverse Prognosis and Tumor Progression in Erg-Fusion-Positive Cancers', *Int J Cancer*, 132 (2013), 1333-40.
- 39 S. Ranganathan, C. A. Benetatos, P. J. Colarusso, D. W. Dexter, and G. R. Hudes, 'Altered Beta-Tubulin Isozyme Expression in Paclitaxel-Resistant Human Prostate Carcinoma Cells', *Br J Cancer*, 77 (1998), 562-6.
- 40 S. Ranganathan, D. W. Dexter, C. A. Benetatos, and G. R. Hudes, 'Cloning and Sequencing of Human Betaiii-Tubulin Cdna: Induction of Betaiii Isozyme in Human Prostate Carcinoma Cells by Acute Exposure to Antimicrotubule Agents', *Biochim Biophys Acta*, 1395 (1998), 237-45.
- 41 A. Ganguly, H. Yang, and F. Cabral, 'Class Iii Beta-Tubulin Counteracts the Ability of Paclitaxel to Inhibit Cell Migration', *Oncotarget*, 2 (2011), 368-77.
- 42 J. Weischenfeldt, R. Simon, L. Feuerbach, K. Schlangen, D. Weichenhan, S. Minner, D. Wuttig, H. J. Warnatz, H. Stehr, T. Rausch, N. Jager, L. Gu, O. Bogatyrova, A. M. Stutz, R. Claus, J. Eils, R. Eils, C. Gerhauser, P. H. Huang, B. Hutter, R. Kabbe, C. Lawrenz, S. Radomski, C. C. Bartholomae, M. Falth, S. Gade, M. Schmidt, N. Amschler, T. Hass, R. Galal, J. Gjoni, R. Kuner, C. Baer, S. Masser, C. von Kalle, T. Zichner, V. Benes, B. Raeder, M. Mader, V. Amstislavskiy, M. Avci, H. Lehrach, D. Parkhomchuk, M. Sultan, L. Burkhardt, M. Graefen, H. Huland, M. Kluth, A. Krohn, H. Sirma, L. Stumm, S. Steurer, K. Grupp, H. Sultmann, G. Sauter, C. Plass, B. Brors, M. L. Yaspo, J. O. Korbel, and T. Schlomm, 'Integrative Genomic Analyses Reveal an Androgen-Driven Somatic Alteration Landscape in Early-Onset Prostate Cancer', *Cancer Cell*, 23 (2013), 159-70.
- 43 G. M. Birdsey, N. H. Dryden, A. V. Shah, R. Hannah, M. D. Hall, D. O. Haskard, M. Parsons, J. C. Mason, M. Zvelebil, B. Gottgens, A. J. Ridley, and A. M. Randi, 'The Transcription Factor Erg Regulates Expression of Histone Deacetylase 6 and Multiple Pathways Involved in Endothelial Cell Migration and Angiogenesis', *Blood*, 119 (2012), 894-903.
- 44 A. Chow, Y. Amemiya, L. Sugar, R. Nam, and A. Seth, 'Whole-Transcriptome Analysis Reveals Established and Novel Associations with Tmprss2:Erg Fusion in Prostate Cancer', *Anticancer Res*, 32 (2012), 3629-41.
- 45 K. Grupp, S. Kohl, H. Sirma, R. Simon, S. Steurer, A. Becker, M. Adam, J. Izbicki, G. Sauter, S. Minner, T. Schlomm, and M. C. Tsourlakis, 'Cysteine-Rich Secretory Protein 3 Overexpression Is Linked to a Subset of Pten-Deleted Erg Fusion-Positive Prostate Cancers with Early Biochemical Recurrence', *Mod Pathol*, 26 (2013), 733-42.

- 46 M. I. Vitolo, A. E. Boggs, R. A. Whipple, J. R. Yoon, K. Thompson, M. A. Matrone, E. H. Cho, E. M. Balzer, and S. S. Martin, 'Loss of Pten Induces Microtentacles through Pi3k-Independent Activation of Cofilin', *Oncogene*, 32 (2013), 2200-10.
- 47 J. L. Thielen, K. G. Volzing, L. S. Collier, L. E. Green, D. A. Largaespada, and P. C. Marker, 'Markers of Prostate Region-Specific Epithelial Identity Define Anatomical Locations in the Mouse Prostate That Are Molecularly Similar to Human Prostate Cancers', *Differentiation*, 75 (2007), 49-61.

3 Erklärung des Eigenanteils

- Während meiner Doktorarbeit habe ich 3 Prostata-Karzinom Gewebemikroarrays (TMAs) hergestellt und somit die Gesamtzahl der Tumoren des Prostata-Prognose TMAs um 1.275 Tumorgewebebeurteilungen erhöht. Dazu habe ich eine sogenannte Stanzliste als Koordinatensystem für 3 TMAs erstellt, jeweils eine 0,6 mm messende Gewebestücke aus den 1.275 Gewebestücken entnommen und auf drei TMA-Blöcke verteilt.
- Parallel zu dieser Arbeit habe ich β III-Tubulin als Kandidaten-Prognosemarker ausgesucht und zusammen mit Frau Dr. Tsourlakis die Immunfärbung gegen β III-Tubulin am TMA ausgewertet, die Ergebnisse in die bestehende Datenbank zu dem TMA übertragen und statistisch ausgewertet. Hierbei wurde ich von Herrn PD Dr. Simon und Frau Dr. Grupp methodisch unterstützt.
- Die erste Version des Manuskriptes der vorliegenden Publikation habe ich eigenständig verfasst. Dazu habe ich eine PubMed-Literaturrecherche durchgeführt, um Daten zur Funktion, Expressionshäufigkeit und prognostischen Relevanz von β III-Tubulin beim Prostatakarzinom und anderen soliden Tumoren zusammenzutragen. Danach habe ich das Manuskript zusammen mit den Co-Autoren revidiert.

Anteil der Co-Autoren

- Frau Dr. Tsourlakis hat die Färbintensität der immunohistochemischen Analyse beurteilt.
- Frau Dr. Grupp und Herr PD Dr. Simon haben die statistische Auswertung betreut.
- Frau Dr. Kluth hat die Kopiezahlanalysen von PTEN, 5q, 6q und 3p beigebracht.
- Herr Dr. Steurer und Frau PD Dr. Sarah Minner haben die Tumoren für den TMA ausgewählt.
- Herr Prof. Schlomm, Herr Dr. Graefen, Herr Dr. Salomon, Herr Prof. Steuber und Herr Prof. Huland haben die klinischen Daten der Patienten, deren Gewebeproben in den TMA eingingen, erhoben.

- Herr Prof. Quaas, Herr Prof. Sauter, Frau PD Dr. Sarah Minner, Herr PD Dr. Sirma und Herr PD Dr. Simon haben das Manuskript überarbeitet.
- Herr Prof. Quaas hat die Studie koordiniert und zusammen mit mir die endgültige Fassung des Manuskriptes erstellt.

4 Danksagung

Zunächst danke ich Prof. Dr. med. G. Sauter für die gute Betreuung und Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt Dr. med. Maria Christina Tsourlakis für die tolle Zusammenarbeit und die Unterstützung über die lange Zeit.

Auch möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Institutes für Pathologie sowie all jenen bedanken, die mich durch Ratschläge und Diskussionen sowie durch ihre Motivation im Gelingen dieser Arbeit unterstützt haben.

5 Lebenslauf

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

6 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.

Unterschrift:

Philipp Weigand