

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Pathologie: Molekularpathologie

Direktor: Professor Dr. med. Guido Sauter

**Prognostische Relevanz der Anzahl chromosomaler
Deletionen beim Prostatakarzinom**

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Philipp Barow aus Hamburg

Hamburg 2016

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 08.02.2017**

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

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. med. Guido Sauter

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. med. Christian Kubisch

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abbildungsverzeichnis	5
Tabellenverzeichnis	6
Abkürzungsverzeichnis	7
1 Einleitung	10
1.1 Genetische Veränderungen des Prostatakarzinoms	11
1.2 Prognoseparameter des Prostatakarzinoms	12
1.2.1 Genombasierte und molekulare Classifier beim Prostatakarzinom	13
1.3 Zielsetzung der Arbeit.....	14
2 Material und Methoden	15
2.1 Prostata-Prognose-Array (Gewebe-mikroarray / TMA)	15
2.2 Escherichia Coli Plasmide	16
2.3 Reagenzien und Kits	17
2.4 Geräte	18
2.5 Verbrauchsmaterialien.....	18
2.6 Software und Datenbanken	19
2.7 Plasmid-Isolierung aus DH10B E. Coli	19
2.8 Bestimmung der DNA-Konzentration.....	19
2.9 Nick Translation.....	20
2.10 Fluoreszenz-in-situ Hybridisierung (FISH)	20
2.11 Mikroskopische Auswertung	21
2.12 Bildung des Deletions-Scores.....	22
2.13 Statistische Auswertung	23
3 Ergebnisse	24
3.1 Auswertbarkeit des TMA mittels FISH	24
3.2 Deletionsrate der 7 untersuchten chromosomalen Regionen.....	25
3.3 Prognostische Relevanz der 7 untersuchten Deletionsregionen beim Prostatakarzinom	25
3.4 Deletions-Score und Assoziation zu den klinisch-pathologischen Parametern	27
3.5 Prognostische Relevanz des Deletions-Scores beim Prostatakarzinom	28
4 Diskussion	32

Zusammenfassung	37
Abstract	38
Literaturverzeichnis.....	39
Danksagung	43
Lebenslauf.....	44
Eidesstattliche Versicherung.....	45

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Lichtbilder der mikroskopischen Auswertung	22
Abbildung 2: Prognostische Relevanz der Deletionen	26
Abbildung 3: Prognostische Relevanz der Deletionsanzahl (Deletions-Score).....	29

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Die 10 häufigsten Deletionsregionen beim Prostatakarzinom	12
Tabelle 2: Zusammensetzung des Prostata-Prognose-Array (TMA)	15
Tabelle 3: Verwendete E.Coli Klone	16
Tabelle 4: Verwendete Arbeitsmaterialien und Herkunft	17
Tabelle 5: Verwendete Geräte mit Herkunft	18
Tabelle 6: Verwendete Materialien mit Herkunft	18
Tabelle 7: mikroskopische Diagnosekriterien.....	21
Tabelle 8: Auswertbarkeit der FISH-Analysen	24
Tabelle 9: Deletionsraten der 7 untersuchten chromosomalen Regionen	25
Tabelle 10: Deletions-Score und Assoziation zu den klinisch-pathologischen Parametern	27
Tabelle 11: Cox-proportionale Hazard Analyse zur Bestimmung der prognostischen Aussagekraft der Deletionsanzahl im Vergleich zu den etablierten Prognoseparametern, inklusive des quantitativen Gleason Scores in allen Prostatatumoren	30
Tabelle 12: Cox-proportionale Hazard Analyse zur Bestimmung der prognostischen Aussagekraft der Deletionsanzahl im Vergleich zu den etablierten Prognoseparametern bei Verwendung des herkömmlichen Gleason Scores in allen Prostatatumoren.....	31

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
<	kleiner
=	gleich
>	größer
≥	größer-gleich
≤	kleiner-gleich
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
aCGH	array comparative genomic hybridization (Array-basierte komparative genomische Hybridisierung)
AJCC	American Joint Committee on Cancer, Chicago/USA
bzw.	beziehungsweise
BAC	bacterial artificial chromosome (künstliches bakterielles Chromosom)
CDKN1B	cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)
CEP	Chromosome Enumeration Probes
CGH	comparative genomic hybridization (komparative genomische Hybridisierung)
CHD1	chromodomain helicase DNA binding protein 1
COT	DNA conc. (mol/L) * renaturation time (s) * buffer factor
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dH2O	destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DRU	digitale rektale Untersuchung
dUTP	2'-Desoxyuridin-5'-triphosphat
E. Coli	Escherichia Coli
ERG	v-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog

et al.	et alii/aliae (und andere)
FBXO31	F-box protein 31
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FOXP1	Forkhead box P1
g	Gramm
G	Gravitationskonstante
KI	Konfidenzintervall
LB-Medium	Lysogeny broth-Medium
MAP3K7	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7
M	Metastase
mg	Milligramm
min	minutes (Minuten)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mo	month (Monate)
mRNA	messenger ribonucleic acid (Boten-Ribonukleinsäure)
n	Anzahl
N	Lymphknoten
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
NP-40	Polyethylenglycol (40) – nonylphenoether
p	pathologisch
P	probability (Wahrscheinlichkeit)
PCMT	Prostate Core Mitomic Test
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
pH	potentia hydrogenii (pH-Wert)
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
RNase	Ribonuklease

rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RR	risk ratio (Risikoverhältnis)
RYBP	RING1 and YY1 binding Protein
SHQ1	SHQ1, H/ACA ribonucleoprotein assembly factor
SSC	Saline-Sodium Citrate
T	Tumor
TMA	tissue micro array (Gewebemikroarray)
TMPRSS2	transmembrane protease, serine 2
TP53	tumor protein p53
UV	ultraviolet
Vis	visible (sichtbar)
vs.	versus

1 Einleitung

Das Prostatakarzinom ist mit 758.700 Neuerkrankungen die häufigste Tumorerkrankung und mit 307.500 Todesfällen pro Jahr (2012) eine der häufigsten Tumorbedingten Todesursachen des Mannes in westlichen Industrienationen ¹. Zusätzlich dazu steigt die jährliche Rate der Neuerkrankungen stetig an ^{1, 2}. Grund dafür ist die Verbesserung der Frühdiagnostik und die steigende Lebenserwartung. Das Prostatakarzinom tritt vor allem ab einem Lebensalter von 50 Jahren auf. Circa zwei Drittel aller Prostatakarzinome werden ab einem Alter von 65 Jahren diagnostiziert ^{3, 4}. Basierend darauf wird Männern ab dem 45. Lebensjahr empfohlen, zur Frühdiagnostik einmal jährlich eine digital-rektale Tastuntersuchung (DRU) und die Messung des Prostata-spezifischen Antigens (PSA) im Blutserum durchführen zu lassen ⁵. Durch die DRU können Veränderungen in der peripheren Zone der Prostata, dem Hauptentstehungsort der Tumoren, ertastet werden ⁶. Das PSA wird von den sekretorischen Drüsenzellen der Prostata gebildet ⁷. Ein Anstieg der PSA-Konzentration auf Werte $\geq 4\text{ng/ml}$ wird als Hinweis auf ein Prostatakarzinom gewertet. Bei auffälligen DRU-Befunden und/oder einem erhöhten PSA-Wert wird eine Stanzbiopsie der Prostata vorgenommen ⁵. Zur Klassifizierung der Karzinome in der Stanzbiopsie wird dann das sogenannte Gleason-Grading durchgeführt. Dabei wird der Entdifferenzierungsgrad der Drüsenstruktur in einem Zahlenwert von 1 (weitgehend normale Drüsenstruktur vorhanden) bis 5 (keine Drüsenstruktur mehr sichtbar) bestimmt. Angegeben wird dann der primäre und sekundäre Gleason Grad des Tumorgewebes als Gleason Score (z.B. 3+4) ^{8, 9}. Anhand des Gleason Scores, dem Tumorgehalt in den Biopsiestanzen, des klinischen Tumorstadiums, dem Alter des Patienten und eventueller Ko-Morbiditäten erfolgt dann die Therapieplanung ⁵. Als kurative Therapieformen bei lokal-begrenzten Tumoren stehen die lokale Bestrahlung, die Brachytherapie und die Prostataektomie zur Verfügung. Insgesamt können diese Therapien jedoch zu Nebenwirkungen wie vor allem Inkontinenz und Impotenz führen ^{4, 5}. Da die Mehrzahl der Prostatakarzinome eher langsam wächst und daher zeitlebens nicht zu Symptomen beim Patienten führt, werden heute neben den invasiven Therapien bei vielen Patienten auch die sogenannte „Active Surveillance“ vorgeschlagen. Hierbei erfolgt eine engmaschige Beobachtung und Kontrolle der Patienten bis zu einer Tumorprogression, auf die dann eine invasive Therapie folgt ⁵. Eine sofortige invasive Therapie, wie die Ektomie, wäre also nur für hoch aggressive Karzinome notwendig, welche zu einem lebensbedrohlichen Krankheitsverlauf für den Patienten führen würden. Die eindeutige Identifizierung dieser aggressiven Karzinome ist jedoch mit den heute etablierten Prognoseparametern wie dem Gleason-Grading nicht möglich. Auf Grund des unsicheren Progressionsverlaufes der individuellen Prostatumoren entscheiden sich die Patienten daher in Deutschland in der Regel auch bei vermutlich indolenten Tumoren eher gegen das „Active Surveillance“ und für die Entnahme der Prostata. Dies führt letztendlich zu einer Übertherapie der Prostatakarzinompatienten ¹⁰. Ein primäres Ziel der Forschung ist es daher, molekulare Marker zu

identifizieren, welche den prognostischen Aussagewert der etablierten Parameter unterstützen und damit eine individuelle Diagnose und Therapie für den Patienten ermöglichen.

1.1 Genetische Veränderungen des Prostatakarzinoms

Auf genetischer Ebene unterscheidet sich das Prostatakarzinom klar von anderen soliden Tumorentitäten. Während zum Beispiel bei Karzinomen der Brust und der Lunge zahlreiche verschiedene chromosomale Alterationen, wie Amplifikationen, Punktmutationen, Deletionen und Translokationen auftreten (zusammengefasst in ^{11, 12}), ist das Prostatakarzinom vor allem charakterisiert durch zahlreiche verschiedene Deletionen ¹³⁻¹⁷. Amplifikationen, Punktmutationen und rekurrente Translokationen hingegen kommen beim Prostatakarzinom nur selten vor ¹³⁻¹⁵. Eine Ausnahme stellt hier die TMPRSS2:ERG-Fusion dar, die in circa 50% aller Karzinome vorkommt und damit die häufigste chromosomale Aberration des Prostatakarzinoms darstellt ^{13, 15, 18}. Diese Fusion beruht auf einer interstitiellen Deletion zwischen der Androgen-regulierten Serinprotease TMPRSS2 und dem Transkriptionsfaktor ERG auf Chromosom 21q22. Bedingt durch die Fusion gelangt das ERG-Gen unter die Kontrolle des TMPRSS2-Promotors und es kommt zur Androgen-abhängigen ERG-Expression in den betroffenen Tumorzellen ¹⁹. Neben der TMPRSS2:ERG-Fusion zählen Deletionen in den chromosomalen Bereichen 8p, 6q, 13q, 12p, 5q, 18q, 10q23, 17p13, 16q und 3p13 mit einer Deletionsrate von circa 10-40% zu den häufigsten Veränderungen des Prostatakarzinoms (siehe Tabelle 1) ^{15-17, 20-26}. Die Zielgene der meisten Deletionen sind nicht vollständig geklärt. Grund dafür ist, dass die Mehrzahl der Deletionen einen großen chromosomalen Bereich und damit häufig mehr als hundert Gene umfassen ¹⁵⁻¹⁷. Eine Ausnahme stellen hier die vergleichsweise kleinen Deletionen in den Regionen 10q23 (PTEN) und 3p13 (FOXP1, RYBP und SHQ1) dar ^{15-17, 25}.

Tabelle 1: Die 10 häufigsten Deletionsregionen beim Prostatakarzinom

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

Sun et al. ¹⁶: aCGH Metaanalyse an 872 Prostatakarzinomen

Williams et al. ¹⁷: CGH und aCGH Metaanalyse an 662 Prostatakarzinomen (inklusive Taylor et al.)

Taylor et al. ¹⁵: aCGH Studie an 181 Prostatakarzinomen

1.2 Prognoseparameter des Prostatakarzinoms

Das Prostatakarzinom stellt eines der wenigen soliden Karzinome dar, bei dem die Möglichkeit besteht, von einer Entfernung des Tumors und damit einer invasiven Therapie zunächst abzusehen. Grund dafür ist, dass die meisten Karzinome zeitlebens symptomlos bleiben und es nicht zu einer lebensbedrohlichen Situation für den Patienten kommt ⁴. Um zu entscheiden, ob ein Tumor entfernt werden muss, ist es jedoch wichtig, den Verlauf der Erkrankung und damit das Aggressivitätspotential der Tumoren sicher einschätzen zu können. Aus diesem Grund sind Prognosefaktoren innerhalb der initialen Diagnose eines Prostatakarzinoms zwingend notwendig. Der wichtigste Prognoseparameter bei der ersten Diagnose eines Prostatakarzinoms in der Stanzbiopsie ist heute der Gleason-Score. Beim Gleason-Score muss allerdings berücksichtigt werden, dass es hier zu Interobserver-Varianzen kommen kann und dass der Gleason-Score in der Biopsie häufig niedriger eingeschätzt wird als er tatsächlich im späteren Ektomiepräparat ist ²⁷. Des Weiteren ist die Prognoseabschätzung in den Gruppen mit einem Gleason-Score 3+4 und 4+3 sehr schwierig. In einer Studie des Instituts für Pathologie konnte kürzlich gezeigt werden, dass die Bestimmung des sogenannten quantitativen Gleason-Scores zur besseren Einschätzung der Patienten-Prognose hilfreich sein kann. Beim quantitativen Gleason-Score wird aus den Rohdaten (Anteil der Gleason 3, 4 und 5 Muster im Tumorgewebe) ein Score gebildet, der die „klassischen“ Kategorien Gleason 3+4 und 4+3 nach dem Anteil des Gleason 4 Musters weiter aufteilt. In der Studie konnte gezeigt werden, dass der quantitative Gleason Score eine präzisere Abschätzung der Patienten-Prognose ermöglicht als der klassische Gleason Score ²⁸. Zur Verbesserung der Prognoseeinschätzung werden außerdem in der Litera-

tur zahlreiche molekulare Parameter vorgeschlagen^{18, 20-22, 24-26, 29-34}. Bei diesen molekularen Parametern handelt es sich entweder um die Bestimmung einer veränderten Expression von Tumor-relevanten Genen oder um den Nachweis von genetischen Veränderungen^{20-26, 29-33}. Die Verwendung von genetischen Aberrationen, wie zum Beispiel Deletionen, als molekularer Marker hat dabei den Vorteil, dass hier in der Regel eine „Ja oder Nein“-Bestimmung erfolgt, welche Interobserver-Varianzen minimiert und eine klare Aussage ermöglicht. Wie bereits oben beschrieben ist das Prostatakarzinom auf genetischer Ebene vor allem charakterisiert durch die TMPRSS2:ERG Fusion und zahlreiche Deletionen verschiedener chromosomaler Regionen¹³⁻¹⁵. Studien konnten bereits zeigen, dass der alleinige Nachweis einer TMPRSS2:ERG Fusion beim Prostatakarzinom prognostisch nicht von Relevanz ist^{13, 18}. Der Verlust von genetischem Material hingegen hat deutliche Auswirkungen auf die Prognose des Patienten. Studien zeigten bereits, dass Patienten, deren Prostatumoren eine alleinige Deletion in den Regionen 10q23, 5q21, 6q15, 3p13, 16q23 oder 12p13 aufweisen, eine wesentlich höhere Wahrscheinlichkeit eines PSA-Rezidivs haben als Patienten, deren Tumoren nicht von einer dieser Deletion betroffen sind^{20, 22-26}.

1.2.1 Genombasierte und molekulare Classifier beim Prostatakarzinom

Unter Berücksichtigung der genetischen und molekularen Komplexität der einzelnen Prostatakarzinome scheint es eher schwierig anhand eines einzigen molekularen Parameters eine Verbesserung der prognostischen Situation zu erzielen. Aus diesem Grund wurden in den letzten Jahren bereits sogenannte „Classifier“ entwickelt, deren prognostische Aussagekraft auf der Bestimmung mehrerer molekularer/genetischer Veränderungen beruht. Diese „Classifier“ können an unterschiedlichen Zeitpunkten der Diagnostik und Therapieplanung des Prostatakarzinoms angewendet werden. Bei einem negativen Biopsiefund kann die Bestimmung eines quantitativen Methylierungsmusters mit Hilfe des Confirm MDx (MDxHealth, Inc.)³⁵⁻³⁷ oder die Untersuchung der mitochondrialen DNA mittels des Prostate Core Mitomic Tests (PCMT) in den Drüsenzellen des normalen Prostatagewebes³⁸ zur Planung einer erneuten Biopsie der Prostata herangezogen werden. Bei positiven Stanzbefunden können drei weitere „Classifier“ eingesetzt werden, um die Aggressivität der Tumoren zum Zeitpunkt der initialen Diagnose besser einzuschätzen. Mit dem Oncotype DX® (Genomic Health, Inc.)³⁹ und dem Prolaris® cell cycle progression (Myriad Genetic Laboratories Inc.) Test⁴⁰ wird die Expression von 12 bzw. 31 Genen mittels Real-Time PCR auf mRNA-Ebene am Biopsiematerial bestimmt. Beim ProMark® (Metamark Genetics) wird die Expression von 8 verschiedenen Genen mittels Immunohistochemie ebenfalls am Biopsiematerial bestimmt⁴¹. Anhand des Expressionsmusters auf mRNA- bzw. Proteinebene erfolgt dann eine Einschätzung des Progressionsrisikos. Unter Berücksichtigung der etablierten Prognoseparameter kann mit Hilfe dieser drei „Classifier“ der Patient in der schwierigen Entscheidung zwischen den Therapieformen „Active Surveillance“ und radikaler Prostatektomie unterstützt werden. Mit dem OurView Prostate Prognostic Panel (Our lab) steht außerdem ein Test zur Verfügung, der mehrere Methoden bzw. molekulare Veränderungen berücksichtigt. Bei diesem Test wird der Gleason Grad, der

Ploidy-Status (DNA-Gehalt), der PTEN-Kopiezahlstatus und der Proliferationsstatus (KI67LI) zur Beurteilung der Aggressivität des Prostatumors ebenfalls an der Stanzbiopsie herangezogen ⁴². Im Gegensatz zu den vorher genannten „Classifiern“ soll der Decipher® Test (GenomeDx Bioscience) die Einschätzung des Risikos eines Rezidivs nach erfolgter Ektomie unterstützen. Dazu wird eine Gesamt-Transkriptom-Analyse am Ektomiematerial durchgeführt. Diese soll die weitere postoperative Therapieplanung unterstützen und so das Risiko einer Metastasierung bzw. Übertherapie reduzieren ⁴³. Obwohl viele dieser „Classifier“ bereits kommerziell erhältlich sind, konnte sich keiner dieser Tests bisher in der breiten klinischen Anwendung durchsetzen. Grund dafür ist vermutlich, dass die Einschätzung der Tumoraggressivität auch bei Verwendung dieser Tests immer noch schwierig ist. Erste Studien konnten bereits zeigen, dass der prozentuale Anteil des fehlenden genetischen Materials in Bezug auf das Gesamtgenom mit einem hohen Gleason-Score, einem frühen PSA-Rezidiv und einer Metastasierung assoziiert ist ^{44, 45}. Es ist daher vorstellbar, dass die Entwicklung eines „Deletions-Scores“, also die Bestimmung der Anzahl der Deletionen in einem Tumor, als „genetischer Classifier“ zur besseren Einschätzung der Prognose beitragen könnte.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Ein primäres Ziel der Prostatakarzinomforschung am Institut für Pathologie ist die Identifizierung von molekularen Prognosemarkern, die es ermöglichen, das Aggressivitätspotential der Prostatakarzinome bei der initialen Diagnose besser einzuschätzen. Dazu wurde ein Prostata-Prognose-Gewebemikroarray (tissue micro array, TMA) mit mehr als 12.000 Prostatumoren etabliert, welcher neben klinisch-pathologischen Daten der Tumoren auch Informationen über das PSA-Rezidiv enthält. Zusätzlich werden alle Untersuchungen an diesem TMA in einer molekularen Datenbank gesammelt. Diese molekulare Datenbank enthält unter anderem den immunohistochemisch ermittelten TMPRSS2:ERG-Status ^{13, 18} und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungs-(FISH) Daten zum Status der häufigsten Deletionsregionen des Prostatakarzinoms ²⁰⁻²⁶. Da alle bisher analysierten Kopiezahlverluste mit einer schlechten Patientenprognose assoziiert sind, stellt sich die Frage, ob die Anzahl der Deletionen in einem Tumor eine zusätzliche prognostische Aussagekraft erbringt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, einen „Deletions-Score“ pro Tumor zu erstellen, der sich aus den Kopiezahl-daten von 7 häufigen Deletionsregionen (3p13, 5q21, 6q15, 10q23, 12p13, 16q24 und 17p13) zusammensetzt. Dazu wurden die Ergebnisse der FISH-Analysen aus der molekularen Datenbank des Prostata-Prognose-TMA verwendet ²⁰⁻²⁶. Da für die Regionen 3p13, 12p13 und 16q24 in den vorherigen Studien nur ein TMA-Subset untersucht wurde ^{20, 23, 25}, wurden diese Daten durch eine eigene FISH-Analyse der fehlenden TMAs ergänzt. Dann wurde pro Tumor die Anzahl der Deletionen („Deletion-Score“) bestimmt. Zur Klärung der prognostischen Relevanz wurde dann der Deletion-Score mit den klinisch-pathologischen Parametern inklusive des neuen quantitativen Gleason-Scores ²⁸ und dem PSA-Rezidiv assoziiert.

2 Material und Methoden

2.1 Prostata-Prognose-Array (Gewebemikroarray / TMA)

Der Prostata-Prognose-Array (TMA) des Instituts für Pathologie setzt sich aus 12427 Prostatektomiepräparaten zusammen. Die Präparate wurden im Zeitraum von 1992 bis 2012 im Institut für Urologie und der Martiniklinik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf gewonnen.

Für die Herstellung des TMA müssen folgende Schritte durchgeführt werden:

1. Auswahl eines repräsentativen, formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Tumorgewebeblocks pro Patient
2. Entnahme einer Prostatatumorstanzung mit einem Durchmesser von 0,6 mm aus diesem Gewebeblock
3. Aufteilung der Prostatatumorstanzungen auf 27 TMA-Blöcke, sodass jeder Block zwischen 144 und 522 Stanzungen enthält
4. Schnitt der Blöcke mit einem Mikrotom und weitere Aufbereitung

Klinische Follow-up-Daten waren für 12344 der 12427 Patientinnen verfügbar.

Nach der Prostatektomie wurde eine Verlaufskontrolle der PSA-Werte durchgeführt. Hierbei wurde ab einem Wert von über 0,2ng/ml von einem PSA-Rezidiv ausgegangen. Die exakte Verteilung innerhalb des TMA in Bezug auf klinisch-pathologische Parameter und weitere Verlaufsdaten sind Tabelle 1 zu entnehmen.

Tabelle 2: Zusammensetzung des Prostata-Prognose-Array (TMA)

	Anzahl der Patienten	
	Anzahl der TMA-Patienten (n=12427)	Anzahl Patienten mit PSA-Rezidiv (n=2759)
Verlaufsdaten (mo)		
Mittelwert	49	
Median	36,4	
Alter (Jahre)		
<50	334	81
50-59	3061	705
60-70	7188	1601
>70	1761	370
präoperativer PSA (ng/ml)		
<4	1585	242
4-10	7480	1355
10-20	2412	737
>20	812	397

pT Stadium (AJCC 2002)		
pT2	8187	1095
pT3a	2660	817
pT3b	1465	796
pT4	63	51
Gleason Score		
≤3+3	2983	368
3+4	6945	1289
4+3	1848	788
≥4+4	584	311
Status der Lymphknoten (pN)		
pN0	6970	1636
pN+	693	393
Status des Resektionsrandes		
negativ	9990	1848
positiv	2211	853

Bemerkung: Die Anzahl der Patienten ergibt auf Grund von fehlenden Daten nicht in allen Kategorien 12427. Abkürzungen: AJCC, American Joint Committee on Cancer, PSA: Prostata-spezifisches Antigen, TMA: tissue micro array (Gewebemikroarray), mo: Monate.

2.2 Escherichia Coli Plasmide

Für die Untersuchung der 7 Deletionsloci (3p13, 5q21, 6q15, 10q23, 12p13, 16q24 und 17p13) wurden FISH-Sonden mittels BAC (bacterial artificial chromosome) transformierten DH10B Escherichia Coli (E.Coli) der Firma Source Bioscience (Cambridge, UK) hergestellt. Eine Übersicht zu allen verwendeten E.Coli Klonen ist in Tabelle 2 zu finden.

Tabelle 3: Verwendete E.Coli Klone

Chr. Lokus	Gen	Klon 1	Klon 2
3p13	FOXP1	RP11-154H23	RP11-49E03
5q21	CHD1	RP11-533M23	RP11-422M08
6q15	MAP3K7	RP3-470J8	RP11-501P02
10q23	PTEN	RP11-380G5	RP11-813O3
12p13	CDKN1B	RP11-180M15	RP11-113I21
16q24	FBXO31	RP11-788A09	RP11-737K02
17p13	TP53	RP11-89D11	RP11-404G1

2.3 Reagenzien und Kits

Die in dieser Arbeit verwendeten Reagenzien/Kits sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 4: Verwendete Arbeitsmaterialien und Herkunft

Reagenzien / Kits	Firma
20x SSC	Abbot, Ludwigshafen
CEP 10 Spectrum Green	Abbot, Ludwigshafen
CEP 12 Spectrum Green	Abbot, Ludwigshafen
CEP 16 Spectrum Orange	Abbot, Ludwigshafen
CEP 17 Spectrum Orange	Abbot, Ludwigshafen
CEP 3 Spectrum Orange	Abbot, Ludwigshafen
CEP 6 Spectrum Orange	Abbot, Ludwigshafen
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich, München
COT Human DNA	Roche, Grenzach-Wyhlen
Dextransulfat (Natriumsalz)	Roth, Karlsruhe
Ethanol 80% (vergällt)	VWR, Darmstadt
Ethanol 96% (vergällt)	VWR, Darmstadt
Ethanol Ph Eur (1 Liter)	VWR, Darmstadt
Formamid pro analysi	Merck, Darmstadt
Grenn dUTP (50 nmol, lyophilisiert)	Abbot, Ludwigshafen
Immersol	Zeiss, Oberkochen
Isopropanol 100%	Merck, Darmstadt
LB broth, Miller	Sigma-Aldrich, München
Mounting Medium with DAPI (VECTASHIELD)	Vector Laboratories
Nick Translations Reagent Kit	Abbot, Ludwigshafen
NP-40	Abbot, Ludwigshafen
NucleoBond® BAC 100	Macherey-Nagel, Düren
nukleasefreies Wasser	Sigma-Aldrich, München
Orange dUTP (50 nmol, lyophilisiert)	Abbot, Ludwigshafen
Pretreatment Reagent 500 ml	Abbot, Ludwigshafen
Protease Buffer 500 ml	Abbot, Ludwigshafen
Protease I 500 mg	Abbot, Ludwigshafen
QIAquick Nucleotide Removal Kit (50)	Qiagen, Venlo, Niederlande
Reinigungsbenzin	Biesterfeld Chemiedistribution GmbH
Xylol	J. T. Baker, Center Valley, USA

2.4 Geräte

Die in dieser Arbeit verwendeten Geräte sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 5: Verwendete Geräte mit Herkunft

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

2.5 Verbrauchsmaterialien

Die in dieser Arbeit verwendeten und über den normalen Laborbedarf hinausgehenden Materialien sind in Tabelle 5 aufgelistet.

Tabelle 6: Verwendete Materialien mit Herkunft

Material	Firma
Deckgläser No.1 24 x 60 mm	Marienfeld, Lauda Königshofen
Fixogum	Marabu, Tamm
Safe-Lock Reaktionsgefäße, amber	Eppendorf (Hamburg)
Safe-Lock Reaktionsgefäße, amber, 0,5 ml	Eppendorf (Hamburg)
SafeSeal Reagiergefäß 1,5 ml aus PP	Sarstedt (Nümbrecht-Rommelsdorf)
SafeSeal Reagiergefäß 2 ml	Sarstedt (Nümbrecht-Rommelsdorf)

2.6 Software und Datenbanken

Ensembl GRCh37: Auswahl der DH10B E.Coli Klone

JMP 9.0.2: statistische Datenauswertung

Exel 2007/PowerPoint 2007: Darstellung der Ergebnisse

2.7 Plasmid-Isolierung aus DH10B E. Coli

Eine Voraussetzung für die Nick Translation zur Gewinnung der Sonden für die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) stellt die Isolierung reiner Plasmid-DNA aus DH10B E.Coli Bakterien dar. In dieser Arbeit wurde das NucleoBond® BAC 100 Kit der Firma Machery-Nagel (Düren, Deutschland) zur Isolierung der Plasmid-DNA verwendet. Vor diesem Vorgang ist eine Vermehrung der DH10B E.Coli Bakterien notwendig.

1. Ansetzen einer Vorkultur mit 10ml LB-Medium, 30µl Chloramphenicol und einer Pipettenspitze Bakterien in einem 100ml Erlenmeyerkolben
2. Inkubation der Vorkultur für 8 Stunden bei 37°C und 190 rpm
3. Überführen von 2ml Vorkultur in 250ml chloramphenicolhaltiges LB-Medium und weitere Inkubation für 16 Stunden bei 37°C und 190rpm
4. Transfer der Hauptkultur in einen Zentrifugenbecher und anschließende Zentrifugation bei 4°C und 6000G für 15 Minuten
5. Isolierung der Plasmid-DNA nach Angaben des Herstellers mit dem NucleoBond® BAC 100 Kit der Firma Machery-Nagel (Düren, Deutschland). Das Protokoll kann unter www.mn-net.com eingesehen werden.
6. Messen der DNA-Konzentration wie unter Punkt 2.8 beschrieben. Anschließend Lagerung der Proben bei 4°C bis zur weiteren Verwendung

2.8 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentrationsbestimmung der isolierten Plasmide wurde mit dem Peqlab NanoDrop® ND-1000 UV/Vis-Spektralphotometer durchgeführt.

1. Bestimmung des Leerwerts mit 1µl RNase-freiem Wasser bei einer Wellenlänge von 260nm
2. Messung von 1µl der Proben bei 260nm.

Eine Absorption von 1 bei dieser Wellenlänge entspricht einem DNA-Gehalt von 50µg/ml⁴⁶.

2.9 Nick Translation

Die Nick Translation ermöglicht die Herstellung fluoreszenz-markierter DNA-Einzelstränge zur Detektion spezifischer DNA-Abschnitte für die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH).

1. Verdünnen von 1µg der unter Punkt 2.7 isolierten Plasmid-DNA in 17,5µl Nuklease-freiem Wasser in einem braunen Eppendorf-Tube
2. Durchführen der Nick Translation mit dem Nick Translation Reagent Kit der Firma Abbott (Illinois, USA) nach Herstellerangaben.
Das Protokoll kann unter www.abbottmolecular.com eingesehen werden
3. Sondenaufreinigung mit dem QIAquick® Nucleotide Removal Kit der Firma Qiagen (Venlo, Niederlande) nach Herstellerangaben.
Das Protokoll kann unter www.qiagen.com eingesehen werden
4. Aufkonzentrieren der pipettierten Proben mit Hilfe einer Vakuumzentrifuge für 20min bei 45°C
5. Lagerung der FISH-Deletionssonden bei -20°C bis zur weiteren Verwendung

2.10 Fluoreszenz-in-situ Hybridisierung (FISH)

Die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) dient zur gezielten Detektion bestimmter DNA-Sequenzen. Unter anderem kann mit Hilfe dieser Technik auch das Fehlen von Abschnitten innerhalb der DNA (Deletion) nachgewiesen werden.

Bei formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Geweben war vor der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) eine Behandlung der TMAs erforderlich:

1. dreimaliges Baden der TMAs in Xylol für 10 Minuten
2. zweimaliges Baden der TMAs in Ethanol 96% für 5 Minuten
3. Trocknen der TMAs auf einer Heizplatte bei 48°C für 3 Minuten
4. Gabe der TMAs in eine Pretreatment-Lösung bei 80°C für 15 Minuten
5. zweimaliges Waschen der TMAs mit dH₂O für je 1 Minute
6. Inkubation mit einer Proteaselösung bei 37°C für 2 Stunden und 30 Minuten
7. zweimaliges Waschen der TMAs mit dH₂O für je 1 Minute
8. Dehydrierung in einer aufsteigenden Reihe: Ethanol 70%, Ethanol 80% und Ethanol 96% für je 3 Minuten
9. Trocknen der TMAs auf einer Heizplatte bei 48°C für 3 Minuten

Anschließend konnte die FISH in folgenden Schritten durchgeführt werden:

1. Herstellen eines Hybridisierungsmix aus 14µl Basismix (15,0ml Formamid, 4,5ml 20xSSC, 3,0g Dextransulfat), 4µl Deletions-Sonde, 2µl COT-DNA und 0,5µl Centromer Sonde pro TMA
2. Schütteln des Hybridisierungsmix mit Hilfe eines Vortexers und anschließende Zentrifugation bei 2500g für 10 Sekunden

3. Pipettieren des Hybridisierungsmix auf die TMAs. Anschließend Auflegen eines Deckgläschens und Ausstreichen von Luftblasen. Fixieren des Deckgläschens mit Fixogum und Trocknung für 10 Minuten
4. Denaturieren der DNA in einem Hybrid bei 72°C für 10 Minuten
5. Hybridisieren der FISH-Sonden bei 37°C über Nacht
6. Waschen der TMAs mit Hilfe eines Hybridisierungswaschpuffers (100ml 20xSSC, 3ml NP-40, ad 1000ml dH2O), der mit einem pH-Meter auf einen pH-Wert von 7,25 eingestellt wurde, am folgenden Tag
7. Entfernen des Fixogums von den Deckgläschen und anschließendes Stellen der TMAs in den Hybridisierungswaschpuffer bei Raumtemperatur im Dunkeln bis zum Ablösen der Deckgläschen
8. Stellen der TMAs in Hybridisierungswaschpuffer bei 72°C für 2 Minuten, dann kurzes Waschen in dH2O
9. Trocknen der TMAs bei Raumtemperatur im Dunkeln für 10 Minuten
10. Gabe von 1 Tropfen DAPI auf die TMAs. Anschließend Auflegen eines Deckgläschens und Ausstreichen von Luftblasen.
11. Lagerung der hybridisierten TMAs bei -20°C bis zur Auswertung

2.11 Mikroskopische Auswertung

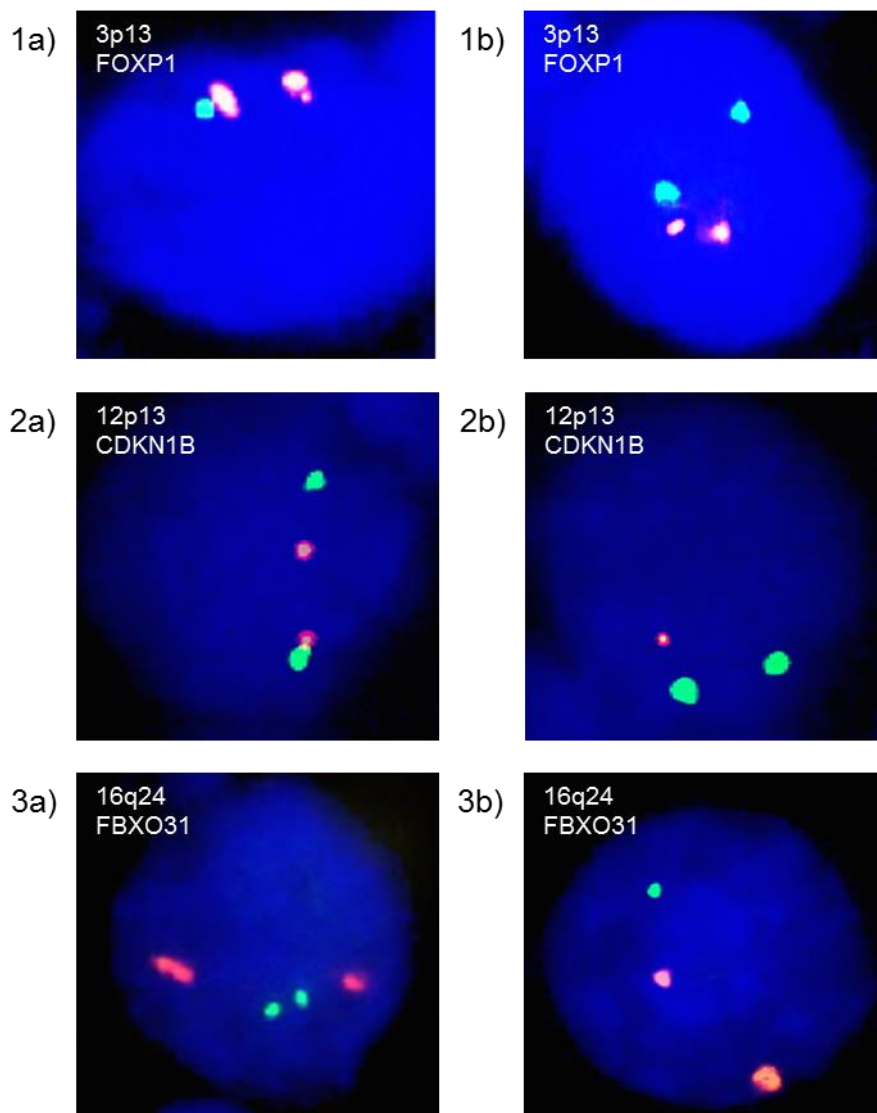
Die mikroskopische Analyse der hybridisierten TMAs wurde mit Hilfe eines Lichtmikroskops der Firma Zeiss und den entsprechenden Lichtfiltern der Firma AHF durchgeführt.

Eine Übersicht zu den möglichen Diagnosen und deren Kriterien ist in Tabelle 6 dargestellt. In Abbildung 1 sind Lichtbilder der mikroskopischen Auswertung zu finden.

Tabelle 7: mikroskopische Diagnosekriterien

Diagnose	Kriterien
Von Analyse ausgeschlossen:	Gewebespots, die auf Grund einer mangelhaften Hybridisierung ein schwaches oder kein Signal in den Tumorzellen und Normalzellen aufwiesen
Keine Deletion:	Die Anzahl der Signale für die untersuchte chromosomale Region entsprach der Anzahl der Centromer-Signale
Heterozygote Deletion:	Im Vergleich zu den Centromer-Signalen waren in der untersuchten chromosomalen Region weniger Signale vorhanden und $\geq 60\%$ der Tumorzellkerne waren betroffen
Homozygote Deletion:	Komplettes Fehlen der Signale der untersuchten chromosomalen Region bei vorhandenen Centromer-Signalen in $\geq 60\%$ der Tumorzellkerne. Signale in angrenzenden Stromazellkernen waren vorhanden

Abbildung 1: Lichtbilder der mikroskopischen Auswertung



2.12 Bildung des Deletions-Scores

Zur Erstellung des Deletions-Scores wurden für die Regionen 10q23²⁴, 17p13²¹, 5q21²⁶ und 6q15²² die Daten aus vorherigen Studien des Instituts für Pathologie verwendet. Für die Deletionsregionen 12p13, 3p13 und 16q24 wurden in vorherigen Studien nur Teile des Prognose-TMAs verwendet. Zur Erhöhung der Fallzahl wurden daher in der vorliegenden Arbeit diese Daten um die restlichen Karzinome (637-3304) in einer FISH-Analyse ergänzt. In die Bildung des Deletions-Scores wurden alle Patienten eingeschlossen, deren Tumorgewebe in allen 7 FISH-Analysen bewertbar waren. Die Einteilung der Patienten erfolgte dann nach der Anzahl der detektierten Deletionen in die Gruppen: 1. Keine Deletion, 2. Eine Deletion, 3. Zwei Deletionen, 4. Drei Deletionen und 5. Mindestens 4 Deletionen.

2.13 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung der FISH-Analyse wurde die Software JMP 9.0.2. verwendet. Die prognostische Relevanz der sieben untersuchten Deletionsloci und des Deletions-Scores wurde mittels eines Log-Rank-Tests geprüft und in einer Kaplan-Meier-Kurve dargestellt. Um den Zusammenhang des Deletions-Scores mit den vorhandenen klinischen-pathologischen Parametern zu prüfen, wurde ein Chi-Quadrat-Test durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Auswertbarkeit des TMA mittels FISH

Insgesamt wurden 7 chromosomale Regionen auf ihren Kopiezahlstatus mittels FISH an 12247 Prostatakarzinomen im TMA-Format untersucht. Auf Grund einer unzureichenden Hybridisierung oder dem Fehlen von Tumor im TMA-Gewebe wurden zwischen 4121 und 6852 Patienten aus der weiteren Analyse ausgeschlossen. Für die Regionen 10q23, 17p13, 5q21 und 6q15 wurden die Daten aus vorherigen Studien des Instituts für Pathologie verwendet. Für die Regionen 12p13, 16q24 und 3p13 wurden bereits vorhandene Daten durch eine weitere FISH-Analyse dieser Regionen ergänzt. Eine Zusammenfassung der auswertbaren Tumoren in den sieben FISH-Analysen ist in Tabelle 7 zu finden.

Tabelle 8: Auswertbarkeit der FISH-Analysen

Region	Studien am Institut für Pathologie		eigene Analyse	
	auswertbare Tumoren	Studie	auswertbare Tumoren	Gesamt
3p13	6444	Krohn et al.	637	7081
5q21	7932	Burkhardt et al.	/	7932
6q15	6069	Kluth et al.	/	6069
10q23	6704	Krohn et al.	/	6704
12p13	3098	Kluth et al.	3039	6137
16q24	2091	Kluth et al.	3304	5395
17p13	8126	Kluth et al.	/	8126

Hinweis: Für die Regionen 3p13, 5q21, 6q15, 10q23 und 17p13 wurden die bereits veröffentlichten Studiendaten in weiteren Untersuchungen am Institut für Pathologie ergänzt. Diese Daten sind in den Dissertationen von Lisa Paustian, Anne Meyer, Thomas Hass, Jovisa Harazenda, Catina Schwemin, Khakan Hussein und Martina Kluth zu finden.

3.2 Deletionsrate der 7 untersuchten chromosomalen Regionen

Mittels FISH konnte für die sieben untersuchten chromosomalen Regionen in 658 bis 1299 Tumoren eine Deletion nachgewiesen werden. Die ermittelte Deletionsrate betrug für 3p13 9,3%, 5q21 10,0%, 6q15 19,2%, 10q23 18,4%, 12p13 13,4%, 16q24 18,7% und 17p13 16,0%. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Tabelle 8 zu finden.

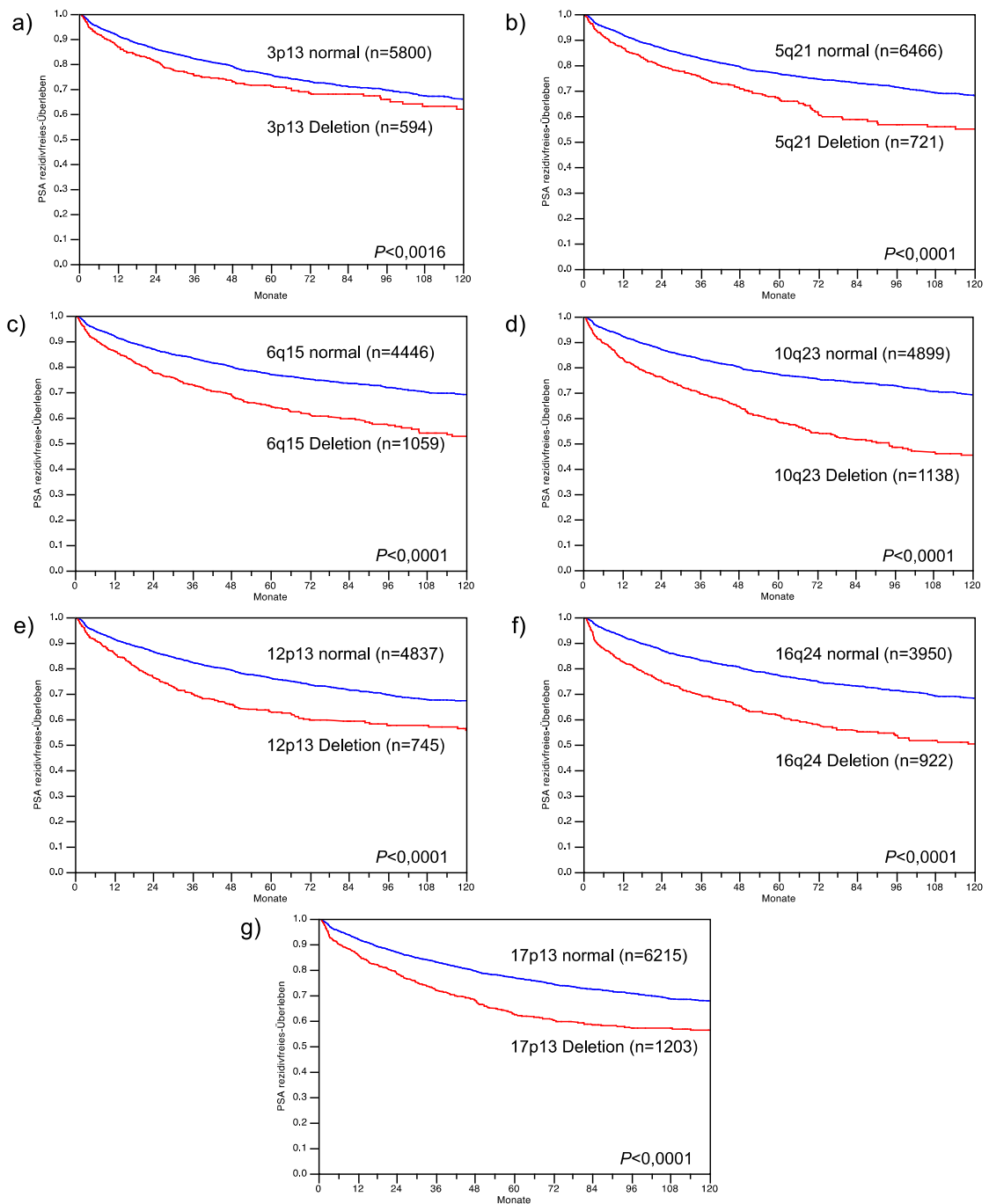
Tabelle 9: Deletionsraten der 7 untersuchten chromosomalen Regionen

Region	Anzahl Tumoren	Deletion n (%)	Normal n (%)
3p13	7081	658 (9,3)	6423 (90,7)
5q21	7932	791 (10,0)	7141 (90,0)
6q15	6069	1164 (19,2)	4905 (80,8)
10q23	6704	1234 (18,4)	5470 (81,6)
12p13	6137	821 (13,4)	5316 (86,6)
16q24	5395	1011 (18,7)	4384 (81,3)
17p13	8126	1299 (16,0)	6827 (84,0)

3.3 Prognostische Relevanz der 7 untersuchten Deletionsregionen beim Prostatakarzinom

Für die Bestimmung der prognostischen Relevanz der sieben untersuchten Deletionsregionen wurde der postoperative Anstieg des PSA im Serum auf Werte über 2 ng/ml (PSA-Rezidiv) als Studienendpunkt verwendet. In einer univariaten Analyse wurde der Kopiezahlstatus der sieben chromosomalen Regionen anhand des Log-Rank-Test mit dem PSA rezidivfreien Überleben verglichen und die Ergebnisse in einer Kaplan-Meier-Kurve dargestellt. Diese Analysen zeigten, dass die Wahrscheinlichkeit eines PSA-Rezidivs, unabhängig von der chromosomalen Region, durch das Auftreten einer Deletion im Karzinom erhöht ist. Patienten, deren Tumoren eine Deletion in der Region 5q21, 6q15, 10q23, 12p13, 16q24 oder 17p13 aufwiesen, hatten eine deutlich schlechtere Prognose im Vergleich zu den Patienten, deren Tumoren einen normalen Kopiezahlstatus in der jeweilig untersuchten Region zeigten ($P < 0,0001$). Das Vorhandensein einer 3p13 Deletion führte ebenfalls zu einer erhöhten Wahrscheinlichkeit eines PSA-Rezidivs ($P = 0,0016$). Im Vergleich zu den anderen sechs Deletionsregionen war der prognostische Unterschied zwischen Tumoren mit oder ohne einer 3p13 Deletion jedoch wesentlich geringer. Eine Zusammenfassung der Analysen ist in Abbildung 2 zu finden.

Abbildung 2: Prognostische Relevanz der Deletionen



Prognostische Relevanz einer Deletion im Bereich a) 3p13, b) 5q21, c) 6q15, d) 10q23, e) 12p13, f) 16q24 und g) 17p13. Als PSA-Rezidiv wurden Werte $>0,2$ ng/ml gewertet. Zur Ermittlung der prognostischen Relevanz wurde ein Log-Rank-Test durchgeführt und die Ergebnisse in einer Kaplan-Meier-Kurve dargestellt.

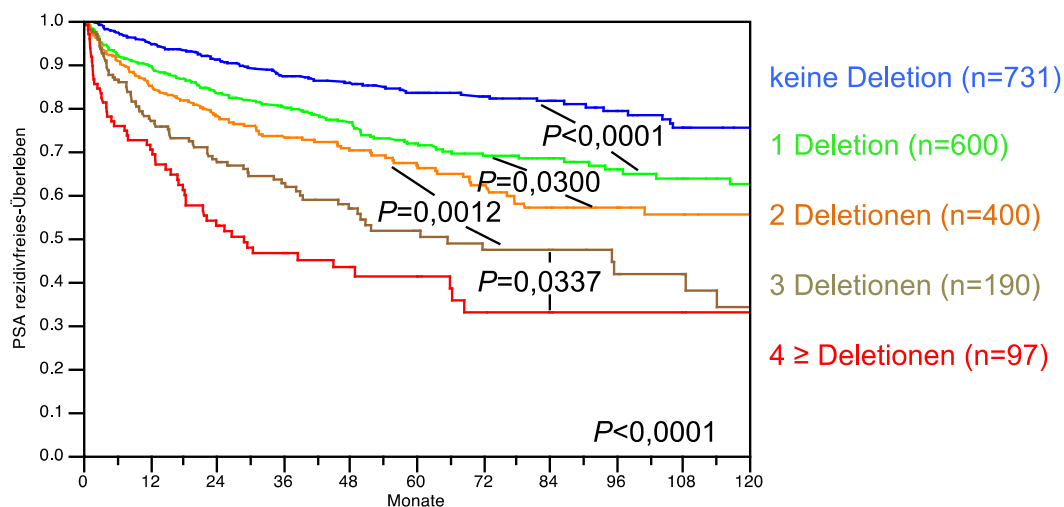
3.4 Deletions-Score und Assoziation zu den klinisch-pathologischen Parametern

Tabelle 10: Deletions-Score und Assoziation zu den klinisch-pathologischen Parametern

	n	keine Del. n (%)	1 n (%)	2 n (%)	3 n (%)	≥4 n (%)	P-Wert
Alle Tumoren							
	2228	808 (36,27)	667 (29,94)	444 (19,93)	206 (9,25)	103 (4,62)	
PSA							
<4	254	103 (40,55)	69 (27,17)	51 (20,08)	18 (7,09)	13 (5,12)	0,0224
4-10	1269	486 (38,3)	384 (30,26)	238 (18,75)	106 (8,35)	55 (4,33)	
10-20	479	155 (32,36)	147 (30,69)	102 (21,29)	54 (11,27)	21 (4,38)	
>20	205	54 (26,34)	62 (30,24)	49 (23,9)	27 (13,17)	13 (6,34)	
Gleason Score							
≤3+3	407	221 (54,3)	120 (29,48)	46 (11,3)	16 (3,93)	4 (0,98)	<0,0001
3+4	1268	487 (38,41)	406 (32,02)	229 (18,06)	105 (8,28)	41 (3,23)	
4+3	395	67 (16,96)	108 (27,34)	114 (28,86)	69 (17,47)	37 (9,37)	
≥4+4	150	29 (19,33)	33 (22)	53 (35,33)	16 (10,67)	19 (12,67)	
qGleason Score							
≤6	343	182 (53,06)	103 (30,03)	39 (11,37)	15 (4,37)	4 (1,17)	<0,0001
3+4 ≤5%	126	56 (44,44)	46 (36,51)	14 (11,11)	6 (4,76)	4 (3,17)	
3+4 6-10%	182	68 (37,36)	55 (30,22)	34 (18,68)	15 (8,24)	10 (5,49)	
3+4 11-20%	132	37 (28,03)	38 (28,79)	37 (28,03)	14 (10,61)	6 (4,55)	
3+4 21-30%	104	31 (29,81)	38 (36,54)	22 (21,15)	9 (8,65)	4 (3,85)	
3+4 31-49%	64	18 (28,13)	18 (28,13)	12 (18,75)	13 (20,31)	3 (4,69)	
3+4 TG5	26	4 (15,38)	11 (42,31)	4 (15,38)	5 (19,23)	2 (7,69)	
4+3 50-60%	64	8 (12,50)	18 (28,13)	25 (39,06)	11 (17,19)	2 (3,13)	
4+3 61-80%	61	11 (18,03)	11 (18,03)	22 (36,07)	13 (21,31)	4 (6,56)	
4+3 >80%	12	2 (16,67)	4 (33,33)	1 (8,33)	2 (16,67)	3 (25,0)	
4+3 TG5	49	5 (10,20)	16 (32,65)	10 (20,41)	9 (18,37)	9 (18,37)	
≥8	74	20 (27,03)	10 (13,51)	26 (35,14)	8 (10,81)	10 (13,51)	
Tumorstadium							
pT2	1320	585 (44,32)	398 (30,15)	209 (15,83)	96 (7,27)	32 (2,42)	<0,0001
pT3a	565	154 (27,26)	167 (29,56)	145 (25,66)	60 (10,62)	39 (6,9)	
pT3b-4	337	65 (19,29)	102 (30,27)	89 (26,41)	50 (14,84)	31 (9,2)	
N-Status							
N0	1263	420 (33,25)	383 (30,32)	277 (21,93)	127 (10,06)	56 (4,43)	<0,0001
N+	167	25 (14,97)	47 (28,14)	48 (28,74)	25 (14,97)	22 (13,17)	
R-Status							
R0	1711	664 (38,81)	511 (29,87)	316 (18,47)	149 (8,71)	71 (4,15)	0,0003
R1	467	132 (28,27)	146 (31,26)	113 (24,2)	50 (10,71)	26 (5,57)	

3.5 Prognostische Relevanz des Deletions-Scores beim Prostatakarzinom

Um zu testen, ob die Anzahl der deletierten Regionen im Tumor einen Einfluss auf die Prognose des Patienten besitzt, wurde zunächst ein Deletions-Score gebildet. Dazu wurden alle Patienten ausgewählt, bei denen der Kopiezahl-Status für die Regionen 3p13, 5q21, 6q15, 10q23, 12p13, 16q24 und 17p13 im Tumorgewebe bestimmt werden konnte. Patienten mit fehlenden FISH-Daten in einer oder mehr analysierten Regionen wurden aus der Analyse ausgeschlossen. Insgesamt konnte für 2228 Patienten die Anzahl der deletierten Regionen ermittelt werden. Die prognostische Relevanz der Deletionsanzahl wurde anhand des Auftretens eines PSA-Rezidivs in einem Log-Rank-Test ermittelt und in einer Kaplan-Meier-Kurve dargestellt. Für diese Analyse standen für 2018 Patienten Verlaufsdaten zur Verfügung. Die Einteilung dieser Patienten erfolgte in folgende Gruppen: Keine Deletion: normaler Kopiezahl-Status in allen sieben chromosomalen Regionen, 1 Deletion: Deletion in einer Region und normaler Kopiezahl-Status in sechs Regionen, 2 Deletionen: Deletion in zwei Regionen und normaler Kopiezahl-Status in fünf Regionen, 3 Deletionen: Deletion in drei Regionen und normaler Kopiezahl-Status in vier Regionen, ≥ 4 Deletionen: Deletion in vier bis sieben Regionen und normaler Kopiezahl-Status in den restlichen Regionen. In der Analyse konnte ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Anzahl der Deletionen im Tumor und der Wahrscheinlichkeit eines PSA-Rezidivs festgestellt werden ($P < 0,0001$). Im Vergleich zu den Patienten mit Tumoren ohne Deletion führte bereits das Vorhandensein von nur einer Deletion im Tumor zu einer deutlich schlechteren Prognose für den Patienten ($P < 0,0001$). Innerhalb der Gruppe der Patienten mit deletierten Tumoren konnte zudem festgestellt werden, dass die Wahrscheinlichkeit eines PSA-Rezidivs mit der Anzahl der Deletionen ansteigt. Das Vorhandensein von zwei Deletionen im Tumor führte bereits zu einer deutlich schlechteren Prognose für den Patienten im Vergleich zum Vorliegen von nur einer Deletion ($P = 0,03$). Die schlechteste Prognose hatten Patienten in deren Tumoren vier oder mehr Deletionen nachgewiesen wurden ($P = 0,0337$ vs. 3 Deletionen). Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Abbildung 3 dargestellt.

Abbildung 3: Prognostische Relevanz der Deletionsanzahl (Deletions-Score)

Als PSA-Rezidiv wurden Werte $>0,2$ ng/ml gewertet. Zur Ermittlung der prognostischen Relevanz wurde ein Log-Rank-Test durchgeführt und die Ergebnisse in einer Kaplan-Meier-Kurve dargestellt.

Zusätzlich zu der univariaten Analyse wurde eine multivariate Analyse (Cox-proportional Hazards) durchgeführt, in der geprüft wurde, ob die Auswirkungen der Deletionsanzahl auf die Wahrscheinlichkeit eines PSA-Rezidivs unabhängig von den etablierten Prognose-Parametern des Prostatakarzinoms sind. In dieser Analyse wurden der quantitative Gleason Score, das pathologische Tumorstadium (pT), der Status der Lymphknoten, der präoperative PSA-Wert und der Status des Resektionsrandes zusätzlich zum Deletions-Score verwendet. Dabei konnte gezeigt werden, dass die prognostische Relevanz der Anzahl von Deletionen unabhängig von den etablierten Markern bestehen bleibt ($P < 0,0001$). Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Tabelle 11 dargestellt. In einer weiteren Analyse wurde anstatt des quantitativen Gleason Scores der herkömmliche Gleason Score verwendet. Auch in dieser Analyse war die prognostische Aussagekraft unabhängig von den etablierten Prognose-Parametern ($P < 0,0001$, Tabelle 12)

Tabelle 11: Cox-proportionale Hazard Analyse zur Bestimmung der prognostischen Aussagekraft der Deletionsanzahl im Vergleich zu den etablierten Prognoseparametern, inklusive des quantitativen Gleason Scores in allen Prostatatumoren

	alle Tumoren		
	RR	95% KI	P-Wert
pT Stadium (AJCC 2002)			
pT3a vs pT2	1,8	1,2-2,5	<0.0001
pT3b vs pT3a	1,5	1,0-2,1	
pT4 vs pT3b	2,7	1,0-6,2	
qGleason Score			
3+4 ≤5% vs ≤6	1,3	0,6-2,9	<0.0001
3+4 6-10% vs 3+4 ≤5%	0,7	0,3-1,6	
3+4 11-20% vs 3+4 6-10%	1,9	1,0-3,9	
3+4 21-30% vs 3+4 11-20%	1,0	0,5-1,9	
3+4 31-49% vs 3+4 21-30%	0,9	0,4-1,8	
3+4 TG5 vs 3+4 31-49%	2,1	0,7-5,2	
4+3 50-60% vs 3+4 TG5	0,7	0,3-1,9	
4+3 61-80% vs 4+3 50-60%	1,2	0,7-2,3	
4+3 >80% vs 4+3 61-80%	2,2	0,9-5,0	
4+3 TG5 vs 4+3 >80%	0,6	0,3-1,6	
≥8 vs 4+3 TG5	0,9	0,5-1,7	
Status der Lymphknoten (pN)			
pN1 vs pN0	1,2	0,8-1,9	0,3614
Status des Resektionsrandes			
R1 vs R0	1,1	0,8-1,6	0,4526
präoperatives PSA (ng/ml)			
4-10 vs <4	0,6	0,4-1,0	0,0276
10-20 vs 4-10	1,4	1,0-2,0	
>20 vs 10-20	1,2	0,8-1,8	
Deletions-Score			
1 Deletion vs keine Deletion	1,2	0,8-1,7	<0.0001
2 Deletionen vs 1 Deletion	1,8	1,2-2,6	
3 Deletionen vs 2 Deletionen	1,0	0,6-1,5	
≥4 Deletionen vs 3 Deletionen	1,4	0,8-2,5	
RR: Risk ratio (Risikoverhältnis), KI: Konfidenzintervall			

Tabelle 12: Cox-proportionale Hazard Analyse zur Bestimmung der prognostischen Aussagekraft der Deletionsanzahl im Vergleich zu den etablierten Prognoseparametern bei Verwendung des herkömmlichen Gleason Scores in allen Prostata Tumoren

	alle Tumoren		
	RR	95% KI	P-Wert
pT Stadium (AJCC 2002)			
pT3a vs pT2	1,9	1,5-2,6	<0,0001
pT3b vs pT3a	1,6	1,2-2,0	
pT4 vs pT3b	2,4	1,2-4,4	
Gleason Score			
3+4 vs ≤3+3	1,6	1,0-2,7	<0,0001
4+3 vs 3+4	1,9	1,5-2,5	
≥4+4 vs 4+3	1,4	1,0-1,9	
Status der Lymphknoten (pN)			
pN1 vs pN0	1,3	0,9-1,7	0,1220
Status des Resektionsrandes			
R1 vs R0	1,1	0,8-1,4	0,6538
präoperatives PSA (ng/ml)			
4-10 vs <4	0,8	0,5-1,2	0,0024
10-20 vs 4-10	1,4	1,1-1,8	
>20 vs 10-20	1,2	0,9-1,6	
Deletions-Score			
1 Deletion vs keine Deletion	1,4	1,1-1,9	<0,0001
2 Deletionen vs 1 Deletion	1,2	0,9-1,5	
3 Deletionen vs 2 Deletionen	1,3	0,9-1,8	
≥4 Deletionen vs 3 Deletionen	1,4	0,9-2,1	

RR: Risk ratio (Risikoverhältnis), KI: Konfidenzintervall

4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit wurde mit der Zielsetzung angefertigt, eine Korrelation zwischen der Gesamtzahl an Deletionen verschiedener chromosomaler Regionen und der Prognose der Patienten mit einem Prostatakarzinom nachzuweisen.

Grundlage für die Analysen waren die Ergebnisse aus FISH-Studien des Instituts für Pathologie zu Veränderungen der Kopiezahl von sieben verschiedenen Deletionsregionen und deren Assoziation zum Phänotyp und Prognose des Prostatakarzinoms am Prostata-Prognose-TMA mit mittlerweile über 12.000 Prostatakarzinomen²⁰⁻²⁶. Da die Regionen 3p13, 12p13 und 16q24 bisher nur an einem Teil der TMAs untersucht wurden, wurde eine eigene FISH-Analyse der fehlenden TMAs durchgeführt. Dadurch konnte die Fallzahl für die Region 3p13 von 6.444 auf 7.081, 12p13 von 3.098 auf 6.137 und 16q24 von 2.091 auf 5.395 auswertbare Prostatakarzinome erhöht werden. Die Verwendung von TMAs zur Untersuchung von genetischen Veränderungen und deren Einfluss auf den Phänotyp und die Prognose von Karzinomen erbringt wesentliche Vorteile im Vergleich zu den „klassischen“ Großflächen-Analysen^{47, 48}. Die TMA-Technik ermöglicht zum Beispiel die Analyse von mehreren hundert Tumoren in nur einem einzigen Experiment^{49, 50}. Dies ist eine immense Arbeits-, Kosten- und Zeiterparnis im Vergleich zu Großflächen-Analysen. Der von uns verwendete Durchmesser von 0,6mm der TMA-Gewebestanzungen ist außerdem vergleichbar mit dem einer Stanzbiopsie, die zur primären Diagnose des Prostatakarzinoms entnommen wird⁵¹. Damit bilden die TMA-Analysen annähernd die Routine-Situation bzw. das zur Diagnostik zur Verfügung stehende Material ab. Zusätzlich dazu konnten Studien zeigen, dass die Analyse von nur einer Gewebestanze pro Tumor ausreicht, um eine verlässliche Aussage über die Häufigkeit und prognostische Relevanz einer molekularen Veränderung zu treffen⁵¹. Da durch die Verwendung von TMAs das zu untersuchende Gewebematerial auf die minimal notwendige Menge reduziert wird, ermöglicht diese zudem eine Vielzahl von verschiedenen Analysen an nur einer einzigen Gewebestanze. Basierend darauf konnte am Institut für Pathologie eine molekulare Datenbank, zugehörig zum Prognose-TMA, angelegt werden, in der die Ergebnisse aller FISH und auch Immunohistochemie-Studien gesammelt werden. Die hohe Fallzahl in Kombination mit der molekularen Datenbank konnte bereits in früheren Studien der Arbeitsgruppe genutzt werden, um molekulare Untergruppen des Prostatakarzinoms zu identifizieren. Zum Beispiel konnte gezeigt werden, dass die Mehrzahl der chromosomalen Deletionen eine deutliche Assoziation zum TMPRSS2:ERG Status besitzt. Dazu zählen Deletionen von 6q15²² und 5q21²⁶, die vermehrt in ERG-negativen und Deletionen von 10q23²⁴, 3p13²⁵, 16q23²³ und 17p13²¹ die häufiger in ERG-positiven Tumoren vorkommen.

Die Deletionsrate der in der Arbeit untersuchten Regionen 3p13 (9,3%), 12p13 (13,4%) und 16q24 (18,7%) ist vergleichbar mit den Deletionsraten in diesen Bereichen in vor-

herigen Studien der Arbeitsgruppe, in denen in 9.2% (3p13), 13.7% (12p13) und 20.1% (16q24) der 3.007 bis 6.444 analysierbaren Tumoren eine Deletion nachgewiesen werden konnte^{20, 25} (Dissertation Sohall Frogh und Lisa Paustian: persönliche Mitteilung). Auch die prognostische Relevanz aller sieben Deletionen in den einzelnen Studien, die nur an einem Teil der TMAs durchgeführt wurden, ist vergleichbar mit der prognostischen Aussagekraft dieser bei der Analyse aller auswertbaren Tumoren²⁰⁻²⁶. Diese Ergebnisse können als Validitätsmerkmal der vorliegenden und auch der früheren Studien gewertet werden. Diese Annahme beruht darauf, dass die Analyse von Kopiezahlveränderungen mittels FISH generell die Möglichkeit bietet, in mehreren Experimenten die Fallzahl vorhandener Studien zu erhöhen. Der Grund besteht darin, dass bei der FISH-Analyse, anders als zum Beispiel bei der IHC-Analyse⁵², das verwendete Protokoll und die experimentellen Bedingungen keinen Einfluss auf den ermittelten Kopiezahlstatus haben. Es ist jedoch zwingend notwendig, einen stringenten Grenzwert zur Definition der Kopiezahlverluste zu etablieren. Aus diesem Grund wurde am Institut für Pathologie in einer früheren Studie anhand einer vergleichenden aCGH- und FISH-Analyse ein Grenzwert etabliert. In dieser Studie wurde eine Übereinstimmung der PTEN-Deletionsrate von 100% zwischen der aCGH und FISH ermittelt, wenn mindestens 60% der analysierbaren Zellkerne einen Verlust des PTEN-Signales im Vergleich zum Centromer 10 Signal in der FISH-Analyse zeigten²⁴. Unter Berücksichtigung dieses Grenzwertes wurden sowohl die in der vorliegenden Arbeit als auch alle anderen Untersuchungen mittels FISH durchgeführt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen deutlich, dass die Verwendung eines DNA-basierten „Classifiers“, welcher die Anzahl der deletierten Regionen berücksichtigt, eine sinnvolle Ergänzung der bisher etablierten prognostischen Parameter zur Einschätzung der Aggressivität eines Prostata Tumors darstellt. Dies wird insbesondere dadurch deutlich, dass die Anzahl der Deletionen nicht nur mit einem hohen Gleason Score, einem fortgeschrittenen Tumorstadium und einem frühen PSA-Rezidiv assoziiert ist, sondern dass die Vorhersage des PSA-Rezidivs außerdem unabhängig von den etablierten Prognoseparametern und dem kürzlich vorgeschlagenen quantitativen Gleason Score ist²⁸. Dass Patienten mit vier oder mehr Deletionen eine deutlich schlechtere Prognose haben als Patienten mit drei oder weniger Deletionen, deutet darauf hin, dass die Anzahl der Deletionen in einem Tumor ausschlaggebend für die Aggressivität der Tumorzellen ist. Es ist daher vorstellbar, dass nicht der Verlust bestimmter Gene, sondern der generelle Verlust chromosomalen Materials den Tumorphänotyp bestimmt. Basierend darauf ist anzunehmen, dass ein „Deletions-Score“, der andere Deletionsregionen berücksichtigt, vergleichbare Ergebnisse liefert wie der in dieser Arbeit gebildete „Deletions-Score“. Diese Hypothese wird unterstützt durch zwei frühere Studien, welche einen Zusammenhang zwischen den generellen Kopiezahlveränderungen im Genom und der Patienten-Prognose beim Prostatakarzinom untersuchten. Hieronymus et al. bestimmten in 168 und 104 Prostatakarzinomen den prozentualen Anteil der Kopiezahlveränderungen (Verlust und Zugewinn) und ermittel-

ten anhand der Korrelation mit dem Gleason Grad, dem PSA-Rezidiv und der Metastasierung einen Grenzwert („CNA burden“), anhand dessen die Patienten in die drei Risikogruppen gering, mittel, und hoch eingeteilt werden könnten. Der „CNA burden“ gibt dabei den prozentualen Anteil der Kopiezahlveränderungen im Vergleich zum „normalen“ Genom an ⁴⁴. In der Studie von Lalonde et al. konnte unter anderem gezeigt werden, dass der prozentuale Anteil der Kopiezahlveränderung deutlich mit einer schlechten Prognose zusammenhängt und dass Patienten, deren Tumoren nur wenige der häufigsten Deletionen aufwiesen, eindeutig die beste Prognose hatten ⁴⁵. Dass diese Studien, wie auch die vorliegende Arbeit, einen klaren Zusammenhang zwischen der Menge des verlorenen chromosomalen Materials und der Prognose zeigen konnten, ist dahingegen nicht erstaunlich, da die vermehrte Entstehung von Deletionen auf eine erhöhte genomische Instabilität hinweist. Der in dieser Arbeit gebildete „Deletions-Score“ kann daher als Surrogate zum Nachweis einer genomischen Instabilität in einem Tumor angesehen werden.

In der Literatur wurden bereits einige molekulare Classifier zur verbesserten Einschätzung der Prognose beim Prostatakarzinom vorgeschlagen. Einige dieser Classifier sind außerdem bereits kommerziell für die Routine-Diagnostik erhältlich. Allerdings konnte sich keiner dieser Tests bisher in der breiten Masse durchsetzen. Grund dafür ist – neben dem fehlenden Nachweis einer klinischen Relevanz - vermutlich, dass die bisherigen Classifier auf der Analyse der mRNA- oder Protein-Expression in isoliertem Material bestehen. Mit dem Oncotyp DX® (Genomic Health, Inc.) ³⁹ und Prolaris® cell cycle progression (Myriad Genetic Laboratories Inc.) ⁴⁰ wird die Expression von 12 bzw. 31 Genen mittels Real Time PCR und mit dem ProMark® (Metamark Genetics) ⁴¹ die Expression von 8 Genen mittels Immunohistochemie bestimmt. Alle drei Classifier haben den Vorteil, dass sie bereits am Biopsie-Material durchgeführt werden können, d.h. in einer Situation, in der noch eine bedeutsame Therapieentscheidung für den Patienten getroffen werden kann. Der ProMark® kann dabei sogar direkt an der Biopsie durchgeführt werden, während für die Durchführung der RNA-basierten Tests diese zunächst aus dem Tumormaterial isoliert werden muss. Die Isolierung der RNA birgt dabei immer die Gefahr von „Verunreinigung“ der Probe mit RNA aus den normalen Epithelzellen und Stromazellen der Biopsie-Stanze. Alle drei Classifier haben den Nachteil, dass anhand eines Grenzwertes das Progressionsrisiko definiert wird. Solche Grenzwerte führen allerdings immer zu der Frage, welche Therapieempfehlung sollte Patienten gegeben werden, deren Grenzwert unmittelbar um den definierten Grenzwert liegt. Des Weiteren unterliegt die Expression sowohl auf mRNA als auch Protein-Ebene zahlreichen posttranskriptionalen und posttranslationalen zellulären Regulationsmechanismen, die bei einem entsprechenden molekularen Hintergrund zu erheblichen Schwankungen in der Expression führen können. Ohne Berücksichtigung der weiteren genomischen Veränderungen ist die Bewertung der Ergebnisse solcher molekularer Classifier vermutlich nur eingeschränkt möglich. Dies wird unterstützt durch die Ergebnisse vorheriger Studien innerhalb der Arbeitsgruppe, in denen gezeigt werden konnte, dass

die prognostische Aussagekraft verschiedener IHC-basierter molekularer Marker stark von der Existenz oder auch Abwesenheit von bestimmten genetischen Veränderungen, wie zum Beispiel der TMPRSS2:ERG Fusion und PTEN-Deletionen, abhängt ^{29, 53-55}.

Der in dieser Arbeit getestete „Classifier“ basiert auf dem Nachweis von Veränderungen auf DNA-Ebene und hat damit deutliche Vorteile gegenüber den bisher vorgeschlagenen Tests. Obwohl die Entstehung von Deletionen durchaus auf Grund der molekularen und zellulären Umgebung begünstigt werden kann, gibt das Vorhandensein oder das Fehlen einer Deletion eine klare „Ja oder Nein“-Antwort. Es ist bekannt, dass bestimmte Deletionen gehäuft in den ERG-positiven und ERG-negativen Tumoren vorkommen ^{15, 20-26, 56}. Es ist anzunehmen, dass hier unterschiedliche Mechanismen, die eventuell vom molekularen Hintergrund in der Zelle abhängen, zu den verschiedenen Deletionen führen. Der in der Arbeit gebildete „Deletions-Score“ basiert sowohl auf ERG-positiv als auch ERG-negativ assoziierten Deletionen. Es kann also die Annahme getroffen werden, dass dieser Deletions-Score unabhängig vom molekularen Hintergrund zur Vorhersage der Prognose geeignet ist. In einer kürzlich veröffentlichten Studie der Arbeitsgruppe wurde ein weiterer DNA-basierter Classifier vorgeschlagen. Dieser Classifier basiert ebenfalls auf der Messung eines abnormen DNA-Gehaltes. Allerdings wird hier der Ploidie-Status in den Tumorzellen mittels Zytometrie gemessen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen deutlich, dass die Prognose der Patienten von diploiden über tetraploide zu aneuploiden Tumorzellen immer schlechter wird. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Kombination des Ploidie-Status mit den Deletionen von 6q15 und PTEN dazu beiträgt, die Patienten in den einzelnen Ploidie-Gruppen noch weiter zu klassifizieren ⁵⁷. Anzunehmen ist, dass eine Kombination aus dem hier gebildeten Deletions-Score mit dem Ploidie-Status ein idealer „Mini-Classifier“, zur Unterstützung der prognostischen Aussagekraft der bisher etablierten Prognose-Parameter wäre. Die klinische Anwendbarkeit dieses „Mini-Classifiers“ wird außerdem durch die Tatsache unterstützt, dass die Untersuchungen des Deletions-Scores an Gewebe im TMA-Format durchgeführt wurden. Damit ist die Menge des benötigten Gewebes vergleichbar mit der zur Verfügung stehenden Menge an Tumorgewebe im Biopsie-Material. Darüber hinaus bietet die Anwendung des hier vorgeschlagenen Deletions-Scores mittels FISH den klaren Vorteil, dass die Analyse in-situ direkt am gewonnenen Gewebe erfolgt und damit klar beurteilt werden kann, ob ein Verlust der Kopiezahl in den Tumorzellen vorliegt oder auch nicht.

Die Analyse von Deletionen mittels FISH hat generell den Vorteil, dass hiermit eine Methode zur Verfügung steht, mit der schnell, einfach und kostengünstig die Bestimmung von Kopiezahlverlusten erfolgen kann. Der Nachteil in Bezug auf den Deletions-Score ist jedoch, dass die Anzahl der Regionen, die in einer Analyse untersucht werden können, auf Grund der zur Verfügung stehenden Fluoreszenz-Farbstoffe limitiert ist. Hinzu kommt, dass für den sicheren Nachweis einer Deletion immer die Kombination aus einer Zentromer-Sonde und einer „Gen“-Sonde verwendet werden sollte. Dies

dient dazu, falsch positive Ergebnisse auf Grund von Schnittartefakten ausschließen zu können. Basierend auf diesen Ergebnissen muss für die Verwendung in der Routine-Diagnostik darauf hingewiesen werden, dass eventuell das Tumormaterial aus den Biopsiestanzen für die vollständige Analyse des Deletions-Scores nicht ausreichen könnte. Die Lösung könnte hier die relativ neue Methode des „Next Generation Sequencing (NGS)“ sein. Bei dieser Methode, insbesondere der Mate-Pair-End-Methode, können mehrere Regionen zeitgleich in einem Experiment untersucht werden. Das Problem besteht jedoch darin, dass diese Analyse nicht direkt am Gewebematerial erfolgt, sondern an der isolierten DNA. Des Weiteren ist das NGS-Verfahren im Moment noch wesentlich zeit- und kostenintensiver als herkömmliche DNA-Analysen, insbesondere im Vergleich zur FISH-Analyse. Neben dem NGS könnte die relativ neue Methode der Nanostring-Technologie zur Bestimmung der Kopiezahlverluste angewendet werden. Die Nanostring-Technologie bietet die Möglichkeit Array-basierte Analysen auf DNA und RNA Ebene durchzuführen. Mit dem nCounter® Copy Number Variation CodeSets können bis zu 800 unterschiedliche Genloci in nur 25 Minuten untersucht werden. Es ist vorstellbar, dass dieses System in Kombination mit dem „Mini-Classifizier“ potentielle Anwendung in der Diagnostik des Prostatakarzinoms findet.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen insbesondere darauf hin, dass in Zukunft eine Kombination der etablierten Prognose-Parameter mit dem Deletions-Score und eventuell auch dem Zytometrie-Classifizier in der Diagnostik des Prostatakarzinoms sinnvoll ist. Vor allem in Patientengruppen, deren Tumoren in der Biopsie einen geringen und damit prognostisch eher günstigen Gleason Score aufweisen, ist die Etablierung von weiteren molekularen Parametern zwingend notwendig. Grund dafür ist, dass diese Patienten die Möglichkeit haben, zunächst ein „Active Surveillance“ durchzuführen, um so eine invasive Therapie hinauszuzögern oder sogar komplett zu vermeiden. Für diese Patienten könnte der vorgeschlagene Deletions-Score eine „Ja oder Nein“-Antwort ermöglichen, welche die Entscheidung zwischen den „Therapieformen“ deutlich erleichtern würde. Es sollte daher in weiteren Analysen geklärt werden, welche prognostische Aussagekraft der Deletions-Score allein und auch in Kombination mit dem Zytometrie-Classifizier in den einzelnen Gruppen von Tumoren mit einem identischen Gleason Score ($\leq 3+3$, $3+4$, $4+3$ und $\geq 4+4$) besitzt.

Zusammenfassung

Das Prostatakarzinom ist charakterisiert durch eine hohe Prävalenz bei vergleichsweise geringer Mortalität. Eine eindeutige Identifizierung der aggressiven und lebensbedrohlichen Karzinome ist jedoch mit den heute zur Verfügung stehenden präoperativen Prognose-Parametern nicht möglich. Zur besseren Einschätzung der Prognose wurden daher einige molekulare Classifier vorgeschlagen, welche zwar teilweise kommerziell erhältlich sind, aber sich aus unterschiedlichen Gründen nicht als Standard in der Diagnostik durchsetzen konnten. Auf genomischer Ebene ist das Prostatakarzinom durch zahlreiche prognostisch relevante Deletionen in verschiedenen chromosomalen Regionen charakterisiert. Ziel der Arbeit war es zu prüfen, ob die Anzahl der Deletionen in einem Tumor die prognostische Aussagekraft dieser Alterationen erhöht. Dazu wurden sieben der zehn häufigsten Deletionsregionen (3p13, 5q, 6q, 10q23, 12p, 16q und 17q13) mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) an mehr als 12.000 Tumoren im Gewebemikroarray-Format untersucht. Dann wurde für jeden Tumor die Anzahl an Deletionen bestimmt und ein Deletions-Score gebildet, in dem die Patienten in folgende Gruppen zusammengefasst wurden: 1. Keine Deletion, 2. Eine Deletion, 3. Zwei Deletionen, 4. Drei Deletionen und 5. Mindestens vier Deletionen. Für 2.228 der untersuchten Tumoren konnte für alle Regionen der Kopiezahlstatus bestimmt werden. Von diesen hatten 808 (36%) keine Deletion, 667 (30%) eine Deletion, 444 (20%) zwei Deletionen, 206 (9%) drei Deletionen und 103 (4%) mindestens vier Deletionen. Der Deletions-Score war signifikant assoziiert mit hohen präoperativen PSA-Werten ($P=0,0224$), hohem Gleason Score ($P<0,0001$), steigendem Anteil an Gleason Grad 4 (quantitativen Gleason Score, $P<0,0001$), fortgeschrittenem Tumorstadium ($P<0,0001$), Lymphknoten-Metastasierung ($P<0,0001$) und Tumor im Resektionsrand ($P=0,0003$). Die schlechteste Prognose, gemessen am PSA-Rezidiv, hatten Patienten mit einem Deletions-Score von mindestens vier Deletionen im Tumor ($P<0,0001$). Die Wahrscheinlichkeit des PSA-Rezidivs stieg von keiner Deletion zu einer Deletion ($P<0,0001$), einer Deletion zu zwei Deletionen ($P=0,0300$), zwei Deletionen zu drei Deletionen ($P=0,0012$) und drei Deletionen zu mindestens vier Deletionen ($P=0,0337$) jeweils signifikant an. Die prognostische Relevanz des Deletions-Scores war in den multivariaten Analysen unabhängig von den etablierten Prognose-Parametern unter Berücksichtigung des klassischen Gleason Scores ($P<0,0001$) und des quantitativen Gleason Scores ($P<0,0001$). Zusammengefasst konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Menge des deletierten chromosomalen Materials eine hohe unabhängige prognostische Relevanz beim Prostatakarzinom besitzt. Die Bestimmung des Deletions-Scores oder eines vergleichbaren Classifiers kann daher als zukünftige Ergänzung der etablierten Prognose-Parameter in der Routine-Diagnostik empfohlen werden.

Abstract

Characteristic features of prostate cancer include a high prevalence but comparatively low mortality. Reliable identification of the aggressive and life-threatening carcinomas is not possible with currently available preoperative prognostic parameters. To enhance prognostic accuracy a few molecular classifiers had been suggested. Some of them are commercially available, but for various reasons none of them became the standard in routine diagnosis. On the genomic level, prostate cancer is characterized by numerous prognostic relevant deletions in different chromosomal regions. The aim of this study was to investigate the prognostic value of the number of deletions in a given tumor (i.e., the "deletion score"). For this purpose, seven highly recurrent regions of deletion (3p13, 5q, 6q, 10q23, 12p, 16q und 17q13) were analyzed by fluorescence-in-situ-hybridization (FISH) in more than 12.000 tumors in a tissue microarray format. The number of deletions per cancer was recorded and patients were grouped according to the deletion score: 1. no deletion, 2. one deletion, 3. two deletions, 4. three deletions and 5. at least four deletions. It was possible to verify the number of deletions in all regions in 2,228 of the examined tumors. Among these, 808 (36%) had no deletion, 667 (30%) one deletion, 444 (20%) two deletions, 206 (9%) three deletions and 103 (4%) at least four deletions. A high deletion score was significantly associated with a high PSA-level ($P=0.0224$), a high Gleason Score ($P<0.0001$), an increasing percentage of Gleason Grade 4 (quantitative Gleason Score, $P<0.0001$), advanced tumor stage ($P<0.0001$), lymph node metastasis ($P<0.0001$) and a positive resection margin ($P=0.0003$). The deletion score had strong impact on patient prognosis: time to recurrence was lowest for cancers without deletions (Score 0) and highest for cancers with ≥ 4 deletions ($P<0.0001$), while an increasingly worsening prognosis was found for cancers with one, two or three deletions. In multivariate analysis, the prognostic relevance of the deletion score was independent of the established prognostic parameters such as the classic Gleason Score ($P<0.0001$) and the quantitative Gleason Score ($P<0.0001$). In summary, the present study shows, that the amount of deleted chromosomal material has a high independent prognostic relevance for prostate cancer. Therefore, the determination of the deletion score or a similar classifier can be recommended for a future complement to the established prognostic parameters in the routine-diagnostic.

Literaturverzeichnis

1. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians* 2015;**65**: 87-108.
2. Center MM, Jemal A, Lortet-Tieulent J, Ward E, Ferlay J, Brawley O, Bray F. International variation in prostate cancer incidence and mortality rates. *Eur Urol* 2012;**61**: 1079-92.
3. *GBE kompakt: Ausgabe 04/2012 - Epidemiologie und Früherkennung häufiger Krebserkrankungen in Deutschland [Gesundheitsberichterstattung - GBE kompakt, August 2012]* ed. <http://www.gbe-bund.de/>.
4. Rohde V, Katalinic A, Wasem J, Aidelburger P. *Gesundheitsberichterstattung des Bundes; Heft 36: Prostataerkrankungen*., 2007.
5. *Robert Koch-Institut (Hrsg), (2015) Gesundheit in Deutschland. Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Gemeinsam getragen von RKI und Destatis.*
RKI, Berlin.
6. Kyle G. Digital rectal examination. *Nurs Times* 2011;**107**: 18-9.
7. Howanitz JH. Prostate specific antigen (PSA). *Dis Markers* 1993;**11**: 3-10.
8. Gleason DF. Histologic grading of prostate cancer: a perspective. *Human pathology* 1992;**23**: 273-9.
9. Delahunt B, Miller RJ, Srigley JR, Evans AJ, Samarasinghe H. Gleason grading: past, present and future. *Histopathology* 2012;**60**: 75-86.
10. Zentrum für Krebsregisterdaten, Robert Koch Institut (2012), <http://www.krebsdaten.de/>, Stand 31.03.2016.
11. Verigos J, Magklara A. Revealing the Complexity of Breast Cancer by Next Generation Sequencing. *Cancers (Basel)* 2015;**7**: 2183-200.
12. Semenova EA, Nagel R, Berns A. Origins, genetic landscape, and emerging therapies of small cell lung cancer. *Genes Dev* 2015;**29**: 1447-62.
13. Weischenfeldt J, Simon R, Feuerbach L, Schlangen K, Weichenhan D, Minner S, Wuttig D, Warnatz HJ, Stehr H, Rausch T, Jäger N, Gu L, et al. Integrative genomic analyses reveal androgen-driven somatic alteration landscape in early-onset prostate cancer. *Cancer Cell* 2013;**23**: 159-70.
14. Berger MF, Lawrence MS, Demichelis F, Drier Y, Cibulskis K, Sivachenko AY, Sboner A, Esgueva R, Pflueger D, Sougnez C, Onofrio R, Carter SL, et al. The genomic complexity of primary human prostate cancer. *Nature* 2011;**470**: 214-20.
15. Taylor BS, Schultz N, Hieronymus H, Gopalan A, Xiao Y, Carver BS, Arora VK, Kaushik P, Cerami E, Reva B, Antipin Y, Mitsiades N, et al. Integrative genomic profiling of human prostate cancer. *Cancer Cell* 2010;**18**: 11-22.
16. Sun J, Liu W, Adams TS, Sun J, Li X, Turner AR, Chang B, Kim JW, Zheng SL, Isaacs WB, Xu J. DNA copy number alterations in prostate cancers: a combined analysis of published CGH studies. *The Prostate* 2007;**67**: 692-700.
17. Williams JL, Greer PA, Squire JA. Recurrent copy number alterations in prostate cancer: an in silico meta-analysis of publicly available genomic data. *Cancer genetics* 2014;**207**: 474-88.

18. Minner S, Enodien M, Sirma H, Luebke AM, Krohn A, Mayer PS, Simon R, Tennstedt P, Muller J, Scholz L, Brase JC, Liu AY, 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**: 5878-88.
19. Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, Dhanasekaran SM, Mehra R, Sun XW, Varambally S, Cao X, Tchinda J, Kuefer R, Lee C, Montie JE, et al. Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science* 2005;**310**: 644-8.
20. Kluth M, Ahrary R, Hube-Magg C, Ahmed M, Volta H, Schwemin C, Steurer S, Wittmer C, Wilczak W, Burandt E, Krech T, Adam M, et al. Genomic deletion of chromosome 12p is an independent prognostic marker in prostate cancer. *Oncotarget* 2015;**6**: 27966-79.
21. Kluth M, Harasimowicz S, Burkhardt L, Grupp K, Krohn A, Prien K, Gjoni J, Hass T, Galal R, Graefen M, Haese A, Simon R, et al. Clinical significance of different types of p53 gene alteration in surgically treated prostate cancer. *International journal of cancer Journal internationale du cancer* 2014;**135**: 1369-80.
22. Kluth M, Hesse J, Heini A, Krohn A, Steurer S, Sirma H, Simon R, Mayer PS, Schumacher U, Grupp K, Izbicki JR, Pantel 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**: 975-83.
23. Kluth M, Runte F, Barow P, Omari J, Abdelaziz ZM, Paustian L, Steurer S, Christina Tsourlakis M, Fisch M, Graefen M, Tennstedt P, Huland H, et al. Concurrent deletion of 16q23 and PTEN is an independent prognostic feature in prostate cancer. *International journal of cancer Journal internationale du cancer* 2015;**137**: 2354-63.
24. Krohn A, Diedler T, Burkhardt L, Mayer PS, De Silva C, Meyer-Kornblum M, Kotschau D, Tennstedt P, Huang J, Gerhauser C, Mader M, Kurtz S, et al. Genomic deletion of PTEN is associated with tumor progression and early PSA recurrence in ERG fusion-positive and fusion-negative prostate cancer. *Am J Pathol* 2012;**181**: 401-12.
25. Krohn A, Seidel A, Burkhardt L, Bachmann F, Mader M, Grupp K, Eichenauer T, Becker A, Adam M, Graefen M, Huland H, Kurtz S, et al. Recurrent deletion of 3p13 targets multiple tumour suppressor genes and defines a distinct subgroup of aggressive ERG fusion-positive prostate cancers. *The Journal of pathology* 2013;**231**: 130-41.
26. Burkhardt L, Fuchs S, Krohn A, Masser S, Mader M, Kluth M, Bachmann F, Huland H, Steuber T, Graefen M, Schlomm T, Minner S, et al. CHD1 is a 5q21 tumor suppressor required for ERG rearrangement in prostate cancer. *Cancer research* 2013;**73**: 2795-805.
27. 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**: 1019-24.
28. Sauter G, Steurer S, Clauditz TS, Krech T, Wittmer C, Lutz F, Lennartz M, Janssen T, Hakimi N, Simon R, von Petersdorff-Campen M, Jacobsen F, et al. Clinical Utility of Quantitative Gleason Grading in Prostate Biopsies and Prostatectomy Specimens. *Eur Urol* 2016;**69**: 592-8.
29. Burdelski C, Bujupi E, Tsourlakis MC, Hube-Magg C, Kluth M, Melling N, Lebok P, Minner S, Koop C, Graefen M, Heinzer H, Wittmer C, et al. Loss of SOX9 Expression Is Associated with PSA Recurrence in ERG-Positive and PTEN Deleted Prostate Cancers. *PLoS One* 2015;**10**: e0128525.

30. Burdelski C, Kleinhans S, Kluth M, Hube-Magg C, Minner S, Koop C, Graefen M, Heinzer H, Tsourlakis MC, Wilczak W, Marx A, Sauter G, et al. Reduced AZGP1 expression is an independent predictor of early PSA recurrence and associated with ERG-fusion positive and PTEN deleted prostate cancers. *International journal of cancer Journal international du cancer* 2015.
31. Melling N, Harutyunyan L, Hube-Magg C, Kluth M, Simon R, Lebok P, Minner S, Tsourlakis MC, Koop C, Graefen M, Adam M, Haese A, et al. High-Level HOOK3 Expression Is an Independent Predictor of Poor Prognosis Associated with Genomic Instability in Prostate Cancer. *PLoS One* 2015;**10**: e0134614.
32. Tsourlakis MC, Schoop M, Plass C, Huland H, Graefen M, Steuber T, Schlomm T, Simon R, Sauter G, Sirma H, Minner S. Overexpression of the chromatin remodeler death-domain-associated protein in prostate cancer is an independent predictor of early prostate-specific antigen recurrence. *Human pathology* 2013.
33. Tsourlakis MC, Weigand P, Grupp K, Kluth M, Steurer S, Schlomm T, Graefen M, Huland H, Salomon G, Steuber T, Wilczak W, Sirma H, et al. betaIII-Tubulin Overexpression Is an Independent Predictor of Prostate Cancer Progression Tightly Linked to ERG Fusion Status and PTEN Deletion. *Am J Pathol* 2013.
34. Schlomm T, Erbersdobler A, Mirlacher M, Sauter G. Molecular staging of prostate cancer in the year 2007. *World J Urol* 2007;**25**: 19-30.
35. Desotelle J, Truong M, Ewald J, Weeratunga P, Yang B, Huang W, Jarrard D. CpG island hypermethylation frequently silences FILIP1L isoform 2 expression in prostate cancer. *J Urol* 2013;**189**: 329-35.
36. Heichman KA, Warren JD. DNA methylation biomarkers and their utility for solid cancer diagnostics. *Clin Chem Lab Med* 2012;**50**: 1707-21.
37. Van Neste L, Herman JG, Otto G, Bigley JW, Epstein JI, Van Criekinge W. The epigenetic promise for prostate cancer diagnosis. *The Prostate* 2012;**72**: 1248-61.
38. Parr RL, Dakubo GD, Thayer RE, McKenney K, Birch-Machin MA. Mitochondrial DNA as a potential tool for early cancer detection. *Hum Genomics* 2006;**2**: 252-7.
39. Knezevic D, Goddard AD, Natraj N, Cherbavaz DB, Clark-Langone KM, Snable J, Watson D, Falzarano SM, Magi-Galluzzi C, Klein EA, Quale C. Analytical validation of the Oncotype DX prostate cancer assay - a clinical RT-PCR assay optimized for prostate needle biopsies. *BMC Genomics* 2013;**14**: 690.
40. Cuzick J, Swanson GP, Fisher G, Brothman AR, Berney DM, Reid JE, Mesher D, Speights VO, Stankiewicz E, Foster CS, Moller H, Scardino P, et al. Prognostic value of an RNA expression signature derived from cell cycle proliferation genes in patients with prostate cancer: a retrospective study. *Lancet Oncol* 2011;**12**: 245-55.
41. Shipitsin M, Small C, Choudhury S, Giladi E, Friedlander S, Nardone J, Hussain S, Hurley AD, Ernst C, Huang YE, Chang H, Nifong TP, et al. Identification of proteomic biomarkers predicting prostate cancer aggressiveness and lethality despite biopsy-sampling error. *Br J Cancer* 2014;**111**: 1201-12.
42. Murphy L, Prencipe M, Gallagher WM, Watson RW. Commercialized biomarkers: new horizons in prostate cancer diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn* 2015;**15**: 491-503.
43. Boorjian SA, Thompson RH, Tollefson MK, Rangel LJ, Bergstralh EJ, Blute ML, Karnes RJ. Long-term risk of clinical progression after biochemical recurrence following radical prostatectomy: the impact of time from surgery to recurrence. *Eur Urol* 2011;**59**: 893-9.
44. Hieronymus H, Schultz N, Gopalan A, Carver BS, Chang MT, Xiao Y, Heguy A, Huberman K, Bernstein M, Assel M, Murali R, Vickers A, et al. Copy number alteration

- burden predicts prostate cancer relapse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;**111**: 11139-44.
45. Lalonde E, Ishkanian AS, Sykes J, Fraser M, Ross-Adams H, Erho N, Dunning MJ, Halim S, Lamb AD, Moon NC, Zafarana G, Warren AY, et al. Tumour genomic and microenvironmental heterogeneity for integrated prediction of 5-year biochemical recurrence of prostate cancer: a retrospective cohort study. *Lancet Oncol* 2014;**15**: 1521-32.
46. Holtzhauer M. *Biochemische Labormethoden*ed. 3. Auflage: Springer-Verlag/Berlin Heidelberg, 1997.
47. Nocito A, Bubendorf L, Tinner EM, Suess K, Wagner U, Forster T, Kononen J, Fijan A, Bruderer J, Schmid U, Ackermann D, Maurer R, et al. Microarrays of bladder cancer tissue are highly representative of proliferation index and histological grade. *The Journal of pathology* 2001;**194**: 349-57.
48. Ruiz C, Seibt S, Al Kuraya K, Siraj AK, Mirlacher M, Schraml P, Maurer R, Spichtin H, Torhorst J, Popovska S, Simon R, Sauter G. Tissue microarrays for comparing molecular features with proliferation activity in breast cancer. *International journal of cancer Journal international du cancer* 2006;**118**: 2190-4.
49. Bubendorf L, Kononen J, Koivisto P, Schraml P, Moch H, Gasser TC, Willi N, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP. Survey of gene amplifications during prostate cancer progression by high-throughout fluorescence in situ hybridization on tissue microarrays. *Cancer research* 1999;**59**: 803-6.
50. Mirlacher M, Simon R. Recipient block TMA technique. *Methods Mol Biol* 2010;**664**: 37-44.
51. Sauter G. Representativity of TMA studies. *Methods in molecular biology* 2010;**664**: 27-35.
52. Schlomm T, Iwers L, Kirstein P, Jessen B, Kollermann J, Minner S, Passow-Drolet A, Mirlacher M, Milde-Langosch K, Graefen M, Haese A, Steuber T, et al. Clinical significance of p53 alterations in surgically treated prostate cancers. *Mod Pathol* 2008;**21**: 1371-9.
53. Muller 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. *International journal of cancer Journal international du cancer* 2013;**132**: 1333-40.
54. Grupp K, Ospina-Klinck D, Tsourlakis MC, Koop C, Wilczak W, Adam M, Simon R, Sauter G, Izbicki JR, Graefen M, Huland H, Steurer S, et al. NY-ESO-1 expression is tightly linked to TMPRSS2-ERG fusion in prostate cancer. *The Prostate* 2014;**74**: 1012-22.
55. Grupp K, Boumesli R, Tsourlakis MC, Koop C, Wilczak W, Adam M, Sauter G, Simon R, Izbicki JR, Graefen M, Huland H, Steurer S, et al. The prognostic impact of high Nijmegen breakage syndrome (NBS1) gene expression in ERG-negative prostate cancers lacking PTEN deletion is driven by KPNA2 expression. *International journal of cancer Journal international du cancer* 2014;**135**: 1399-407.
56. Lapointe J, Li C, Higgins JP, van de Rijn M, Bair E, Montgomery K, Ferrari M, Egevad L, Rayford W, Bergerheim U, Ekman P, DeMarzo AM, et al. Gene expression profiling identifies clinically relevant subtypes of prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;**101**: 811-6.
57. Lennartz M, Minner S, Brasch S, Wittmann H, Paterna L, Angermeier K, Ozturk E, Shihada R, Ruge M, Kluth M, Koop C, Wilczak W, et al. The Combination of DNA Ploidy Status and PTEN/6q15 Deletions Provides Strong and Independent Prognostic Information in Prostate Cancer. *Clin Cancer Res* 2016.

Danksagung

Prof. Dr. med. Guido Sauter danke ich für die Vergabe des interessanten Promotions-themas und für die Möglichkeit, diese Arbeit am Institut für Pathologie des Universitäts-klinikums Hamburg-Eppendorf durchführen zu können.

Mein besonderer Dank gilt auch Frau Dr. rer. nat. Martina Kluth. Ihre hervorragende Beratung, Betreuung und Unterstützung haben maßgeblich zur Erstellung der Arbeit beigetragen.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Philipp Jorge Max Barow
Wohnort: Maria-Louisen-Straße 55, 22301 Hamburg
Geburtsdatum: 17.07.1987
Geburtsort: Hamburg
Staatsangehörigkeit: Deutsch

Schulische Ausbildung

1994-1998 Reventlouschule(Grundschule), Kiel
1998-2007 Ricarda-Huch-Schule(Gymnasium), Kiel
Abschluss: Abitur

Berufliche Erfahrungen und Qualifikationen

10/2007-07/2008 Zivildienst am Lubinus-Clinicum, Kiel
09/2008-01/2009 Ausbildung an der MedEcole, Kiel
Abschluss: Rettungssanitäter
01/2009-08/2009 Ehrenamtliche Mitarbeit im Rettungsdienst der Malteser, Kiel

Studium

09/2009-08/2011 Studium an der Semmelweis-Universität, Budapest
Bestehen des 1. Staatsexamens mit der Note -sehr gut-
10/2011-12/2015 Studium an der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf
10/2014 Bestehen des 2. Staatsexamens mit der Note -sehr gut-
11/2014-10/2015 Praktisches Jahr:
1. Tertial: Allgemeinchirurgie
K.A.T.H in Kumasi, Ghana
Asklepios Klinik Barmbek, Hamburg
2.Tertial: Innere Medizin
BWKrankenhaus Hamburg
3.Tertial: Orthopädie/Unfallchirurgie
Schön Klinik Eilbek, Hamburg
12/2015 Bestehen des 3. Staatsexamens mit der Note -sehr gut-

Ort, Datum

Unterschrift

Eidesstattliche Versicherung

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

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

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

Ort, Datum

Unterschrift