

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Pathologie: Molekularpathologie

Direktor: Professor Dr. med. Guido Sauter

Prävalenz und klinische Signifikanz der 16q-Deletionsgröße beim Prostatakarzinom

Dissertation

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

vorgelegt von:

Sohall Frogh
aus Eschweiler

Hamburg 2017

Angenommen von der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 06.02.2018

Veröffentlicht mit Genehmigung der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:

Prof. Dr. Guido Sauter

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in:

Prof. Dr. Tobias Lange

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| 1. Einleitung | 5 |
| 1.1 Das Prostatakarzinom | 5 |
| 1.1.1 Epidemiologie des Prostatakarzinoms | 5 |
| 1.1.2 Diagnostik des Prostatakarzinoms..... | 5 |
| 1.1.3 Prognostische Faktoren beim Prostatakarzinom | 5 |
| 1.1.4 Therapie des Prostatakarzinoms..... | 6 |
| 1.2 Genomische Veränderungen beim Prostatakarzinom | 7 |
| 1.2.1 Translokationen..... | 7 |
| 1.2.2 Deletionen..... | 8 |
| 1.3 Die 16q-Deletion beim Prostatakarzinom..... | 9 |
| 1.4 Zielsetzung der Arbeit | 11 |
| 2. Material und Methoden | 11 |
| 2.1 Patientenkollektiv/ Prognose-Gewebemikroarray (TMA)..... | 11 |
| 2.2 Escherichia Coli Klone | 12 |
| 2.3 Reagenzien und Kits | 13 |
| 2.4 Geräte..... | 14 |
| 2.5 Verbrauchsmaterialien | 14 |
| 2.6 Software und Datenbanken..... | 15 |
| 2.7 Herstellung der FISH-Sonden | 15 |
| 2.7.1 Plasmid Isolierung aus DH10B E.coli | 15 |
| 2.7.2 Bestimmung der DNA-Konzentration | 16 |
| 2.7.3 Nick Translation | 16 |
| 2.7.4 Sondenaufreinigung | 16 |
| 2.8 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)..... | 17 |
| 2.8.1 Vorbehandlung des Gewebes | 17 |
| 2.8.2 Hybridisierung der FISH-Sonden | 17 |
| 2.8.3 Waschprozess..... | 18 |
| 2.9 Auswertung | 18 |
| 2.9.1 Mikroskopische Auswertung | 18 |
| 2.9.2 Statistische Auswertung | 18 |
| 3. Ergebnisse..... | 20 |

| | |
|---|----|
| 3.1 Auswertbarkeit des TMAs mittels FISH..... | 20 |
| 3.2 Häufigkeit und Korrelation der 16q21, 16q23 und 16q24 Deletion mit den klinisch-pathologischen Parametern des Prostatakarzinoms | 20 |
| 3.3 Architektur der 16q-Deletion in der FISH-Analyse..... | 21 |
| 3.4 Assoziation der 16q-Deletionsgröße mit dem Tumorphänotyp..... | 22 |
| 3.4 Prognostische Relevanz der 16q Deletionsgröße beim Prostatakarzinom..... | 23 |
| 3.5 Prognostische Aussagekraft der 16q Deletionsgröße in Bezug auf die etablierten prognostischen Parameter beim Prostatakarzinom | 25 |
| 4. Diskussion..... | 26 |
| 5. Zusammenfassung | 31 |
| 6. Abstract | 32 |
| 7. Literaturverzeichnis | 33 |
| 8. Abkürzungsverzeichnis | 37 |
| 9. Abbildungsverzeichnis | 38 |
| 10. Tabellenverzeichnis..... | 38 |
| 11. Danksagung..... | 39 |
| 12. Eidesstattliche Erklärung..... | 40 |

1. Einleitung

1.1 Das Prostatakarzinom

1.1.1 Epidemiologie des Prostatakarzinoms

Mit einer weltweiten Anzahl von 903.500 Neuerkrankungen zählt das Prostatakarzinom zu den am häufigsten diagnostizierten Malignomen des Mannes und verursacht 6% von allen krebsbedingten Todesfällen (n=258.400). Im weltweiten Vergleich fällt auf, dass das Prostatakarzinom das häufigste Karzinom des Mannes in den Industrieländern ist [1]. Es gibt unterschiedliche Erklärungsansätze für dieses Phänomen, wie die steigende Lebenserwartung und das PSA (Prostata-spezifische Antigen) –Screening [1]. Das Prostatakarzinom ist mit einem mittleren Erkrankungsalter von ca. 70 Jahren klar eine Erkrankung des älteren Mannes [2]. Die Divergenz zwischen Inzidenz und Mortalität ist, neben den intensivierten diagnostischen Maßnahmen, auf den meist symptomlosen Verlauf des Prostatakarzinoms zurückzuführen, so dass die Patienten eher „mit“ als „an“ einem Prostatakarzinom versterben. Dies spiegelt sich auch in der 5-Jahres-Überlebensrate von 93% wieder [2].

1.1.2 Diagnostik des Prostatakarzinoms

Im Rahmen der Krebsvorsorge wird Männern ab dem 45. Lebensjahr oft eine digitale rektale Untersuchung (DRU) und die Bestimmung des PSA-Wertes empfohlen. Eine Prostatabiopsie gilt als indiziert bei einem PSA-Wert ≥ 4 ng/ml bei erstmaliger Untersuchung, nach einem signifikanten Anstieg nach regelmäßigen Messungen und/oder einem auffälligen karzinomverdächtigen Tastbefund in der DRU. Unter transrektal-sonografischer Kontrolle werden 10-12 Gewebezyylinder entnommen, die anschließend histopathologisch ausgewertet werden [3].

1.1.3 Prognostische Faktoren beim Prostatakarzinom

Zu den klinisch relevanten Faktoren zählen das Gleason-Grading, das TNM-Stadium sowie die Untersuchung der chirurgischen Resektionsränder des Karzinoms [3]. Der Gleason-Score dient der histologischen Identifizierung der Drüsenarchitektur. Ein Gleason-Grad 1 spiegelt sehr gut differenzierte Drüsen wieder, während ein Gleason-Grad 5 einer gering differenzierten Drüse entspricht [4]. Die TNM-Stadieneinteilung erfolgt nach der aktuellen UICC Klassifikation. Hierbei wird die Ausdehnung des Primärtumors (T), das Vorkommen von Lymphknotenmetastasen

(N) und das Vorhandensein von Fernmetastasen(M) sowohl pathohistologisch als auch klinisch untersucht [3]. Der chirurgische Resektionsrand (R-Status) wird auf Vorhandensein eines Residualtumors überprüft [3]. Die etablierten prognostischen Faktoren bieten jedoch im Einzelfall oft nur eine unzureichende Darbietung des Krankheitsverlaufs und können i.d.R. erst postoperativ erhoben werden (TNM, R-Status). Bei der initialen Diagnose des Prostatakarzinoms können lediglich der Gleason-Score in der Biopsie, die Tumormenge in den Stenzen, das klinische Tumorstadium und der präoperative PSA-Wert zur Abschätzung des zu erwartenden klinischen Verlaufs verwendet werden. Anhand dieser Parameter kann allerdings der prognostische Verlauf nicht eindeutig bestimmt werden. Grund dafür ist, dass es zum Beispiel beim Gleason-Grading in der Biopsie häufig zu einer Unterschätzung des tatsächlichen Gleason-Scores kommt [5]. Basierend darauf ist es heute nicht ausreichend sicher möglich, latente von aggressiven Tumoren zu unterscheiden. Das primäre Ziel der Prostataforschung ist daher die Auffindung von Prognosefaktoren, die möglichst eine Differenzierung zwischen Tumoren mit aggressivem Verlauf von den Tumoren mit guter Prognose erlauben, um eine frühzeitige adäquate Therapieentscheidung zu unterstützen.

1.1.4 Therapie des Prostatakarzinoms

In der Therapieplanung werden neben den prognostischen Faktoren die individuellen Risiken und Wünsche des Patienten berücksichtigt. Grundsätzlich stehen dem Patienten verschiedene Therapieoptionen zur Verfügung. Neben der radikalen Prostataektomie und der Bestrahlung (perkutan oder Brachytherapie) ist auch die Aktive Überwachung („Active Surveillance“) oder das „Watchful Waiting“ möglich. „Active Surveillance“ ist eine Option für Patienten mit einer Lebenserwartung von mehr als 10 Jahren, die sich in einem frühen Stadium (T2a) befinden und im Rahmen dessen engmaschigen Kontrollen unterzogen werden. Ziel dabei ist die invasive Therapie bis zur auffälligen Progression des Tumors hinauszuzögern. „Watchful Waiting“ ist bei Patienten mit einer Lebenserwartung unter 10 Jahren möglich und dient der Verzögerung der palliativen Therapie. Die radikale Prostatektomie ist sowohl beim lokal begrenzten als auch beim lokal fortgeschrittenen Prostatakarzinom die primäre Therapiewahl. Hierbei kann es allerdings zu Nebenwirkungen wie Inkontinenz und Impotenz kommen [3]. Da eine vollkommen sichere diagnostische Differenzierung zwischen latenten und aggressiven Tumoren derzeit präoperativ nicht möglich ist, entscheiden sich trotzdem die Mehrzahl der Patienten für eine Prostataektomie, so dass es bei den meisten Patienten mit eigentlich „gutartigen“ indolenten Tumoren zu einer Übertherapie kommt. Dies zeigt umso mehr, dass dringend molekulare Prognoseparameter gebraucht werden, um die diagnostische und therapeutische Situation für den Patienten zu verbessern.

1.2 Genomische Veränderungen beim Prostatakarzinom

Im Vergleich zu anderen soliden Tumoren zeigen Prostatakarzinome nur selten Mutationen in „klassischen“ Tumorgenen [6-11]. So ist p53 zwar auch beim Prostatakarzinom eines der am häufigsten mutierten Gene, jedoch zeigen nur weniger als 5% der Tumoren eine inaktivierende p53 Mutation [12] – im Gegensatz zu 30-50% in den meisten soliden Tumortypen [13]. Vielmehr sind Prostatakarzinome durch strukturelle Chromosomenaberrationen charakterisiert. Auch hierbei gibt es zwei Prostatakarzinom-spezifische Besonderheiten: 1. Es handelt sich durchweg um Deletionen und Translokationen, während Genamplifikationen im therapienaiven Prostatakarzinom nicht auftreten [7, 8, 14-16]. 2. Die häufigste Veränderung, nämlich die TMPRSS2:ERG Fusion (siehe unten) kommt ausschließlich in Prostatakarzinomen vor [7, 8, 17]. Im Folgenden werden die häufigsten Translokationen und Deletionen kurz beschrieben.

1.2.1 Translokationen

Die häufigste Veränderung beim Prostatakarzinom ist die TMPRSS2:ERG Fusion [8, 18]. Bei dieser Aberration kommt es bedingt durch eine interstielle Deletion auf Chromosom 21 zu einer Fusion zwischen der Androgen-regulierte Serinprotease TMPRSS2 und dem Transkriptionsfaktor ERG. Durch diese Fusion gelangt das Gen ERG unter die Kontrolle des TMPRSS2-Promotors und es kommt zu einer Androgen-abhängigen ERG Expression in den betroffenen Tumorzellen [17]. Insgesamt tritt die TMPRSS2:ERG Fusion in circa 50% aller Prostatakarzinome auf [18]. Betroffen sind etwas gehäuft Patienten, bei denen bereits in jungen Jahren (unter 50 Jahre) ein Prostatakarzinom diagnostiziert wird [8]. Studien konnten zeigen, dass die TMPRSS2:ERG Fusion keine klinische Relevanz beim Prostatakarzinom hat [18-20]. Allerdings kommt es durch die ERG Expression zur Deregulation von circa 1.600 Genen [7]. Auf zellulärer Ebene entstehen so zwei unterschiedliche Gruppen von Prostatakarzinomen. Aus diesem Grund werden Prostatakarzinome häufig eingeteilt in ERG positive (mit Fusion) und ERG negative (ohne Fusion) Tumoren, um eine Einteilung und Untersuchung in molekulare Subgruppen zu ermöglichen. Neben der TMPRSS2:ERG Fusion sind weitere Fusionen und Translokationen von AR-responsiven Genen aber auch AR-unabhängigen Genen bekannt, die jedoch häufig nicht rekurrent sind und im Vergleich zur TMPRSS2:ERG Fusion und den häufigen Deletionen eher selten vorkommen [8, 21].

1.2.2 Deletionen

Das Prostatakarzinom ist charakterisiert durch zahlreiche rekurrente Deletionen, die in 10% bis 40% aller Karzinome auftreten. Zu den häufigsten deletierten Bereichen zählen die Regionen 8p, 6q12-q22, 10q23, 16q23-q24, 12p12-p13, 3p13, 5q21, 13q14, 2q22 und 17p13. [7, 12, 14, 15, 22-27] (siehe Tabelle 1). Potentielle Tumorsuppressorgene einiger Regionen sind zum Beispiel die Gene PTEN auf Chromosom 10q23 [28], RB1 auf Chromosom 13q14 [29], CDKN1B auf Chromosom 12p13 [30] und TP53 auf Chromosom 17p13 [31]. Die tatsächlich pathogenetisch entscheidenden Tumorsuppressorgene der meisten Deletionen sind jedoch bis heute nicht bekannt. Grund dafür ist vermutlich, dass die Mehrzahl der Deletionen häufig über die sogenannte minimal deletierte Region hinausgeht [7, 25]. Bemerkenswert ist außerdem, dass die meisten Deletionen mehrere Megabasen einnehmen und damit große Bereiche des betroffenen Chromosomes und auch eine Vielzahl von Genen Deletions-bedingt verloren gehen [7, 25]. Eine erste Studie am Institut für Pathologie konnte bereits zeigen, dass die Größe der 6q-Deletion im Tumor Auswirkungen auf die Prognose des Patienten besitzt [32]. Ob dieses Ergebnis ein grundsätzliches Phänomen aller Deletionen beim Prostatakarzinom darstellt, ist jedoch unklar.

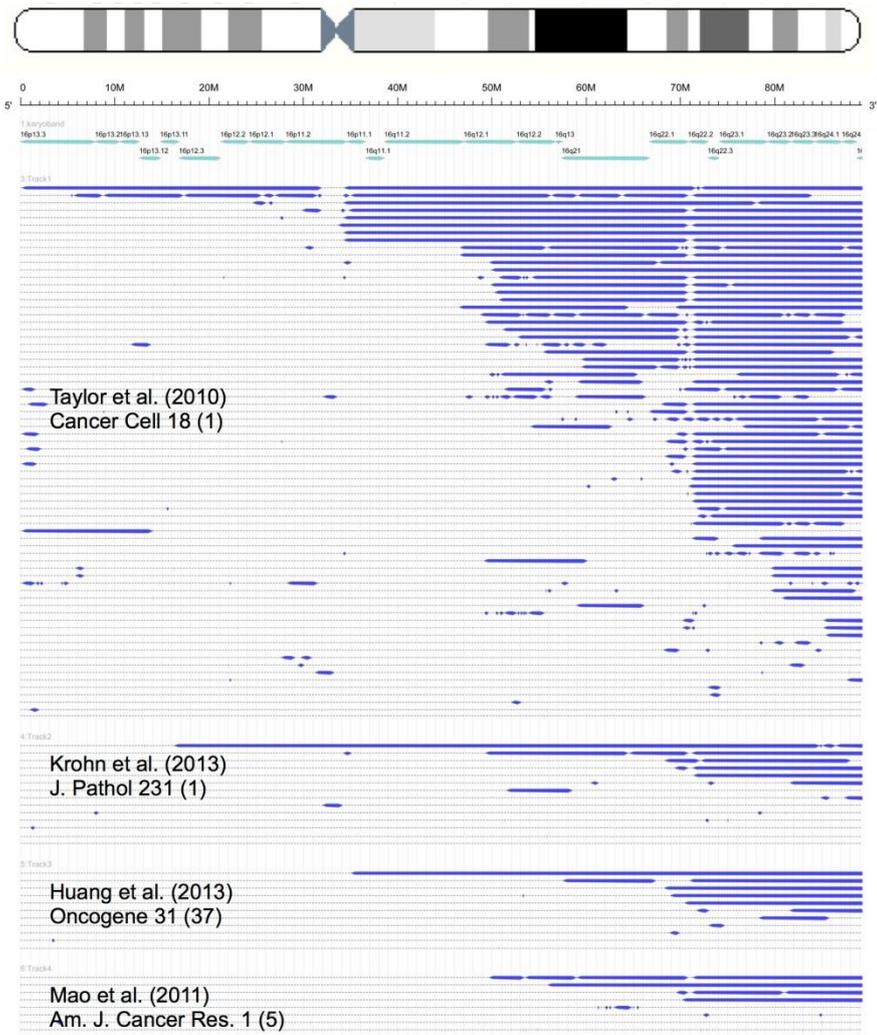
Tabelle 1: Häufige Deletionsregionen beim Prostatakarzinom. Taylor et al. 2010: aCGH-Studie an 181 Prostatatumoren [7], Williams et al. 2014: CGH und aCGH Metaanalyse an 662 Prostatatumoren [14], Sun et al. 2007: aCGH Metaanalyse an 872 Prostatatumoren [15].

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

1.3 Die 16q-Deletion beim Prostatakarzinom

Verluste auf dem langen Arm des Chromosoms 16 zählen mit einer Rate von 18% bis 83% zu den am häufigsten beschriebenen Deletionen beim Prostatakarzinom [15, 33-41]. Bisherige Studien lassen vermuten, dass die 16q-Deletionsrate mit der Tumorprogression ansteigt und in metastasierten Tumoren häufiger vorhanden ist als bei Primärtumoren [34, 36, 38]. In einer eigenen Studie der Arbeitsgruppe am Institut für Pathologie konnte mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) an über 3.500 Prostatakarzinomen außerdem gezeigt werden, dass die 16q23 Deletion vor allem in Tumoren mit einem ungünstigen Tumorphänotyp vorkommt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Patienten, deren Tumoren eine 16q23 Deletion hatten, eine höhere Wahrscheinlichkeit eines frühen PSA-Rezidivs aufzeigten als Patienten, deren Tumoren keine 16q23 Deletion hatten [24]. Studien, die mittels der klassischen oder Array-basierten komparativen genomischen Hybridisierung (CGH, aCGH) die 16q Deletion untersuchten, fanden, dass die 16q Deletion unterschiedlich große Bereiche des q-Arms einnehmen kann [7, 25, 42, 43]. Eine mittels spezieller am UKE entwickelter Software (FISHOracle) durchgeführte Re-Analyse dieser Daten lässt vermuten, dass die 16q Deletion sich vom Telomer ausgehend ausdehnt. Je nach Größe der Deletion sind daher weniger als 5 Megabasen (16q24) bis hin zu mehr als 40 Megabasen (16q12-q24) von der Deletion betroffen (siehe Abbildung 1). Ob die Deletionsgröße einen Einfluss auf die prognostische Relevanz der 16q Deletion besitzt, ist jedoch unklar.

Abbildung 1: Architektur der 16q Deletion. FISHOracle [44, 45] Darstellung von 4 aCGH Studien: Taylor et al. 2010 an 181 Prostatatumoren [7], Krohn et al. 2013 an 72 Tumoren [25], Huang et al. 2013 an 86 Prostatatumoren [42], Mao et al. 2011 an 77 Prostatatumoren [43]. Blaue Linie: Deletierte Regionen auf Chromosomen 16 in den einzelnen Tumoren, Grenzwert: -0,3



1.4 Zielsetzung der Arbeit

Die 16q Deletion zählt zu den häufigsten genomischen Veränderungen des Prostatakarzinoms, die mit einem schlechten Phänotyp dieser Tumorentität einhergeht. Da je nach Ausdehnung der 16q Deletion die Anzahl der potentiell tumorrelevanten Gene, die von der Deletion betroffen sind, variiert, ist anzunehmen, dass die prognostische Relevanz dieser Deletion von der Deletionsgröße abhängig ist. Insbesondere große Deletionen (16q21-q24) könnten eine wesentliche schlechtere Prognose aufweisen als kleine Deletionen (16q24). Um diese Hypothese zu testen, wurden in der vorliegenden Arbeit die Bereiche 16q21 und 16q24 mittels Fluoreszenz in-situ Hybridisierung an mehr als 7000 Prostatatumoren untersucht. Die Daten wurden ergänzt durch die Untersuchungen der 16q23 Region in der Studie von Kluth et al. [24]. Für jeden 16q deletierten Tumor wurde die Deletionslänge festgelegt und so eine Einteilung in kleine (16q24), mittlere (16q23-q24) und große (16q21-q24) 16q-Deletionen durchgeführt. Zur Bestimmung der klinischen Relevanz der 16q Deletionsgröße wurde dann der 16q Status mit den klinisch-pathologischen Parametern und der Patienten Prognose verglichen.

2. Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv/ Prognose-Gewebemikroarray (TMA)

Ein am Institut für Pathologie etablierter Prostata-Prognose-Array (TMA) wurde für die Analyse des 16q21 und 16q24- Aberrationsstatus mit Hilfe der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) herangezogen. Der Status der 16q23 Deletion wurde bereits in einer vorherigen Studie am Institut für Pathologie untersucht (Kluth et al.). Die verwendeten Gewebeproben stammen aus 7481 Prostataektomiepräparaten, die in der Zeit von 1992 bis 2011 am Institut für Urologie und in der Martiniklinik am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf entnommen wurden. Der TMA umfasst pro Patient eine aus einem repräsentativen Areal entnommenen Prostatakarzinomstanze mit einem Durchmesser von 0,6mm. Die verwendeten Proben stammen aus einem formalin-fixierten und in parafin-eingebetteten Tumorgewebeblock. Die Gewebestanden wurden auf 16 TMA Blöcke verteilt. Ein TMA Block beinhaltet zwischen 144 und 522 Prostatakarzinomstanzen. Klinische Follow-up Daten von 7361 der 7481 Patienten standen der Studie zur Verfügung. Ab einem postoperativen PSA-Wert von 0,2ng/ml wurde von einem PSA-Rezidiv ausgegangen. Dazu wurde der postoperative PSA-Wert in regelmäßigen Intervallen gemessen. Die folgende Tabelle 1 gibt Auskunft über Details des Patientenkollektivs hinsichtlich Alter bei Prostataektomie und klinisch-pathologischen Parametern.

Tabelle 2: Patientenkollektiv des Prostata-Gewebe-Mikroarray (TMA)

| | | Anzahl der Patienten (%) | |
|----------------------------------|---------|------------------------------------|-------------------------|
| | | Studienkohorte auf TMA (n=7482) | PSA-Rezidiv (n=1457) |
| Follow-up (Monate) | | | |
| Mittelwert | | 53,4 | - |
| Median | | 36,8 | - |
| Alter (Jahre) | ≥50 | 234 (3,2%) | 43 (18,4%) |
| | 50-60 | 1912 (25,8%) | 368 (19,2%) |
| | 60-70 | 4438 (59,9%) | 872 (19,6%) |
| | >70 | 822 (11,1%) | 172 (20,9%) |
| Präoperativer PSA (ng/ml) | <4 | 976 (13,2%) | 125 (12,8%) |
| | 4-10 | 4443 (60,3%) | 650 (14,6%) |
| | 10-20 | 1461 (19,8%) | 411 (28,1%) |
| | >20 | 488 (6,6%) | 248 (50,8%) |
| pT Kategorie (AJCC 2002) | pT2 | 4927 (66,2%) | 460 (9,3%) |
| | pT3a | 1650 (22,2%) | 477 (28,9%) |
| | pT3b | 803 (10,8%) | 472 (58,8%) |
| | pT4 | 58 (0,8%) | 48 (82,8%) |
| Gleason Grad | ≤3+3 | 2316 (31,2%) | 171 (7,4%) |
| | 3+4 | 3804 (51,2%) | 693 (18,2%) |
| | 4+3 | 1018 (13,7%) | 448 (44,0%) |
| | ≥4+4 | 287 (3,9%) | 144 (50,2%) |
| pN Kategorie | pN0 | 3963 (92,4%) | 919 (23,2%) |
| | pN+ | 328 (7,6%) | 207 (63,1%) |
| Resektionsrand | Negativ | 5921 (80,6%) | 914 (15,4%) |
| | Positiv | 1428 (19,4%) | 516 (36,1%) |

Hinweis: Die Anzahl summiert sich nicht immer auf 7.482 in den einzelnen Kategorien aufgrund von Fällen mit fehlenden Daten. Abkürzung: AJCC, American Joint Committee on Cancer, PSA: Prostata-spezifisches Antigen

2.2 Escherichia Coli Klone

Zur Herstellung der FISH-Sonden wurden mit BACs (bacterial artificial chromosome) transformierte DH10B Escherichia Coli (E.Coli) von der Firma Source Bioscience

(Cambridge, UK) verwendet. Für die 16q-Deletionssonden wurden für die Region 16q21 die BACs RP11-575-H07 und RP11-631-D06, für die Region 16q23 (WVOX) die BACs RP11-190D6 und RP11-345K17 und für die Region 16q24 die BACs RP11-788A09 und RP11-737-K02 verwendet.

2.3 Reagenzien und Kits

In der Tabelle 3 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Reagenzien aufgelistet.

Tabelle 3: Reagenzien & Kits

| Reagenzien / Kits | Firma |
|---|-------------------------------------|
| 20x SSC | Abbot, Ludwigshafen |
| CEP 6 Spectrum Aqua | 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 |
| Green 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

In der Tabelle 4 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Geräte aufgelistet.

Tabelle 4: Geräte

| 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

In der Tabelle 5 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Materialien sowie alle den normalen Laborbedarf übersteigende Verbrauchsmaterialien aufgelistet.

Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien

| 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

Die Auswahl der BAC-Klone zur Herstellung der FISH-Sonden erfolgte über die Datenbank Ensembl (GRCh38). Für die statistische Auswertung der Daten aus der FISH-Analyse wurde von der Software JMP9.0.2. Gebrauch genommen. Die Resultate wurden über Excel (2013) und Power Point (2013) dargestellt.

2.7 Herstellung der FISH-Sonden

Die Sondenherstellung für die FISH-Analyse erfolgte nach einem am Institut für Pathologie etablierten und standardisierten Protokoll.

2.7.1 Plasmid Isolierung aus DH10B E.coli

Für die Herstellung von FISH-Sonden via Nick Translation ist die Isolierung reiner Plasmid-DNA erforderlich. Die Isolierung der Plasmid-DNA aus den DH10B E.coli erfolgte mit Hilfe des NucleoBond BAC 100 Kit (Machery-Nagel, Düren, Deutschland). Die Kultivierung der E.coli sollte sicherstellen, dass eine hinreichende Menge an Plasmid-DNA für die Isolierung vorhanden ist. Die Vorkultur setzte sich zusammen aus 10 ml LB-Medium, 30 µl Chloramphenicol und mehreren kleinen Bakterienkolonien. Die angeimpfte Vorkultur wurde bei 37 °C und 190 rpm für 8 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Hauptkultur aus 250 ml LB-Medium, 750 µl Chloramphenicol und 2 ml Vorkultur angesetzt und erneut bei 37°C und 190 rpm für 16 Stunden inkubiert. Um ein Bakterienpellet herzustellen, wurde die Hauptkultur in ein Zentrifugengefäß überführt und bei 4°C und 6000g für 15 min zentrifugiert. Der S1 Buffer wurde mit RNase A versetzt und das Bakterienpellet mit 24 ml S1 Buffer resuspendiert. Um unerwünschte Zellbestandteile, u.a. die chromosomale DNA, auszufällen, wurden 24 ml S2 Buffer der Bakteriensuspension hinzugegeben und für 4 min bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf wurden 24 ml S3 Buffer zu der Bakteriensuspension pipettiert. Nach vorsichtigem Invertieren der Zentrifugenbecher per Hand, wurde die Mischung für 5 min auf Eis inkubiert. Der Überstand wurde durch einen dH2O befeuchteten Filter gegossen. Zur Isolierung der Plasmid-DNA wurde die Anionenaustauscher-Säule mit 6 ml N2 Buffer equilibriert und das Filtrat wurde auf die Säule gegeben. Die Anionenaustauscher-Säule wurde zweimal in Folge mit 18 ml N3 Buffer gewaschen. Die Elution der an der Säule gebundenen Plasmid-DNA erfolgte mit 15 ml von auf 50°C erwärmtem N5 Buffer. Das Eluat wurde mit 11 ml Isopropanol 100% vermischt und die Plasmid-DNA wurde bei 4°C und 16500 g für 30 min ausgefällt. Der Überstand wurde verworfen. Unter Zugabe von 5 ml Ethanol 70% wurde das Plasmid-DNA-Pellet bei 4°C und 16500 g für 10 min gewaschen. Nach Verwerfen des Überstandes wurde die Plasmid-DNA in 150 µl nucleasefreiem Wasser über Nacht bei 4°C gelöst.

2.7.2 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte mit Hilfe des Peqlab NanoDrop ND – 1000 UV/Vis-Spektralphotometer. Nachdem als Referenz der Leerwert mit 1,5 µl RNase freiem Wasser bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen wurde, wurden 1,5 µl der DNA-Probe bei gleicher Wellenlänge bestimmt. Eine Absorption von 1 entspricht einem DNA-Gehalt von 50 µg/ml.

2.7.3 Nick Translation

Die Nick Translation umfasst die Herstellung fluoreszenz-markierter Nukleotide, die in der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) zum Nachweis spezifischer DNA-Sequenzen genutzt werden können. Die Durchführung erfolgte mit dem Nick Translation Reagent Kit der Firma Abbott (Illinois, USA). Wegen der hohen Licht- und Temperaturempfindlichkeit wurden die Arbeiten auf Eis und in lichtundurchlässigen braunen Eppendorf-Tubes verrichtet. Zunächst wurde die isolierte Plasmid-DNA mit Nuklease-freiem Wasser auf eine Konzentration von 1 µg / 17,5 µl verdünnt. Im Anschluss wurde ein Mastermix aus 5 µl Nick Translation Buffer, 10 µl 0,1 mM dNTPs, 5 µl 0,1 mM dTTPs, 2,5 µl 0,2 mM Orange dUTPs und 10 µl Nick Translation Enzym (DNA-Polymerase I, DNase I) angesetzt. Der Mastermix wurde mit einem Vortexer durchmischt und zu der verdünnten Plasmid-DNA gegeben. Anschließend wurde die Mischung erneut gevortext und bei 2000 g für 1 Minute zentrifugiert. Dann wurden die Proben im Rahmen der Nick Translation für 8 Stunden bei 15 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch das Aufheizen auf 72°C für 10 Minuten gestoppt.

2.7.4 Sondenaufreinigung

Die Sondenreinigung mittels QIAquick Nucleotide Removal Kit (Qiaagen, Venlo, Niederlande) sollte gewährleisten, dass unerwünschte Bestandteile wie ungebundene Nukleotide oder Salze entfernt wurden. Hierfür wurde der PNI-Buffer mit 19 ml Isopropanol 100% und der PE-Buffer mit 30 ml absolutem Ethanol verdünnt. Dann wurden 500 µl PNI-Buffer zu der zuvor angefertigten Nick Translations-Probe gegeben, mit der Pipette durchmischt und auf den Filter des QIAquick spin column übertragen. Bei Raumtemperatur und 3800 g erfolgte die Zentrifugation für eine Dauer von 1 Minute. Das entstandene Eluat wurde verworfen. Dann wurden 750 µl PE-Buffer auf den Filter pipettiert und für 1 Minute bei Raumtemperatur und 3800 g zentrifugiert. Als dann das Eluat verworfen war, wurde der Filter bei Raumtemperatur und 17900 g für 1 Minute trocken zentrifugiert. Die QIAquick spin column wurde auf ein neues Eppendorf-Tube gesetzt. Hierauf wurde 60 µl DNase-freies Wasser direkt auf den Filter gegeben und für 1 Minute bei

Raumtemperatur inkubiert. Um die FISH-Sonde zu eluieren, erfolgte eine Zentrifugation bei Raumtemperatur und 17900 g für 1 Minute. Zuletzt wurden die FISH-Sonden zusammenpipettiert und in einer Vakuumszentrifuge bei 45 °C für 20 Minuten aufkonzentriert. Die hergestellte FISH-Sonde wurde bis zur Hybridisierung bei -20°C gelagert

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

2.8.1 Vorbehandlung des Gewebes

Für die Hybridisierung mit den FISH Sonden wurden die formalin-fixierten und paraffin-eingebetteten TMAs zunächst einer Vorbehandlung unterzogen. Im Rahmen der Entparaffinierung wurden die TMAs dreimal für 10 Minuten in Xylol gestellt, dann zweimal für 5 Minuten in Ethanol 96 % getaucht und schließlich auf einer Heizplatte bei 48°C für 3 Minuten getrocknet. Der Proteinverdau wurde initiiert durch eine Inkubation der TMAs für 15 Minuten in einer Pretreatment-Lösung (80°C). Dann wurden die TMAs zweimal für 1 Minute gewaschen. Nachdem die TMAs für 150 Minuten bei 37°C in einer Proteaselösung inkubierten, wurden die TMAs zweimal für 1 Minute in dH₂O gewaschen. Hierauf wurden die TMAs für je 3 Minuten in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70%, 80%, 96%) dehydriert und auf einer Heizplatte bei 48°C für 3 Minuten getrocknet.

2.8.2 Hybridisierung der FISH-Sonden

Zur Hybridisierung der TMAs ist ein Hybridisierungsmix aus 14 µl Basismix (15,0 ml Formamid, 4,5 ml 20xSSC, 3,0 g Dextransulfat), 2 µl Cot-DNA, 4 µl 16q21/24 Sonde und 0,5 µl orange-fluoreszierende Centromer 6 Sonde notwendig. Nach Vortexen des Hybridisierungsmix erfolgte eine Zentrifugation bei 2500 g für 10 Sekunden und das Pipettieren der Mischung auf die TMAs. Die TMAs wurden luftblasenfrei mit einem Deckgläschen eingedeckelt und mit Fixogum fixiert. Sobald das Fixogum getrocknet war, wurden die TMAs im Thermobrite™ (Abbot, Ludwigshafen) für 10 Minuten auf 72 °C erhitzt. Die Hybridisierung der FISH-Sonden erfolgte bei 37°C über zwei Nächte.

2.8.3 Waschprozess

Das Fixogum wurde vorsichtig von den Deckgläschen abgezogen und die TMAs wurden in einen Hybridisierungswaschpuffer gestellt. Der Hybridisierungswaschpuffer setzte sich zusammen aus 100 ml 20xSSC, 3 ml NP40 und ad 1000 ml dH₂O bei einem pH-Wert von 7,25. Die TMAs verblieben im Hybridisierungswaschpuffer bei Raumtemperatur und im Dunkeln bis sich die Deckgläschen ablösten. Parallel wurde eine zweite Küvette mit Hybridisierungswaschpuffer gefüllt und auf 72°C erhitzt. Die TMAs wurden für 2 Minuten in den erhitzten Hybridisierungswaschpuffer gestellt, mit dH₂O gewaschen und darauf für 10 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln getrocknet. Schließlich wurde 1 Tropfen DAPI für die Zellkernfärbung auf die TMAs pipettiert. Die TMAs wurden möglichst luftblasenfrei mit einem Deckgläschen eingedeckelt. Bei Luftblasen wurden diese mit einer Pipettenspitze ausgestrichen. Die fertigen TMAs wurden bis zur mikroskopischen Auswertung bei -20°C gelagert.

2.9 Auswertung

2.9.1 Mikroskopische Auswertung

Die FISH-Analyse erfolgte mittels eines Lichtmikroskops der Firma Zeiss mit den dazugehörigen Fluoreszenzfiltern. Gewebespots, die wegen einer unzureichenden Hybridisierung nur ein schwaches oder kein 16q-Signal in den Tumorzellen und Stromazellen (Referenzzellen) aufwiesen, wurden als nicht auswertbar aus der Analyse herausgenommen. Mit Hilfe einer Hämatoxylin/Eosin-Färbung konnten die Gewebespots, die kein Tumor enthielten von der Analyse ausgeschlossen werden. Zeigten sich die 16q-Signale und die Centromer 6 Signale im gleichen Verhältnis, wurde von einer normalen 16q (16q21,q23,q24) Kopiezahl ausgegangen. Eine heterozygote Deletion zeigte sich durch eine geringere Anzahl von 16q Signalen im Vergleich zu den Centromer 6 Signalen in 60% der Tumorzellkerne. Homozygote Deletionen wurden definiert durch das vollständige Fehlen der 16q-Signale bei vorhandenen Centromer 6 Signalen in den Tumorzellen und 16q/Centromer 6 Signalen in den Stromazellkernen.

2.9.2 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte unter Verwendung der Software JMP 9.0.2.. Zur Ermittlung der prognostischen Relevanz der 16q-Deletionslänge wurde ein Log-Rank-Test durchgeführt und eine Kaplan-Meier-Kurve angefertigt. Um eine

Assoziation zwischen der 16q-Deletionslänge und klinisch-pathologischen Parametern zu ermitteln wurde ein Chi-Quadrat-Test durchgeführt. Desweiteren wurde mit der Cox-Regression eine Multivariate Analyse durchgeführt, um zu testen, ob die 16q Deletionsgröße unabhängig von den etablierten Prognosemarkern eine prognostische Relevanz besitzt.

3. Ergebnisse

3.1 Auswertbarkeit des TMAs mittels FISH

Von den 7481 zur Verfügung stehenden Prostatakarzinomstanzen waren 2848 Gewebeslots für die 16q21-Deletionssonde und 2846 Gewebeslots für die 16q24-Deletionssonde mittels FISH auswertbar. Angesichts mangelhafter Hybridisierung oder dem nicht Vorhandensein von Tumorgewebe in der Stanze konnten 4633 bzw. 4635 Gewebeproben nicht für alle FISH Proben erfolgreich untersucht werden und deswegen nicht in die Analyse eingeschlossen werden. Die Daten für die Region 16q23 wurden aus einer vorherigen Studie von Kluth et al. entnommen und umfassten 3831 analysierbare Gewebeproben. Für die Bestimmung der 16q Deletionslänge waren insgesamt 2712 Tumoren für alle drei FISH-Sonden auswertbar.

3.2 Häufigkeit und Korrelation der 16q21, 16q23 und 16q24 Deletion mit den klinisch-pathologischen Parametern des Prostatakarzinoms

Eine 16q21 Deletion konnte in 10% (288/2848), eine 16q23 Deletion in 21,2% (814/3831) und eine 16q24 Deletion in 27,9% (794/2846) der analysierbaren Prostatatumoren nachgewiesen werden. Alle detektierten 16q Deletionen waren heterozygot. Homozygote Deletionen wurden nicht festgestellt. Der Zusammenhang zwischen der 16q Deletion und den klinisch-pathologischen Parametern wurde mittels eines Chi-Quadrat-Tests überprüft. Alle untersuchten 16q Regionen (16q21, 16q23, 16q24) zeigten eine signifikante Assoziation zu einem fortgeschrittenem Tumorstadium (jeweils $p < 0,0001$ für alle), einem hohen Gleason Grad (jeweils $p < 0,0001$) und dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen ($p < 0,0001$ für 16q21 und 16q23, $p < 0,0270$ für 16q24). Eine Deletion im Bereich 16q23 oder 16q24 war außerdem mit einem Tumorbefall des chirurgischen Resektionsrandes assoziiert ($p < 0,0004$ für 16q23, $p < 0,0152$ für 16q24). Eine signifikante Korrelation der drei 16q Deletionen mit einem erhöhten präoperativen PSA-Wert konnte nicht ermittelt werden. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Tabelle 6 detailliert dargestellt.

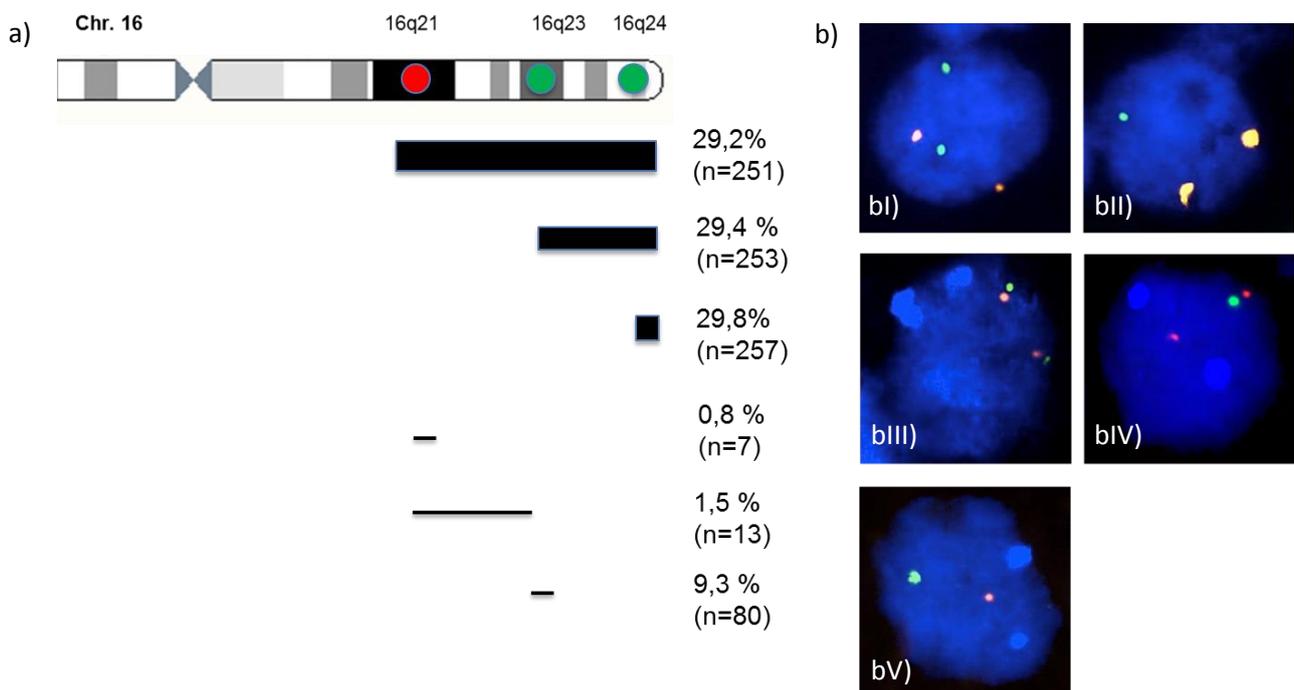
Tabelle 6: Häufigkeit und Korrelation der 16q21, 16q23 und 16q24 Deletion mit den klinisch-pathologischen Parametern des Prostatakarzinoms, PSA: Prostata-spezifisches Antigen

| | | 16q21 | | | 16q23 | | | 16q24 | | |
|------------------------------------|---------|------------------|-------------------|---------|------------------|-------------------|---------|------------------|-------------------|---------|
| | | analysierbar (n) | Deletion in % (n) | P-Wert | analysierbar (n) | Deletion in % (n) | P-Wert | analysierbar (n) | Deletion in % (n) | P-Wert |
| alle Tumoren | | 2848 | 10,1 (288) | | 3831 | 21,2 (814) | | 2846 | 27,9 (794) | |
| Tumorstadium | pT2 | 1728 | 8,0 (139) | <0,0001 | 2366 | 17,3 (409) | <0,0001 | 1727 | 23,5 (406) | <0,0001 |
| | pT3a | 737 | 12,9 (95) | | 956 | 24,1 (230) | | 737 | 32,8 (242) | |
| | ≥pT3b | 372 | 13,4 (45) | | 489 | 33,9 (156) | | 371 | 37,7 (132) | |
| Gleason-Grad | ≤3+3 | 730 | 4,9 (36) | <0,0001 | 1051 | 13,4 (141) | <0,0001 | 730 | 17,9 (131) | <0,0001 |
| | 3+4 | 1526 | 9 (138) | | 2008 | 20,4 (410) | | 1526 | 27,5 (420) | |
| | 4+3 | 462 | 18,2 (84) | | 597 | 33,2 (198) | | 460 | 40,7 (187) | |
| | ≥4+4 | 114 | 21,1 (24) | | 148 | 35,1 (52) | | 114 | 41,2 (47) | |
| Lymphknotenstatus | N0 | 1604 | 9,9 (158) | <0,0001 | 2092 | 21,6 (451) | <0,0001 | 1603 | 28,1 (450) | 0,0270 |
| | N+ | 144 | 18,8 (27) | | 188 | 36,7 (69) | | 144 | 40,3 (58) | |
| Status des Resektionsrandes | negativ | 2194 | 9,5 (208) | 0,1134 | 2960 | 19,8 (585) | 0,0004 | 2194 | 26,5 (581) | 0,0152 |
| | positiv | 598 | 11,7 (70) | | 806 | 25,6 (206) | | 596 | 31,5 (188) | |
| PSA präOP (ng/μl) | <4 | 339 | 9,7 (33) | 0,8211 | 451 | 20,2 (91) | 0,0505 | 339 | 25,7 (87) | 0,3720 |
| | >20 | 223 | 9 (20) | | 295 | 25,8 (76) | | 223 | 31,8 (71) | |
| | 10-20 | 590 | 11 (65) | | 789 | 23,3 (184) | | 588 | 29,1 (171) | |
| | 4-10 | 1656 | 10 (166) | | 2239 | 20 (448) | | 1656 | 27,4 (454) | |

3.3 Architektur der 16q-Deletion in der FISH-Analyse

Zur Bestimmung der 16q Deletionslänge wurden 2712 Tumoren verwendet, da diese für alle drei 16q-Sonden auswertbar waren. Insgesamt wurde in 763 (28,1%) Tumoren eine 16q Deletion nachgewiesen. Von diesen zeigten 258 (33,8%) eine kleine 16q24 Deletionen, 254 (33,3%) eine mittlere 16q23-q24 Deletion und 251 (32,9%) eine große 16q21-q24 Deletion. Insgesamt zeigte sich durch die Analyse eine vom Telomer ausgehende Trichter-förmige Struktur der 16q-deletion (siehe Abbildung 2).

Abbildung 2: Architektur der 16q-Deletion in der FISH-Analyse a) Größe und Häufigkeit der unterschiedlichen 16q Deletionen b) Exemplarische Beispiele der FISH-Analyse bI: normaler 16q23 Kopiezahl Status mit 2 grünen 16q23 Signalen und 2 orangenen Zentromer 6 Signalen, bII: deletierter 16q23 Kopiezahl Status mit 1 grünen 16q23 Signal und 2 orangenen Zentromer 6 Signalen, bIII: normaler 16q21 und 16q24 Kopiezahl Status mit 2 roten 16q21 Signalen und 2 grünen 16q24 Signalen und 2 blauen Zentromer 6 Signalen, bIV: deletierter 16q24 Kopiezahl Status mit 2 roten 16q21 Signalen, 1 grünen 16q24 Signal und 2 blauen Zentromer 6 Signalen und bV: deletierter 16q21 und 16q24 Kopiezahl Status mit 1 roten 16q21, 1 grünen 16q24 und 2 blauen Zentromer 6 Signalen.



3.4 Assoziation der 16q-Deletionsgröße mit dem Tumorphänotyp

Um zu prüfen, ob die 16q Deletionsgröße einen Einfluss auf den malignen Phänotyp der Prostatakarzinome besitzt, wurde ein Chi-Quadrat-Test durchgeführt, indem der Zusammenhang zwischen der 16q Deletionsgröße und den klinisch-pathologischen Parametern getestet wurde. Diese Analyse zeigte, einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Deletionsgröße und dem Tumorphänotyp im Bezug auf das Tumorstadium ($p < 0,0001$) und dem Gleason Grad ($p = 0,0019$). Der Anteil an Tumoren mit einer kleinen 16q24 Deletion nahm mit steigendem Tumorstadium (pT2: 40,4% zu \geq pT3b: 25,8%) und erhöhtem Gleason Grad ($\leq 3+3$: 49,2% zu $\geq 4+4$: 20,0%) ab. Im Gegensatz dazu nahmen die Tumoren mit einer mittleren 16q23-q24 Deletion und einer großen 16q21-q24 Deletion mit steigendem Tumorgrad (pT2: 28,6%/30,1% zu \geq pT3b: 42,4%/31,8%) und einem höherem Gleason Grad ($\leq 3+3$:

28,2%/22,6% zu $\geq 4+4$: 33,3%/46,7%) zu. Ein geringer Unterschied in der Verteilung der Deletionsgröße konnte außerdem im Bezug auf den präoperativen PSA-Wert festgestellt werden ($p=0,0197$). Hier nahm der Anteil an Tumoren mit einer mittleren 16q23-24 Deletion mit steigendem PSA-Wert (PSA<4ng/ μ l: 29,9% zu PSA:>20 ng/ μ l) zu. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7: Assoziation der 16q-Deletionsgröße mit dem Tumorphänotyp, PSA: Prostata-spezifisches Antigen

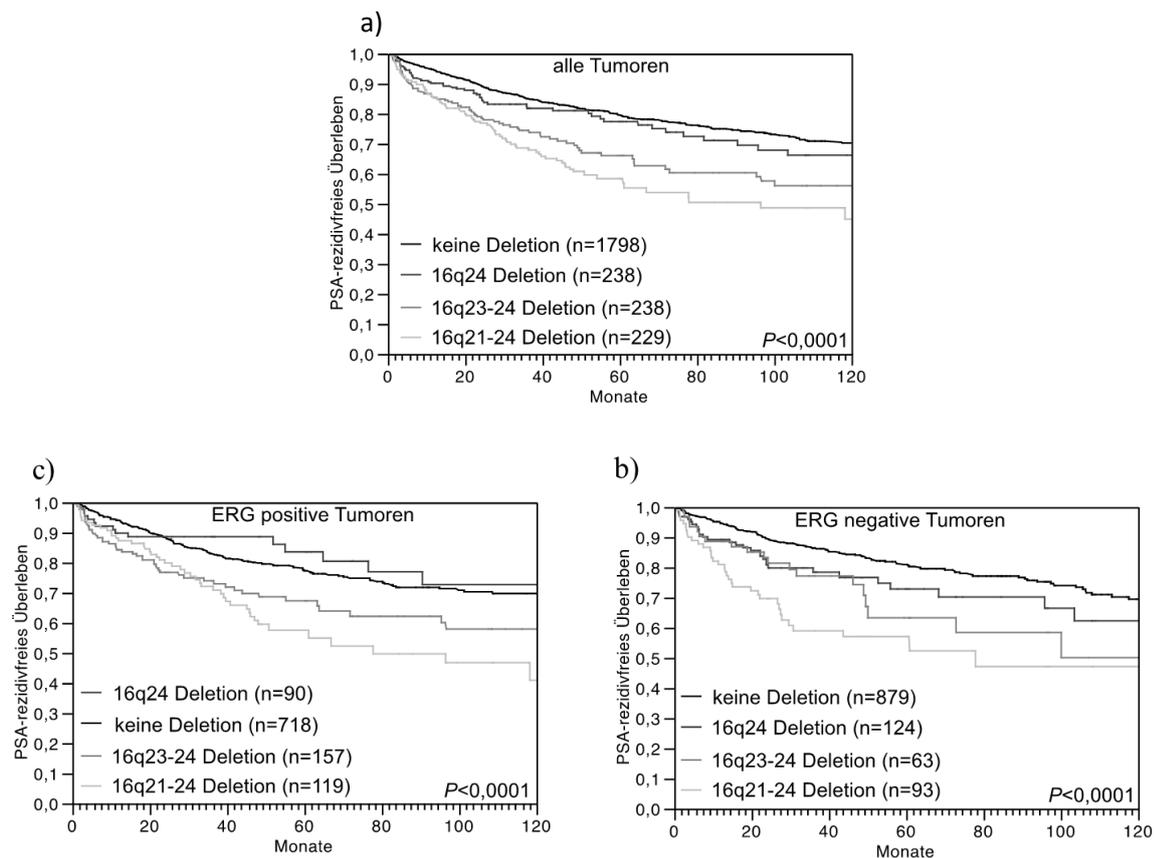
| | | analysierbar (n) | kleine (16q24) Deletion in % (n) | mittlere (16q23- q24) Deletion in % (n) | große (16q21-q24) Deletion in % (n) | P-Wert |
|---|-------------|---------------------|-------------------------------------|---|--|---------|
| alle Tumoren | | 763 | 33,8 (258) | 33,3 (254) | 32,9 (251) | |
| Tumorstadium | pT2 | 391 | 40,4 (158) | 28,6 (112) | 30,9 (121) | <0,0001 |
| | pT3a | 234 | 28,2 (66) | 35,9 (84) | 35,9 (84) | |
| | \geq pT3b | 132 | 25,8 (32) | 42,4 (55) | 31,8 (37) | |
| Gleason-Grad | $\leq 3+3$ | 124 | 49,2 (61) | 28,2 (35) | 22,6 (28) | 0,0019 |
| | 3+4 | 404 | 35,9 (145) | 33,4 (135) | 30,7 (124) | |
| | 4+3 | 181 | 23,8 (43) | 36,5 (66) | 39,8 (72) | |
| | $\geq 4+4$ | 45 | 20 (9) | 33,3 (15) | 46,7 (21) | |
| Lymphknotenstatus | N0 | 433 | 33,3 (144) | 34,6 (150) | 32,1 (139) | 0,0752 |
| | N+ | 57 | 19,3 (11) | 38,6 (22) | 42,1 (24) | |
| Status des Resektionsrandes | negativ | 557 | 35,4 (197) | 32,1 (179) | 32,5 (181) | 0,4083 |
| | positiv | 181 | 30,4 (55) | 36,5 (66) | 33,1 (60) | |
| PSA präOP (ng/μl) | <4 | 77 | 29,9 (23) | 33,8 (26) | 36,4 (28) | 0,0197 |
| | 4-10 | 439 | 38 (167) | 28,9 (127) | 33 (145) | |
| | 10-20 | 167 | 26,9 (45) | 38,3 (64) | 34,7 (58) | |
| | >20 | 69 | 30,4 (21) | 46,4 (32) | 23,2 (16) | |

3.4 Prognostische Relevanz der 16q Deletionsgröße beim Prostatakarzinom

Zur Ermittlung der prognostischen Relevanz der 16q Deletionsgröße konnten 2503 Prostatagewebestanzungen herangezogen werden, da für diese Patienten sowohl Daten aus der FISH-Analyse als auch postoperative Verlaufsdaten verfügbar waren. Mit Hilfe eines Log-Rank-Tests wurde die prognostische Relevanz geprüft und anschließend in einer Kaplan-Meier-Kurve visualisiert. Die 16q Deletionsgröße zeigte eine signifikante Assoziation mit dem Auftreten eines frühen PSA-Rezidivs

($p < 0,0001$). Mit zunehmender Deletionsgröße stieg die Wahrscheinlichkeit eines frühen PSA-Rezidivs an. Die schlechteste Prognose zeigten Patienten, deren Tumoren eine große 16q21-16q24 Deletion besaßen ($p < 0,0001$). Im Gegensatz dazu besaßen Patienten mit Tumoren mit einer kleinen 16q24 Deletion eine ähnliche Prognose wie Patienten mit Tumoren ohne 16q Deletion ($p = 0,2257$, Abbildung 2a). Die Assoziation der 16q Deletionsgröße mit dem Auftreten des PSA Rezidivs war außerdem unabhängig vom ERG Status. Sowohl in der Gruppe der ERG-negativen und ERG-positiven Tumoren, nahm die Wahrscheinlichkeit eines PSA-Rezidivs mit der Ausdehnung der 16q Deletion zu ($p < 0,0001$ für beide; Abbildung 2b und c).

Abbildung 2: Prognostische Relevanz der 16q Deletionsgröße gemessen an der Wahrscheinlichkeit eines PSA-Rezidivs in a) allen Tumoren, zusätzliche P-Werte: normal vs. 16q24 $p = 0,2985$, 16q24 vs 16q23-24 $p = 0,0245$, 16q23-24 vs 16q21-24 $p = 0,1122$ b) ERG-negativen Tumoren, zusätzliche P-Werte: normal vs. 16q24 $p = 0,0279$, 16q24 vs 16q23-24 $p = 0,5494$, 16q23-24 vs 16q21-24 $p = 0,1171$ und c) ERG-positiven Tumoren, zusätzliche P-Werte: normal vs. 16q24 $p = 0,3044$, 16q24 vs 16q23-24 $p = 0,0117$, 16q23-24 vs 16q21-24 $p = 0,2383$



3.5 Prognostische Aussagekraft der 16q Deletionsgröße in Bezug auf die etablierten prognostischen Parameter beim Prostatakarzinom

Um auszuschließen, dass der Zusammenhang der 16q Deletionsgröße mit einem frühen PSA-Rezidiv durch die Assoziation mit dem Gleason Grad und dem Tumorstadium bedingt ist, wurde eine Multivariate Analyse durchgeführt. In diese Analyse gingen neben dem Status der 16q Deletionsgröße außerdem die etablierten prognostischen Parameter, wie Gleason Grad, Tumorstadium, präoperativer PSA-Wert, Status der Lymphknoten und des Resektionsrandes, ein. Die Ergebnisse dieser Analyse zeigen, dass die 16q Deletionsgröße unabhängig von den verwendeten Prognosemarkern einen Zusammenhang mit der Prognose des Patienten besitzt ($p=0,0066$). Bei Tumoren mit einer großen 16q21-q24 Deletion ist zum Beispiel das Risiko eines PSA-Rezidivs für den Patienten 1,47 mal höher, als bei Tumoren mit einer mittleren 16q23-q24 Deletion. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Tabelle 8 dargestellt

Tabelle 8: Multivariate Analyse mittels Cox-Regression. Berücksichtigt wurden die etablierten Prognoseparameter (Gleason Grad, Tumorgrad, präoperativer PSA-Wert, Status der Lymphknoten und des Resektionsrandes) und die Ausdehnung der 16q Deletion, PSA: Prostata-spezifisches Antigen

| | Parameter | RR | 95% CI | P-Wert |
|-----------------------------|--|------|-----------|---------|
| Tumorstadium | pT2 vs pT3a | 1,69 | 1,30-2,20 | <0,0001 |
| | pT3a vs pT3b | 1,68 | 1,33-2,14 | |
| | pT3b vs pT4 | 1,1 | 0,67-1,72 | |
| Gleason Grad | ≤3+3 vs 3+4 | 2,8 | 1,88-4,31 | <0,0001 |
| | 3+4 vs 4+3 | 2,2 | 1,75-2,75 | |
| | 4+3 vs ≥4+4 | 0,91 | 0,65-1,25 | |
| Lymphknotenstatus | pN0 vs pN+ | 1,91 | 1,45-2,51 | <0,0001 |
| PSA Wert | <4 vs 4-10 | 1,2 | 0,79-1,88 | 0,0035 |
| | 4-10 vs 10-20 | 1,18 | 0,93-1,48 | |
| | 10-20 vs >20 | 1,38 | 1,07-1,79 | |
| Status des Resektionsrandes | R0 vs R1 | 1,39 | 1,12-1,72 | 0,0029 |
| Deletionsstatus | 16q24 Deletion vs keine Deletion | 0,97 | 0,68-1,35 | 0,0066 |
| | 16q23-24 Deletion vs 16q24 Deletion | 1,16 | 0,77-1,77 | |
| | 16q21-24 Deletion vs 16q23-24 Deletion | 1,47 | 1,03-2,10 | |

4. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu prüfen, ob die Ausdehnung der 16q Deletion beim Prostatakarzinom eine klinische Relevanz besitzt. Hierfür wurde die Größe der 16q Deletion an einem Kollektiv von mehr als 7500 Tumoren im TMA-Format unter der Verwendung mehrerer FISH-Sonden untersucht.

Insgesamt konnte in der FISH-Analyse eine deutliche Varianz der 16q-Deletionsrate in Abhängigkeit von der Lokalisation der untersuchten Region gemessen werden. Dabei stieg die 16q-Deletionsrate von 10% (16q21) bis auf 28% (16q24) in Richtung des Telomers an. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stehen in Einklang mit der ermittelten Architektur der 16q-Deletion in der Re-Analyse von publizierten aCGH und CGH-Studien mittels des Instituts internen FISHOracle (siehe Abb. 1) [7, 25, 42-45]. In dieser Analyse zeigte sich deutlich eine Trichter-förmige Architektur der 16q-Deletion, die ihre Spitze am Telomer des Chromosoms erreicht. Vergleichbare Ergebnisse konnten außerdem in der Studie von Härkönen et al. erzielt werden. In dieser Studie wurde der Verlust der Heterozygotie (Loss of heterozygosity, LOH) in verschiedenen Regionen des Chromosoms 16 untersucht und eine LOH-Rate von 16% (16q21), 31% (16q23) und 32% (16q24) ermittelt [38]. In der LOH-Studie von Elo et al. wurden ebenfalls unterschiedliche 16q-Verlustraten gefunden. Allerdings zeigte sich hier mit 44% die höchste Rate in der Region 16q23 [39]. Cher et al. führten eine Mapping-Studie der 16q Deletion durch, in der die Deletionsrate der Regionen 16q13, 16q23 und 16q24 mittels FISH ermittelt wurde. Auch in dieser Studie wurde die höchste Deletionsrate mit über 40% in der Region 16q24 ermittelt [37].

Generell weist die 16q Deletionshäufigkeit mit 18% bis 83 % in der Literatur eine hohe Varianz auf [15, 40]. Dies ist darauf zurückzuführen, dass in den vorhandenen Studien verschiedenen Regionen des 16q Armes untersucht wurden. Vier Studien untersuchten die 16q24 Region mittels FISH und fanden eine Deletionsrate von 50-73% in 30 bis 53 Tumoren. Diese Studien enthielten allerdings einen hohen Anteil an fortgeschrittenen bzw. metastasierten Karzinomen [33, 36, 37, 46]. In der LOH Studie von Fromont et al. wurde eine Verlustrate für die 16q23 Region von 83% in 48 untersuchten Tumoren gefunden [40]. In zwei CGH bzw. aCGH Metaanalysen wurde eine durchschnittliche Deletionsrate von 18-52% in 662 und 872 analysierten Prostatakarzinomen ermittelt [14, 15]. Dadurch wird deutlich, dass neben der untersuchten 16q Region auch die Methode zur Bestimmung der Kopiezahlveränderung eine Rolle spielt. Die CGH, aCGH und LOH Methoden haben gemeinsam, dass sie an isolierter DNA durchgeführt werden. Damit kann es zu Schwankungen in der Deletionsrate durch Verunreinigung der Probe mit „normaler“ DNA kommen. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete FISH Methode hat

demgegenüber den Vorteil, dass die Bestimmung der Kopiezahl direkt am Gewebe erfolgt. Allerdings ist hierbei zu beachten, dass die Wahl des Grenzwertes für die Kopiezahlveränderung einen hohen Einfluss auf die Deletionsrate besitzen kann. In der Studie von Matsuyama et al. wurde zum Beispiel von einer 16q24 Deletion ausgegangen, wenn mindestens 35% von 150 Zellkernen weniger 16q24 Signal als Zentromer 16 Signal zeigten. Die dadurch ermittelte Deletionsrate betrug 55% [33]. Bei Cher et al. musste der größte Anteil der auswertbaren Zellkerne (n=50 bis 100) einen Verlust des 16q Signals im Vergleich zum Zentromer 16 Signal aufweisen [37]. Die somit ermittelte Deletionsrate betrug 50%. In der vorliegenden Studie wurde ein stringenter Grenzwert verwendet, der anhand einer aCGH und FISH Vergleichsstudie ermittelt wurde. In dieser Studie konnten identische PTEN Deletionsraten ermittelt werden, wenn mindestens 60% aller Tumorzellkerne in der FISH einen Verlust des PTEN Signals im Vergleich zum Zentromer Signal aufwiesen [27]. Dieser Grenzwert wurde außerdem in mehreren Deletionsstudien der Arbeitsgruppe verwendet, in denen die prognostische Relevanz verschiedener Deletionsregionen beim Prostatakarzinom beschrieben wurde [12, 22-27].

Dass die höchste Deletionsrate im Bereich 16q24 gefunden wurde ist mit der Annahme vereinbar, dass die 16q-Deletion sich vom Telomer aus ausdehnt. Grundsätzlich können Deletionen in telomerisch und interstitiell eingeteilt werden [47].

Interstitielle Deletionen bezeichnen den Verlust von chromosomalem Material zwischen dem Zentromer und Telomer eines Chromosoms [47]. Dabei wird aufgrund zwei benachbarter Doppelstrangbrüche ein mehr oder weniger „kleiner“ Abschnitt aus einem Chromosom herausgeschnitten. Mit Hilfe der Nicht-homologen End-zu-End Verbindung werden diese Brüche repariert [48]. Dabei kann es allerdings zu einer „fehlerhaften“ Reparatur kommen, die zum Verlust des herausgetrennten Materials führt. In einer Studie innerhalb der Arbeitsgruppe konnte bereits am Beispiel von Chromosom 6 gezeigt werden, dass die interstitielle 6q Deletion während der Progression des Prostatakarzinoms wächst [32]. Vermutlich ist der Grund dafür, dass die kleine 6q15 Deletion von ca. 4 Megabasen dazu führt, dass entfernte Bereiche im Chromosomen, die eine hohe Neigung zu Doppelstrangbrüchen haben, in räumliche Nähe gebracht werden. Darauf folgende benachbarte Doppelstrangbrüche (zum Beispiel im Bereich 6q14 und 6q16) führen dann zu einer Ausweitung der 6q Deletion.

Telomerische Deletionen bezeichnen den Verlust von chromosomalem Material am Telomer [47]. Dass die drei unterschiedlichen Größen der 16q-Deletion, die in der vorliegenden Arbeit gefunden wurden, alle die Region 16q24 einschließen, spricht dafür, dass die 16q Deletion zu den telomerischen Deletionen zählt. Die Deletionsgröße ist dabei jedoch sehr unterschiedlich. Insgesamt konnten 90% der 16q-deletierten Tumoren in drei wesentliche Deletionsgrößen eingeteilt werden. Von

den 763 16q-deletierten Tumoren hatten 258 (33,8%) eine „kleine“ 16q24 Deletion, 254 (33,3%) eine „mittlere“ 16q23-q24 Deletion und 251 (32,9 %) eine „große“ 16q21-q24 Deletion. Die in der FISH Analyse ermittelte Architektur der 16q Deletion steht damit in Einklang mit der beschriebenen „trichterförmigen“ Architektur in der FISH Oracle Analyse (siehe Abbildung 1).

Unabhängig von der untersuchten 16q Region (16q21, 16q23, 16q24) konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die 16q Deletion mit einem schlechten Phänotyp des Prostatakarzinoms assoziiert ist. Desweiteren stehen die Ergebnisse in Einklang mit früheren Studien, welche die Assoziation der 16q Deletion mit den klinisch-pathologischen Parametern des Prostatakarzinoms untersuchten. Insgesamt konnten 6 Studien eine Korrelation zwischen Deletionen im Bereich 16q23, 16q24 und 16q13-24 mit einem hohen Gleason Grad [34, 41], einem fortgeschrittenem Tumorstadium [33, 39] und Lymphknoten oder Fernmetastasen [34, 36, 38] finden. Aufgrund der Tatsache, dass die 16q Deletion unterschiedlich große Bereiche des q-Arms einnimmt, stellt sich jedoch die Frage, ob die Größe der Deletion einen Einfluss auf die Assoziation zum Phänotyp des Prostatakarzinoms besitzt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen deutlich, dass anhand der Größe der 16q Deletion eine klare Abstufung der Prognoseeinschätzung möglich ist. Während der Anteil an kleinen 16q24 Deletionen mit steigendem Gleason Grad und Tumorstadium abnahm, stieg der Anteil an mittleren 16q23-24 und großen 16q21-24 Deletionen mit dem Gleason Grad und dem Tumorstadium signifikant an. Ebenfalls war die Wahrscheinlichkeit einer lymphogenen Metastasierung abhängig von der Größe der Deletion. Desweiteren nahm die Wahrscheinlichkeit eines PSA-Rezidivs mit der Ausdehnung der Deletion zu. So zeigten Patienten, deren Tumoren „nur“ eine 16q24 Deletion aufwiesen, eine ähnliche Prognose wie Patienten ohne 16q Deletion. Die deutlich schlechteste Prognose hatten Patienten, deren Tumoren eine große 16q21-24 Deletion hatten. Basierend auf diesen Ergebnissen, lässt sich vermuten, dass die Anzahl der von der Deletion betroffenen Gene eine wesentliche Rolle bei der Progression des Prostatakarzinoms spielt. Diese Annahme wird unterstützt durch eine Studie innerhalb der Arbeitsgruppe, in der die Assoziation zwischen der Größe der 6q Deletion und der Prognose beim Prostatakarzinom untersucht wurde. In dieser Studie hatten Patienten mit einer großen 6q12-22 Deletion ebenfalls die schlechteste Prognose im Vergleich zu Patienten mit einer kleinen 6q14-16 Deletion [32]. Zusätzlich dazu konnten in einer in-vitro Studie der Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass der Effekt der Suppression von potenziellen tumorsuppressiven Genen auf das Zellwachstum mit der Anzahl der supprimierten Gene anstieg [32]. In einer weiteren Studie von Dal Bo et al. konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Größe der 13q14 Deletion einen Einfluss auf die Prognose von Patienten mit einer akuten lymphatischen Leukämie besitzt. Patienten mit einer kleinen Deletion, die sich auf das Gen DLEU beschränkte, hatten eine wesentlich bessere Prognose als Patienten

mit einer Deletion, die vom Gen DLEU bis zum Gen RB1 reichte [49]. Xue et al. untersuchten den Einfluss der 8p Deletion auf die Progression von hepatozellulären Karzinomen. Auch diese Arbeitsgruppe zeigte, dass mit der Anzahl der supprimierten Gene der Einfluss auf die Progression der Tumoren anstieg [50].

In Anbetracht der Tatsache, dass in Abhängigkeit von der Größe der 16q Deletion 77 bis 395 Gene betroffen sind [51] und dass dies einen Einfluss auf die Aggressivität des Tumors besitzt, ist es annehmbar, dass mehrere Gene auf dem Chromosom 16 eine tumorrelevante Funktion besitzen. Desweiteren ist es möglich, dass die deletionsbedingte Inaktivierung dieser Gene einen kooperativen oder additiven Effekt auf die Malignität der Tumoren besitzt. Es stellt sich jedoch die Frage, ob dieser Effekt unabhängig von der Deletionsregion auch zwischen mehreren Chromosomen, die von einer Deletion betroffen sind, besteht. Erste Studien weisen außerdem daraufhin, dass die gesamte, für alle Chromosomen bestimmte Menge des deletierten genomischen Materials einen hohen Einfluss auf die Prognose und die Aggressivität der Prostatatumoren besitzt. Innerhalb der UKE-Arbeitsgruppe wurden die Ergebnisse der 6q-Mapping Studie mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zur 16q Deletion zusammengefasst und der Verlust an genomischen Material pro Tumor in diesen beiden chromosomalen Regionen bestimmt. In dieser Analyse zeigte sich deutlich, dass die Prognose des Patienten von der Menge des deletierten chromosomalen Materials abhängt. Die Prognose wurde umso schlechter, je mehr Megabasen in den Regionen 6q und 16q deletierten waren (persönliche Kommunikation AG Ronald Simon). In zwei weiteren Studien wurde der prozentuale Anteil der Kopiezahlveränderungen in Relation zum Gesamtgenom gemessen (Copy number variation burden, CNV burden). Sowohl in der Studie von Hieronymus et al. [52] als auch in der Arbeit von Lalonde et al. [53] zeigte sich eine klare Assoziation der „CNV burden“ mit dem Phänotyp und der Prognose des Patienten. Je höher die „CNV burden“ im Tumor war, desto schlechter waren die phänotypischen Merkmale des Karzinoms und die Prognose des Patienten. In einer weiteren Studie der Arbeitsgruppe am Institut für Pathologie konnte außerdem gezeigt werden, dass die Anzahl an Deletionen in einem Tumor unabhängig von der Deletionsregion einen hohen Einfluss auf die Prognose des Patienten besitzt. Die Wahrscheinlichkeit eines PSA-Rezidivs stieg in der Analyse deutlich mit der Anzahl an Deletionen im Tumor an (persönliche Kommunikation AG Ronald Simon). Die Ergebnisse dieser Arbeiten und der vorliegenden Arbeit weisen damit deutlich daraufhin, dass die Aggressivität der Prostatakarzinome von der Menge des deletierten chromosomalen Materials abhängt.

Der klassische Modus zur Inaktivierung eines Tumorsuppressorgenes ist ein zweistufiger Prozess, bei dem zunächst ein Defekt des Genes auf dem einen Allel und später ein weiterer Defekt auf dem verbliebenden Allel auftritt [54]. Ein besonderes Charakteristikum der großen Deletionen beim Prostatakarzinom ist, dass

sie praktisch immer auf ein Allel beschränkt sind (heterozygote Deletion) und dass eine vollständige Inaktivierung bestimmter Gene – z.B. durch Mutationen auf dem 2. Allel - praktisch nicht vorkommt [7, 8, 32, 42]. Aus diesem Grund ist es bislang nicht gelungen, typische Tumorsuppressorgene in den meisten Deletionen zu identifizieren. Vielmehr werden in der Literatur zahlreiche Gene auf Grund ihrer Funktion als potentielle Zielgene der verschiedenen Deletionsregionen vorgeschlagen. Im Bezug auf das Chromosom 16 werden zum Beispiel die Gene CDH1 (16q22) [55], WWOX (16q23) [56], MAF (16q23) [57] oder FOXF1 (16q24) [57] häufig als potentielle Tumorsuppressorgene genannt. Dass mit dieser Studie bereits die zweite Deletionsregion identifiziert werden konnte, deren zunehmende Größe mit zunehmend schlechter Prognose korreliert, spricht klar für die Existenz vieler Tumor-relevanten Gene innerhalb der Deletionsbereiche. Es ist annehmbar, dass durch weitere Studien bestätigt wird, dass das Prostatakarzinom durch die Inaktivierung von einer Vielzahl an haploinsuffizienten Tumorsuppressorgenen charakterisiert ist, welche kooperativ oder additiv zur Entstehung und Progression des malignen Phänotyps beitragen.

Zusammengefasst konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die prognostische Relevanz der 16q-Deletion in der Menge des deletierten Materials abhängt. Die schlechteste Prognose zeigt sich bei Tumoren, welche eine große Deletion im Bereich 16q21 bis 16q24 aufweisen. Es ist daher annehmbar, dass die Bestimmung der 16q-Deletionsgröße zu einer besseren prognostischen Klassifizierung der Tumoren bei der initialen Diagnose eines Prostatakarzinoms beitragen kann.

5. Zusammenfassung

Die Mehrzahl aller Prostatakarzinome zeichnet sich durch ein langsames Wachstum aus und wird daher in der Regel nie klinisch relevant. Eine lebensbedrohliche Situation für den Patienten entsteht lediglich durch eine kleine Gruppe von Karzinomen, welche hochgradig aggressiv sind und deswegen zwingend einer invasiven Therapie bedürfen. Die Identifizierung dieser lebensbedrohlichen Prostatakarzinome ist jedoch mit den heute etablierten Prognose-Parametern (Gleason Grad, klinisches Tumorstadium, PSA-Wert) nicht eindeutig möglich. Aus diesem Grund werden zwingend molekulare prognostische-relevante Marker benötigt, welche die etablierten Parameter in ihrer Aussagekraft unterstützen. Auf genomischer Ebene ist das Prostatakarzinom durch zahlreicher rekurrente Deletionen charakterisiert, die häufig sehr große Bereiche einer chromosomalen Region umfassen. Studien konnten für die meisten dieser Deletionsregionen bereits eine prognostische Relevanz beim Prostatakarzinom nachweisen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es am Beispiel der 16q Deletion zu klären, ob die Größe der Deletion einen Einfluss auf die prognostische Aussagekraft besitzt. Dazu wurden die Regionen 16q21, 16q23 und 16q24 mittels FISH an über 7.000 Prostatakarzinomen im TMA-Format untersucht und dann die Deletionsgröße pro Tumor bestimmt. Insgesamt waren 2717 Tumoren in allen drei Analysen auswertbar. Eine 16q Deletion konnte in 763 dieser Prostatakarzinome nachgewiesen werden. Von diesen Tumoren hatten 258 (33,8%) eine „kleine“ 16q24 Deletion, 254 (33,3%) eine „mittlere“ 16q23-q24 Deletion und 251 (32,9 %) eine „große“ 16q21-q24 Deletion. Damit konnte gezeigt werden, dass die 16q-Deletion eine vom Telomer ausgehende trichterförmige Architektur beim Prostatakarzinom besitzt. Die 16q-Deletionsgröße war signifikant mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium ($p < 0,0001$), einem hohen Gleason Grad ($p = 0,0019$) und einem frühen PSA-Rezidiv ($p = 0,0197$) assoziiert. Diese Assoziation zeigte sich in einer multivariaten Analyse unabhängig vom Tumorstadium ($p < 0,0001$), Gleason Grad ($p < 0,0001$), Lymphknotenstatus ($p < 0,0001$), Resektionsrand ($p = 0,0029$) und präoperativen PSA-Wert ($p = 0,0035$). Insgesamt konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Größe der 16q-Deletion einen hohen Einfluss auf die Prognose des Patienten besitzt. Es ist daher annehmbar, dass innerhalb der 16q-Deletion mehrere Tumor-relevante Gene lokalisiert sind, deren Verlust in einem kooperativen oder additiven Effekt gemeinsam den malignen Prozess bei der Progression des Prostatakarzinoms fördert.

6. Abstract

Prostate cancer is the most common cancer and a frequent cause of cancer related deaths in males. However, only a small subgroup of cancers is highly aggressive and needs an intensive therapy. Notably, the established diagnostic parameters, including Gleason score, tumor stage and preoperative PSA level are not sufficient to distinguish between these aggressive cancers and indolent cancers. It is hoped, that molecular prognostic parameters could help to better identify those patients that require immediate therapy. Chromosomal deletions are a hallmark of prostate cancer and of high prognostic relevance. Recent studies have shown, that almost all of these deletions are highly variable with respect to their size. This is particularly true for chromosome 16q, where the reported deletion length ranges from a single chromosomal band at the telomere to the entire chromosome arm.

The aim of the present study was to clarify the prognostic impact of the 16q deletion size in prostate cancer. Therefore, a tissue microarray (TMA) including more than 7,000 prostate cancers was analyzed by fluorescence in situ hybridization (FISH) with three dual colored FISH-Probes specific for 16q21, 16q23 and 16q24. The 16q deletion size per tumor was determined as “large” (16q21-q24), “medium-sized” (16q23-q24), or “small” (16q24 only). Deletions of 16q were found in 763 of 2717 analyzable tumors. From these, 258 (33.8%) showed a “small”, 254 (33.3%) a “medium-sized” (16q23-q24) and 251 (32.9 %) a “large” deletion (16q21-q24). 16q deletion size was tightly linked to advanced tumor stage ($p < 0.0001$), high Gleason score ($p = 0.0019$) and early PSA recurrence ($p = 0.0197$). Multivariate analysis including tumor grade ($p < 0.0001$), Gleason score ($p < 0.0001$), pN status ($p < 0.0001$), resection margin status ($p = 0.0029$) and preoperative PSA level ($p = 0.0035$) revealed 16q deletion size as an independent prognostic feature.

In summary, the results of our study demonstrate that the size of 16q deletion has a strong impact on patient prognosis. Therefore, we hypothesize that loss of several tumor suppressor genes residing at 16q jointly promote prostate cancer progression.

7. Literaturverzeichnis

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E and Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011; 61(2):69-90.
2. Robert Koch-Institut (Hrsg), (2015) Gesundheit in Deutschland. Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Gemeinsam getragen von RKI und Destatis. RKI, Berlin.
3. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft DK, AWMF). Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms. (<http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Leitlinien.7.0.html>), pp. Registernummer: 043/022OL.
4. Humphrey PA. Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* 2004; 17(3):292-306.
5. Epstein JI, Feng Z, Trock BJ and 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(5):1019-1024.
6. Barbieri CE, Baca SC, Lawrence MS, Demichelis F, Blattner M, Theurillat JP, White TA, Stojanov P, Van Allen E, Stransky N, Nickerson E, Chae SS, Boysen G, Auclair D, Onofrio RC, Park K, et al. Exome sequencing identifies recurrent SPOP, FOXA1 and MED12 mutations in prostate cancer. *Nature genetics.* 2012; 44(6):685-689.
7. 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, et al. Integrative genomic profiling of human prostate cancer. *Cancer cell.* 2010; 18(1):11-22.
8. Weischenfeldt J, Simon R, Feuerbach L, Schlangen K, Weichenhan D, Minner S, Wuttig D, Warnatz HJ, Stehr H, Rausch T, Jager N, Gu L, Bogatyrova O, Stutz AM, Claus R, Eils J, et al. Integrative genomic analyses reveal an androgen-driven somatic alteration landscape in early-onset prostate cancer. *Cancer cell.* 2013; 23(2):159-170.
9. Verigos J and Magklara A. Revealing the Complexity of Breast Cancer by Next Generation Sequencing. *Cancers (Basel).* 2015; 7(4):2183-2200.
10. Jiang L, Huang J, Higgs BW, Hu Z, Xiao Z, Yao X, Conley S, Zhong H, Liu Z, Brohawn P, Shen D, Wu S, Ge X, Jiang Y, Zhao Y, Lou Y, et al. Genomic Landscape Survey Identifies SRSF1 as a Key Oncodriver in Small Cell Lung Cancer. *PLoS Genet.* 2016; 12(4):e1005895.
11. Nakagawa H and Shibata T. Comprehensive genome sequencing of the liver cancer genome. *Cancer Lett.* 2013; 340(2):234-240.
12. Kluth M, Harasimowicz S, Burkhardt L, Grupp K, Krohn A, Prien K, Gjoni J, Hass T, Galal R, Graefen M, Haese A, Simon R, Huhne-Simon J, Koop C, Korb J, Weischenfeld J, et al. Clinical significance of different types of p53 gene alteration in surgically treated prostate cancer. *International journal of cancer Journal international du cancer.* 2014.
13. Soussi T and Lozano G. p53 mutation heterogeneity in cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 331(3):834-842.
14. Williams JL, Greer PA and Squire JA. Recurrent copy number alterations in prostate cancer: an in silico meta-analysis of publicly available genomic data. *Cancer Genet.* 2014; 207(10-12):474-488.
15. Sun J, Liu W, Adams TS, Li X, Turner AR, Chang B, Kim JW, Zheng SL, Isaacs WB and Xu J. DNA copy number alterations in prostate cancers: a combined analysis of published CGH studies. *The Prostate.* 2007; 67(7):692-700.

16. Lapointe J, Li C, Giacomini CP, Salari K, Huang S, Wang P, Ferrari M, Hernandez-Boussard T, Brooks JD and Pollack JR. Genomic profiling reveals alternative genetic pathways of prostate tumorigenesis. *Cancer Res.* 2007; 67(18):8504-8510.
17. 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 and Chinnaiyan AM. Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science.* 2005; 310(5748):644-648.
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, Schluter H, Pantel K, Schumacher U, Bokemeyer C, et al. ERG status is unrelated to PSA recurrence in radically operated prostate cancer in the absence of antihormonal therapy. *Clin Cancer Res.* 2011; 17(18):5878-5888.
19. FitzGerald LM, Agalliu I, Johnson K, Miller MA, Kwon EM, Hurtado-Coll A, Fazli L, Rajput AB, Gleave ME, Cox ME, Ostrander EA, Stanford JL and Huntsman DG. Association of TMPRSS2-ERG gene fusion with clinical characteristics and outcomes: results from a population-based study of prostate cancer. *BMC Cancer.* 2008; 8:230.
20. Gopalan A, Leversha MA, Satagopan JM, Zhou Q, Al-Ahmadie HA, Fine SW, Eastham JA, Scardino PT, Scher HI, Tickoo SK, Reuter VE and Gerald WL. TMPRSS2-ERG gene fusion is not associated with outcome in patients treated by prostatectomy. *Cancer Res.* 2009; 69(4):1400-1406.
21. Kluth M, Galal R, Krohn A, Weischenfeldt J, Tsourlakis C, Paustian L, Ahrary R, Ahmed M, Scherzai S, Meyer A, Sirma H, Korbelt J, Sauter G, Schlomm T, Simon R and Minner S. Prevalence of chromosomal rearrangements involving non-ETS genes in prostate cancer. *Int J Oncol.* 2015; 46(4):1637-1642.
22. 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 and Simon R. CHD1 is a 5q21 tumor suppressor required for ERG rearrangement in prostate cancer. *Cancer Res.* 2013; 73(9):2795-2805.
23. Kluth M, Hesse J, Heintz A, Krohn A, Steurer S, Sirma H, Simon R, Mayer PS, Schumacher U, Grupp K, Izbicki JR, Pantel K, Dikomey E, Korbelt JO, Plass C, Sauter G, et al. Genomic deletion of MAP3K7 at 6q12-22 is associated with early PSA recurrence in prostate cancer and absence of TMPRSS2:ERG fusions. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* 2013; 26(7):975-983.
24. 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, Michl U, Minner S, Sauter G, Simon R, et al. Concurrent deletion of 16q23 and PTEN is an independent prognostic feature in prostate cancer. *International journal of cancer Journal international du cancer.* 2015; 137(10):2354-2363.
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, Steurer S, Tsourlakis MC, Minner S, Michl U, 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(1):130-141.
26. 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, Michl U, Heinzer H, Salomon G, Graefen M, et al. Genomic deletion of chromosome 12p is an independent prognostic marker in prostate cancer. *Oncotarget.* 2015; 6(29):27966-27979.
27. 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, Sirma H, Saad F, Steuber T, Graefen M, et al. Genomic deletion of PTEN is associated with tumor progression and early PSA recurrence in ERG fusion-positive and fusion-negative prostate cancer. *Am J Pathol.* 2012; 181(2):401-412.

28. Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, Puc J, Miliareisis C, Rodgers L, McCombie R, Bigner SH, Giovanella BC, Ittmann M, Tycko B, Hibshoosh H, Wigler MH, et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science*. 1997; 275(5308):1943-1947.
29. Chinnam M and Goodrich DW. RB1, development, and cancer. *Curr Top Dev Biol*. 2011; 94:129-169.
30. Macri E and Loda M. Role of p27 in prostate carcinogenesis. *Cancer Metastasis Rev*. 1998; 17(4):337-344.
31. Efeyan A and Serrano M. p53: guardian of the genome and policeman of the oncogenes. *Cell Cycle*. 2007; 6(9):1006-1010.
32. Kluth M. (2016). Bedeutung und Charakterisierung der 6q-Deletion beim Prostatakarzinom: Dissertation, Staats- und Universitätsbibliothek Hamburg).
33. Matsuyama H, Pan Y, Yoshihiro S, Kudren D, Naito K, Bergerheim US and Ekman P. Clinical significance of chromosome 8p, 10q, and 16q deletions in prostate cancer. *The Prostate*. 2003; 54(2):103-111.
34. Li C, Berx G, Larsson C, Auer G, Aspenblad U, Pan Y, Sundelin B, Ekman P, Nordenskjold M, van Roy F and Bergerheim US. Distinct deleted regions on chromosome segment 16q23-24 associated with metastases in prostate cancer. *Genes, chromosomes & cancer*. 1999; 24(3):175-182.
35. Suzuki H, Komiya A, Emi M, Kuramochi H, Shiraishi T, Yatani R and Shimazaki J. Three distinct commonly deleted regions of chromosome arm 16q in human primary and metastatic prostate cancers. *Genes, chromosomes & cancer*. 1996; 17(4):225-233.
36. Pan Y, Matsuyama H, Wang N, Yoshihiro S, Haggarth L, Li C, Tribukait B, Ekman P and Bergerheim US. Chromosome 16q24 deletion and decreased E-cadherin expression: possible association with metastatic potential in prostate cancer. *The Prostate*. 1998; 36(1):31-38.
37. Cher ML, Ito T, Weidner N, Carroll PR and Jensen RH. Mapping of regions of physical deletion on chromosome 16q in prostate cancer cells by fluorescence in situ hybridization (FISH). *J Urol*. 1995; 153(1):249-254.
38. Harkonen P, Kyllonen AP, Nordling S and Vihko P. Loss of heterozygosity in chromosomal region 16q24.3 associated with progression of prostate cancer. *The Prostate*. 2005; 62(3):267-274.
39. Elo JP, Harkonen P, Kyllonen AP, Lukkarinen O and Vihko P. Three independently deleted regions at chromosome arm 16q in human prostate cancer: allelic loss at 16q24.1-q24.2 is associated with aggressive behaviour of the disease, recurrent growth, poor differentiation of the tumour and poor prognosis for the patient. *Br J Cancer*. 1999; 79(1):156-160.
40. Fromont G, Vallancien G, Validire P, Levillain P and Cussenot O. BCAR1 expression in prostate cancer: association with 16q23 LOH status, tumor progression and EGFR/KAI1 staining. *The Prostate*. 2007; 67(3):268-273.
41. Kobayashi M, Ishida H, Shindo T, Niwa S, Kino M, Kawamura K, Kamiya N, Imamoto T, Suzuki H, Hirokawa Y, Shiraishi T, Tanizawa T, Nakatani Y and Ichikawa T. Molecular analysis of multifocal prostate cancer by comparative genomic hybridization. *The Prostate*. 2008; 68(16):1715-1724.
42. Huang S, Gulzar ZG, Salari K, Lapointe J, Brooks JD and Pollack JR. Recurrent deletion of CHD1 in prostate cancer with relevance to cell invasiveness. *Oncogene*. 2012; 31(37):4164-4170.
43. Mao X, Boyd LK, Yanez-Munoz RJ, Chaplin T, Xue L, Lin D, Shan L, Berney DM, Young BD and Lu YJ. Chromosome rearrangement associated inactivation of tumour suppressor genes in prostate cancer. *Am J Cancer Res*. 2011; 1(5):604-617.

44. Mader M, Simon R and Kurtz S. FISH Oracle 2: a web server for integrative visualization of genomic data in cancer research. *J Clin Bioinforma.* 2014; 4(1):5.
45. Mader M, Simon R, Steinbiss S and Kurtz S. FISH Oracle: a web server for flexible visualization of DNA copy number data in a genomic context. *J Clin Bioinforma.* 2011; 1(1):20.
46. Demichelis F, Setlur SR, Beroukhir R, Perner S, Korbel JO, Lafargue CJ, Pflueger D, Pina C, Hofer MD, Sboner A, Svensson MA, Rickman DS, Urban A, Snyder M, Meyerson M, Lee C, et al. Distinct genomic aberrations associated with ERG rearranged prostate cancer. *Genes, chromosomes & cancer.* 2009; 48(4):366-380.
47. Buselmaier W and Tariverdian G. (1999). *Humangenetik*, 2. Auflage: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Seite 59).
48. Wagener C and Müller O. (2010). *Molekulare Onkologie: Entstehung, Progression, klinische Aspekte*; 3. Auflage: Thieme-Verlag, Seite 126).
49. Dal Bo M, Rossi FM, Rossi D, Deambrogi C, Bertoni F, Del Giudice I, Palumbo G, Nanni M, Rinaldi A, Kwee I, Tissino E, Corradini G, Gozzetti A, Cencini E, Ladetto M, Coletta AM, et al. 13q14 deletion size and number of deleted cells both influence prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Genes, chromosomes & cancer.* 2011; 50(8):633-643.
50. Xue W, Kitzing T, Roessler S, Zuber J, Krasnitz A, Schultz N, Reville K, Weissmueller S, Rappaport AR, Simon J, Zhang J, Luo W, Hicks J, Zender L, Wang XW, Powers S, et al. A cluster of cooperating tumor-suppressor gene candidates in chromosomal deletions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012; 109(21):8212-8217.
51. Yates A, Akanni W, Amode MR, Barrell D, Billis K, Carvalho-Silva D, Cummins C, Clapham P, Fitzgerald S, Gil L, Giron CG, Gordon L, Hourlier T, Hunt SE, Janacek SH, Johnson N, et al. Ensembl 2016. *Nucleic Acids Res.* 2016; 44(D1):D710-716.
52. Hieronymus H, Schultz N, Gopalan A, Carver BS, Chang MT, Xiao Y, Heguy A, Huberman K, Bernstein M, Assel M, Murali R, Vickers A, Scardino PT, Sander C, Reuter V, Taylor BS, et al. Copy number alteration burden predicts prostate cancer relapse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014; 111(30):11139-11144.
53. 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, Meng X, Thoms J, Grzadkowski MR, Berlin A, 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(13):1521-1532.
54. Knudson AG. Hereditary cancer: two hits revisited. *Journal of cancer research and clinical oncology.* 1996; 122(3):135-140.
55. Machado JC, Oliveira C, Carvalho R, Soares P, Berx G, Caldas C, Seruca R, Carneiro F and Sobrinho-Simoes M. E-cadherin gene (CDH1) promoter methylation as the second hit in sporadic diffuse gastric carcinoma. *Oncogene.* 2001; 20(12):1525-1528.
56. Paige AJ, Taylor KJ, Taylor C, Hillier SG, Farrington S, Scott D, Porteous DJ, Smyth JF, Gabra H and Watson JE. WWOX: a candidate tumor suppressor gene involved in multiple tumor types. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98(20):11417-11422.
57. Watson JE, Doggett NA, Albertson DG, Andaya A, Chinnaiyan A, van Dekken H, Ginzinger D, Haqq C, James K, Kamkar S, Kowbel D, Pinkel D, Schmitt L, Simko JP, Volik S, Weinberg VK, et al. Integration of high-resolution array comparative genomic hybridization analysis of chromosome 16q with expression array data refines common regions of loss at 16q23-qter and identifies underlying candidate tumor suppressor genes in prostate cancer. *Oncogene.* 2004; 23(19):3487-3494.

8. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------------|--|
| AJCC | American Joint Committee on Cancer (AJCC) |
| BAC | Bacterial Artificial Chromosome, bakterielles artifizielles Chromosom |
| ca. | circa |
| °C | Celcius |
| CEP | centromere probe, Zentromersonde |
| COT | |
| DAPI | 4',6-Diamidin-2-phenylindol |
| DNA | deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure |
| DNase | Desoxyribonuklease |
| dNTP | Nukleosidtriphosphate |
| dTTP | Desoxythymidintriphosphat |
| dUTP | Desoxyuridintriphosphat |
| dH₂O | destilliertes Wasser |
| DRU | Digitale rektale Untersuchung |
| E.coli | Escherichia coli |
| FISH | Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung |
| g | Gramm |
| i.d.R. | in der Regel |
| LB | Lysogeny Broth |
| M | Metastase |
| mg | Milligramm |
| min | Minute |
| ml | Milliliter |
| mM | Millimol |
| mm | Millimeter |
| N | Nodes, Lymphknoten |
| ng | Nanogramm |
| p-Wert | Signifikanzwert |
| PSA | Prostata spezifisches Antigen |
| R | Resektionsrand |
| RNase | Ribonuklease |
| rpm | rounds per minute, Umdrehungen pro Minute |
| SSC | Sodium/ Sodium citrate, Natrium/ Natriumcitrat |
| T | Tumor |
| TMA | Tissue micro array, Gewebemikroarray |
| UICC | Krebs Union International contre le Cancer, Internationale Vereinigung gegen Krebs |
| µg | Mikrogramm |

μ
%

Mikroliter
Prozent

9. Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1: Architektur der 16q Deletion. FISHOracle | 10 |
| Abbildung 2: Prognostische Relevanz der 16q Deletionsgröße gemessen an der Wahrscheinlichkeit eines PSA-Rezidivs..... | 24 |

10. Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tabelle 1: häufige Deletionsregionen beim Prostatakarzinom | 8 |
| Tabelle 2: Patientenkollektiv des Prostata-Gewebe-Mikroarray (TMA) | 12 |
| Tabelle 3: Reagenzien & Kits | 13 |
| Tabelle 4: Geräte | 14 |
| Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien | 14 |
| Tabelle 6: Häufigkeit und Korrelation der 16q21, 16q23 und 16q24 Deletion mit den klinisch-pathologischen Parametern des Prostatakarzinoms, PSA: Prostata-spezifisches Antigen..... | 21 |
| Tabelle 7: Assoziation der 16q-Deletionsgröße mit dem Tumorphänotyp, PSA: Prostata-spezifisches Antigen | 23 |
| Tabelle 8: Multivariate Analyse mittels Cox-Regression. Berücksichtigt wurden die etablierten Prognoseparameter (Gleason Grad, Tumorgrad, präoperativer PSA-Wert, Status der Lymphknoten und des Resektionsrandes) und die Ausdehnung der 16q Deletion, PSA: Prostata-spezifisches Antigen | 25 |

11. Danksagung

An erster Stelle richtet sich mein Dank an Herrn Prof. Dr. Guido Sauter für die Bereitstellung des Promotionsthemas sowie für die Möglichkeit am Institut für Pathologie zu promovieren.

Mein besonderer Dank richtet sich an PD Dr. R. Simon und Frau Dr. Kluth für die ausgesprochen freundliche Aufnahme und zielgerichtete Betreuung. Ihre fachliche Kompetenz und die angenehme Atmosphäre innerhalb der Arbeitsgruppe trugen maßgeblich zum Gelingen der Arbeit bei.

Weiterhin gilt mein Dank den technischen Angestellten des Instituts.

Ebenso möchte ich meiner Familie danken, die mir stets unterstützend zur Seite standen.

12. 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: