

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für Diagnostik, Institut für Pathologie, Sektion Molekularpathologie

Direktor des Instituts: Prof. Dr. med. Guido Sauter

Prävalenz und klinische Relevanz der 13q-Deletion beim Prostatakarzinom

Dissertation

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

Vorgelegt von:

Sekander Scherzai

aus Kabul

Hamburg 2018

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 06.02.2018

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

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

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: Prof. Dr. Tobias Lange

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	3
1 EINLEITUNG	5
1.1 DAS PROSTATAKARZINOM	5
1.2 GENETISCHE VERÄNDERUNGEN DES PROSTATAKARZINOMS	9
1.3 DIE 13Q-DELETION BEIM PROSTATAKARZINOM	10
1.4 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	12
2 MATERIAL UND METHODEN	13
2.1 PROGNOSE-GEWEBEMIKROARRAY (TMA) / PATIENTENKOLLEKTIV	13
2.2 GERÄTE	15
2.3 REAGENZIEN UND KITS	15
2.4 VERBRAUCHSMATERIALIEN	16
2.5 DHB10 ESCHERICHIA COLI (E. COLI) KLONE	16
2.6 HERSTELLUNG DER FISH-SONDEN	16
2.7 FLUORESCENZ-IN-SITU HYBRIDISIERUNG (FISH)	17
2.8 MIKROSKOPISCHE AUSWERTUNG	19
2.9 STATISTIK	20
3 ERGEBNISSE	22
3.1 PRÄVALENZ DER 13Q-DELETION	22
3.2 ASSOZIATION DER 13Q-DELETION MIT DER TMPRSS2:ERG-FUSION	23
3.3 ASSOZIATION DER 13Q-DELETION MIT DEN KLINISCH-PATHOLOGISCHEN PARAMETERN BEIM PROSTATAKARZINOM	24
3.4 PROGNOSTISCHE RELEVANZ DER 13Q-DELETION BEIM PROSTATAKARZINOM	25
4 DISKUSSION	30
5 ZUSAMMENFASSUNG	34
6 ABSTRACT	35
7 LITERATURVERZEICHNIS	36
8 TABELLEN- UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS	43
9 DANKSAGUNG	45
10 LEBENS LAUF	46
11 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	48

Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
°	Grad
%	Prozent
AJCC	American Joint Committee on Cancer
BAC	bacterial artificial chromosome
bp	Basenpaar(e)
C	Celsius
CGH-Array	Comparative Genomic Hybridisation
cTNM	klinische TNM-Klassifikation
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DRU	digitale rektale Untersuchung
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
E. coli	Escherichia coli
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
g	Gramm
H/E-Färbung	Hämatoxylin/Eosin-Färbung
IHC	Immunhistochemie
kb	Kilobasen
LOH	loss of heterozygosity
Mb	Megabasen
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimol
mm	Millimeter
n	Anzahl n untersuchter / analysierbarer Proben
nmol	Nanomol
ng	Nanogramm
NP40	Octylphenoxypolyethoxyethanol

p	den kurzen Arm des Chromosoms betreffend
PSA	prostataspezifisches Antigen
pTNM	pathologische TNM-Klassifikation
p-Wert	p = probability, engl. für Wahrscheinlichkeit; Signifikanzwert
q	den langen Arm des Chromosoms betreffend
RNAse	Ribonuklease
rpm	rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SSC	Saline-Sodium-Citrat
TMA	Tissue Microarray, Gewebemikroarray
TNM	Tumor-, Nodus- und Metastasen-Stadium (für Klassifikation)
UICC	International Union against Cancer
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

1 Einleitung

1.1 Das Prostatakarzinom

Das Prostatakarzinom ist mit 758.700 Neuerkrankungen pro Jahr die häufigste maligne Tumorerkrankung des Mannes weltweit (1). Allein in Deutschland erkrankten im Jahr 2012 über 63.710 Männer an einem Prostatakarzinom (2). Ein Grund für die hohe Prävalenz des Prostatakarzinoms ist unter anderem die steigende Lebenserwartung. Immerhin über 60% der über 70 Jahre alten Männer erkranken pro Jahr an einem Prostatakarzinom, während nur circa 2% der unter 50 Jahre alten Männer von dieser Erkrankung betroffen sind (2). Damit ist das Prostatakarzinom eindeutig eine Erkrankung des älteren Mannes. Ein weiterer Grund für die hohe Prävalenz des Prostatakarzinoms ist aber auch die in den letzten Jahrzehnten deutliche Verbesserung der frühdiagnostischen Verfahren. Männern ab dem 45. Lebensjahr wird zur Früherkennung des Prostatakarzinoms eine digital-rektale Untersuchung (DRU) und die Messung des prostataspezifischen Antigens (PSA) im Blut empfohlen (3). Das PSA ist eine prostata-spezifische Serinprotease, die in messbaren Mengen nur von den Prostatazellen sekretiert wird (4). Bei malignen aber auch benignen Veränderungen der Prostata kommt es zu einer gesteigerten Sekretion des PSA ins Blut (5). Steigt der PSA-Wert auf ≥ 4 ng/ml an, besteht ein Karzinomverdacht (5). Da es ebenfalls zu erhöhten PSA-Werten auf Grund einer benignen Hyperplasie (BPH) kommen kann, wird neben dem Gesamt-PSA-Wert in der Regel auch die PSA-Dichte (PSA-Wert in Bezug auf das Prostatavolumen), die PSA-Velocity (PSA-Anstiegsgeschwindigkeit) und die Konzentration an freiem PSA-Wert im Blutserum bestimmt (6). Bei zu hohen PSA-Werten und / oder auffälligen Tastbefunden innerhalb der DRU wird zur Prüfung des Karzinomverdachtes eine Stanzbiopsie der Prostata durchgeführt (3). Das Standardverfahren ist hier die transrektale Prostatastanzbiopsie unter Ultraschallkontrolle (TRUS) bei der 10 bis 12 dünne Gewebezylinder (Durchmesser: 0,6 mm) aus der Prostata gestanzt werden (7). Mit Hilfe dieser Frühdiagnostik werden heute die meisten Karzinome bereits in sehr frühen Stadien entdeckt, in denen noch keine Symptomatik der Erkrankung vorhanden ist.

Da allerdings die größte Anzahl der Prostatakarzinome zeitlebens symptomlos bleibt, werden heute viele Karzinome diagnostiziert die früher unentdeckt geblieben wären. Dies hat zu einer deutlichen Erhöhung der Prävalenz des Prostatakarzinoms beigetragen. Da stellt sich die Frage, wenn die Karzinome zeitlebens zu keinem Problem für den Patienten führen, warum dann den Patienten mit der Diagnose „Krebs“ belasten? Die Antwort darauf ist, dass eine zwar kleine aber hoch aggressive Gruppe von Prostatakarzinomen existiert, die im Verlauf der Erkrankung auf jeden Fall zu einer Metastasierung und damit lebensbedrohlichen Situation für

den Patienten führt. Eine Symptomatik tritt bei diesen Karzinomen in der Regel erst im fortgeschritten Stadium der Erkrankung auf, in der nur noch eine palliative Behandlung möglich ist (3). Diese Karzinome sind auch der Grund dafür, dass das Prostatakarzinom immer noch zu den häufigsten Karzinom-assoziierten Todesursachen in Deutschland und auch weltweit zählt (1, 2). Die Diagnose der Prostatakarzinome in frühen Stadien der Erkrankung ermöglicht allerdings so gut wie immer eine kurative Behandlung des Patienten. Therapie der Wahl ist neben einer subkutanen oder lokalen Bestrahlung heute die vollständige Entfernung der Prostata (Ektomie) (3). Bei Tumoren, deren Wachstum auf die Prostata beschränkt ist (pT2), führt diese Behandlung in der Regel zur Heilung des Patienten. Allerdings kann es zu erheblichen Nebenwirkungen, wie Harninkontinenz und Impotenz kommen (8). Da die meisten Karzinome nur sehr langsam wachsen und der Patient vermutlich eher an einer anderen Erkrankung versterben wird, ist als weitere „Therapieoption“ das „Active Surveillance“ möglich. Beim „Active Surveillance“ erfolgt eine engmaschige Beobachtung des Patienten durch wiederholte Messung des PSA-Wertes, der DRU und Stanzbiopsie bis es zu einer tatsächlichen Progression des Karzinoms kommt. Erst bei Progression des Tumors wird eine invasive Therapie, wie z.B. die Prostatektomie durchgeführt (3). Hintergrund ist die Vermeidung der Übertherapie von Patienten, deren Karzinome zeitlebens symptomlos geblieben wären. Dennoch entscheiden sich viele Männer bei der Diagnose eines Prostatakarzinoms von vorneherein für eine Ektomie. Grund dafür ist, dass eine sichere Einschätzung des Progressionsrisikos mit den heute vorhandenen prognostischen Parametern nicht möglich ist.

Die Einschätzung der Aggressivität der Karzinome in frühen Stadien der Erkrankung erfolgt heute anhand von wenigen etablierten Prognoseparametern. Präoperativ sind diese die Höhe des PSA-Wertes im Serum, das klinische Tumorstadium (cT) und der Gleason Grad (3). Beim Tumorstadium wird die Ausdehnung des Prostatakarzinoms festgelegt. Auf Grund einer fehlenden bildgebenden Diagnostik ist dies klinisch jedoch nur sehr schwer zu beurteilen. Besser ist hier das pathologische Tumorstadium (pT), welches postoperativ mit Hilfe des Ektomiepräparates bestimmt wird bzw. die Klassifizierung der Tumoren nach UICC (siehe Tabelle 1) (9).

Tabelle 1: TNM-Klassifikation des Prostatakarzinoms nach UICC 2009, 7. Auflage

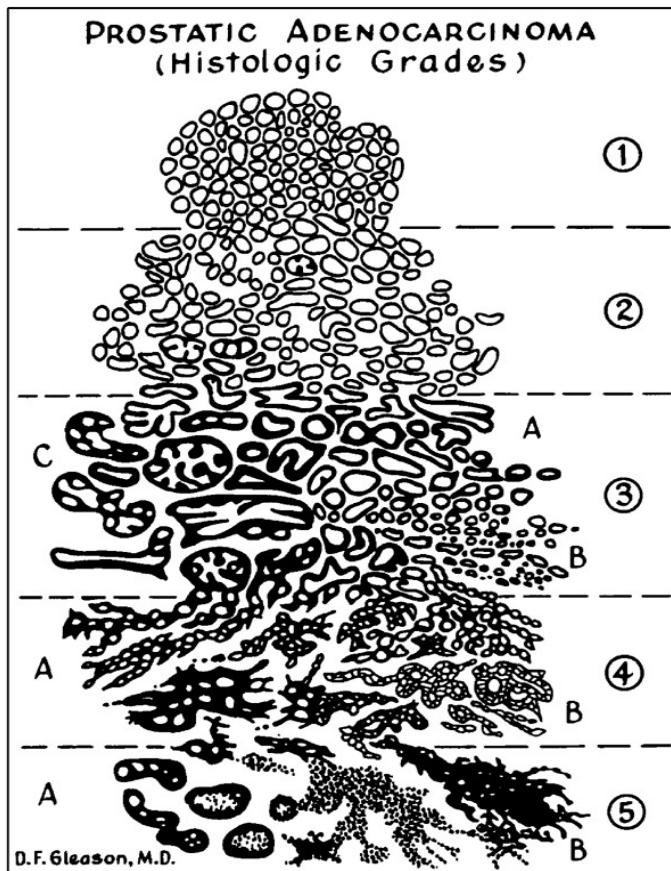
T-Stadium (Ausdehnung des Primärtumors)	
T0	Kein Hinweis auf einen Primärtumor
T1	Kleiner nicht tastbarer Tumor. Zufallsbefund innerhalb einer Prostataoperation aufgrund einer anderen Erkrankung.
T1a	Tumorbefall \leq 5 % des Gewebes
T1b	Tumorbefall $>$ 5 % des Gewebes
T1c	Tumor durch eine Nadelbiopsie diagnostiziert
T2	Tumor innerhalb der Prostatakapsel
T2a	Tumorbefall \leq 50 % eines Seitenlappens
T2b	Tumorbefall $>$ 50 % eines Seitenlappens
T2c	Tumorbefall beider Seitenlappen
T3	Tumor wächst über die Prostatakapsel hinaus
T3a	Kapselüberschreitung ohne Infiltration der Samenblasen
T3b	Kapselüberschreitung mit Infiltration der Samenblasen
T4	Tumorbefall der Nachbarstrukturen

N-Stadium (Befall der Lymphknoten)	
N0	Keine Metastasen in regionären Lymphknoten
N1	Metastasen in regionären Lymphknoten

M-Stadium (Fernmetastasen)	
M0	Keine Fernmetastasen nachweisbar
M1	Fernmetastasen nachweisbar
M1a	Metastasen in anderen Lymphknoten (nicht regionäre Lymphknoten)
M1b	Metastasen in Knochen.
M1c	Metastasen in anderen Organen und/oder Strukturen.

Der Gleason Grad gibt an inwieweit sich die Drüsenstruktur von der Drüsenstruktur im benignen Prostatagewebe unterscheidet. Der Entdifferenzierungsgrad des Drüsengewebes wird dann von 1 (niedrig) bis 5 (hoch) angegeben. Bei einem Gleason Grad von 5 ist also keine Drüsenstruktur mehr erkennbar (siehe Abbildung 1) (10). Aus dem Gleason Grad wird der Gleason Score gebildet. In der Biopsie wird unabhängig vom Anteil des betroffenen Gewebes der „Beste“ und der „Schlechteste“ Gleason Grad angegeben (z.B. 3+5). Bei der Beurteilung des Ektomiepräparates wird der primäre (häufigste) und sekundäre (zweithäufigste) Gleason Grad ermittelt (z.B. 3+4). Sollte ein ungünstigerer dritter Gleason Grad vorhanden sein, wird dieser als Tertiärgrad mit angegeben (z.B. 3+4 Tert. 5) (11).

Abbildung 1: Der Gleason Grad nach Donald F. Gleason. Dargestellt sind die morphologischen Veränderungen der Drüsenstruktur in den Gleason Graden 1-5.



Der Gleason Score gilt als der beste Prognoseparameter beim Prostatakarzinom. Mit steigendem Gleason Score kommt es zu einer deutlichen Verschlechterung der Prognose des Patienten (12). Patienten, deren Tumoren bereits in der Biopsie einen Gleason Score von $\geq 4+4$ aufweisen wird auf jeden Fall zur Entnahme der Prostata geraten, während bei Tumoren mit einem Gleason Score $\leq 3+3$ das „Active Surveillance“ eine gute Therapieoption ist. Bei Tumoren mit einem Gleason Score von $4+3$ geht die Tendenz auch eindeutig zur Ektomie. Sollte allerdings ein Gleason Score von $3+4$ vorliegen ist eine sichere Einschätzung des Progressionsrisikos nicht mehr möglich (13, 14). Hier stehen Arzt und Patient vor einer schwierigen Entscheidung: Kurative Behandlung mit potentiellen Nebenwirkungen oder Abwarten bis zur Progression. Die meisten Männer entscheiden sich an diesem Punkt für die sichere Heilung der Erkrankung – also die Ektomie und damit potentielle Übertherapie. Dies macht deutlich wie dringend wir neue Prognosemarker brauchen, welche die „alten“ Prognoseparameter bei der Einschätzung der Aggressivität der Prostatakarzinome unterstützen.

Am Institut für Pathologie des UKE wird eine vorklinische Version des Gleason Scores verwendet. In einer Studie der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass der prozentuale Anteil des Gleason 4 Musters im Tumor einen starken Einfluss auf die Prognose des Patienten be-

sitzt. Die Wahrscheinlichkeit eines PSA-Rezidivs ist zum Beispiel bei einem Gleason Score von 3+4 mit 5% Gleason 4 wesentlich besser als bei einem Gleason Score von 3+4 mit 45% Gleason 4. Dieser „quantitative Gleason Score“ kann dementsprechend genutzt werden um die Tumoren nach ihrem Progressionsrisiko besser zu klassifizieren (15). Um darüber hinaus auch den Tertiärgrad 5 zu berücksichtigen wurde innerhalb der Arbeitsgruppe aus dem quantitativen Gleason Score der integrierte quantitative Gleason Score entwickelt. Hier wird ein kontinuierlich numerischer Wert anhand des prozentualen Anteils der Gleason 4 und 5 Muster und dem Vorhandensein eines Gleason 5 Musters ermittelt. Ein Tumor mit 40% Gleason 4 und 5 Muster bekommt den Wert 40 plus 10 zusätzliche Punkte für das Vorhandensein des Gleason 5 Musters (Endwert = 50), während ein Tumor mit 40% nur Gleason 4 Muster den Wert 40 erhält. Übersteigt das Gleason 5 Muster einen Anteil von 20% werden zusätzlich 7,5 Punkte vergeben. Der IQ Gleason führt dadurch so zu einer noch besseren Klassifizierung der Tumoren (16). Eine weitere Modifikation ist durch die Integration von molekularen Prognosemarkern angedacht (persönliche Kommunikation AG Ronald Simon). Es besteht die Hoffnung, dass die Kombination aus einem histologischen und einem oder mehreren molekularen Parametern zu einer noch stärkeren Verbesserung der prognostischen Aussagekraft führt. Zwingend notwendig ist dafür natürlich die Identifizierung von prognostisch relevanten genetischen bzw. molekularen Veränderungen.

1.2 Genetische Veränderungen des Prostatakarzinoms

Das Prostatakarzinom ist auf genomischer Ebene vor allem charakterisiert durch Translokationen und chromosomale Verluste (Deletionen) (17-20). Rekurrente Amplifikationen und Genmutationen hingegen kommen nur sehr selten vor (21-23). Die häufigste genetische Veränderung des Prostatakarzinoms ist die TMPRSS2:ERG Fusion (18, 19, 24). Bei dieser Translokation kommt es bedingt durch eine Deletion von circa 3 Megabasen zur Fusion des Promotors der Androgen-regulierten Serinprotease TMPRSS2 und der codierenden Region des Transkriptionsfaktors ERG auf Chromosom 21. ERG wird physiologisch nicht in den Prostataepithelzellen exprimiert. Bedingt durch die Fusion mit dem TMPRSS2-Promotor kommt es allerdings zu einer Androgen-abhängigen ERG-Expression in den betroffenen Karzinomzellen (25). In circa der Hälfte aller Prostatakarzinome ist die TMPRSS2:ERG Fusion nachweisbar (19, 24). Basierend darauf können die Prostatakarzinome in ERG-positive (mit Fusion) und ERG-negative (ohne Fusion) Tumoren eingeteilt werden. Obwohl die ERG-Expression zu einer deutlichen Veränderung des Transkriptomts in der Zelle führt (19, 25, 26), ist sie für sich allein genommen prognostisch irrelevant (19, 24). Die Wahrscheinlichkeit eines PSA-Rezidivs ist bei Tumoren mit und ohne ERG-Expression nahezu identisch (24). Allerdings konnten Studien zeigen, dass der ERG-Status einen Einfluss auf die prognostische Relevanz

von potentiellen molekularen Prognosemarkern besitzt. Zum Beispiel besitzen APE1 (27), GGH (28) und p16 (29) nur in den ERG-negativen Tumoren eine Prognoserelevanz, während diese bei SOX9 (30) und mTOR (31) auf die Gruppe der ERG-positiven Tumoren beschränkt ist.

Neben der TMPRSS2:ERG Fusion zählen Deletionen in den Regionen 8p, 10q23, 16q, 13q, 6q, 12p, 17p13, 18q, 5q, 3p13 und 2q mit einer Deletionsrate von 8% bis 40% zu den häufigsten genetischen Veränderungen (17, 18, 20). Einige dieser Deletionen enthalten bekannte Tumorsuppressorgene, wie PTEN auf 10q23 (32, 33), CDKN1B auf 12p13 (34, 35) und TP53 auf 17p13 (36). Für die meisten Deletionen sind die Zielgene jedoch nicht eindeutig bekannt. Grund dafür ist, dass die Deletionen häufig sehr groß sind und mehrere Megabasen und damit einige 100 Gene umfassen (18, 37-39). Außerdem kommen nahezu alle Deletionen ausschließlich heterozygot vor (39-45) und spezifische inaktivierende Punktmutationen einzelner Gene auf dem verbleibenden Allel fehlen (18, 19). Eine Ausnahme stellt lediglich die 10q23 Deletion zur Inaktivierung des Tumorsuppressorgenes PTEN dar. Diese betrifft nur wenige Kilobasen und kann sowohl heterozygot als auch homozygot vorkommen (46). Auf Grund der fehlenden klassischen Tumorsuppressorgene in den Deletionsregionen, welche der Second Hit Theorie von Knudson entsprechen (47), entstand die Idee, dass das Ziel der Deletionen die Runterregulierung von mehreren haplo-insuffizienten Tumorsuppressorgenen ist (48, 49). Unabhängig von der Identifizierung der Zielgene dieser Regionen konnte für die meisten Deletionen bereits eine hohe prognostische Relevanz gezeigt werden (39-46, 50). Patienten, deren Tumoren zum Beispiel eine Deletion in den Regionen 10q23, 6q15, 16q23, 5q21, 8p21, 18q14 oder 12p13 aufweisen haben eine deutlich höhere Wahrscheinlichkeit für ein frühes PSA-Rezidiv als Patienten, deren Tumoren einen normalen Kopiezahlstatus in diesen Regionen haben (40-42, 44-46, 50). Für einige dieser Deletionen bleibt die prognostische Aussagekraft sogar unabhängig von den etablierten Prognoseparametern bestehen (40-42, 44, 45, 49).

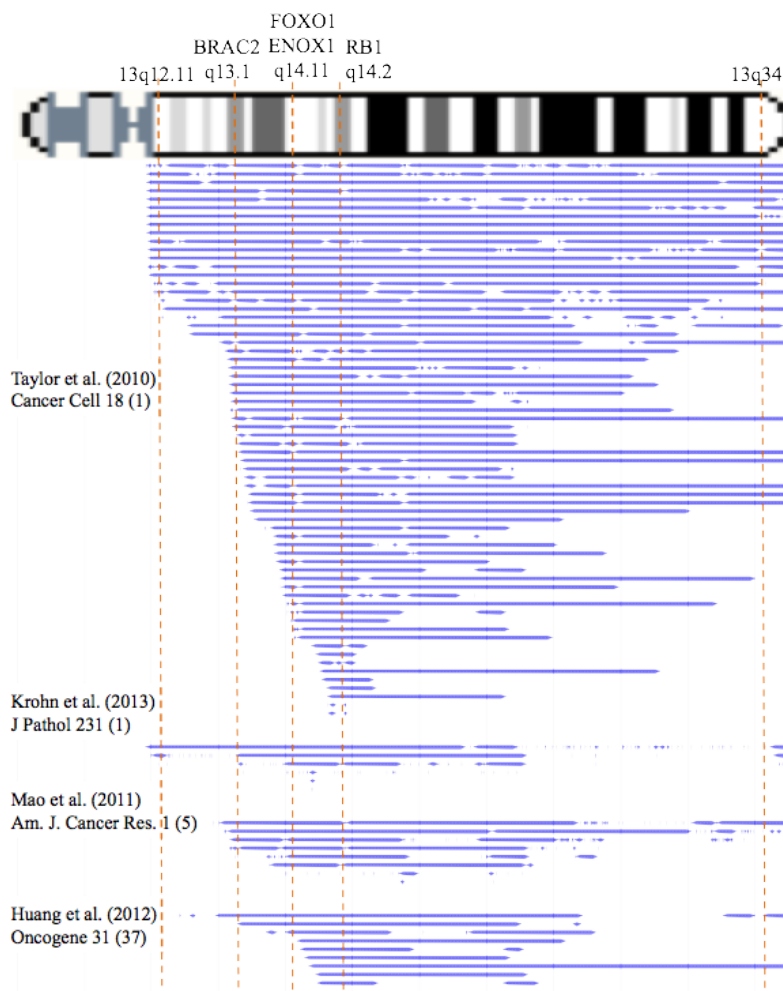
1.3 Die 13q-Deletion beim Prostatakarzinom

Die 13q-Deletion zählt mit einer Rate von 18%-72% zu den häufigsten Deletionen des Prostatakarzinoms (17-20, 39, 51-56). Zudem beherbergt diese Deletion mit RB1 im Bereich 13q14.2 nicht nur eines der bekanntesten Tumorsuppressorgene (57), sondern zusätzlich dazu auch noch weitere potentielle sowie bereits bekannte Tumorsuppressorgene. Dazu zählen zum Beispiel BRAC2 (13q13.1) (58), FOXO1 (13q14.11) (59) und ENOX1 (13q14.11) (60).

Umso erstaunlicher ist, dass die 13q-Deletion zu den am Wenigsten untersuchten chromosomalen Verlusten beim Prostatakarzinom zählt. Darauf basierend ist die tatsächliche Prävalenz der 13q-Deletion und deren klinische Relevanz beim Prostatakarzinom bis heute weitestge-

hend unklar. Array-basierte komparative genomische Hybridisierungsanalysen (aCGH) zeigen eine für das Prostatakarzinom typische Architektur der 13q-Deletion. Neben kleinen Deletionen in der Region 13q14 existieren auch große Deletionen, die mehrere Megabasen bis hin zum kompletten 13q-Arm umfassen können (siehe Abbildung 2, (18, 37-39)). Die Mehrzahl der publizierten Studien untersuchten die 13q-Deletion mittels der klassischen CGH oder der Verlust der Heterozygotie Analyse (LOH) und kamen dabei zu einer 13q-Verlustrate von 18% bis 72% (17-20, 39, 51-56). Studien, welche die klinische Relevanz der 13q-Deletion untersuchten kamen zu sehr divergenten Ergebnissen. Während einige Arbeitsgruppen eine Assoziation der 13q-Deletion mit einem schlechten Tumorphänotyp (52, 56, 61-63) und einer ungünstigen Prognose (64) in 21 bis 156 Prostatakarzinomen fanden, konnten andere bei der Untersuchung von 20 bis 111 Tumoren diesen Zusammenhang nicht bestätigen (53, 65-69).

Abbildung 2: Architektur der 13q-Deletion. Die Abbildung zeigt die mittels FISH Oracle (70, 71) re-analysierten Daten der Array-basierten komparativen genomischen Hybridisierungsstudien von Taylor et al. (n=181 Tumoren) (18), Krohn et al. (n=72 Tumoren) (39), Mao et al. (n=77 Tumoren) (38) und Huang et al. (n=86 Tumoren) (37). Die blauen Linien zeigen die deletierten Bereiche in den einzelnen untersuchten Tumoren bei einer Intensität von $-0,3$.



1.4 Zielsetzung der Arbeit

Die 13q-Deletion zählt zu den häufigsten chromosomalen Verlusten beim Prostatakarzinom. Innerhalb dieser Deletionsregion ist außerdem mit RB1 eines der bekanntesten Tumorsuppressorgene lokalisiert. Bemerkenswert ist daher, dass im Gegensatz zu vielen anderen Deletionen, wie zum Beispiel 10q23, 6q, 5q, 3p13, 16q, 8p, 12p und 18q (39-42, 44-46, 50) über die tatsächliche Prävalenz und klinische Relevanz der 13q-Deletion beim Prostatakarzinom lediglich divergente Ergebnisse aus sehr kleinen Studienkohorten existieren. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher zu klären, in welchem Zusammenhang das Auftreten der 13q-Deletion mit dem Tumorphänotyp (Gleason Score, Tumorstadium usw.) und der Prognose der Patienten gemessen am PSA-Rezidiv-freien Überleben steht. Zusätzlich dazu sollte geprüft werden, ob das Vorkommen der 13q-Deletion mit dem Auftreten bzw. dem Fehlen der TMPRSS2:ERG-Fusion – der häufigsten genetischen Veränderung beim Prostatakarzinom – assoziiert ist. Zur Klärung dieser Fragestellungen wurde die 13q14-Deletionsregion mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) an über 12.000 Prostatakarzinomen im Gewebemikroarray-Format (tissue microarray, TMA) untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Prognose-Gewebemikroarray (TMA) / Patientenkollektiv

Zur Bestimmung des 13q14 Kopiezahlstatus mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung wurde ein bestehender Gewebemikroarray (tissue microarray, TMA) des Instituts für Pathologie verwendet. Dieser TMA enthielt jeweils eine Gewebeprobe von 12.427 Prostatae, welche in der Zeit von 1992 bis 2013 in der Martiniklinik oder der Klinik und Poliklinik für Urologie auf Grund einer Prostatakarzinomkrankung operativ radikal entfernt wurden. Zur Herstellung der TMAs wurde pro Ektomiepräparat ein 0,6 mm durchmessender Gewebezylinder aus einem repräsentativen Formalin-fixierten und Paraffin-eingebetteten Tumorgewebeblock entnommen und auf einen TMA-Paraffinblock übertragen. Insgesamt wurden die Proben auf 27 TMA-Blöcke mit je 144 bis 522 Gewebeproben verteilt. Die dem TMA zugehörige Datenbank enthält Informationen zu klinisch-pathologischen Parametern (Gleason Grad, pT-Stadium, pN-Stadium, präoperativer PSA-Wert usw.), häufigen molekularen und genetischen Veränderungen (ERG-Status, verschiedene Deletionsregionen) (19, 24, 39-46, 50) und dem klinischen Verlauf der Erkrankung gemessen am PSA-Rezidiv. Klinische Verlaufsdaten waren für 12.344 der Patienten vorhanden. Von einem biochemischen Rezidiv wurde bei einem postoperativen Anstieg des Serum PSA-Wertes ab 0,2 ng/ml ausgegangen. Eine detaillierte Darstellung des Patientenkollektivs ist in Tabelle 2 zu finden.

Tabelle 2: Zusammensetzung des Patientenkollektivs im Prognose-Gewebemicroarray (n=12.427)

	Anzahl der Patienten (%)	
	Studienkohort im TMA (n=12427)	Biochemisches Rezidiv
Klinische Verlaufsdaten (Monate)		
n	11665 (93.9%)	2769 (23.7%)
Mittelwert	48.9	-
Median	36.4	-
Alter (Jahre)		
≤50	334 (2.7%)	81 (24.3%)
51-59	3061 (24.8%)	705 (23.0%)
60-69	7188 (58.2%)	1610 (22.4%)
≥70	1761 (14.3%)	370 (21.0%)
präoperativer PSA		
<4	1585 (12.9%)	242 (15.3%)
4-10	7480 (60.9%)	1355 (18.1%)
10-20	2412 (19.6%)	737 (30.6%)
>20	812 (6.6%)	397 (48.9%)
Tumorstadium (AJCC 2002)		
pT2	8187 (66.2%)	1095 (13.4%)
pT3a	2660 (21.5%)	817 (30.7%)
pT3b	1465 (11.8%)	796 (54.3%)
pT4	63 (0.5%)	51 (81.0%)
Gleason Grad		
≤3+3	2848 (22.9%)	234 (8.2%)
3+4	6679 (53.8%)	1240 (18.6%)
3+4 Tert.5	433 (3.5%)	115 (26.6%)
4+3	1210 (9.7%)	576 (47.6%)
4+3 Tert.5	646 (5.2%)	317 (49.1%)
≥4+4	596 (4.8%)	348 (58.4%)
Lymphknotenstatus		
pN0	6970 (91.0%)	1636 (23.5%)
pN+	693 (9.0%)	393 (56.7%)
Resektionsrand		
Negativ	9990 (81.9%)	1848 (18.5%)
Positiv	2211 (18.1%)	853 (38.6%)

HINWEIS: Die Anzahl ergibt in den einzelnen Kategorien nicht immer 12427 aufgrund fehlender Daten für einige Fälle. Abbreviation: AJCC, American Joint Committee on Cancer.

2.2 Geräte

In Tabelle 3 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Geräte aufgelistet.

Tabelle 3: Verwendete 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
Potor- JA-14	Beckmann, Krefeld
Potor- 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

2.3 Reagenzien und Kits

In Tabelle 4 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Reagenzien und Kits aufgelistet.

Tabelle 4: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Reagenzien und 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
LBbroth, 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	Besterefeld Chemiedistribution GmbH
Xylol	J. T. Baker, Center Valley, USA

2.4 Verbrauchsmaterialien

In Tabelle 5 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Materialien aufgelistet die den normalen Laborbedarf übersteigen.

Tabelle 5: Übersicht über die für diese Arbeit verwendeten 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-Pommelsdorf)
SafeSeal Reagiergefäß 2 ml	Sarstedt (Nümbrecht-Pommelsdorf)

2.5 DHB10 Escherichia coli (E. coli) Klone

Zur Bestimmung des 13q14-Kopiezahlstatus wurde mit Hilfe von mit BACs (bacterial artificial chromosome) transformierten DH10B E. coli (SourceBioscience, Nottingham, UK) eine fluoreszenz-markierte Sonde hergestellt. Verwendet wurden die Klone RP11-364B16 und RP11-64J21, welche das Gen ENOX1 in der Region 13q14.11 markieren.

2.6 Herstellung der FISH-Sonden

Die Herstellung der FISH-Sonde erfolgte in vier Teilschritten. 1. Isolierung der Plasmid- DNA, 2. Fluoreszenz-Markierung der DNA-Stränge (Nick Translation), 3. Aufreinigung der Sonde und 4. Testung der Sonde. Alle Schritte wurden anhand von am Institut für Pathologie des UKE etablierten und standardisierten Protokollen wie folgt durchgeführt:

- **Isolierung der Plasmid-DNA aus E. coli**
 - Vorkultur ansetzen: 10 ml LB-Medium, 30 µl Chloramphenicolösung, kleine Menge Bakterien (Zahnstocherspitze)
 - Inkubation der Vorkultur bei 190 rpm und 37 °C für 8 Stunden
 - Hauptkultur ansetzen: 250 ml LB-Medium, 750 µl Chloramphenicolösung, 2 ml Vorkultur
 - Inkubation der Hauptkultur bei 190 rpm und 37 °C für 16 Stunden
 - Herstellung eines Bakterienpellets: Zentrifugieren der Bakterienlösung bei 6.000 rpm und 4 °C für 15 Minuten, Überstand verwerfen

- Isolation der Plasmid-DNA aus dem Bakterienpellet mit dem NucleoBond® BAC 100 Kit nach Angabe des Herstellers (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland)
- DNA-Pellet in 150 µl nukleasefreiem Wasser bei 4°C für 16 Stunden lösen
- Bestimmung der DNA-Konzentration mit dem Peqlab NanoDrop® ND-1000 UV/Vis-Spektralphotometer (VWR, Radnor, USA). Bei 260 nm entspricht eine Absorption von 1 einem DNA-Gehalt von 50 µg/ml
- **Nick Translation**
 - Alle Arbeiten wurden in lichtundurchlässigen Reagiergefäßen auf Eis durchgeführt
 - Verdünnung der Plasmid-DNA auf eine Konzentration von 1 µg / 17,5 µl mit nukleasefreiem Wasser
 - Fluoreszenz-Markierung der DNA mit dem Nick Translation Reagent Kit nach Angabe des Herstellers (Abbott, Illinois, USA) und dUTP Spectrum Orange.
- **Aufreinigung der Sonden**
 - Entfernen von unerwünschten Bestandteilen mit dem QIAquick® Nucleotide Removal Kit nach Angabe des Herstellers (Qiagen, Venlo, Niederlande)
 - Aufkonzentrieren der FISH-Sonde durch Reduktion des Volumens in einer Vakuumzentrifuge bei 45°C für 20 Minuten
- **Sondentest**
 - Hybridisierung der Sonde auf ein Testgewebe wie unter Punkt 2.7 beschrieben
 - Mikroskopische Beurteilung der Sondenqualität: Signalstärke in Tumor- und Bindegewebszellkernen, Überlappung der Sondersignale in den Bindegewebszellkernen (max. zwei Signale pro Zellkern)

2.7 Fluoreszenz-in-situ Hybridisierung (FISH)

Die FISH der TMAs (Schnittdicke = 4 µm) erfolgte in drei Teilschritten: 1. Vorbehandlung des Gewebes, 2. Hybridisierung der FISH-Sonden und 3. Waschen des Gewebes. Alle Schritte wurden anhand eines am Institut für Pathologie des UKE etablierten und standardisierten Protokolls wie folgt durchgeführt:

- Vorbehandlung des Gewebes
 - Entparaffinieren des Gewebes: 3 Mal für 10 Minuten in Xylol und 2 Mal für 5 Minuten in Ethanol 96 % stellen
 - Trocknen des Gewebes bei 48 °C für 3 Minuten
 - Inkubation des Gewebes bei 80 °C für 15 Minuten in einer Pretreatment-Lösung

- Zweimaliges Waschen des Gewebes für 1 Minute in dH₂O
- Inkubation des Gewebes bei 30 °C für 150 Minuten in einer Proteaselösung
- Zweimaliges Waschen des Gewebes für 1 Minute in dH₂O
- Dehydrierung des Gewebes mittels aufsteigender Ethanolreihe (70 %, 80 % und 96 %) für jeweils 3 Minuten
- Trocknen des Gewebes bei 48°C für 3 Minuten

□ **Hybridisierung der FISH-Sonden**

- Herstellung des Hybridisierungsansatzes für selbst-markierte 13q Sonde (Sondentest: halbe Menge)
 - 14 µl Basismix (15,0 ml Formamid, 4,5 ml 20xSSC und 3,0 g Dextran-sulfat)
 - 2 µl COT-DNA,
 - 4 µl orange fluoreszierende 13q-Sonde
 - 0,5 µl grün fluoreszierender Centromer 10-Sonde
 - vortexen und bei 2.500 g für 10 Sekunden zentrifugieren
- Herstellung des Hybridisierungsansatzes für kommerzielle RB1-Sonde
 - 19 µl Basismix
 - 1 µl orange fluoreszierende RB1 Sonde
 - 0,5 µl grün fluoreszierender Centromer 10-Sonde
- Pro TMA-Schnitt 20 µl Hybridisierungsansatz direkt auf das Gewebe pipettieren, Deckgläschen auflegen und mit Fixogum fixieren
- Hybridisierung im Hybrite: 72 °C für Minuten und 37 °C für 16 bis 18 Stunden

□ **Waschen des Gewebes**

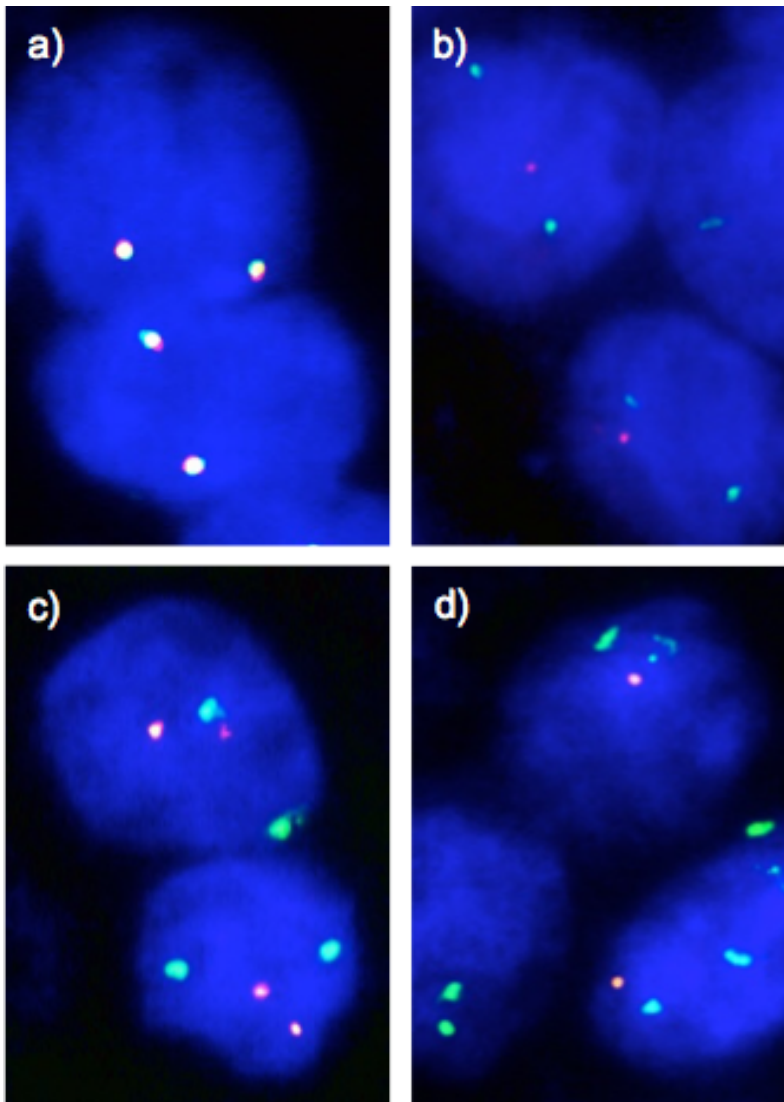
- Herstellung des Hybridisierungswaschpuffers: 100 ml 20xSSC, 3 ml NP40, ad 1000 ml dH₂O; pH = 7,25)
- Äquilibrierung des Gewebes: TMAs lichtgeschützt bei Raumtemperatur für 20-30 Minuten und in den Hybridisierungswaschpuffer stellen
- Entfernen überschüssiger FISH-Sonde: TMAs bei 72 °C für 2 Minuten in Hybridisierungswaschpuffer stellen
- Einmaliges Waschen des Gewebes in dH₂O
- Trocknen des Gewebes für 20 Minuten im Dunkeln
- Zellkernfärbung: 1 Tropfen DAPI auf das Gewebe pipettieren und TMAs mit einem Deckgläschen versehen
- Lagerung der TMAs: - 20 °C

2.8 Mikroskopische Auswertung

Die mikroskopische Auswertung der TMAs erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop „Axio Imager.A1“ (Zeiss, Oberkochen, Deutschland). Ausgeschlossen aus der Analyse wurden alle Gewebesspots die keine oder zu wenige Tumorzellkerne enthielten oder dessen Hybridisierung unzureichend für eine Bewertung war (sehr schwache oder keine Signale in Tumor- und Bindegewebszellkernen). Die Bewertung des Kopiezahlstatus wurde wie folgt anhand eines etablierten Grenzwertes (72) durchgeführt (siehe auch Abbildung 3):

- Heterozygote Deletion (Verlust eines Allels): Weniger 13q14 bzw. RB1 Signal als Centromer 10 Signal in ≥ 60 % aller Tumorzellkerne
- Homozygote Deletion (Verlust beider Allele): Kein 13q14 bzw. RB1 Signal in den Tumorzellkernen bei Vorhandensein des 13q14 bzw. RB1 Signals in den Bindegewebszellkernen und Centromer 10 Signal in Tumor- und Bindegewebszellkernen
- Normal (Beide Allele vorhanden): Gleiche Anzahl von 13q14 bzw. RB1 Signalen und Centromer 10 Signalen in nahezu allen bewertbaren Zellkernen

Abbildung 3: Repräsentative Beispiele der FISH-Analyse. a) Normaler 13q14.11 (ENOX1) Kopiezahlstatus mit zwei orangen 13q14.11 und zwei grünen Centromer 10 Signalen, b) Heterozygote 13q14.11 Deletion mit einem orangen 13q14.11 und zwei Centromer 10 Signalen, c) Normaler 13q14.2 (RB1) Kopiezahlstatus mit zwei orangen 13q14.2 und zwei grünen Centromer 10 Signalen, b) Heterozygote 13q14.2 Deletion mit einem orangen 13q14.2 und zwei Centromer 10 Signalen. Blau: Färbung der Zellkerne mittels DAPI.



2.9 Statistik

Für die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde die Software JMP – Statistical Discovery Software 9.0.2. (SAS Institute, Cary, NC, USA) verwendet. Mittels Chi-Quadrat-Test wurde auf einen Zusammenhang des 13q-Kopiezahlstatus mit den klinisch-pathologischen Parametern und der TMPRSS2:ERG-Fusion getestet. Der Einfluss des 13q-Kopiezahlstatus auf das PSA-Rezidivfreie Überleben der Patienten wurde mittels einer Kaplan-Meyer-Analyse und einem LogRank-Test untersucht. Zusätzlich dazu wurde eine Cox-Proportional-Hazard-Analyse durchgeführt in der getestet wurde, ob der Zusammenhang der 13q-Deletion mit dem PSA-Rezidiv unabhängig von den prä- und postoperativen Prognoseparametern ist. Diese Multivariateanalyse wurde in vier verschiedenen Szenarien durchgeführt, um die klinische Situation bestmöglich abzubilden. Das erste Szenario sollte die postoperative Situation abbilden und schließt daher neben dem 13q-Kopiezahlstatus den präoperativen PSA-Wert, das pa-

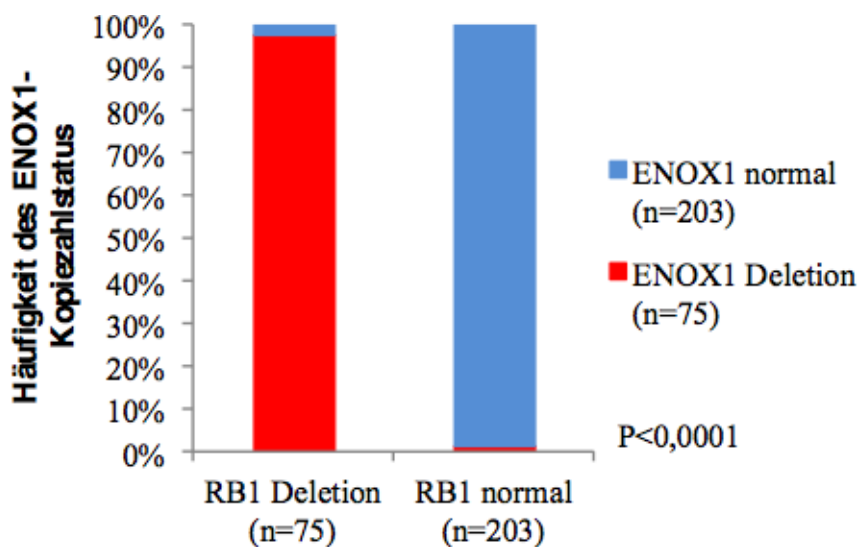
thologische Tumorstadium, den pathologischen Lymphknotenstatus, den Status des Resektionsrandes und den Gleason Score im Ektomiepräparat ein. In diesem Szenario ist die Aggressivität des Tumors am besten zu beurteilen. Allerdings ist die therapeutische Entscheidung schon getroffen. Das zweite Szenario bildet ebenfalls die postoperative Situation ab und enthält mit Ausnahme des Lymphknotenstatus alle Parameter aus dem ersten Szenario. Grund dafür ist, dass früher bei der Ektomie nicht immer eine Entnahme der Lymphknoten erfolgt ist. Dies reduziert „künstlich“ die Fallzahl in Szenario 2. Das dritte Szenario bildet keine reale klinische Situation ab. Es enthält neben dem 13q-Kopiezahlstatus, den präoperativen PSA-Wert, das klinische Tumorstadium und den Gleason Score im Ektomiepräparat und somit sowohl prä- als auch postoperative Prognoseparameter. Das vierte Szenario bildet die prätherapeutische Situation ab und enthält neben dem 13q-Kopiezahlstatus, den präoperativen PSA-Wert, das klinische Tumorstadium und den Gleason Score im Biopsiepräparat. Hier kann die Aggressivität des Tumors nicht sicher beurteilt werden, aber noch eine therapeutische Entscheidung getroffen werden. Das Signifikanzniveau wurde in allen Analysen auf $\leq 0,05$ festgelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Prävalenz der 13q-Deletion

Insgesamt konnte für 7.375 (59,3%) der 12.247 Prostatakarzinome der 13q14.11 (ENOX1)-Kopiezahlstatus mittels FISH bestimmt werden. Die verbleibenden 5.052 (40,65%) Gewebeproben mussten auf Grund von fehlendem Gewebe im TMA, fehlenden Tumorzellen im Gewebespot oder einer unzureichenden Hybridisierung (kein oder zu schwaches Signal) aus der Analyse ausgeschlossen werden. Eine heterozygote 13q-Deletion war in 1.545 (21%) der 7.375 auswertbaren Tumorproben nachweisbar. Homozygote 13q-Deletionen wurden nicht gefunden. In der FISH-Analyse der kommerziellen RB1-Sonde waren 307 (58,8%) der 522 untersuchten Tumoren analysierbar. Eine heterozygote RB1-Deletion konnte für (29,3%) der Karzinome ermittelt werden. Homozygote Deletionen waren nicht vorhanden. Insgesamt waren 278 (53,3%) der Tumoren sowohl in der RB1- als auch der 13q14 (ENOX1)-Analyse auswertbar. Die Korrelation beider Ergebnisse mittels Chi-Quadrat-Test ergab eine 98,6%ige Übereinstimmung im ermittelten Kopiezahlstatus beider Regionen ($p < 0,0001$, Abbildung 4). Dies bestätigt die Anwendbarkeit der 13q14-Sonde als Surrogat für die 13q-Deletion bzw. RB1-Deletion.

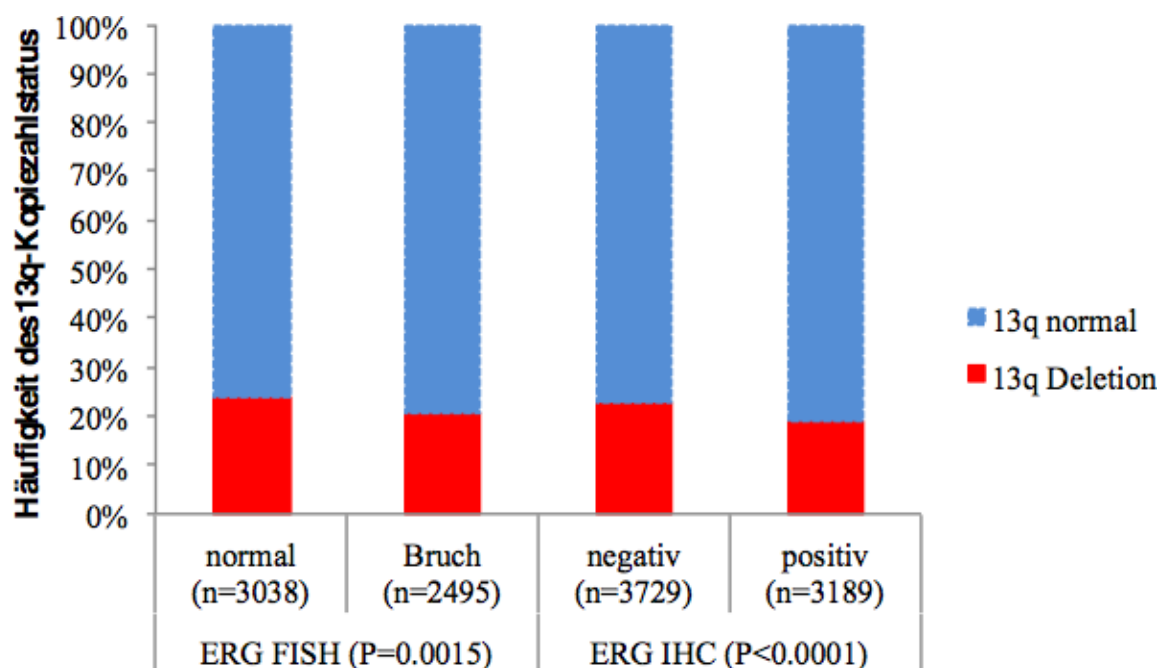
Abbildung 4. Übereinstimmung des Kopiezahlstatus in der 13q14.11 (ENOX1) und 13q14.2 (RB1) FISH-Analyse.



3.2 Assoziation der 13q-Deletion mit der TMPRSS2:ERG-Fusion

Um zu prüfen, in welchem Zusammenhang das Auftreten der 13q-Deletion mit dem Status der TMPRSS2:ERG-Fusion steht, wurde der 13q14-Kopiezahlstatus mit dem ERG-Expressionsstatus (Immunohistochemie) und dem genetischen ERG-Status (FISH) aus einer früheren Studie der Arbeitsgruppe (19, 24) mittels Chi-Quadrat-Test korreliert. Diese Analyse ergab eine signifikante Assoziation der 13q-Deletion mit einem negativen ERG-Status, sowohl beim Vergleich mit dem immunohistochemischen ERG-Status ($p < 0,0001$) als auch beim Vergleich mit dem genetischen ERG-Status ($p < 0,0001$). Allerdings waren die Unterschiede in der 13q-Deletionsrate in den Gruppen der ERG-negativen und ERG-positiven Karzinome eher gering. Zum Beispiel zeigten 854 (22,9%) der 3729 ERG-negativen Tumoren eine 13q-Deletion und 599 (18,7%) der 2593 ERG-positiven Karzinome eine 13q-Deletion. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Abbildung 5 dargestellt.

Abbildung 5: Assoziation der 13q-Deletion mit der TMPRSS2:ERG-Fusion. Die Daten zum ERG-Status stammen aus früheren Studien der Arbeitsgruppe und wurden mittels Immunohistochemie und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung ermittelt.



3.3 Assoziation der 13q-Deletion mit den klinisch-pathologischen Parametern beim Prostatakarzinom

Um zu prüfen, ob das Auftreten der 13q-Deletion mit dem Tumorphänotyp des Prostatakarzinoms in Zusammenhang steht, wurde mittels eines Chi-Quadrat-Tests der 13q14-Kopiezahlsstatus mit dem pathologischen Tumorstadium, dem Gleason Score in der Ektomie, dem präoperativen PSA-Wert, dem Lymphknotenstatus und dem Status des Resektionsrandes korreliert. Diese Analyse zeigte eine klare Assoziation der 13q-Deletion mit einem ungünstigen Phänotyp. Der Anteil an 13q-deletierten Tumoren stieg signifikant mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium ($p < 0,0001$), einem hohen klassischen Gleason Score ($p < 0,0001$), einem hohen quantitativen Gleason Score ($p < 0,0001$, Abbildung 6), dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen ($p = 0,0377$), einem hohen präoperativen PSA-Wert ($p = 0,0125$) und dem Tumorbefall des Resektionsrandes ($p = 0,0064$) an. In einer Untergruppenanalyse der Tumoren zeigte sich, dass diese Assoziationen sowohl in den ERG-negativen Karzinomen als auch den ERG-positiven Karzinomen weitestgehend erhalten blieb. In den ERG-negativen Tumoren war die 13q-Deletion mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium ($p < 0,0001$), einem hohen Gleason Score ($p < 0,0001$) und einem positiven Resektionsrand ($p = 0,0288$) assoziiert. In den ERG-positiven Karzinomen konnte ein signifikanter Zusammenhang zu einem hohen Gleason Score ($p < 0,0001$) und einem fortgeschrittenen Tumorstadium ($p = 0,0023$) nachgewiesen werden. Die Ergebnisse aller Analysen sind in Tabelle 6 zu finden.

Abbildung 6: Assoziation der 13q-Deletion mit dem quantitativen Gleason Score bei der Analyse aller Prostatakarzinome.

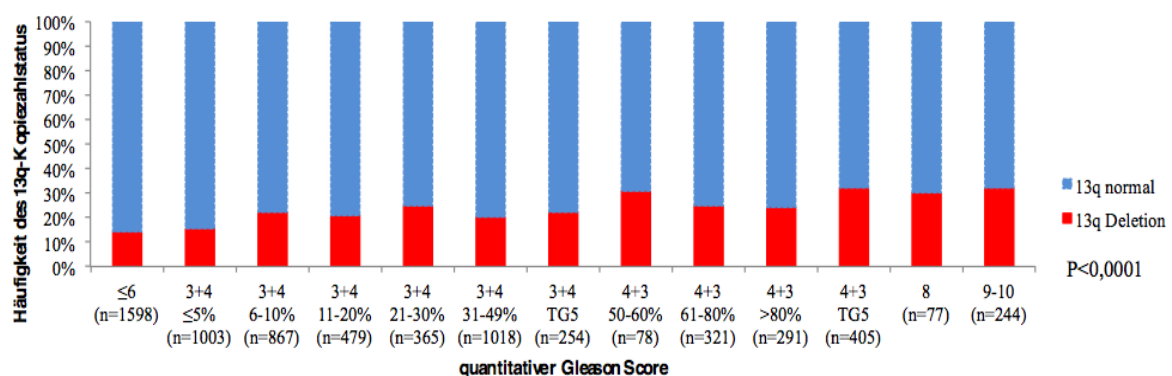


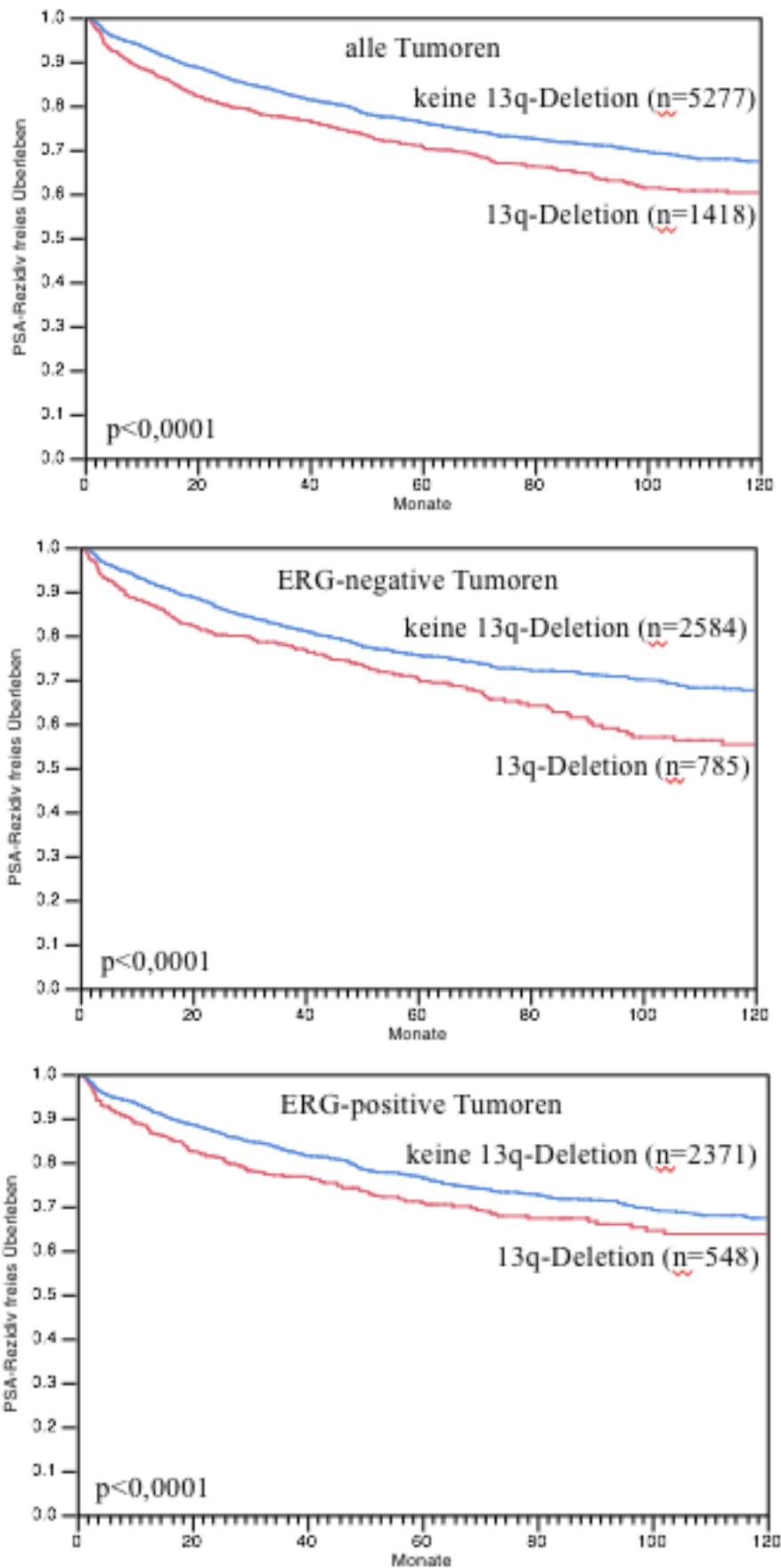
Tabelle 6: Assoziation der 13q-Deletion mit den klinisch-pathologischen Parametern bei der Analyse aller Prostatakarzinome und den Untergruppen der ERG-positiven und ERG-negativen Karzinome.

	Alle Tumoren			ERG-negative Tumoren			ERG-positive Tumoren		
	Anzahl	13q Deletion (%)	p Wert	Anzahl	13q Deletion (%)	p Wert	Anzahl	13q Deletion (%)	p Wert
Alle Tumoren	7375	21,0		3729	22,9		3189	18,7	
Tumorstadium									
pT2	4654	19,0	<0,0001	2477	20,6	<0,0001	1866	16,9	0,0023
pT3a	1678	22,4		752	25,9		845	19,3	
pT3b	966	27,0		465	30,1		442	24,0	
pT4	48	33,3		23	34,8		21	33,3	
Gleason Score									
≤3+3	1598	14,4	<0,0001	112	14,3	<0,0001	95	14,3	<0,0001
3+4	3732	20,0		400	21,6		307	18,2	
3+4 Tert. 5	254	22,4		38	26,0		17	18,3	
4+3	690	25,2		109	29,2		56	19,9	
4+3 Tert. 5	405	32,1		78	35,9		43	25,3	
≥4+4	321	31,8		70	37,2		28	25,7	
Lymphknotenmetastasen									
N0	4205	22,2	0,0377	2143	24,9	0,0952	1835	18,9	0,1693
N+	444	26,6		212	30,2		205	22,9	
PSA Level (ng/μl)									
<4	914	17,8	0,0125	408	19,4	0,2639	431	16,9	0,1377
4-10	4340	21,0		2175	23,4		1906	18,4	
10-20	1509	21,2		827	23,2		594	18,2	
>20	526	25,1		284	25,0		212	24,5	
Resektionsrand									
negativ	5811	20,3	0,0064	2959	22,2	0,0288	2481	18,0	0,1578
positiv	1428	23,6		708	26,1		645	20,5	

3.4 Prognostische Relevanz der 13q-Deletion beim Prostatakarzinom

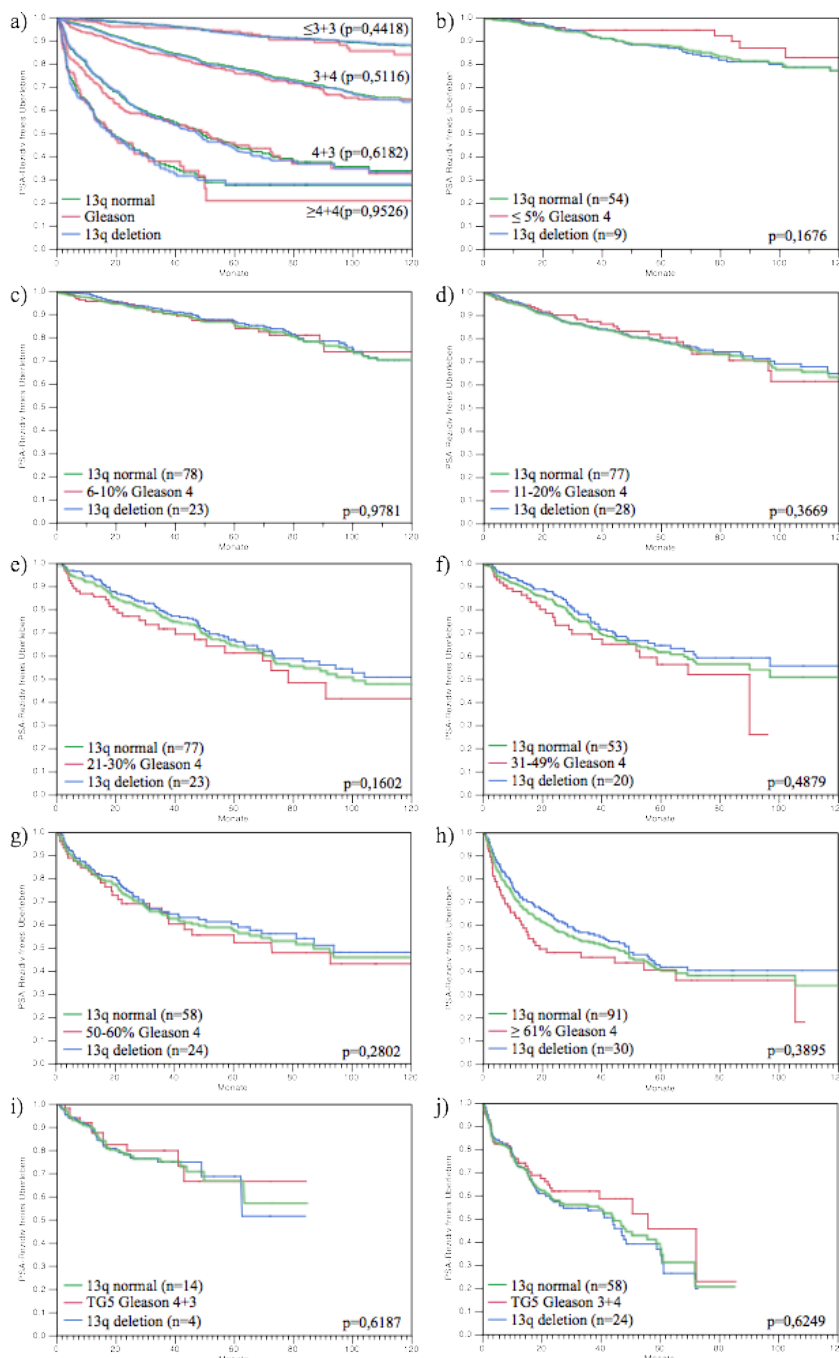
Um zu prüfen in welchem Zusammenhang das Auftreten der 13q-Deletion mit der Prognose der Patienten steht, wurde der 13q-Kopiezahlstatus mit den klinischen Verlaufsdaten zum PSA-Rezidiv in einer Kaplan-Meyer-Analyse assoziiert. Die statistische Signifikanz wurde in einem LogRank-Test geprüft. Bei der Analyse aller Prostatakarzinome wurde eine signifikante Assoziation der 13q-Deletion mit der Wahrscheinlichkeit eines frühen PSA-Rezidivs ermittelt ($p < 0,0001$). Die Auswirkungen auf die Prognose waren jedoch marginal (10 Jahre postoperativ circa 10% Unterschied). Von den Patienten, deren Tumoren keine 13q-Deletion aufwiesen hatten 10 Jahre postoperativ 30% dieser Patienten ein PSA-Rezidiv. Bei Vorliegen einer 13q-Deletion in der Tumoranalyse bekamen etwas weniger als 40% der Patienten im gleichen Zeitraum ein biochemisches Rezidiv (siehe Abbildung 7a). Bei der Untergruppenanalyse der ERG-positiven und ERG-negativen Tumoren zeigte sich in beiden Untergruppen ebenfalls ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Auftreten eines PSA-Rezidivs und der 13q-Deletion. Dieser war jedoch in den ERG-negativen Tumoren ($p < 0,0001$, Abbildung 7b) etwas ausgeprägter als in den ERG-positiven Tumoren ($p < 0,0001$, Abbildung 7c).

Abbildung 7: Assoziation der 13q-Deletion mit der Prognose des Patienten in a) allen Prostatakarzinomen, b) den ERG-negativen Prostatakarzinomen und c) den ERG-positiven Prostatakarzinomen.



In einer weiteren Untergruppenanalyse sollte geprüft werden, welche prognostische Aussagekraft die 13q-Deletion in den Gruppen der Tumoren mit einem identischen Gleason Score besitzt. Dazu wurde die Einteilung der Tumoren in den klassischen und den quantitativen Gleason Score verwendet. Diese Analysen zeigten, dass die 13q-Deletion keinen prognostischen Wert in Tumoren mit einem identischen Gleason Grad besitzt. Die Ergebnisse dieser Analysen sind in Abbildung 8 dargestellt.

Abbildung 8: Assoziation der 13q-Deletion mit dem PSA-Rezidiv in Tumoren mit einem identischen a) klassischen und b-j) quantitativen Gleason Score.



Um zu prüfen, in welchem Ausmaß die prognostische Aussagekraft der 13q-Deletion durch die Assoziation dieser mit den etablierten prä- und postoperativen Prognoseparametern des Prostatakarzinoms bedingt ist, wurde eine Cox-Proportional-Hazard-Analyse verwendet. Um sowohl die prä- als auch die posttherapeutische klinische Situation abzubilden wurden vier multivariate Szenarien zusammengestellt.

- Szenario 1 (postoperative Situation): 13q-Kopiezahlstatus, präoperativer PSA-Wert, pathologisches Tumorstadium, pathologischer Lymphknotenstatus, Status des Resektionsrandes und Gleason Score des Tumors im Ektomiepräparat.
In diesem Szenario kann die Aggressivität des Tumors am besten beurteilt werden, da nach der Ektomie der Gesamttumor für die histologische und pathologische Beurteilung zur Verfügung steht. Ein Prognoseparameter der in diesem Szenario eine unabhängige prognostische Aussagekraft zeigt, kann als sehr guter Prognoseparameter gewertet werden.
- Szenario 2 (postoperative Situation): 13q-Kopiezahlstatus, präoperativer PSA-Wert, pathologisches Tumorstadium, Status des Resektionsrandes und Gleason Score des Tumors im Ektomiepräparat.
Dieses Szenario bildet wie im Szenario 1 die postoperative Situation ab. Allerdings wurde hier der Lymphknotenstatus ausgeschlossen. Grund dafür ist, dass früher im Zuge der Ektomie nicht immer die Lymphknoten entfernt wurden. Dieses Szenario dient der Erhöhung der Fallzahl.
- Szenario 3 (prä/postoperative Situation): 13q-Kopiezahlstatus, präoperativer PSA-Wert, klinisches Tumorstadium und Gleason Score des Tumors im Ektomiepräparat.
Dieses Szenario bildet keine echte klinische Situation ab. Hier wurde das pathologische Tumorstadium gegen das weniger aussagekräftige klinische Tumorstadium ausgetauscht. Dieses Szenario soll prüfen wie gut der getestete putative Prognoseparameter in einem weniger aussagekräftigen Szenario ist.
- Szenario 4 (präoperative Situation): 13q-Kopiezahlstatus, präoperativer PSA-Wert, klinisches Tumorstadium und Gleason Score des Tumors im Biopsiepräparat.
Dieses Szenario bildet die heutige Situation der Erstdiagnose ab, in der der Arzt und Patient gemeinsam entscheiden müssen, welche Therapie geeignet ist. Die Aggressivität des Tumors ist in diesem Szenario im Vergleich zu den anderen Szenarien am schlechtesten beurteilbar. Allerdings werden genau für diese klinische Situation dringend Prognoseparameter benötigt.

Bei der Analyse aller Prostatakarzinome war die prognostische Aussagekraft der 13q-Deletion unabhängig von den präoperativen Prognoseparametern (Szenario 4) vorhanden ($p=0,0004$).

In den Szenarien 1-3 konnte kein signifikanter Wert für die 13q-Deletion in Bezug auf das PSA-Rezidiv mehr ermittelt werden. Die Untergruppenanalyse der ERG-negativen und ERG-positiven Karzinome zeigte eine unabhängige prognostische Aussagekraft für die 13q-Deletion in Szenario 4 in der Gruppe der ERG-negativen Karzinome ($p=0,0021$). In der Gruppe der ERG-positiven Karzinome konnte in allen 4 Szenarien kein signifikanter Wert mehr ermittelt werden. Die Ergebnisse der Analysen sind in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7: Prognostische Aussagekraft der 13q-Deletion in Abhängigkeit von den etablierten prä- und postoperativen Prognoseparametern des Prostatakarzinoms.

	Szenario	auswertbar (n)	präoperativer PSA-Wert	pT-Status	cT-Status	Gleason Score Ektomie	Gleason Score Biopsie	pN-Status	R-Status	13q-Deletion
alle Tumoren	1	3802	<0,0001	<0,0001		<0,0001		0,0016	0,0355	0,3161
	2	6188	<0,0001	<0,0001		<0,0001			<0,0001	0,1578
	3	6113	<0,0001		<0,0001	<0,0001				0,0691
	4	6321	<0,0001		<0,0001		<0,0001			0,0004
ERG-negative Tumoren	1	2070	0,0006	<0,0001		<0,0001		0,0039	0,0239	0,9155
	2	3289	<0,0001	<0,0001		<0,0001			0,0008	0,3783
	3	3246	<0,0001		<0,0001	<0,0001				0,1082
	4	3205			<0,0001		<0,0001			0,0021
ERG-positive Tumoren	1	1810	0,0055	<0,0001		<0,0001		0,3157	0,2146	0,6515
	2	2843	0,0014	<0,0001		<0,0001			0,0118	0,9355
	3	2772	<0,0001		<0,0001	<0,0001				0,6271
	4	2730			<0,0001		<0,0001			0,1005

4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es die klinische Relevanz der 13q-Deletion beim Prostatakarzinom zu klären. Dazu wurde der 13q-Kopiezahlstatus an über 12.000 Prostatakarzinomen im TMA-Format mittels FISH bestimmt und die Ergebnisse mit dem Tumorphänotyp und der Prognose des Patienten gemessen am PSA-Rezidiv korreliert.

Eine 13q-Deletion wurde in 21% der über 7.300 erfolgreich analysierten Prostatakarzinome nachgewiesen. Genomweite Kopiezahlstudien und Sequenzierstudien haben gezeigt, dass die 13q-Deletion unterschiedlich große Bereiche des langen Arms von Chromosom 13 einnehmen kann (18, 19, 39). Basierend darauf wurde eine FISH-Sonde hergestellt, welche im Zentrum der meisten Deletionen, der sogenannten gemeinsam minimal deletierten Region, im Bereich 13q14 lokalisiert ist. Die 13q-Deletionsrate in der vorliegenden Studie ist etwas geringer als in der Mehrzahl anderer Studien. In zwei großen CGH bzw. aCGH Metaanalysen wurde eine 13q-Deletionsrate von 28%-52% in 872 (17) und 662 (20) untersuchten Prostatakarzinomen gefunden. Zwei weitere Studien, welche ebenfalls die aCGH zur Kopiezahlanalyse nutzten fanden eine 13q-Deletionsrate von 16% (51) und 47% (18) in 333 und 181 analysierten Prostatakarzinomen. Die höchsten Verlustraten (18%-72%) des langen Arms des Chromosoms 13 wurden in Studien gefunden, welche die Methode der LOH zur Bestimmung von Kopiezahlveränderungen verwendeten (52-56). Die LOH ist jedoch keine präzise Methode. Es ist möglich, dass die geringe 13q-Deletionsrate in der vorliegenden Arbeit allein durch die Verwendung der FISH-Methode bedingt ist. Studien, die ebenfalls die FISH zur Bestimmung der 13q-Deletion anwendeten und damit einen direkten Vergleich mit den vorliegenden Ergebnissen ermöglichen würden, fehlen leider in der Literatur. Die FISH gilt als die präziseste Methode zur Bestimmung von Kopiezahlveränderungen. Grund dafür ist, dass diese Methode eine Untersuchung des Kopiezahlstatus direkt im Zellkern der Tumorzellen im Gewebe ermöglicht und damit Verunreinigungen durch nicht neoplastische Zellen ausgeschlossen werden können. Bei der Verwendung von isolierter DNA, wie es in allen anderen Methoden der Fall ist, hat neben der Reinheit der Tumor-DNA die Definition des Grenzwertes zur Deletionsbestimmung einen starken Einfluss auf das Ergebnis der Studie (73-75). In der vorliegenden Arbeit wurde zur Bestimmung des 13q-Kopiezahlstatus ein Grenzwert verwendet der innerhalb der Arbeitsgruppe anhand einer Vergleichsstudie etabliert wurde. In dieser Studie wurde die PTEN-Deletion mittels FISH und aCGH an einem identischen Tumorsubset bestimmt. Wenn mindestens 60% der Tumorzellkerne einen Verlust des PTEN-Signales im Vergleich zum Centromer 10 Signal in der FISH zeigten, konnte diese PTEN-Deletion auch in der aCGH detektiert werden (46). Dieser Grenzwert wurde außerdem bereits in zahlreichen Studien der Arbeitsgruppe zur Bestimmung der klinischen Relevanz verschiedener Deletionsregionen

beim Prostatakarzinom verwendet (39, 40, 43-45, 50, 72). Der Vergleich zu diesen Studien zeigt, dass die 13q-Deletion nach der TMPRSS2:ERG (52%) (24) und der 8p-Deletion (36%) (41) gemeinsam mit der 16q-Deletion (21%) (45) an dritter Stelle der häufigsten chromosomalen Veränderungen beim Prostatakarzinom steht.

Das Auftreten der 13q-Deletion war in der vorliegenden Arbeit signifikant mit ungünstigen Tumormerkmalen, wie einem hohen Gleason Score, einem fortgeschrittenen Tumorstadium, einem hohem präoperativen PSA-Wert, einer Lymphknotenmetastasierung, Tumorbefall des Resektionsrandes und der Wahrscheinlichkeit eines frühen PSA-Rezidivs assoziiert. Dieses Ergebnis spiegelt die klinische Bedeutung der chromosomalen Deletionen beim Prostatakarzinom insgesamt wieder. Innerhalb der Arbeitsgruppe am Institut für Pathologie wurden bereits viele der häufigsten Deletionen beim Prostatakarzinom mittels FISH am selben TMA auf ihre prognostische Relevanz hin untersucht. Dazu zählen Deletionen von PTEN (46), 3p (39), 5q (50), 6q (44), 16q (45), 8p (41), 18q (42) und 12p (40), die alle mit einem ungünstigen Phänotyp der Prostatakarzinome einhergehen. Dass der Unterschied in der Prognose zwischen Tumoren mit und ohne 13q-Deletion eher gering war (10%), erklärt auch die starke Diskrepanz in den Ergebnissen früherer Studien, welche mittels LOH die klinische Relevanz der 13q-Deletion an 16-294 Prostatakarzinomen untersuchten (52, 53, 56, 61-69). Während einige Studien höhere 13q-Verlustraten mit steigendem Gleason Grad (52), fortschreitendem Tumorstadium (56, 61-63), Metastasierung (63) und ungünstigem klinischen Verlauf (64) fanden, konnte andere diese Zusammenhänge nicht bestätigen (53, 65-69). Es ist natürlich außerdem möglich, dass diese diskrepanten Ergebnisse auf der Zusammensetzung der Studienkohorten basieren.

Obwohl die Bedeutung der Gene PTEN (76) und CHD1 (50, 77) für die 10q- bzw. 5q-Deletion beim Prostatakarzinom eindeutig geklärt ist, gibt es starke Hinweise darauf, dass die Mehrzahl der Deletionen beim Prostatakarzinom mehr als nur ein Tumor-relevantes Gen enthält. Diese Annahme basiert zum Beispiel darauf, dass die meisten Deletionen beim Prostatakarzinom sehr groß sein können, in der Regel ausschließlich heterozygot vorkommen und ein erkennbarer „second Hit“ – wie etwa eine Punktmutation - zur spezifischen Inaktivierung eines Genes auf dem verbleibenden Allel fehlt (19). Die schlechte Prognose der deletierten Tumoren beruht demnach vermutlich auf der zeitgleichen Deletions-bedingten Suppression von einigen bzw. mehreren tumorsuppressiven Genen. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete FISH-Sonde markiert das Gen ENOX1 (13q14). Dieses Gen wurde ursprünglich auf Grund seiner Lokalisation im Zentrum der gemeinsam minimal deletierten Region ausgewählt. Mittlerweile gibt es jedoch erste Hinweise, dass ENOX1 zu den Tumor-relevanten Genen der 13q-Deletion zählen könnte. ENOX1 ist ein Mitglied der Ekto-Nox-Familie der

NADH Oxidasen, die in zahlreichen zellulären Prozessen, wie zum Beispiel der Kontrolle von Zellwachstum und Zellüberleben eine Rolle spielen (78). Darüber hinaus konnte kürzlich in einer Studie gezeigt werden, dass eine zielgerichtete ENOX1-Therapie zu einer fehlerhaften Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen führt (60). Damit könnte eine Deletion von ENOX1 zur Entstehung der genomischen Instabilität in Tumorzellen beitragen. Das wichtigste Tumorsuppressorgen auf 13q bleibt RB1, das 4,5 Megabasen telomerisch neben ENOX1 liegt. Der Vergleich von ENOX1 und RB1 Deletionen zeigt, dass beide Gene häufig gemeinsam deletiert sind. Jedoch in mindestens 2% der Fälle nur eine RB1-Deletion vorliegt. Zudem zeigte sich in der RB1-Analyse eine höhere 13q-Deletionsrate (29%) als in der ENOX1-Analyse (21%). Vermutlich kommen isolierte RB1-Deletionen daher häufiger vor als in der Vergleichsanalyse gezeigt werden konnte. Für die Zukunft wäre es interessant zu klären, ob die Tumoren welche RB1, aber nicht ENOX1 deletiert sind sich klinisch anders verhalten, als die in unserer Studie gefundenen 13q-deletierten Karzinome. Neben RB1 sind weitere putative tumorsuppressive Gene BRAC2 (58) und FOXO1 (59), die laut Studien ebenfalls häufig von der 13q-Deletion betroffen sind (18, 19, 39).

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu klären, in welchem Zusammenhang die 13q-Deletion mit der TMPRSS2:ERG Fusion steht. Die TMPRSS2:ERG Fusion ist mit einer Rate von circa 50% die häufigste genetische Veränderung beim Prostatakarzinom (24). ERG ist ein Transkriptionsfaktor, der physiologisch nicht in den Prostataepithelzellen exprimiert wird. Bedingt durch die Fusion mit dem Promotor der Androgen-regulierten Serinprotease TMPRSS2 kommt es jedoch zu einer Androgen-abhängigen ERG-Expression in den betroffenen Tumorzellen (25). Frühere Studien haben gezeigt, dass die Mehrzahl aller Deletionen entweder mit einem ERG-positiven oder mit einem ERG-negativen Tumorphänotyp assoziiert ist. Zum Beispiel kommen Deletionen von PTEN, TP53, 3p13 und 16q23 gehäuft in den ERG-positiven Tumoren vor (18, 19, 39, 43, 45, 46), während Deletionen in den Regionen 5q21 und 6q15 vermehrt in den ERG-negativen Prostatakarzinomen zu finden sind (18, 44, 50, 79). Einige dieser Assoziationen sind durch zelluläre funktionelle Interaktionen bestimmter Gene mit ERG erklärbar. Der Verlust von PTEN bei gleichzeitiger Aktivierung von ERG soll zum Beispiel kooperativ begünstigende Effekte zur Tumordinvasion hervorrufen (80, 81), dies erklärt das vermehrte Auftreten dieser Deletion in den ERG-positiven Tumoren. Der Expressionsverlust von CHD1 hingegen führt zu einer Störung des Androgenrezeptor-Signalweges und damit zur Hemmung der Androgen-vermittelten Entstehung der TMPRSS2:ERG Fusion (50, 77). Aus diesem Grund sind homozygote CHD1-Deletionen ausschließlich in den ERG-negativen Tumoren zu finden (50). Dass in der vorliegenden Arbeit nur eine marginale Assoziation zwischen dem Auftreten der 13q-Deletion und einem ERG-negativen Tumorphänotyp gefunden wurde, war deswegen eher unerwartet. Allerdings wurden innerhalb der Arbeits-

gruppe bei der Analyse desselben TMAs mit der 12p- und 8p-Deletion ebenfalls zwei chromosomale Bereiche identifiziert, die gar keine Assoziation zum ERG-Status aufweisen (40, 41).

Obwohl in der multivariaten Analyse gezeigt werden konnte, dass die 13q-Deletion unabhängig von den etablierten präoperativen Prognoseparametern mit der Wahrscheinlichkeit eines PSA-Rezidivs assoziiert ist, muss darauf hingewiesen werden, dass die prognostische Aussagekraft der 13q-Deletion limitiert ist. Der Unterschied im Auftreten eines biochemischen Rezidivs ist innerhalb von 10 Jahren postoperativ lediglich 10% bei Tumoren mit oder ohne 13q-Deletion. Im Vergleich zu anderen Deletionen ist dieser Unterschied eher gering. Bei Tumoren mit einer PTEN-Deletion erleiden wesentlich mehr Patienten (25%) ein Rezidiv als bei Tumoren ohne PTEN-Deletion (72). Ähnliches gilt für die 8p- (20%), 5q- (15%) und 6q- (15%) Deletion (41, 44, 50). Der stärkste in der Routine angewendete Prognosemarker ist im Moment der Gleason Grad. Leider verschwindet der prognostische Wert der 13q-Deletion fast vollständig bei der Einteilung der Karzinome in Gruppen mit einem identischen Gleason Grad. Basierend auf der großen Anzahl von Prostatakarzinomen mit klinischen Verlaufsdaten ist es der Arbeitsgruppe am Institut für Pathologie kürzlich gelungen die prognostische Aussagekraft des Gleason Grades weiter zu verfeinern. Dazu wird der prozentuale Anteil des Gleason 4 Musters als eine kontinuierliche Variable verwandt (quantitativer Gleason Score). Sowohl im Biopsie- als auch im Ektomiepräparat kommt es zu einer kontinuierlichen Verschlechterung der Prognose mit steigendem Anteil des Gleason 4 Musters (15). Dass die 13q-Deletion keinerlei prognostischen Wert in den Tumoren mit einem identischen quantitativen Gleason Score besitzt, zeigt deutlich wie schwierig es für einen molekularen Marker ist, gegen einen morphologischen Parameter der Malignität des Gewebes anzukommen. Allerdings kann der kontinuierliche Anstieg der 13q-Deletionsrate mit steigendem Anteil des Gleason 4 Musters als „molekulare Validierung“ des quantitativen Gleason Scores angesehen werden.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass die 13q-Deletion zu den häufigsten genetischen Veränderungen des Prostatakarzinoms zählt, die außerdem mit einem ungünstigen Tumorphänotyp und einem schlechten klinischen Verlauf in Zusammenhang steht. Der Nachweis der 13q-Deletion mittels FISH ist ein einfaches und schnelles Verfahren, dass außerdem zu einer klaren Ja/Nein-Antwort führt. Basierend darauf ist es denkbar, dass die 13q-Deletion Bestandteil zukünftiger Multiparameter-Tests zur Bestimmung der Aggressivität von Prostatakarzinomen wird.

5 Zusammenfassung

Das Prostatakarzinom ist die häufigste maligne Tumorerkrankung und eine der häufigsten Tumor-assoziierten Todesursachen des Mannes weltweit. Auf genetischer Ebene ist das Prostatakarzinom durch die TMPRSS2:ERG-Fusion und zahlreiche Deletionen verschiedener chromosomaler Regionen charakterisiert. Eine der häufigsten chromosomalen Verluste stellt die 13q-Deletion dar, deren klinische Relevanz allerdings bis heute unklar ist. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher die prognostische Relevanz der 13q Deletion und deren Assoziation zum Tumorphänotyp beim Prostatakarzinom zu klären. Dazu wurde der 13q-Kopiezahlstatus an über 12.000 Prostatakarzinomen in Gewebemikroarray-Format für zwei chromosomale Loci (13q14.11; ENOX1 und 13q14.2; RB1) mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung bestimmt. Eine heterozygote 13q-Deletion wurde in 1.545 (21%) der 7.375 analysierbaren Prostatakarzinome gefunden. Homozygote 13q-Deletionen wurden nicht nachgewiesen. Die 13q-Deletion war assoziiert mit einem hohen Gleason Grad ($p < 0,0001$), einem fortgeschrittenen Tumorstadium ($p < 0,0001$), einem hohen präoperativen PSA-Wert ($p = 0,0125$), einer Lymphknotenmetastasierung ($p = 0,0377$), einem Tumorbefall des Resektionsrandes ($p = 0,0064$) und der Wahrscheinlichkeit eines frühen PSA-Rezidivs ($p < 0,0001$). Die 13q-Deletion war etwas häufiger in den ERG-negativen (22,9%) als in den ERG-positiven Karzinomen vorhanden (18,7%, $p < 0,0001$). Der prognostische Wert der 13q-Deletion war unabhängig ($p = 0,0004$) von den etablierten präoperativen Parametern, wie dem präoperativen PSA-Wert, dem klinischen Tumorstadium und dem Gleason Score in der Biopsie. Insgesamt zeigten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass die 13q-Deletion häufig beim Prostatakarzinom vorkommt und mit einem ungünstigen Tumorphänotyp und einer schlechten Prognose des Patienten assoziiert ist.

6 Abstract

Prostate cancer is the most common cancer and one of the common cause of cancer related death in men in the western societies. On the genetic level, prostate cancer is characterized by the TMPRSS2:ERG Fusion and deletions of several chromosomal regions. Loss of chromosome 13q belongs to the most frequent genetic alterations in prostate cancer. However, the clinical relevance of this deletion in prostate cancer is still unclear. To better understand the prognostic role of 13q deletion in prostate cancer we took advantage of our large prostate cancer tissue microarray comprising more than 12,000 cancer samples with full pathological and clinical follow up data. Fluorescence in-situ hybridization (FISH) with probes for ENOX1 (13q14.11) and the retinoblastoma gene (13q14.2) was employed. A 13q deletion was found in 21% of 7,375 analyzable cancers. Deletions were always heterozygous and associated with high Gleason grade ($p<0.0001$), advanced tumor stage ($p<0.0001$), high preoperative PSA levels ($p=0.0125$), lymph node metastasis ($p=0.0377$), positive resection margin ($p=0.0064$), and early biochemical recurrence ($p<0.0001$). 13q deletions were marginally more frequent in prostate cancers with negative ERG status (22.9%) than in ERG- positive tumors (18.7%; $p<0,0001$). Loss of 13q predicted patient prognosis independently from established prognostic parameters that are available at the time of biopsy ($p=0.0004$), including preoperative PSA level, clinical tumor stage, and biopsy Gleason grade. In summary, the results of our study identify 13q deletion as a frequent event in prostate cancer, which is linked to an adverse phenotype and poor prognosis in this disease.

7 Literaturverzeichnis

1. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2015;65(2):87-108.
2. Rohde V, Katalinic A, Wasem J, Aidelsburger P. Gesundheitsberichterstattung des Bundes; Heft 36: Prostataerkrankungen. Institut RK, editor2007.
3. Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms [Internet].
4. Takayama TK, Vessella RL, Lange PH. Newer applications of serum prostate-specific antigen in the management of prostate cancer. *Semin Oncol.* 1994;21(5):542-53.
5. Mazzucchelli R, Colanzi P, Pomante R, Muzzonigro G, Montironi R. Prostate tissue and serum markers. *Adv Clin Path.* 2000;4(3):111-20.
6. Pathology & Genetics - Tumors of the Urinary System and Male Genital Organs. Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA, editors: World Health Organization Classification of Tumours; 2004.
7. Lee HY, Lee HJ, Byun SS, Lee SE, Hong SK, Kim SH. Classification of focal prostatic lesions on transrectal ultrasound (TRUS) and the accuracy of TRUS to diagnose prostate cancer. *Korean J Radiol.* 2009;10(3):244-51.
8. Stanford JL, Feng ZD, Hamilton AS, Gilliland FD, Stephenson RA, Eley JW, et al. Urinary and sexual function after radical prostatectomy for clinically localized prostate cancer - The prostate cancer outcomes study. *Jama-J Am Med Assoc.* 2000;283(3):354-60.
9. TNM: Klassifikation Maligner Tumoren. Wittekind C, Meyer H-J, editors: International Union Against Cancer; 2013.
10. Gleason DF. Histologic grading of prostate cancer: a perspective. *Hum Pathol.* 1992;23(3):273-9.
11. Murphy GP, Busch C. Histopathology of Localized Prostate-Cancer. *Scand J Urol Nephrol.* 1994:7-40.
12. Wittschieber D, Kollermann J, Schlomm T, Sauter G, Erbersdobler A. Nuclear grading versus Gleason grading in small samples containing prostate cancer: a tissue microarray study. *Pathol Oncol Res.* 2010;16(4):479-84.
13. Nyame YA, Almassi N, Haywood SC, Greene DJ, Ganesan V, Dai C, et al. Intermediate-Term Outcomes of Men with Very Low/Low and Intermediate/High Risk Prostate Cancer Managed by Active Surveillance. *J Urol.* 2017.

14. Tay KJ, Scheltema MJ, Ahmed HU, Barret E, Coleman JA, Dominguez-Escrig J, et al. Patient selection for prostate focal therapy in the era of active surveillance: an International Delphi Consensus Project. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2017.
15. Sauter G, Steurer S, Clauditz TS, Krech T, Wittmer C, Lutz F, et al. Clinical Utility of Quantitative Gleason Grading in Prostate Biopsies and Prostatectomy Specimens. *Eur Urol.* 2016;69(4):592-8.
16. Sauter G, Clauditz T, Steurer S, Wittmer C, Buscheck F, Krech T, et al. Integrating Tertiary Gleason 5 Patterns into Quantitative Gleason Grading in Prostate Biopsies and Prostatectomy Specimens. *Eur Urol.* 2017.
17. Sun J, Liu W, Adams TS, Li X, Turner AR, Chang B, et al. DNA copy number alterations in prostate cancers: a combined analysis of published CGH studies. *Prostate.* 2007;67(7):692-700.
18. Taylor BS, Schultz N, Hieronymus H, Gopalan A, Xiao Y, Carver BS, et al. Integrative genomic profiling of human prostate cancer. *Cancer Cell.* 2010;18(1):11-22.
19. Weischenfeldt J, Simon R, Feuerbach L, Schlangen K, Weichenhan D, Minner S, et al. Integrative genomic analyses reveal an androgen-driven somatic alteration landscape in early-onset prostate cancer. *Cancer Cell.* 2013;23(2):159-70.
20. Williams JL, Greer PA, 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):474-88.
21. Barbieri CE, Baca SC, Lawrence MS, Demichelis F, Blattner M, Theurillat JP, et al. Exome sequencing identifies recurrent SPOP, FOXA1 and MED12 mutations in prostate cancer. *Nat Genet.* 2012;44(6):685-9.
22. Dong JT. Prevalent mutations in prostate cancer. *J Cell Biochem.* 2006;97(3):433-47.
23. Grasso CS, Wu YM, Robinson DR, Cao X, Dhanasekaran SM, Khan AP, et al. The mutational landscape of lethal castration-resistant prostate cancer. *Nature.* 2012;487(7406):239-43.
24. Minner S, Enodien M, Sirma H, Luebke AM, Krohn A, Mayer PS, et al. ERG Status Is Unrelated to PSA Recurrence in Radically Operated Prostate Cancer in the Absence of Anti-hormonal Therapy. *Clinical cancer research.* 2011;17(18):5878-88.
25. Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, Dhanasekaran SM, Mehra R, Sun XW, et al. Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science.* 2005;310(5748):644-8.
26. Brase JC, Johannes M, Mannsperger H, Falth M, Metzger J, Kacprzyk LA, et al. TMPRSS2-ERG -specific transcriptional modulation is associated with prostate cancer biomarkers and TGF-beta signaling. *BMC Cancer.* 2011;11:507.

27. Juhnke M, Heumann A, Chirico V, Hoflmayer D, Menz A, Hinsch A, et al. Apurinic/aprimidinic endonuclease 1 (APE1/Ref-1) overexpression is an independent prognostic marker in prostate cancer without TMPRSS2: ERG fusion. *Mol Carcinog.* 2017.
28. Melling N, Rashed M, Schroeder C, Hube-Magg C, Kluth M, Lang D, et al. High- Level gamma-Glutamyl-Hydrolase (GGH) Expression is Linked to Poor Prognosis in ERG Negative Prostate Cancer. *Int J Mol Sci.* 2017;18(2).
29. Burdelski C, Dieckmann T, Heumann A, Hube-Magg C, Kluth M, Beyer B, et al. p16 upregulation is linked to poor prognosis in ERG negative prostate cancer. *Tumour Biol.* 2016;37(9):12655-63.
30. Burdelski C, Bujupi E, Tsourlakis MC, Hube-Magg C, Kluth M, Melling N, et al. Loss of SOX9 Expression Is Associated with PSA Recurrence in ERG-Positive and PTEN Deleted Prostate Cancers. *PLoS One.* 2015;10(6):e0128525.
31. Muller J, Ehlers A, Burkhardt L, Sirma H, Steuber T, Graefen M, et al. Loss of pSer2448-mTOR expression is linked to adverse prognosis and tumor progression in ERG-fusion-positive cancers. *Int J Cancer.* 2013;132(6):1333-40.
32. Wang X, Jiang X. PTEN: a default gate-keeping tumor suppressor with a versatile tail. *Cell Res.* 2008;18(8):807-16.
33. Li L, Ross AH. Why is PTEN an important tumor suppressor? *J Cell Biochem.* 2007;102(6):1368-74.
34. Le Toriellec E, Despouy G, Pierron G, Gaye N, Joiner M, Bellanger D, et al. Haploinsufficiency of CDKN1B contributes to leukemogenesis in T-cell prolymphocytic leukemia. *Blood.* 2008;111(4):2321-8.
35. Ogino S, Kawasaki T, Kirkner GJ, Yamaji T, Loda M, Fuchs CS. Loss of nuclear p27 (CDKN1B/KIP1) in colorectal cancer is correlated with microsatellite instability and CIMP. *Mod Pathol.* 2007;20(1):15-22.
36. Aubrey BJ, Strasser A, Kelly GL. Tumor-Suppressor Functions of the TP53 Pathway. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2016;6(5).
37. Huang S, Gulzar ZG, Salari K, Lapointe J, Brooks JD, Pollack JR. Recurrent deletion of CHD1 in prostate cancer with relevance to cell invasiveness. *Oncogene.* 2011.
38. Mao X, Boyd LK, Yanez-Munoz RJ, Chaplin T, Xue L, Lin D, et al. Chromosome rearrangement associated inactivation of tumour suppressor genes in prostate cancer. *Am J Cancer Res.* 2011;1(5):604-17.
39. Krohn A, Seidel A, Burkhardt L, Bachmann F, Mader M, Grupp K, et al. Recurrent deletion of 3p13 targets multiple tumour suppressor genes and defines a distinct subgroup of aggressive ERG fusion-positive prostate cancers. *J Pathol.* 2013;231(1):130-41.

40. Kluth M, Ahrary R, Hube-Magg C, Ahmed M, Volta H, Schwemin C, et al. Genomic deletion of chromosome 12p is an independent prognostic marker in prostate cancer. *Oncotarget*. 2015;6(29):27966-79.
41. Kluth M, Amschler NN, Galal R, Moller-Koop C, Barrow P, Tsourlakis MC, et al. Deletion of 8p is an independent prognostic parameter in prostate cancer. *Oncotarget*. 2017;8(1):379-92.
42. Kluth M, Graunke M, Moller-Koop C, Hube-Magg C, Minner S, Michl U, et al. Deletion of 18q is a strong and independent prognostic feature in prostate cancer. *Oncotarget*. 2016;7(52):86339-49.
43. Kluth M, Harasimowicz S, Burkhardt L, Grupp K, Krohn A, Prien K, et al. Clinical significance of different types of p53 gene alteration in surgically treated prostate cancer. *Int J Cancer*. 2014;135(6):1369-80.
44. Kluth M, Hesse J, Heidl A, Krohn A, Steurer S, Sirma H, et al. Genomic deletion of MAP3K7 at 6q12-22 is associated with early PSA recurrence in prostate cancer and absence of TMPRSS2:ERG fusions. *Modern pathology*. 2013;26(7):975-83.
45. Kluth M, Runte F, Barow P, Omari J, Abdelaziz ZM, Paustian L, et al. Concurrent deletion of 16q23 and PTEN is an independent prognostic feature in prostate cancer. *Int J Cancer*. 2015;137(10):2354-63.
46. Krohn A, Diedler T, Burkhardt L, Mayer PS, De Silva C, Meyer-Kornblum M, et al. Genomic deletion of PTEN is associated with tumor progression and early PSA recurrence in ERG fusion-positive and fusion-negative prostate cancer. *Am J Pathol*. 2012;181(2):401-12.
47. Knudson AG, Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1971;68(4):820-3.
48. Davoli T, Xu AW, Mengwasser KE, Sack LM, Yoon JC, Park PJ, et al. Cumulative haploinsufficiency and triplosensitivity drive aneuploidy patterns and shape the cancer genome. *Cell*. 2013;155(4):948-62.
49. Solimini NL, Xu Q, Mermel CH, Liang AC, Schlabach MR, Luo J, et al. Recurrent hemizygous deletions in cancers may optimize proliferative potential. *Science*. 2012;337(6090):104-9.
50. Burkhardt L, Fuchs S, Krohn A, Masser S, Mader M, Kluth M, et al. CHD1 is a 5q21 tumor suppressor required for ERG rearrangement in prostate cancer. *Cancer Res*. 2013;73(9):2795-805.
51. Cancer Genome Atlas Research N. The Molecular Taxonomy of Primary Prostate Cancer. *Cell*. 2015;163(4):1011-25.
52. Cooney KA, Wetzel JC, Merajver SD, Macoska JA, Singleton TP, Wojno KJ. Distinct regions of allelic loss on 13q in prostate cancer. *Cancer Res*. 1996;56(5):1142-5.

53. Erbersdobler A, Graefen M, Wullbrand A, Hammerer P, Henke RP. Allelic losses at 8p, 10q, 11p, 13q, 16q, 17p, and 18q in prostatic carcinomas: The impact of zonal location, Gleason grade, and tumour multifocality. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 1999;2(4):204-10.
54. Latil A, Chene L, Mangin P, Fournier G, Berthon P, Cussenot O. Extensive analysis of the 13q14 region in human prostate tumors: DNA analysis and quantitative expression of genes lying in the interval of deletion. *Prostate.* 2003;57(1):39-50.
55. Verhage BA, van Houwelingen K, Ruijter TE, Kiemeny LA, Schalken JA. Allelic imbalance in hereditary and sporadic prostate cancer. *Prostate.* 2003;54(1):50-7.
56. von Knobloch R, Konrad L, Barth PJ, Brandt H, Wille S, Heidenreich A, et al. Genetic pathways and new progression markers for prostate cancer suggested by microsatellite allelotyping. *Clin Cancer Res.* 2004;10(3):1064-73.
57. Dyson NJ. RB1: a prototype tumor suppressor and an enigma. *Genes Dev.* 2016;30(13):1492-502.
58. Donoho G, Brenneman MA, Cui TX, Donoviel D, Vogel H, Goodwin EH, et al. Deletion of Brca2 exon 27 causes hypersensitivity to DNA crosslinks, chromosomal instability, and reduced life span in mice. *Genes Chromosomes Cancer.* 2003;36(4):317-31.
59. Arden KC. FoxOs in tumor suppression and stem cell maintenance. *Cell.* 2007;128(2):235-7.
60. Smith CA, Mont S, Traver G, Sekhar KR, Crooks PA, Freeman ML. Targeting Enox1 in tumor stroma increases the efficacy of fractionated radiotherapy. *Oncotarget.* 2016;7(47):77926-36.
61. Lu W, Takahashi H, Furusato M, Maekawa S, Nakano M, Meng C, et al. Allelotyping analysis at chromosome 13q of high-grade prostatic intraepithelial neoplasia and clinically insignificant and significant prostate cancers. *Prostate.* 2006;66(4):405-12.
62. Melamed J, Einhorn JM, Ittmann MM. Allelic loss on chromosome 13q in human prostate carcinoma. *Clin Cancer Res.* 1997;3(10):1867-72.
63. Yin Z, Spitz MR, Babaian RJ, Strom SS, Troncso P, Kagan J. Limiting the location of a putative human prostate cancer tumor suppressor gene at chromosome 13q14.3. *Oncogene.* 1999;18(52):7576-83.
64. Strohmeyer DM, Berger AP, Moore DH, 2nd, Bartsch G, Klocker H, Carroll PR, et al. Genetic aberrations in prostate carcinoma detected by comparative genomic hybridization and microsatellite analysis: association with progression and angiogenesis. *Prostate.* 2004;59(1):43-58.
65. Li C, Larsson C, Futreal A, Lancaster J, Phelan C, Aspenblad U, et al. Identification of two distinct deleted regions on chromosome 13 in prostate cancer. *Oncogene.* 1998;16(4):481-7.

66. Nakano M, Takahashi H, Shiraishi T, Lu T, Furusato M, Wakui S, et al. Prediction of clinically insignificant prostate cancer by detection of allelic imbalance at 6q, 8p and 13q. *Pathol Int.* 2008;58(7):415-20.
67. Pettus JA, Cowley BC, Maxwell T, Milash B, Stephenson RA, Rohr LR, et al. Multiple abnormalities detected by dye reversal genomic microarrays in prostate cancer: a much greater sensitivity than conventional cytogenetics. *Cancer Genet Cytogenet.* 2004;154(2):110-8.
68. Ribeiro FR, Diep CB, Jeronimo C, Henrique R, Lopes C, Eknaes M, et al. Statistical dissection of genetic pathways involved in prostate carcinogenesis. *Genes Chromosomes Cancer.* 2006;45(2):154-63.
69. Teixeira MR, Ribeiro FR, Eknaes M, Waehre H, Stenwig AE, Giercksky KE, et al. Genomic analysis of prostate carcinoma specimens obtained via ultrasound-guided needle biopsy may be of use in preoperative decision-making. *Cancer.* 2004;101(8):1786-93.
70. Mader M, Simon R, Kurtz S. FISH Oracle 2: a web server for integrative visualization of genomic data in cancer research. *Journal of clinical bioinformatics.* 2014;4(1):5.
71. Mader M, Simon R, Steinbiss S, 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.
72. Krohn A, Freudenthaler F, Harasimowicz S, Kluth M, Fuchs S, Burkhardt L, et al. Heterogeneity and chronology of PTEN deletion and ERG fusion in prostate cancer. *Mod Pathol.* 2014;27(12):1612-20.
73. Lai Y, Zhao H. A statistical method to detect chromosomal regions with DNA copy number alterations using SNP-array-based CGH data. *Comput Biol Chem.* 2005;29(1):47-54.
74. Pin C, Reuter M, Pearson B, Friis L, Overweg K, Baranyi J, et al. Comparison of different approaches for comparative genetic analysis using microarray hybridization. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2006;72(4):852-9.
75. Shah SP. Computational methods for identification of recurrent copy number alteration patterns by array CGH. *Cytogenet Genome Res.* 2008;123(1-4):343-51.
76. Deocampo ND, Huang H, Tindall DJ. The role of PTEN in the progression and survival of prostate cancer. *Minerva Endocrinol.* 2003;28(2):145-53.
77. Metzger E, Willmann D, McMillan J, Forne I, Metzger P, Gerhardt S, et al. Assembly of methylated KDM1A and CHD1 drives androgen receptor-dependent transcription and translocation. *Nat Struct Mol Biol.* 2016;23(2):132-9.
78. Scarlett DJ, Herst PM, Berridge MV. Multiple proteins with single activities or a single protein with multiple activities: the conundrum of cell surface NADH oxidoreductases. *Biochim Biophys Acta.* 2005;1708(1):108-19.

79. Lapointe J, Li C, Giacomini CP, Salari K, Huang S, Wang P, et al. Genomic profiling reveals alternative genetic pathways of prostate tumorigenesis. *Cancer Res.* 2007;67(18): 8504-10.
80. Carver BS, Tran J, Gopalan A, Chen Z, Shaikh S, Carracedo A, et al. Aberrant ERG expression cooperates with loss of PTEN to promote cancer progression in the prostate. *Nat Genet.* 2009;41(5):619-24.
81. King JC, Xu J, Wongvipat J, Hieronymus H, Carver BS, Leung DH, et al. Cooperativity of TMPRSS2-ERG with PI3-kinase pathway activation in prostate oncogenesis. *Nat Genet.* 2009;41(5):524-6.

8 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

- Tab. 1** TNM-Klassifikation des Prostatakarzinoms nach UICC 2009
- Tab. 2** Zusammensetzung des Patientenkollektivs im Prognose-Gewebe-microarray (n=12.427)
- Tab. 3** Verwendete Geräte
- Tab. 4** Liste der in dieser Arbeit verwendeten Reagenzien und Kits
- Tab. 5** Übersicht über die für diese Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien
- Tab. 6** Assoziation der 13q-Deletion mit den klinisch-pathologischen Parametern bei der Analyse aller Prostatakarzinome und den Untergruppen der ERG-positiven und ERG-negativen Karzinome.
- Tab. 7** Prognostische Aussagekraft der 13q-Deletion in Abhängigkeit von den etablierten prä- und postoperativen Prognoseparametern des Prostatakarzinoms

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1:** Der Gleason Grad nach Donald F. Gleason. Dargestellt sind die morphologischen Veränderungen der Drüsenstruktur in den Gleason Graden 1-5
- Abb. 2:** Architektur der 13q-Deletion. Die Abbildung zeigt die mittels FISH Oracle (70, 71) re-analysierten Daten der Array-basierten komparativen genomischen Hybridisierungsstudien von Taylor et al. (n=181 Tumoren) (18), Krohn et al. (n=72 Tumoren) (39), Mao et al. (n=77 Tumoren) (38) und Huang et al. (n=86 Tumoren) (37). Die blauen Linien zeigen die deletierten Bereiche in den einzelnen untersuchten Tumoren bei einer Intensität von $-0,3$

- Abb. 3:** Repräsentative Beispiele der FISH-Analyse. a) Normaler 13q14.11 (ENOX1) Kopiezahlstatus mit zwei orangen 13q14.11 und zwei grünen Centromer 10 Signalen, b) Heterozygote 13q14.11 Deletion mit einem orangen 13q14.11 und zwei Centromer 10 Signalen, c) Normaler 13q14.2 (RB1) Kopiezahlstatus mit zwei orangen 13q14.2 und zwei grünen Centromer 10 Signalen, b) Heterozygote 13q14.2 Deletion mit einem orangen 13q14.2 und zwei Centromer 10 Signalen. Blau: Färbung der Zellkerne mittels DAPI.
- Abb. 4:** Übereinstimmung des Kopiezahlstatus in der 13q14.11 (ENOX1) und 13q14.2 (RB1) FISH-Analyse
- Abb. 5:** Assoziation der 13q-Deletion mit der TMPRSS2:ERG-Fusion. Die Daten zum ERG-Status stammen aus früheren Studien der Arbeitsgruppe und wurden mittels Immunohistochemie und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung ermittelt
- Abb. 6:** Assoziation der 13q-Deletion mit dem quantitativen Gleason Score bei der Analyse aller Prostatakarzinome.
- Abb. 7:** Assoziation der 13q-Deletion mit der Prognose des Patienten in a) allen Prostatakarzinomen, b) den ERG-negativen Prostatakarzinomen und c) den ERG-positiven Prostatakarzinomen.
- Abb. 8:** Assoziation der 13q-Deletion mit dem PSA-Rezidiv in Tumoren mit einem identischen a) klassischen und b-j) quantitativen Gleason Score

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei denen bedanken, die mich bei der Durchführung dieser Arbeit unterstützt haben. Besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Sauter für die Überlassung des Themas sowie die fachkompetente Unterstützung. Herrn PD Dr. Ronald Simon danke ich für die konstruktive Kritik bei der Erstellung dieser Arbeit sowie der wissenschaftlichen Supervision.

Hervorzuheben ist vor allem mein Dank an Frau Dr. Martina Kluth für den stetigen wissenschaftlichen Austausch, die Integration in das Team und die Einarbeitung in das Thema.

Meinen Kolleginnen und Kollegen im Labor danke ich für die organisatorische Unterstützung sowie die nette Zusammenarbeit.

10 Lebenslauf

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

11 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: