

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Institut für Pathologie: Molekularpathologie
Direktor: Professor Dr. med. Guido Sauter

Charakterisierung der 5q-Deletion beim Prostatakarzinom

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Humanmedizin
Medizinische Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Malik Mudabar Ahmed

aus

Hamburg

Hamburg, 2018

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 25.06.2018

Veröffentlicht mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

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

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: Prof. Dr. Christian Kubisch

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	3
1.1 Das Prostatakarzinom	3
1.2 Genetische Veränderungen beim Prostatakarzinom	5
1.3 Die 5q-Deletion beim Prostatakarzinom	6
1.4 Zielsetzung der Arbeit	8
2 Material und Methoden	9
2.1 Gewebekollektiv	9
2.2 Reagenzien und kommerzielle Kits	11
2.3 Materialien und Geräte	12
2.4 DH10B Escherichia coli (E. coli) Klone	13
2.5 FISH-Sonden-Herstellung	13
2.6 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)	15
2.7 Mikroskopische Auswertung	16
2.8 Statistische Auswertung	17
3 Ergebnisse	18
3.1 Auswertbarkeit der FISH-Analyse	18
3.2 Häufigkeit der 5q13- und 5q21-Deletion	18
3.3 Assoziation der 5q13- und 5q21-Deletion mit dem Tumorphänotyp des Prostatakarzinoms	19
3.4 Assoziation der 5q13- und 5q21-Deletion mit der Prognose des Patienten..	20
3.5 Architektur der 5q-Deletion	23
3.6 Assoziation der 5q-Deletion mit dem TMPRSS2:ERG-Status	24
3.7 Prognostische Relevanz der 5q13/5q21-Ko-Deletion beim Prostatakarzinom	26
4 Diskussion	30
5 Zusammenfassung	34
6 Abstract	35
7 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	36
8 Abkürzungsverzeichnis	37
9 Literaturverzeichnis	39
10 Danksagung	43
12 Lebenslauf	44
11 Eidesstattliche Versicherung	44

1 Einleitung

1.1 Das Prostatakarzinom

Das Prostatakarzinom stellt mit einer Inzidenz von über 750.000 im Jahr 2012 die häufigste Karzinomerkrankung des Mannes in den westlichen Industrieländern dar (1). Die Diagnose wird bei der Mehrheit der Karzinome mit einem exponentiellen Anstieg ab einem Alter von 50 Jahren gestellt. Das mittlere Diagnosealter ist 70 Jahre (2). Deshalb gilt das Prostatakarzinom als eine Erkrankung des älteren Mannes. Durch verbesserte diagnostische Methoden, wie beispielsweise dem laborchemischen Nachweis des Prostata-spezifischen Antigens (PSA) im Serum, zeigte sich eine hohe Prävalenz des Prostatakarzinoms, da durch den PSA-Nachweis heute vor allem symptomlose Tumoren entdeckt werden (1, 2). Neben verbesserter diagnostischer Methoden, wird basierend auf der konstant steigenden Lebenserwartung in der Bevölkerung außerdem gemutmaßt, dass zukünftig die Prävalenz des Prostatakarzinoms beim Mann weiter zunimmt (2, 3).

Wegen der hohen Prävalenz des Prostatakarzinoms gilt für Männer ab dem 45. Lebensjahr die Empfehlung einer regelmäßigen Vorsorgeuntersuchung. Diese Vorsorgeuntersuchung setzt sich idealerweise aus der Bestimmung des PSA-Wertes und einer digital rektalen Untersuchung zusammen (DRU) (3). Die Krankenkassen tragen jedoch lediglich die Kosten für die DRU (2). Wenn der PSA-Wert 4 ng/ml oder höher ist und / oder der Tastbefund aus der digital rektalen Untersuchung auffällig ist, erfolgt eine Stanzbiopsie der Prostata (3, 4). Unter Anwendung des Gleason Score wird das Biopsiepräparat im Hinblick auf die Abweichung der Drüsenstruktur von einem normalen Drüsenmuster untersucht, so dass dem Biopsiepräparat schließlich ein bestimmter Gleason Grad zugewiesen wird. Der Gleason Grad von 1 weist auf sehr geringe Abweichungen hin, wobei ein Gleason Grad von 5 auf eine hohe Entdifferenzierung der Drüsenstruktur hinweist. Aus dem primären und sekundären Gleason Grad entsteht der Gleason Score, wie beispielsweise 4+3 (5). Der Gleason Score zählt heute zu den wichtigsten therapieentscheidenden Parametern bei der Diagnose eines Prostatakarzinoms. Je höher der Gleason Score ist, desto wahrscheinlicher ist das Vorliegen eines aggressiven Prostatakarzinoms (6).

Die Mehrheit der Prostatakarzinome ist jedoch klinisch insignifikant und würde

unentdeckt nie zu Symptomen führen. Trotzdem gehört das Prostatakarzinom zu den häufigsten Tumor-bedingten Todesursachen des Mannes (1, 2). Grund dafür ist eine kleine Gruppe von hoch aggressiven Tumoren, die mit einem schweren Krankheitsverlauf verknüpft sein können und somit unbedingt therapiert werden müssen. Aktuell ist der häufigste kurative Therapieansatz die vollständige operative Entfernung der Prostata (Prostatektomie) (3). Allerdings ist die Prostatektomie mit vielen potentiellen Nebenwirkungen verknüpft, wie Harninkontinenz und Impotenz (4). Diese können zu einer deutlichen Einschränkung der Lebensqualität der Patienten führen. Neben der kurativen Therapie ist für lokalbegrenzte Tumoren mit einem geringen Aggressivitätspotential auch eine „Active Surveillance“ möglich. Bei diesem Therapieansatz erfolgt eine engmaschige Beobachtung des Patienten bis zur Progression des Tumors. Erst dann wird eine invasive kurative Therapie, wie die Ektomie durchgeführt (3). Für diese Therapie sind jedoch nur Tumoren geeignet, deren Aggressivitätspotential bei der initialen Diagnose als gering eingeschätzt wird (3).

Zur Beurteilung des Progressionsrisikos erfolgt anhand des präoperativen PSA-Wertes, dem klinischen Tumorstadium (cT), das durch die DRU bestimmt wird, des Gleason Scores und dem Tumorgehalt in den Gewebestanden eine Einteilung in drei Risikogruppen. Für die „Active Surveillance“ Strategie werden heute nur Tumoren mit einem geringen Risiko empfohlen (Gleason $\leq 3+3$, PSA ≤ 10 ng/ml, cT1-2, Tumor in max. 2 Stenzen, Volumen $\leq 50\%$). Bereits bei Tumoren mit einem intermediären Risiko wird laut S3-Leitlinie zu einer sofortigen kurativen Therapie geraten (3). Eingestuft als intermediäres Progressionsrisiko werden allen Tumoren, die auf die Prostata begrenzt sind (cT2), eine Gleason-Score von 7 und ein PSA-Wert zwischen 10-20 ng/ml haben (3). Damit umfasst diese Gruppe die Mehrheit aller diagnostizierter Prostatakarzinome. Es ist allerdings schon lange bekannt, dass Tumoren mit einem Gleason-Score von $3+4=7$ und $4+3=7$ prognostisch einen komplett unterschiedlichen Verlauf aufweisen können (6). Des weiteren ist es nicht möglich anhand der etablierten präoperativen prognostischen Parameter (PSA-Wert, Gleason Grad und klinische Tumorstadium), die Tumoraggressivität eindeutig zu bestimmen. Aufgrund dessen fällt bei vielen Patienten mit einem wahrscheinlich nichtaggressiven Tumor die Entscheidung für eine Prostatektomie. Das heißt, um das Risiko der putativen Tumorprogression zu eliminieren, wird das Risiko einer Übertherapie in Kauf genommen.

Eine Verbesserung der diagnostischen Methoden ist damit für Tumoren mit einem intermediären Progressionsrisiko von großer Bedeutung, denn vor allem in dieser Gruppe stehen die Patienten vor der schwierigen Entscheidung zwischen einem

abwartenden Therapieverhalten („Active Surveillance“) oder einer Prostatektomie (2-4). Es ist daher nicht erstaunlich, dass sich viele Studien im Bereich der Prostatakarzinomforschung mit der Verbesserung der diagnostischen Methoden beschäftigen. Eine aktuelle Studie des Instituts für Pathologie ergab, dass der Anteil des Gleason Grades 4 von großer Bedeutung ist. Sowohl in der Gruppe der Gleason 3+4 als auch der Gruppe der Gleason 4+3 Tumoren steigt die Wahrscheinlichkeit eines PSA-Rezidivs mit einer Erhöhung des prozentualen Anteil des Gleason 4 Musters an. Aus diesem Grund wurde von der Arbeitsgruppe ein quantitativer Gleason Score etabliert, bei dem der prozentuale Anteil des Gleason 4 Musters im pathologischen Befund mit angegeben wird (7). Neben dem Gleason Score, der einer nicht unbeträchtlichen Interobservervarianz unterliegt (8), ist eine weitere Möglichkeit zur Verbesserung der Diagnostik, die Etablierung von molekularen Prognosemarkern. Deshalb besteht das primäre Ziel der Prostatakarzinomforschung innerhalb der Arbeitsgruppe des Instituts für Pathologie darin, molekulare und genetische Veränderungen beim Prostatakarzinom auf ihre klinische und tumorbiologische Relevanz hin zu untersuchen. Es besteht die Hoffnung, dass die Kombination aus histologischen Kriterien (Gleason Score) und molekularen bzw. genetischen Prognosemarkern zu einer besseren Einschätzung der Tumoraggressivität führt und somit für den Patienten eine genauere Diagnose und entsprechend eine adäquate Therapie ermöglicht.

1.2 Genetische Veränderungen beim Prostatakarzinom

Das Prostatakarzinom ist im Hinblick auf genetische Veränderungen vor allem durch Translokationen und Deletionen charakterisiert. Punktmutationen und Amplifikationen sind eher eine Seltenheit beim Prostatakarzinom (9-14).

Die TMPRSS2:ERG-Translokation ist die häufigste chromosomale Veränderung beim Prostatakarzinom und kommt bei circa 50% aller Prostatakarzinome vor (14, 15). Hierbei kommt es zur Fusion des Androgen-regulierten Gens TMPRSS2 und des Gens ERG, was auf eine Deletion auf Chromosom 21 zurückzuführen ist (16). Charakteristisch ist das besonders frühe Auftreten der Tumoren mit einer TMPRSS2:ERG-Translokation, denn diese Tumoren kommen häufig vor dem 50. Lebensjahr vor (14). Trotz einer Veränderung der Zusammensetzung des Transkriptoms (9, 10) durch die ERG Expression hat die TMPRSS2:ERG-Fusion für sich allein genommen keine prognostische Relevanz (15). Studien konnten allerdings zeigen, dass eine Einteilung der Prostatakarzinome in die molekulare Untergruppen der ERG-positiven (mit TMPRSS2:ERG-Fusion) und ERG-negativen (ohne TMPRSS2:ERG-Fusion) Karzinome

generell sinnvoll ist. Viele genetische und molekulare Veränderungen zeigen eine Assoziation zum ERG-Status (12, 17-32). Beispielsweise zeigen Deletionen von 10q23 (PTEN), 3p13, 16q23 und 17p13 (TP53) ein häufigeres Auftreten in ERG-positiven Tumoren (9, 12, 30, 32, 33). Deletionen von 6q15 und 5q21 hingegen zeigen eine klare Assoziation zu ERG-negativen Tumoren (28, 31, 34).

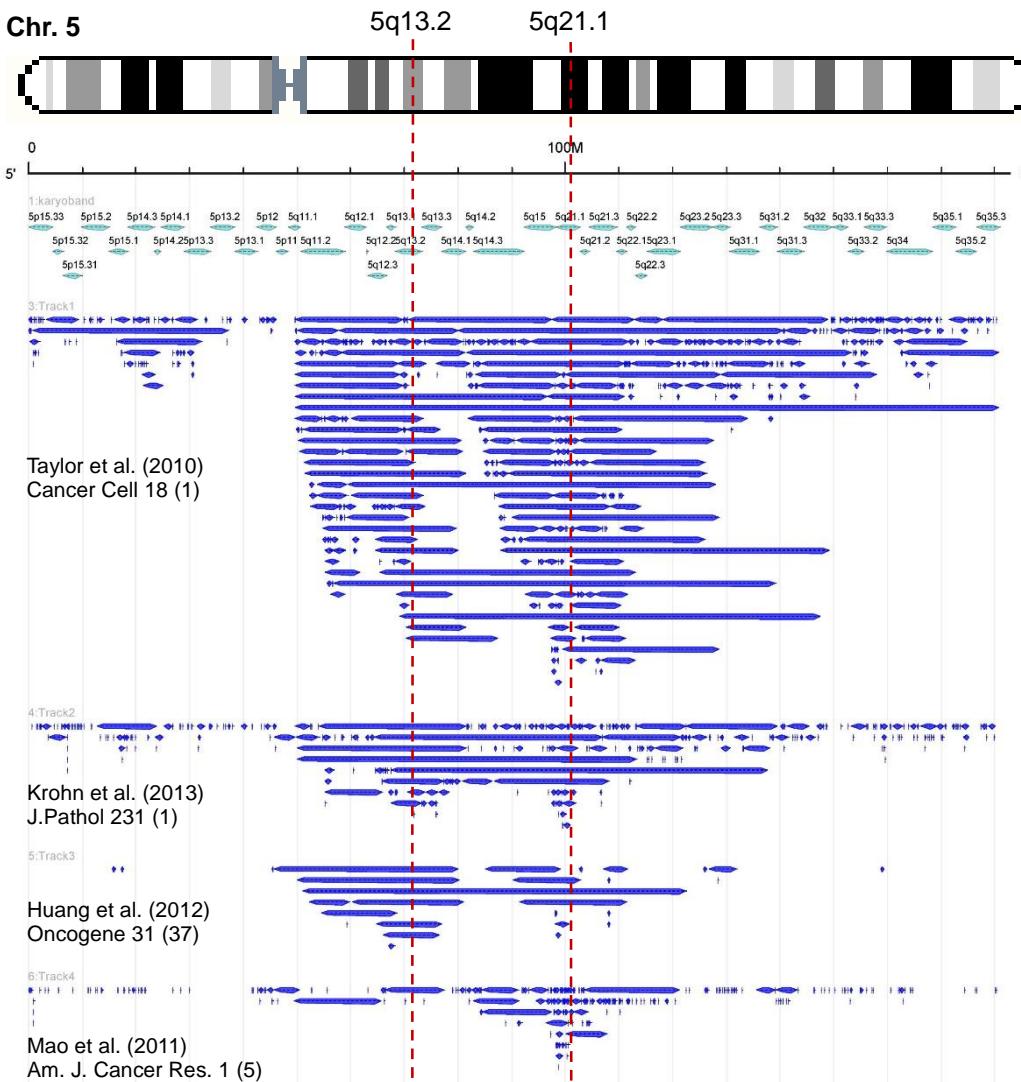
Ebenfalls häufig beim Prostatakarzinom sind Verluste verschiedener chromosomaler Regionen. Dazu zählen zum Beispiel Deletionen auf den Chromosomenarmen 8p, 6q, 5q, 16q, 2q, 17p und 12p und den Regionen 3p13 und 10q23 (9, 12, 13). Ein charakteristisches Merkmal der Mehrheit dieser Deletionen ist, dass sie sowohl große chromosomale Regionen aus mehreren Megabasen eines Chromosoms einnehmen können, aber auch kleine - sogenannte minimal deletierte Regionen - von wenigen Kilobasen aufweisen (9, 12). Eine Ausnahme stellen Deletionen von 3p13 und 10q23 dar. Diese Deletionen umfassen in der Regel nur wenige Kilobasen und dienen daher der Inaktivierung von einem bzw. wenigen Genen. Bei der 3p13-Deletion handelt es sich dabei um die bekannten putativen Tumorsuppressorgene FOXP1, SHQ1 und RYBP und bei der 10q23-Deletion um das bekannte Tumorsuppressorgen PTEN (12, 32, 35, 36). Bei allen anderen Deletionen gibt es zwar Hinweise auf einzelne tumorrelevante Zielgene, aber „das Gen der Deletion“ konnte in der Regel nicht identifiziert werden. In den letzten Jahren kristallisierte sich daher immer mehr die Idee heraus, dass diese Deletionen der Suppression von mehreren putativ haplo-insuffizienten Genen dienen (37, 38). Unabhängig von der Frage nach den Zielgenen der Deletionen wurde die Mehrzahl der Deletionen bereits innerhalb der Arbeitsgruppe am Institut für Pathologie auf ihre klinische Relevanz hin an einem Kollektiv von bis zu 12.427 Prostatakarzinomen untersucht. Bemerkenswerterweise konnte für alle untersuchten Deletionen eine prognostische Relevanz beim Prostatakarzinom nachgewiesen werden (12, 29-33, 39, 40).

1.3 Die 5q-Deletion beim Prostatakarzinom

Die 5q-Deletion zählt mit einer Rate von 6-19% in der Literatur zu den häufigsten genetischen Veränderungen des Prostatakarzinoms (9, 12, 13, 28, 35, 41). Eine Re-Analyse der Daten von Studien die mittels der Array-basierten genomischen Hybridisierung (aCGH) die genomweiten Kopiezahlveränderungen beim Prostatakarzinom untersuchten, zeigen eine für das Prostatakarzinom typische Deletions-Architektur der 5q-Deletionen (9, 12, 42, 43). Neben sehr großen Deletionen, die von der Region 5q11 bis 5q36 reichen und damit bis zu 130 Megabasen einnehmen

können, gibt es auch kleine minimal deletierte Regionen. Besonders heben sich hier allerdings zwei Regionen - die 5q13 und die 5q21 - hervor. Es scheint so, als ob diese Regionen sowohl gemeinsam in sehr großen 5q-Deletionen verloren gehen können, aber auch alleine als kleine Deletion in einem Tumor auftreten können (siehe Abbildung 1).

Abbildung 1: Architektur der 5q-Deletion. Dargestellt ist die Re-Analyse publizierter Array-basierter genomischer Hybridisierungsstudien von Huang et al. (n=86) (42), Taylor et al. (n=181) (9), Mao et al. (n=77) (43) und Krohn et al. (n=72) (12). Die Re-Analyse erfolgte mittels FISH Oracle. Jede blaue Linie markiert eine Deletion in einem einzelnen Tumor.



Die meisten Untersuchungen zur 5q-Deletion fokussierten sich allerdings auf die 5q21 Region, vor allem nachdem das Gen CHD1 als wesentliches Zielgen bzw. Tumorsuppressorgen der Deletion identifiziert werden konnte (9, 28, 34, 35, 41, 44, 45). So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass die CHD1 Inaktivierung die Entstehung der TMPRSS2:ERG Fusion durch Hemmung des Androgenrezeptor (AR)-Signals verhindert (28). Dies ist auch der Grund dafür, warum die 5q21-Deletion klar den ERG-negativen Prostatakarzinomen zugeordnet werden können (28, 34). Des Weiteren konnte innerhalb der Arbeitsgruppe am Institut für Pathologie eine deutliche Assoziation der 5q21-Deletion mit einem ungünstigen Tumorphänotyp, der Wahrscheinlichkeit eines frühen PSA-Rezidivs und einem ungünstigen klinischen Verlauf gezeigt werden (28, 46). Welche Bedeutung die 5q13-Deletion alleine oder in Kombination mit der 5q21-Deletion beim Prostatakarzinom besitzt ist allerdings bis heute vollkommen unklar.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Die 5q-Deletion zählt zu den häufigsten chromosomalen Verlusten beim Prostatakarzinom. Neben großen Deletionen, die fast den kompletten 5q-Arm einnehmen, existieren zwei kleine sogenannte minimal deletierte Bereiche in den Regionen 5q13 und 5q21. Während die 5q21-Deletion bereits sehr gut untersucht ist und die hohe klinische Relevanz dieser Deletionregion eindeutig geklärt ist, ist über die Bedeutung der 5q13-Deletion beim Prostatakarzinom nichts bekannt. Ziel der vorliegenden Arbeit war daher zu klären, in welchem Zusammenhang die 5q13-Deletion alleine oder auch in Ko-Deletion mit der 5q21-Deletion mit den phenotypischen Merkmalen des Prostatakarzinoms, der Prognose der Patienten und der TMPRSS2:ERG-Fusion steht. Dazu wurde die 5q13 Region mittels Fluoreszenz in-situ Hybridisierung (FISH) an einem Kollektiv aus über 12.000 Prostatakarzinomen im Gewebemikroarray (TMA)-Format untersucht und mit den klinisch-pathologischen Parametern des Prostatakarzinoms, dem Auftreten eines PSA-Rezidivs sowie dem TMPRSS2:ERG Status (14, 15) und dem 5q21-Kopiezahlstatus (28, 46) der Tumoren aus vorherigen Studien korreliert.

2 Material und Methoden

2.1 Gewebekollektiv

Für die vorliegende Arbeit wurde ein am Institut für Pathologie hergestellter Gewebemikroarray (tissue microarray, TMA) verwendet, der jeweils eine Gewebeprobe aus 12.427 Prostatae enthielt. Alle Ektomiepräparate stammen von Patienten, denen auf Grund eines Prostatakarzinoms in der Zeit von 1992 bis 2013 in der Martiniklinik oder der Klinik und Poliklinik für Urologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf die Prostata radikal entfernt wurde. Die Ektomiepräparate wurden aufgearbeitet und in Form von mehreren Formalin-fixierten und Paraffin-eingebetteten Tumor/Gewebeblöcken konserviert. Pro Ektomiepräparat wurde eine 0,6 mm durchmessende Gewebestanze aus einem repräsentativen Tumor-enthaltenden Gewebeblock entnommen und in das TMA-Format überführt. Der komplette TMA bestand aus 27 TMA-Blöcken, welche je 144 bis 522 unterschiedliche Gewebeproben enthielten. Zum TMA gehört eine klinisch-pathologische Datenbank und eine molekulare Datenbank. Die klinisch-pathologische Datenbank enthält Informationen zu den Patienten (z.B. Alter bei OP) und den Tumorparametern, wie zum Beispiel dem Gleason Grad, Tumorstadium, PSA-Wert und klinischen Verlauf gemessen am PSA-Rezidiv (siehe Tabelle 1). Die molekulare Datenbank enthält alle Ergebnisse der Arbeitsgruppe zu molekularen und genetischen Veränderungen die am TMA mittels Immunohistochemie (IHC) oder FISH untersucht worden (veröffentlicht und nicht veröffentlichte Daten), wie zum Beispiel der ERG-Status auf Expressionsebene und DNA-Ebene (14, 15) sowie der Kopiezahlstatus der Region 5q21 (28, 46).

Tabelle 1: Zusammensetzung des Patientenkollektivs im Gewebemikroarray (tissue microarray, TMA).

	Anzahl der Patienten	
	Untersuchungskohorte in TMA (Anzahl=12427)	Biochemisches Rezeidiv unter allen Kategorien
Klinischer Verlauf		
Anzahl	11665 (93,9%)	2769 (23,7%)
Mean	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 (ng/ml)		
<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%)
pT Stadium (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-Score		
≤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%)
pN Status		
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%)

Bitte Beachten: Die Zahlen addieren sich nicht immer bei der Addition der verschiedenen Kategorien zur Summe 12427, weil in einigen Fällen Daten fehlen: Abkürzung: AJCC: American Joint Committee on Cancer, pN: pathologischer Lymphknotenstatus, PSA: Prostata-spezifisches Antigen, pT: pathologisches Tumorstadium, TMA: Tissue microarray.

2.2 Reagenzien und kommerzielle Kits

In der folgenden Tabelle 2 sind die in der vorliegenden Arbeit verwendete Reagenzien und kommerzielle Kits aufgelistet.

Tabelle 2: Verwendete Reagenzien und kommerzielle Kits.

Reagenzien / Kits	Firma
20x SSC	Abbot, Ludwigshafen
CEP 10 Spectrum Green	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
Orange 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

2.3 Materialien und Geräte

In der folgenden Tabelle 3 sind die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Geräte und die den normalen Laborbedarf überschreitende Materialien aufgelistet.

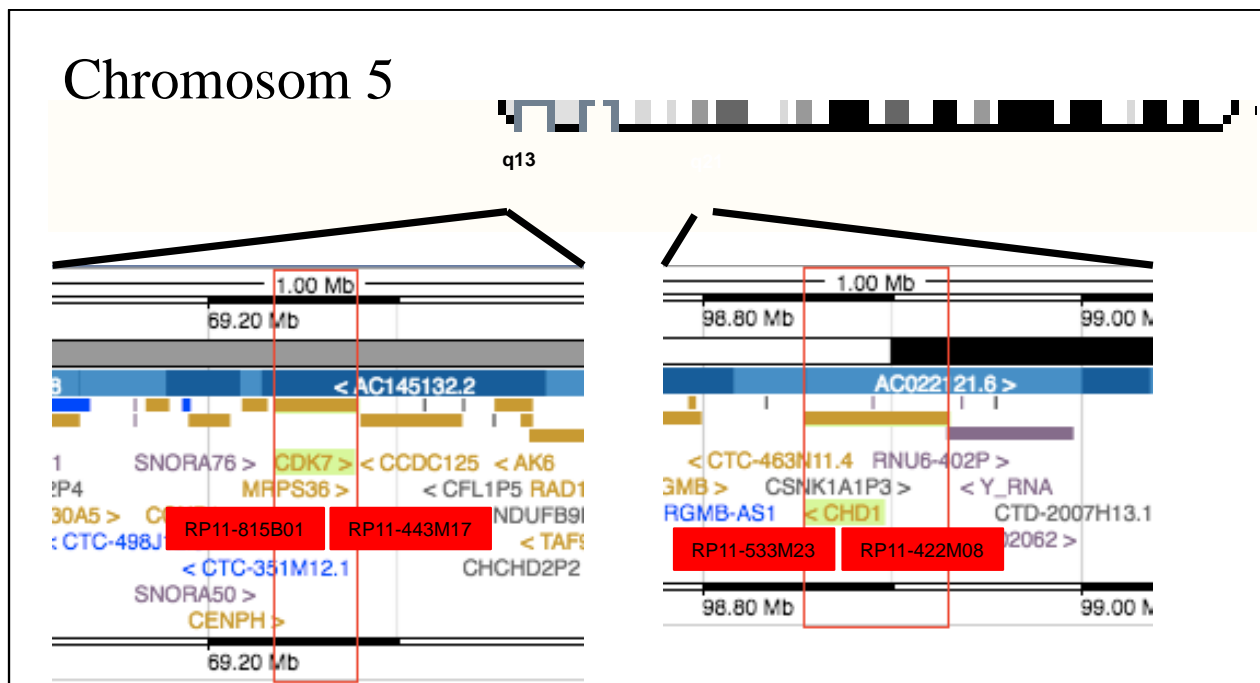
Tabelle 3: Verwendete Geräte und Materialien

Geräte/Material	Firma
Bunsenbrenner, Brebo	Tecnomara, Zürich, Schweiz
Concentrator Plus	Eppendorf, Hamburg
Deckgläser No. 1 24x160 mm	Marienfeld, Luda/Königshofen
Fixogum	Marabu, Tamm
Heizplatte	MEDAX GmbH & Co. KG, Neumünster
Heizrührer BCT Basic	IKA Labortechnik
Inkubator	GFL (Gesellschaft für Labortechnik GmbH), Burgwedel
Lab-Thermometer IP65LT-101	IFA Dostmann GmbH & Co. KG, Wertheim-Reicholzheim
Lichtmikroskop, Axio Imager.A1	Zeiss, Oberkochen
MS1 Minishaker	IKA Labortechnik, Staufen
Nanodrop ND1000	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
ph-Meter 766 Calimatic	Knick, Berlin
Primus	ALS, Dena
Rotor-CA-14	Beckmann, Krefeld
Rotor-CA-20	Beckmann, Krefeld
Safe-Lock Reaktionsgefäße, Amber	Eppendorf (Hamburg)
Safe-Lock Reaktionsgefäße, Amber, 0,5 ml	Eppendorf (Hamburg)
SafeSeal Reagiergefäß 0,5 ml AusEP	Sarstedt (Nümbrecht-Rommelsdorf)
SafeSeal Reagiergefäß 2 ml	Sarstedt (Nümbrecht-Rommelsdorf)
Thermobrite	Abbot, Ludwigshafen
Wasserbäder	GFL (Gesellschaft für Labortechnik GmbH), Burgwedel
Zentrifuge, Beckmann CP-21M/E	Beckmann, Krefeld
Zentrifuge, Biofuge B	Heraeus Thermo Scientific, Hanau

2.4 DH10B Escherichia coli (E. coli) Klone

Zur Herstellung der 5q13-FISH-Sonde wurden mit BACs (bacterial artificial chromosome) transformierten DH10B E. coli der Firma SourceBioscience (Nottingham, UK) verwendet. Dazu wurden die Klone RP11-815B01 und RP11-443M17 ausgewählt die das Gen CDK7 markieren. In Abbildung 2 ist die Lokalisation der in der vorliegenden Arbeit verwendeten 5q13-Sonde sowie die Lokalisation der 5q21-Sonde in der vorherigen 5q-Studie der Arbeitsgruppe (28, 46) dargestellt.

Abbildung 2: Lokalisation der 5q13- und 5q21-FISH-Sonde auf dem Chromosom 5.



2.5 FISH-Sonden-Herstellung

Die Herstellung der 5q13-FISH-Sonde erfolgte anhand eines am Institut für Pathologie etablierten und standardisierten Protokolls, welches wie folgt beschrieben im wesentlichen aus 4 Teilschritten besteht.

Isolierung der Plasmid-DNA aus den DH10B E. coli

- Ansetzen der Vorkultur
 - 10 ml LB-Medium, 30 µl Chloramphenicolösung und eine kleine Menge Bakterien (Zahnstocherspitze)

- Inkubation der Vorkultur bei 190 rpm und 37 °C für 8 Stunden
- Ansetzen der Hauptkultur
 - 250 ml LB-Medium, 750 µl Chloramphenicol-Lösung, 2 ml Vorkultur
 - Inkubation der Hauptkultur bei 190 rpm und 37 °C für 16 Stunden
- Herstellung des Bakterienpellets
 - Zentrifugieren der Bakterienlösung bei 6.000 rpm und 4 °C für 15 Minuten
 - Überstand verwerfen
- Isolation der Plasmid-DNA mit dem NucleoBond® BAC 100 Kit nach Angabe des Herstellers (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland)
- Lösen des DNA-Pellet in 150 µl nukleasefreiem Wasser bei 4°C für 16 Stunden
- Bestimmung der DNA-Konzentration mit dem Peqlab NanoDrop® ND-1000 UV/Vis-Spektralphotometer (VWR, Radnor, USA).
 - Absorption von 1 bei 260nm ≈ DNA-Gehalt von 50 µg/ml

Fluoreszenz-Markierung von Nukleotidsträngen (Nick Translation)

- Hinweis: Licht- und Temperaturempfindlichkeit der Reaktion
- Verdünnung der Plasmid-DNA mit nukleasefreiem Wasser
 - Konzentration: 1 µg / 17,5 µl
- Fluoreszenz-Markierung der DNA mit dem Nick Translation Reagent Kit nach Angabe des Herstellers (Abbott, Illinois, USA) und dUTP Spectrum Orange (Abbott, Illinois, USA).

Aufreinigung der Nukleotidstränge (FISH-Sonde)

- Entfernen von unerwünschten Bestandteilen mit dem QIAquick® Nucleotide Removal Kit nach Angabe des Herstellers (Qiagen, Venlo, Niederlande)
- Aufkonzentrieren der FISH-Sonde
 - Reduktion des Volumens in Vakuumzentrifuge bei 45°C für 20 Minuten

Sondentest

- Hybridisierung der Sonde auf ein Testgewebe
 - Siehe Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung Punkt 2.6
- Mikroskopische Beurteilung der Sondenqualität
 - Signalstärke in Tumor- und Bindegewebszellkernen
 - Überlappung der Sonden-signale in den Bindegewebszellkernen (max. zwei Signale pro Zellkern)

2.6 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Die Herstellung der 5q13-FISH-Sonde erfolgte anhand eines am Institut für Pathologie etablierten und standardisierten Protokolls, welches wie folgt beschrieben im wesentlichen aus 4 Teilschritten besteht.

Vorbehandlung des Gewebes

- Entparaffinieren des Gewebes
 - 3x für 10 Minuten in Xylol
 - 2x für 5 Minuten in Ethanol 96 %
- Trocknen des Gewebes bei 48 °C für 3 Minuten
- Inkubation des Gewebes in einer Pretreatment-Lösung
 - 80 °C für 15 Minuten
- Zweimaliges Waschen des Gewebes
 - 1 Minute in dH₂O
- Inkubation des Gewebes in einer Proteaselösung
 - 37 °C für 150 Minuten
- Zweimaliges Waschen des Gewebes
 - 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 (Sondentest: halbe Menge)
 - 14 µl Basismix (15,0 ml Formamid, 4,5 ml 20xSSC und 3,0 g Dextransulfat)
 - 2 µl COT-DNA,
 - 4 µl orangefluoreszierende 5q13-Sonde
 - 0,5 µl grünfluoreszierender Centromer 10-Sonde
 - vortexen
 - bei 2.500 g für 10 Sekunden zentrifugieren
- Hybridisierungsansatz auf das Gewebe pipettieren
 - 20 µl/TMA-Schnitt
 - Deckgläschen auflegen, mit Fixogum fixieren
- Hybridisierung im Hybrite

- 72 °C für 10 Minuten und 37 °C für 16 bis 18 Stunden

Entfernen überschüssiger FISH-Sonde / Waschen des Gewebes

- Herstellung des Hybridisierungswaschpuffer
 - 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
 - TMAs mit einem Deckgläschen versehen
- Lagerung der TMAs: - 20 °C

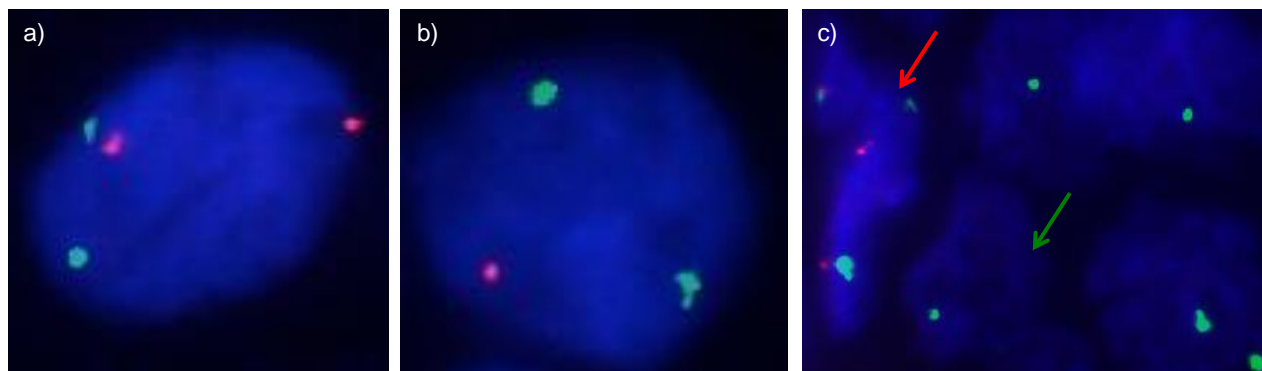
2.7 Mikroskopische Auswertung

Für die mikroskopische Auswertung der TMAs wurde ein Fluoreszenzmikroskop „Axio Imager.A1“ (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) mit den entsprechenden Filtern verwendet. Nicht in die Analyse aufgenommen wurden TMA-Spots bei fehlendem Tumorgewebe, insgesamt fehlendem Gewebe und einer mangelhaften Hybridisierung (sehr schwache oder keine Signale in Tumor- und Bindegewebszellkernen). Zur Bestimmung des 5q13-Kopiezahlstatus wurde ein in der Arbeitsgruppe etablierter Grenzwert verwendet (32), der im Folgenden kurz beschrieben ist.

- Normal (Beide Allele vorhanden)
 - Gleiche Anzahl an 5q-Signalen und Centromer 10-Signalen in nahezu allen bewertbaren Zellkernen (siehe Abbildung 3a)
- Heterozygote Deletion (Verlust eines Allels)
 - Weniger 5q-Signal als Centromer 10-Signal in ≥ 60 % aller Tumorzellkerne (siehe Abbildung 3b)

- Homozygote Deletion (Verlust beider Allele)
 - Kein 5q-Signal in den Tumorzellkernen bei Vorhandensein des 5q13-Signals in den Bindegewebszellkernen und Centromer 10 Signal in Tumor- und Bindegewebszellkernen (siehe Abbildung 3c)

Abbildung 3: Exemplarische Darstellung der FISH-Analyse am Beispiel der 5q21 (CHD1)-Analyse. a) Normaler 5q21-Kopiezahlstatus mit zwei orangen 5q21-Signalen und 2 grünen Centromer 10 Signalen, b) heterozygote 5q21-Deletion mit einem orangen 5q21-Signale und 2 grünen Centromer 10 Signalen und c) homozygote 5q21-Deletion mit fehlendem 5q21-Signal in den Tumorzellkernen (grüner Pfeil) und zwei orangen 5q21-Signalen im Stromazellkern (roter Pfeil) sowie grünen Centromer 10 Signalen in den Tumor- und Stromazellkernen.



2.8 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurde die Software JMP – Statistical Discovery Software 9.0.2. (SAS Institute, Cary, NC, USA) verwendet. Der Zusammenhang zwischen dem 5q13-Kopiezahlstatus und den klinisch-pathologischen Parametern sowie dem ERG-Status und dem 5q21-Kopiezahlstatus wurde mit dem Chi-Quadrat-Test untersucht. Der Einfluss der 5q13-Deletion auf den klinischen Verlauf im Bezug auf das PSA-Rezidiv freie Überleben wurde mit der Kaplan-Meyer-Analyse und einem LogRank-Test univariat getestet. Um zu prüfen, ob der Zusammenhang mit dem PSA-Rezidiv unabhängig von den etablierten prä- und postoperativen Prognoseparametern vorliegt wurde eine Cox-Proportional-Hazard-Analyse in vier verschiedenen Szenarien durchgeführt. Diese Szenarien sollten die unterschiedlichen klinischen Situationen darstellen. Das erste Szenario enthielt neben dem 5q-Kopiezahlstatus den präoperativen PSA-Wert, das pathologische Tumorstadium, den Gleason Score im

Ektomiepräparat, den Status der Lymphknoten und des Resektionsrandes. Also alle Parameter die erst nach der Ektomie, mit Ausnahme des PSA-Wertes, erhoben werden können. Da der Lymphknotenstatus nur für einen Teil der Patienten erhoben wurde, wurde ein zweites Szenario durchgeführt, in dem dieser nicht berücksichtigt wurde. Grund war die Erhöhung der Fallzahl. Das dritte Szenario ist ein künstliches Konstrukt, dass in der Klinik in der Regel nicht vorkommt. Es war zusammengesetzt aus dem präoperativen PSA-Wert, dem Gleason Score in der Ektomie und dem klinischen Tumorstadium. Das vierte Szenario bildet die präoperative Situation ab in der lediglich der präoperative PSA-Wert, das klinische Tumorstadium und der Gleason Score der Biopsiepräparate zur Beurteilung des Tumors vorhanden sind. In allen Analysen wurde das Signifikanzniveau auf $\leq 0,05$ festgelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Auswertbarkeit der FISH-Analyse

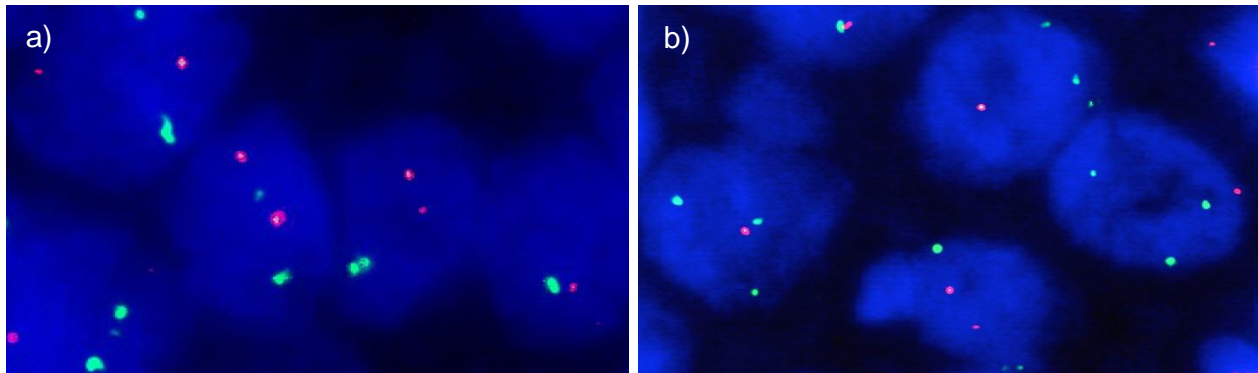
Insgesamt konnte der 5q13-Kopiezahlstatus für 6.866 (56,1%) der 12.274 untersuchten Prostatakarzinome bestimmt werden. Die verbleibenden 5.381 (43,9%) TMA-Spots konnten auf Grund von fehlendem Gewebe, einer zu geringen Menge an eindeutigen Tumorzellen oder einer unzureichenden Hybridisierung nicht analysiert werden. In der Re-Analyse der 5q21-FISH-Daten (28, 46) war für 7.932 (64,6%) der 12.274 untersuchten Tumoren ein 5q21-Kopiezahlstatus vorhanden. Die restlichen 4.342 (35,4%) der Gewebeslots konnten aus den oben genannten Gründen nicht in den vorherigen Studien bewertet werden.

3.2 Häufigkeit der 5q13- und 5q21-Deletion

Durch die FISH-Analyse der 5q13-Region konnte für 926 (13,5%) der 6.688 analysierbaren Prostatakarzinome eine heterozygote Deletion nachgewiesen werden. Homozygote 5q13-Deletionen wurden nicht gefunden (siehe Abbildung 4). In der 5q21-Region zeigten 793 (10,0%) der 7.932 auswertbaren Tumoren eine heterozygote 5q21-Deletion und 198 (2,5%) der 7.932 Tumoren eine homozygote 5q21-Deletion.

Abbildung 4: Exemplarische Darstellung der 5q13-FISH-Analyse. a) Normaler 5q13-

Kopiezahlstatus mit zwei orangen 5q13-Signalen und zwei grünen Centromer 10 Signalen und b) heterozygote 5q13-Deletion mit einem orangen 5q13-Signal und zwei grünen Centromer 10 Signalen.



3.3 Assoziation der 5q13- und 5q21-Deletion mit dem Tumorphänotyp des Prostatakarzinoms

Um zu prüfen, ob die 5q13-Deletion bzw. 5q21-Deletion mit einem bestimmten Tumorphänotyp des Prostatakarzinoms assoziiert ist, wurde der 5q-Kopiezahlstatus mittels Chi-Quadrat-Test mit den klinisch-pathologischen Parametern (Gleason Score, Tumorstadium, Lymphknotenstatus, Status des Resektionsrandes und präoperativen PSA-Wert) korreliert. Die Analysen wurden in allen Tumoren und in den Untergruppen der ERG-positiven und ERG-negativen Prostatakarzinome durchgeführt. Für die Untersuchung der 5q21-Region wurde ein bereits bestehender Datensatz aus der molekularen Datenbank des Instituts für Pathologie verwendet (28, 46). Sowohl die 5q13-Deletion als auch die 5q21-Deletion waren unabhängig vom ERG-Status signifikant mit einem ungünstigen Phänotyp assoziiert. Der Anteil der 5q13-deletierten Tumoren stieg mit dem Tumorstadium ($p < 0,0001$), dem Gleason Score ($p < 0,0001$) und einer Lymphknotenmetastasierung ($p < 0,0001$) an. Diese Assoziation zeigte sich auch in den ERG-negativen ($p \leq 0,005$) und ERG-positiven Prostatakarzinomen ($p \leq 0,003$). Das Vorkommen der 5q21-Deletion war signifikant mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium ($p = 0,0039$) und einem hohen Gleason Score ($p < 0,0001$) bei der Analyse aller Tumoren und in der Gruppe der ERG-negativen ($p \leq 0,06$) und ERG-positiven ($p < 0,0001$) assoziiert. Alle Ergebnisse sind in Tabelle 4 und 5 dargestellt.

Tabelle 4: Assoziation der 5q13-Deletion mit den klinisch-pathologischen Parametern in allen Prostata Tumoren, in der Gruppe der ERG-positiven und der ERG-negativen Tumoren.

	Alle Karzinome			ERG-negative Karzinome			ERG-positive Karzinome		
	Anzahl	5q13 deletion (Anzahl)	p value	Anzahl	5q13 deletion (Anzahl)	p-wert	Anzahl	5q13 deletion (n)	p-wert
Tumorstadium	6866	926		3453	514		3002	367	
pT2	4312	489	<0.0001	2298	288	<0.0001	1735	175	0.0002
pT3a	1561	239		679	117		808	114	
pT3b	967	193		443	101		426	74	
Gleason-Score									
≤3+3	1494	111	<0.0001	782	58	<0.0001	638	45	<0.0001
3+4	3663	487		1873	259		1748	204	
3+4 Tert. 5	235								
4+3	733	238		584	141		474	89	
4+3 Tert. 5	381								
≥4+4	352	83		197	51		125	27	
Lymphknotenstatus									
N0	3914	560	<0.0001	1967	315	0.0047	1723	223	0.0024
N+	425	97		193	47		209	44	
PSA Level (ng/μl)									
<4	827	114	0.0834	359	55	0.6201	401	52	0.1846
4-10	4045	513		2027	289		1781	200	
10-20	1398	212		759	123		568	80	
>20	511	77		272	42		210	31	
Resektionsrand									
negativ	5412	711	0.3012	2743	401	0.4769	2330	275	0.5258
positiv	1329	189		655	103		612	78	

Abkürzung: ERG:ETS-related Gene, N: Lymphknotenstatus, PSA: Prostata-spezifisches Antigen, pT: pathologisches Tumorstadium, p-wert: Signifikanzwert

Tabelle 5: Assoziation der 5q21-Deletion mit den klinisch-pathologischen Parametern in allen Prostatatumoren, in der Gruppe der ERG-positiven und der ERG-negativen Tumoren.

	Alle Karzinome			ERG-negative Karzinome			ERG-positive Karzinome		
	n	5q21 deletion (%)	p-wert	n	5q21 deletion (%)	p-wert	n	5q21 deletion (%)	p-wert
Tumorstadium	7932	10,0%		3793	16,2%		3332	4,1%	
pT2	5054	9,0%	0,0039	2540	15,2%	0,0564	1936	2,6%	<0,0001
pT3a	1778	11,2%		746	19,0%		897	5,1%	
pT3b	1022	12,1%		473	17,6%		467	7,7%	
pT4	45	13,3%		21	9,5%		17	11,8%	
Gleason-Score									
≤3+3	1814	5,3%	<0,0001	827	9,4%	<0,0001	690	1,7%	<0,0001
3+4	4441	9,1%		2078	15,2%		1981	3,6%	
4+3	1231	17,5%		639	25,7%		507	8,1%	
≥4+4	402	16,7%		230	23,0%		135	7,4%	
Lymphknotenstatus									
N0	4463	11,4%	0,8570	2170	18,3%	0,4985	1909	4,8%	0,3959
N+	493	11,1%		225	16,4%		230	6,1%	
PSA Level (ng/μl)									
<4	981	8,6%	0,0970	404	15,4%	0,7682	459	4,1%	0,9253
4-10	4715	9,7%		2234	16,0%		1996	4,2%	
10-20	1607	11,5%		844	17,3%		616	4,1%	
>20	536	10,1%		279	15,4%		217	3,2%	
Resektionsrand									
negativ	6278	9,9%	0,8039	3023	16,3%	0,7138	2593	4,0%	0,9934
positiv	1509	10,1%		705	15,7%		672	4,0%	

Abkürzung: ERG:ETS-related Gene, PSA: Prostata-spezifisches Antigen, pT: pathologisches Tumorstadium, p-wert: Signifikanzwert

3.4 Assoziation der 5q13- und 5q21-Deletion mit der Prognose des Patienten

Um zu prüfen, ob die 5q13-Deletion bzw. 5q21-Deletion mit der Prognose der Patienten in Zusammenhang stehen, wurde der klinische Verlauf (Aufreten eines PSA-Rezidivs) mit dem 5q-Kopiezahlstatus in einer Kaplan-Meyer-Analyse verglichen und zur Festlegung einer statistischen Signifikanz ein Log-Rank-Test durchgeführt. Die Analysen

wurden in allen Tumoren und in den Untergruppen der ERG-positiven und ERG-negativen Prostatakarzinome durchgeführt. Für die Untersuchung der 5q21-Region wurde ein bereits bestehender Datensatz aus der molekularen Datenbank des Instituts für Pathologie verwendet (28, 46). Bei der Analyse aller Tumoren war sowohl der Verlust im Bereich 5q13 als auch 5q21 mit einer ungünstigen Prognose für den Patienten assoziiert. Die Auswirkungen der beiden Deletionen auf die Wahrscheinlichkeit eines PSA-Rezidivs waren dabei sehr ähnlich. Nach Entnahme der Prostata erlitten circa 40% der Patienten mit 5q13-deletierten Tumoren und circa 30% der Patienten mit 5q13-normalen Tumoren ein PSA-Rezidiv ($p < 0,0001$). Bei der Analyse der 5q21-Deletion hatten circa 45% der Patienten mit 5q21-deletierten Karzinomen und circa 30% der Patienten mit 5q21-normalen Tumoren ein biochemisches Rezidiv ($p < 0,0001$). Der Zusammenhang mit einer ungünstigen Prognose zeigte sich für die 5q13-Deletion ebenfalls in der Untergruppe der ERG-negativen ($p < 0,0001$) und ERG-positiven Prostatakarzinome ($p = 0,0025$), während die 5q21-Deletion nur in der Untergruppe der ERG-negativen Tumoren eine prognostische Relevanz aufwies ($p < 0,0001$). Alle Ergebnisse sind in Abbildung 5 und 6 dargestellt.

Abbildung 5. Assoziation der 5q13-Deletion mit dem Auftreten eines PSA-Rezidivs in a) allen Prostatatumoren ($n = 6.265$), b) ERG-negativen Prostatatumoren ($n = 3.144$) und c) ERG-positiven Prostatatumoren ($n = 2.749$).

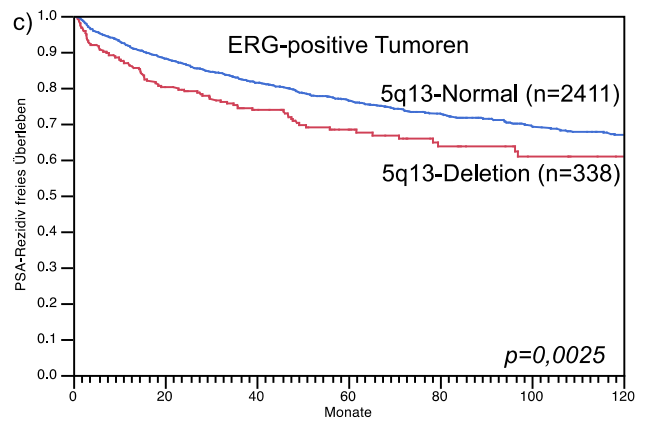
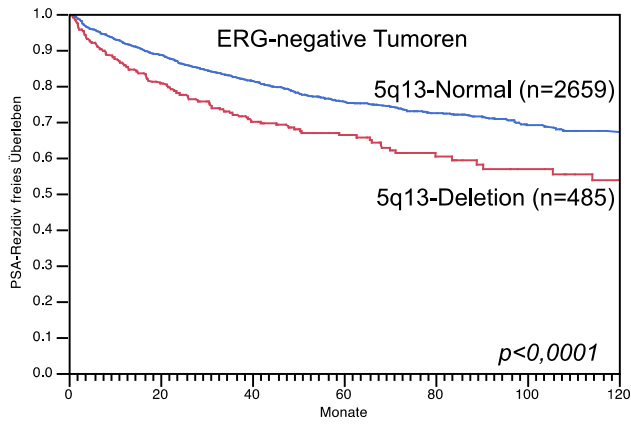
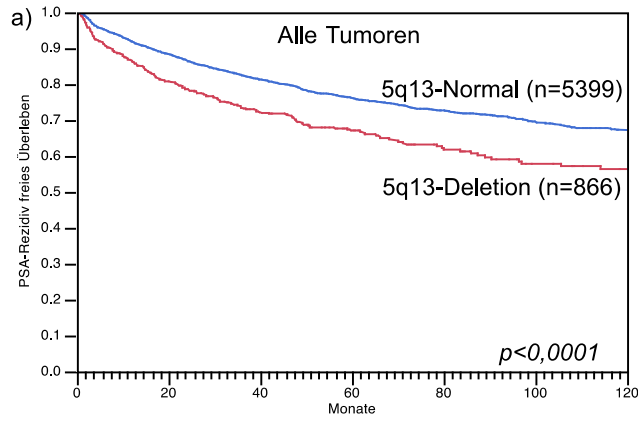
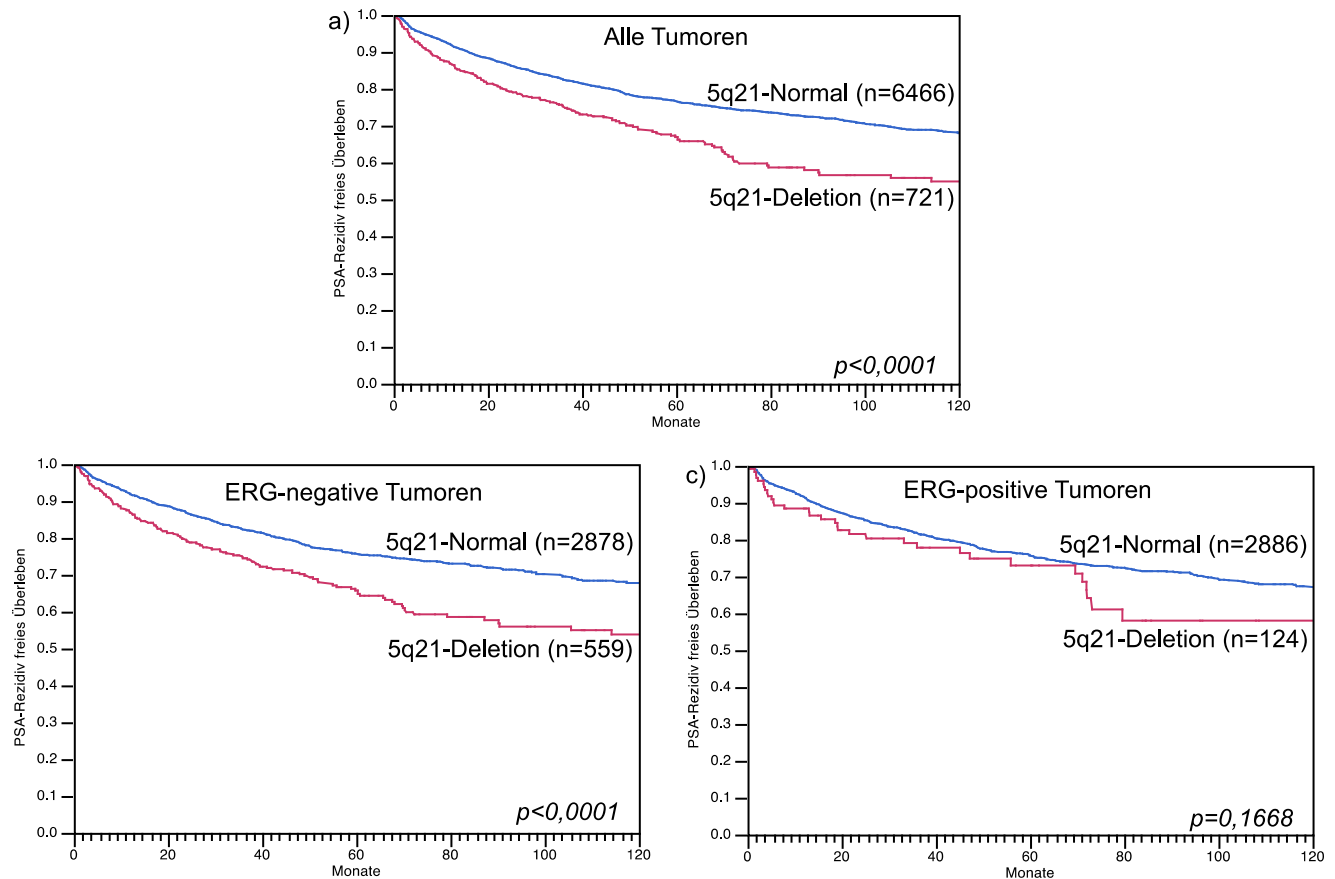


Abbildung 6: Assoziation der 5q21-Deletion mit dem Auftreten eines PSA-Rezidivs in a) allen Prostatatumoren (n=7.187), b) ERG-negativen Prostatatumoren (n=3.437) und c) ERG-positiven Prostatatumoren (n=3.010).



3.5 Architektur der 5q-Deletion

Um zu prüfen, wie häufig die 5q-Deletion vom 5q13 bis 5q21-Lokus reicht bzw. isolierte 5q13- und 5q21-Deletionen vorkommen, wurden die eigenen 5q13-FISH-Daten mit den 5q21-Daten aus der vorherigen Studie der Arbeitsgruppe (28, 46) kombiniert. Ein 5q-Kopiezahlstatus in beiden Regionen war für 5.510 Prostatakarzinome vorhanden von denen 1.137 (20,6%) eine 5q-Deletion in mindestens einer der beiden Regionen aufwiesen. Innerhalb der 5q-deletierten Tumoren hatten 562 (49,4%) nur in der Region 5q13 eine Deletion (5q13-Deletion), 364 (32,0%) der Karzinome waren nur in im Bereich 5q21 deletiert (5q21-Deletion) und 211 (18,6%) der Tumoren hatten sowohl eine 5q13-Deletion als auch 5q21-Deletion (5q13/5q21-Ko-Deletion). Die Analyse zeigt damit, dass sich die 5q-Deletion in 81,4% der 5q-deletierten Karzinomen auf eine der beiden analysierten 5q-Regionen beschränkt, während nur 18,6% der 5q-deletierten Tumoren eine große Deletion von der chromosomalen Bande q13 bis q21 aufweist.

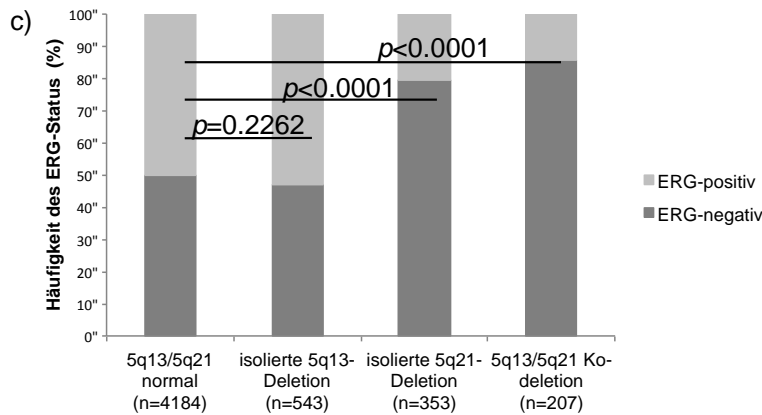
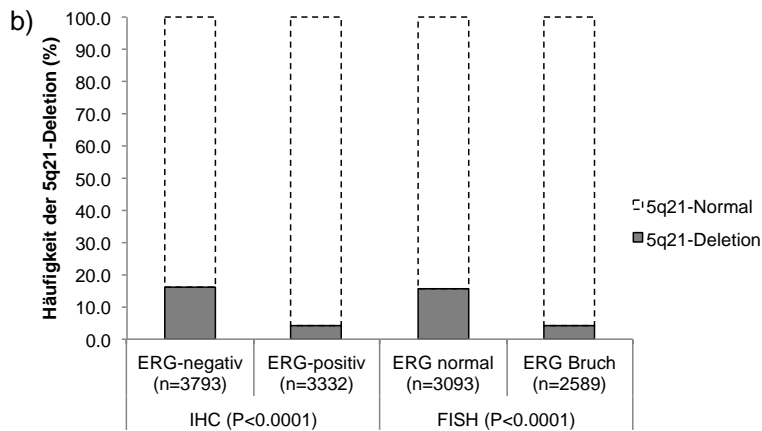
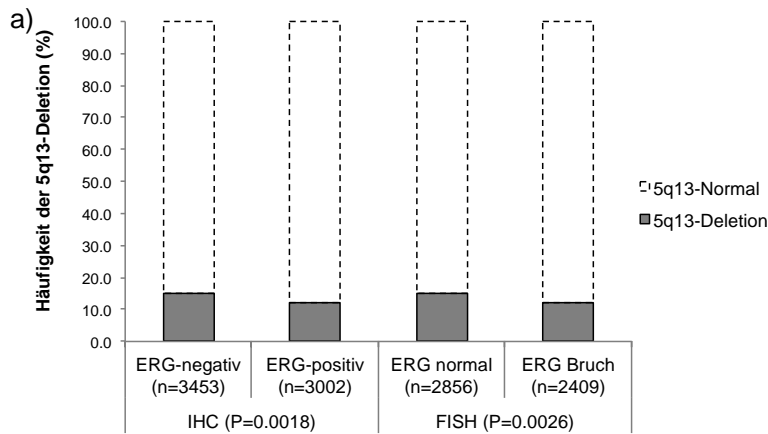
3.6 Assoziation der 5q-Deletion mit dem TMPRSS2:ERG-Status

Um zu prüfen, in welchem Zusammenhang der 5q-Kopiezahlstatus mit dem Auftreten oder Fehlen der TMPRSS2:ERG Fusion steht, wurden die Ergebnisse zum 5q-Status in einem Chi-Quadrat-Test mit dem ERG-Expressionsstatus (IHC) und ERG-Genstatus (FISH) aus einer vorherigen Studie der Arbeitsgruppe verglichen (14, 15). In den ersten beiden Analysen wurde die 5q13- und 5q21-Deletion separat – also ohne Berücksichtigung von putativen Ko-Deletionen - analysiert. Die Analysen zeigten, dass sowohl die 5q13-Deletion als auch die 5q21-Deletion mit dem Fehlen der TMPRSS2:ERG Fusion, unabhängig von der Analysemethode (IHC oder FISH), assoziiert ist (siehe Abbildung 7a-b). Allerdings war der Zusammenhang zwischen der 5q21-Deletion und einem ERG-negativen Tumorphänotyp wesentlich ausgeprägter ($p < 0,0001$ für FISH und IHC) als zwischen der 5q13-Deletion und einem ERG-negativen Status ($p = 0,0018$ für IHC und $p = 0,0026$ für FISH). Zum Beispiel konnte eine 5q13-Deletion in 514 (14,9%) der 3453 immunohistochemisch ERG-negativen Karzinome und in 367 (12,2%) der 3002 immunohistochemisch ERG-positiven Tumoren nachgewiesen werden. Eine 5q21-Deletion kam hingegen fast viermal so häufig in den ERG-negativen (616/3793; 16,2%) wie den ERG-positiven (136/3232; 4,1%) vor.

Um zu prüfen welchen Einfluss die Ko-Deletion beider Region auf die marginale Assoziation der 5q13-Deletion mit den ERG-negativen Tumoren besitzt, wurde in einer weiteren Analyse der 5q13/5q21-Ko-Deletionsstatus berücksichtigt. Dazu wurden die Tumoren in vier Gruppen eingeteilt: 1. Keine 5q13- und 5q21-Deletion, 2. 5q13-Deletion (5q21 ist normal), 3. 5q21-Deletion (5q13 ist normal) und 4. 5q13/5q21-Ko-Deletion. In dieser Analyse konnte klar gezeigt werden, dass der geringe Zusammenhang der 5q13-Deletion mit dem Fehlen der TMPRSS2:ERG-Fusion durch die starke Assoziation der 5q21-Deletion mit einem ERG-negativen Tumorphänotyp bedingt war (siehe Abbildung 7c). Die 5q13-Deletion konnte in 256 (9,1%) der 2801 ERG-negativen und 287 (11,5%) der 2486 ERG-positiven Karzinomen nachgewiesen werden, während die 5q21-Deletion in 280 (10,0%) der 2801 ERG-negativen und nur 73 (2,9%) der 2486 ERG-positiven Prostatakarzinome gefunden wurde. Vergleichbar mit der 5q21-Deletion war die 5q13/5q21-Ko-Deletion in 177 (6,3%) der 2801 ERG-negativen und nur in 30 (1,2%) der 2486 ERG-positiven Tumoren vorhanden ($p < 0,0001$). Alle Ergebnisse sind in Abbildung 7 dargestellt.

Abbildung 7: Assoziation der 5q-Deletion mit der TMPRSS2:ERG-Fusion.

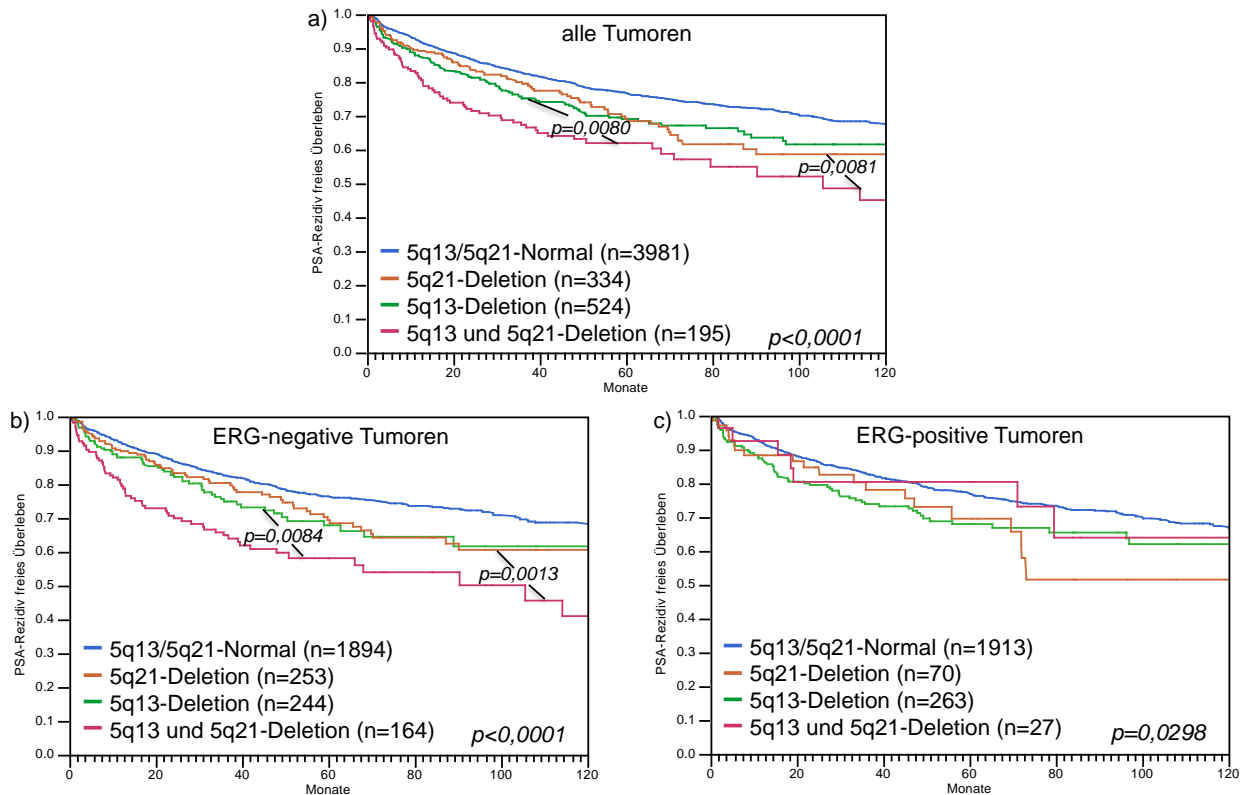
a) Assoziationen der 5q13-Deletion mit TMPRSS2:ERG-Fusion, b) Assoziationen der 5q21-Deletion mit der TMPRSS2:ERG-Fusion und c) Assoziation der isolierten 5q13- bzw. 5q21-Deletion und der 5q13/5q21 Ko-Deletion mit der TMPRSS2:ERG-Fusion. Der Status der TMPRSS2:ERG-Fusion wurde mittels Immunohistochemie (IHC) und Fluoreszenz in-situ Hybridisierung (FISH) ermittelt.



3.7 Prognostische Relevanz der 5q13/5q21-Ko-Deletion beim Prostatakarzinom

Um zu prüfen, ob die seltenen 5q13/5q21-Ko-Deletionen eine zwar kleine aber putativ prognostisch hoch-relevante Gruppe der Prostatakarzinome charakterisieren könnte, wurde der 5q13/5q21-Ko-Deletionsstatus mit dem klinischen Verlauf in einer Kaplan-Meyer-Kurve und einem Log-Rank-Test assoziiert. Diese Analyse wurde sowohl in allen Tumoren als auch den Untergruppen der ERG-negativen und ERG-positiven Karzinomen durchgeführt. In der Analyse aller Tumoren hatten Patienten mit 5q13/5q21-ko-deletierten Tumoren die deutlich ungünstigste Prognose. Die Wahrscheinlichkeit eines PSA-Rezidivs war bei Vorliegen einer 5q13/5q21-Ko-Deletion wesentlich höher als bei einer Beschränkung der Deletion auf die Region 5q13 ($p=0,0080$) oder 5q21 ($p=0,0081$). Die beste Prognose hatten die Patienten, deren Tumoren weder eine 5q13-Deletion noch eine 5q21-Deletion hatten (siehe Abbildung 8a). In der Untergruppe der ERG-negativen Tumoren war ebenfalls die 5q13/5q21-Ko-Deletion mit der deutlich schlechtesten Prognose für den Patienten assoziiert ($p\leq 0,009$). In der Untergruppe der ERG-positiven Karzinome war der klinische Verlauf der 5q13/5q21-ko-deletierten Karzinome allerdings vergleichbar mit dem der 5q13- oder 5q21-deletierten Prostatakarzinome ($p\geq 0,5$). Alle Ergebnisse sind in Abbildung 8 dargestellt.

Abbildung 8: Assoziation der 5q13/5q21 Ko-Deletion mit dem Auftreten eines PSA-Rezidivs in a) allen Prostatatumoren (n=5.034), b) ERG-negativen Prostatatumoren (n=2.555) und c) ERG-positiven Prostatatumoren (n=2.273).



Um zu prüfen, ob die 5q-Deletion (Region 5q13 und/oder 5q21) unabhängig von den prä- und postoperativen Prognoseparametern des Prostatakarzinoms mit dem Auftreten eines PSA-Rezidivs assoziiert ist wurde eine Cox-Proportional-Hazard-Analyse durchgeführt. Dazu wurden vier Szenarien aufgestellt, die zum einen die präoperative und zum anderen die postoperative Situation in der Klinik darstellen.

Szenario 1 bildet die postoperative Situation ab und beinhaltet neben dem 5q-Kopiezahlstatus (5q13 und/oder 5q21) und dem präoperativer PSA-Wert das pathologische Tumorstadium, den pathologischen Lymphknotenstatus, den Status des Resektionsrandes und den Gleason Score des Tumors im Ektomiepräparat. Diese Parameter sind im Moment die besten und „härtesten“ Prognoseparameter beim Prostatakarziom, da sie am gesamten Tumor ermittelt werden und somit die besten Voraussetzungen zur Einschätzung des Aggressionspotentials des Tumors gegeben sind.

Szenario 2 bildet wie das Szenario 1 die postoperative Situation ab. Hier sind alle Parameter aus dem Szenario 1 enthalten mit Ausnahme des Lymphknotenstatus. Grund dafür ist, dass bei dem verwendeten Patientenkollektiv nicht immer die Lymphknoten bei der radikalen Ektomie entfernt wurden. Der Ausschluss dieses Parameters erhöht somit die Fallzahl.

Szenario 3 schließt neben dem 5q-Kopiezahlstatus (5q13 und/oder 5q21) den präoperativen PSA-Wert, das klinische Tumorstadium und den Gleason Score des Tumors im Ektomiepräparat ein. Dieses Szenario soll keine klinische Situation wieder spiegeln. Hier wurde Anstelle des pathologischen Tumorstadiums das weniger aussagekräftige klinische Tumorstadium gewählt.

Szenario 4 soll die klinische Situation vor der Therapie – also bei Diagnose des Karzinoms - widerspiegeln. Es beinhaltet den neben dem 5q-Kopiezahlstatus (5q13 und/oder 5q21) den präoperativen PSA-Wert, das klinische Tumorstadium und den Gleason Score des Tumors im Biopsiepräparat. Unter Verwendung dieser Parameter kann eine gute Einschätzung des Progressionsrisikos erfolgen. Allerdings ist die tatsächliche Tumoraggressivität dadurch nur schwierig bis gar nicht nachweisbar.

Bei der Analyse aller Prostatakarzinome war die prognostische Aussagekraft der 5q-Deletion sowohl in der separaten Analyse der 5q13-Deletion ($p=0,0018$), der separaten Analyse der 5q21-Deletion ($p=0,0007$) als auch in der zusammengefassten Analyse beider Datensätze (5q13/5q21-Ko-Deletion, $p=0,0013$) unabhängig von den präoperativen Prognoseparametern (Szenario 4) vorhanden. In den Szenarien 1-3 konnte in keiner der Analysen ein signifikanter Wert für die 5q-Deletion ermittelt werden. In der Untergruppenanalyse der ERG-negativen und ERG-positiven Karzinome zeigte sich das die 5q21-Deletion alleine als auch in Ko-Deletion mit der 5q13-Deletion in der Gruppe der ERG-negativen Karzinome unabhängig von den prä- und postoperativen Prognoseparametern mit dem Auftreten des PSA-Rezidivs assoziiert ist. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Assoziation der 5q13- und 5q21-Deletion alleine sowie als Ko-Deletion mit dem Auftreten eines PSA-Rezidivs in Abhängigkeit von den prä- und postoperativen Prognoseparametern des Prostatakarzinoms in allen Tumoren, den ERG-negativen Karzinomen und den ERG-positiven Karzinomen.

Tumoren	Scenario	n [⊞] auswertbar	P-Wert									
			präop. PSA-Wert	pT [⊞]	cT [⊞]	GleasonScore [⊞] Ektomie	GleasonScore [⊞] Biopsie	pN [⊞]	R-Status	Sq13Deletion [⊞] alleine	Sq21Deletion [⊞] alleine	Sq13/Sq21 [⊞] Ko-Deletion
alle [⊞] Tumoren	1	3842	<0,0001	<0,0001		<0,0001		<0,0001	0,0354	0,5416	0,2157	0,5448
	2	6102	<0,0001	<0,0001		<0,0001		<0,0001		0,3617	0,0414	0,1039
	3	5995	<0,0001		<0,0001	<0,0001				0,1563	0,0656	0,2181
	4	5907	<0,0001		<0,0001		<0,0001			0,0018	0,0007	0,0013
ERG-negative [⊞] Tumoren	1	1914	<0,0001	<0,0001		<0,0001		<0,0001	0,0531	0,4294	0,0190	0,0455
	2	3069	<0,0001	<0,0001		<0,0001		0,0020		0,1738	0,0008	0,0013
	3	3030	<0,0001		<0,0001	<0,0001				0,0603	0,0156	0,0417
	4	2989	<0,0001		<0,0001		<0,0001			0,0041	0,0004	0,0011
ERG-positive [⊞] Tumoren	1	1715	0,0005	<0,0001		<0,0001		0,0254	0,6835	0,5438	0,0384	0,0673
	2	2673	<0,0001	<0,0001		<0,0001		0,0672		0,4930	0,0456	0,0743
	3	2608	<0,0001		<0,0001	<0,0001				0,9486	0,3125	0,6255
	4	2566	<0,0001		<0,0001		<0,0001			0,2649	0,8623	0,8369

4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu prüfen, welche klinische Relevanz die 5q13-Region beim Prostatakarzinom besitzt und in welchen Zusammenhang sie mit der bereits gut untersuchten 5q21-Deletionsregion beim Prostatakarzinom steht. Dazu wurde der 5q13-Kopiezahlstatus mittels FISH an mehr als 12.000 Prostatakarzinomen untersucht und mit den klinisch-pathologischen Parametern des Prostatakarzinoms, dem klinischen Verlauf gemessen am PSA-Rezidiv, dem TMPRSS2:ERG-Status und der 5q21-Deletion verglichen.

Die erfolgreiche FISH-Analyse von mehr als 6,800 Prostatakarzinomen zeigte eine 5q13-Deletion in 13.5% der Tumoren. In einer vorherigen Analyse der 5q21-Region innerhalb der Arbeitsgruppe konnte ebenfalls mittels FISH am gleichen Tumorkollektiv eine 5q21-Deletion in 10% der analysierbaren Tumoren gefunden werden (28, 46). Die Ergebnisse befinden sich im Bereich der Resultate von Studien, die die Methode der Array-basierten komparativen genomischen Hybridisierung (aCGH) oder die Methode der SNP Array Analyse zur genomweiten Untersuchung von Kopiezahlveränderungen beim Prostatakarzinom nutzten. Diese Untersuchungen enthielten zwischen 136 und 181 primäre Prostatakarzinome und konnten in 6%-19% eine 5q13- bzw. 5q21-Deletion finden (www.cbioportal.org (9, 35, 41)). Es muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass die FISH als die präziseste Methode für die Bestimmung von Kopienzahlveränderungen ist und daher häufig als Goldstandard für diese Analysen gesehen wird. Grund dafür ist, dass die FISH die Analyse auf der Ebene einer einzelnen Zelle direkt im Gewebe erlaubt, während die aCGH, CGH oder SNP an aus dem Gewebe isolierter DNA durchgeführt wird. Die FISH ist damit im Gegensatz zu den anderen Methoden ohne Beeinträchtigung durch kontaminierte nicht neoplastische Zellen, die zwangsläufig auch im Tumorgewebe vorhanden sind, durchführbar. Zu beachten ist bei der FISH - wie auch bei allen anderen Methoden - das ein stringenter Grenzwert zur Definition einer Deletion verwendet wird. Gerade die Deletionsbestimmung kann auf Grund von Schnittartefakten, schnell zu falsch positiven Ergebnisse führen. Der in der Arbeit verwendete Grenzwert zur Definition von heterozygoten und homozygoten 5q-Deletionen wurde innerhalb der Arbeitsgruppe durch eine Vergleichsanalyse bestimmt, in der die PTEN-Deletion mittels FISH und aCGH bestimmt wurde. Diese Studie zeigte eine 100%ige Übereinstimmung in den Ergebnissen beider Analysen, wenn mindestens 60% der Tumorzellkerne weniger PTEN-Signal als Centromer 10 Signal zeigten [4]. Dieser Grenzwert wurde zudem

bereits erfolgreich zur Analyse von anderen Deletionenregionen am Prognose-TMA der Arbeitsgruppe verwendet (12, 28, 30-33, 39).

Von der Arbeitsgruppe konnte bereits bei der Untersuchung des gleichen Tumorkollektivs gezeigt werden, dass die 5q21-Deletion mit einem ungünstigen Tumorphänotyp und einer schlechten Prognose für den Patienten beim Prostatakarzinom assoziiert ist. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die 5q13-Deletion ebenfalls mit schlechten phänotypischen und prognostischen Eigenschaften eines Prostatakarzinoms in Zusammenhang steht. Dazu zählen ein fortgeschrittenes Tumorstadium, ein hoher Gleason Score, das Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen sowie das Auftreten eines PSA-Rezidivs. Diese Ergebnisse sind charakteristisch für das Auftreten von chromosomalen Verlusten beim Prostatakarzinom. Durch die FISH-Analyse unterschiedlicher Deletionsregionen am gleichen Tumorkollektiv konnte die Arbeitsgruppe bereits eine prognostische Relevanz für die Deletionsregionen PTEN (32), 3p13(12), 5q21 (28), 6q15 (31), 8p21 (40), 12p13 (39), 16q23 (33) und 18q24 (29) zeigen.

Die meisten Untersuchungen der 5q-Deletion fokussierten sich auf die Region 5q21, die das CHD1 Tumorsuppressorgen enthält (9, 28, 34, 44, 45). Um ein besseres Verständnis über die Beziehung zwischen der 5q13 und 5q21 Deletionsregion zu erlangen, wurden die Daten aus der vorherigen 5q21 FISH-Analyse (28) mit der gegenwärtigen Untersuchung der 5q13-Region zusammengefasst. Die Tatsache, dass über 80% der 5q-Deletionen entweder eine isolierte 5q13- oder 5q21-Deletion enthielten, weist stark darauf hin, dass diese Veränderungen typischerweise unabhängig voneinander auftreten. Dieses Ergebnis wirft die Frage auf, ob Tumoren mit einer 5q13- und 5q21-Deletion biologisch unterschiedliche Untergruppen der Prostatakarzinome darstellen. Die große Anzahl der Karzinome, die auf molekularer Basis im Rahmen dieser Untersuchung charakterisiert wurden, ermöglichte vergleichende und kombinierte Analysen mit anderen genomischen Veränderungen. Die wohl wichtigste Veränderung zur Untersuchung von molekularen Untergruppen stellt die TMPRSS2:ERG Fusion dar. Dabei handelt es sich mit einer Rate von circa 50% um die häufigste genomische Veränderung beim Prostatakarzinom und die einzige bisher identifizierte Translokation die rekurrent zur Expression eines Gens führt (15). Die TMPRSS2:ERG Fusion entsteht durch eine circa 3 Megabasen große Deletion auf Chromosom 21 zwischen den Genen TMPRSS2 und ERG. Bedingt durch die Translokation kommt es zur Fusion des Promotors der androgenregulierten Serinprotease TMPSS2 und der kodierenden Region des Transkriptionsfaktors ERG. Folge ist die androgeninduzierte ERG-

Expression in den betroffenen Tumorzellen (16). Diese Fusion ist prognostisch zwar nicht relevant (15), führt aber zu einer Deregulation von mehr als 1.600 Genen und damit zur Veränderung des Transkriptoms (9, 10). In der vorherigen Studie konnte bereits gezeigt werden, dass die 5q21-Deletion - ohne Berücksichtigung von eventuellen 5q13-Ko-Deletionen - eine deutliche Assoziation zur Gruppe der ERG-negativen Tumoren bestimmt (28). In der vorliegenden Arbeit konnte nun nachgewiesen werden, dass die kleine von 5q13 isolierte 5q21-Deletion ebenfalls mit einem ERG-negativen Karzinomphänotyp assoziiert ist. Dieses Ergebnis war nicht erstaunlich, da bereits innerhalb der Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte, dass die Inaktivierung des CHD1 Tumorsuppressorgenes in der 5q21-Region die Bildung der TMPRSS2:ERG Fusion durch eine Hemmung des Androgenrezeptor (AR) Signals verhindert (28). Dass diese Assoziation ebenfalls für große Deletionen, mit eingeschlossen Deletionen des 5q13 Locus - aber nicht für kleine Deletionen am 5q13 - , gefunden wurde, bekräftigt die Rolle der CHD1 Inaktivierung bei der "Prävention" der TMPRSS2-ERG Fusion. Die Identifizierung einer identischen Fraktion der kleinen von 5q21 isolierten 5q13-Deletionen in ERG-negativen (11%) und ERG-positiven (12%) Karzinomen weist sehr stark darauf hin, dass die Funktion des/der vermeintlichen 5q13 Tumorsuppressorgen (e) vollkommen unabhängig von der ERG Aktivierung ist. Innerhalb der Arbeitsgruppe konnte bereits weitere ERG unabhängige Deletionen identifiziert werden. Dazu zählen Verluste von 8p (40), 12p (39), und 13q. Zu beachten ist dabei, dass chromosomale Verluste von 8p und 13q nicht spezifisch für das Prostatakarzinom sind, sondern häufige genetische Veränderungen in anderen soliden Tumoren wie die der Leber, Brust, des Kolons, der Lunge und der Blase repräsentieren (47). Dies dürfte auch auf 5q13-Deletionen zutreffen. Zum Beispiel wurden 5q13-Deletionen ebenfalls bei Karzinomen des Kolons (48), der Lunge (49), des Ovars (36), des Magens (50), des Pankreas (51) und der Harnblase (52) gefunden. In diesen Untersuchungen vorgeschlagene putative Tumorsuppressorgene für diese Region sind beispielsweise OCLN und RAD17 im Kolonkarzinom (48) und NSA2 (53) bei Leukämie.

Um den klinischen Wert der 5q Analyse über die univariate Kaplan-Meyer-Analyse hinaus zu bewerten, wurden mehrere multivariate Analysen durchgeführt, in denen die etablierten prognostischen Parameter, die zum Zeitpunkt der initialen Prostatabiopsie und/oder nach der radikalen Prostataktomie verfügbar sind, eingeschlossen wurden. Diese Untersuchungen zeigten, dass die 5q13- und 5q21-Deletion (alleine oder in Kombination) unabhängig von den präoperativen prognostischen Parametern (Gleason Score in der Biopsie, klinische Tumorstadium, präoperativer PSA-Wert) mit dem Auftreten eines PSA-Rezidivs assoziiert ist. Damit ist der Nachweis einer 5q-Deletion

potentiell für diagnostische Testverfahren an Prostatakarzinombiopsien geeignet, also zum wichtigsten Zeitpunkt der Erkrankung, wenn Therapieentscheidungen von aktiver Überwachung bis zur radikalen Prostatektomie noch möglich sind. Zudem ist die FISH-Analyse eine sehr gut geeignete Methode für die Durchführung von diagnostischen Tests, da sie eine klare ja/nein Antwort liefert. Das heißt, der behandelnde Arzt muss nicht über die Aussagekraft von verschiedenen Grenzwerten, wie zum Beispiel in RNA-basierten Testsystemen nachdenken (54, 55). Auf Grund der Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit sollte im Fall der 5q-Deletion ein diagnostischer Test beide - also 5q13 und 5q21 - Regionen beinhalten. Damit ist gewährleistet, dass so viel Karzinome wie möglich mit einer 5q-Deletionen identifiziert werden. Zusätzliche prognostische Aussagekraft würde außerdem das Vorhandensein von 5q13/5q21-Ko-Deletionen liefern, wie in der univariaten Analyse gezeigt werden konnte.

Zusammenfassend demonstrieren die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass das Chromosom 5 zwei verschiedene Deletionsregionen im Bereich 5q13 und 5q21 enthält, die in der Regel unabhängig voneinander deletiert sind. Beide Deletionsregionen sind mit einem ungünstigen Phänotyp und einer schlechten Prognose für den Patienten assoziiert. Während die 5q21-Deletion eine aggressive Gruppe der ERG-negativen Prostatakarzinome charakterisiert, zeigt die 5q13-Deletion hingegen keine Assoziation zum ERG Status. Die Bestimmung des 5q13/5q21-Deletionsstatus könnte hilfreich zur Einschätzung der Aggressivität von Prostatakarzinomen zum Zeitpunkt der Biopsie sein und wird daher als Bestandteil für zukünftige diagnostische Multiparametertests empfohlen.

5 Zusammenfassung

Deletionen des Chromosomarms 5q sind mit einer aggressiven Untergruppe der ERG-negativen Prostatakarzinome assoziiert. Genomweite Analysen zu Kopienzahlveränderungen bei Prostatakarzinom weisen auf zwei separate Deletionsregionen im Bereich 5q13 und 5q21 hin. Die 5q21-Region wurde bereits innerhalb der Arbeitsgruppe am Institut für Pathologie analysiert. Um mehr über die Bedeutung der 5q13-Deletionsregionen bzw. die 5q-Deletion insgesamt beim Prostatakarzinom zu erfahren, wurden in der vorliegenden Arbeit die 5q13-Region mittels Fluoreszenz in-situ Hybridisierung (FISH) an 12,427 Prostatakarzinomen im Gewebemikroarray-Format untersucht. Die Ergebnisse der Studie wurden mit den klinisch-pathologischen Daten, dem TMPRSS2:ERG-Status und den Daten zur 5q21-Region assoziiert. Die 5q13-Deletion wurde in 926 (13.5 %) von 6,866 und die 5q21-Deletion in 793 (10%) von 7,932 erfolgreich analysierten Karzinomen gefunden. Beide Deletionen waren mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium, einem hohen Gleasongrad und einem frühen biochemischen Rezidiv assoziiert ($P < 0.0050$ jeweils). Bei der Mehrheit der 5q alterierenden Karzinomen traten Deletionen im Bereich 5q13 unabhängig von Verlusten in der Region 5q21 auf: 81% (926/1137) aller 5q deletierten Karzinome wiesen entweder isolierte Verluste im Bereich 5q13 (49,4%) oder 5q21 (32%) auf. Isolierte 5q21-Deletionen oder Ko-Deletionen beider Loci waren klar mit der Gruppe der ERG-negativen Karzinomen assoziiert ($P < 0.0001$). Im Gegensatz dazu war die isolierte 5q13-Deletion unabhängig vom ERG-Status (49.4% in ERG-negativen und 50.1% in ERG-positiven). Karzinome mit 5q13/5q21-Ko-Deletionen hatten eine schlechtere Prognose als Karzinome mit isolierten 5q13 oder 5q21 Deletionen ($P = 0.0080$). Die multivariate Analyse zeigte, dass die Analyse der 5q- (q13 oder q21) Deletion unabhängig von den prognostischen Parametern, die zum Zeitpunkt der initialen Biopsie zur Verfügung stehen, zur Vorhersage eines PSA-Rezidivs geeignet ist. Damit könnte diese Analyse hilfreich für die Identifizierung von Hochrisiko Patienten sein, die in jedem Fall eine umfangreiche und invasive Behandlung benötigen. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der Arbeit, dass auf Chromosom 5 mit der 5q13 und 5q21 Region zwei wesentliche Deletionsbereiche vorhanden sind, die bezüglich der klinischen Relevanz vergleichbar sind, aber verschiedenen Untergruppen der Prostatakarzinome angehören. Die Bestimmung des Status der 5q-Deletion könnte dementsprechend nützlich für die Einschätzung der Aggressivität des Karzinoms zum Zeitpunkt der Biopsie sein.

6 Abstract

Die Deletion des Chromosom 5q ist mit einer aggressiven ERG-negativen Teilmenge der Prostatakarzinome verknüpft. Globale Kopienzahlstatistiken weisen auf zwei Deletionsherde hin, nämlich 5q13 und 5q21, die (5q21) bereits vormals analysiert wurde. Um mehr über den Beitrag dieser Deletionsherde für die Biologie des Prostatakarzinoms zu erfahren, haben wir eine ergänzende FISH-Analyse von 5q13 und 5q21 in einer breiten TMA mit 12,427 Prostatakarzinomen, welche einer klinischen und molekularen Datenbank angeschlossen sind. Die Deletion von 5q13 wurde in 926 (13.5 %) von 6,866 und die Deletion von 5q21 in 793 (10%) von 7,932 erfolgreich analysierten Karzinomen gefunden. Beide Deletionen waren mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium, einem hohen Gleasongrad und einer frühen biochemischen Rekurrenz verknüpft ($P < 0.0050$ jeweils). Deletionen von 5q13 traten unabhängig von 5q21 Deletionen bei der weiten Mehrheit der 5q alterierenden Karzinomen auf: 81% (926/1137) aller 5q deletierten Karzinome wiesen entweder isolierte Verluste am 5q13 (49,4%) oder am 5q21 (32%) auf. Isolierte 5q21-Deletionen oder Ko-Deletionen beider loci waren stark verknüpft mit ERG-negativen Karzinomen ($P < 0.0001$). In Kontrast dazu war die isolierte 5q13-Deletion unabhängig vom ERG-Status (49.4% in ERG-negativen und 50.1% in ERG-positiven). Karzinome mit Ko-Deletionen von 5q13 und 5q21 hatten eine schlechtere Prognose als Karzinome mit isolierten 5q13- oder 5q21-Deletionen ($P = 0.0080$). Multivariate Statistiken mit prognostischen Parametern, die zum Zeitpunkt der initialen Biopsie zur Verfügung stand, weisen darauf hin, dass die Analyse der 5q-(q13 oder q21) Deletion hilfreich für die Identifikation von hochrisiko Patienten sein könnte, die eine umfangreiche Behandlung benötigen. Zusammenfassend identifizieren unsere Ergebnisse zwei Arten von 5q-Deletionen, die bezüglich der klinischen Relevanz vergleichbar sind, aber verschiedenen Untergruppen von Prostatakarzinomen angehören. Die Bestimmung des Status der 5q-Deletion könnte nützlich für die Einschätzung der Aggressivität des Karzinoms zum Zeitpunkt der Biopsie sein.

7 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Zusammensetzung des Patientenkollektivs im Gewebemikroarray
Tabelle 2:	Verwendete Reagenzien und kommerzielle Kits
Tabelle 3:	Verwendete Geräte und Materialien
Tabelle 4:	Assoziation der 5q13-Deletion mit den klinisch-pathologischen Parametern des Prostatakarzinoms
Tabelle 5:	Assoziation der 5q21-Deletion mit den klinisch-pathologischen Parametern des Prostatakarzinoms
Tabelle 6:	Assoziation der 5q13- und 5q21-Deletion alleine sowie in Ko-Deletion mit dem Auftreten eines PSA-Rezidivs in Abhängigkeit von den prä- und postoperativen Prognoseparametern des Prostatakarzinoms

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Architektur der 5q-Deletion
Abbildung 2:	Lokalisation der 5q13- und 5q21-FISH-Sonde auf Chromosom 5
Abbildung 3:	Exemplarische Darstellung der FISH-Analyse am Beispiel der 5q21-(CHD1)-Analyse
Abbildung 4:	Exemplarische Darstellung der 5q13-FISH-Analyse
Abbildung 5:	Assoziation der 5q13-Deletion mit dem Auftreten eines PSA-Rezidivs
Abbildung 6:	Assoziation der 5q21-Deletion mit dem Auftreten eines PSA-Rezidivs
Abbildung 7:	Assoziation der 5q-Deletion mit der TMPRSS2:ERG-Fusion
Abbildung 8:	Assoziation der 5q13/5q21-Ko-Deletion mit dem Auftreten eines PSA-Rezidivs

8 Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
°	Grad
%	Prozent
AJCC	American Joint Committee on Cancer
BAC	bacterial artificial chromosome
C	Celsius
CGH-Array	Comparative Genomic Hybridisation, Komperative genomische Hybridisierung
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
IHC	Immunhistochemie
kb	Kilobasen
Mb	Megabasen
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimol
mm	Millimeter
n	Anzahl n untersuchter / analysierbarer Proben
nmol	Nanomol

ng	Nanogramm
NP40	Octylphenoxyethoxyethanol
PSA	prostataspezifisches Antigen
pTNM	pathologische TNM-Klassifikation
p-Wert	p = probability, engl. für Wahrscheinlichkeit; Signifikanzwert
rpm	rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
SSC	Saline-Sodium-Citrat
TMA	Tissue Microarray, Gewebemikroarray
UICC	International Union against Cancer
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

9 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. Kraywinkel K, Bertz J, Laudi A, U W. Epidemiologie und Früherkennung häufiger Krebserkrankungen in Deutschland. <http://www.rki.de/gbe-kompakt> Hrsg. Robert Koch-Institut Berlin. GBEkompakt 3(4) 2012 [
3. Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms [Internet].
4. Michl MS, Thüroff Jw, Janetschek G, Wirth M. Die Urologie. Michl MS, Thüroff Jw, Janetschek G, Wirth M, editors. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016.
5. Gleason DF. Histologic grading of prostate cancer: a perspective. *Human pathology.* 1992;23(3):273-9.
6. Isbarn H, Wanner M, Salomon G, Steuber T, Schlomm T, Kollermann J, et al. Long-term data on the survival of patients with prostate cancer treated with radical prostatectomy in the prostate-specific antigen era. *BJU Int.* 2010;106(1):37-43.
7. 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.
8. Singh RV, Agashe SR, Gosavi AV, Sulhyan KR. Interobserver reproducibility of Gleason grading of prostatic adenocarcinoma among general pathologists. *Indian J Cancer.* 2011;48(4):488-95.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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. *The Journal of pathology.* 2013;231(1):130-41.
13. 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.
14. 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.
15. 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 Antihormonal Therapy. *Clin Cancer Res.* 2011;17(18):5878-88.
16. 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.

17. 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.
18. Burdelski C, Menan D, Tsourlakis MC, Kluth M, Hube-Magg C, Melling N, et al. The prognostic value of SUMO1/Sentrin specific peptidase 1 (SEN1) in prostate cancer is limited to ERG-fusion positive tumors lacking PTEN deletion. *BMC Cancer*. 2015;15:538.
19. Grupp K, Diebel F, Sirma H, Simon R, Breitmeyer K, Steurer S, et al. SPINK1 expression is tightly linked to 6q15- and 5q21-deleted ERG-fusion negative prostate cancers but unrelated to PSA recurrence. *Prostate*. 2013;73(15):1690-8.
20. Grupp K, Hohne TS, Prien K, Hube-Magg C, Tsourlakis MC, Sirma H, et al. Reduced CD147 expression is linked to ERG fusion-positive prostate cancers but lacks substantial impact on PSA recurrence in patients treated by radical prostatectomy. *Exp Mol Pathol*. 2013;95(2):227-34.
21. Melling N, Harutyunyan L, Hube-Magg C, Kluth M, Simon R, Lebok P, et al. High-Level HOOK3 Expression Is an Independent Predictor of Poor Prognosis Associated with Genomic Instability in Prostate Cancer. *PLoS One*. 2015;10(7):e0134614.
22. Melling N, Thomsen E, Tsourlakis MC, Kluth M, Hube-Magg C, Minner S, et al. Overexpression of enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) characterizes an aggressive subset of prostate cancers and predicts patient prognosis independently from pre- and postoperatively assessed clinicopathological parameters. *Carcinogenesis*. 2015;36(11):1333-40.
23. Pust A, Kyliès D, Hube-Magg C, Kluth M, Minner S, Koop C, et al. Aquaporin 5 expression is frequent in prostate cancer and shows a dichotomous correlation with tumor phenotype and PSA recurrence. *Human pathology*. 2016;48:102-10.
24. Stumm L, Burkhardt L, Steurer S, Simon R, Adam M, Becker A, et al. Strong expression of the neuronal transcription factor FOXP2 is linked to an increased risk of early PSA recurrence in ERG fusion-negative cancers. *J Clin Pathol*. 2013;66(7):563-8.
25. Tsourlakis MC, Khosrawi P, Weigand P, Kluth M, Hube-Magg C, Minner S, et al. VEGFR-1 overexpression identifies a small subgroup of aggressive prostate cancers in patients treated by prostatectomy. *Int J Mol Sci*. 2015;16(4):8591-606.
26. Tsourlakis MC, Walter E, Quaas A, Graefen M, Huland H, Simon R, et al. High Nr-CAM expression is associated with favorable phenotype and late PSA recurrence in prostate cancer treated by prostatectomy. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2013;16(2):159-64.
27. Zabalza CV, Adam M, Burdelski C, Wilczak W, Wittmer C, Kraft S, et al. HOXB13 overexpression is an independent predictor of early PSA recurrence in prostate cancer treated by radical prostatectomy. *Oncotarget*. 2015;6(14):12822-34.
28. 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 research*. 2013;73(9):2795-805.
29. 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.
30. 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. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2014;135(6):1369-80.

31. Kluth M, Hesse J, Heini 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 : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* 2013;26(7):975-83.
32. 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.
33. 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. *International journal of cancer Journal international du cancer.* 2015;137(10):2354-63.
34. Lapointe J, Li C, Giacomini CP, Salari K, Huang S, Wang P, et al. Genomic profiling reveals alternative genetic pathways of prostate tumorigenesis. *Cancer research.* 2007;67(18):8504-10.
35. Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, et al. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov.* 2012;2(5):401-4.
36. Tavassoli M, Steingrimsdottir H, Pierce E, Jiang X, Alagoz M, Farzaneh F, et al. Loss of heterozygosity on chromosome 5q in ovarian cancer is frequently accompanied by TP53 mutation and identifies a tumour suppressor gene locus at 5q13.1-21. *Br J Cancer.* 1996;74(1):115-9.
37. 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.
38. 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.
39. 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.
40. 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.
41. Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, et al. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal.* 2013;6(269):p11.
42. 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.
43. 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.
44. Cunningham JM, Shan A, Wick MJ, McDonnell SK, Schaid DJ, Tester DJ, et al. Allelic imbalance and microsatellite instability in prostatic adenocarcinoma. *Cancer research.* 1996;56(19):4475-82.
45. Liu W, Lindberg J, Sui G, Luo J, Egevad L, Li T, et al. Identification of novel CHD1-associated collaborative alterations of genomic structure and functional assessment of CHD1 in prostate cancer. *Oncogene.* 2012;31(35):3939-48.

46. Meyer A. Bedeutung der CHD1-Deletion auf Chromosom 5q21 zur Stratifizierung von Prostatakarzinomen in klinisch relevanten Subgruppen: Dissertation, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf; 2015.
47. Knuutila S, Aalto Y, Autio K, Bjorkqvist AM, El-Rifai W, Hemmer S, et al. DNA copy number losses in human neoplasms. *Am J Pathol.* 1999;155(3):683-94.
48. Dyrso T, Li J, Wang K, Lindebjerg J, Kolvraa S, Bolund L, et al. Identification of chromosome aberrations in sporadic microsatellite stable and unstable colorectal cancers using array comparative genomic hybridization. *Cancer Genet.* 2011;204(2):84-95.
49. Miura I, Graziano SL, Cheng JQ, Doyle LA, Testa JR. Chromosome alterations in human small cell lung cancer: frequent involvement of 5q. *Cancer research.* 1992;52(5):1322-8.
50. Tamura G, Ogasawara S, Nishizuka S, Sakata K, Maesawa C, Suzuki Y, et al. Two distinct regions of deletion on the long arm of chromosome 5 in differentiated adenocarcinomas of the stomach. *Cancer research.* 1996;56(3):612-5.
51. Achille A, Baron A, Zamboni G, Di Pace C, Orlandini S, Scarpa A. Chromosome 5 allelic losses are early events in tumours of the papilla of Vater and occur at sites similar to those of gastric cancer. *Br J Cancer.* 1998;78(12):1653-60.
52. Atkin NB, Fox MF. 5q deletion. The sole chromosome change in a carcinoma of the bladder. *Cancer Genet Cytogenet.* 1990;46(1):129-31.
53. Wu X, Ivanova G, Merup M, Jansson M, Stellan B, Grander D, et al. Molecular analysis of the human chromosome 5q13.3 region in patients with hairy cell leukemia and identification of tumor suppressor gene candidates. *Genomics.* 1999;60(2):161-71.
54. Cuzick J, Swanson GP, Fisher G, Brothman AR, Berney DM, Reid JE, et al. Prognostic value of an RNA expression signature derived from cell cycle proliferation genes in patients with prostate cancer: a retrospective study. *Lancet Oncol.* 2011;12(3):245-55.
55. Knezevic D, Goddard AD, Natraj N, Cherbavaz DB, Clark-Langone KM, Snable J, et al. Analytical validation of the Oncotype DX prostate cancer assay - a clinical RT-PCR assay optimized for prostate needle biopsies. *BMC Genomics.* 2013;14:690.

10 Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei all denjenigen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben: Prof. Sauter, Martina Kluth und Ronald Simon.

12 Lebenslauf

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

11 Eidesstattliche Versicherung

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

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

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

Unterschrift: