

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Pathologie

Prof. Dr. med. Guido Sauter

Prävalenz und klinische Signifikanz der BCL-2-Expression beim Prostatakarzinom

Dissertation

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

vorgelegt von:

Simone Riepl
aus Dachau

Hamburg 2020

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 14.10.2020**

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

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Hans Heinzer

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Guido Sauter

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	5
1.1 Das Prostatakarzinom	5
1.1.1 Epidemiologie	5
1.1.2 Symptome und Früherkennung	5
1.1.3 Diagnose	6
1.1.4 Therapie	8
1.1.5 Prognoseparameter	9
1.2 Bcl-2	11
2. Material und Methoden	15
2.1 Patienten	15
2.2 TMA-Herstellung	16
2.3 Immunhistochemie	18
2.4 Statistische Auswertung	19
3. Ergebnisse	20
3.1 Technische Aspekte	20
3.2 Bcl-2-Expression und Tumorphänotyp	20
3.3 Bcl-2-Expression und Prognose	23
3.4 Bcl-2-Expression und ERG-Status	25
3.5 Bcl-2-Expression und chromosomale Deletionen	27
3.6 Multivariate Analysen	29
3.7 Bcl-2-Expression und Ki67-Labeling-Index	31
4 Diskussion	33
5 Zusammenfassung	41
6 Abkürzungsverzeichnis	44
7 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	45
8 Literaturverzeichnis	47
9 Danksagung	59
10 Lebenslauf	60
11 Eidesstattliche Erklärung	61

1. Einleitung

1.1 Das Prostatakarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Das Prostatakarzinom ist weltweit die zweithäufigste diagnostizierte Krebserkrankung bei Männern, in den westlichen Ländern ist es sogar die häufigste diagnostizierte Krebserkrankung. Weltweit macht das Prostatakarzinom etwa 14% aller neu diagnostizierten Krebsfälle aus (Jemal et al. 2011). In Deutschland gibt es jährlich 480.000 Krebsneuerkrankungen. Davon waren 2014 rund 57.400 Fälle Prostatakrebs. Die Neuerkrankungsrate ist bis 2003 stark angestiegen. Nachdem sie bis 2011 konstant war ist sie seit 2011 wieder deutlich rückläufig (Robert-Koch-Institut 2017). Dies ist darauf zurückzuführen, dass durch die PSA-Messung (Prostata-spezifisches-Antigen) in der Prostatakarzinom-vorsorgeuntersuchung Neuerkrankungen früher erkannt werden (Jones et al. 2018). Etwa 40% der männlichen Bevölkerung in den westlichen Industrieländern tragen das Risiko im Laufe ihres Lebens am Prostatakarzinom zu erkranken. Es werden allerdings nur 10% symptomatisch und nur 3% sterben daran (Bott et al. 2003). Etwa 3 von 4 Tumoren werden aufgrund der Vorsorgeuntersuchung in einem frühen Stadium (T1 oder T2) bei einem mittleren Erkrankungsalter von 72 Jahren diagnostiziert. Die relative 5-Jahresüberlebensrate liegt bei 91% (Robert-Koch-Institut 2017).

1.1.2 Symptome und Früherkennung

Im frühen Stadium des Prostatakarzinoms ist der Patient meist symptomlos, es gibt keine Frühsymptome oder typischen Warnzeichen. Im fortgeschrittenen Stadium können obstruktive Miktionsbeschwerden auftreten. Dazu zählen ein abgeschwächter Miktionsstrahl, initiales Warten/Startverzögerung, Pressen zur Miktion, eine verlängerte Miktionsdauer, unterbrochene Miktion oder auch das Gefühl der unvollständigen Blasenentleerung. Es kann zu einer Harnstauungsniere kommen. Wenn das Prostatakarzinom schon Knochenmetastasen gebildet hat sind Rückenschmerzen ein typisches Symptom (Hautmann und Gschwend 2014).

Aufgrund der fehlenden Frühsymptome wird Männern ab dem 45. Lebensjahr, bei familiär vorbelasteten Männern ab dem 40. Lebensjahr, mit einer

mutmaßlichen Lebenserwartung von mehr als 10 Jahren eine Vorsorgeuntersuchung empfohlen (Hautmann und Gschwend 2014). Bei der Früherkennung wird nach Beschwerden oder anderen gesundheitlichen Veränderungen gefragt. Ebenso werden die äußeren Geschlechtsorgane untersucht und die Prostata in einer digital-rektalen Untersuchung (DRU) abgetastet (Robert-Koch-Institut 2017). Des Weiteren ist es sinnvoll den PSA-Wert im Blut zu messen (Mistry und Cable 2003). Das PSA ist ein ausschließlich im Prostatagewebe gebildetes Glykoprotein, das zur Verflüssigung des Samens dient. Liegt eine Prostatahyperplasie oder ein Karzinom vor, so kann der PSA-Wert erhöht sein (Hautmann und Gschwend 2014). Je nach PSA-Wert und Alter des Patienten sollte das Intervall für weitere Vorsorgeuntersuchungen gewählt werden, sofern es keinen Anlass zur weiterführenden Diagnostik gibt.

PSA < 1 ng/ml: Intervall alle 4 Jahre

PSA 1-2 ng/ml: Intervall alle 2 Jahre

PSA > 2 ng/ml: Intervall jedes Jahr

Männern, die das 70. Lebensjahr überschritten haben und einen PSA-Wert unter 1ng/ml haben, wird eine PSA-gestützte Vorsorgeuntersuchung nicht mehr empfohlen (Leitlinienprogramm Onkologie 2018, Lilja et al. 2011). Eine weiterführende Diagnostik ist notwendig, wenn mindestens eines der folgenden Kriterien erfüllt ist: kontrollierter PSA > 4ng/ml, ein karzinomverdächtiges Ergebnis bei der DRU oder ein auffälliger Anstieg des PSA-Wertes, obwohl das Bestimmungsverfahren nicht gewechselt wurde (Harris und Lohr 2002).

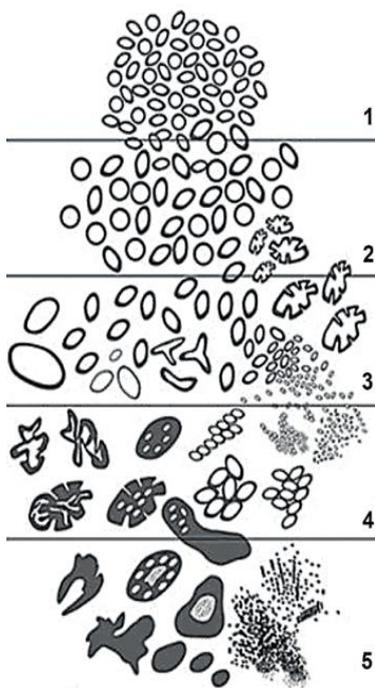
1.1.3 Diagnose

Die Diagnose Prostatakarzinom erfolgt durch eine Stanzbiopsie. Es werden unter infiltrativer Lokalanästhesie zehn bis zwölf Gewebezylinder unter transrektal-sonographischer Kontrolle aus der Prostata entnommen. Bereiche der Prostata, die palpatorisch oder in bildgebenden Verfahren auffällig waren, werden zusätzlich gezielt biopsiert (Renfer et al. 1995, Eichler et al. 2006). Die Gewebeproben werden mikroskopisch untersucht und der Differenzierungsgrad des Prostatagewebes mithilfe des Gleason-Scores festgelegt. Der Gleason-Score beruht ausschließlich auf architektonischen Parametern, es werden die Form und Anordnung der Prostatadrüsen beurteilt und in fünf Muster eingeteilt (Abbildung 1, Tabelle 1). Der Gleason-Score setzt sich aus dem Gleason-Muster

des häufigsten und des am schlechtesten differenzierten Tumorabschnitts zusammen. Kommt in einem Tumor nur ein Gleason-Muster vor, so wird dieses zweimal verwendet, z.B. 3+3=6 (Schlomm und Sauter 2016).

Liegt die Diagnose eines Prostatakarzinoms vor erfolgt das Staging. Mithilfe der TNM-Klassifikation wird das Ausmaß des Tumors eingeteilt (Tabelle 2). Das Prostatakarzinom kann bezüglich der Rezidiventwicklung in verschiedene Risikogruppen eingeteilt werden. Ein niedriges Risiko besteht bei PSA ≤ 10 ng/ml, Gleason-Score 6 und cT1c und cT2a, mittleres Risiko bei PSA > 10 ng/ml und ≤ 20 ng/ml oder Gleason-Score 7 oder cT2b, hohes Risiko bei PSA > 20 ng/ml oder Gleason-Score ≥ 8 oder cT2c. Je nach Tumorkategorie und Risikogruppe werden beim Staging bildgebende Untersuchungen (Sonografie, MRT, PET/CT, Skelettszintigrafie) durchgeführt (Manikandan et al. 2007, Abuzallouf et al. 2004).

Tabelle 1: Gleason Muster nach Helzap, B.& Egevad, L (2006)



Gleason-Muster	Bedeutung
1	scharf begrenzter Knoten, Drüsen gleichförmig, dicht gepackt und mittelgroß
2	nicht ganz scharf begrenzter Knoten, Drüsen lockerer und ungleichmäßiger
3	unscharfer Knoten, Drüsen klein und ungleichmäßig, evtl. kleine solide Bezirke
4	Tumorbereich unscharf, Drüsen meist ohne Innenraum, verschmolzene Drüsen, solide Bezirke
5	Tumorbereich unscharf, keine klaren Drüsen, solide Bezirke, weitere Veränderungen

Abbildung 1: Gleason Muster (verändert nach Epstein et al. 2016)

Tabelle 2: TNM-Klassifikation (nach Wittekind, C. & Meyer, H-J. 2010)

T - Primärtumor	
Tx	Primärtumor nicht beurteilbar
T0	kein Anhalt für Primärtumor
T1	weder tastbar noch sichtbar
T1a	Tumor zufälliger histologischer Befund in $\leq 5\%$ des resezierten Gewebes
T1b	Tumor zufälliger histologischer Befund in $> 5\%$ des resezierten Gewebes
T1c	Tumor durch Nadelbiopsie diagnostiziert
T2	Tumor begrenzt auf Prostata
T2a	Tumor befällt maximal die Hälfte eines Prostatalappens
T2b	Tumor befällt mehr als die Hälfte eines Prostatalappens
T2c	Tumor befällt beide Prostatalappen
T3	Tumor breitet sich durch die Prostatakapsel in extrakapsuläres Gewebe aus
T3a	einseitige oder beidseitige extrakapsuläre Ausbreitung
T3b	Tumor infiltriert Samenblase
T4	Tumor wächst in die umliegenden Organe ein
N - regionäre Lymphknoten	
N0	Lymphknoten nicht befallen
N1	Lymphknotenmetastasen
Nx	keine Aussage zu Lymphknotenmetastasen möglich
M - Fernmetastasen	
M0	keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen
Mx	keine Aussage zu Fernmetastasen möglich

1.1.4 Therapie

Je nach Ausprägungsgrad des Tumors, Alter und Komorbiditäten des Patienten sind unterschiedliche Therapieansätze möglich. Es gibt die lokale Therapie mit kurativer Intention, das Konzept der aktiven Überwachung („Active Surveillance“) und die sekundäre symptomorientierte Therapie („Watchful Waiting“).

Eine Active Surveillance wird nur unter strengen Voraussetzungen empfohlen. Der PSA-Wert darf 10ng/ml nicht übersteigen, der Gleason-Score darf maximal 6 betragen, der Tumor darf klinisch weder tastbar noch sichtbar sein (cT1) oder maximal die Hälfte eines Prostatalappens (cT2a) befallen, es dürfen bei leitliniengerechter Entnahme von 10-12 Stenzen nur maximal zwei Stenzen Tumor enthalten und es darf nicht mehr als 50% Tumor in einer Stanze sein. Sind diese Voraussetzungen erfüllt und Alter und Komorbiditäten des Patienten berücksichtigt, so werden in regelmäßigen Abständen (in den ersten zwei Jahren

alle 3 Monate, dann alle 6 Monate bei stabilem PSA) PSA-Wert-Kontrollen und digital-rektale Untersuchungen (DRU) durchgeführt (Bastian et al. 2009).

Bei einer lokalen Therapie mit kurativer Intention ist die radikale Prostatektomie eine primäre Therapieoption. Ziel ist es die Prostata komplett mit tumorfreien Resektionsrändern zu entfernen, die Harnkontinenz und Erektionsfunktion sollen erhalten bleiben (Swindle et al. 2005). Dies ist bei einem lokal begrenzten Prostatakarzinom leichter zu erreichen als bei einem lokal fortgeschrittenem. Um bei letzterem ein Krankheitsrezidiv vorzubeugen sind zusätzliche Maßnahmen, nötig (Van Poppel et al. 2006). Die perkutane Strahlentherapie ist bei lokal begrenzten Prostatakarzinomen aller Risikogruppen eine primäre Therapieoption (Hamdy et al. 2016). Bei Patienten mit einem hohen Risikoprofil ist zusätzlich eine neoadjuvante und/oder adjuvante hormonablative Therapie sinnvoll (Denham et al. 2011). Bei Patienten mit lokal fortgeschrittenem Prostatakarzinom ist die perkutane Strahlentherapie ebenfalls eine primäre Therapieoption, allerdings kombiniert mit einer langfristigen hormonablativen Therapie von mindestens 24, besser 36 Monaten (Bolla et al. 2009, Edamura et al 2005). Je nach Tumorstadium und Risikoprofil sind die Brachytherapie und die Lymphadenektomie weitere Therapieoptionen (Galalae et al. 2004, Kälkner et al. 2007, Heidenreich et al. 2002).

Bei der sekundären symptomorientierten Therapie entscheiden sich Patient und Arzt gegen eine Therapie mit kurativer Intention. Es wird nur symptomorientiert palliativ behandelt (Leitlinienprogramm Onkologie 2018).

1.1.5 Prognoseparameter

Zu den klinisch angewandten Prognoseparametern gehören der Gleason-Score, das TNM-Stadium, der PSA-Wert, das Alter und Komorbiditäten des Patienten (Grignon und Hammond 1995). Der postoperative PSA-Wert kann einen Hinweis auf ein mögliches biochemisches Rezidiv geben (Hutter et al. 1996). Ein tumorpositiver Resektionsrand nach einer Prostatektomie ist mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Zhang et al. 2018).

Es wurden zahlreiche Studien durchgeführt, welche den Zusammenhang zwischen Prognose und molekularbiologische Veränderungen am Prostatakarzinom untersuchten.

Ki-67 ist ein Proliferationsmarker, der in allen Phasen des Zellzyklus exprimiert wird. Eine hohe Ki-67-Expression im Prostatakarzinom ist mit einer schlechteren Prognose bezüglich des krankheitsfreien Überlebens, biochemischen Rezidivs, Fernmetastasen, krankheitsspezifischen Überleben und Gesamtüberleben assoziiert (Berlin et al. 2017).

β III-Tubulin gehört zu den Mikrotubuli. Das sind Proteine, die in der Zelle an vielen Aufgaben beteiligt sind, z.B. Aufbau des Zytoskeletts, Aufrechterhaltung der Zellstruktur, Mitose und Meiose (Orr et al. 2003). Eine hohe β III-Tubulin-Expression ist assoziiert mit einem hohen Gleason-Score, fortgeschrittenem pT-Stadium und einem frühen PSA-Rezidiv (Tsourlakis et al. 2014).

PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog) ist ein Tumorsuppressor und Proliferationshemmer, der auf dem Gen 10q23 lokalisiert ist. Eine Inaktivierung von PTEN führt zu einem gesteigerten Zellwachstum, Proliferation, Überleben und Migration. PTEN-Deletionen sind im Prostatakarzinom mit einem hohen Gleason-Score und frühen PSA-Rezidiv assoziiert (Krohn et al. 2012).

Eine weitere beim Prostatakarzinom häufig vorkommende Genveränderung ist die TMPRSS2:ERG-Fusion. Hierbei kommt es zur Fusion zwischen dem transmembrane protease serine 2 (TMPRSS2)-Gen und ERG, einem Mitglied der ETS-Transkriptions-Familie (Tomlins et al. 2005). Diese Veränderung kommt in ca. 50% aller Prostatakarzinome vor und ist somit die häufigste genetische Alteration (Kumar-Sinha et al. 2008). Diese Genveränderung findet in der frühen Prostatakarzinomentstehung statt (Perner et al. 2007) und der Transkriptionsfaktors ERG wird vermehrt exprimiert (Sabaliauskaite et al. 2012). Verschiedene Untersucher, u.a. Font-Tello et al. (2015) postulierten an kleinen Patientenkollektiven, dass die TMPRSS2:ERG-Genfusion mit einem aggressiveren Phänotyp einher gehen könnte und möglicherweise Auswirkungen auf die Prognose haben könnte. Untersuchungen von mehreren 1000 Tumoren aus dem Hamburger Patientenkollektiv konnten aber verdeutlichen, dass der TMPRSS2-ERG-Genfusion keinerlei prognostische Bedeutung zukommt (Minner et al 2011).

1.2 Bcl-2

Bcl-2 ist ein Protein der gleichnamigen Genfamilie, die im intrinsischen Apoptose-Signalweg eine entscheidende Rolle spielt (Rassow et al. 2012).

Das Protein „Bcl-2“ hat seinen Namen daher, dass es erstmals in einem B-Zell-Lymphom entdeckt wurde (Aiello et al. 1992). Es war das erste Protein, das aus der Genfamilie der Apoptose-regulierenden Proteine identifiziert wurde. Proteine werden in die Bcl-2-Familie aufgenommen, wenn sie mindestens eine von vier dem „Gründungsmitglied“ Bcl-2 homologe Sequenzen, sogenannte BH-Domänen (Bcl-2 homology Domäne) besitzen (Czabotar et al. 2014, Shamas-Din et al. 2013). Mittlerweile sind über 20 Proteine bekannt, die man bezüglich Funktion und Struktur in drei Gruppen einteilen kann. Zu den anti-apoptotischen Proteinen gehören u.a. Bcl-2, Bcl-XL und Mcl-1, zu den pro-apoptotischen Proteinen gehören Bax, Bak und Bok. Die Proteine dieser zwei Gruppen besitzen alle vier BH-Domänen und haben eine ähnliche globale Struktur (Czabotar et al. 2014). Die Proteine der dritten Gruppe besitzen nur die BH3-Domäne, weswegen sie BH3-only-Proteine genannt werden. Dazu gehören u.a. Bim, Bad, Puma, Noxa, Bik, Hrk, Bmf und tBid. Ihre Wirkung ist pro-apoptotisch (Czabotar et al. 2014). Das Verhältnis dieser pro- und anti-apoptotischen Proteine entscheidet darüber, ob eine Zelle unter gewissen Umständen überlebt oder nicht. Verlagert sich das Konzentrationsgleichgewicht zugunsten der pro-apoptotischen Proteine wird der intrinsische Apoptosesignalweg ausgelöst (Shamas-Din et al. 2013).

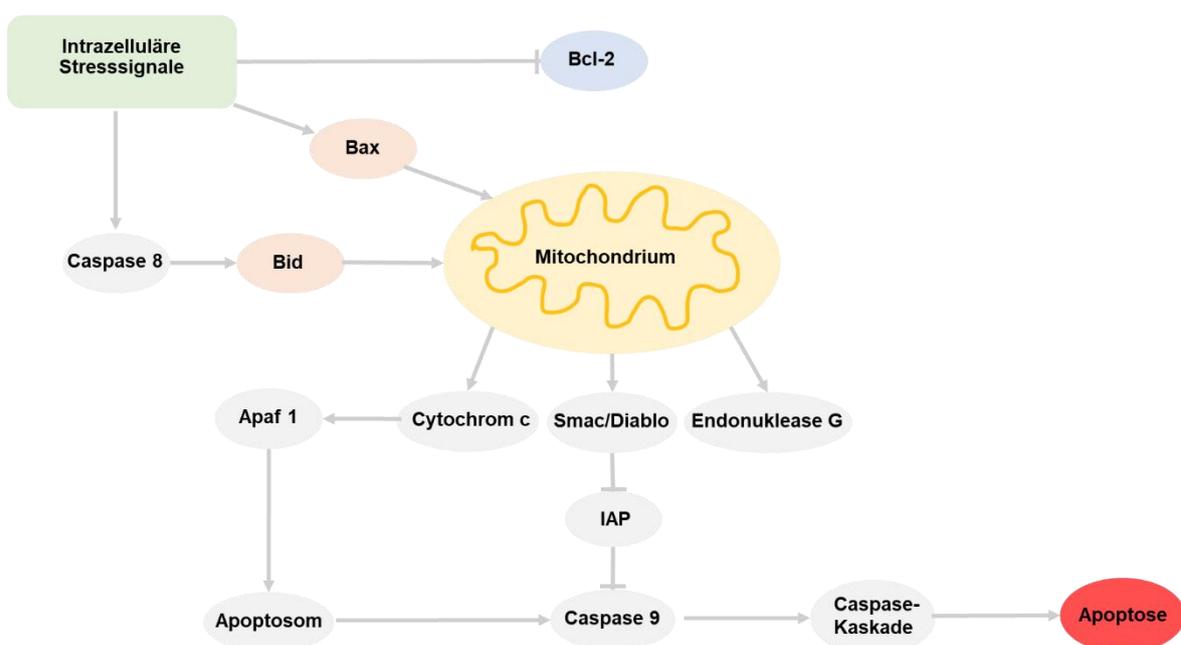


Abbildung 2: intrinsischer Apoptose-Signalweg

Bei der Apoptose unterscheidet man zwischen dem extrinsischen und intrinsischen Signalweg. Beim extrinsischen Signalweg bindet ein Ligand an sogenannte Todesrezeptoren und aktiviert den Apoptosesignalweg (Rassow et al. 2012). Der intrinsische Signalweg wird durch intrazelluläre Signale, zum Beispiel DNA-Schäden oder oxidativer Stress, also unabhängig von Membranrezeptoren, ausgelöst.

Durch die Stress-Signale kommt es zum einen zur proteolytischen Aktivierung von Bid durch Caspase 8 als auch zu einer verstärkten Expression von Bax. Folglich ist das Gleichgewicht zwischen pro- und anti-apoptotischen Proteinen gestört, die anti-apoptotische Schutzfunktion von Bcl-2 reicht nicht mehr aus um die Apoptose zu verhindern. Daraufhin werden in der äußeren Mitochondrienmembran aus Bax und Bad und weiteren mitochondrialen Proteinen Permeabilitäts-Transitions-Poren gebildet, wodurch das Membranpotential der inneren Mitochondrienmembran zusammenbricht. Es werden Cytochrom c, Smac/Diablo und Endonuklease G in das Zytoplasma freigesetzt. Dies sind mitochondriale Apoptose-Mediatoren. Smac/Diablo verhindern mithilfe sogenannter Inhibitors of Apoptosis Proteins (IAP) den Abbau von Caspasen. Der wichtigste Apoptose-Mediator ist Cytochrom c. Es bindet an den monomeren Apoptotic Protease activating Factor 1, Apaf-1. Durch Konformationsänderungen bildet sich das Apoptosom, welches die Procaspase 9 zur Caspase 9 aktiviert. Durch die kaskadenartige proteolytische Aktivierung der Caspasen 3, 6 und 7 wird letztendlich die Apoptose ausgelöst. (Rassow et al. 2012, Czabotar et al. 2014)

Bcl-2 ist vor allem in fetalem Gewebe häufig exprimiert. Bei Erwachsenen scheint die Bcl-2-Expression vorwiegend in Zellen vorzukommen, die sich schnell teilen und differenzieren müssen (Kirkin et al. 2004). Bcl-2 ist nicht nur wie oben beschrieben in der äußeren Mitochondrienmembran zu finden, sondern auch in der Kernhülle und im endoplasmatischen Retikulum (ER) (Kirkin et al. 2004). Der Kalzium-Haushalt im ER wird durch Bcl-2 beeinflusst und der intrazelluläre Kalzium-Spiegel wiederum beeinflusst die Apoptose (Foyourzi-Youssefi et al. 2000, Zörnig et al. 1995).

Eine Bcl-2-Überexpression kann durch eine chromosomale Translokation an t(14;18) verursacht werden (Tsujiimoto et al 1984). Dabei tauscht das Bcl-2-Gen seine normale chromosomale Position von 18q21 auf das Chromosom 14 in die

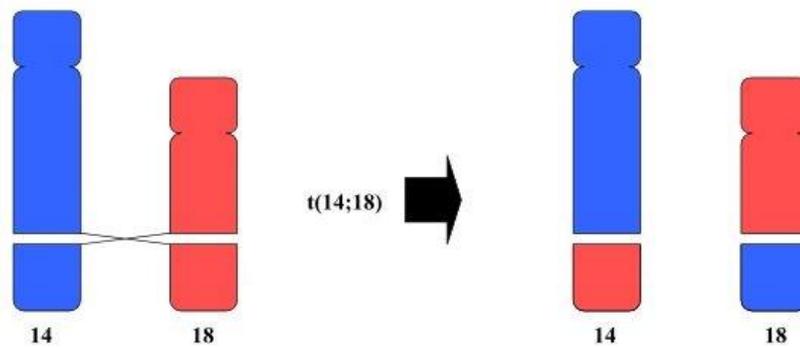


Abbildung 3: Translokation Bcl-2 (verändert nach Kirkin et al. 2004)

direkte Nähe des Intron-Enhancers. Es wird weiterhin ein normales Bcl-2-Protein produziert. Allerdings erhöht sich die Bcl-Expression durch eine Aktivierung der Transkription und eine nicht normale posttranskriptionale Regulation der Bcl-2-mRNA (Cleary et al. 1986). Eine vermehrte Bcl-2-Expression löst jedoch kein Tumorgeschehen aus (Vaux et al. 1988).

In zahlreichen Studien wurde die prognostische Bedeutung der Bcl-2-Expression in verschiedenen Tumorarten untersucht. Beim Mamma-Karzinom wird eine hohe Bcl-2-Expression mit jüngeren Patientenalter, frühem Tumorstadium, niedrigerem Tumorgrad und einer besseren Prognose assoziiert (Seong et al. 2015). Im lokalisierten nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom ist die Prognose ebenfalls besser, wenn die Bcl-2-Expression erhöht ist (Schmidt et al. 2014; Yoo et al. 2007). Beim kolorektalen Karzinom spricht eine erhöhte Bcl-2-Expression ebenfalls für ein besseres Gesamt- und krankheitsfreies Überleben (Huang et al. 2017). Bei Patienten mit einem B-Zell-Lymphom ist eine erhöhte Bcl-2-Expression mit einem schlechteren Gesamtüberleben und einem kürzeren progressionsfreien Überleben assoziiert (Lu et al. 2015, Kim et al. 2016). Beim Nierenzellkarzinom kommt es durch eine erhöhte Bcl-2-Expression zu einer größeren Tumorprogression und einer Behandlungsresistenz (Gobé et al. 2002). Aus diesen Beispielen lässt sich schließen, dass die prognostische Bedeutung der Bcl-2-Expression je nach Tumortyp unterschiedlich ist.

Die Datenlage beim Prostatakarzinom ergibt unterschiedliche Ergebnisse. Es gibt Studien, die keinen Zusammenhang zwischen einer erhöhten Bcl-2-Expression und dem Tumorstadium und dem Gleason-Score sehen (Fonseca et al. 2004, Cesinaro et al. 2000, Abaza et al. 2006). Auf der anderen Seite gibt es Studien, die darauf hinweisen, dass die Bcl-2-Expression mit dem Tumorstadium und dem Gleason-Score assoziiert ist (Zellweger et al. 2003, Erbersdobler et al.

2002). Des Weiteren gibt es Studien, die auf einen Zusammenhang zwischen der Bcl-2-Expression und dem Misslingen einer Radiotherapie hinweisen (Pollack et al. 2003, Huang et al. 1998).

2012 wurde am Institut der Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf eine Studie an 3261 Patienten zur Bcl-2-Expression durchgeführt. Dabei fand sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen einer Bcl-2-Überexpression und einem hohen Gleason-Score, einem fortgeschrittenen Tumorstadium, einem erhöhten Risiko für ein PCA-Rezidiv und einem hohen Proliferationsindex (Fleischmann et al. 2012). Mittlerweile hat sich allerdings gezeigt, dass viele Prognoseparameter beim Prostatakarzinom in hohem Maß vom Vorliegen einer TMPRSS2:ERG-Genfusion abhängig sind und ihre prognostische Aussagekraft nur entweder in ERG-positiven (Grupp et al. 2014, Heumann et al. 2017, Burdelski et al. 2016, Burdelski et al. 2015, Müller et al. 2013) oder in ERG-negativen Tumoren (Stumm et al. 2013, Grupp et al. 2013) entfalten. Das Ziel dieser Arbeit war es deswegen die Bcl-2 Expression an einem größeren Tumorkollektiv mit über 12.000 Patienten zu untersuchen und dabei mögliche ERG-abhängige Zusammenhänge mit der Prognose aufzudecken. Zudem sollte der Zusammenhang zwischen dem Bcl-2-Status und den wichtigsten chromosomalen Deletionen des Prostatakarzinoms geklärt werden.

2. Material und Methoden

2.1 Patienten

Für dieses Projekt waren Prostatektomiepräparate von 12.427 Patienten verfügbar, die sich im Zeitraum von 1992 bis 2012 einer Operation in der Abteilung für Urologie und dem Prostatakrebszentrum der Martiniklinik am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE) unterzogen. Verlaufsdaten sind für 11.665 Patienten mit einem mittleren Verlaufsbeobachtungszeitraum von 36 Monaten und einer Spannbreite von 1-241 Monate vorhanden. Tabelle 3 zeigt klinische Angaben (Follow-up, Patientenalter, präoperativer PSA-Wert) und Informationen über das Prostatakarzinom der Patienten (pT-Stadium, Gleason Grad, pN-Status und chirurgische Resektionslinien). Das Prostata-spezifische Antigen (PSA) wurde postoperativ regelmäßig gemessen. Der Zeitpunkt eines Tumorrezidivs wurde als Zeitspanne definiert, welche zwischen der Operation und dem ersten Auftreten von PSA-Werten über 0,2ng/ml im Serum und im Verlauf weiter ansteigenden Werten bei wiederholten Messungen liegt. Alle Prostataproben wurden nach einem standardisierten Verfahren untersucht. Im Rahmen der Operation wurden sie farblich markiert (anterior, posterior, lateral, periurethral) und anschließend für ca. 12 Stunden in 4% gepufferter Formalinlösung gelagert. Die Präparate wurden in Scheiben mit einer Schichtdicke von ca. 2-4mm geschnitten und dann zum Härten in Paraffin gebettet (Blöcke). Mit einem Mikrotom wurden Schnitte von 4 µm angefertigt, auf Objektträger übertragen, fixiert und einer Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung unterzogen. Anschließend wurden die Präparate mikroskopisch beurteilt und die Tumorareale auf den Objektträgern farblich markiert.

Die molekularbiologische Datenbank zu diesen TMAs enthält den ERG-Expressionsstatus in 10.678 Fällen (Weischenfeldt et al. 2013), den ERG-break-apart-Status durch FISH-Analysen in 7.099 Fällen (erweitert von Minner et al. 2011), den Deletionsstatus von 5q21 (CHD1) in 7.932 Fällen (erweitert von Burkhardt et al. 2013), 6q15 (MAP3K7) in 6.069 Fällen (erweitert von Kluth et al. 2013), PTEN (10q23) in 6.704 Fällen (erweitert von Krohn et al. 2012), 3p13 (FOXP1) in 7.081 Fällen (erweitert von Krohn et al. 2013) und Ki67-labeling-Index (Ki67-LI) Daten in 4.426 Fällen (erweitert von Tennstedt et al. 2012).

Tabelle 3: Klinische und pathologische Daten der ausgewählten Patienten

	Anzahl der Patienten (%)	
	Patientenkohorte des TMA (n=12.427)	biochemisches Rezidiv
Follow-up (Monate)		
n	11666 (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%)
60-69	7188 (58,2%)	1610 (22,4%)
≥70	1761 (14,3%)	370 (21%)
Präoperatives 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%)
Gleason Grad		
≤3+3	2983 (24,1%)	368 (12,3%)
3+4	6945 (56,2%)	1289 (18,6%)
4+3	1848 (15%)	788 (42,6%)
≥4+4	584 (4,7%)	311 (53,3%)
pN Stadium		
pN0	6970 (91%)	1636 (23,5%)
pN+	693 (9%)	393 (56,7%)
chirurgische Resektionslinien		
negativ	9990 (81,9%)	1848 (18,5%)
positiv	2211 (18,1%)	853 (38,6%)

Anmerkung: aufgrund teilweise nicht vorhandener Daten ergibt die Summe der Einzelpositionen nicht immer 12.427.

Abkürzung: AJCC = American Joint Committee on Cancer

2.2 TMA-Herstellung

Die Tissue Microarrays (TMAs) wurden wie folgt hergestellt (Mirlacher and Simon 2010). Als erstes wurden ein Stanz-File und –„Cartoon“ hergestellt (Beispiele siehe Tabelle 4 und Abbildung 4). Aus dem Stanz-File können anonymisiert die

Tabelle 4: Beispiel eines Stanz-Files gehörend zum TMA (Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, 2018)

Pat.-ID	Koordinaten	Tumortyp	Alter bei OP	PSA vor OP	pGleason	path. T	path. N	R-Status	Rezidiv	Monate Beobachtung
1	A 1a	Adenokarzinom	72	15,4	3+3	pT3a	N0	R0	nein	121,5
2	A 1b	Adenokarzinom	53,1	14	3+4	pT3a	N0	R0	nein	217,4
3	A 1c	Adenokarzinom	63,4	3,9	3+4	pT3a	N0	R0	nein	111,2
4	A 1d	Adenokarzinom	65,1	10,06	3+4	pT3b	N0	R1	ja	191,2
5	A 1e	Adenokarzinom	68,5	7,48	5+3	pT3a	N0	R0	nein	153,4
6	A 1f	Adenokarzinom	66,3	37	3+3	pT3a	N1	R0	nein	183,2
7	A 1g	Adenokarzinom	73,4	20,61	3+4	pT3b	N0	R1	nein	193,3
8	A 1h	Adenokarzinom	58,3	6,4	3+3	pT3a	N0	R1	ja	228,4
9	A 1i	Adenokarzinom	60,2	12,26	2+3	pT2	N0	R0	nein	219,3
10	A 1k	Adenokarzinom	70,2	34	3+3	pT3a	N0	R0	nein	173,3
11	A 1l	Adenokarzinom	63,4	19,54	4+5	pT3a	N0	R0	nein	119,5
12	A 1m	Adenokarzinom	66,8	22	4+3	pT3b	N0	R0	ja	154,3
13	A 1n	Adenokarzinom	49,5	5	3+3	pT2	N0	R0	ja	135,2
14	A 1o	Adenokarzinom	65,5	120	3+4	pT3a	N0	R1	ja	169,5
15	A 1p	Adenokarzinom	60,3	4,14	3+4	pT3b	N0	R0	nein	184,2
16	A 1q	Adenokarzinom	69	14	3+3	pT3b	N0	R0	nein	168,2
17	A 1r	Adenokarzinom	52,3	11,33	4+5	pT3b	N2	R1	nein	76,2
18	A 2a	Adenokarzinom	70,4	54,6	3+4	pT3a	N0	R0	ja	143,8
19	A 2b	Adenokarzinom	59,3	3,3	3+4	pT2	N0	R0	nein	219,6
20	A 2c	Adenokarzinom	68,6	10,06	3+3	pT3a	N0	R0	nein	132,5
21	A 2d	Adenokarzinom	71,4	35,8	3+4	pT3a	N0	R0	nein	86,9
22	A 2e	Adenokarzinom	66,4	11	3+4	pT3a	N0	R0	ja	194,6
23	A 2f	Adenokarzinom	68,3	31,4	4+5	pT3b	N0	R1	ja	157,3
24	A 2g	Adenokarzinom	65,3	7,48	3+3	pT3b	N0	R1	ja	186,4
25	A 2h	Adenokarzinom	63,5	83,5	3+4	pT3b	N0	R0	nein	198,4
26	A 2i	Adenokarzinom	72,3	50	4+4	pT3b	N0	R0	nein	87,3
27	A 2k	Adenokarzinom	65,8	43,2	4+5	pT3b	N0	R0	ja	145,2

Patienten-ID, die zugehörige Koordinate auf dem TMA und die jeweiligen Pathologie- und Überlebensdaten abgelesen werden. Das Cartoon ist eine Grafik, die die Koordinaten des TMAs definiert.

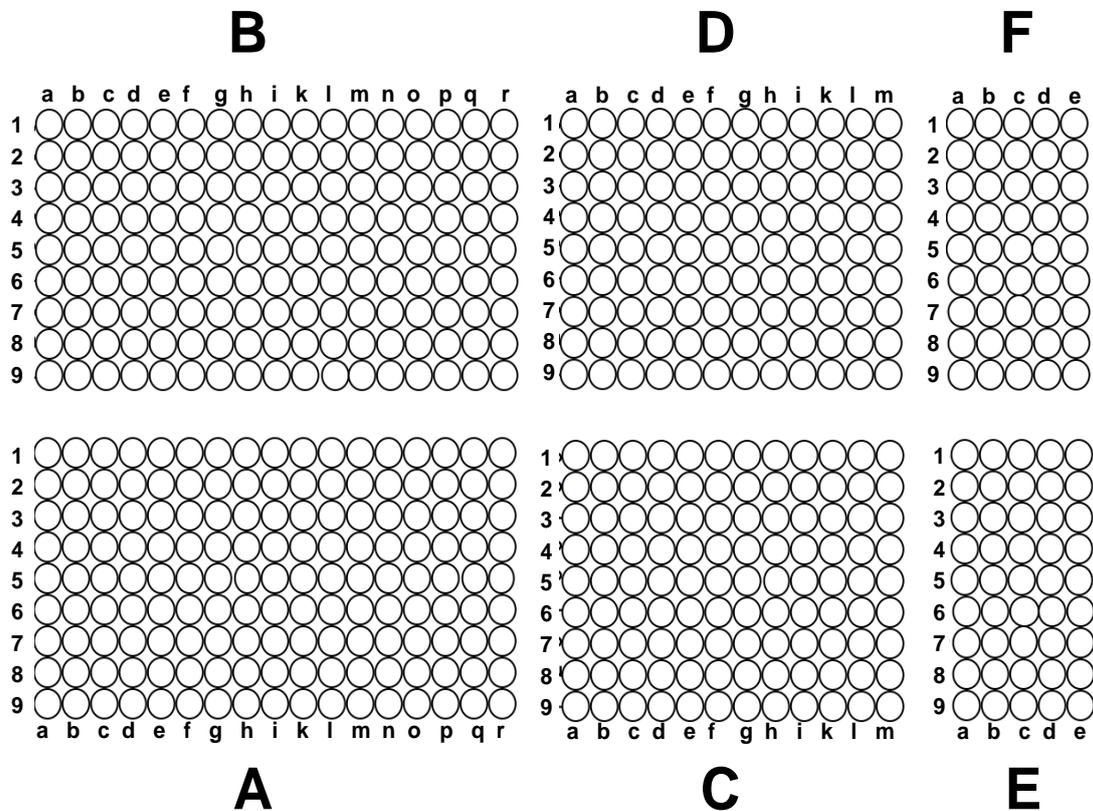


Abbildung 4: Beispiel eines Stanz-Cartoons. (Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, 2018)

Zur Herstellung der TMA-Blöcke wurden Gewebezylinder mit 0,6 mm Durchmesser aus den markierten Bereichen der Prostataproben herausgestant und in ein vorgebohrtes Loch mit ebenfalls 0,6mm Durchmesser eines leeren Paraffinblockes übertragen (Abbildung 5). Die verwendeten Prostatagewebe wurden auf insgesamt 27 TMA-Blöcke verteilt, die jeweils zwischen 144 und 522 Tumorproben enthalten. Für interne Kontrolluntersuchungen wurden auf jedem TMA-Block zusätzlich noch tumorfreies Referenzgewebe von anderen Organen (Leber, Niere, Haut, Lunge und Haut) und tumorfreies Prostatagewebe dazugestant.

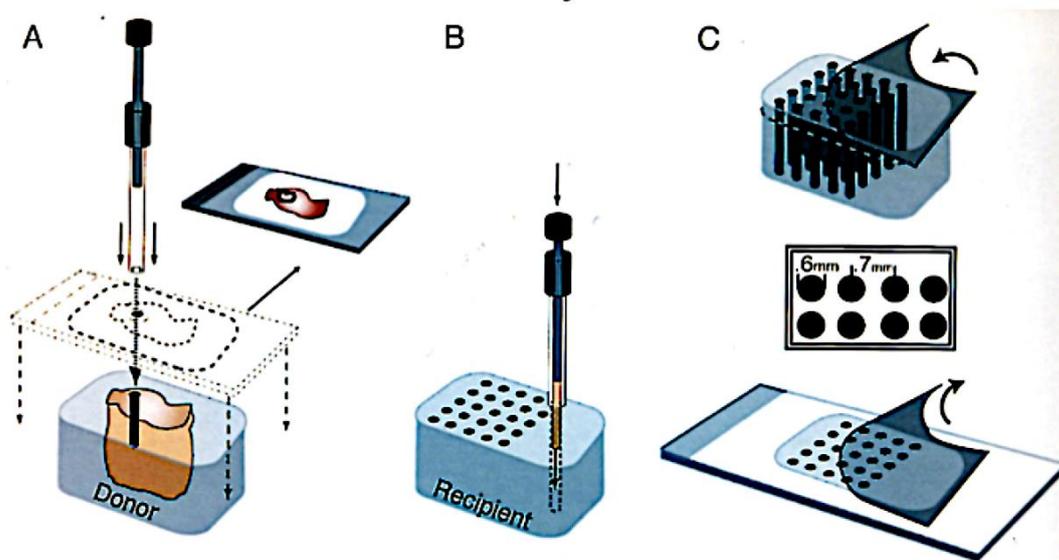


Abbildung 5: TMA-Herstellung. A: Entnahme des Gewebezylinders. B: Übertragen des Gewebezylinders in ein vorgebohrtes Loch. C: von dem fertigen TMA-Block werden 4 µm dicke Scheiben weggeschnitten und auf Objektträger übertragen. Quelle: Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, 2016

2.3 Immunhistochemie

Mit einem Mikrotom wurden 4 µm Schnitte des TMA Blocks hergestellt. Die frisch geschnittenen Schnitte wurden innerhalb eines Tages und in einem Experiment immunhistochemisch gefärbt. Die Objektträger wurden entparaffinisiert und zur Hitze-induzierten Antigen-Demaskierung für 5 Minuten im Autoklav bei 121°C mit Tris-EDTA-Citrat-Puffer bei pH 7,8 behandelt. Anschließend wurde der primäre Antikörper, spezifisch für Bcl-2 (monoklonaler Mausantikörper (Klon 100/D5), Abcam, Cambridge, UK; ab692; Verdünnung 1:25) bei 37°C für 60 Minuten aufgetragen. Um die gebundenen Antikörper sichtbar zu machen wurde das

EnVision Kit (Dako, Glostrup, Denmark) nach Herstelleranweisung angewendet.

Das Färbeergebnis wurde in folgende Kategorien eingeteilt:

negativ:	keine Färbung der Zellen nachweisbar
schwach positiv:	Färbeintensität 1+ in $\leq 70\%$ der Tumorzellen oder Färbeintensität 2+ in $\leq 30\%$ der Tumorzellen
mäßig positiv:	Färbeintensität 1+ in $> 70\%$ der Tumorzellen oder Färbeintensität 2+ in $> 30\%$ und $\leq 70\%$ der Tumorzellen oder Färbeintensität 3+ in $\leq 30\%$ der Tumorzellen
stark positiv:	Färbeintensität 2+ in $> 70\%$ der Tumorzellen oder Färbeintensität 3+ in $> 30\%$ der Tumorzellen

2.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit der JMP® 10.0.2 Software (SAS Institute Inc., NC, USA). Um nach Verbindungen zwischen molekularbiologischen Parametern und Tumorphänotypen zu suchen, wurden Kontingenztabellen berechnet und ein X^2 -Test durchgeführt. Überlebenskurven wurden nach Kaplan-Meier erstellt. Es wurde der Log-Rank-Test angewendet um signifikante Überlebensunterschiede zwischen den Gruppen herauszufinden. Es wurde eine proportionale Hazardregression nach Cox durchgeführt um die statistische Unabhängigkeit und Signifikanz zwischen den pathologischen, molekularbiologischen und klinischen Variablen zu testen. Hierfür wurden verschiedene Szenarien mit unterschiedlichen Zusammenstellungen der Parameter je nach ihrer Verfügbarkeit vor oder nach der Prostatektomie berechnet.

3. Ergebnisse

3.1 Technische Aspekte

Insgesamt waren 10.214 von 12.427 Tumoren in der immunhistochemischen Untersuchung auswertbar (82,2%). Ursachen für nicht auswertbare Patienten waren entweder das Fehlen von eindeutigen Tumorzellen im Gewebespot oder aber das völlige Fehlen von Gewebematerial an dem entsprechenden TMA-Spot.

3.2 Bcl-2-Expression und Tumorphänotyp

Eine Bcl-2-Expression war bei insgesamt 16,7% der Tumoren nachweisbar, wobei die Färbung in 13,3% schwach, in 2,4% mäßig stark und in 1,0% stark ausgeprägt war. Die Bcl-2-Expression war hochsignifikant mit einem ungünstigen Tumorphänotyp assoziiert. Die Häufigkeit einer mäßig- bis starken Bcl-2-Expression stieg von 2,8% bei pT2-Tumoren auf 6% bei pT3b-pT4-Tumoren an, bzw. von 2,2% bei Gleason 3+3-Karzinomen zu 11% bei Gleason \geq 4+4-Karzinomen (p jeweils $<0,0001$, Tabelle 5). Eine nachweisbare Bcl-2-Expression war auch mit dem Vorliegen von Lymphknotenmetastasen assoziiert. N0-Tumoren hatten in 3,5% eine mäßig- bis starke Bcl-2-Expression, während dieser

Tabelle 5: Bcl-2-Färbung und Tumorphänotyp in allen Tumoren

	analysierbar (n)	negativ (%)	schwach (%)	moderat (%)	stark (%)	p-Wert
alle Tumore n	10214	83.3	13.3	2.4	1.0	
Tumorstadium						<0.0001
pT2	6598	84.3	13.0	2.0	0.8	
pT3a	2290	83.2	12.8	2.7	1.3	
pT3b-pT4	1290	78.4	15.6	4.1	1.9	
Gleason Grad						<0.0001
\leq 3+3	2236	85.4	12.4	1.7	0.5	
3+4	5870	84.9	12.5	1.8	0.8	
4+3	1587	78.1	15.9	4.1	2.0	
\geq 4+4	474	71.1	17.9	8.0	3.0	
Lymphknoten-Metastasen						0.0119
N0	5803	82.3	14.3	2.4	1.1	
N+	603	77.6	16.4	4.1	1.8	
Präoperativer PSA-Wert (ng/ml)						0.2037
<4	1233	82.3	14.1	3.0	0.6	
4-10	6143	83.9	13.0	2.1	1.1	
10-20	2033	82.7	13.6	2.6	1.1	
>20	702	81.6	13.8	3.4	1.1	
Resektionsrand						0.2134
negativ	8104	83.5	13.2	2.4	0.9	
positiv	1919	82.5	13.5	2.5	1.5	

Wert auf 5,9% bei N+-Patienten stieg ($p=0.0119$). Repräsentative Bilder von Tumoren mit unterschiedlichem Gleason Grad und unterschiedlich stark ausgeprägter Bcl-2-Färbung sind in den Abbildungen 6-7 dargestellt. Normales Prostataepithel war bei den gewählten immunhistochemischen Bedingungen abgesehen von einer Positivität in den Basalzellen normalerweise Bcl-2-negativ. Ein entsprechendes Beispiel ist in Abbildung 8 dargestellt.

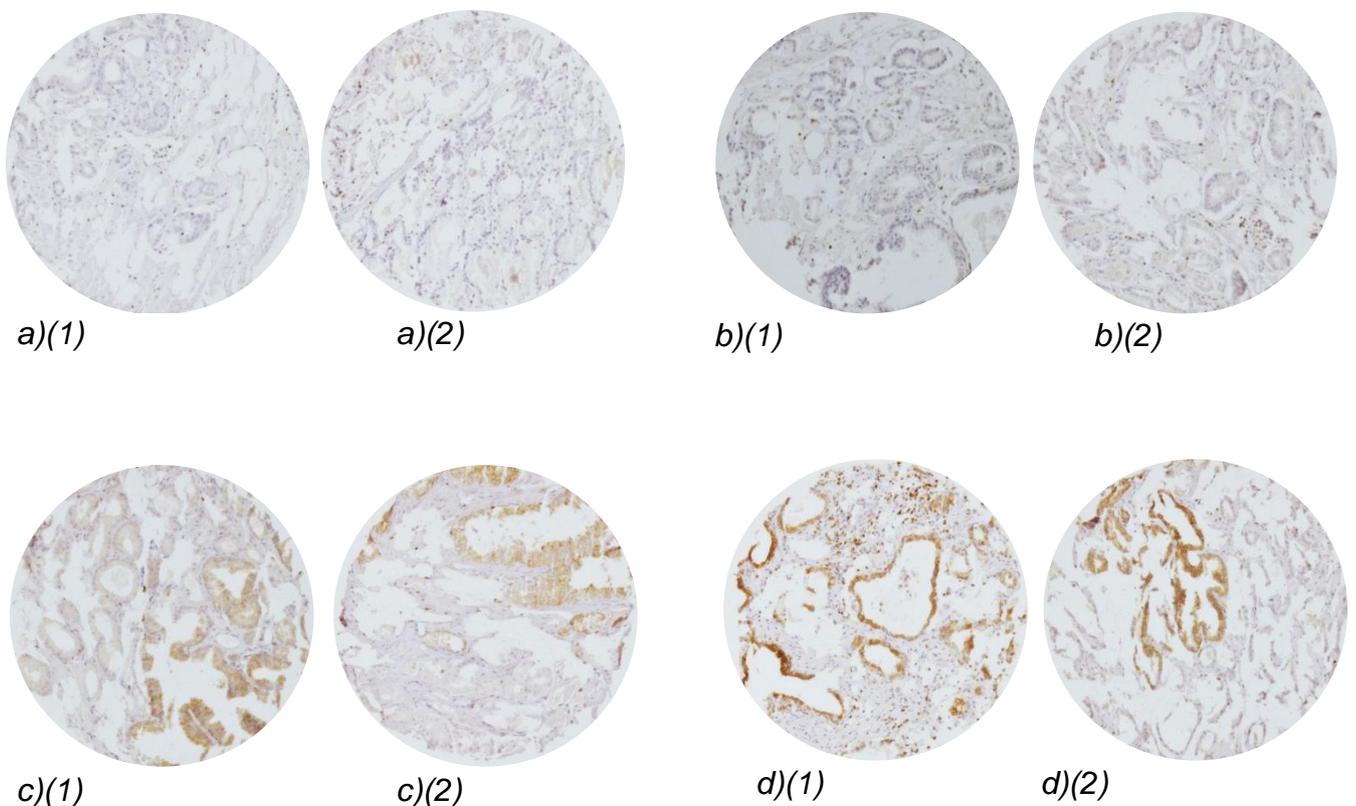


Abbildung 6: immunhistochemische Färbung mit Bcl-2 an Tumoren mit niedrigem Gleason Grad und a) negativem, b) schwachem, c) mäßig-starkem und d) starkem Färbeergebnis

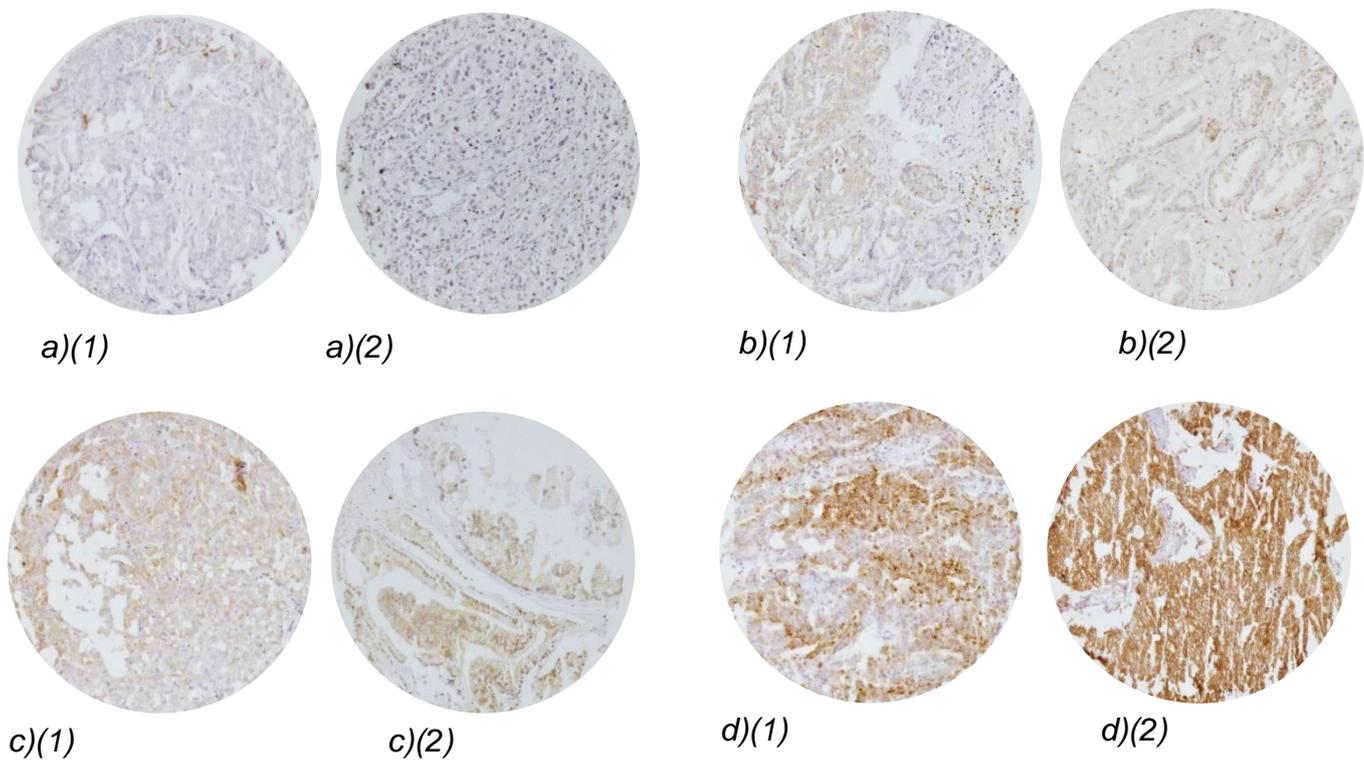


Abbildung 7: immunhistochemische Färbung mit Bcl-2 an Tumoren mit hohem Gleason Grad und a) negativem, b) schwachem, c) mäßig-starkem und d) starkem Färbeergebnis



Abbildung 8: Immunhistochemische Bcl-2-Färbung an normalem Prostatagewebe

3.3 Bcl-2-Expression und Prognose

Die prognostische Bedeutung der klassischen etablierten Prognosemarker pT, pN, klassischer Gleason Grad und quantitativer Gleason sind in den Abbildungen 9a) - d) dargestellt. Auch der Nachweis einer Bcl-2-Expression war mit ungünstiger Prognose assoziiert. Patienten mit mäßiggradiger bis starker Bcl-2-Expression zeigten eine deutlich ungünstigere Prognose als Patienten mit negativem Befund bzw. schwacher Anfärbung (Abbildung 9e, $p < 0.0001$).

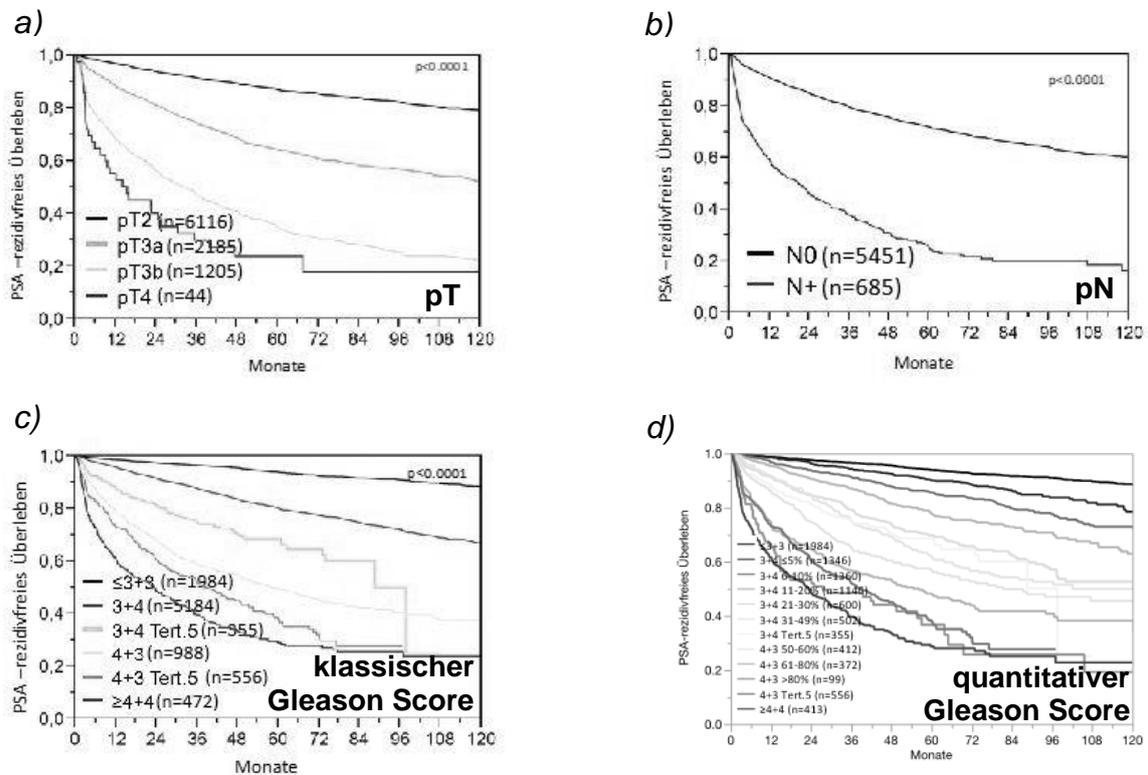


Abbildung 9a: Prognostische Bedeutung von a) pT, b) pN, c) klassischem Gleason Score und d) quantitativen Gleason Grad

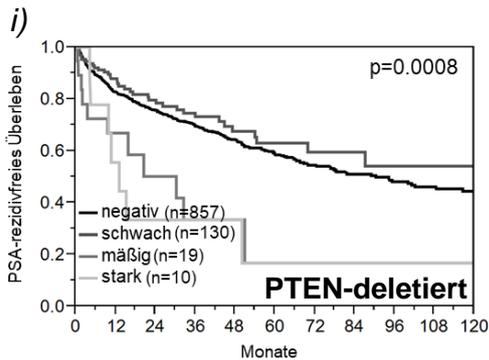
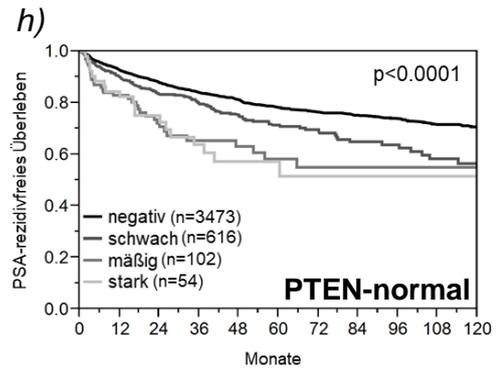
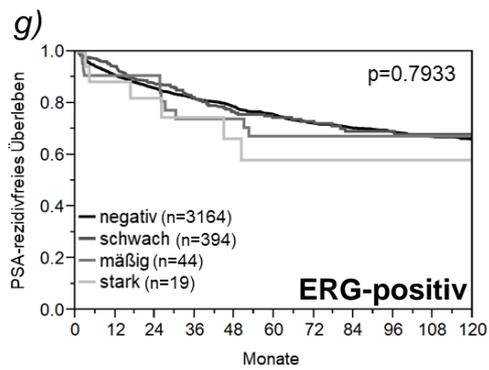
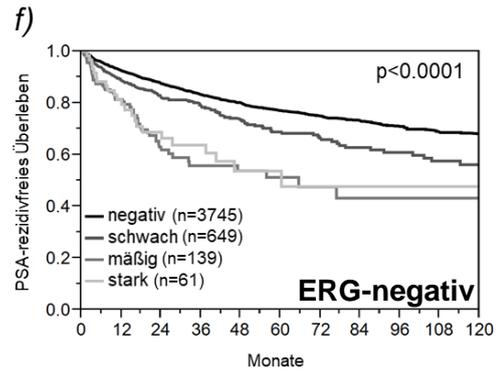
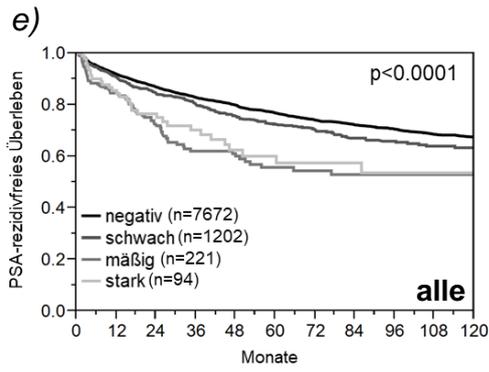


Abbildung 9b: Prognostische Bedeutung der Bcl-2-Expression in e) allen Tumoren, f) ERG-negativen Tumoren, g) ERG-positiven Tumoren, h) PTEN-normalen Tumoren und i) PTEN-deletierten Tumoren

3.4 Bcl-2-Expression und ERG-Status

Die Expression von Bcl-2 war bei ERG-negativen Tumoren häufiger nachweisbar und intensiver als in ERG-positiven Tumoren. Dies galt bei Vergleich der Bcl-2-Expression mit den immunhistochemischen ERG-Daten wie auch mit den ERG-FISH-Daten (Abbildung 10, $p < 0.0001$ jeweils). Angesichts der starken Unterschiede der Bcl-2-Expression zwischen ERG-negativen und ERG-positiven Tumoren wurden Beziehungen zwischen Bcl-2-Expression und dem Tumorphänotyp und der Patientenprognose in den Untergruppen der ERG-positiven und der ERG-negativen Tumoren separat berechnet. Diese Untersuchung ergab, dass die Beziehung zwischen der Bcl-2-Expression und einem hohen Gleason Grad bzw. einem hohen Tumorstadium und einem positiven Nodalstatus ganz überwiegend für die Gruppe der ERG-negativen Tumoren gefunden werden konnten (Tabelle 6). Währenddessen erreichten diese Unterschiede in der Gruppe der ERG-positiven Tumoren keine statistische Signifikanz mehr (Tabelle 7). Dementsprechend war auch das Ergebnis bei der Untersuchung zur Patientenprognose. In der Gruppe der ERG-negativen Tumoren verlief die Erkrankung bei Tumoren mit mäßig-starker bis starker Bcl-2-Positivität hoch signifikant ungünstiger als bei Tumoren mit geringer oder schwacher Bcl-2-Positivität (Abbildung 9f), $p < 0,0001$), während sich in der Gruppe der ERG-positiven Karzinome kein signifikanter Unterschied in der Prognose zwischen Tumoren mit unterschiedlicher Bcl-2-Expression fand (Abbildung 9g), $p = 0,793$).

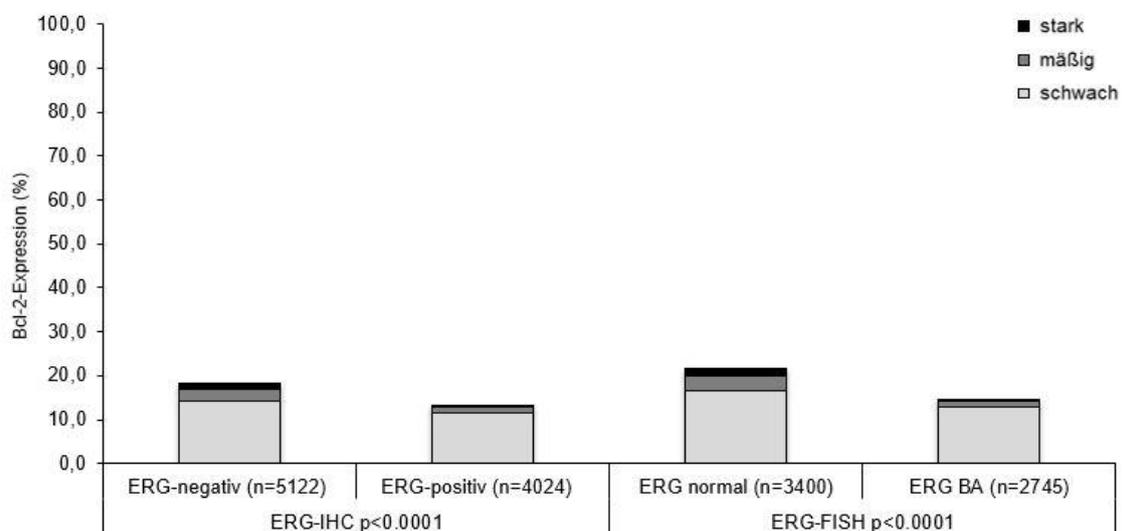


Abbildung 10: Bcl-2-Färbung und ERG-Status (IHC/FISH) in allen Tumoren

Tabelle 6: Bcl-2-Färbung und Tumorphänotyp in ERG-negativen Tumoren

	analysierbar (n)	negativ (%)	schwach (%)	moderat (%)	stark (%)	p-Wert
alle Tumore n	5122	81.7	14.1	2.9	1.3	
Tumorstadium	<0.0001					
pT2	3440	84.0	13.2	2.0	0.8	
pT3a	1040	79.3	14.2	4.0	2.4	
pT3b-pT4	628	73.1	18.8	5.9	2.2	
Gleason Grad	<0.0001					
≤3+3	1041	86.6	12.0	1.2	0.3	
3+4	2934	83.6	13.4	2.1	0.9	
4+3	850	74.5	17.2	5.4	2.9	
≥4+4	278	65.5	19.4	10.8	4.3	
Lymphknoten-Metastasen	0.0045					
N0	2995	80.1	15.2	3.2	1.5	
N+	286	73.1	17.1	6.6	3.1	
Präoperativer PSA-Wert (ng/ml)	0.0609					
<4	528	79.7	16.5	3.6	0.2	
4-10	3052	82.0	13.8	2.7	1.4	
10-20	1107	82.3	13.6	2.7	1.4	
>20	393	79.1	14.8	4.6	1.5	
Resektionsrand	0.0012					
negativ	4085	82.3	14.0	2.7	1.1	
positiv	948	78.7	14.9	3.9	2.5	

Tabelle 7: Bcl-2-Färbung und Tumorphänotyp in ERG-positiven Tumoren

	analysierbar (n)	negativ (%)	schwach (%)	moderat (%)	stark (%)	p-Wert
alle Tumore n	4024	86.8	11.4	1.3	0.5	
Tumorstadium	0.3318					
pT2	2389	86.5	11.7	1.3	0.5	
pT3a	1070	87.8	10.8	1.1	0.3	
pT3b-pT4	550	86.0	11.3	1.5	1.3	
Gleason Grad	0.5574					
≤3+3	831	86.6	11.4	1.3	0.6	
3+4	2395	87.6	10.9	1.2	0.4	
4+3	625	84.6	13.1	1.3	1.0	
≥4+4	152	84.2	12.5	2.6	0.7	
Lymphknoten-Metastasen	0.6792					
N0	2309	86.1	12.5	1.0	0.4	
N+	265	83.8	14.0	1.5	0.8	
Präoperativer PSA-Wert (ng/ml)	0.7978					
<4	549	86.9	10.7	1.8	0.5	
4-10	2448	87.1	11.4	1.1	0.4	
10-20	731	85.1	12.7	1.5	0.7	
>20	249	88.0	9.6	1.6	0.8	
Resektionsrand	0.3922					
negativ	3149	86.4	11.7	1.4	0.5	
positiv	797	88.6	9.9	1.0	0.5	

3.5 Bcl-2-Expression und chromosomale Deletionen

Chromosomale Deletionen gehören neben der TMPRSS2:ERG-Fusion zu den häufigsten genomischen Veränderungen beim Prostatakarzinom. Die meisten Deletionen sind dabei eng mit dem ERG-Status assoziiert. Dies gilt auch für die in diesem Projekt untersuchten Deletionen. Deletionen von 3p13 und PTEN sind gehäuft bei ERG-positiven Tumoren nachweisbar (Krohn et al. 2013, Fallahabadi et al. 2016), während Deletionen von 6q15 und 5q21 vor allem bei ERG-negativen Tumoren vorkommen (Kluth et al. 2016, Kluth et al. 2019). Deswegen ist bei Parametern, welche wie Bcl-2 auch mit dem ERG-Status assoziiert sind, die Untersuchung der Beziehung zwischen dem interessierenden Protein (aktuell Bcl-2) und dem Deletionsstatus bei gleichzeitiger Betrachtung aller Tumoren durch diese Wechselwirkung verzerrt (Abbildung 11a)). Die separate Untersuchung der ERG-positiven und der ERG-negativen Tumoren erlaubt es allerdings die Beziehung zwischen Bcl-2 und den genannten Deletionen unabhängig vom Einfluss des ERG-Status zu untersuchen. Die diesbezüglichen Befunde zeigen für die ERG-negativen Tumoren eine deutliche Tendenz zu einer ausgeprägteren Bcl-2-Expression in den deletierten Tumoren als in den nicht-deletierten Tumoren (Abbildung 11b)). In den ERG-positiven Tumoren finden sich keine eindeutigen statistischen Zusammenhänge, lediglich eine Tendenz zu einer etwas höheren Bcl-2-Expression in 6q15-deletierten und einer etwas geringeren Bcl-2-Expression in PTEN-normalen Tumoren (Abbildung 11c)). Es ist allerdings zu erwähnen, dass diese Unterschiede ausschließlich durch Unterschiede bei den schwach positiven Tumoren entstehen, während keine relevanten Unterschiede in der Häufigkeit der (klinisch eher relevanten) starken Bcl-2-Positivität zu finden sind.

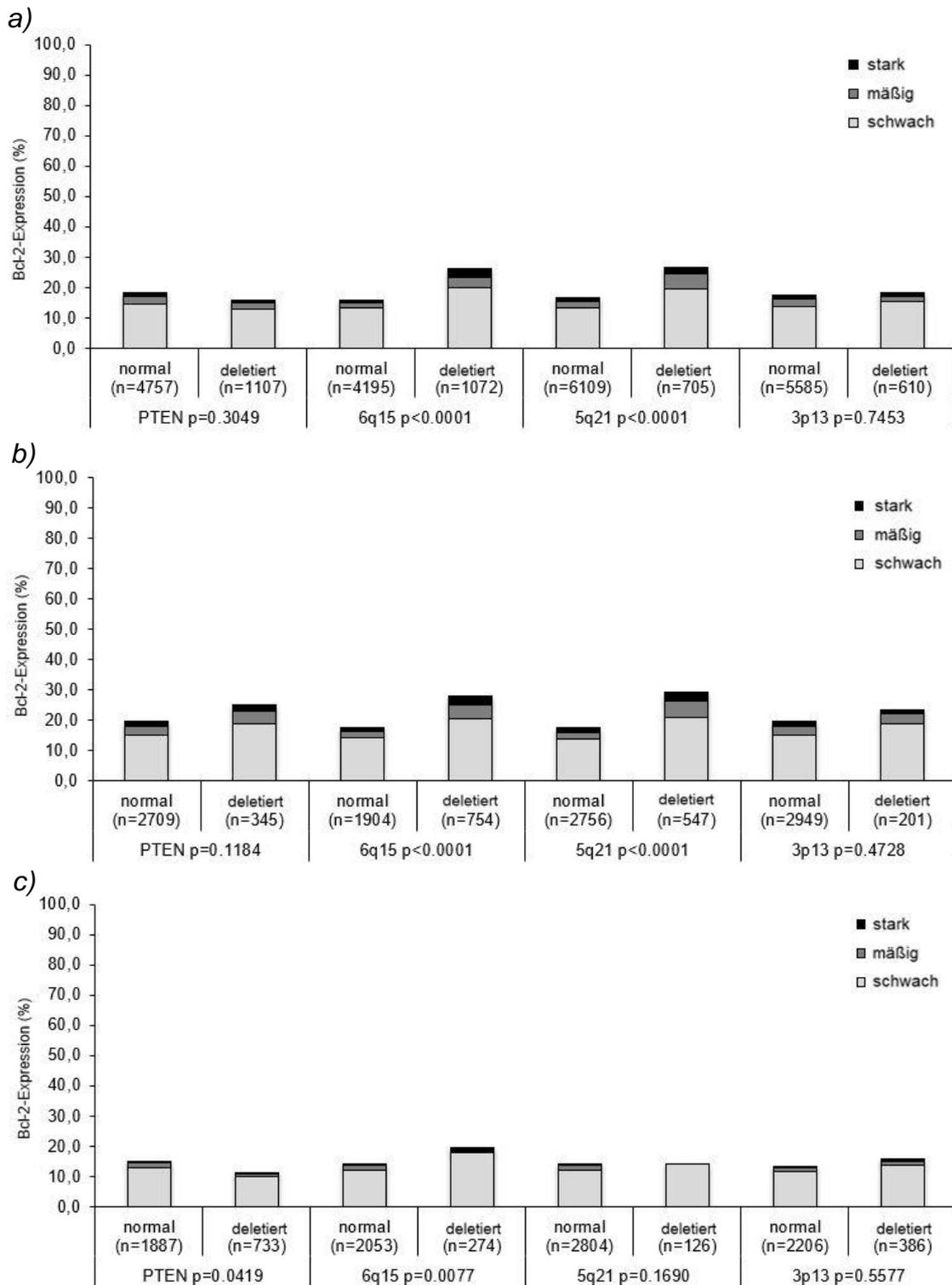


Abbildung 11: Bcl-2-Färbung und 10q23(PTEN)-, 5q21(CHD1)-, 6q15(MAP3K7)-, 3p13(FOXP1)-Deletionen in a) allen Tumoren, b) ERG-negativen Tumoren und c) ERG-positiven Tumoren

3.6 Multivariate Analysen

Zur Klärung der Frage, ob die Bcl-2-Expression neben den klassischen klinischen und pathologischen Parametern unabhängige Prognoserelevanz zukommt, wurden multivariate Untersuchungen durchgeführt. Dabei kamen verschiedene Szenarien zum Einsatz. Szenario 1 beinhaltet sämtliche postoperativ zur Verfügung stehenden prognostischen Parameter einschließlich präoperatives PSA, pT-Stadium, Gleason Grad, pN-Status und R-Status. Da bei vielen Prostatektomien die Lymphknoten nicht mitentfernt werden, wurde in Szenario 2 berechnet, ob der Bcl-2-Expression bei Verwendung der Parameter pT, Gleason Grad, präoperatives PSA und R-Status unabhängige prognostische Bedeutung zukommt. Da die meisten dieser Parameter (pT, pN, R-Status) nur postoperativ zur Verfügung stehen, also zu einem Zeitpunkt, wo die relevanten therapeutischen Entscheidungen bereits gefallen sind, wurde weiterhin berechnet, ob der Bcl-2-Expression dann unabhängige prognostische Bedeutung zukommt, wenn nur Parameter verwendet werden, die präoperativ erhältlich sind. Eine Schwäche dieses letzteren Verfahrens ist, dass zwar das klinische Stadium und das präoperative PSA für unsere Untersuchung zur Verfügung stand, aber bezüglich des Gleason Grades suboptimale Untersuchungsbedingungen vorlagen. Es standen zwei unterschiedliche Gleason Scores für die multivariate Analyse zur Verfügung. Der Gleason Score der Prostatektomie hat den Nachteil, dass er bei der Betrachtung des gesamten Präparates genauer ist als es bei der Untersuchung von nur kleinen Tumorausschnitten einer Biopsie erwartet werden kann. Der Gleason Score der Prostatektomie ist also „besser“ als der unter optimalen Bedingungen erreichbare Gleason Score an der Biopsie. Der verfügbare präoperative Gleason Score aus der Biopsie stammt allerdings von externen Pathologien. Angesichts der Erfahrung von 40% Interobserver-Variabilität in der Gleason-Gradierung und der inhomogenen Erfahrung von Pathologen, welche in kleineren Institutionen tätig sind, muss davon ausgegangen werden, dass der Gleason Score in den externen Biopsien weniger genau bestimmt worden ist als er beispielsweise am UKE bestimmt worden wäre. Szenario 3 verwendet als Modell für die präoperative Risikoabschätzung neben dem Bcl-2-Status das präoperative PSA, das klinische T-Stadium und den (zu guten) Gleason Score vom Prostatektomiepräparat. Szenario 4 verwendet neben den klassischen präoperativen Parametern klinisches T-Stadium und Serum-

PSA den (zu schlechten) Gleason Score der ursprünglichen Prostatabiopsie. Die Ergebnisse der multivariaten Analyse sind in Tabelle 8 dargestellt. Die Befunde identifizieren den Bcl-2-Status als unabhängigen Prognosefaktor bei ERG-negativen, aber nicht bei ERG-positiven Tumoren. Die prognostische Bedeutung des Bcl-2-Status ist so stark, dass die Bcl-2-Expression bei ERG-Status-unabhängiger Betrachtung des Gesamtkollektivs in den meisten Szenarien immer noch ein unabhängiger Prognoseparameter bleibt oder die Signifikanzschwelle nur knapp verfehlt.

Tabelle 8: Multivariate Analysen einschließlich Bcl-2 in a) allen Tumoren, b) ERG-negativen und c) ERG-positiven Tumoren

a)

Szenario	n auswertbar	p-Wert							
		präoperat. PSA-Wert	pT-Stadium	cT-Stadium	Gleason Score Prostat- ektomie	Gleason Score Biopsie	N-Stadium	R-Status	Bcl-2- Expression
1	5056	<0.0001	<0.0001	-	<0.0001	-	<0.0001	0.0089	0.0150
2	8085	<0.0001	<0.0001	-	<0.0001	-	<0.0001	<0.0001	0.0779
3	7986	<0.0001	-	<0.0001	<0.0001	-	<0.0001	-	0.0948
4	7884	<0.0001	-	<0.0001	-	<0.0001	<0.0001	-	<0.0001

b)

Szenario	n auswertbar	p-Wert							
		präoperat. PSA-Wert	pT-Stadium	cT-Stadium	Gleason Score Prostat- ektomie	Gleason Score Biopsie	N-Stadium	R-Status	Bcl-2- Expression
1	2574	<0.0001	<0.0001	-	<0.0001	-	0.0002	0.4308	0.0003
2	4019	<0.0001	<0.0001	-	<0.0001	-	-	0.0244	0.0004
3	3987	<0.0001	-	<0.0001	<0.0001	-	-	-	0.0005
4	3933	<0.0001	-	<0.0001	-	<0.0001	<0.0001	-	<0.0001

Szenario	n auswertbar	p-Wert							
		präoperat. PSA-Wert	pT-Stadium	cT-Stadium	Gleason Score Prostat- ektomie	Gleason Score Biopsie	N-Stadium	R-Status	Bcl-2- Expression
1	2037	0.0043	<0.0001	-	<0.0001	-	0.0224	0.0144	0.4682
2	3199	<0.0001	<0.0001	-	<0.0001	-	-	<0.0001	0.8185
3	3138	<0.0001	-	<0.0001	<0.0001	-	-	-	0.5529
4	3100	<0.0001	-	<0.0001	-	<0.0001	<0.0001	-	0.8870

3.7 Bcl-2-Expression und Ki67-Labeling-Index

Die Beziehung zwischen dem Ki67-Labeling-Index und der Bcl-2-Expression ist in Tabelle 9 dargestellt. Dabei zeigt sich, dass der Ki67-Labeling-Index insbesondere bei Betrachtung aller Tumoren mit der Bcl-2-Expression im Zusammenhang steht. Bei Betrachtung aller Tumoren beträgt der mittlere Ki67-Labeling-Index bei Bcl-2-negativen Tumoren 2,67, bei stark positiven aber immerhin 4,08 ($p < 0.0001$). Bei isolierter Betrachtung von Untergruppen mit

Tabelle 9: Bcl-2-Expression und Ki67-Labeling-Index

Ki67	Bcl-2 IHC	n=	Ki67 Li (Mittelwert)	Std.- Abweichung
alle Tumore $p < 0.0001$	negativ	5314	2.67877	0.03741
	schwach	715	3.34779	0.10197
	mäßig	117	3.41026	0.25209
	stark	59	4.08475	0.35499
pGleason $\leq 3+3$ $p = 0.0533$	negativ	1160	2.08707	0.06100
	schwach	133	2.60902	0.18010
	mäßig	10	2.10000	0.65700
	stark	3	1.66667	1.19940
pGleason 3+4 $p = 0.0001$	negativ	3023	2.56530	0.04303
	schwach	386	3.25043	0.12041
	mäßig	44	2.70455	0.35665
	stark	20	3.70000	0.52900
pGleason 3+4 Tert5 $p = 0.0423$	negativ	209	3.14354	0.17860
	schwach	34	3.97059	0.44290
	mäßig	4	1.25000	1.29130
	stark	4	1.00000	1.29130
pGleason 4+3 $p = 0.0714$	negativ	488	3.21944	0.15053
	schwach	71	4.19718	0.39465
	mäßig	23	2.95652	0.69339
	stark	17	4.29412	0.80652
pGleason 4+3 Tert5 $p = 0.0398$	negativ	251	3.79283	0.23860
	schwach	44	3.68182	0.56980
	mäßig	16	6.56250	0.94500
	stark	6	3.33333	1.54310
pGleason $\geq 4+4$ $p = 0.3400$	negativ	178	4.84831	0.36780
	schwach	47	4.19149	0.71580
	mäßig	20	4.05000	1.09730
	stark	9	7.22222	1.63580

gleicher Gleason Kategorie finden sich aber nur noch geringe Unterschiede bei Gleason 3+3, Gleason 3+4 und Gleason 4+3 Karzinomen, welche jeweils nur knapp die statistische Signifikanz erreichen oder diese verfehlen. Lediglich bei Gleason 3+4 Karzinomen besteht eine eindeutige klinische Signifikanz ($p < 0.0001$).

4 Diskussion

In unserer Studie fanden wir eine Bcl-2-Positivität in 16,7% der Prostatakarzinome. Im Vergleich zu früheren Studien (Tabelle 10) liegt diese Zahl im unteren Bereich. Die Diskrepanz zwischen unserer Studie und den bereits früher publizierten Studien ist mit hoher Wahrscheinlichkeit inhärenten Problemen der immunhistochemischen Untersuchung von Proteinen geschuldet. Die publizierten Studien verwendeten unterschiedliche Antikörper, unterschiedliche Färbeprotokolle und unterschiedliche Kriterien für die Beurteilung der Färbungen. Dementsprechend erstaunt es nicht, dass die Rate positiver Fälle in der Literatur zwischen 5 und knapp 70% schwankt (Fleischmann et al. 2012, Khor et al. 2007, Abaza et al. 2006, Rubio et al. 2005, Amirghofran et al. 2005, Fonseca et al. 2004, Kaur et al. 2004, Pollack et al. 2003, Zellweger et al. 2003, Karaburun Paker et al. 2001, Matsushima et al. 1996, Matsushima et al. 1997, Lipponen et al. 1997, Apakama et al. 1996, Bubendorf et al. 1996). Ob unsere Färbung „besser“ oder „schlechter“ ist als Untersuchungen anderer Autoren lässt sich nicht festlegen. Die immunhistochemische Untersuchung erlaubt nämlich grundsätzlich nicht die Unterscheidung von tatsächlich Bcl-2-positiven oder Bcl-2-negativen Tumoren, sondern erlaubt es nur die Expression nachzuweisen, die über einem bestimmten Schwellenwert liegt. Auch Bcl-2-„negative“ Tumoren dürften Bcl-2 exprimieren, allerdings in einem geringeren Ausmaß als die Bcl-2-„positiven“ Tumoren.

Unsere Daten zeigen, dass die Bcl-2-Expression beim Prostatakarzinom in fortgeschrittenen, besonders malignen Tumoren im Vergleich zu weniger aggressiven Tumoren im Durchschnitt erhöht ist. Zahlreiche frühere Untersuchungen haben prinzipiell das gleiche Ergebnis erzielt, darunter auch eine Untersuchung am UKE an einem Unterkollektiv unserer Tumoren von damals 3261 Karzinomen (Fleischmann et al. 2012). Einige andere Studien hatten keine prognostische Bedeutung der Bcl-2-Expression gefunden (Fonseca et al. 2004, Sulik et al. 2002). Möglicherweise waren bei diesen Studien die Patientenkollektive zu klein oder die gewählten methodischen Bedingungen für die Identifikation einer Prognoserelevanz ungünstig. Die meisten Studien, welche keine prognostische Bedeutung fanden, hatten höhere Positivitätsraten beschrieben als in unserer

Tabelle 10: Frühere Studien zur Bcl-2-Expression beim Prostatakarzinom

Titel	Autor	Jahr	Antikörper	Anzahl der Fälle	Häufigkeit der Bcl-2-Expression
Prognostic relevance of Bcl-2 overexpression in surgically treated prostate cancer is not caused by increased copy number or translocation of the gene.	Fleischmann A et al.	2012	Bcl-2 Oncoprotein (Dako M887, 1:250)	3261	137 (4,8%)
Bcl-2 and Bax expression predict prostate cancer outcome in men treated with androgen deprivation and radiotherapy on radiation therapy oncology group protocol 92-02.	Khor LY et al.	2007	Bcl-2 (clone 124, DAKO Corp)	502	229 (45,6%)
Prognostic value of DNA ploidy, bcl-2 and p53 in localized prostate adenocarcinoma incidentally discovered at transurethral prostatectomy.	Abaza R et al.	2006	bcl-2 (clone 124) (Cytomation, Dako)	44	17 (39%)
Immunohistochemical expression of Ki-67 antigen, cox-2 and Bax/Bcl-2 in prostate cancer; prognostic value in biopsies and radical prostatectomy specimens.	Rubio J et al.	2005	Bcl-2 monoclonal, DAKO	91	5 (5%)
Apoptosis in prostate cancer: bax correlation with stage.	Amirghofran Z et al	2005	bcl-2: mouse monoclonal antibody, clone 124, Dako, Glostrup, Denmark	50	21 (42%)
The role of HER2/neu, BCL2, p53 genes and proliferating cell nuclear protein as molecular prognostic parameters in localized prostate carcinoma.	Fonseca GN et al.	2004	BCL2 (124, Dako, Glostrup, Denmark)	150	35 (23%)
Survivin and Bcl-2 expression in prostatic adenocarcinomas.	Kaur P et al.	2004	prim. AK: monoclonal mouse anti-human Bcl-2 (clone Bcl-2/100/D5; Ventana); sek. AK: biotinylated goat anti-mouse immunoglobulins (Dako Corporation, Carpinteria, Calif)	138	95 (69%)
Molecular markers of outcome after radiotherapy in patients with prostate carcinoma: Ki-67, bcl-2, bax, and bcl-x.	Pollack A et al.	2003	bcl-2 (clone 124; item M0887; Dako Corporation)	77	12 (16%)
Tissue microarray analysis reveals prognostic significance of syndecan-1 expression in prostate cancer.	Zellweger T et al.	2003	Bcl-2 (124-BCL-2, DAKO)	493	68 (13,7%)
Relationship between apoptosis regulator proteins (bcl-2 and p53) and Gleason score in prostate cancer.	Karaburun Paker S et al.	2001	mouse monoclonal anti-bcl-2 antibody (clone 124, Dako)	32	3 (9,32%)
Combined analysis with Bcl-2 and P53 immunostaining predicts poorer prognosis in prostatic carcinoma.	Matsushima H et al.	1997	mouse monoclonal anti-bcl-2 antibody (clone 124, Dako, Glostrup, Denmark)	146	29 (20%)
Expression of the apoptosis suppressing protein bcl-2 in prostatic adenocarcinoma is related to tumor malignancy.	Lipponen P et al.	1997	monoclonal anti-bcl-2 protein (Dako, Glostrup, Denmark)	235	68 (29%)
bcl-2 overexpression combined with p53 protein accumulation correlates with hormone-refractory prostate cancer.	Apakama I et al.	1996	anti-bcl-2 (Dako, UK Ltd)	77	37 (48%)
Prognostic significance of Bcl-2 in clinically localized prostate cancer.	Bubendorf L et al.	1996	mouse monoclonal antibody Bcl-2 124 (1:400; Dako, Glostrup, Denmark)	137	33 (24%)
bcl-2 [corrected] Expression on prostate cancer and its relationship to cell cycle and prognosis.	Matsushima H et al.	1996	anti-bcl-2 antibody (DAKO bcl-2,124; Dako, Glostrup, Denmark)	37	14 (38%)

Studie. Die ausgesprochen große prognostische Bedeutung und die Unabhängigkeit von etablierten nur postoperativ verfügbaren Prognoseparametern spricht dafür, dass die von uns gewählten diagnostischen Bedingungen für die Bcl-2-Messung gut zur Prognoseabschätzung geeignet sind. Dass eine vermehrte Expression beim Prostatakarzinom prognoserelevant ist passt gut zu der bekannten Funktion von Bcl-2 als Apoptosehemmer.

Bei zahlreichen anderen Tumorarten hat sich die Expression von Bcl-2 als Indikator für einen aggressiven, prognostisch ungünstigen klinischen Verlauf erwiesen. Dies ist insbesondere bei B-Zell-Lymphomen (Perry et al. 2014, Lu et al. 2015) oder bei Neuroblastomen (Gallo et al. 2003) der Fall. Erwähnenswert ist, dass es aber bei vielen Tumorarten, wie bei Mammakarzinomen (Seong et al. 2015, Ermiah et al. 2013), nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen (Schmidt et al. 2014, Renouf et al. 2009), kolorektalen Karzinomen (Huang et al. 2017, Poincloux et al. 2009) und Pankreaskarzinomen (Hu et al. 1999, Sun et al. 2002), auch Publikationen gibt, welche über einen günstigen prognostischen Effekt der Bcl-2-Expression berichten. Bei multiplen Tumorarten, z.B. Melanomen (Ilmonen et al. 2005, Divito et al. 2004) oder Nierenzellkarzinomen (Gobé et al. 2002, Itoi et al. 2004), gibt es Studien, welche über einen günstigen prognostischen Effekt berichten, während andere Studien beim gleichen Tumor für einen ungünstigen Effekt der Bcl-2-Expression sprechen. Die Ursachen für diese diskrepanten Ergebnisse könnten entweder in zu kleinen Patientenkollektiven mit großem Einfluss der Patientenselektion sprechen oder aber auch für unterschiedliche Effekte unterschiedlicher Immunhistochemieprotokolle. Es wäre möglich, dass unterschiedliche Bcl-2-Expressionsspiegel, welche mit unterschiedlichen Protokollen erfasst werden können einen unterschiedlichen biologischen Einfluss auf Tumorzellen ausüben.

Es ist eine Besonderheit der aktuell vorliegenden Studie, dass die Bcl-2-Expression beim Prostatakarzinom nicht nur mit klassischen klinisch-pathologischen Parametern verglichen werden konnte, sondern auch mit den relevanten molekularen Prostatakarzinomsubtypen. Die TMPRSS2:ERG-Fusion ist die häufigste genomische Veränderung bei Prostatakarzinomen, welche in ca. 50% dieser Tumoren auftritt. Die TMPRSS2:ERG-Fusion wird in ihrer Entstehung durch einen aktiven Androgenrezeptorsignalweg begünstigt. Dies dürfte die Ursache dafür sein, dass bei jüngeren Männern mit tendenziell höherem

Testosteronspiegel häufiger ERG-positive Karzinome auftreten als bei älteren Männern (Weischenfeldt et al. 2013). Die TMPRSS2:ERG-Fusion wurde 2005 von Tomlins et al. erstmals beschrieben. Initial kam es zu einigen Publikationen, welche eine teils substantielle prognostische Bedeutung der ERG-Fusion vermuteten (Brase et al. 2011, Leinonen et al. 2010, Beuzeboc et al. 2009, Hermans et al. 2009, Rostad et al. 2009, Mackinnon et al. 2009, Saramäki et al. 2008, Yoshimoto et al. 2008). Diese Untersuchungen waren alle an Patientenkollektiven von weniger als 200 Fällen durchgeführt worden. Die an einem Unterkollektiv der jetzigen Patientenkohorte durchgeführte Studie von Minner hatte allerdings gezeigt, dass sich ERG-positive und ERG-negative Tumoren in ihrer Prognose in keiner Weise unterscheiden (Minner et al. 2011). Die Diskrepanz zwischen der an 2805 Karzinomen durchgeführten Studie von Minner et al. (2011) und den multiplen Studien mit weniger als 200 Fällen, welche auf eine Prognoserelevanz der ERG-Fusion hindeuteten, macht auch deutlich, wie wichtig eine hohe Patientenzahl für die Evaluation von Prognosemarkern darstellt. Eine Untersuchung an beinahe 10.000 Fällen schließt das Risiko eines Sampling Errors nahezu vollständig aus. Der Vergleich von Bcl-2-Expression in ERG-positiven und ERG-negativen Tumoren ergab – mit zwei unterschiedlichen Methoden durchgeführt – eine deutlich höhere Bcl-2-Expression in ERG-negativen als in ERG-positiven Tumoren. Dieser Befund ist mit Sicherheit biologisch relevant. Einerseits spricht das Erzielen identischer Befunde unter Verwendung zweier verschiedener Methoden dafür, dass diese Beziehung real existiert. Zum anderen spricht die Tatsache, dass ERG-negative Tumoren gehäuft Bcl-2-positiv sind dafür, dass die Beziehung nicht durch ein immunhistochemisches Färbeartefakt bedingt werden kann. Ein Problem der Immunhistochemie ist es nämlich, dass ca. 10% der Gewebe nur eine eingeschränkte Reaktivität mit Antikörpern aufweisen, weil die Gewebe eine Immunhistochemie-„ungünstige“ Vorbehandlung erlitten haben, beispielsweise durch entweder zu lange oder zu kurze Formalinfixation oder eine zu lange Ischämiezeit nach bzw. während der Entnahme des Gewebes aus dem Patienten. Der genaue Mechanismus, warum ERG-negative Karzinome häufiger Bcl-2 exprimieren als ERG-positive ist nicht bekannt. Allerdings führt die ERG-Aktivierung in Prostataepithelzellen zur Dysregulierung von mehr als 1500 verschiedenen Genen. Es darf angenommen werden, dass eine oder mehrere

dieser dysregulierten Gene einen direkten oder indirekten Einfluss auf die Expression von Bcl-2 ausüben.

Die Bcl-2-Expression war in unserer Studie signifikant mit der Tumorzellproliferation assoziiert. Der Antikörper Ki67 markiert ein Protein, welches von Zellen exprimiert wird, welche in der G₁-, S- oder G₂/M-Phase des Zellzyklus stehen (Scholzen, Gerdes 2000). Die Anzahl der Ki67-positiven Zellen stellen so ein Maß für die Proliferationsaktivität eines Gewebes dar. Der Ki67-Labeling-Index entspricht dem prozentualen Anteil der Zellen in der G₁-, S- oder G₂/M-Phase. Dass Bcl-2 und der Ki67-Labeling-Index miteinander assoziiert sind erstaunt prinzipiell nicht, da beide Parameter mit der Tumorprogression in Zusammenhang stehen. Unter Berücksichtigung dieser Tatsache ist die Beziehung zwischen den beiden Parametern sogar recht marginal und in Gleason 3+3, Gleason 4+3 und Gleason \geq 4+4 wird das Signifikanzlevel von $p \leq 0.05$ nur knapp erreicht oder gar verfehlt. Insgesamt sind diese Befunde gut vereinbar mit der bekannten Funktion von Bcl-2, welche explizit nicht die Proliferation, sondern das Tumorwachstum über die Behinderung des Zellabbaus (Apoptose) beeinflusst (Rassow et al. 2012, Czabotar et al. 2014). Es ist nicht erstaunlich, dass die größten signifikanten Unterschiede in der Untergruppe der Gleason 3+4 Karzinome bestehen. Es ist bekannt, dass diese Untergruppe, bei denen der Gleason-4-Anteil zwischen 5 und 45% liegen kann, die größte klinische Heterogenität zeigt. Patienten mit einem Gleason 3+4 mit 5% Gleason-4-Anteil haben eine Prognose zu erwarten, die einem Gleason 3+3 Karzinom sehr ähnlich ist, währenddem Patienten mit 45% Gleason-4-Anteil eine deutlich ungünstigere Prognose entgegensehen (Sauter et al. 2016).

Neben TMPRSS2:ERG-Fusionen sind chromosomale Deletionen die nächst häufigen genomischen Veränderungen beim Prostatakarzinom. Die meisten chromosomalen Deletionen sind prognoserelevant, wobei nicht ganz klar ist, was die biologische Grundlage hierfür darstellt. Früher wurde angenommen, dass eine Deletion zur Inaktivierung von jeweils einem Tumorsuppressorgen pro Deletion führt, wobei ein Allel des Tumorsuppressorgens durch die Deletion, das andere Allel durch eine andere Veränderung, meist eine Mutation, erfolgt (Levine 1993). Heute weiß man, dass diese Annahmen nicht exakt zutreffen. Gerade für

PTEN kann postuliert werden, dass die 10q-Deletion, welche meistens sehr klein ist und nur PTEN und einige wenige andere Gene umfasst, eine PTEN-spezifische Aberration darstellt, auch wenn das zweite Allel meistens gar nicht inaktiviert ist (Majumder und Sellers 2005). Auch auf 3p13 ist die Deletion meistens eher klein und enthält nur wenige Gene, von denen allerdings mindestens drei (FOXP1, RYBP und SHQ1) bis heute als mögliche Tumorsuppressorgene beim Prostatakarzinom diskutiert werden (Krohn et al. 2013). Völlig unklar ist aber die Situation für die Deletionen von 6q und 5q. Diese sind sehr groß und enthalten zahlreiche potentielle Tumorsuppressorgene, welche alle so gut wie nie durch eine zweite Läsion nachweisbar alteriert sind. Große Studien haben unter Verwendung von Next-Generation-Sequenzierung gezeigt, dass es in diesen Regionen keine rekurrenten Mutationen von potentiellen Tumorsuppressorgenen gibt (Kluth et al. 2013, Burkhardt et al. 2013). Es wird deswegen heute vermutet, dass die großen Deletionen ihren biologischen Effekt nicht durch die Inaktivierung eines spezifischen Gens entfalten, sondern durch die gleichzeitig verminderte Expression von mehreren Genen (sog. Haploinsuffizienz) (Chaib et al. 2003). Der Vergleich von interessierenden Proteinen mit den wichtigen chromosomalen Deletionen ist von potentiell Interesse, da durch eine isolierte Beziehung zu einer Deletion möglicherweise ein funktioneller Zusammenhang mit einem Gen im Bereich der Deletion identifiziert werden kann. Im Falle von Bcl-2 zeigen die Befunde, dass die Bcl-2-Expression generell mit einem vermehrten Vorkommen von Deletionen assoziiert ist. Dies ist vor allem in ERG-negativen Tumoren für sämtliche untersuchten Deletionen sichtbar. Dieser Effekt passt zu einer vermehrten genetischen Instabilität bei Bcl-2-positiven Tumoren. Dies passt wiederum gut zur bekannten Rolle von Bcl-2 als Apoptoseinhibitor. Kritische genomische Aberrationen führen normalerweise in „gesunden“ Zellen zum Zellsuizid durch Apoptose (Krammer 2000). Ist dieser Mechanismus gestört, kann es leichter zu einer Akkumulation von genomischen Veränderungen in Zellen kommen.

Der hervorstechende Befund dieser Studie ist die prognostische Bedeutung der Bcl-2-Überexpression, welche von etablierten Prognosemarkern unabhängig ist. Frühe Studien der Hamburger Arbeitsgruppe vom UKE haben einige andere Proteine identifiziert, welche eine ähnlich starke Prognoserelevanz wie Bcl-2

aufweisen, beispielsweise Tubulin-βIII, Rbm3 oder p53 (Tsourlakis et al. 2014, Grupp et al. 2014, Kluth et al. 2014). Für die Zukunft ist zu erwarten, dass die kombinierte Anwendung von molekularen Prognosefaktoren in einem immunhistochemischen Panel, beispielsweise durch Anwendung einer Mehr-Farben-Immunhistochemie durch Fluoreszenzfärbungen eine bessere Prognoseabschätzung erlauben wird als die aktuell etablierten Verfahren. Hierbei ist hervorzuheben, dass letztlich nicht nur bessere Prognosemarker als der Gleason Grad notwendig sind, sondern auch Parameter, welche reproduzierbarer sind. Die Tatsache, dass der Gleason Grad von unterschiedlichen Pathologen in bis zu 40% unterschiedlich interpretiert wird, macht diesen Parameter für die klinische Handhabung schwierig (Egevad et al. 2013, Schlomm und Sauter 2016). Für die Zukunft ist es erstrebenswert ein Verfahren zu etablieren, welches reproduzierbar ist, weitgehend unabhängig von der Gewebefixierung und eine möglichst automatisierte Bestimmung relevanter molekularer Prognoseparameter erlaubt. Bemerkenswert ist übrigens die Tatsache, dass der starke Prognoseparameter Bcl-2 nur für einen bestimmten molekularen Subtyp des Prostatakarzinoms klinische Relevanz besitzt. Dies ist zumindest beim Prostatakarzinom keine Ausnahme. In früheren Studien wurden mehrere Parameter identifiziert, welche nur bei ERG-positiven oder nur bei ERG-negativen Tumoren prognoserelevant waren. Einige Beispiele hierzu sind in Tabelle 11 dargestellt. Somit wäre es notwendig/wünschenswert separate

Tabelle 11: Übersicht zu Prognoseparametern in Verbindung mit dem ERG-Status

Protein	häufiger mit ERG-positiven Tumoren assoziiert	häufiger mit ERG-negativen Tumoren assoziiert	prognoserelevant bei ERG-positiven Tumoren	prognoserelevant bei ERG-negativen Tumoren	nicht prognoserelevant	Studie
NBS1	x		x			Grupp et al. 2014
YB-1	x		x			Heumann et al. 2017
P16	x		x			Burdelski et al. 2016
FOXP2	x			x		Stumm et al. 2013
SOX9		x	x			Burdelski et al. 2015
mTOR		x	x			Müller et al. 2013
CD147	x	x			x	Grupp et al. 2013
MTCO2	x			x		Grupp et al. 2013

Prognosepanels für molekulardefinierte Tumoruntergruppen zu definieren.

Zusammenfassend zeigen die Daten unserer Studie, dass die Bcl-2-Überexpression ein wichtiger Prognoseparameter bei Prostatakarzinomen ist, der allerdings nur bei ERG-negativen Karzinomen anwendbar ist. Für die Zukunft erwarten wir, dass Bcl-2 ein wichtiger Bestandteil eines Multiparametertests zur Prognoseabschätzung von Prostatakarzinomen darstellen könnte.

5 Zusammenfassung

Das Prostatakarzinom ist der häufigste Tumor bei Männern. Die meisten Karzinome benötigen allerdings keine Therapie. Die Entscheidung, ob ein Mann mit einem neu diagnostizierten Prostatakarzinom kurativ behandelt werden muss, wird durch die etablierten Prognosemarker Serum-PSA-Wert, klinisches Stadium, Zahl der positiven Stanzbiopsien und Gleason Score bestimmt. Für die Zukunft ist zu erwarten, dass molekulare Tests die etablierten Parameter ergänzen oder ersetzen werden. Bcl-2 ist in dieser Hinsicht von Interesse, da die Bcl-2-Expression bei vielen Tumorarten einschließlich des Prostatakarzinoms als prognoserelevant beschrieben wurde. In der vorliegenden Studie untersuchten wir an einem Kollektiv von mehr als 10.000 Tumoren die prognostische Relevanz der Bcl-2-Expression in Bezug auf ihre Bedeutung in molekular definierten Untergruppen. Die immunhistochemische Untersuchung an einem Tissue Micro Array ergab eine Bcl-2-Positivität in 16,7% der Tumoren, einschließlich 13,3% mit schwacher, 2,4% mit mäßiggradiger und 1,0% mit starker Expression. Die Bcl-2-Expression war signifikant mit dem ERG-Status assoziiert. Bei ERG-negativen Tumoren waren 18,3% der Fälle Bcl-2-positiv, bei ERG-positiven Tumoren nur 13,2% ($p < 0.0001$). Die Untersuchung der Beziehung zwischen Tumorphänotyp und Prognose und dem Bcl-2-Status ergab, dass diese Beziehung in ERG-negativen und ERG-positiven Tumoren völlig unterschiedlich war. In ERG-negativen Tumoren war eine mäßigstarke bzw. starke Bcl-2-Expression hochsignifikant mit hohem Gleason Grad, hohem Tumorstadium, dem Vorliegen von Lymphknotenmetastasen und einer ungünstigen Prognose assoziiert (p jeweils < 0.0001), wobei die prognostische Bedeutung auch bei Hinzunahme sämtlicher nur postoperativ vorhandener Parameter wie pT, pN, R-Status vom präoperativem PSA statistisch unabhängig war. Im Gegensatz dazu war die Bcl-2-Expression bei ERG-positiven Tumoren nicht signifikant mit dem Tumorphänotyp oder der Patientenprognose assoziiert. Der Vergleich mit weiteren Parametern der UKE-Datenbank ergab, dass der Bcl-2-Status nur geringgradig mit dem Ki67-Labeling-Index assoziiert war, aber einen deutlichen Zusammenhang mit sämtlichen untersuchten Deletionen (in ERG-negativen Tumoren) zeigte. Die Befunde passen zu einer erhöhten genomischen Instabilität in Bcl-2-positiven Tumoren.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass eine erhöhte Bcl-2-Expression zu den stärksten bekannten ungünstigen Prognoseparametern beim Prostatakarzinom gehört, allerdings nur bei ERG-negativen Tumoren. Für die Zukunft ist zu erwarten, dass der Bcl-2-Nachweis Teil eines klinisch nützlichen molekularem Prognosepanels beim Prostatakarzinom sein könnte.

Summary

Prostate cancer is the most frequent tumor with men. However, most carcinoma do not need a therapy. The decision, if a man with a newly diagnosed prostate cancer must be treated curative or not, will be made with well-established prognostic markers. These markers are the prostate specific antigen (PSA) value, clinical stage, number of positive punch biopsies, and the Gleason score. In future, it is to be expected that these well-established parameters will be complemented or substituted with molecular tests. In this respect, Bcl-2 is interesting because the Bcl-2-expression has been described to be relevant to the prognosis in many tumor types, including the prostate cancer. In the present study we analyzed the prognostic relevance of the Bcl-2-expression in relation to its significance to molecular defined subgroups at a collective of more than 10,000 tumors. The immunohistochemical investigation on a tissue micro array showed a Bcl-2-positivity in 16.7% of the tumor, including 13.3% with weak, 2.4% with moderate, and 1.0% with strong expression. The Bcl-2-expression was significantly associated with the ERG-status. Upon ERG-negative cancers 18.3% of the cases were Bcl-2-positiv, on ERG-positive cancers only 13.2% ($p < 0.0001$). Investigations on the relationship between tumor phenotype, prognosis, and Bcl-2-status showed that the relationship regarding ERG-negative and ERG-positive cancers were completely different. In ERG-negative cancers a moderate or strong Bcl-2-expression was highly significantly associated with a high Gleason score, high tumor grade, existence of lymph node metastases, and unfavorable outcome (in each case $p < 0.0001$). This prognostic relevance was still statistically independent of the preoperative PSA, even upon addition of all postoperative available parameter like pT, pN, and R-status. However, the Bcl-2-expression of ERG-positive cancers was not significantly associated with tumor phenotype or

patient prognosis. The comparison with additional parameters of the UKE-data base revealed an only low-grade association of the Bcl-2-status with the Ki67-labeling index. In contrast, there is a significant correlation with all investigated deletions (in ERG-negative cancers). The diagnostic findings match an increased genomic instability in Bcl-2-positive tumors.

Concluding, an increased Bcl-2-expression belongs to the strongest known unfavorable prognostic parameters of the prostate cancer, but only with ERG-negative cancers. In future application the Bcl-2-detection might be a useful tool in the molecular prognosis panel in clinical application of prostate cancer.

6 Abkürzungsverzeichnis

AJCC	American Joint Committee on Cancer
AK	Antikörper
ALCAM	Activated leukocyte cell adhesion molecule
Apaf-1	Apoptotic Protease Activating Factor 1
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BH	Bcl-2 homology
CHD1	Chromodomain-helicase-DNA-binding Protein 1
DNA	Desoxyribonukleinacid
DRU	digital-rektale Untersuchung
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERG	Mitglied der ETS-Transkriptionsfamilie
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FOXP2	Forkhead box P 2
HE	Hämatoxylin-Eosin
IAP	Inhibitors of Apoptosis Proteins
ID	Identifikator
MAP3K7	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 7
MRT	Magnetresonanztomografie
NBS1	Nijmegen breakage syndrome gene
n	Anzahl der Fälle
PET/CT	Positronen-Emissions-Tomographie/Computertomographie
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog
Rbm3	RNA-binding protein 3
RYBP	RING1 and YY1-binding Protein
TMA	Tissue Micor-Array
TMPRSS2	transmembrane protease serine 2
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
YB-1	Y-box binding protein 1

7 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen:

Abbildung 1: Gleason Muster

Abbildung 2: intrinsischer Apoptose-Signalweg

Abbildung 3: Translokation Bcl-2

Abbildung 4: Beispiel eines Stanz-Cartoons

Abbildung 5: TMA-Herstellung

Abbildung 6: immunhistochemische Färbung mit Bcl-2 an Tumoren mit niedrigem Gleason Grad und a) negativem, b) schwachem, c) mäßig-starkem und d) starkem Färbeergebnis

Abbildung 7: immunhistochemische Färbung mit Bcl-2 an Tumoren mit hohem Gleason Grad und a) negativem, b) schwachem, c) mäßig-starkem und d) starkem Färbeergebnis

Abbildung 8: immunhistochemische Färbung mit Bcl-2 an normalem Prostatagewebe

Abbildung 9: Prognostische Bedeutung von a) pT, b) pN, c) klassischem Gleason Score und d) quantitativen Gleason Grad und der Bcl-2-Expression in e) allen Tumoren, f) ERG-negativen Tumoren, g) ERG-positiven Tumoren, h) PTEN-normalen Tumoren und i) PTEN-deletierten Tumoren

Abbildung 10: Bcl-2-Färbung und ERG-Status (IHC/FISH) in allen Tumoren

Abbildung 11: Bcl-2-Färbung und 10q23(PTEN)-, 5q21(CDD1)-, 6q15(MAP3K7)-, 3p13(FOXP1)-Deletionen in a) allen Tumoren, b) ERG-negativen Tumoren und c) ERG-positiven Tumoren

Tabellen:

Tabelle 1: Gleason Muster

Tabelle 2: TNM-Klassifikation

Tabelle 3: Klinische und pathologische Daten der ausgewählten Patienten

Tabelle 4: Beispiel eines Stanz-Files gehörend zum TMA

Tabelle 5: Bcl-2-Färbung und Tumorphänotyp in allen Tumoren

Tabelle 6: Bcl-2-Färbung und Tumorphänotyp in ERG-negativen Tumoren

Tabelle 7: Bcl-2-Färbung und Tumorphänotyp in ERG-positiven Tumoren

Tabelle 8: Multivariate Analysen einschließlich Bcl-2 in a) allen Tumoren, b) ERG-negativen und c) ERG-positiven Tumoren

Tabelle 9: Bcl-2-Expression und Ki67-Labeling-Index

Tabelle 10: Übersicht zur Bcl-2-Expression beim Prostatakarzinom in früheren Studien

Tabelle 11: Übersicht zu Prognoseparametern in Verbindung mit dem ERG-Status

8 Literaturverzeichnis

Abaza R, Diaz LK Jr, Laskin WB, Pins MR (2006) Prognostic value of DNA ploidy, bcl-2 and p53 in localized prostate adenocarcinoma incidentally discovered at transurethral prostatectomy. *J Urol.*; 176(6 Pt 1):2701-2705.

Abuzallouf S, Dayes I, Lukka H (2004) Baseline staging of newly diagnosed prostate cancer: a summary of the literature. *J Urol.*;171(6 Pt 1): 2122-7.

Aiello A, Delia D, Borrello MG, Biassoni D, Giardini R, Fontanella E, Pezzella F, Pulford K, Pierotti M, Della Porta G (1992) Flow cytometric detection of the mitochondrial BCL-2 protein in normal and neoplastic human lymphoid cells. *Cytometry*. 1992;13(5):502-9.

Amirghofran Z, Monabati A, Gholijani N (2005) Apoptosis in prostate cancer: bax correlation with stage. *Int J Urol.*;12(4):340-5.

Apakama I, Robinson MC, Walter NM, Charlton RG, Royds JA, Fuller CE, Neal DE, Hamdy FC (1996) bcl-2 overexpression combined with p53 protein accumulation correlates with hormone-refractory prostate cancer. *Br J Cancer.*;74(8):1258-62.

Bastian PJ, Carter BH, Bjartell A, Seitz M, Stanislaus P, Montorsi F, Stief CG, Schröder F (2009) Insignificant prostate cancer and active surveillance: from definition to clinical implications. *Eur Urol.*;55(6):1321-30.

Berlin A, Castro-Mesta JF, Rodriguez-Romo L, Hernandez-Barajas D, González-Guerrero JF, Rodríguez-Fernández IA, González-Conchas G, Verdines-Perez A, Vera-Badillo FE (2017) Prognostic role of Ki-67 score in localized prostate cancer: A systematic review and meta-analysis. *Urol Oncol.*; 35(8):499-506.

Beuzeboc P, Soulié M, Richaud P, Salomon L, Staerman F, Peyromaure M, Mongiat-Artus P, Cornud F, Paparel P, Davin JL, Molinié V (2009) [Fusion genes and prostate cancer. From discovery to prognosis and therapeutic perspectives]. *Prog Urol*. 2009 Dec;19(11):819-24.

Bolla M, de Reijke TM, Van Tienhoven G, Van den Bergh AC, Oddens J, Poortmans PM, Gez E, Kil P, Akdas A, Soete G, Kariakine O, van der Steen-Banasik EM, Musat E, Piérart M, Mauer ME, Collette L; EORTC Radiation Oncology Group and Genito-Urinary Tract Cancer Group (2009) Duration of androgen suppression in the treatment of prostate cancer. *N Engl J Med.*;360(24):2516-27.

Borboroglu PG, Sur RL, Roberts JL, Amling CL (2001) Repeat biopsy strategy in patients with atypical small acinar proliferation or high grade prostatic intraepithelial neoplasia on initial prostate needle biopsy. *Journal of Urology*;166(3):866-70.

Bott S R J, Birtle A J, Taylor C J, Kirby R S (2003) Prostate cancer management: (1) an update on localised disease. *Postgraduate Medical Journal* – Volume 79-936: S. 575-580.

Brase JC, Johannes M, Mannsperger H, Fälth M, Metzger J, Kacprzyk LA, Andrasiuk T, Gade S, Meister M, Sirma H, Sauter G, Simon R, Schlomm T, Beissbarth T, Korf U, Kuner R, Sültmann H (2011) TMPRSS2-ERG -specific transcriptional modulation is associated with prostate cancer biomarkers and TGF- β signaling. *BMC Cancer*. 2011 Dec 5;11:507.

Bubendorf L, Sauter G, Moch H, Jordan P, Blöchlinger A, Gasser TC, Mihatsch MJ (1996) Prognostic significance of Bcl-2 in clinically localized prostate cancer. *Am J Pathol.*;148(5):1557-65.

Burdelski C, Bujupi E, Tsourlakis MC, Hube-Magg C, Kluth M, Melling N, Lebok P, Minner S, Koop C, Graefen M, Heinzer H, Wittmer C, Sauter G, Wilczak W, Simon R, Schlomm T, Steurer S, Krech T (2015) Loss of SOX9 Expression Is Associated with PSA Recurrence in ERG-Positive and PTEN Deleted Prostate Cancers. *PLoS One*. 2015 Jun 1;10(6):e0128525.

Burdelski C, Dieckmann T, Heumann A, Hube-Magg C, Kluth M, Beyer B, Steuber T, Pompe R, Graefen M, Simon R, Minner S, Tsourlakis MC, Koop C, Izbicki J, Sauter G, Krech T, Schlomm T, Wilczak W, Lebok P (2016) p16 upregulation is linked to poor prognosis in ERG negative prostate cancer. *Tumour Biol*. 2016 Sep;37(9):12655-12663.

Burkhardt L, Fuchs S, Krohn A, Masser S, Mader M, Kluth M, Bachmann F, Huland H, Steuber T, Graefen M, Schlomm T, Minner S, Sauter G, Sirma H, Simon R (2013) CHD1 is a 5q21 tumor suppressor required for ERG rearrangement in prostate cancer. *Cancer Res.*; 73(9):2795-2805.

Cesinaro AM, Migaldi M, Ferrari G, Castagnetti G, Dotti A, De Gaetani C, Ferrari P, Trentini GP (2000) Expression of p53 and bcl-2 in clinically localized prostate cancer before and after neo-adjuvant hormonal therapy. *Oncol Res.*;12(1):43-49.

Chaib H, MacDonald JW, Vessella RL, Washburn JG, Quinn JE, Odman A, Rubin MA, Macoska JA (2003) Haploinsufficiency and reduced expression of genes localized to the 8p chromosomal region in human prostate tumors. *Genes Chromosomes Cancer*. 2003 Jul;37(3):306-13.

Cleary ML, Smith SD, Sklar J (1986) Cloning and structural analysis of cDNAs for bcl-2 and a hybrid bcl-2/immunoglobulin transcript resulting from the t(14;18) translocation. *Cell*; 47(1):19-28.

Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM (2014) Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol.*; 15(1):49-63.

D'Amico AV, Whittington R, Malkowicz SB, Schultz D, Blank K, Broderick GA, Tomaszewski JE, Renshaw AA, Kaplan I, Beard CJ, Wein A (1998) Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer. *JAMA*; 280(11):969-74.

Denham JW, Steigler A, Lamb DS, Joseph D, Turner S, Matthews J, Atkinson C, North J, Christie D, Spry NA, Tai KH, Wynne C, D'Este C (2011) Short-term neoadjuvant androgen deprivation and radiotherapy for locally advanced prostate cancer: 10-year data from the TROG 96.01 randomised trial. *Lancet Oncol.*; 12(5):451-9.

Divito KA, Berger AJ, Camp RL, Dolled-Filhart M, Rimm DL, Kluger HM (2004) Automated quantitative analysis of tissue microarrays reveals an association between high Bcl-2 expression and improved outcome in melanoma. *Cancer Res.*;64(23):8773-7.

Edamura K, Saika T, Senoh T, Koizumi F, Manabe D, Ebara S, Kaku H, Yokoyama T, Abarzua F, Nagai A, Nasu Y, Tsushima T, Kumon H (2005) Long-term clinical outcomes of 420 consecutive prostate cancer patients in a single institute. *Acta Med Okayama.*;59(5):195-9.

Egevad L, Ahmad AS, Algaba F, Berney DM, Boccon-Gibod L, Comp rat E, Evans AJ, Griffiths D, Grobholz R, Kristiansen G, Langner C, Lopez-Beltran A, Montironi R, Moss S, Oliveira P, Vainer B, Varma M, Camparo P (2013) Standardization of Gleason grading among 337 European pathologists. *Histopathology*. 2013 Jan;62(2):247-56.

Eichler K, Hempel S, Wilby J, Myers L, Bachmann LM, Kleijnen J (2006) Diagnostic value of systematic biopsy methods in the investigation of prostate cancer: a systematic review. *Journal of Urology*;175(5):1605-12.

Epstein JI, Egevad L, Amin MB, Delahunt B, Srigley JR, Humphrey PA; Grading Committee (2016) The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma: Definition of Grading Patterns and Proposal for a New Grading System. *Am J Surg Pathol.*;40(2):244-52.

Erbersdobler A, Fritz H, Schn ger S, Graefen M, Hammerer P, Huland H, Henke RP (2002) Tumour grade, proliferation, apoptosis, microvessel density, p53, and bcl-2 in prostate cancers: differences between tumours located in the transition zone and in the peripheral zone. *Eur Urol.*;41(1):40-46.

Ermiah E, Buhmeida A, Khaled BR, Abdalla F, Salem N, Pyrh nen S, Collan Y (2013) Prognostic value of bcl-2 expression among women with breast cancer in Libya. *Tumour Biol.*;34(3):1569-78.

Fallahabadi ZR, Noori Dalooi MR, Mahdian R, Behjati F, Shokrgozar MA, Abolhasani M, Asgari M, Shahrokh H (2016) Frequency of PTEN alterations, TMPRSS2-ERG fusion and their association in prostate cancer. *Gene*. 2016 Jan 10;575(2 Pt 3).

Fleischmann A, Huland H, Mirlacher M, Wilczak W, Simon R, Erbersdobler A, Sauter G, Schlomm T (2012) Prognostic relevance of Bcl-2 overexpression in surgically treated prostate cancer is not caused by increased copy number or translocation of the gene. *Prostate*;72(9):991-997.

Fonseca GN, Srougi M, Leite KR, Nesrallah LJ, Ortiz V (2004) The role of HER2/neu, BCL2, p53 genes and proliferating cell nuclear protein as molecular prognostic parameters in localized prostate carcinoma. *Sao Paulo Med J*;122(3):124-127.

Font-Tello A, Juanpere N, de Muga S, Lorenzo M, Lorente JA, Fumado L, Serrano L, Serrano S, Lloreta J, Hernández S (2015) Association of ERG and TMPRSS2-ERG with grade, stage, and prognosis of prostate cancer is dependent on their expression levels. *Prostate*;75(11):1216-26.

Foyouzi-Youssefi R, Arnaudeau S, Borner C, Kelley W, Tschopp J, Lew D, Demarex N, Krause K-H (2000) Bcl-2 decreases the free Ca²⁺-concentration within the endoplasmic reticulum. *PNAS* vol. 97 no.11: 5723–5728.

Galalae RM, Martinez A, Mate T, Mitchell C, Edmundson G, Nuernberg N, Eulau S, Gustafson G, Gribble M, Kovács G (2004) Long-term outcome by risk factors using conformal high-dose-rate brachytherapy (HDR-BT) boost with or without neoadjuvant androgen suppression for localized prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*; 58(4):1048-55.

Gallo G, Giarnieri E, Bosco S, Cappelli C, Alderisio M, Giovagnoli MR, Giordano A, Vecchione A (2003) Aberrant bcl-2 and bax protein expression related to chemotherapy response in neuroblastoma. *Anticancer Research*., 23(1B):777-784.

Gobé G, Rubin M, Williams G, Sawczuk I, Buttyan R (2002) Apoptosis and expression of Bcl-2, Bcl-XL, and Bax in renal cell carcinomas. *Cancer Invest*.; 20(3):324-32.

Grignon DJ, Hammond EH (1995) College of American Pathologists Conference XXVI on clinical relevance of prognostic markers in solid tumors. Report of the Prostate Cancer Working Group. *Arch Pathol Lab Med*.;119(12):1122-6.

Grupp K, Höhne TS, Prien K, Hube-Magg C, Tsourlakis MC, Sirma H, Pham T, Heinzer H, Graefen M, Michl U, Simon R, Wilczak W, Izbicki J, Sauter G, Minner S, Schlomm T, Steurer S (2013) 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 Oct;95(2):227-34.

Grupp K, Jedrzejewska K, Tsourlakis MC, Koop C, Wilczak W, Adam M, Quaas A, Sauter G, Simon R, Izbicki JR, Graefen M, Huland H, Schlomm T, Minner S, Steurer S (2013) High mitochondria content is associated with prostate cancer disease progression. *Mol Cancer*. 2013 Nov 21;12(1):145.

Grupp K, Wilking J, Prien K, Hube-Magg C, Sirma H, Simon R, Steurer S, Budäus L, Haese A, Izbicki J, Sauter G, Minner S, Schlomm T, Tsourlakis MC (2014) High RNA-binding motif protein 3 expression is an independent prognostic marker in operated prostate cancer and tightly linked to ERG activation and PTEN deletions. *Eur J Cancer*. 2014 Mar;50(4):852-61.

Grupp K, Boumesli R, Tsourlakis MC, Koop C, Wilczak W, Adam M, Sauter G, Simon R, Izbicki JR, Graefen M, Huland H, Steurer S, Schlomm T, Minner S, Quaas A (2014) The prognostic impact of high Nijmegen breakage syndrome (NBS1) gene expression in ERG-negative prostate cancers lacking PTEN deletion is driven by KPNA2 expression. *Int J Cancer*. 2014 Sep 15;135(6):1399-407.

Hamdy FC, Donovan JL, Lane JA, Mason M, Metcalfe C, Holding P, Davis M, Peters TJ, Turner EL, Martin RM, Oxley J, Robinson M, Staffurth J, Walsh E, Bollina P, Catto J, Doble A, Doherty A, Gillatt D, Kockelbergh R, Kynaston H, Paul A, Powell P, Prescott S, Rosario DJ, Rowe E, Neal DE; ProtecT Study Group (2016) 10-Year Outcomes after Monitoring, Surgery, or Radiotherapy for Localized Prostate Cancer. *N Engl J Med*.;375(15):1415-1424.

Harris R, Lohr KN (2002) Screening for prostate cancer: an update of the evidence for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med*;137(11):917-29.

Hautmann R, Gschwend J E (2014) *Urologie*, Springer Verlag, 5. Auflage.

Heidenreich A, Varga Z, Von Knobloch R (2002) Extended pelvic lymphadenectomy in patients undergoing radical prostatectomy: high incidence of lymph node metastasis. *J Urol*.;167(4):1681-6.

Hermans KG, Boormans JL, Gasi D, van Leenders GJ, Jenster G, Verhagen PC, Trapman J (2009) Overexpression of prostate-specific TMPRSS2(exon 0)-ERG fusion transcripts corresponds with favorable prognosis of prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2009 Oct 15;15(20):6398-403.

Heumann A, Kaya Ö, Burdelski C, Hube-Magg C, Kluth M, Lang DS, Simon R, Beyer B, Thederan I, Sauter G, Izbicki JR, Luebke AM, Hinsch A, Jacobsen F, Wittmer C, Büscheck F, Höflmayer D, Minner S, Tsourlakis MC, Schlomm T, Wilczak W (2017) Up regulation and nuclear translocation of Y-box binding protein 1 (YB-1) is linked to poor prognosis in ERG-negative prostate cancer. *Sci Rep*. 2017 May 17;7(1):2056.

Hu Y-X, Watanabe H, Ohtsubo K, Yamaguchi Y, Ha A, Motoo Y, Okai T, Sawabu N (1999) Bcl-2 expression related to altered p53 protein and its impact on the progression of human pancreatic carcinoma. *British Journal of Cancer*; 80 (7), 1075–1079.

Huang A, Gandour-Edwards R, Rosenthal SA, Siders DB, Deitch AD, White RW (1998) p53 and bcl-2 immunohistochemical alterations in prostate cancer treated with radiation therapy. *Urology*.;51(2):346-351.

Huang Q, Li S, Cheng P, Deng M, He X, Wang Z, Yang CH, Zhao XY, Huang J (2017) High expression of anti-apoptotic protein Bcl-2 is a good prognostic factor in colorectal cancer: Result of a meta-analysis. *World J Gastroenterol.*; 23(27):5018-5033.

Hutter R, Montie J, Busch C, Grignon D, Lieber M, Logothetis C, Ragde H, Reuter V (1996) Current Prognostic Factors and Their Relevance to Staging. *CANCER / Volcume 78 / Number 2: 369-371.*

Ilmonen S, Hernberg M, Pyrhönen S, Tarkkanen J, Asko-Seljavaara S (2005) Ki-67, Bcl-2 and p53 expression in primary and metastatic melanoma. *Melanoma Res.*;15(5):375-81.

Itoi T, Yamana K, Bilim V, Takahashi K, Tomita F (2004) Impact of frequent Bcl-2 expression on better prognosis in renal cell carcinoma patients. *Br J Cancer.*; 90(1): 200–205.

Jemal A, Bray F, Center M M, Ferlay J, Ward E, Forman D (2011) Global Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin*,61: 69-90.

Jones D, Friend C, Dreher A, Allgar V, Macleod U (2018) The diagnostic test accuracy of rectal examination for prostate cancer diagnosis in symptomatic patients: a systematic review. *BMC Family Practice* 19:79.

Kälkner KM, Wahlgren T, Ryberg M, Cohn-Cedermark G, Castellanos E, Zimmerman R, Nilsson J, Lundell M, Fowler J, Levitt S, Hellström M, Nilsson S (2007) Clinical outcome in patients with prostate cancer treated with external beam radiotherapy and high dose-rate iridium 192 brachytherapy boost: a 6-year follow-up. *Acta Oncol.*; 46(7):909-17.

Karaburun Paker S, Kilicarslan B, Ciftcioglu AM, Oztekin S, Sargin FC, Erdogru T, Baykara M (2001) Relationship between apoptosis regulator proteins (bcl-2 and p53) and Gleason score in prostate cancer. *Pathol Oncol Res.*;7(3):209-12.

Kaur P, Kallakury BS, Sheehan CE, Fisher HA, Kaufman RP Jr, Ross JS (2004) Survivin and Bcl-2 expression in prostatic adenocarcinomas. *Arch Pathol Lab Med.*;128(1):39-43.

Khor LY, Moughan J, Al-Saleem T, Hammond EH, Venkatesan V, Rosenthal SA, Ritter MA, Sandler HM, Hanks GE, Shipley WU, Pollack A (2007) Bcl-2 and Bax expression predict prostate cancer outcome in men treated with androgen deprivation and radiotherapy on radiation therapy oncology group protocol 92-02. *Clin Cancer Res*;13(12):3585-90.

Kim S, Nam SJ, Kwon D, Kim H, Lee E, Kim TM, Heo DS, Park SH, Kim CW, Jeon YK (2016) MYC and BCL2 overexpression is associated with a higher class of Memorial Sloan-Kettering Cancer Center prognostic model and poor clinical outcome in primary diffuse large B-cell lymphoma of the central nervous system. *BMC Cancer*; 16:363.

Kirkin V, Joos S, Zörnig M (2004) The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta.*;1644(2-3): 229-249.

Kluth M, Hesse J, Heini A, Krohn A, Steurer S, Sirma H, Simon R, Mayer PS, Schumacher U, Grupp K, Izbicki JR, Pantel K, Dikomey E, Korbel JO, Plass C, Sauter G, Schlomm T, Minner S (2013) Genomic deletion of MAP3K7 at 6q12-22 is associated with early PSA recurrence in prostate cancer and absence of TMPRSS2:ERG fusions. *Mod Pathol.*;26(7):975-83.

Kluth M, Harasimowicz S, Burkhardt L, Grupp K, Krohn A, Prien K, Gjoni J, Haß T, Galal R, Graefen M, Haese A, Simon R, Hühne-Simon J, Koop C, Korbel J, Weischenfeld J, Huland H, Sauter G, Quaas A, Wilczak W, Tsourlakis MC, Minner S, Schlomm T (2014) Clinical significance of different types of p53 gene alteration in surgically treated prostate cancer. *Int J Cancer.* 2014 Sep 15;135(6):1369-80.

Kluth M, Meyer D, Krohn A, Freudenthaler F, Bauer M, Salomon G, Heinzer H, Michl U, Steurer S, Simon R, Sauter G, Schlomm T, Minner S (2016) Heterogeneity and chronology of 6q15 deletion and ERG-fusion in prostate cancer. *Oncotarget.* 2016 Jan 26;7(4):3897-904.

Kluth M, Al Kilani Z, Özden C, Hussein K, Frogh S, Möller-Koop C, Burandt E, Steurer S, Büscheck F, Jacobsen F, Luebke AM, Minner S, Tsourlakis MC, Hoeflmayer D, Wittmer C, Schlomm T, Sauter G, Simon R, Wilczak W (2019) 5q21 deletion is often heterogeneous in prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer.* 2019 Aug;58(8):509-515.

Krammer P H (2000) Apoptose. *Dtsch. Arztebl* 2000; 97(25): A-1752 / B-1481 / C-1315

Krohn A, Diedler T, Burkhardt L, Mayer PS, De Silva C, Meyer-Kornblum M, Kötschau D, Tennstedt P, Huang J, Gerhäuser C, Mader M, Kurtz S, Sirma H, Saad F, Steuber T, Graefen M, Plass C, Sauter G, Simon R, Minner S, Schlomm T (2012) Genomic deletion of PTEN is associated with tumor progression and early PSA recurrence in ERG fusion-positive and fusion-negative prostate cancer. *Am J Pathol.*; 181(2):401-12.

Krohn A, Seidel A, Burkhardt L, Bachmann F, Mader M, Grupp K, Eichenauer T, Becker A, Adam M, Graefen M, Huland H, Kurtz S, Steurer S, Tsourlakis MC, Minner S, Michl U, Schlomm T, Sauter G, Simon R, Sirma H (2013) Recurrent deletion of 3p13 targets multiple tumour suppressor genes and defines a distinct subgroup of aggressive ERG fusion-positive prostate cancers. *J Pathol.*;231(1):130-141.

Kumar-Sinha C, Tomlins SA, Chinnaiyan AM (2008) Recurrent gene fusions in prostate cancer. *Nat Rev Cancer*; 8(7): 497-511.

Leinonen KA, Tolonen TT, Bracken H, Stenman UH, Tammela TL, Saramäki OR, Visakorpi T (2010) Association of SPINK1 expression and TMPRSS2:ERG fusion with prognosis in endocrine-treated prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2010 May 15;16(10):2845-51.

Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF) (2018) Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms, Kurzversion 5.0,2018, AWMF Registernummer: 043/022OL, <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Prostatakarzinom.58.0.html> (abgerufen am: 13.07.2018)

Levine A J (1993) The tumor suppressor genes. *Annu. Rev. Biochem.* 1993. 62:623-51.

Lilja H, Cronin AM, Dahlin A, Manjer J, Nilsson PM, Eastham JA, Bjartell AS, Scardino PT, Ulmert D, Vickers AJ (2011) Prediction of significant prostate cancer diagnosed 20 to 30 years later with a single measure of prostate-specific antigen at or before age 50. *Cancer* 117(6):1210-9.

Lipponen P, Vesalainen S (1997) Expression of the apoptosis suppressing protein bcl-2 in prostatic adenocarcinoma is related to tumor malignancy. *Prostate.* 32(1):9-15.

Lu TX, Fan L, Wang L, Wu JZ, Miao KR, Liang JH, Gong QX, Wang Z, Young KH, Xu W, Zhang ZH, Li JY (2015) MYC or BCL2 copy number aberration is a strong predictor of outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma; *Oncotarget*; 6(21): 18374–18388.

Mackinnon AC1, Yan BC, Joseph LJ, Al-Ahmadie HA (2009) Molecular biology underlying the clinical heterogeneity of prostate cancer: an update. *Arch Pathol Lab Med.* 2009 Jul;133(7):1033-40.

Majumder P K, Sellers W R (2005) Akt-regulated pathways in prostate cancer. *Oncogene* 24, 7465-7474.

Manikandan R, Qazi HA, Philip J, Mistry R, Lamb GH, Woolfenden KA, Cornford PA, Parsons KF (2007) Routine use of magnetic resonance imaging in the management of T(1c) carcinoma of the prostate: is it necessary? *J Endourol.*; 21(10):1171-4.

Matsushima H, Hosaka Y, Suzuki M, Mizutani T, Ishizuka H, Kawabe K (1996) bcl-2 [corrected] Expression on prostate cancer and its relationship to cell cycle and prognosis. *Int J Urol.*;3(2):113-7.

Matsushima H, Kitamura T, Goto T, Hosaka Y, Homma Y, Kawabe K (1997) Combined analysis with Bcl-2 and P53 immunostaining predicts poorer prognosis in prostatic carcinoma. *J Urol.*;158(6):2278-83.

Minner S, Enodien M, Sirma H, Luebke AM, Krohn A, Mayer PS, Simon R, Tennstedt P, Müller J, Scholz L, Brase JC, Liu AY, Schlüter H, Pantel K, Schumacher U, Bokemeyer C, Steuber T, Graefen M, Sauter G, Schlomm T (2011) ERG status is unrelated to PSA recurrence in radically operated prostate cancer in the absence of antihormonal therapy. *Clin Cancer Res.*; 17(18): 5878-5888.

Minner S, Kraetzig F, Tachezy M, Kilic E, Graefen M, Wilczak W, Bokemeyer C, Huland H, Sauter G, Schlomm T (2011) Low activated leukocyte cell adhesion molecule expression is associated with advanced tumor stage and early prostate-specific antigen relapse in prostate cancer. *Hum Pathol.* 2011 Dec;42(12):1946-52.

Mirlacher M, Simon R (2010) Recipient block TMA technique. *Methods Mol Biol.*; 664:37-44.

Mistry K, Cable G. (2003) Metaanalysis of prostate-specific antigen and digital rectal examination as screening tests for prostate carcinoma. *J Am Board Fam Pract*16(2):95-101.

Müller J, Ehlers A, Burkhardt L, Sirma H, Steuber T, Graefen M, Sauter G, Minner S, Simon R, Schlomm T, Michl U (2013) Loss of pSer2448-mTOR expression is linked to adverse prognosis and tumor progression in ERG-fusion-positive cancers. *Int J Cancer.* 2013 Mar 15;132(6):1333-40.

Orr GA, Verdier-Pinard P, McDaid H, Horwitz SB (2003) Mechanisms of Taxol resistance related to microtubules. *Oncogene*; 22(47):7280-95.

Perner S, Mosquera JM, Demichelis F, Hofer MD, Paris PL, Simko J, Collins C, Bismar TA, Chinnaiyan AM, De Marzo AM, Rubin MA (2007) TMPRSS2-ERG fusion prostate cancer: an early molecular event associated with invasion. *Am J Surg Pathol.*; 31(6):882-8.

Perry AM, Alvarado-Bernal Y, Laurini JA, Smith LM, Slack GW, Tan KL, Sehn LH, Fu K, Aoun P, Greiner TC, Chan WC, Bierman PJ, Bociek RG, Armitage JO, Vose JM, Gascoyne RD, Weisenburger DD (2014) MYC and BCL2 protein expression predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab. *Br J Haematol.*;165(3):382-91.

Poincloux L, Durando X, Seitz JF, Thivat E, Bardou VJ, Giovannini MH, Parriaux D, Barriere N, Giovannini M, Delpero JR, Monges G (2009) Loss of Bcl-2 expression in colon cancer: a prognostic factor for recurrence in stage II colon cancer. *Surg Oncol.*;18(4):357-65.

Pollack A, Cowen D, Troncso P, Zagars GK, von Eschenbach AC, Meistrich ML, McDonnell T (2003) Molecular markers of outcome after radiotherapy in patients with prostate carcinoma: Ki-67, bcl-2, bax, and bcl-x. *Cancer.*;97(7):1630-1638.

Porpiglia F, Russo F, Manfredi M, Mele F, Fiori C, Regge D (2015) Preoperative prostate biopsy and multiparametric magnetic resonance imaging: reliability in detecting prostate cancer. *Int Braz J Urol*;41(1):124-33.

Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R (2012) *Biochemie*, 3. Auflage, Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart.

- Renfer LG, Schow D, Thompson IM, Optenberg S (1995) Is ultrasound guidance necessary for transrectal prostate biopsy? *Journal of Urology*;154(4):1390-1.
- Renouf DJ, Wood-Baker R, Ionescu DN, Leung S, Masoudi H, Gilks CB, Laskin J (2009) BCL-2 expression is prognostic for improved survival in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol.*;4(4):486-91.
- Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg) (2017) Krebs in Deutschland 2013/2014. 11. Ausgabe.
- Rostad K, Hellwinkel OJ, Haukaas SA, Halvorsen OJ, Øyan AM, Haese A, Budäus L, Albrecht H, Akslen LA, Schlomm T, Kalland KH (2009) TMPRSS2:ERG fusion transcripts in urine from prostate cancer patients correlate with a less favorable prognosis. *APMIS*. 2009 Aug;117(8):575-82.
- Rubio J, Ramos D, López-Guerrero JA, Iborra I, Collado A, Solsona E, Almenar S, Llombart-Bosch A (2005) Immunohistochemical expression of Ki-67 antigen, cox-2 and Bax/Bcl-2 in prostate cancer; prognostic value in biopsies and radical prostatectomy specimens. *Eur Urol.*;48(5):745-51.
- Sabaliauskaite R, Jarmalaite S, Petroska D, Dasevicius D, Laurinavicius A, Jankevicius F, Lazutka JR (2012) Combined analysis of TMPRSS2-ERG and TERT for improved prognosis of biochemical recurrence in prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer*;51(8):781-791.
- Saramäki OR, Harjula AE, Martikainen PM, Vessella RL, Tammela TL, Visakorpi T (2008) TMPRSS2:ERG fusion identifies a subgroup of prostate cancers with a favorable prognosis. *Clin Cancer Res*. 2008 Jun 1;14(11):3395-400.
- Sauter G, Steurer S, Clauditz TS, Krech T, Wittmer C, Lutz F, Lennartz M, Janssen T, Hakimi N, Simon R, von Petersdorff-Campen M, Jacobsen F, von Loga K, Wilczak W, Minner S, Tsourlakis MC, Chirico V, Haese A, Heinzer H, Beyer B, Graefen M, Michl U, Salomon G, Steuber T, Budäus LH, Hekeler E, Malsy-Mink J, Kutzera S, Fraune C, Göbel C, Huland H, Schlomm T (2016) Clinical Utility of Quantitative Gleason Grading in Prostate Biopsies and Prostatectomy Specimens. *Eur Urol.*;69(4):592-598. Epub 2015 Nov 2.
- Schlomm T, Sauter G (2016) Beurteilung des Prostatakarzinoms: Gleason-Score – Status 2016; *Dtsch Arztebl*; 113: 33-34.
- Schmidt LH, Görlich D, Spieker T, Rohde C, Schuler M, Mohr M, Humberg J, Sauer T, Thoenissen NH, Hüge A, Voss R, Marra A, Faldum A, Müller-Tidow C, Berdel WE, Wiewrodt R (2014) Prognostic impact of Bcl-2 depends on tumor histology and expression of MALAT-1 lncRNA in non-small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol.*; 9(9):1294-304.
- Scholzen T, Gerdes J (2000) The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*. 2000 Mar;182(3):311-22.

Seong MK, Lee JY, Byeon J, Sohn YJ, Seol H, Lee JK, Kim EK, Kim HA, Noh WC (2015) Bcl-2 is a highly significant prognostic marker of hormone-receptor-positive, human epidermal growth factor receptor-2-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.*;150(1):141-148.

Shamas-Din A, Kale J, Leber B, Andrews DW (2013) Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*;5(4): a008714.

Stumm L, Burkhardt L, Steurer S, Simon R, Adam M, Becker A, Sauter G, Minner S, Schlomm T, Sirma H, Michl U (2013) 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 Jul;66(7):563-8.

Sun CY, Wang BL, Hu CQ, Peng RY, Gao YB, Gu QY, Wang DW (2002) Expression of the bcl-2 gene and its significance in human pancreatic carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.*;1(2):306-8.

Swindle P, Eastham JA, Ohori M, Kattan MW, Wheeler T, Maru N, Slawin K, Scardino PT (2005) Do margins matter? The prognostic significance of positive surgical margins in radical prostatectomy specimens. *J Urol.*;174(3):903-7.

Sulik M, Guzińska-Ustymowicz K (2002) Bcl-2 immunohistochemical detection in prostate cancer. *Rocz Akad Med Bialymst.*; 47:254-61.

Tennstedt P, Köster P, Brüchmann A, Mirlacher M, Haese A, Steuber T, Sauter G, Huland H, Graefen M, Schlomm T, Minner S, Simon R (2012) The impact of the number of cores on tissue microarray studies investigating prostate cancer biomarkers. *Int J Oncol.*;40(1):261-268.

Thompson I, Thrasher JB, Aus G, Burnett AL, Canby-Hagino ED, Cookson MS, D'Amico AV, Dmochowski RR, Eton DT, Forman JD, Goldenberg SL, Hernandez J, Higano CS, Kraus SR, Moul JW, Tangen CM; AUA Prostate Cancer Clinical Guideline Update Panel (2007) Guideline for the management of clinically localized prostate cancer: 2007 update. *J Urol.*;177(6):2106-31.

Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, Dhanasekaran SM, Mehra R, Sun XW, Varambally S, Cao X, Tchinda J, Kuefer R, Lee C, Montie JE, Shah RB, Pienta KJ, Rubin MA, Chinnaiyan AM (2005) Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science*; 310(5748):644-648.

Tsourlakis MC, Weigand P, Grupp K, Kluth M, Steurer S, Schlomm T, Graefen M, Huland H, Salomon G, Steuber T, Wilczak W, Sirma H, Simon R, Sauter G, Minner S, Quaas A (2014) β III-tubulin overexpression is an independent predictor of prostate cancer progression tightly linked to ERG fusion status and PTEN deletion. *The American Journal of Pathology* Volume 184, Issue 3: Pages 609-617.

Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC, Croce CM (1984) Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation *Science*;226(4678):1097-1099.

Van Poppel H, Vekemans K, Da Pozzo L, Bono A, Kliment J, Montironi R, Debois M, Collette L (2006) Radical prostatectomy for locally advanced prostate cancer: results of a feasibility study (EORTC 30001). *Eur J Cancer*;42(8):1062-7.

Vaux DL, Cory S, Adams JM (1988) Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature*; 335(6189):440-442.

Weischenfeldt J, Simon R, Feuerbach L, Schlangen K, Weichenhan D, Minner S, Wuttig D, Warnatz HJ, Stehr H, Rausch T, Jäger N, Gu L, Bogatyrova O, Stütz AM, Claus R, Eils J, Eils R, Gerhäuser C, Huang PH, Hutter B, Kabbe R, Lawrenz C, Radomski S, Bartholomae CC, Fälth M, Gade S, Schmidt M, Amschler N, Haß T, Galal R, Gjoni J, Kuner R, Baer C, Masser S, von Kalle C, Zichner T, Benes V, Raeder B, Mader M, Amstislavskiy V, Avci M, Lehrach H, Parkhomchuk D, Sultan M, Burkhardt L, Graefen M, Huland H, Kluth M, Krohn A, Sirma H, Stumm L, Steurer S, Grupp K, Sültmann H, Sauter G, Plass C, Brors B, Yaspo ML, Korbel JO, Schlomm T (2013) Integrative genomic analyses reveal an androgen-driven somatic alteration landscape in early-onset prostate cancer. *Cancer Cell*; 23(2):159-170.

Yoo J, Jung JH, Lee MA, Seo KJ, Shim BY, Kim SH, Cho DG, Ahn MI, Kim CH, Cho KD, Kang SJ, Kim HK (2007) Immunohistochemical analysis of non-small cell lung cancer: correlation with clinical parameters and prognosis. *J Korean Med Sci*; 22(2):318-325.

Yoshimoto M, Joshua AM, Cunha IW, Coudry RA, Fonseca FP, Ludkovski O, Zielenska M, Soares FA, Squire JA (2008) Absence of TMPRSS2:ERG fusions and PTEN losses in prostate cancer is associated with a favorable outcome. *Mod Pathol*. 2008 Dec;21(12):1451-60.

Zellweger T, Ninck C, Mirlacher M, Anefeld M, Glass AG, Gasser TC, Mihatsch MJ, Gelmann EP, Bubendorf L (2003) Tissue microarray analysis reveals prognostic significance of syndecan-1 expression in prostate cancer. *Prostate*. 1;55(1):20-9.

Zhang L, Wu B, Zha Z, Zhao H, Yuan J, Jiang Y, Yang W (2018) Surgical margin status and its impact on prostate cancer prognosis after radical prostatectomy: a meta-analysis. *World J Urol*. doi: 10.1007/s00345-018-2333-4.

Zörnig M, Busch G, Beneke R, Gulbins E, Lang F, Ma A, Korsmeyer S, Möröy T (1995) Survival and death of prelymphomatous B-cells from N-myc/bcl-2 double transgenic mice correlates with the regulation of intracellular Ca²⁺ fluxes. *Oncogene*; 11(10):2165-2

9 Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. G. Sauter für die Bereitstellung des Themas und für die freundliche Übernahme der Betreuung bei dieser Arbeit.

Vielen Dank an Herrn PD Dr. rer. nat. R. Simon und Frau Dr. rer. nat. C. Hübner-Magg für die geduldige Beantwortung meiner Fragen.

Des Weiteren danke ich dem Team des TMA-Labors unter der Leitung von Frau C. Möller-Koop für die gute Zusammenarbeit und den freundlichen und herzlichen Umgang.

Zum Schluss möchte ich meiner Familie und meiner Mitbewohnerin Jessi danken, die mich während des Studiums immer unterstützt haben.

10 Lebenslauf

Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

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: