

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Pathologie

Direktor: Prof. Dr. med. G. Sauter

**Heterogenität und Abfolge der ERG, CRISP3 und SPINK1
Expression beim Prostatakarzinom**

Dissertation

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

vorgelegt von:

Margaret Mähl
aus Tscherniwzi (Ukraine)

Hamburg 2020

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 15.03.2021**

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

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Christian Kubisch

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

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	4
1.1. Epidemiologie des Prostatakarzinoms.....	4
1.2. Diagnostik des Prostatakarzinoms.....	5
1.3. Therapie	11
1.4. Prognose	12
1.5. Genetik des Prostatakarzinoms.....	14
1.6. Die Rolle von CRISP3 und SPINK1 beim Prostatakarzinom	16
1.7. Multifokalität und Heterogenität	17
1.8. Ziel der Arbeit	18
2. Material und Methoden	19
2.1. Patientenproben und Tissue Microarray (TMA) Konstruktion	19
2.2. Immunhistochemie (IHC).....	21
3. Ergebnisse.....	23
3.1. Technische Aspekte.....	23
3.2. Heterogenität von ERG, CRISP3 und SPINK1	25
3.3. Ko-Expressionsmuster von ERG, CRISP3 und SPINK1	26
3.4. Zeitliche Abfolge von ERG und CRISP3 Expression	27
3.5. Exklusivität von ERG/CRISP3 und SPINK1	31
4. Diskussion.....	32
5. Zusammenfassung	36
6. Abstract	38
7. Abkürzungsverzeichnis	40
8. Literaturverzeichnis	41
9. Danksagung.....	49
10. Lebenslauf	50
11. Eidesstattliche Erklärung	51

1. Einleitung

1.1. Epidemiologie des Prostatakarzinoms

Das Prostatakarzinom ist der häufigste Tumor des Mannes und (nach dem Bronchialkarzinom) die zweithäufigste tumorbedingte Todesursache des Mannes. Aktuelle Schätzungen aus den USA und aus Deutschland prognostizieren für 2020 ca. 175.000/70.000 (USA bzw. Deutschland) Neuerkrankungen und 32.000/15.000 Prostatakarzinom-bedingte Todesfälle (Robert-Koch-Institut, 2017; Siegel RL, Miller KD, 2019). Das mittlere Erkrankungsalter ist mit 70,9 Jahren hoch. Die altersstandardisierte Inzidenzrate betrug in der letzten Erhebung von 2017 in Deutschland 92,7 je 100.000 Einwohner und war somit, wie in den letzten Jahren auch, gering rückläufig. Die altersstandardisierte Mortalitätsrate betrug 19,7 je 100.000 Einwohner und verblieb somit auf stabilem Niveau. Beide Raten waren damit vergleichsweise so hoch wie in der gesamten Europäischen Union ².

Weltweit sind die Neuerkrankungsraten des Prostatakarzinoms stark variabel und können sich um bis zu 25-fache unterscheiden. Die höchsten Inzidenzraten lassen sich in den Industrieländern (Australien, Neuseeland, Nordamerika, West- und Nordeuropa) und die niedrigsten Inzidenzraten im Asiatischen Raum finden. Die höchsten Sterberaten lassen sich dagegen in den Ländern mit niedrigem bis mittlerem Einkommen (Südamerika, Mittelfrika, Karibik) finden ³. Insgesamt ist aufgrund der zunehmenden Lebenserwartung der Bevölkerung mit einem weiteren Anstieg der Neuerkrankungsraten und somit zwangsläufig auch der Mortalitätsraten zu rechnen.

Die großen Unterschiede der Inzidenzraten im weltweiten Vergleich haben vielerlei Ursachen wie z.B. differierende umwelt- und lebensstilbezogene Faktoren, genetische Komponenten, sowie variierende diagnostische und therapeutische Maßnahmen. Nicht zuletzt sind in wirtschaftlich höher entwickelten Ländern verbreitete diagnostische Früherkennungsmethoden wie z.B. das Prostata-spezifische Antigen (PSA)-Screening mit verantwortlich für die höheren Inzidenzraten an Prostatakrebs. Zudem weist diese Krebsform mit zunehmendem Alter einen exponentiellen Anstieg in der Häufigkeit auf, sodass nicht nur aufgrund verbesserter diagnostischer Maßnahmen, sondern auch bedingt durch die steigende Lebenserwartung in der Bevölkerung zukünftig mit einer weiteren Zunahme von Inzidenz und Mortalität des Prostatakarzinoms beim Mann zu rechnen ist ^{2,4}.

1.2. Diagnostik des Prostatakarzinoms

Ab dem Alter von 45 Jahren ist bei Männern eine jährliche Beschwerdeanamnese sowie körperliche Untersuchung inklusive digital-rektaler Untersuchung Bestandteil der gesetzlichen Krebsvorsorge ⁵. Mit 95% stellen Adenokarzinome die große Mehrheit der malignen Prostatatumoren dar. Ihren Ursprung bildet azinäres Prostataepithel aus den vorwiegend hinteren, zum Enddarm hin gelegenen Teilen der Drüse, der sogenannten peripheren Zone. Nach McNeal lassen sich insgesamt vier unterschiedliche Zonen der Prostata definieren (siehe Abbildung 1).

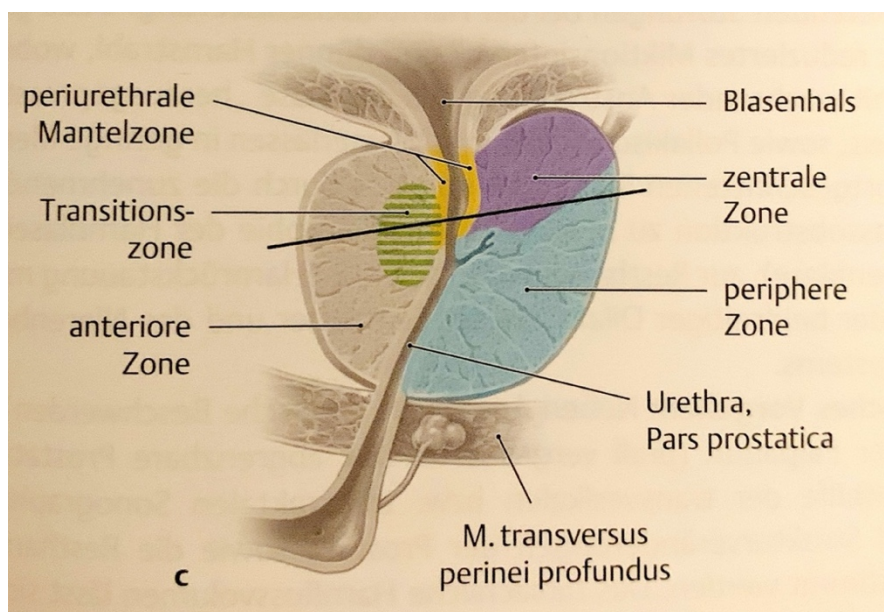


Abbildung 1: Klinisch-histologische Unterteilung der Prostata in Zonen nach McNeal, im Sagittalschnitt (aus: Prometheus Innere Organe, Schünke et al.⁶)

Mittels rektaler Tastuntersuchung kann somit ein Teil der Karzinome entdeckt werden. Als alleinige Methode ist die digital-rektale Untersuchung allerdings nicht geeignet, da sich auf diese Art nur größere Karzinombefunde ertasten lassen.

Seit etwa den 1990-er Jahren spielt die Früherkennung durch die Bestimmung des Prostata-spezifischen Antigens (PSA) im Serum eine wichtige Rolle. Da PSA praktisch ausschließlich von normalen und tumorösen Prostatazellen gebildet wird, gilt der Nachweis eines erhöhten PSA-Levels (d.h. mehr als 4 ng/ml) in der Blutbahn als Beleg für eine erhöhte Rate an zu Grunde gehenden Prostatazellen. Hierbei kann jedoch nicht unterschieden werden, ob es sich um Verletzungen normaler Zellen durch Entzündungen, gutartige Veränderungen

oder mechanische Reize handelt, oder um Tumorzellen, die ständig in großer Menge neu entstehen und vergehen⁷. Aus diesem Grund wird bei wiederholt erhöhten PSA Werten eine sonografisch gesteuerte Prostatabiopsie zur Klärung einer etwaigen Tumorerkrankung an-geraten.

Bei der überwiegend transrektal-ultraschallgestützten systematischen Biopsie werden regelhaft zehn bis zwölf Gewebezyylinder nach einem festen Schema aus unterschiedlichen Prostataarealen beider Prostatahälften gewonnen (siehe Abbildung 2). Die Stansen sollen aus den apikalen, mittleren und basisnahen Bereichen mit einer 20 Gauge Biopsienadel entnommen werden. Aus tastbaren oder bildmorphologisch suspekten Arealen werden zusätzliche Biopsien gewonnen. Jede Stanzbiopsie wird ihrer Lokalisation entsprechend individuell gekennzeichnet. Dies ist vor allem für die Tumorlokalisation von entscheidender Bedeutung, um das mögliche Risiko eines kapselüberschreitenden Wachstums beurteilen zu können.

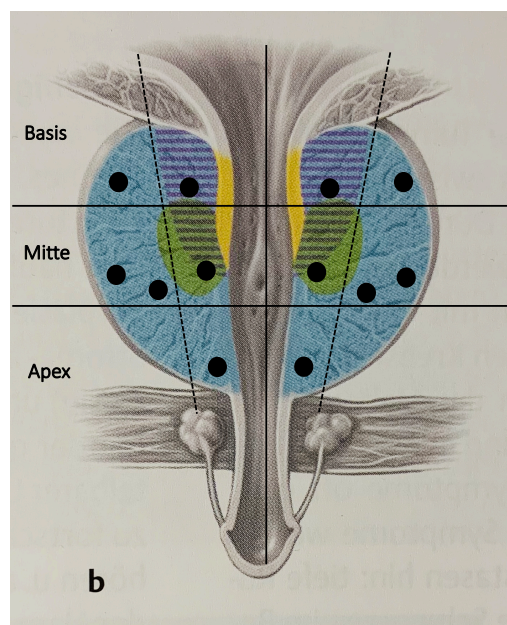


Abbildung 2: Exemplarische Darstellung des Biopsie-Schemas mit 12 Entnahmestellen zur Diagnostik des Prostatakarzinoms

(aus: Prometheus Innere Organe, Schünke et al.⁶, modifiziert nach Takenaka et al.⁸)

Die Stansen werden dann durch den Pathologen auf einen eventuellen Tumorgehalt und die Aggressivität des Tumors beurteilt. Diese histopathologische Aufarbeitung erfolgt für jede Stanzbiopsie einzeln und im Falle des Vorliegens eines positiven Karzinombefundes erfolgt die Angabe der Tumorausdehnung prozentual und/oder unter Angabe der absoluten Länge

des Befalls in Millimetern. Die Anzahl der tumorbefallenen Stenzen korreliert mit der Tumorausdehnung und erlaubt eine Abschätzung des lokalen Tumorstadiums. Weiterhin soll im Falle der perineuralen Tumordinfiltration, Kapselüberschreitung oder Samenblaseninfiltration diese miterfasst werden, da diese einen erheblichen Einfluss auf die Therapiefindung haben ⁵.

Bildgebende Verfahren wie transrektale/transabdominale Sonografie, Positronen-Emissions-Tomografie (PET) / Computertomografie (CT) oder Magnetresonanztomografie (MRT) sind keine sicheren Verfahren zur Entdeckung eines Karzinoms und daher zur primären Untersuchung nicht geeignet. Sie können jedoch bei Vorliegen eines Tumors ergänzend durchgeführt werden ⁵. Insbesondere die Sonografie und in zunehmendem Maße das MRT werden zur Zielsteuerung der Prostata-Biopsie eingesetzt, z. B. bei anhaltendem Tumorverdacht auch nach einer 12-Stanzen-Biopsie zur Durchführung einer Sättigungsbiopsie, bei der 20-30 Proben entnommen werden.

Die Unterscheidung zwischen gesunden und tumorösen Drüsen in der Biopsie oder im Operationspräparat wird anhand der An- oder Abwesenheit der Basalzellen, aus welchen die Drüsenzellen hervorgehen, sowie von zytologischen Atypien der Drüsenzellen getroffen. Das sichere Erkennen des Verlustes der Basalzellen ist daher eine Voraussetzung für die Diagnose eines Prostatakarzinoms. Oftmals wird dabei die Immunhistochemie zur Hilfe genommen, wobei Antikörper zur Detektion der Basalzellkeratine (z.B. 34ßE12 oder CK5/6) eingesetzt werden.

Liegt ein Karzinom vor, ist das wichtigste Merkmal zur Beurteilung der Tumoraggressivität der Gleason Grad. Es handelt sich dabei um die Einteilung der Architektur der Prostata-Drüsen nach einem Schema, das ursprünglich von dem amerikanischen Pathologen Donald Gleason in den 1960er Jahren etabliert wurde ^{9,10}

Von den ursprünglich 5 Erscheinungsbildern der Drüsen (Gleason-Muster 1-5, siehe Abbildung 3) werden heute nur noch die drei Muster 3, 4 und 5 verwendet. Während das Gleason Muster 3 weitgehend dem Erscheinungsbild einer normalen Prostata-drüse entspricht, ist das Gleason 4 Muster durch Verschmelzungen der Drüsen miteinander charakterisiert. Beim Gleason 5 dagegen ist das Drüsenmuster komplett aufgehoben und es finden sich Tumorzellen in einem ungeordneten Verband.

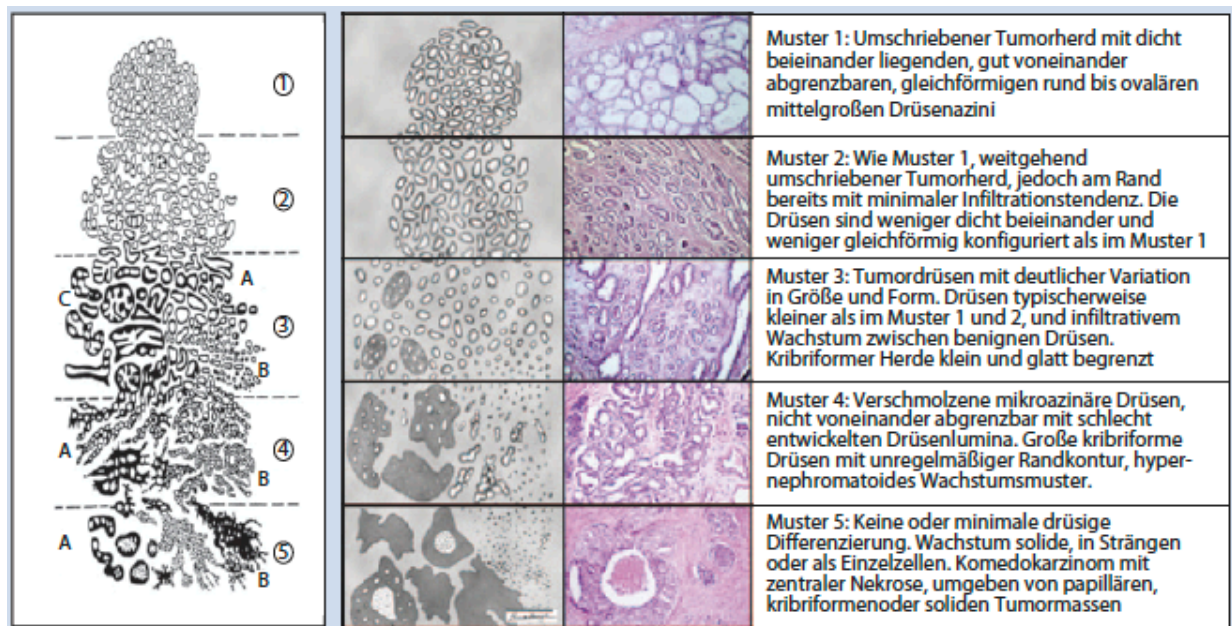


Abbildung 3: Histologisches Gleason-Grading System des Adenokarzinoms der Prostata.

a) Schematisches Originaldiagramm b) modifiziertes Grading nach Gleason

(aus: Uroonkologie, Rübben¹¹)

Der Gleason Grad wird aus dem primären und dem sekundären Muster gebildet. Das primäre Muster ist das im Tumor häufigste Gleason Muster, während das sekundäre Muster in der Regel dem zweithäufigsten Muster eines Tumors entspricht. Eine Ausnahme besteht allerdings dann, wenn als dritthäufigstes (und somit als seltenstes) Muster Gleason 5 Anteile vorhanden sind. Zudem werden unterschiedliche Regeln bei der Beurteilung von Biopsien und Operationspräparaten (radikalen Prostatektomien) angewendet. An der Prostatabiopsie wird der Gleason Score nach der Formel „das Häufigste + das Schlimmste“ Gleason Muster angegeben: Hier bildet nämlich das das schlimmste (und nicht das zweithäufigste) Gleason Muster den sekundären Gleason Grad. Beträgt z.B. in einer Prostata-Stanze der Gleason 3 – Anteil 60%, der Gleason 4 – Anteil 30% und der Gleason 5 – Anteil 10%, so ist der Gleason Grad der Stanze 3+5 (für den häufigsten + den schlimmsten Anteil). Bei Prostatektomien dagegen bildet das zweithäufigste Muster den sekundären Gleason Grad, während das dritthäufigste Muster als tertiärer Gleason Grad Erwähnung findet – aber auch nur dann, wenn es sich auch um das schlimmste Muster handelt. Im oben genannten Beispiel (Gleason 3 – Anteil 60%, Gleason 4 – Anteil 30% und Gleason 5 – Anteil 10%) würde daher an der radikalen Prostatektomie der Gleason Grad „3+4, Tertiär 5“ resultieren. Kommt nur ein einziges

Gleason-Muster vor, wird das Muster für den Gleason Grad verdoppelt: So z.B. Gleason 3+3 oder Gleason 4+4.

Die ursprüngliche Gleason-Graduierung wurde im Laufe der Jahre leicht modifiziert hin zur letzten Revision im Jahre 2016 ¹². Allerdings handelt es sich bei dieser letzten „Modifikation“ der Nomenklatur im Wesentlichen lediglich um eine Neubenennung der bisherigen Gleason Grad-Gruppen in „Prognosegruppen“, um die unterschiedliche Aggressivität der Tumoren je nach Gleason Grad besser zu verdeutlichen ¹³ (Tabelle 1).

Gleason Prognosegruppen	Entspricht dem Gleason Grad von
Prognosegruppe 1	≤ 6
Prognosegruppe 2	3+4=7
Prognosegruppe 3	4+3=7
Prognosegruppe 4	8 (4+4; 3+5; 5+3)
Prognosegruppe 5	9-10

Tabelle 1: Gleason Prognosegruppen und Gleason Grad-Gruppen

Nach histologischem Nachweis des Prostatakarzinoms ist in der Regel ein Staging, d.h. eine Bestimmung der Tumorausbreitung erforderlich. Beim Prostatakarzinom wird das klinische Tumorstadium nach dem TNM-System der Union „Internationale Contre le Cancer“ (UICC) (siehe Abbildung 4) und des „American Joint Committee on Cancer“ (AJCC) beurteilt. Dazu gehören die lokale Tumorausdehnung (T-Stadium), der Lymphknotenstatus (N-Stadium) und die Fernmetastasierung (M-Stadium). Es wird zwischen der klinischen (cTNM) und pathologischen (pTNM) Stadieneinteilung unterschieden. Bei der cTNM-Klassifizierung sind die Ergebnisse der körperlichen Untersuchungen und der bildgebenden Diagnostik tragend, während die pTNM-Einteilung auf dem postoperativen histologischen Befund des Prostatektomiepräparates basiert. Das Staging ermöglicht es anhand der Klinik eine individualisierte Therapieform für den Patienten zu finden und anhand der Pathologie eine prognostische Aussage treffen zu können.

<u>Stadium</u>	<u>Beschreibung</u>
T- Lokale Ausdehnung des Primärtumors	
T0	Kein Hinweis auf Primärtumor
T1	Zufällig gefundener Tumor, der klinisch nicht erkennbar ist
T1a	5% des entnommenen Gewebes oder weniger sind befallen
T1b	Mehr als 5% des entnommenen Gewebes sind befallen
T1c	Tumornachweis durch Nadelbiopsie
T2	Tumorgewebe auf Prostata begrenzt
T2a	Tumorbefall von weniger als der Hälfte eines Lappens
T2b	Tumorbefall von mehr als der Hälfte eines Lappens
T2c	Tumorbefall von beiden Lappen
T3	Tumor durchbricht die Prostatakapsel
T3a	Ausbreitung über die Prostatakapsel hinaus ohne Befall der Samenblasen
T3b	Ausbreitung über die Prostatakapsel hinaus mit Befall der Samenblasen
T4	Tumorbefall von Nachbarstrukturen und/oder fixierter Tumor
N- Regionäre Lymphknoten	
N0	Keine Metastasierung in regionäre Lymphknoten
N1	Metastasierung in regionäre Lymphknoten
M- Fernmetastasen	
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen
M1a	Fernmetastasen in nicht regionären Lymphknoten
M1b	Fernmetastasen im Knochen
M1c	Metastasen in anderen Organen

Abbildung 4: Stadieneinteilung des Prostatakarzinoms nach dem TNM-System (UICC)

1.3. Therapie

Nach der Diagnose eines Prostatakarzinoms sind allem voran das klinische Stadium und der Gleason-Score die entscheidenden Parameter für die Therapiewahl. Eine Vielzahl an Therapieoptionen stehen zur Verfügung - dazu gehören die Strategie der Aktiven Überwachung („Active Surveillance“), Operation, Bestrahlung (von außen oder innen), Hormon- und Chemotherapie, aber auch keine Therapie („Watchful Waiting“). Der Einsatz der Therapieform oder deren Kombination richtet sich danach, in welchem Stadium sich der Tumor befindet und ob es sich um einen einzelnen karzinomverdächtigen Befund (unifokal) oder mehrere suspekte Befunde (multifokal) handelt.

Bei Patienten mit der Zufallsdiagnose Prostatakarzinom mit grundsätzlich günstiger Prognose gilt es eine Übertherapie zu vermeiden, da bei den meisten lokalisierten Prostatakarzinomen die Annahme besteht, dass diese einen indolenten Krankheitsverlauf nehmen. Im frühen Stadium der Erkrankung hat man die Möglichkeit einer sogenannten „Aktiven Überwachung“ (engl. „Active Surveillance“), d.h. eines zunächst konservativ abwartenden Verhaltens unter engmaschiger Observation mit Kontrollmonitoring des PSA-Wertes und Kontrollbiopsien. Dabei wird der Patient aktiv in die Entscheidung miteinbezogen und die Risiken und Vorteile des Vorgehens und der gegebenen Alternativen erläutert. Voraussetzung für die Wahl der Active Surveillance sind aktuell die folgenden Parameter:

- PSA -Wert ≤ 10 ng/ml
- Gleason-Score ≤ 6
- cT1c und cT2a
- Tumor in ≤ 2 Stanzen
- ≤ 50 % Tumor pro Stanze

Das „Watchful Waiting“ ist als palliative Strategie streng von der Active Surveillance abzugrenzen. Es wird bei Patienten mit einer Lebenserwartung von weniger als 10 Jahren angeboten, um vor allem älteren Patienten bzw. Patienten mit schlechtem Allgemeinzustand die Belastungen einer Therapie zu ersparen, von der ohnehin keine Verlängerung der Lebensdauer zu erwarten ist. Nur im Fall einer klinisch symptomatischen Progression muss eine Intervention stattfinden.

Bei Patienten mit längerer Lebenserwartung, die aufgrund ihrer Tumorcharakteristika jedoch nicht für die Active Surveillance infrage kommen, kommt eine Form der aktiven

Intervention wie Operation, Bestrahlung oder antiandrogene Therapie zur Anwendung. Dabei kann unter Umständen kein kurativer Ansatz mehr gewählt werden, sodass die Einleitung einer palliativen Therapie - meist eine Kombination aus Hormon- und Chemotherapie - im fortgeschrittenen Stadium des Prostatakarzinoms empfohlen wird. Die antiandrogene Therapie kommt grundsätzlich als Primäransatz bei schlechtem Allgemeinzustand oder fortgeschrittenem Alter als Option in Frage, gehört aber zu der nicht kurativen Behandlungsform. Die Chemotherapie spielt vor allem bei hormonrefraktären Tumoren eine wichtige Rolle.

Aktuell ist der Goldstandard bei lokalisiertem Prostatakarzinom und kurativem Ansatz eine radikale Prostatektomie. Zu den möglichen schwerwiegenden Nebenwirkungen dieser Therapie zählen Impotenz und Harninkontinenz, welche die Lebensqualität der betroffenen Patienten erheblich mindern können. Aus Autopsiestudien ist allerdings bekannt, dass zwar eine große Anzahl von Männern ein Prostatakarzinom in sich „tragen“, aber offensichtlich nicht daran leiden ¹⁴, denn sie wurden zu Lebzeiten niemals mit einer Prostatakrebs Symptomatik auffällig. Dies lässt darauf schließen, dass viele Prostatakarzinome derart wenig aggressiv sind, dass sie vermutlich überhaupt nicht behandlungsbedürftig sind. Das PSA-Screening deckt allerdings viele solcher Fälle auf und stellt die betroffenen Männer somit vor das Problem, entweder mit dem Risiko einer vielleicht doch progredient verlaufenden Krebserkrankung ohne Therapie zu leben, oder aber sich für die invasive Therapie mit der Sicherheit der Tumorentfernung, aber auch allen damit verbundenen Risiken zu entscheiden. Schätzungen zufolge werden daher aktuell etwa 40% der diagnostizierten Prostatakarzinome übertherapiert ¹⁵.

1.4. Prognose

Aussagen zur individuellen Prognose des Prostatakarzinoms sind schwierig. Der an der Stanze am besten etablierte Prognoseparameter ist der Gleason Grad. Dieser Parameter ist zwar statisch sehr stark, aber für die Vorhersage des Krankheitsverlaufes des einzelnen Patienten dennoch nicht ausreichend. Zur Verbesserung wurden sogenannte Nomogramme entwickelt, die pathologische und klinische Befunde kombinieren, um die Aggressivität des Karzinoms bestmöglich einzuschätzen. Beispiel hierfür sind das CAPRA (Cancer of the Prostate Risk Assessment) oder das Kattan-Nomogramm, die dazu dienen die Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs oder Metastasenentwicklung nach radikaler Prostatektomie bzw.

Strahlentherapie zu quantifizieren und die standardisierten Parameter wie präoperativen PSA-Wert, Gleason-Grad in der Biopsie, Prozent positiver Stenzen, Alter und das klinische Stadium einschließen. Weitere Verbesserungen erhofft man sich durch den Einschluss molekularer Marker. So sind in den letzten Jahren einige Testsysteme kommerziell verfügbar geworden, die basierend auf Expressionsanalysen mehrerer Gene in der Tumorseite verbesserte Vorhersagen der Tumoraggressivität versprechen. Das Ergebnis des jeweiligen Tests ist eine Zahl „Genomic Prostate Score (GPS)“ die in der Zusammenschau mit Gleason Score und PSA eine Hilfestellung bei der Therapieentscheidung und Therapiewahl bietet. Die wichtigsten Tests sind in Tabelle 2 aufgelistet ¹⁶. Anwendung finden sie im klinischen Alltag jedoch nur relativ selten und wenn, dann weitgehend auf die USA beschränkt. Die Validierungsstudien z.B. zum Prolaris Test ^{17,18} deuten an, dass ein sorgfältig durchgeführtes Gleason-Grading immer noch eine höhere prognostische Aussagekraft hat als der Test: In diesen Studien wurden z.B. die prognostisch stark unterschiedlichen Tumoren mit Gleason 3+4 / 4+3 grundsätzlich in einer Gruppe (Gleason 7) zusammengefasst. Entsprechend werden die Testkosten z.B. von den deutschen Krankenkassen nicht erstattet.

Oncotype DX	Genomic Health Inc., Redwood City, CA, USA	Gewebe	Prognostisch→ 17 Karzinomgene an positiven Biopsien
Prolaris	Myriad Genomic Inc., Salt Lake City, UT, USA	Gewebe	Prognostisch→ 46 aggressive Gene an positiven Biopsien
Decipher	GenomeDx Biosciences, San Diego, CA, USA	Gewebe	Genetischer Test nach Prostatektomie, 22 Gene zur Risiko der Metastasierung
Confirm MDx	MDxHealth, Irvine, CA, USA	Gewebe	Diagnostisch
SelectMDx	MDxHealth, Irvine, CA, USA	Urin	Diagnostisch

Tabelle 2: Molekulare Prostatakarzinom-Tests

1.5. Genetik des Prostatakarzinoms

Im Rahmen von internationalen Tumorgenom-Sequenzierungsprogrammen wie dem TCGA (The Cancer Genome Atlas) und ICGC (International Cancer Genome Consortium) wurden bisher fast 4.000 Genome von Prostatakarzinomen aller Stadien, von früh auftretenden „early onset“ Tumoren von Patienten unter 50 Jahren bis hin zu extrem fortgeschrittenen metastatischen und hormonrefraktären Karzinomen, umfassend hinsichtlich ihrer cyto- und molekulargenetischen Eigenschaften charakterisiert. Zu den wesentlichen Erkenntnissen zählt, dass „typische“ Prostatakarzinome zwar häufig strukturelle Veränderungen der Chromosomen aufweisen, aber (im Vergleich zu anderen soliden Tumoren) nur relativ selten Mutationen von „klassischen“ Tumorsuppressor- oder Onkogenen zeigen.

Die häufigste strukturelle Veränderung ist die Fusion der Transmembran Serinprotease 2, TMPRSS2, mit dem Transkriptionsfaktor „ETS-related gene“ (ERG) aus der Familie der „erythroblast transformation-specific“ (ETS)- Transkriptionsfaktoren ¹⁹. Sie kommt in etwa der Hälfte aller Prostatakarzinome vor ^{19–22} und ist insbesondere bei jungen Patienten unter 50 Jahren besonders gehäuft ^{23,24}. Während TMPRSS2 normale Funktionen der Prostatazelle steuert, ist ERG in diesen Zellen normalerweise nicht aktiv. Sowohl TMPRSS2 (21q22.3) als auch ERG (21q22.2) befinden sich im Abstand von etwa 3,7 Megabasenpaaren auf dem langen Arm vom Chromosom 21. TMPRSS2 ist ein Androgen-abhängiges Gen, dessen Transkription durch die Bindung von aktiviertem Androgenrezeptor an den TMPRSS2-Promoter gesteuert wird. Dieser Prozess ist durch Um- und Überlagerungen der DNA-Doppelhelix gekennzeichnet, in deren Folge das TMPRSS2-Gen in die Nähe des ERG-Genes gelangt. Durch zufällige Fehlfunktionen von DNA-Reparatursystemen kommt es häufig zum Bruch mit anschließender Fehlverknüpfung der DNA, wodurch Teile des TMPRSS2-Genes direkt mit dem ERG-Gen fusioniert werden ²⁰. Vermutlich sind der höhere Androgenspiegel und die somit aktivere Androgen-abhängige Transkriptionssteuerung bei jüngeren Männern daher auch der Grund für die o.g. Häufung der TMPRSS2:ERG Fusion bei jüngeren Patienten ^{23,24}. Als Folge dieser Genfusion kommt ERG unter die Kontrolle des TMPRSS2 Promotors und wird massiv exprimiert ^{19,25}, was zur Deregulierung von mehr als 1.600 Genen führt ^{26–28}. Auf welche Art und Weise ERG die weitere Progression der betroffenen Zellen beeinflusst, ist nicht abschließend geklärt. Untersuchungen an mehr als 10.000 Tumoren zeigen, dass die ERG Fusion an sich keinen Einfluss auf die Patientenprognose hat ²⁹. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass ERG mit anderen genetischen Veränderungen interagiert und so zur Tumorprogression beiträgt. Diese Annahme wird dadurch

untermauert, dass eine ganze Reihe von genetischen Veränderungen häufiger in Tumoren mit ERG Fusion auftreten als in solchen ohne Fusion. Ein wichtiges Beispiel für eine solche kooperative Veränderung ist die Deletion des „Phosphatase und Tensin homolog“ (PTEN) Tumorsuppressorgenes. In Mausmodellen wurde gezeigt, dass ERG-Aktivierung und PTEN-Verlust nur zusammen ein invasives Tumorwachstum ermöglichen ^{30,31}. Es wird vermutet, dass hierbei ERG die Fähigkeit zur Tumorzellmigration beiträgt, während die PTEN Deletion die Tumorzellproliferation antreibt ^{30,32,33}.

Überhaupt stellen Deletionen chromosomaler Regionen nach der TMPRSS2:ERG Fusion die nächsthäufige Gruppe genetischer Veränderungen des Prostatakarzinoms dar. Die häufigste Deletion betrifft den Kurzen Arm von Chromosom 8 und wird in etwa 40% der Tumoren gefunden ³⁴. Eine Liste der wichtigsten Deletionen des Prostatakarzinoms und ihrer Häufigkeit ist in Tabelle 3 gezeigt.

Deletionsregion	Gene	Häufigkeit
8p21	NKX3-1	30-40%
13q21	KLF5; RB1; RCA2	20-30%
6q	MAP3K7	20-30%
16q	CDH1	20-30%
5q	CHD1; APC	15-25%
10q23	PTEN	15-25%
18q	SMAD4; BCL2	10-20%
12p13	p27/Kip1; CDKN1B	10-20%
3p	FOXP1; RYBP; SHQ1	10-20%

Tabelle 3: Deletionen beim Prostatakarzinom³⁴⁻⁴⁰

Fast alle diese Deletionen sind entweder mit ERG Fusions-positiven Tumoren (z.B. 3p, 10q (PTEN), 8p, 16q) oder ERG Fusions-negativen Tumoren (z.B. 5q, 6q, 13q) assoziiert. Dass

zudem grundsätzlich alle diese Deletionen mit einer ungünstigen Prognose assoziiert sind, erklärt daher vielleicht auch die fehlende Prognose-Relevanz von ERG. Die meisten Deletionen weisen eine variable Ausdehnung auf und betreffen nur eines der beiden Chromosomen. Eine Studie zur prognostischen Bedeutung der 6q-Deletionen z.B. zeigt, dass die Länge der Deletion während der Tumورprogression zunehmen kann und dass längere Deletionen aggressivere Tumoren kennzeichnen als kurze Deletionen. Es wird vermutet, dass kooperative Effekte einer zunehmenden Zahl von heterozygot-inaktivierten Genen die tumorbiologische Wirkung verursachen ⁴¹.

Mutationen auf der Ebene einzelner oder weniger Basen der DNA sind beim Prostatakarzinom – ganz im Gegensatz zu den meisten anderen soliden Tumoren – selten oder zumindest weitgehend auf sehr fortgeschrittene Tumoren beschränkt. Mit ca. 6-15% ist die E3-Ubiquitin Ligase SPOP1 (Speckle-type POZ protein) das am häufigsten mutierte Gen ^{42,43}. Bemerkenswerterweise ist die Mutation praktisch auf ERG-negative Tumoren beschränkt. Das am häufigsten mutierte „klassische“ Tumorsuppressorgen ist p53 – jedoch sind nur weniger als 5% der Tumoren betroffen ⁴⁴. Die Inaktivierung von p53 (sei es durch Mutation oder Deletion) charakterisiert in jedem Fall prognostisch äußerst ungünstige, fortgeschrittene und meist metastatische Tumoren ⁴⁵.

1.6. Die Rolle von CRISP3 und SPINK1 beim Prostatakarzinom

Zu den interessantesten ERG-assoziierten Veränderungen beim Prostatakarzinom zählen die Gene CRISP3 (Cystein-reiches sekretorisches Protein 3) und SPINK1 (Serin-Peptidase-Inhibitor Kazal Typ 1), die relativ strikt nur in ERG-positiven (CRISP3) bzw. ERG-negativen Tumoren (SPINK1) exprimiert sind. Die Überexpression beider Gene geht im jeweiligen Subtyp mit ungünstigen Tumorparametern und schlechter Patientenprognose einher ⁴⁶⁻⁵⁰.

In diversen Untersuchungen wurde das Cystein-reiche sekretorisches Protein 3 (CRISP3) durch seine Überexpression im Prostatakarzinom als wichtiger molekularer Marker diskutiert ⁴⁹⁻⁵¹. Das auf dem Chromosom 6 befindliche Glykoprotein wurde initial in den neutrophilen Granulozyten nachgewiesen und wird nicht nur in der Prostata-drüse, sondern auch in anderen exokrinen Drüsen wie Speicheldrüsen oder Pankreas exprimiert ⁵². Seine abschließende Rolle in der Tumorgenese ist jedoch nicht abschließend geklärt.

Die starke Assoziation der CRIPS3 Überexpression zu Tumoren mit ERG Fusion erklärt sich teils durch den Umstand, dass ERG einer der Transkriptionsfaktoren ist, die an der Steuerung der CRIP3 Expression beteiligt sind ⁵¹. Allerdings wird die CRISP3 Expression auch von 2,5-56% ERG Fusions-negativer Tumoren berichtet ^{48,53}; und andersherum findet sich eine SPINK1 Expression auch in 0,28-4% der ERG-positiven Tumoren ⁵⁴⁻⁵⁶.

Bei SPINK1, auch als Tumor-assoziiierter Trypsin-Inhibitor (TATI) oder pankreatischer sekretorischer Trypsin-Inhibitor (PSTI) bezeichnet, handelt es sich um ein aus vier Exons bestehendes Gen auf dem Chromosom 5, welches für einen Serinprotease-Inhibitor (Kazal Typ 1) kodiert. Im Pankreas verhindert SPINK1 durch Blockade von aktivem Verdauungsenzym Trypsin seine vorzeitige Aktivierung und bietet somit einen Schutzmechanismus gegen die Autolyse des Pankreas ⁵⁷.

In verschiedenen Organen wie z.B. Lunge, Ovar oder Niere findet man bei bösartigen Tumoren eine Überexpression von SPINK1, sodass das Protein auch als prognostischer Marker gehandelt wird. Im Prostatakarzinom wird ein Zusammenhang zwischen seiner Expression und dem Gleason-Score vermutet ^{26,58,59}.

In Studien konnte mittels experimentellen Modellsystemen SPINK1 als ein Akute-Phase Protein und Wachstumsfaktor identifiziert und ein signifikanter Einfluss von SPINK1 auf Tumorzellwachstum und Inhibition der Apoptose gezeigt werden ⁶⁰

1.7. Multifokalität und Heterogenität

Etwa 60-80% der Prostatakarzinome treten initial multifokal auf ⁶¹ und zeichnen sich durch eine inter- und/oder intrafokale histologische und molekulare Heterogenität aus. Hieraus erwächst das klinische Problem, dass unterschiedlich aggressive Typen oder Stadien von Prostatakarzinomen nebeneinander in einem Patienten vorliegen können und die Therapie daher optimalerweise an den schlimmsten Tumorzell-Subklon angepasst werden muss. Gerade bei individualisierten Therapien, bei denen bestimmte molekulare Veränderungen nachgewiesen werden müssen, ist die Tumorheterogenität ein wichtiges Problem. Andererseits stellt die Heterogenität eine besondere Chance zum Verständnis der klonalen Evolution vom Tumor dar. So kann davon ausgegangen werden, dass besonders frühe, Tumor-initiierende genetische Veränderungen praktisch in allen Tochterzellen des Tumors vorhanden sein

müssen, während späte Veränderungen, die erst im fortgeschrittenen Stadium hinzukommen, nur in einem Subset der Tumorzellen zu finden sein dürften.

Untersuchungen zur Tumorerheterogenität sind allerdings aufwändig und verlangen eine möglichst systematische Untersuchung unterschiedlicher Tumorareale. Die Gewebemikroarray (Tissue Microarray, TMA) Technologie eignet sich in besonderer Form für solche Studien. Der grundsätzliche „Nachteil“ dieser Technologie, nämlich dass eine einzelne Stanze (typischerweise 0.6 mm im Durchmesser) nur einen winzig kleinen Teil eines Tumors abdeckt, wird hierbei zu einem wichtigen Vorteil, weil eine Vielzahl von Gewebestücken aus den verschiedensten Tumorbereichen mit wenig Aufwand gleichzeitig untersucht werden können und damit optimal dessen Heterogenität widerspiegeln. Mit dieser Methodik konnte z.B. die molekulare Heterogenität und Reihenfolge des Auftretens von PTEN Deletionen ⁶² oder der 6q Deletion ⁶³ im Vergleich zur ERG Fusion geklärt werden.

1.8. Ziel der Arbeit

Untersuchungen zur Heterogenität molekularer Veränderungen innerhalb eines Tumors stellen eine Chance zum Verständnis der biologischen Abläufe während der Tumorerprogression dar. ERG, SPINK1 und CRISP3 sind drei häufig veränderte Proteine des Prostatakarzinoms, die durch ihre charakteristischen Assoziationen zueinander imponieren. Bisherige Untersuchungen dieser Gene waren meist auf die Häufigkeit ihrer Expressionsveränderung und deren Assoziation mit klinisch-pathologischen Parametern des Prostatakarzinoms beschränkt. Eine detaillierte Untersuchung des relativen zeitlichen Verlaufes ihrer molekularen Veränderungen in einem großen Tumorkollektiv fehlt bislang.

Ziel der Arbeit ist es daher, durch die systematische Analyse der Ko-Expression von ERG, SPINK1 und CRISP3 in verschiedenen Arealen von Prostatakarzinomen Hinweise auf die zeitlichen Abläufe der Expressionsveränderungen dieser drei Gene während der Tumorerprogression zu erhalten.

2. Material und Methoden

2.1. Patientenproben und Tissue Microarray (TMA) Konstruktion

Für die Herstellung des Heterogenitäts-TMAs wurden insgesamt 317 konsekutive Prostatakarzinome ausgewählt, die in der Martiniklinik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE) zwischen Januar und März 2010 radikal prostatektomiert wurden. Die histologische Aufarbeitung erfolgte standardisiert nach einem modifizierten Stanford-Protokoll⁶⁴: Die kompletten Prostaten einschließlich Samenblasen und anhängender Lymphknoten wurden in 4% gepuffertem Formalin fixiert, in serielle, ca. 3 mm dicke Scheiben senkrecht zu der rektalen Oberfläche zugeschnitten und diese in Paraffin eingebettet. Alle Gewebsstücke wurden eindeutig bezeichnet und ihre räumliche Zuordnung zueinander fotografisch dokumentiert. Ein Beispiel ist in Abbildung 5 gezeigt.

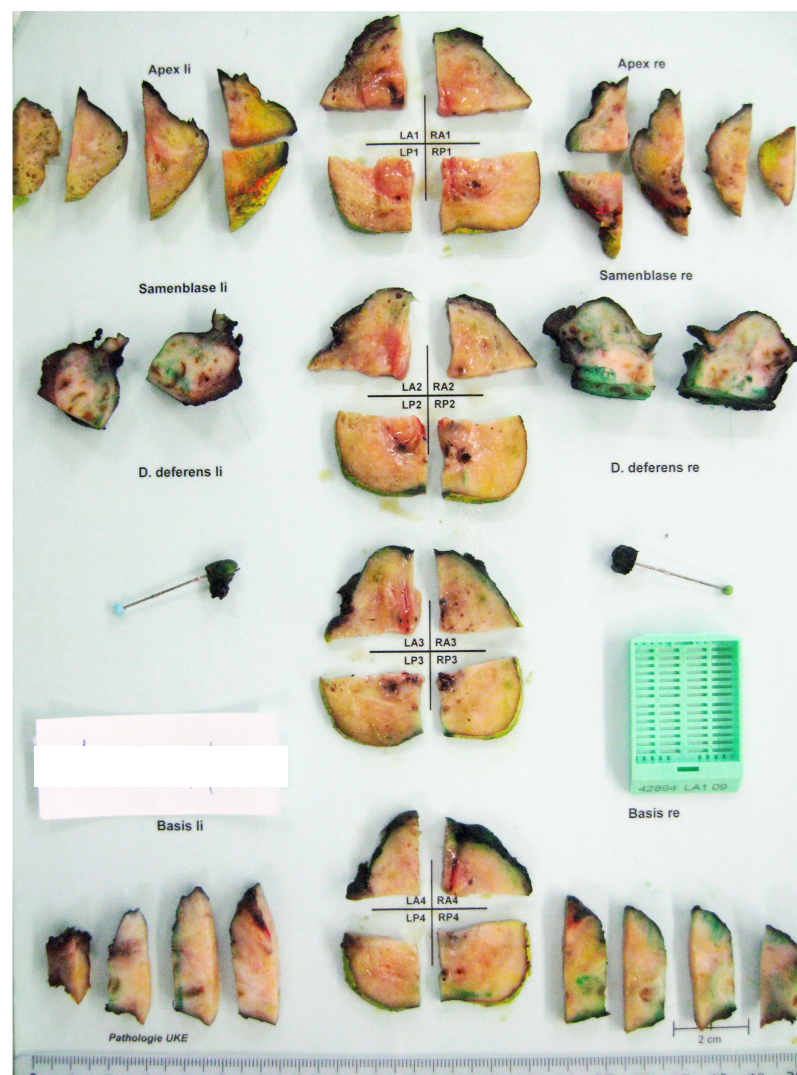


Abbildung 5: Aufarbeitung eines Prostatatektomiepräparates in Geweblöcke

Von jedem Block wurde ein HE-gefärbter Schnitt angefertigt und mikroskopisch auf die An- oder Abwesenheit von Tumor untersucht. In jeder Prostata wurden zudem die Anzahl und Lage unabhängiger Tumoren anhand der Kriterien von Wise et al.⁶⁵ bestimmt. Zwei Tumorfoci wurden dann als unabhängige Tumoren interpretiert, wenn sie innerhalb desselben Schnittes mehr als 3 mm voneinander entfernt waren, oder wenn sie in aneinander angrenzenden unterschiedlichen Schnitten mehr als 4 mm voneinander entfernt waren.

Für die TMA Konstruktion wurden bis zu 10 verschiedene tumorhaltige Gewebeblöcke aus dem größten Tumorfokus jeder der 317 Prostataen ausgewählt. Von jedem Tumorblock wurde eine 0,6 mm Stanze für die TMA Konstruktion verwendet und die 10 Stanzen eines jeden Tumors wurden nebeneinander in den TMA Block eingebracht. Bei Tumoren mit weniger als 10 tumorhaltigen Blöcken wurden die verfügbaren Blöcke teils mehrfach gestanzt, um die Anzahl von 10 Stanzen je Tumor beizubehalten. In jedem Fall (d.h., bei Tumoren mit mehr oder weniger oder genau 10 tumorhaltigen Blöcken) wurden die Blöcke und Tumorbereiche zur TMA Konstruktion so selektiert, dass eine möglichst optimale Repräsentation des gesamten Tumors mit größtmöglichem Abstand der gestanzten Tumorareale erreicht wurde. Dieses Vorgehen resultierte in 7 TMA Blöcken mit insgesamt 3.170 TMA Stanzen (6 TMA Blöcke mit je 500 Spots, 1 Block mit 170 Spots) aus 317 unterschiedlichen Tumorfoci. An einem HE-Schnitt des TMA wurde die Präsenz von Tumorzellen in jedem TMA Spot bestätigt. Ein Foto des TMAs ist in Abbildung 6 gezeigt.

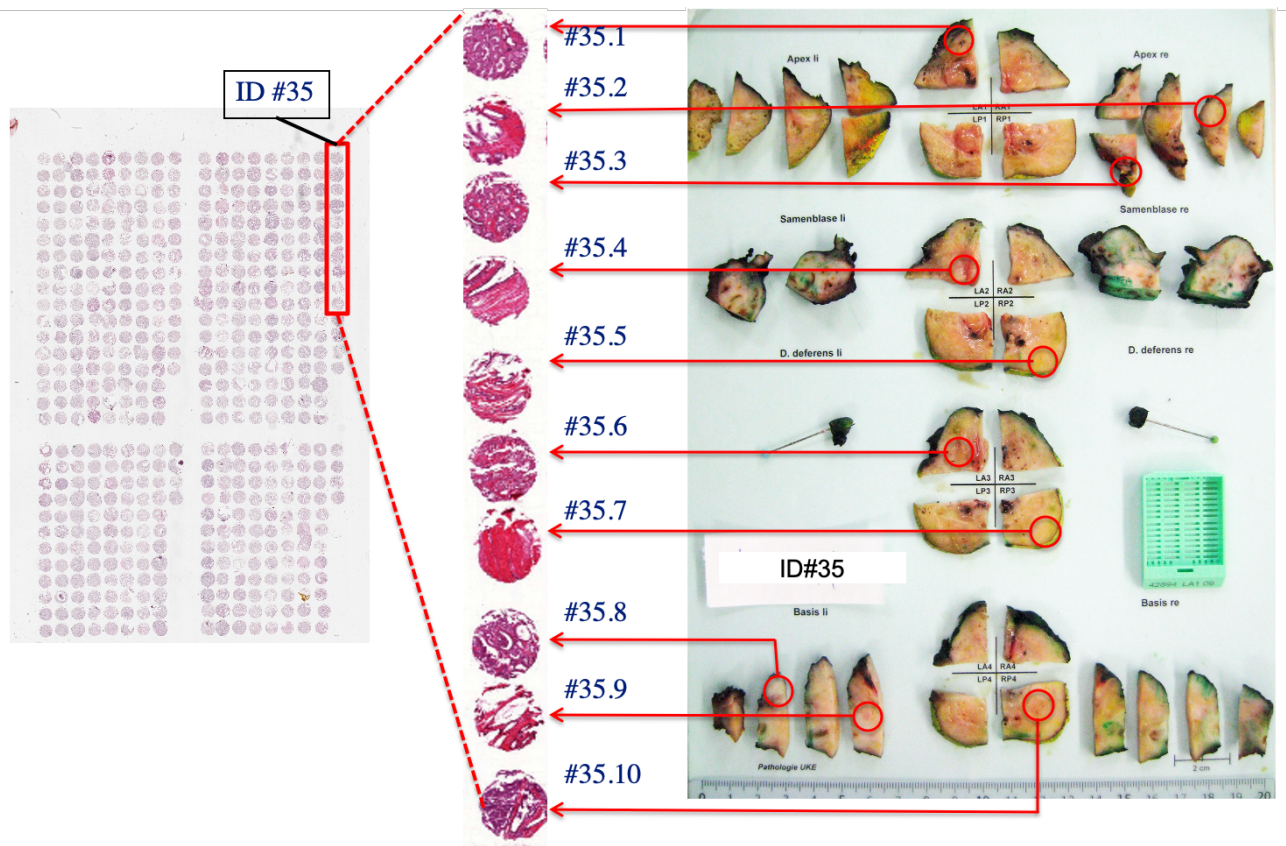


Abbildung 6: Übersichtsbild eines Blockes des Heterogenitäts-TMA mit 500 TMA Spots. Die 10 zugehörigen Spots eines Tumors (hier: #35) sind markiert.

2.2. Immunhistochemie (IHC)

Die immunhistochemische Analyse von ERG, SPINK1 und CRISP3 wurden von jedem Block des TMAs 3 Schnitte von je 4 μ m mit einem Mikrotom frisch (d.h., am Tag vor der Analyse) geschnitten, auf den Objektträger gezogen, über Nacht bei 80°C auf dem Objektträger angetrocknet, mit Xylol entparaffiniert und in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70-100% EtOH) entwässert. Die so vorbereiteten Schnitte wurden einer speziellen hitze-induzierten Antigen-Demaskierung im Autoklaven bei 121° unterzogen: Die zur Färbung von ERG und CRISP3 vorgesehenen Objektträger wurden dabei in einem TRIS-EDTA Puffer mit einem pH-Wert von 7,8 inkubiert, die Schnitte für SPINK1 bei einem pH-Wert von 6,0 in einem Citratpuffer. Nach dem Abkühlen der Objektträger wurde der jeweilige Primärantikörper zugegeben: Anti-ERG (Epitomics, Kalifornien, USA, Klon EPR3864, Verdünnung 1:450), anti-CRISP3 (Abcam, Cambridge, UK, ab105951, Verdünnung 1:450) und anti-

SPINK1 (Sigma, St. Louis, USA, Klon 4D4, Verdünnung 1:40). Die gebundenen Primärantikörper wurden mit dem EnVision Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, USA), einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper und Diaminobenzidin als Substrat sichtbar gemacht, infolgedessen ein brauner Niederschlag an der Stelle des gebundenen Antikörpers im Gewebe produziert wird.

Für ERG wurde jegliche nukleäre Färbung als „positiv“ interpretiert, für SPINK1 und CRISP3 jegliche cytoplasmatische und/oder extrazelluläre Färbung. Beispiele von positiver und negativer Färbung der drei Proteine sind in Abbildung 7 zu sehen.

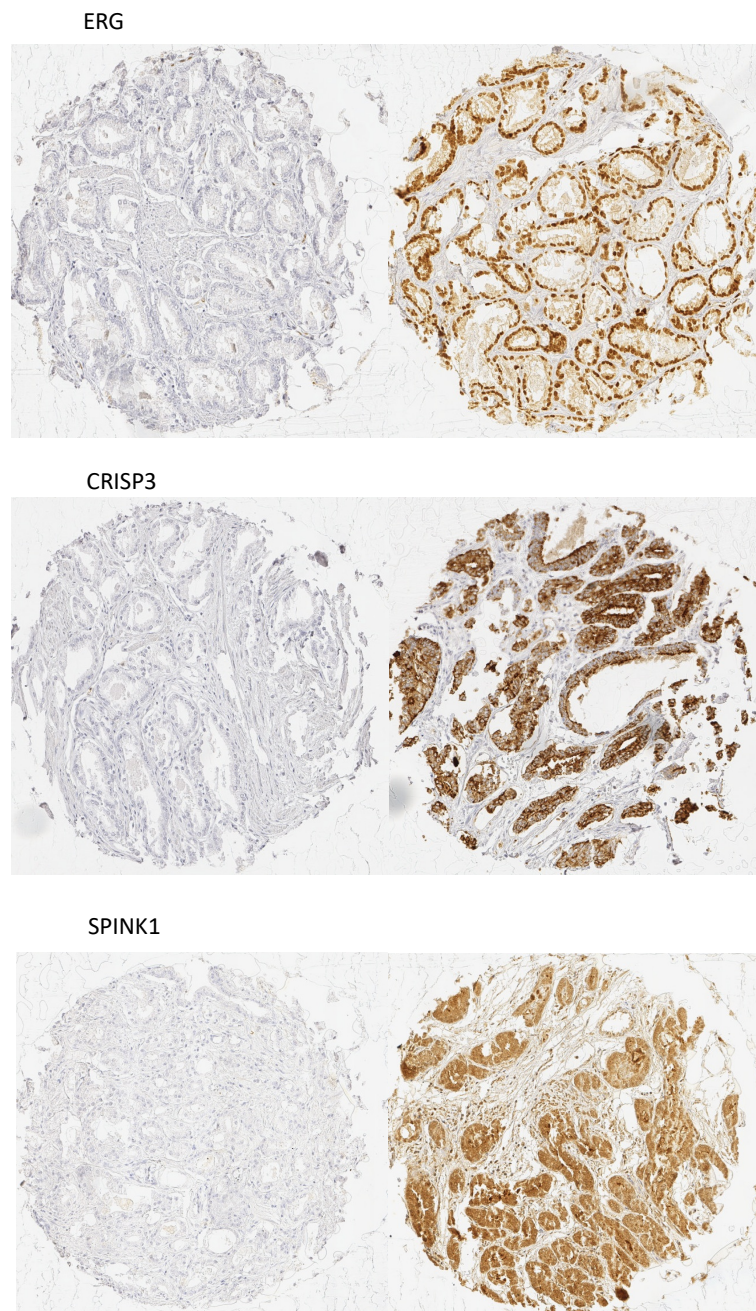
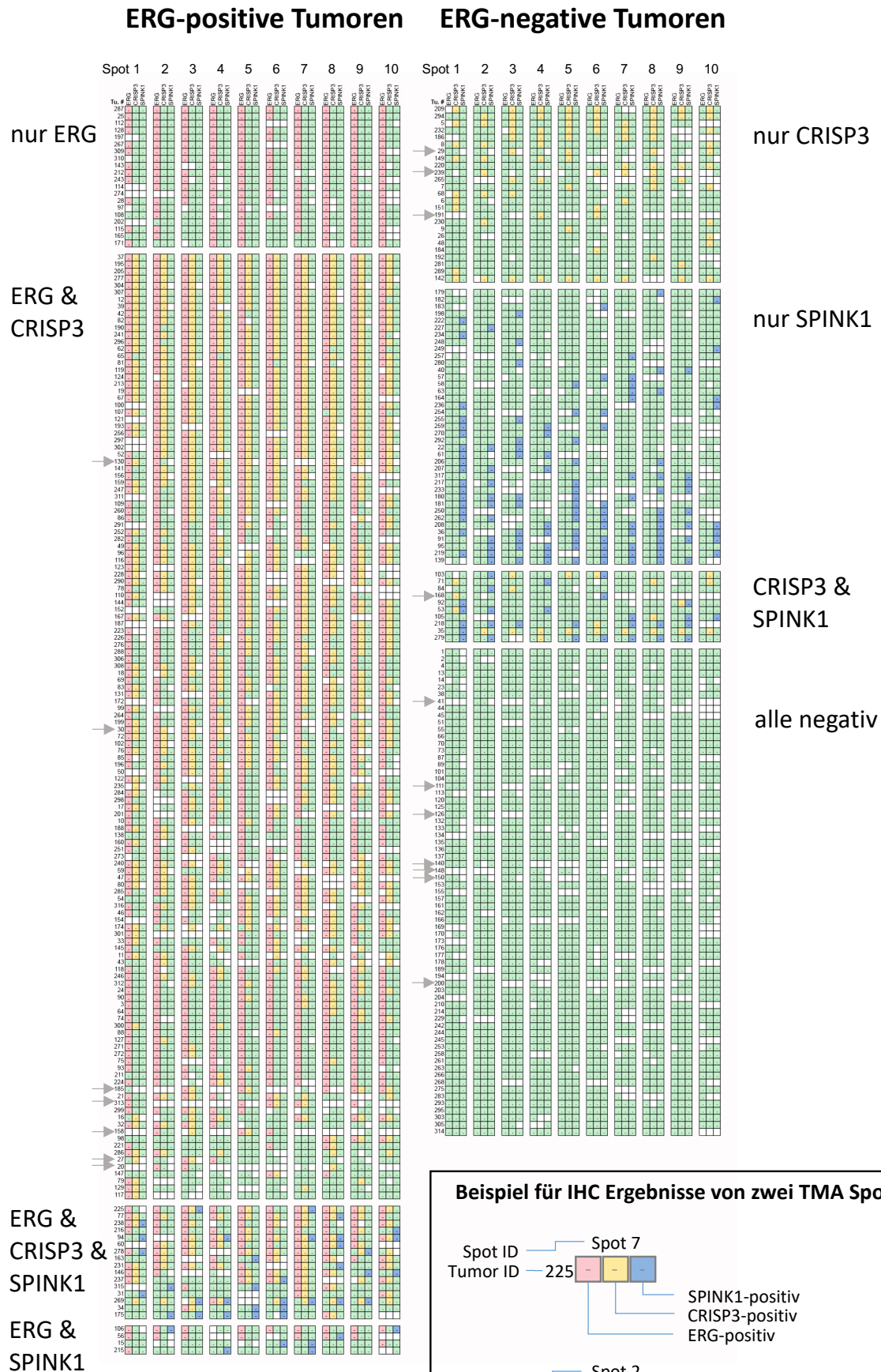


Abbildung 7: Beispiele für positive und negative Färbung für ERG, SPINK1 und CRISP3

3. Ergebnisse

3.1. Technische Aspekte

Interpretierbare Ergebnisse für alle drei Marker (ERG, CRISP3 und SPINK1) fanden sich in 2.480 (78,2%) der 3.170 Gewebestanzten von den 317 Tumoren des Heterogenitäts-TMAs. Insgesamt 299 der 317 Karzinome wurden in die Studie aufgenommen, weil sie mindestens 5 TMA Stanzen mit interpretierbaren Ergebnissen für alle drei Marker enthielten. Die restlichen 18 Tumore hatten weniger als 5 auswertbare Gewebespots für ERG, CRISP3 und SPINK1 und wurden daher von der Auswertung ausgeschlossen. Unter den 299 Tumoren der Studienkohorte waren 49 Karzinome mit 10 für jeden Marker auswertbaren Stanzen, 97 Karzinome mit 9 für jeden Marker auswertbaren Stanzen, 76 Karzinome mit 8 auswertbaren Stanzen, 45 Karzinome mit 7 auswertbaren Stanzen, 24 Karzinome mit 6 auswertbaren Stanzen und 8 Karzinome mit 5 auswertbaren Stanzen. 248 der 299 Karzinome zeigten unterschiedliche Expression der drei Marker in den verschiedenen Tumorspots und waren daher geeignet, um Rückschlüsse auf die Abfolge der molekularen Ereignisse zu ziehen. Bei den restlichen 51 Karzinomen war dies nicht möglich: 30 Tumore zeigten eine homogene Ko-Expression von ERG und CRISP3 in allen Spots, die es unmöglich machte zu bestimmen, ob ERG oder CRISP3 das „frühere“ Ereignis war. Die anderen 21 Tumore zeigten Expressionsmuster, die es nahelegten, dass es sich um ineinander gewachsene unterschiedliche Tumorfoci („Kollisionstumoren“) handelte, die durch die Kriterien von Wise et al.⁶⁵ nicht als solche erkennbar waren. Eine grafische Übersicht über Expressionsstatus aller drei Proteine in der gesamten Kohorte von 317 Tumoren ist in Abbildung 8 dargestellt.



ERG & CRISP3 & SPINK1

225

77

218

216

60

278

163

231

237

315

31

269

34

175

ERG & SPINK1

106

15

215

Beispiel für IHC Ergebnisse von zwei TMA Spots

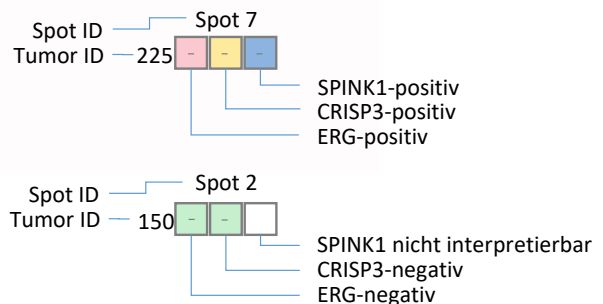


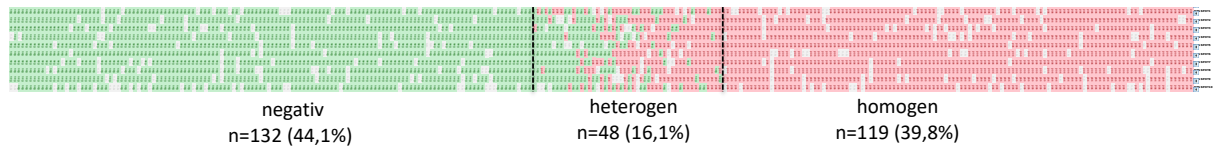
Abbildung 8: Grafische Darstellung aller immunhistochemischen Ergebnisse der für den TMA ausgewählter Gewebespots aus den 317 Prostatakarzinomfällen. Die Tumoren wurden zur besseren Übersicht eingeteilt nach ERG-negativen und ERG-positiven Tumoren und zusätzlich gruppiert nach ihrem Ko-Expressionsmuster. Die 18 aus der gesamten Studie ausgeschlossenen Tumoren sind mit einem grauen Pfeil gekennzeichnet.

3.2. Heterogenität von ERG, CRISP3 und SPINK1

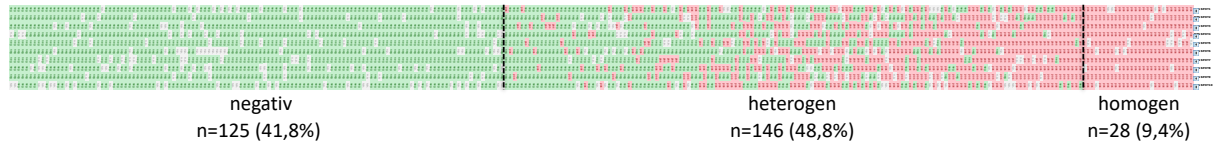
In den 299 Tumoren, die für weitere Analysen eingeschlossen wurden, war mindestens ein positiver Gewebespot für ERG in 167 (55,9%), für CRISP3 in 174 (58,2%) und für SPINK1 in 68 Tumoren (22,7%) zu finden. Um herauszufinden, ob diese Marker während der Tumorentwicklung früher oder später auftreten, wurde der Anteil der Tumore mit homogener und heterogener Färbung für jeden Marker bestimmt. Insgesamt 119 der 167 (71,3%) ERG-positiven Tumoren waren homogen positiv, d.h., alle interpretierbaren Spots dieser Tumoren waren ERG-positiv. Dieser Befund lässt darauf schließen, dass die ERG-Expression bei diesen Karzinomen bereits früh auftrat.

Der Anteil homogen positiver Tumoren für CRISP3 und SPINK1 war deutlich kleiner: nur 28 der 174 (16,1%) CRISP3-positiver und 1 von 68 (1,5%) SPINK1-positiver Tumoren zeigten eine homogene Positivität. Das deutet wiederum darauf hin, dass diese Marker erst später während der Tumورprogression aktiviert werden. Alle Daten sind in der Abbildung 9 zusammengefasst.

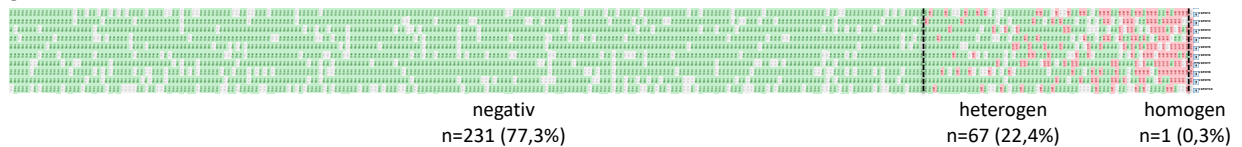
ERG



CRISP3



SPINK1



- IHC negativ
- IHC positiv

Abbildung 9: Heterogenitätsverteilung von ERG, CRISP3 und SPINK1 in 299 Fällen von Prostatakarzinomen. Alle interpretierbaren Stansen aus 299 Tumoren sind durch grüne (negativ) und rote (positiv) Farbe repräsentiert. Nicht interpretierbare Fälle sind durch graue Farbe gekennzeichnet. Der Anteil der Tumoren mit homogenen und heterogenen immunhistochemischen Ergebnissen sind in den Untergruppen, die jeweils positiv für ERG (n=167), CRISP3 (n=174) und SPINK1 (n=68) waren, angedeutet.

3.3. Ko-Expressionsmuster von ERG, CRISP3 und SPINK1

Die Ko-Expressionsmuster von ERG, CRISP3 und SPINK1 aller 299 Karzinome sind in Abbildung 10 zusammengefasst. Für diese Analyse wurden Tumore für einen bestimmten Marker als positiv erachtet, wenn mindestens ein Gewebespot ein positives Ergebnis hatte. Ko-Expression war am häufigsten für ERG und CRISP3 in 127 (42,5%) Tumoren, jedoch selten für CRISP3 und SPINK1 in 9 (3,0%) oder ERG und SPINK1 in 4 (1,3%) Tumoren. Dementsprechend war eine CRISP3 Färbung signifikant mit ERG-positiven Tumoren assoziiert: CRISP3 Färbung wurde in 143 von 167 (85,6%) ERG-positiver aber nur in 31 von

132 (23,5%) ERG-negativen Tumoren gefunden ($p<0.0001$). Im Gegensatz dazu war SPINK1 Expression massiv mit ERG-negativen Tumoren assoziiert: SPINK1 Expression fand sich in 48 von 132 (36,4%) ERG-negativen Tumoren, im Vergleich zu 20 von 167 (12%) ERG-positiven Tumoren ($p<0.0001$).

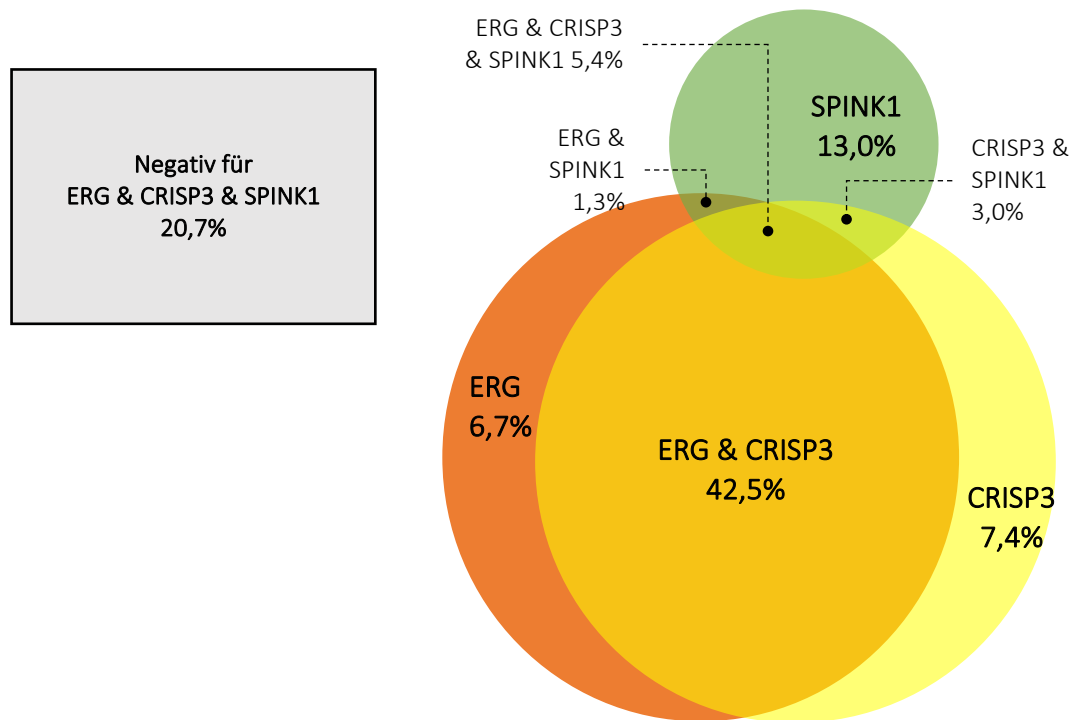


Abbildung 10: Ko-Expressionsmuster von ERG, CRISP3 und SPINK1 in 299 Prostatakarzinomen.

3.4. Zeitliche Abfolge von ERG und CRISP3 Expression

Für die Bewertung der chronologischen Abfolge der TMPRSS2:ERG Fusion und CRISP3 Expression wurden speziell die Subgruppen der 119 homogen ERG-positiven Tumoren und der 28 homogen CRISP3-positiven Tumoren untersucht. Offensichtlich muss eine homogene Veränderung vor der heterogenen entstehen, sodass hier die Frage war, welche Konstellation (ERG homogen und CRISP3 heterogen, oder umgekehrt) häufiger auftritt.

Abbildung 11 zeigt klar, dass CRISP3 Expression typischerweise nach der ERG Fusionsbildung entsteht: 80 von 119 (67,2%) Tumoren hatten heterogene (fokale) CRISP3-positive Areale in einem ansonsten homogenen ERG-positiven Hintergrund, während fokale ERG Positivität nur in 3 von 28 (10,7%) homogen CRISP3-positiven Tumoren gefunden wurde ($p<0.0001$).

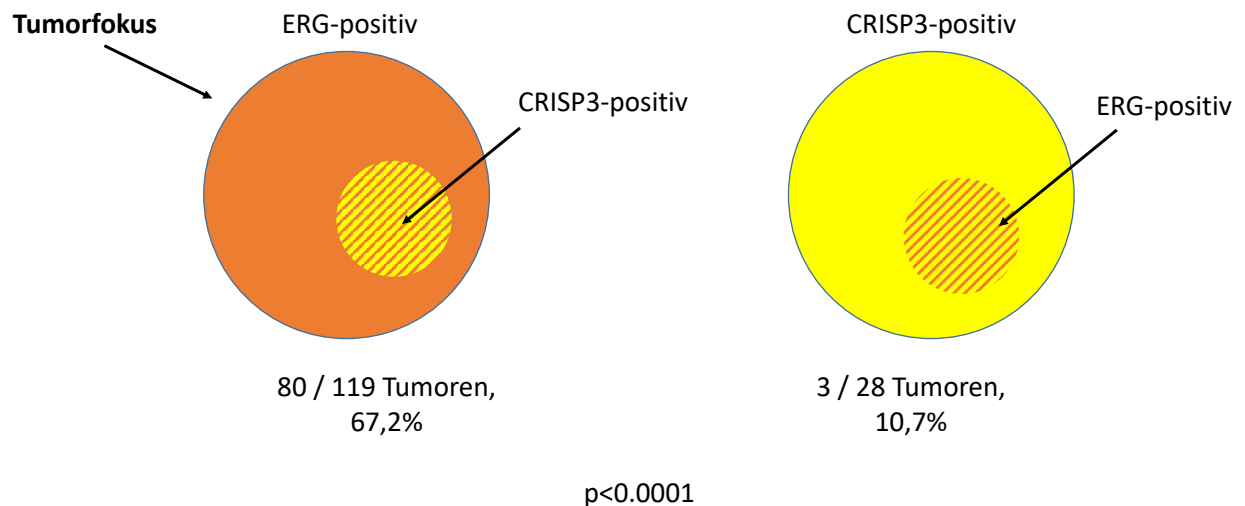


Abbildung 11: ERG Expression entsteht typischerweise vor der CRISP3 Expression. Links: Gut 2/3 (67,2%) der Karzinome mit homogener ERG Expression zeigten eine fokale CRISP3 Expression, die darauf hindeutet, dass ERG vor CRISP3 exprimiert wurde. Rechts: Nur 10,7% der Fälle mit homogener CRISP3 Expression zeigten eine fokale ERG Expression: In diesen seltenen Fällen wurde CRISP3 vor ERG exprimiert.

Um die zeitliche Abfolge von ERG und CRISP3 und deren Abhängigkeit noch besser zu verstehen, wurden von den 299 diejenigen 248 Tumoren eingehend analysiert, deren Expressionsmuster eindeutige Rückschlüsse auf die relative zeitliche Abfolge der Expression dieser Marker erlaubten. Dabei wurde davon ausgegangen, dass:

- 1) die Anzahl der positiven Gewebespots eines jeden Markers Auskunft darüber gibt, wie früh er aufgetreten ist (je mehr positive Spots, desto früher),
- 2) der „spätere“ Marker in einem Teil der Spots exprimiert ist, die für den „früheren“ Marker positiv sind und
- 3) fehlende Ko-Expression auf eine unabhängige Aktivierung der Marker hindeutet.

Zum Beispiel: Von den 10 Spots eines Tumors sind 8 positiv für ERG, von denen wiederum 3 auch positiv für CRISP3 sind. Hieraus folgt, dass CRISP3 erst nach ERG exprimiert wurde und zwar exklusiv in dem ERG-positiven Tumorbereich. Ein weiteres Beispiel: Von den 10 Spots sind 7 positiv nur für ERG und die 3 anderen Spots positiv nur für CRISP3. Dieses Muster kann nur dadurch erklärt werden, dass ERG und CRISP3 in unterschiedlichen Arealen des Tumors unabhängig voneinander exprimiert wurden.

Das Ergebnis dieser Datenanalyse ist in Abbildung 12 dargestellt, wobei als „Startpunkt“ ein fiktives Prostata-Normalgewebe vorausgesetzt wurde. Der vollflächig orange Kreis z.B. bezeichnet 13 homogen ERG-positive Tumoren, die aus diesem fiktiven Normalgewebe entstanden sind und schon sehr früh (vielleicht sogar initial) ERG-positiv waren. Die weitaus höhere Anzahl von 76 Tumoren mit homogener (orangener) ERG Expression mit gleichzeitiger CRISP3 Ko-Expression belegen, dass ein ERG-positiver Tumor typischerweise sehr rasch CRISP3 aktiviert. Die Untersuchung zeigt aber auch, dass die CRISP3 Expression durchaus unabhängig von ERG entstehen kann: 29 (23,6%) Tumoren zeigten CRISP3 Expression ohne vorherige ERG Aktivierung. Bei 6 (20,7%) dieser Tumoren wurde ERG dann erst anschließend exprimiert. Die Analyse zeigt auch, dass ERG nicht zwingend ein initiales Ereignis bei der Tumorentstehung sein muss: Insgesamt fanden sich 27 von 122 (22,1%) ERG-positive Karzinome, bei denen die ERG Aktivierung erst erfolgte, nachdem der Tumor bereits als initial „ERG-negatives“ Karzinom entstanden war.

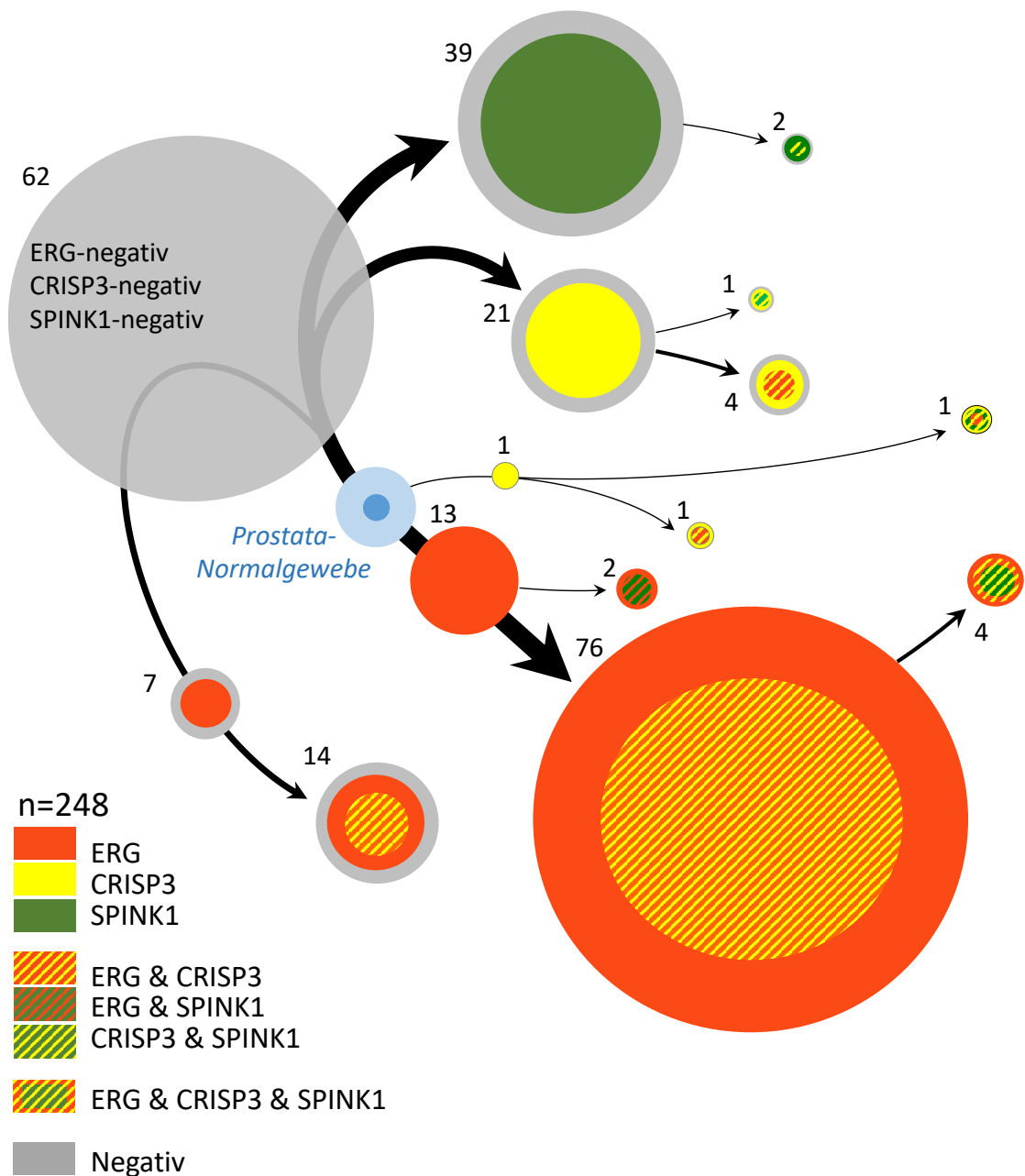


Abbildung 12: Grafische Darstellung der Abfolge der Expression von ERG (orange), CRISP3 (gelb) und SPINK1 (grün) in 248 Prostatakarzinomen. Normale Prostata (blauer Kreis) kann sich in Karzinome mit Expression von ERG, CRISP3 und SPINK1 entwickeln, oder aber auch in Karzinome ohne Expression dieser einzelnen Gene (graue Kreise). Schraffierte Kreise stellen Ko-Expression dar. Die Größe der Kreise entspricht der Anzahl der eingeschlossenen Karzinomfälle, die jeweils neben jedem Kreis angegeben sind.

3.5. Exklusivität von ERG/CRISP3 und SPINK1

Aufgrund der praktisch fehlenden homogenen Expression von SPINK1 (nur ein einziger Fall) konnte die Strategie zur Analyse von ERG/CRISP3 (vergleiche Abbildung 9) nicht auf SPINK1 angewendet werden. Jedoch zeigte ein Vergleich der Häufigkeit von fokaler SPINK1 Expression in ERG-positiven, CRISP3-positiven, ERG- und CRISP3-positiven und ERG- und CRISP3-negativen Tumoren, dass sich SPINK1 Expression vorrangig in ERG- und CRISP3-negativen Tumoren bildet (Abbildung 12). Fokale SPINK1 Expression wurde in 39 von 101 (38,6%) ERG- und CRISP3-negativen Tumoren, jedoch nur in 10 von 147 (6,8%) Tumoren mit ERG und/oder CRISP3 Positivität gefunden ($p < 0.0001$). Diese 10 Tumoren enthielten 2 (von 22) ERG-positive aber CRISP3-negative Tumoren, 3 (von 25) CRISP3-positiven aber ERG-negativen Tumor und 5 (von 100) Tumoren mit Positivität für beide Marker ERG und CRISP3.

4. Diskussion

Die Ergebnisse der Studie zeigen, dass die ERG Fusion in der Regel ein frühes Ereignis während der Progression des Prostatakarzinoms ist, auf die rasch die CRISP3 Expression folgt. Die Expression von SPINK1 charakterisiert eine distinkte Untergruppe von ERG-negativen Prostatakarzinomen.

Im Gegensatz zu „konventionellen“ TMAs, die meist aus 1-2 Gewebestanzungen aus einem einzelnen Tumoreal bzw. Paraffinblock aufgebaut sind, enthält der in dieser Arbeit verwendete Heterogenitäts-TMA Stanzen aus 10 verschiedenen Bereichen eines jeden Tumors. Um ein Vermischen individueller Tumoren bei multifokalen Karzinomen zu vermeiden, wurden so sorgfältig wie möglich nach etablierten Kriterien ⁶⁵ einzelne Tumorfoci identifiziert und dann nur der größte Tumorfokus für die TMA Konstruktion ausgewählt. Unter diesen Bedingungen kann der Anteil der Gewebespots, die für einen bestimmten Marker positiv sind, als Gradmesser für die intratumorale Heterogenität angesehen werden. Intratumorale Heterogenität ist die Folge von molekularen Selektionsmechanismen während der Tumorentwicklung. Es ist intuitiv anzunehmen, dass ein hoher Anteil positiver Spots eine früh aufgetretene Veränderung kennzeichnet, die während der Tumorexpansion erhalten blieb. Eine homogene Färbung (d.h., alle Spots sind positiv für den jeweiligen Marker) zeigt demnach unter idealen Bedingungen - wenn wirklich jedes Tumoreal getroffen wurde - ein Ereignis an, dass schon während der Tumorentstehung aufgetreten ist. Dass eine homogene Färbung bei 70% der ERG-positiven Tumoren gefunden wurde, deutet darauf hin, dass ERG in der Regel eine solche sehr frühe Veränderung ist. Dies war jedoch nur vergleichsweise selten für CRISP (16%) und SPINK (<1%) der Fall. Diese Proteine werden also in der Regel erst in mittleren (CRISP3) und späten (SPINK1) Stadien der Tumorentwicklung exprimiert. Diese Annahme wird von Berichten unterstützt, die darauf hindeuten, dass die ERG Fusion ein potenziell Tumor-initiierendes Ereignis beim Prostatakarzinom ist ^{22,66}, während SPINK1 erst in späteren Stadien der Erkrankung eine relevante Rolle spielt ⁴⁶. Auch in Zelllinien-Modellen konnte eine erzwungene SPINK1 Expression nur in bereits fortgeschrittenen Tumoren (den 22RV1 Prostatakarzinomzellen) die Fähigkeit zum invasiven Wachstum zusätzlich verstärken, nicht jedoch in den gutartigen RWPE Prostataepithelzellen. Dies stützt die Annahme, dass SPINK1 für eine Tumor-relevante Funktion zusätzliche genetische Veränderungen benötigt, die typischerweise erst in fortgeschrittenen Tumoren vorliegen⁴⁶.

Der in Relation zu ERG und SPINK1 „mittelmäßige“ Grad der homogenen Färbung von CRISP3 bedeutet nicht zwangsläufig, dass dieses Protein in der Mitte einer imaginären Zeitachse zwischen ERG und SPINK1 aktiviert wird. Viel eher deuten die Ergebnisse darauf hin, dass ERG und SPINK1 exklusive Untergruppen der Prostata Tumoren charakterisieren und dass CRISP3 Expression typischerweise nach der ERG Fusion auftritt. Die Mehrheit der Studien, die sich mit der Beziehung zwischen EGR und SPINK1 in 28 – 9.503 Prostata Tumoren auseinandergesetzt haben, deuten in der Tat darauf hin, dass die SPINK1 Expression größtenteils auf die ERG-negative Untergruppe der Prostata Tumoren beschränkt war ^{26,46,47,54–56,67–78}. Die Beziehung zwischen ERG und CRISP3 wurde in mindestens 4 Studien untersucht, die alle eine starke Assoziation dieser Proteine aufzeigen ^{27,48,49,51}. Hierbei wurde auch gezeigt, dass CRISP3 ein direktes Zielgen des ERG Transkriptionsfaktors ist ⁵¹, was die häufige Ko-Expression dieser beiden Proteine erklärt. Die vorliegende Studie gibt aber darüber hinaus Hinweise auf zusätzliche alternative Mechanismen für die CRISP3 Expression, weil immerhin 20% der CRISP3-positiven Tumoren keinerlei nachweisbare ERG Expression hatten. Tatsächlich listet die Datenbank „GeneHancer“ ⁷⁹ über 150 weitere Transkriptionsfaktoren auf, welche die CRISP3 Expression steuern können. Der Nachweis dieser relevanten Fraktion von CRISP3+/ERG– Tumoren erweitert die Sichtweise auf CRISP3 insoweit, dass es nicht nur ein „Nebenprodukt“ der ERG Aktivierung ist. Dieser Befund stellt quasi ein klinisches Gegenstück für funktionelle Studien dar, die eine ERG-unabhängige Rolle für die Tumorprogression vermuten, vermutlich durch Modulation der Immunantwort und Erleichterung des invasiven Tumorwachstums ⁸⁰.

Eine weitere wichtige Beobachtung war, dass ERG nicht zwangsläufig als ein frühes Ereignis in Erscheinung trat. Die Tatsache, dass 20% der ERG-positiven Tumoren aus einem ERG-negativen Vorläufer-Tumor entstanden, stützt die Theorie, dass die ERG Fusion auch erst im Laufe der späteren Tumorprogression auftreten kann. Diese Beobachtung wurde bereits in einer früheren Studie an konventionellen Großschnitten von 125 Patienten gemacht, bei der systematisch alle tumorhaltigen Gewebeblöcke der komplett aufgearbeiteten Prostatektomiepräparate untersucht wurden⁸¹. In dieser Studie fanden sich sogar bei 45% der ERG-positiven Tumoren zwar kleine, aber dennoch eindeutig ERG-negative Areale. Zusammen mit der aktuellen Studie am Heterogenitäts-TMAs eröffnen diese Befunde die Möglichkeit, dass viele Prostatakarzinome – wenn nicht sogar alle - prinzipiell als „ERG-negative“ Tumore entstehen und die ERG Aktivierung eher als ein (sehr) frühes Ereignis in der Tumorprogression zu sehen ist, als ein ursächlich Tumor-initiierendes Ereignis.

Weiterhin interessant ist, dass in seltenen Fällen die Abfolge der Aktivierung von ERG, CRISP3 und SPINK1 nicht zum Bild der ERG/CRISP3 und SPINK1 Exklusivität passten: Zehn (4%) Tumoren zeigten eine SPINK1 Expression in ERG/CRISP3-positiven Tumoren, und die ERG Fusion trat bei 6 Tumoren (2,4%) erst nach der CRISP3 Aktivierung auf. Ähnliche Beobachtungen wurden bereits publiziert. In zwei TMA-Studien mit jeweils 3 Spots pro Tumor wurde Ko-Expression von ERG und SPINK1 in 1% von 284 Tumoren ⁷¹ und in 3% von 1076 Tumoren ⁵⁴ gefunden. Eine weitere TMA-Studie mit einem einzigen 0,6 mm Spot je Tumor fand CRISP3 Expression in Abwesenheit von ERG in 2,5% der Tumoren ⁴⁸. Solche Befunde könnten tatsächlich auf eine untypische Deregulierung der analysierten Proteine hinweisen. Alternativ kann aber auch nicht ausgeschlossen werden, dass diese seltenen Beobachtungen auf ineinander wachsende verschiedene Tumorherde zurückzuführen sind. Obwohl in der vorliegenden Studie die etablierten Richtlinien für die Unterscheidung multifokaler Tumore ⁶⁵ strikt eingehalten wurden, gab es 21 (7%) Fälle, deren molekulare Ergebnisse nur durch Kollision verschiedener Tumorherde zu erklären waren, sodass diese von der Analyse ausgeschlossen wurden.

Die aktuelle Studie ist ein Beispiel für das Potential des Heterogenitäts-TMA Konzeptes. Der beinahe identische Anteil der Tumore mit ERG Expression (56%) in der Analyse von 5-10 analysierten Gewebespots pro Karzinom wie in Studien mit Großschnitten oder Einzelspot-TMAs (40-60%) ^{19,81,82} war für einen frühen Marker wie ERG, der in allen Tumorbereichen nachgewiesen werden kann, zu erwarten. Ebenso ist es für „spätere“ Marker wie CRISP3 und SPINK1 nicht überraschend, dass deutlich mehr positive Tumoren gefunden werden, je mehr Spots eines jeden Tumors analysiert werden: Im Vergleich zur vorhergehenden Einzel-spot TMA Analyse (30% versus 58% für CRISP3 ⁴⁸ und 6% versus 23% für SPINK1 ⁵⁶ zeigt die Multiple-spot Heterogenitäts-TMA deutlich mehr positive Tumoren. Dies stützt die Annahme, dass es sich um Marker handelt, die nur in einem Teil der Tumorzellen exprimiert werden. Auch wenn bereits „einfache“ Assoziations-Studien eine enge positive oder negative Beziehung zwischen ERG und CRISP3 oder SPINK1 Expression demonstriert haben, kann der Heterogenitäts-TMA wichtige ergänzende Informationen liefern. Zu diesen gehören die definitive chronologische Reihenfolge der ERG und CRISP3 Expression in individuellen Tumoren, die Möglichkeit der ERG-unabhängigen Expression von CRISP3 und die Erkenntnis, dass die ERG Fusion zwar ein frühes, aber nicht notwendigerweise initiales Ereignis ist. Außerdem handelt es sich bei dem Heterogenitäts-TMA um eine

„gebrauchsfertige“ Kohorte für viele weiterführende molekulare Analysen, die dazu dienen könnten, die molekulare Herkunft der individuellen Tumoren weiter zu präzisieren. In Anbetracht dessen, dass die histologischen Kriterien in einigen Fällen nicht ausgereicht haben, um alle unabhängigen Tumorherde zu identifizieren, ist es bemerkenswert, dass jeder weiterer untersuchte molekulare Marker die Identifizierung separater Tumorfoci verbessern kann.

5. Zusammenfassung

Die Expression von ERG, CRISP3 und SPINK1 charakterisiert unterschiedliche molekulare Subgruppen von Prostatakarzinom. Die Abfolge der Aktivierung dieser 3 Proteine während der Tumorprogression ist im Einzelfall jedoch nicht vollkommen verstanden. Basierend auf der Hypothese, dass die Untersuchung unterschiedlicher Bereiche eines Tumors Rückschlüsse auf die Reihenfolge erlaubt, in der die analysierten molekularen Ereignisse auftreten, wurde in der vorliegenden Arbeit ein spezieller Heterogenitäts-Gewebemikroarray (TMA) auf die immunhistochemisch nachweisbare Expression von ERG, CRISP3 und SPINK1 untersucht. Der TMA bestand aus insgesamt 3.170 Tumorseiten (TMA Spots), welche 10 unterschiedliche Tumoreareale von 317 Tumoren repräsentierten. Zunächst wurden 3 konsekutive Schnitte des TMAs mit Antikörpern gegen ERG, SPINK1 und CRISP3 gefärbt. Für die Analyse der zeitlichen Abfolge der Expression dieser 3 Marker wurden 299 der 317 Tumoren ausgewählt, bei denen mindestens 5 TMA Spots für alle drei Marker auswertbar waren. Ein Tumor wurde für „positiv“ für den jeweiligen Marker erachtet, wenn mindestens ein TMA Spot eine erkennbare Immunfärbung zeigte. Demnach waren positiv für ERG n=167 (56%) Tumoren, für CRISP3 n=174 (58%) und für SPINK1 n=68 (23%) Tumoren. Der Anteil der Tumoren mit homogener, in allen Tumorseiten positiver Expression jedes Biomarkers und deren Ko-Expressionsmuster wurden genutzt, um die chronologische Abfolge der Aktivierung der 3 Marker und mögliche molekulare Subgruppen zu identifizieren. Es fanden sich 119 (71%) Tumoren mit homogener ERG Positivität, 28 (16%) Tumoren mit homogener CRISP3 Positivität, aber nur 1 (2%) Karzinome mit homogener SPINK Positivität. Dies deutet auf eine relativ frühe (ERG), mittlere (CRISP3) und späte (SPINK1) Expression dieser Proteine während der Tumorprogression. Die CRISP3 Färbung war stark mit ERG-positiven Karzinomen assoziiert, während SPINK1 massiv mit ERG-negativen Karzinomen einherging: CRISP3 war in 86% der ERG-positiven und nur in 24% der ERG-negativen Tumore nachweisbar ($p < 0.0001$) während sich SPINK in 36% der ERG-negativen und nur in 12% der ERG-positiven Tumore finden ließ ($p < 0.0001$). Die CRISP3 Expression entstand üblicherweise erst nach der ERG-Fusionsbildung: 67% der 119 homogen ERG-positiven Tumoren hatten kleine, CRISP3-positive Areale, während eine fokale ERG Positivität nur in 11% der 28 homogen CRISP3-positiven Tumore gesehen wurde ($p < 0.0001$). Die Analyse der Entstehungssequenz in 248 Prostatakarzinomen ergab, dass 12% der Tumoren CRISP3 exprimierten ohne dass vorher eine ERG Aktivierung vorlag, und dass 11% der Tumoren erst nach der Tumorentstehung ERG-positiv wurden.

Zusammenfassend stellen die Ergebnisse dieser Studie eine detaillierte Beschreibung der zeitlichen Abfolge der molekularen Ereignisse in Bezug auf ERG, CRISP3 und SPINK1 in knapp 300 Prostatakarzinomen dar. Die Expression von ERG ist typischerweise ein frühes, aber nicht unbedingt initiales Ereignis, was meistens die Expression von CRISP3 nach sich zieht. SPINK1 wird fast exklusiv in ERG-negativen Tumoren gefunden. Es gibt jedoch auch seltene Ausnahmen von diesen Regeln, die in weniger als 5% der Tumoren auftreten: CRISP3 Expression ohne vorherige ERG Aktivierung und SPINK1 Expression in ERG-positiven Tumoren. Besonders die CRISP3 Expression ohne vorherige ERG Aktivierung stützt die Annahme, dass CRISP3 eine ERG-unabhängige Rolle in der Tumorprogression spielen kann. Der Heterogenitäts-TMA Ansatz ist ein wertvolles Werkzeug zur Klärung der Abfolge molekularer Veränderungen in individuellen Tumoren.

6. Abstract

The expression of ERG, CRISP3 and SPINK1 characterizes different molecular subsets of prostate cancers. The chronological sequence of molecular events involving activation of these three proteins during the tumor progression in individual cancers is not fully understood. Based on the hypothesis that the examination of different tumor areas allows to draw conclusions about the sequence in which the analyzed molecular events occur, the present study developed a special heterogeneity tissue microarray (TMA) to examine the immunohistochemically detectable expression of ERG, CRISP3 and SPINK1. From each of the 317 prostates, 10 different tumor-containing tissue blocks were selected for the TMA construction, resulting in a total of 3.170 tissue spots. Antibodies specific for ERG, SPINK1 and CRISP3 were applied to visualize the staining in three consecutively freshly cut TMA sections. 299 cancers with at least 5 TMA spots interpretable for all three markers were included in this study to further analyze the chronology of molecular events connected to these three proteins. A tumor was considered “positive” for a given marker if at least one TMA spot showed immunohistochemically detectable staining. Therefore n=167 (56%) cancers had positive results for ERG, n=174 (58%) cancers for CRISP3 and n=68 (23%) cancers for SPINK1. We used the fraction of tumors with homogeneous positivity (i.e. 100% interpretable spots per tumor shows a positive result) of each biomarker and their co-expression patterns in order to estimate whether these markers occur early or late during tumor development and identify possible molecular subset of cancers. Homogeneous positivity was found in 119 (71%) ERG-positive tumors. The fraction of homogeneously positive cancers was 28 (16%) for CRISP3 and only 1 (2%) for SPINK1. These different fractions of tumors suggest that these three markers occur at early (ERG), intermediate (CRISP3) and late (SPINK1) phases of cancer development. Co-expression was most frequent for ERG and CRISP3, but rare for CRISP3 and SPINK1.

Positive CRISP3 staining was tightly linked to ERG-positive cancers, while SPINK1 expression was strongly associated with ERG-negative cancers: Staining of CRISP3 was found in 86% ERG-positive cancers but only 24% ERG-negative cancers ($p < 0.0001$). In contrast, staining of SPINK1 was found in 36% ERG-negative cancers as compared to 12 % ERG-positive cancers ($p < 0.0001$).

CRISP3 expression typically develops after ERG fusion has formed: 67% of 119 homogeneously ERG-positive cancers had small CRISP3-positive areas, while focal ERG positivity was only seen in 11% of 28 homogeneously CRISP3-positive cancers ($p < 0.0001$). Analysis

of the chronological sequence of molecular alterations in 248 prostate carcinomas showed that 12% of the tumors expressed CRISP3 without prior ERG activation and that 11% of the tumors only became ERG-positive after the tumor had developed

In summary, the results of this study provide a detailed description of the chronological sequence of molecular events connected to ERG, CRISP3 and SPINK1 expression in about 300 prostate cancers. ERG fusion is typically an early and potentially but not necessarily cancer-initiating event in prostate cancers usually followed by CRISP3 expression. SPINK1 expression is found almost exclusively in ERG-negative tumors. However, there are also rare exceptions to these rules that occur in less than 5% of the tumors: CRISP3 expression without previous ERG activation and SPINK1 expression in ERG-positive tumors. Especially the observation that CRISP3 expression without previous ERG activation provides clinical support for the assumption that CRISP3 has an own and active role in cancer progression. The heterogeneity TMA approach is a powerful tool to describe the chronology of molecular events in individual cancers.

7. Abkürzungsverzeichnis

CRISP3	Cystein-reiches sekretorisches Protein 3
ERG	ETS-related gene
EtOH	Ethanol
HE	Hämatoxylin-Eosin
ICH	Immunhistochemie
MRT	Magnetresonanztomografie
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
PTEN	Phosphatase und Tensin homolog
SPINK1	Serin-Peptidase-Inhibitor Kazal Typ 1
TMA	Tissue Microarray
TMPRSS2	Transmembran Serinprotease 2
TNM	Tumor (T), Nodus (N), Metastasen (M)
TRIS-EDTA	Tris(hydroxymethyl)aminomethane-Ethylendiamintetraessigsäure
UICC	International Union against Cancer

8. Literaturverzeichnis

1. Siegel RL, Miller KD JA. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin* 2019. 2019.
2. Robert-Koch-Institut. Krebs in Deutschland für 2013 / 2014 Krebs in Deutschland. 2017. doi:10.17886/rkipubl-2017-007
3. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J. Global Cancer Statistics. *A Cancer J Clin*. 2015. doi:10.3322/caac.21262.
4. Hinkelbein W, Miller K, Wiegel T. *Prostatakarzinom — Urologische Und Strahlentherapeutische Aspekte.*; 2011. doi:10.1007/978-3-642-60064-7
5. Leitlinienprogramm Onkologie. Konsultationsfassung: Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms, Lang-version 4.0, 2016 AWMF Registernummer: 043/022OL. 2018;(April):1-394. http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Prostatakarzinom.58.0.html_upload/Downloads/Leitlinien/Prostata_5_0/LL_Prostata_Langversion_5.0.pdf.
6. Schünke M, Schulte E, Schumacher U, Voll M, Wesker KH. *PROMETHEUS Innere Organe.*; 2018. doi:10.1055/b-006-149645
7. Lein M. Molekulare formen des PSA in der diagnostik des prostatakarzinoms. *J für Urol und Urogynakologie*. 2003.
8. Takenaka A, Hara R, Ishimura T, et al. A prospective randomized comparison of diagnostic efficacy between transperineal and transrectal 12-core prostate biopsy. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2008;11(2):134-138. doi:10.1038/sj.pcan.4500985
9. Gleason DF. Classification of prostatic carcinomas. *Cancer Chemother reports*. 1966.
10. Mellinger GT, Gleason D, Bailar J. The histology and prognosis of prostatic cancer. *J Urol*. 1967. doi:10.1016/S0022-5347(17)63039-8
11. Rübber H. *Uroonkologie / Herausgegeben von Herbert Rübber.*; 2014. doi:10.1007/978-3-642-35032-0
12. Epstein JI, Egevad L, Amin MB, Delahunt B, Srigley JR, Humphrey PA. 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*. 2016. doi:10.1097/PAS.0000000000000530
13. Kristiansen G, Roth W, Helpap B. Grading von Prostatakarzinomen. *Pathologe*.

2016. doi:10.1007/s00292-016-0185-5
14. Sakr WA, Grignon DJ, Crissman JD, et al. High grade prostatic intraepithelial neoplasia (HGPIN) and prostatic adenocarcinoma between the ages of 20-69: An autopsy study of 249 cases. In: *In Vivo.* ; 1994.
 15. Schröder FH, Hugosson J, Roobol MJ, et al. Screening and prostate cancer mortality: Results of the European Randomised Study of Screening for Prostate Cancer (ERSPC) at 13 years of follow-up. *Lancet.* 2014. doi:10.1016/S0140-6736(14)60525-0
 16. Pummer K. Wie weit sind die molekularen marker beim prostatakarzinom? *J für Urol und Urogynakologie.* 2017. doi:10.1007/s41972-017-0006-y
 17. Cooperberg MR, Simko JP, Cowan JE, et al. Validation of a cell-cycle progression gene panel to improve risk stratification in a contemporary prostatectomy cohort. *J Clin Oncol.* 2013. doi:10.1200/JCO.2012.46.4396
 18. Cuzick J, Stone S, Fisher G, et al. Validation of an RNA cell cycle progression score for predicting death from prostate cancer in a conservatively managed needle biopsy cohort. *Br J Cancer.* 2015. doi:10.1038/bjc.2015.223
 19. Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, et al. Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science (80-).* 2005. doi:10.1126/science.1117679
 20. Mani RS, Tomlins SA, Callahan K, et al. Induced chromosomal proximity and gene fusions in prostate cancer. *Science (80-).* 2009. doi:10.1126/science.1178124
 21. Tomlins SA, Bjartell A, Chinnaiyan AM, et al. ETS Gene Fusions in Prostate Cancer: From Discovery to Daily Clinical Practice. *Eur Urol.* 2009. doi:10.1016/j.eururo.2009.04.036
 22. Perner S, Demichelis F, Beroukhim R, et al. TMPRSS2:ERG fusion-associated deletions provide insight into the heterogeneity of prostate cancer. *Cancer Res.* 2006. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-1482
 23. Weischenfeldt J, Simon R, Feuerbach L, et al. Integrative Genomic Analyses Reveal an Androgen-Driven Somatic Alteration Landscape in Early-Onset Prostate Cancer. *Cancer Cell.* 2013. doi:10.1016/j.ccr.2013.01.002
 24. Steurer S, Mayer PS, Adam M, et al. TMPRSS2-ERG fusions are strongly linked to young patient age in low-grade prostate cancer. *Eur Urol.* 2014;66(6):978-981. doi:10.1016/j.eururo.2014.06.027
 25. Hermans KG, Van Marion R, Van Dekken H, Jenster G, Van Weerden WM,

- Trapman J. TMPRSS2:ERG fusion by translocation or interstitial deletion is highly relevant in androgen-dependent prostate cancer, but is bypassed in late-stage androgen receptor-negative prostate cancer. *Cancer Res.* 2006. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-1871
26. Jhavar S, Brewer D, Edwards S, et al. Integration of ERG gene mapping and gene-expression profiling identifies distinct categories of human prostate cancer. *BJU Int.* 2009. doi:10.1111/j.1464-410X.2008.08200.x
 27. Brase JC, Johannes M, Mannsperger H, et al. TMPRSS2-ERG -specific transcriptional modulation is associated with prostate cancer biomarkers and TGF- β signaling. *BMC Cancer.* 2011. doi:10.1186/1471-2407-11-507
 28. Gupta S, Iljin K, Sara H, et al. FZD4 as a mediator of ERG oncogene-induced WNT signaling and epithelial-to-mesenchymal transition in human prostate cancer cells. *Cancer Res.* 2010. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-0244
 29. Minner S, Luebke AM, Kluth M, et al. High level of Ets-related gene expression has high specificity for prostate cancer: A tissue microarray study of 11483 cancers. *Histopathology.* 2012. doi:10.1111/j.1365-2559.2012.04240.x
 30. Carver BS, Tran J, Gopalan A, et al. Aberrant ERG expression cooperates with loss of PTEN to promote cancer progression in the prostate. *Nat Genet.* 2009. doi:10.1038/ng.370
 31. King JC, Xu J, Wongvipat J, et al. Cooperativity of TMPRSS2-ERG with PI3-kinase pathway activation in prostate oncogenesis. *Nat Genet.* 2009. doi:10.1038/ng.371
 32. Tamura M, Gu J, Tran H, Yamada KM. PTEN gene and integrin signaling in cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1999. doi:10.1093/jnci/91.21.1820
 33. Di Cristofano A, Pesce B, Cordon-Cardo C, Pandolfi PP. Pten is essential for embryonic development and tumour suppression. *Nat Genet.* 1998. doi:10.1038/1235
 34. Dong JT. Chromosomal deletions and tumor suppressor genes in prostate cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2001. doi:10.1023/A:1015575125780
 35. Burkhardt L, Fuchs S, Krohn A, et al. CHD1 Is a 5q21 tumor suppressor required for ERG rearrangement in prostate cancer. *Cancer Res.* 2013. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-1342
 36. Kluth M, Hesse J, Heintz A, et al. Genomic deletion of MAP3K7 at 6q12-22 is associated with early PSA recurrence in prostate cancer and absence of

- TMPRSS2:ERG fusions. *Mod Pathol*. 2013. doi:10.1038/modpathol.2012.236
37. Krohn A, Seidel A, Burkhardt L, et al. Recurrent deletion of 3p13 targets multiple tumour suppressor genes and defines a distinct subgroup of aggressive ERG fusion-positive prostate cancers. *J Pathol*. 2013. doi:10.1002/path.4223
 38. Sun J, Liu W, Adams TS, et al. DNA copy number alterations in prostate cancers: A combined analysis of published CGH studies. *Prostate*. 2007. doi:10.1002/pros.20543
 39. Taylor BS, Schultz N, Hieronymus H, et al. Integrative Genomic Profiling of Human Prostate Cancer. *Cancer Cell*. 2010. doi:10.1016/j.ccr.2010.05.026
 40. Williams JL, Greer PA, Squire JA. Recurrent copy number alterations in prostate cancer: An in silico meta-analysis of publicly available genomic data. *Cancer Genet*. 2014. doi:10.1016/j.cancergen.2014.09.003
 41. Kluth M, Jung S, Habib O, et al. Deletion lengthening at chromosomes 6q and 16q targets multiple tumor suppressor genes and is associated with an increasingly poor prognosis in prostate cancer. *Oncotarget*. 2017. doi:10.18632/oncotarget.22408
 42. Barbieri CE, Baca SC, Lawrence MS, et al. Exome sequencing identifies recurrent SPOP, FOXA1 and MED12 mutations in prostate cancer. *Nat Genet*. 2012. doi:10.1038/ng.2279
 43. Blattner M, Lee DJ, O'Reilly C, et al. SPOP mutations in prostate cancer across demographically diverse patient cohorts. *Neoplasia (United States)*. 2014. doi:10.1593/neo.131704
 44. Leroy B, Fournier JL, Ishioka C, et al. The TP53 website: An integrative resource centre for the TP53 mutation database and TP53 mutant analysis. *Nucleic Acids Res*. 2013. doi:10.1093/nar/gks1033
 45. Kluth M, Harasimowicz S, Burkhardt L, et al. Clinical significance of different types of p53 gene alteration in surgically treated prostate cancer. *Int J Cancer*. 2014. doi:10.1002/ijc.28784
 46. Tomlins SA, Rhodes DR, Yu J, et al. The Role of SPINK1 in ETS Rearrangement-Negative Prostate Cancers. *Cancer Cell*. 2008. doi:10.1016/j.ccr.2008.04.016
 47. Leinonen KA, Tolonen TT, Bracken H, et al. Association of SPINK1 expression and TMPRSS2:ERG fusion with prognosis in endocrine-treated prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2010. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-2505
 48. Grupp K, Kohl S, Sirma H, et al. Cysteine-rich secretory protein 3 overexpression is linked to a subset of PTEN-deleted ERG fusion-positive prostate cancers with early

- biochemical recurrence. *Mod Pathol*. 2013;26(5):733-742.
doi:10.1038/modpathol.2012.206
49. Al Bashir S, Alshalalfa M, Hegazy SA, Dolph M, Donnelly B, Bismar TA. Cysteine- Rich secretory protein 3 (CRISP3), ERG and PTEN define a molecular subtype of prostate cancer with implication to patients' prognosis. *J Hematol Oncol*. 2014. doi:10.1186/1756-8722-7-21
 50. Bjartell AS, Al-Ahmadie H, Serio AM, et al. Association of cysteine-rich secretory protein 3 and β - microseminoprotein with outcome after radical prostatectomy. *Clin Cancer Res*. 2007. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-3031
 51. Ribeiro FR, Paulo P, Costa VL, et al. Cysteine-Rich secretory protein-3 (CRISP3) is strongly Up-Regulated in prostate carcinomas with the TMPRSS2-ERG fusion gene. *PLoS One*. 2011. doi:10.1371/journal.pone.0022317
 52. Krätzschmar J, Haendler B, Eberspaecher U, Roosterman D, Donner P, Schleuning WD. The human cysteine-rich secretory protein (CRISP) family Primary structure and tissue distribution of CRISP-1, CRISP-2 and CRISP-3. *Eur J Biochem*. 1996. doi:10.1111/j.1432-1033.1996.t01-1-00827.x
 53. Noh BJ, Sung JY, Kim YW, Chang SG, Park YK. Prognostic value of ERG, PTEN, CRISP3 and SPINK1 in predicting biochemical recurrence in prostate cancer. *Oncol Lett*. 2016. doi:10.3892/ol.2016.4459
 54. Brooks JD, Wei W, Hawley S, et al. Evaluation of ERG and SPINK1 by immunohistochemical staining and clinicopathological outcomes in a multi-institutional radical prostatectomy cohort of 1067 patients. *PLoS One*. 2015. doi:10.1371/journal.pone.0132343
 55. Flavin R, Pettersson A, Hendrickson WK, et al. SPINK1 protein expression and prostate cancer progression. *Clin Cancer Res*. 2014. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-1341
 56. Grupp K, Diebel F, Sirma H, et al. SPINK1 expression is tightly linked to 6q15- and 5q21-deleted ERG-fusion negative prostate cancers but unrelated to PSA recurrence. *Prostate*. 2013. doi:10.1002/pros.22707
 57. Kazal LA, Spicer DS, Brahinsky RA. Isolation of a Crystalline Trypsin Inhibitor-Anticoagulant Protein from Pancreas1a. *J Am Chem Soc*. 1948. doi:10.1021/ja01189a060
 58. Paju A, Stenman UH. Biochemistry and clinical role of trypsinogens and pancreatic secretory trypsin inhibitor. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2006.

doi:10.1080/10408360500523852

59. Paju A, Hotakainen K, Cao Y, et al. Increased Expression of Tumor-Associated Trypsin Inhibitor, TATI, in Prostate Cancer and in Androgen-Independent 22Rv1 Cells. *Eur Urol*. 2007. doi:10.1016/j.eururo.2007.01.096
60. Räsänen K, Itkonen O, Koistinen H, Stenman UH. Emerging roles of SPINK1 in cancer. *Clin Chem*. 2016. doi:10.1373/clinchem.2015.241513
61. Karavitikis M, Ahmed HU, Abel PD, Hazell S, Winkler MH. Tumor focality in prostate cancer: Implications for focal therapy. *Nat Rev Clin Oncol*. 2011;8(1):48-55. doi:10.1038/nrclinonc.2010.190
62. Krohn A, Freudenthaler F, Harasimowicz S, et al. Heterogeneity and chronology of PTEN deletion and ERG fusion in prostate cancer. *Mod Pathol*. 2014. doi:10.1038/modpathol.2014.70
63. Kluth M, Meyer D, Krohn A, et al. Heterogeneity and chronology of 6q15 deletion and ERG-fusion in prostate cancer. *Oncotarget*. 2016. doi:10.18632/oncotarget.6597
64. McNeal JE, Redwine EA, Freiha FS, Stamey TA. Zonal Distribution of Prostatic Adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol*. 1988. doi:10.1097/00000478-198812000-00001
65. Wise AM, Stamey TA, McNeal JE, Clayton JL. Morphologic and clinical significance of multifocal prostate cancers in radical prostatectomy specimens. *Urology*. 2002. doi:10.1016/S0090-4295(02)01728-4
66. Clark JP, Cooper CS. ETS gene fusions in prostate cancer. *Nat Rev Urol*. 2009. doi:10.1038/nrurol.2009.127
67. Teng L, Gao W, Lu D, Xu J, Zhao L. Prognostic significance of mutually exclusive expression of ERG and SPINK1 in endocrine-treated prostatic cancer. *Chinese J Pathol*. 2014. doi:10.3760/cma.j.issn.0529-5807.2014.03.002
68. Väänänen RM, Lilja H, Kauko L, et al. Cancer-associated changes in the expression of TMPRSS2-ERG, PCA3, and SPINK1 in histologically benign tissue from cancerous vs noncancerous prostatectomy specimens. *Urology*. 2014. doi:10.1016/j.urology.2013.11.005
69. Leinonen KA, Saramäki OR, Furusato B, et al. Loss of PTEN is associated with aggressive behavior in ERG-positive prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2013. doi:10.1158/1055-9965.EPI-13-0333-T
70. Lippolis G, Edsjö A, Stenman UH, Bjartell A. A high-density tissue microarray

- from patients with clinically localized prostate cancer reveals ERG and TATI exclusivity in tumor cells. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2013. doi:10.1038/pcan.2013.7
71. Bhalla R, Kunju LP, Tomlins SA, et al. Novel dual-color immunohistochemical methods for detecting ERG-PTEN and ERG-SPINK1 status in prostate carcinoma. *Mod Pathol.* 2013. doi:10.1038/modpathol.2012.234
 72. Sabaliauskaite R, Jarmalaite S, Petroska D, et al. Combined analysis of TMPRSS2-ERG and TERT for improved prognosis of biochemical recurrence in prostate cancer. *Genes Chromosom Cancer.* 2012. doi:10.1002/gcc.21963
 73. Bismar TA, Yoshimoto M, Duan Q, Liu S, Sircar K, Squire JA. Interactions and relationships of PTEN, ERG, SPINK1 and AR in castration-resistant prostate cancer. *Histopathology.* 2012. doi:10.1111/j.1365-2559.2011.04116.x
 74. Han B, Mehra R, Suleman K, et al. Characterization of ETS gene aberrations in select histologic variants of prostate carcinoma. *Mod Pathol.* 2009. doi:10.1038/modpathol.2009.79
 75. Huang KC, Evans A, Donnelly B, Bismar TA. SPINK1 Overexpression in Localized Prostate Cancer: a Rare Event Inversely Associated with ERG Expression and Exclusive of Homozygous PTEN Deletion. *Pathol Oncol Res.* 2017. doi:10.1007/s12253-016-0119-9
 76. Tomlins SA, Alshalalfa M, Davicioni E, et al. Characterization of 1577 primary prostate cancers reveals novel biological and clinicopathologic insights into molecular subtypes. *Eur Urol.* 2015. doi:10.1016/j.eururo.2015.04.033
 77. Terry S, Nicolaiew N, Basset V, et al. Clinical value of ERG, TFF3, and SPINK1 for molecular subtyping of prostate cancer. *Cancer.* 2015. doi:10.1002/cncr.29233
 78. Palanisamy N, Tsodikov A, Yan W, et al. Molecular profiling of ETS gene rearrangements in patients with prostate cancer registered in REDEEM clinical trial. *Urol Oncol Semin Orig Investig.* 2015. doi:10.1016/j.urolonc.2014.07.015
 79. Fishilevich S, Nudel R, Rappaport N, et al. GeneHancer: genome-wide integration of enhancers and target genes in GeneCards. *Database (Oxford).* 2017. doi:10.1093/database/bax028
 80. Pathak BR, Breed AA, Apte S, Acharya K, Mahale SD. Cysteine-rich secretory protein 3 plays a role in prostate cancer cell invasion and affects expression of PSA and ANXA1. *Mol Cell Biochem.* 2016. doi:10.1007/s11010-015-2564-2
 81. Tsourlakis MC, Stender A, Quaas A, et al. Heterogeneity of ERG expression in

- prostate cancer: A large section mapping study of entire prostatectomy specimens from 125 patients. *BMC Cancer*. 2016. doi:10.1186/s12885-016-2674-6
82. Minner S, Enodien M, Sirma H, et al. ERG status is unrelated to PSA recurrence in radically operated prostate cancer in the absence of antihormonal therapy. *Clin Cancer Res*. 2011. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-1251

9. Danksagung

Mein ganz herzlicher Dank gilt Prof. Dr. med. Guido Sauter für die Bereitstellung des Themas und wohlwollende Unterstützung, die die Durchführung und das Gelingen dieser Arbeit ermöglichten.

Ein ganz besonderer Dank ist an PD Dr. rer. nat. Ronald Simon gerichtet, nicht nur für die Übernahme der fachkundigen Betreuung während der gesamten Entstehungszeit dieser Arbeit, sondern auch für die Durchsicht und die vielen hilfreichen Hinweise, die eine Fertigstellung dieser ermöglichten.

Vielen Dank an alle, die mich während der Anfertigung dieser Arbeit begleitet, unterstützt und an mich geglaubt 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: