

# **UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

Zentrum für Diagnostik, Institut für Pathologie, Sektion Molekularpathologie

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

## **Prognostische Bedeutung von Avian Myeloblastosis Viral Oncogene Homolog-Like 2 -Protein (MYBL2) beim Prostatakarzinom**

### **Dissertation**

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

vorgelegt von:

Theresa Margret Erika Krause aus Hamburg

Hamburg 2020

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 19.04.2021**

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

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:            Prof. Dr. Sabine Riethdorf**

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

Für meinen Opa Hans.

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung .....	5
2. Material und Methoden.....	16
2.1 Patienten.....	16
2.2 TMA-Technik .....	16
2.3 Immunhistochemie.....	22
2.4 Datenbank .....	23
2.5 Statistik .....	24
3. Ergebnisse.....	25
3.1 MYBL2-Expression in Normalgeweben und Tumoren.....	25
3.2 MBYL2-Expression und Tmprss2/ERG-Fusionsstatus.....	28
3.3 MYBL2-Expression und Deletionen .....	33
3.4 MYBL2 und Tumorzellproliferation, p53-Status, BCL2-Expression .....	36
3.5 Multivariate Analyse.....	38
4. Diskussion.....	44
5. Zusammenfassung.....	51
6. Abstract.....	53
7. Literaturverzeichnis .....	54
8. Abbildungs- u. Tabellenverzeichnis .....	62
9. Abkürzungsverzeichnis.....	64
10. Danksagung.....	67
11. Lebenslauf.....	67
12. Eidesstattliche Versicherung.....	67

## 1. Einleitung

Das Prostatakarzinom ist der häufigste maligne Tumor beim Menschen überhaupt. Mehr als 70% der über 70-jährigen Männer weisen in ihrer Prostata ein Prostatakarzinom auf (Rohde V, 2007). Die meisten Prostatakarzinome sind asymptomatisch und bereiten den betroffenen Patienten zeitlebens keine Probleme. Allerdings werden in Deutschland jährlich über 60.000 Prostatakarzinome neu diagnostiziert und circa 13.000 Männer versterben allein in Deutschland jährlich an den Folgen eines Prostatakarzinoms (Wirth M, 2019). Damit ist das Prostatakarzinom die zweithäufigste Krebstodesursache bei Männern nach dem Lungenkarzinom (Robert Koch Institut, 2017). Das Prostatakarzinom macht kaum klinische Symptome, auch deswegen, weil es typischerweise in der Außenzone der Prostata auftritt, wo es fern von der prostatistischen Urethra liegt. Im Gegensatz dazu führt die myoglanduläre Hyperplasie, welche im Prostatazentrum ihren Ursprung nimmt, frühzeitig zu einer Obstruktion der Urethra und damit zu Miktionsstörungen (Meyer D, 2013). Das häufigste erste klinische Zeichen eines Prostatakarzinoms sind Knochenschmerzen als Folgen einer ossären Metastasierung (Böcker W, 2006). Da die Erstentdeckung des Prostatakarzinoms in einer derart späten Krankheitsphase dem Patienten wenig nützt, ist das Prostatakarzinom heutzutage Gegenstand einer systematischen Vorsorgeuntersuchung, wobei eine regelmäßige digitale rektale Untersuchung und/oder eine serologische PSA-Bestimmung vorgenommen wird. Die digitale rektale Untersuchung hat den Nachteil, dass nur dorsal gelegene Prostatakarzinome in der unmittelbaren Umgebung des Rektums diagnostiziert werden können und auch nur dann, wenn sie eine signifikante Größe erreicht haben. Zwar liegen die meisten Prostatakarzinome in dem genannten Bereich, doch gibt es zahlreiche Karzinome, welche auch in anderen Arealen der Prostata auftreten. Die serologische Bestimmung des Prostataspezifischen Antigens (PSA) ist weit sensitiver. Das Prostataspezifische Antigen wird beim Menschen ausschließlich in Prostataepithelzellen gebildet und dies in großem Ausmaß. Die wichtigste bekannte Rolle von PSA ist die Verflüssigung der Samenflüssigkeit (Hara M, 1971). Die in der Prostata gebildete Menge an PSA ist so groß, dass Spuren von PSA auch im Blut nachweisbar sind (Filella X, 2018). Die Menge des im Serum nachgewiesenen PSA ist dabei proportional zur Menge des im Patienten befind-

lichen Prostataepithels. Bei Männern unter 50 Jahren ist der Serum-PSA-Wert typischerweise  $<1\text{ng/ml}$ , mit zunehmendem Alter steigt der Wert kontinuierlich mit der „physiologischen“ Prostatahyperplasie etwas an. Ein abrupter Anstieg oder ein sehr hoher Wert ( $>4\text{ng/ml}$ ) sind allerdings verdächtig auf eine abnormale Vermehrung von Prostataepithelien, was ein Indiz für ein Prostatakarzinom darstellt (Wirth M, 2019).

Wenn bei einem Mann ein Verdacht auf ein Prostatakarzinom besteht, wird eine Prostatabiopsie durchgeführt, entweder durch eine systematische Entnahme von Proben aus allen Regionen der Prostata oder aber gezielt in dem Bereich eines digitalen Tastbefundes oder eines Herdes, der in der Magnetresonanzbildgebung (MRI) gefunden wurde (Wirth M, 2019).

Wenn eine Karzinomdiagnose gestellt wurde muss primär entschieden werden, ob der Patient eine Therapie benötigt oder nicht. Während früher die meisten operablen Patienten mit einem neu diagnostiziertem Prostatakarzinom prostatektomiert oder gegebenenfalls bestrahlt wurden, hat sich heute die Active Surveillance (AS) als alternative Therapiemethode durchgesetzt, vor allem in skandinavischen Ländern und vermehrt auch in den Vereinigten Staaten von Amerika (Mahal BA, 2019), (Thomsen FB, 2019). Bei der AS wird der Patient nicht behandelt, sondern er wird so regelmäßig nachkontrolliert, dass eine gefährliche Progression des Tumors rechtzeitig genug erkannt wird, um den Patienten in diesem Fall immer noch kurativ behandeln zu können (Parker, 2004). Bei Active Surveillance-Patienten werden regelmäßige PSA-Kontrollen und auch biopsische Kontrollen des Krankheitsverlaufes durchgeführt. Die Entscheidung, ob eine aktive Therapie oder eine AS durchgeführt wird, hängt im Wesentlichen von den Biopsiefunden und dem PSA-Wert ab. Für den PSA-Wert wird gefordert, dass dieser  $<10\text{ng/ml}$  beträgt. Bei den Biopsien wird für eine AS ein Gleason Grad von  $3+3=6$  (oder innerhalb von Studien ein Gleason Grad von  $3+4=7$ ) und der Befall von nicht mehr als zwei Prostatastanzen gefordert (Heidenreich A, 2014).

Entscheidet man sich für eine aktive Therapie des Prostatakarzinoms, kommt eine radikale Prostatektomie, eine traditionelle perkutane Bestrahlung und bei Niedrigrisikopatienten (maximal Gleason Grad  $3+4$ ) auch eine sogenannte Brachytherapie infrage, wobei

dem Patienten radioaktive Partikel direkt in die Prostata eingeführt werden (Wirth M, 2019). Die Prostatektomie hat gegenüber den Bestrahlungsmethoden den Vorteil, dass der ganze Tumor aus dem Patienten entfernt wird und danach histologisch untersucht werden kann. Dabei kann der Pathologe den Gleason Grad am Gesamttumor erheben. Der Gleason Grad am Gesamttumor ist naturgemäß (wegen Sampling Error) nicht immer identisch mit dem aufgrund der Biopsien angenommenen Gleason Grad (Niall M Corcoran, 2012). Darüber hinaus kann das Tumolvolumen, der Tumordurchmesser, das pT-Stadium, sowie bei gleichzeitiger Durchführung einer Lymphadenektomie auch der pN-Status bestimmt werden. Dies dient der Einschätzung der Prognose. Falls die Tumoresektion inkomplett war (R1-Status) kann eine postoperative Radiotherapie die Operation ergänzen. Eine adjuvante Chemotherapie wird heute aber, selbst bei einer Hochrisikosituation im Prostatektomiepräparat, meist nicht erfolgen. Bei vielen anderen Tumorarten hat sich allerdings gezeigt, dass eine postoperative (adjuvante) Chemotherapie die Prognose der behandelten Patienten verbessert. Adjuvante Chemotherapien sind besonders dann wirksam, wenn die im Patienten verbliebene Metastasenlast sehr gering ist, sodass die Chance besteht, dass sämtliche Tumorzellen durch die Chemotherapie abgetötet werden (Mulder JH, 1983). Einer der Gründe dafür, dass eine adjuvante Chemotherapie beim Prostatakarzinom nicht üblich ist dürfte auch die Tatsache darstellen, dass die Prognoseabschätzung der Prostatakarzinompatienten schwierig ist. Alle etablierten Prognoseparameter (Gleason Grad, pT-Stadium, pN-Stadium, Tumorausdehnung in Prostatastanzen) weisen substanzielle Schwachpunkte auf, welche nachstehend besprochen werden sollen.

Der Gleason Grad ist das weltweit etablierte Malignitätsgradierungssystem bei Prostatakarzinomen. Die Besonderheit des Gleason Grades ist, dass diese ausschließlich aufgrund von architektonischen Befunden definiert wird (Bailar JC, 1966), (Barakzai MA, 2011), (Delahunt B, 2012). Unterschieden werden in Tumoren die Gleason Muster 3, 4 und 5. Grob vereinfacht entspricht ein Gleason-3-Muster gut voneinander abgrenzbaren Drüsen, ein Gleason-Muster 4 konfluierenden Drüsen und ein Gleason-Muster 5 einem soliden Wachstum ohne Drüsen oder dem Vorkommen von Tumornekrosen. Um der beim Prostatakarzinom häufig vorkommenden morphologischen Heterogenität Rechnung zu tragen werden bei der Gleason Gradierung zwei verschiedene Muster in einem

Gleason Score zusammengeführt. In den meisten Fällen sind das ein primäres Gleason Muster (das in einem Tumor am häufigsten zu beobachtende Muster) und ein sekundäres Gleason Muster (das in einem Tumor am zweithäufigsten zu beobachtende Muster). Bei Biopsien gibt es von dieser Regel aber eine Abweichung. Als zweites Muster wird dann das schlimmste in einem Tumor vorkommende Muster verwendet, wenn dieses einem Gleason-5-Muster entspricht. In der Biopsie wird aus einem Tumor mit sehr viel Muster 3, viel Muster 4 und sehr wenig Muster 5 ein Gleason 3+5. Bei Prostatektomien wird beim Vorkommen von wenig Gleason-5-Muster in einem Gleason 3+4 Karzinom ein Tertiärgrad 5 definiert. Ein Prostatektomiepräparat mit einem Tumor mit sehr viel Gleason 3, viel Gleason 4 und sehr wenig Gleason 5 würde dann zu Gleason 3+4, Tertiärgrad 5. Das Problem beim Gleason Grad ist, dass die drei definierten Muster schwierig voneinander abzugrenzen sind (Sauter G S. S., 2016). Auch Experten der Urothologie weichen in ihrer Gleasongradierung in bis zu 40% der Fälle voneinander ab (Egevad L, 2013). Dies ist insbesondere bei der Primärdiagnose von Prostatakarzinomen ein Problem, denn nur Gleason 3+3-Karzinome haben in der Realität eine Chance auf eine Active Surveillance- „Therapie“, welche für den Patienten und das Gesundheitssystem (null Kosten, null Morbidität) außerordentlich attraktiv ist.

Auch das pT-Stadium ist ein starker Prognosefaktor, doch leider nur postoperativ zu bestimmen. Alle radiologischen und klinischen Untersuchungsmethoden sind nicht genau genug, um das pT-Stadium eines Prostatakarzinoms präoperativ festzulegen. Bei in kurativer Intention bestrahlten Prostatakarzinompatienten wird nie klar sein, wie das ursprüngliche pT-Stadium war (Wittekind, 2010).

Das pN-Stadium ist ein weiterer sehr starker Prognosefaktor, doch lässt sich ein Lymphknotenbefall weder präoperativ noch postoperativ mit Sicherheit diagnostizieren oder ausschließen. Die Präzision radiologischer Verfahren beim Nachweis von kleinen Metastasen (0,2mm) ist gering. Allerdings ist auch postoperativ nach Lymphadenektomie keine definitive Klärung des Lymphknotenstatus eines Patienten möglich. Anders als bei vielen anderen Tumoren gibt es beim Prostatakarzinom nämlich keinen Sentinel-Lymphknoten (Wächterlymphknoten), wo die ersten Lymphknotenmetastasen eines Tumors zu erwarten sind (Burkhard FC, 2005). Das heißt, dass Lymphknotenme-



tastasen praktisch in allen Lymphknoten des kleinen Beckens auftreten können, welche aber nie alle im Rahmen einer Lymphadenektomie entfernt werden. Eine derart ausgedehnte Lymphadenektomie wäre mit einer unverhältnismäßigen Morbidität, insbesondere Lymphozelen verbunden (Peneau M, 2004). Die entnommenen Lymphknoten stellen also immer nur eine Teilmenge der Kandidaten für eine Lymphknotenmetastasierung dar, wobei die entnommene Menge an Lymphknoten stark vom Aufwand des mit der Operation betrauten Chirurgen zusammenhängt. Auch die Identifikation von Lymphknoten bzw. tumorpositiven Lymphknoten durch den mit dieser Aufgabe betrauten Pathologen hängt stark vom betriebenen Aufwand ab. Die Standardmethode zur Lymphknotenuntersuchung ist es, die vom Chirurgen entnommenen Fettpakete zu palpieren und die identifizierten Lymphknoten danach histologisch zu untersuchen (Conti A, 2017). Da die Identifikation der Lymphknoten in dem glitschigen Fettgewebe schwierig ist, hängt die Zahl der gefundenen Lymphknoten stark von der Sorgfalt und dem betriebenen Zeitaufwand des untersuchenden Pathologen ab. Am Institut für Pathologie des UKE wird aus diesem Grund sämtliches entnommenes Fettgewebe eingebettet und histologisch untersucht. Nur dieses Verfahren stellt sicher, dass keine vom Chirurgen entnommenen Lymphknoten verpasst werden. Aber auch diese aufwändige und standardisierte makroskopische Untersuchung von Lymphknoten stellt nicht sicher, dass alle vorhandenen Lymphknotenmetastasen erfasst werden. Denn der histologische Schnitt ist nur 4 µm dick und er trifft nur eine einzige Ebene, welche durch einen Lymphknoten gelegt wird. Es können auch Metastasen in einem Lymphknoten übersehen werden, auch, wenn sie eigentlich erkennbar wären. In einer Studie an Lymphknoten von Mamma-Karzinompatientinnen konnte gezeigt werden, dass Pathologen unter Zeitdruck circa 50% der Mikrometastasen übersahen (Ehteshami Bejnordi B, 2017). Eine andere Möglichkeit die Zahl der übersehenen Lymphknotenmetastasen zu reduzieren ist beispielsweise die am UKE verwendete routinemäßige immunhistochemische Untersuchung von Lymphknoten mit Antikörpern gegen Zytokeratine.

Die aktuellen Leitlinien zur Prostatakarzinomtherapie legen fest, dass der Tumornachweis in mehr als zwei Prostatastanzen (oder der Nachweis von Tumorzellen in mindestens 50% einer Prostatastanze) gegen eine Active Surveillance spricht (Wirth M, 2019). Dies basiert auf der Vorstellung, dass derartige Befunde für einen bereits großen Tumor

in der Prostata sprechen. Allerdings sind auch diese Befunde zu relativieren. Der 50%-Wert wird naturgemäß bei kleinen Prostatastanzen schneller erreicht als bei großen Prostatastanzen und die Entnahme gezielter Biopsien aus einem radiologisch oder palpatorisch auffälligen Bereich führt zu einer beliebig großen Anzahl tumorpositiver Stanzen, je nachdem wie häufig in das identifizierte Ziel hinein gestanzt wird.

Die Schwächen der etablierten Prognoseparameter sind aktuell besonders dramatisch bei der initialen Diagnose eines Prostatakarzinoms, wo entschieden werden muss, ob eine Therapie erfolgt oder nicht. Sobald die adjuvante Chemotherapie beim Prostatakarzinom einen höheren Stellenwert erlangen wird, wird aber auch bei bereits therapierten Patienten die Einschätzung der individuellen Patientenprognose wichtiger werden. Wegen der Schwächen der etablierten morphologischen Parameter ist es wünschenswert, dass diese durch weitere zuverlässigere, stärkere und besser reproduzierbare Parameter ergänzt oder gar ersetzt werden. Aufgrund der großen Fortschritte in der molekularen Charakterisierung von Prostatakarzinomen ist dabei zu hoffen, dass die Untersuchungen relevanter molekularer Parameter hierbei weiterhelfen werden.

Ein bezüglich der Prostatakarzinomprognose potenziell interessantes Gen ist das Avian Myeloblastosis Viral Oncogene Homolog-Like 2 -Protein (MYBL2). MYBL2 ist ein 78764 Dalton schwerer Transkriptionsfaktor. Das kodierende Gen ist auf Chromosom 20q13.12 lokalisiert (Liang HB, 2017) und neben MYBL1 und -3 ein Mitglied der MYB-Transkriptionsfaktorfamilie. Alle drei Transkriptionsfaktoren kodieren für nukleäre Proteine, die als Aktivatoren der Transkription fungieren. MYBL3 kommt vor allem im Knochenmark vor, dort spielt es eine entscheidende Rolle bei der Bildung von hämatopoietischen Stammzellen (Sandberg ML, 2005). Es wird in unreifen Stammzellen vermehrt gebildet und während der abschließenden Differenzierung inaktiviert (Trauth K, 1994). MYBL1 ist überwiegend im Hoden zu finden. Es ist an der Spermatogenese, aber auch an der Proliferation der Brustdrüse beteiligt (Toscani A, 1997).

MYBL2 hingegen ist in allen proliferierenden Zellen vorhanden (Ness, 2003). Es ist an der Kontrolle von diversen Prozessen in der Zelle beteiligt, z.B. an der Regulierung des Zellzyklus und der Differenzierung von Zellen sowie der Apoptose (Musa J, 2017). Da-

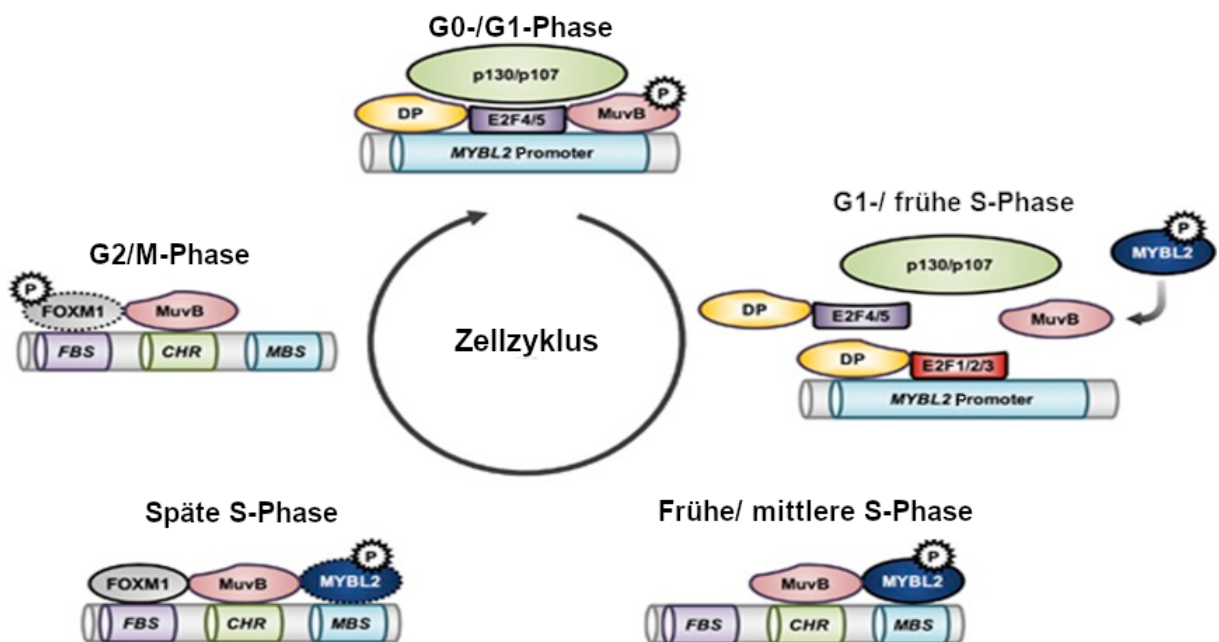
bei induziert MYBL2 beispielsweise die Transkription von mitotischen Genen (Guiley KZ, 2018). MYBL2 ist funktionell und phylogenetisch identisch mit D-MYB, einem Transkriptionsfaktor, der in Drosophilafliegen vorkommt. Studien an Drosophila können somit als Modell für die Funktion von MYBL2 verwendet werden (Davidson CJ, 2005). Ein D-Myb-Knockdown bewirkt eine reduzierte Expression von G2-/M-Phasegenen und führt zu einer verminderten Zellproliferation (Katzen AL, 1998), (Okada M, 2002), (Osterloh L, 2007), (Papetti M, 2011), (Tarasov KV, 2008). Ein Funktionsverlust von MYBL2, z.B. durch eine Mutation, führt zu abnormen Mitosen mit multiplen funktionellen Zentrosomen, ungleicher Chromosomensegregation, sowie zur Bildung von Mikronuklei (Fung SM, 2002). Dies spricht für eine Bedeutung von MYBL2 für die Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität (Tarasov KV, 2008), (Fung SM, 2002), (Manak JR, 2002), (Shepard JL, 2005).

MYBL2 ist ein Gen, das den Zellzyklus reguliert, aber auch durch ihn reguliert wird. Es unterliegt der Kontrolle eines Multiproteinkomplexes, dem DREAM-Komplex (DP, RB-Like, E2F und MuvB-Komplex). Dieser spielt eine wichtige regulierende Rolle im Zellzyklus und besteht aus den Dimerisierungspartnern DP1, -2, -3, den RB-ähnlichen Proteinen p130, p107, E2F (E2F4 oder E2F5) und einem weiteren Multiproteinkomplex, dem MuvB-Komplex (Musa J, 2017). Durch den DREAM-Komplex wird die Genrepression von MYBL2 während der Ruhephase (G0-Phase) vermittelt und die periodische Genexpression während der G1-/S- und der G2-/M-Phase kontrolliert. Ist diese Regulierung gestört verschiebt sich das Gleichgewicht von Ruhe zu Proliferation und es kommt zu einer erhöhten Expression von mitoserelevanten Genen (Sadasivam S D. J., 2013). Folglich kann sich die Zelle unkontrolliert teilen.

MYBL2 interagiert während des Zellzyklus vor allem mit dem MuvB-Komplex des DREAM-Komplexes, um Gene zu aktivieren, die für die G2- und die M-Phase benötigt werden (Guiley KZ, 2018). Der Transkriptionsregulationskomplex MuvB besteht seinerseits aus fünf Kernproteinen LIN9, LIN37, LIN52, RBBP4 und LIN54 (Guiley KZ, 2018). Während der G0-Phase ist die Expression von MYBL2 kaum nachweisbar. Am Übergang von der G1- in die S-Phase wird die Genexpression induziert, wobei die Proteingehalte während des gesamten Zellzyklus parallel zur Expression von mRNA sind.

Während der Ruhephase und der G1-Phase der Zelle bindet der MuvB-Komplex an p130 und die Transkriptionsfaktoren E2F4/5-DP1/2. Es liegt der DREAM-Komplex vor. Dieser bindet auch an den MYBL2-Promoter, wodurch die Expression von MYBL2 unterdrückt wird. Zu diesem Zeitpunkt liegt LIN52, ein Kernprotein des MuvB-Komplexes, phosphoryliert vor. Erhält eine ruhende Zelle ein passendes Signal eines Wachstumsfaktors, tritt sie in den Zellzyklus ein. Die DYRK1A-abhängige Phosphorylierung von LIN52 wird gelöst, dadurch dissoziieren P130 oder p107 vom MuvB-Kern und von den Repressoren E2F4 und E2F5. Der DREAM-Komplex zerfällt somit und der MYBL2-Promoter wird freigegeben. MYBL2 kann ab diesem Zeitpunkt zunehmend exprimiert werden. Außerdem können die Aktivatoren E2F1, -2, -3 jetzt durch den Wegfall der Phosphorylierung von LIN52 Zellzyklusgene der G1- und S-Phase transaktivieren (Sadasivam S D. J., 2013). In der G1- und S-Phase wird MYBL2 zunehmend exprimiert und durch Cyclin A/E-CDK2-abhängige Phosphorylierung aktiviert (Musa J, 2017). Der Transkriptionsfaktor bindet direkt an den Promotor von G2/M-Phase-Genen und transaktiviert diese (unter anderen Cyclin B1, CDK1 und Cyclin A2) (Zhu W, 2004). Während der S-Phase fusioniert MYBL2 mit dem MuvB-Komplex zum MMB(MYBL2-MuvB)-Komplex. Die Transkription von Mitoseerforderlichen Proteinen wird dadurch aktiviert (Litovchick L, 2007), (Sadasivam S D. S., 2012). In der späten S-Phase bindet mit FOXM1 ein weiteres Protein an den MMB-Komplex, sodass der MMB-FOXM1-Komplex (MYBL2-MuvB-FOXM1-Komplex) entsteht (Sadasivam S D. S., 2012). Die DNA-Bindungsdomäne von FOXM1 hat eine sehr geringe Bindungsaffinität zu seinen Zielsequenzen und es wird davon ausgegangen, dass MYBL2 diese Zielspezifität von FOXM1 erhöht (Sadasivam S D. S., 2012). Nach der Bildung des MMB-FOXM1-Komplexes wird MYBL2 in der späten S-Phase nach und nach durch Proteasen abgebaut (Charrasse S, 2000), sodass in der G2-/M-Phase der FOXM1-MuvB-Komplex vorherrscht. Zeitgleich wird FOXM1 durch Phosphorylierung verstärkt aktiviert (Fu Z, 2008). Während der M-Phase dissoziiert der MuvB-FOXM1-Komplex durch zunehmenden APC/C-CDH1-abhängigen Abbau von FOXM1 und es kommt zu einer erneuten Bildung des DREAM-Komplexes in der G0-/G1-Phase (Park HJ, 2008).

Abbildung 1: MYBL2 Expression im Zellzyklus (Musa J., 2017)



Schon lange ist ein Zusammenhang zwischen MYBL2 und dem Überleben von Zellen bekannt. Meist findet die Regulierung durch die Transkription von bestimmten Zielgenen statt, allerdings kann sie auch durch direkte Protein-Protein-Interaktionen vermittelt werden. Ob der Transkriptionsfaktor eine Pro- oder eine Anti-Überlebensfunktion hat, scheint vom jeweiligen Zelltyp abzuhängen (Musa J, 2017). In Studien an murinen Interleukin2-abhängigen T-Zellen wurde ein Zusammenhang zwischen erhöhter MYBL2-Expression und vermehrter Transaktivierung des Anti-apoptotischen BCL-2 hergestellt, wodurch die Zellen resistenter gegen chemotherapeutika-induzierte Apoptose wurden. Dies betrifft z.B. Stoffe wie Doxorubicin, Ceramide und Dexamethasone (Grassilli E, 1999). In Eizellen unterdrückt MYBL2 die Autophagie und fördert das Zellüberleben (Yuan J, 2015). In Neuralzellen erwirkt MYBL2 einen gegensätzlichen Effekt, so schützt z.B. ein Knockdown des Transkriptionsfaktors Pheochromozyten vor dem Zelltod (Liu DX, 2004).

MYBL2 besitzt, wenn es dereguliert wird, onkogenes Potenzial und kann wesentlich zur Krebsprogression beitragen. Es fördert die Krebszellproliferation, die Therapieresistenz und die Metastasierung (Musa J, 2017). Eine erhöhte Expression und Aktivität von MYBL2 kann durch eine Amplifikation des Gens auf Chromosom 20q13 erfolgen. Dies wurde bei Formen von Brustkrebs, Colonkrebs und Tumoren der Ovarien beschrieben (Shi H, 2011), (Lassmann S, 2007), (Tanner MM, 2000). Außerdem kann eine fehlerhafte Funktion von MYBL2 aus einer Deregulation des DREAM-Komplexes resultieren, z.B. durch eine Mutation von p53. In gesunden Zellen reguliert p53 p21. Wird p21 aktiviert verhindert es die Phosphorylierung von p130. Dadurch kommt es zu einem Dissoziieren des MYBL2-MuvB-Komplexes und der DREAM-Komplex wird erneut gebildet (Quaas M, 2012). Die Expression von MYBL2 wird somit verhindert und es findet keine Transkription von mitotischen Genen statt. Diese Signalkette wird p53-p21-DREAM-pathway genannt und greift bei Zellstress, z.B. durch DNA-Schäden. Sie hindert die Zelle am Fortschreiten im Zellzyklus (Fischer M Q. M., 2016), (Fischer M Q. M., 2015). Bei einer Inaktivierung von p53, z.B. durch das HPV16 E7 Onkogen greift der p53-p21-DREAM-pathway nicht und die Expression von MYBL2 ist von der negativen Regulierung entkoppelt. Als Folge kann vermehrt MYBL2 an MuvB und FOXM1 binden, wodurch in der Zelle während der späten S-Phase unkontrolliert mitotische Gene aktiviert werden. Das Resultat ist eine gesteigerte Proliferation (Musa J, 2017). Außerdem kann die MYBL2-Expression auf post-transkriptioneller Ebene durch eine Fehlfunktion von micro-RNAs pathologisch gesteigert werden (Deng S, 2008).

Die erste immunhistochemische Untersuchung von MYBL2 in einem malignen Tumor erfolgte 2008 durch Nakajima et al. an 22 primären Leberzellkarzinomen (Nakajima T, 2008). Hier wurde eine höhere MYBL2-Expression im Tumor als im peritumoralen normalen Lebergewebe gefunden, wobei MYBL2 in 20 von 22 Tumoren (91%) hochreguliert war. Spätere immunhistochemische Untersuchungen der MYBL2-Proteinexpression erfolgten bei der akuten myeloischen Leukämie (Fuster O, 2013), Mammakarzinomen (Chen J, 2018), Gallenblasenkarzinomen (Liang HB, 2017), Endometriumkarzinomen (Häring J, 2012), Hirntumoren (Zhang X, 2017), Kolorektalkarzinomen (Ren F, 2015), nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen (Geng GJ, 2018), Öso-

phaguskarzinomen (Qin HD, 2016), Magenkarzinomen (Jia Y, 2019), Pankreaskarzinomen (Yu R, 2017) und dem Zervixkarzinom (Astbury K, 2011). Die Daten dieser Untersuchungen stimmen weitgehend miteinander überein. MYBL2 war in allen genannten Tumorarten in Tumoren höher exprimiert als im korrespondierenden Normalgewebe. In den meisten Studien, in welchen Tumoren mit unterschiedlichem Phänotyp zur Untersuchung gelangten, wurde über eine höhere MYBL2-Expression in fortgeschrittenen Tumoren als in weniger fortgeschrittenen Tumoren berichtet. Darüber hinaus wurden in Studien am Ösophaguskarzinom, Gallenblasenkarzinom, Pankreaskarzinom und der akuten myeloischen Leukämie über eine signifikante Beziehung zwischen einer erhöhten MYBL2-Expression und einer ungünstigen Prognose berichtet (Qin HD, 2016), (Liang HB, 2017), (Yu R, 2017), (Fuster O, 2013). Eine immunhistochemische Untersuchung der MYBL2-Expression an einem Kollektiv von primären Prostatakarzinomen wurde bisher nicht durchgeführt. Allerdings gibt es Hinweise von Studien, welche RNA-Expressionsdaten analysierten, dass MYBL2 in fortgeschrittenen, metastatischen und kastrationsrefraktären Prostatakarzinomen überexprimiert werden könnte (Anat Bar-Shira, 2002). In einer Studie, welche nach Transkriptionsfaktoren suchte, welche bei Androgenmangelzuständen in Prostataepithelzellen aktiviert werden, gehörte MYBL2 zu den zehn am meisten hochregulierten Proteinen (Rosa-Ribeiro R, 2014). Zhang et al. fanden heraus, dass der bei hormonrefraktären Prostatakarzinomen häufig aktivierte Transkriptionsfaktor FOXa1 mit MYBL2 interagiert (Zhang C, 2011). Alberti et al. beschrieben eine Hochregulation von MYBL2 in Prostatakarzinometastasen im Vergleich zu den korrespondierenden Primärtumoren (Alberti, 2008).

Aufgrund der interessanten Funktion von MYBL2, dem Nachweis einer signifikanten Prognoseassoziation in mehreren Tumorarten und vielversprechenden Vorbefunden beim Prostatakarzinom entschieden wir uns die prognostische Bedeutung der MYBL2-Expression an einem Kollektiv von mehr als 15.000 radikal prostatektomierten Patienten zu überprüfen.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Patienten**

Alle in die Untersuchung eingeschlossenen Patienten waren zwischen 1992 und 2014 an der urologischen Klinik des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf oder an der Martiniklinik prostatektomiert worden. Die entnommenen Prostaten wurden alle am Institut für Pathologie nach einem standardisierten Verfahren untersucht. Dabei wurde in allen Fällen die gesamte Prostata in Scheiben lamelliert und komplett eingebettet. Die Untersuchung der Lymphknoten wurde im Untersuchungszeitraum mehrfach optimiert. Von 1992-2008 wurden nur palpatorisch erkannte Lymphknoten untersucht. Ab 2008 wurde auch das übrige Fettgewebe eingebettet und histologisch untersucht. Seit 2012 wurden mindestens 4, seit 2014 mindestens 8 Tumorblöcke immunhistochemisch mit Panzytokeratinen-Antikörpern auf das Vorliegen von Metastasen untersucht (Wilczak W, 2018). Der Gleason Score wurde seit 2005 standardisiert untersucht (nach den Kriterien, welche in der WHO-Klassifikation 2004 beschrieben worden waren). Neben der Bestimmung des Gleason Grades erfolgte bei allen Tumoren eine prozentuale Quantifizierung der Anteile von Gleason 3, 4 und 5 Mustern in den Tumoren. Die Tumorpräparate wurden in 4% gepuffertem Formalin für mindestens 16 Stunden fixiert.

### **2.2 TMA-Technik**

Von den Tumoren der Patienten war bereits früher ein Tissue Microarray (TMA) hergestellt worden. Bei diesem Verfahren werden aus tumorhaltigen Paraffinblöcken zylindrische Gewebefragmente mit einem Durchmesser von 0,6mm entnommen und in einen vorgefertigten Hohlraum in einem Empfängerparaffinblock eingeführt (Bubendorf L, 2001), (Sauter G S. R., 2003). Das Verfahren ermöglicht die Integration von mehr als 600 Gewebefragmenten in einen TMA-Block, wobei jedes einzelne Gewebeelement an einer vorher genau definierten Stelle im Empfängerblock deponiert wird. Für jeden TMA-Block werden die Stellen, an denen die Tumorfragmente der einzelnen Patienten deponiert werden durch ein Koordinatensystem definiert. Die am UKE angefertigten TMA-Blöcke weisen typischerweise 6 Sektoren auf (A-F). Für jeden Sektor werden die Spalten mit fortlaufenden Kleinbuchstaben (z.B. a-r) und die Zeilen mit Nummern (1-9)



definiert. Abbildung 2a zeigt ein Beispiel eines typischen TMA-Blockes aus dem UKE. Abbildung 3 zeigt das dazugehörige „Cartoon“, welches die einzelnen Tumorgewebspots einem Koordinatensystem zuordnet. Das für diese Untersuchung verwendete Kollektiv von TMA-Blöcken besteht aus 39 Blöcken mit insgesamt 17747 Tumoren (und Kontrollgeweben). Das gesamte TMA-Kollektiv ist in Abbildung 4 dargestellt.

Abbildung 2a: Übersichtsaufnahme eines TMA-Schnittes

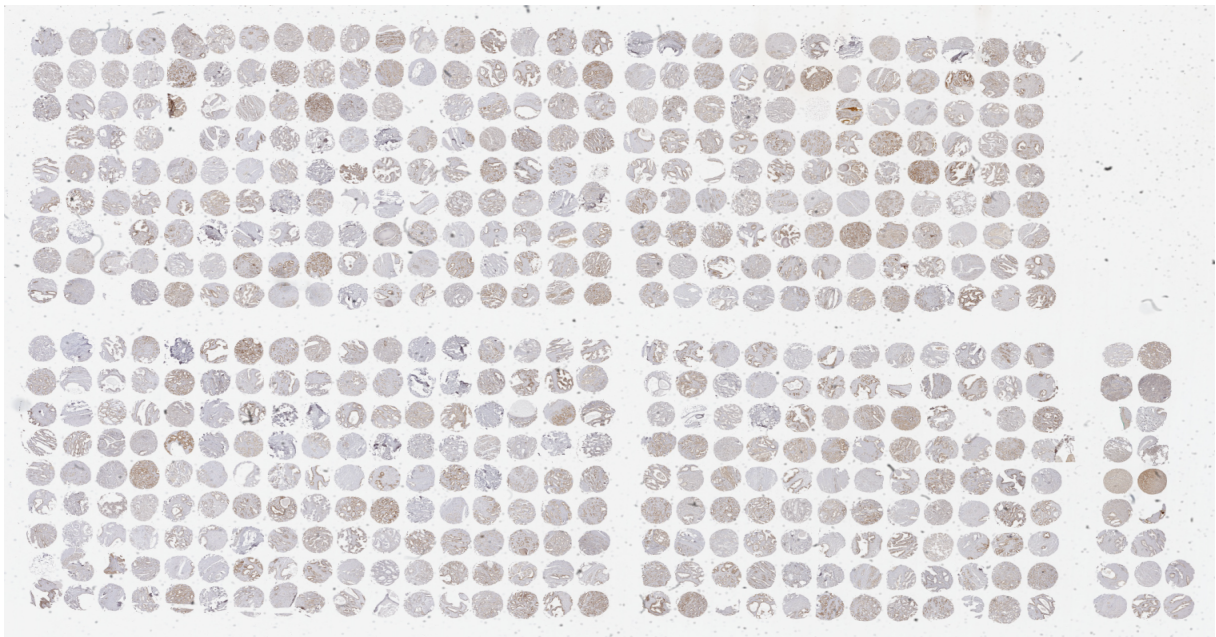


Abbildung 2b: Detailaufnahme einer einzelnen Stanze bei 7-facher Vergrößerung

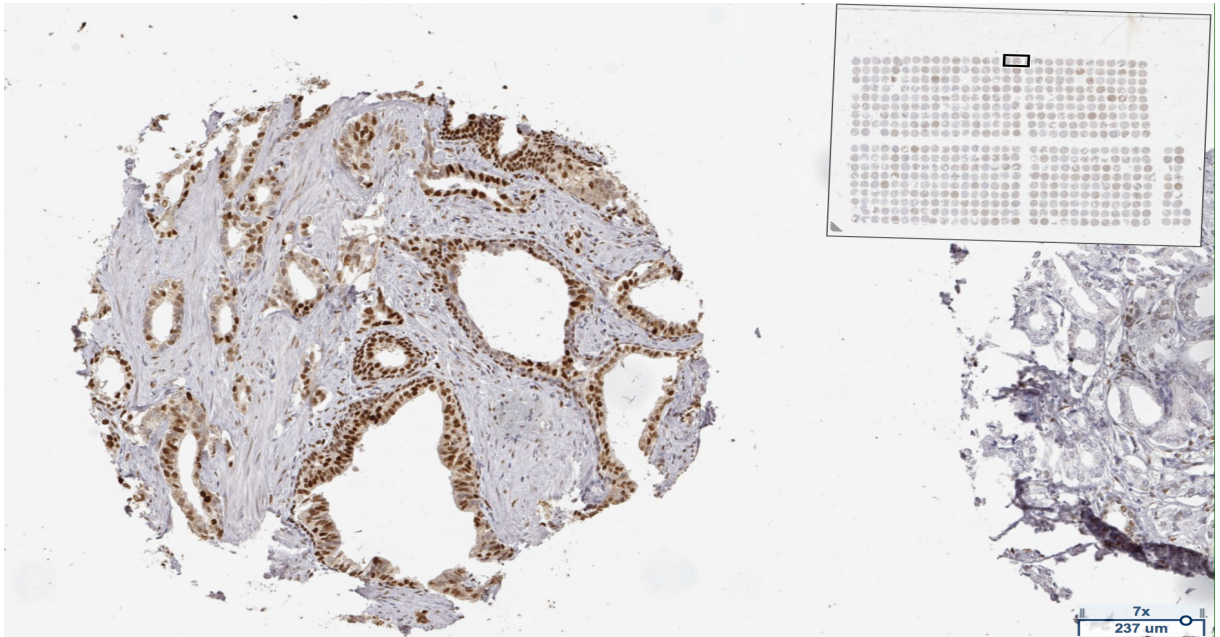


Abbildung 3: Schematische Darstellung eines TMA-Blockes

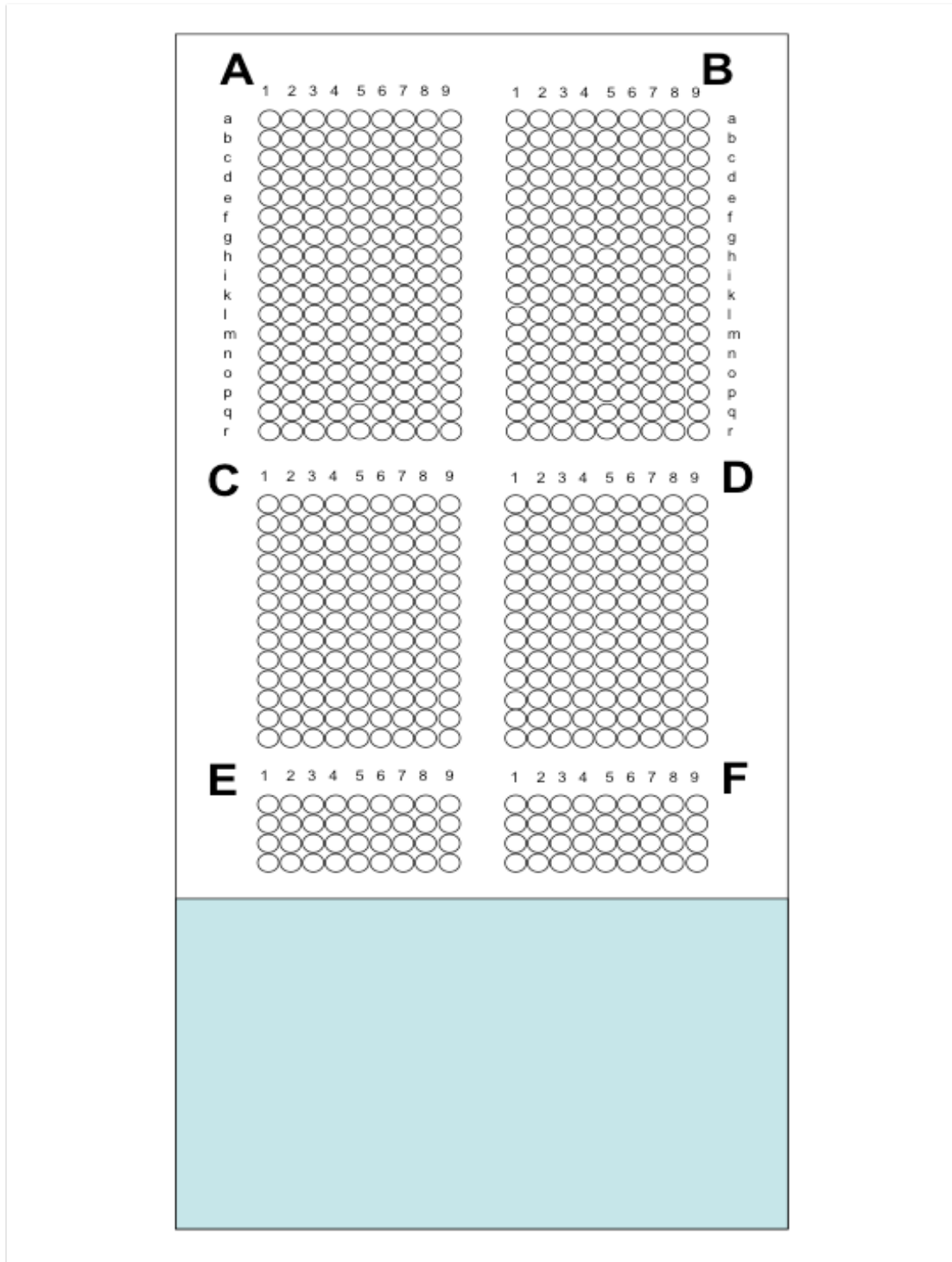


Abbildung 4: Prostatakarzinom-TMA-Kollektiv



Das TMA-Verfahren ist besonders geeignet für die Pseudonomisierung und Anonymisierung von Patienten- und Gewebedaten, da die Patientenidentifizierungsnummern (Biopsienummern) nur für die Herstellung des TMAs benötigt werden und nachher ausgeblendet (pseudonymisiert) oder permanent gelöscht (anonymisiert) werden können. Tabelle 1 zeigt ein Beispiel von Patientendaten, welche zum Hamburger Prostatakarzinom-TMA vorhanden sind.

Tabelle 1: Patientendaten

Pat.-ID	TMA	localisat.	Alter bei OP	PSA prä OP	RPE_Gleason	RPE_quant_Gleason	Bx. klin. Stadium 2	pN group	R_Status	Bx. Anzahl Stanzes ges.	Bx. Anzahl Stanzes pos.	Bx. Gleason max group	BCR censor	BCR month
2176	Pro 6.1	A 6c	62,4	6,32	≤3+3	≤3+3	T1c	N0	positiv	6	2	≤3+3		
2177	Pro 6.1	A 6d	65,6	14,95	3+4	3+4 6-10%	T1c	N0	negativ	6	1	3+4	1	144
2178	Pro 6.1	A 6e	63,1	8,74	3+4	3+4 6-10%	T1c	N0	negativ	6	3	3+4	1	107,9
2179	Pro 6.1	A 6f	63,8	7,2	≤3+3	≤3+3	T1c	N0	negativ	6	1	≤3+3	1	139,5
2180	Pro 6.1	A 6g	56,4	0,39	4+3	4+3 61-80%	T1c	N+	positiv	6	6	4+3	0	3,6
2181	Pro 6.1	A 6h	71,4	5,51	3+4	3+4 ≤5%	T2a	N0	negativ	6	5	3+4	0	57,1
2182	Pro 6.1	A 6i	63,6	4	≤3+3	≤3+3	T1c	N0	negativ			≤3+3	1	67,7
2183	Pro 6.1	A 6k	60,9	6,2	≤3+3	≤3+3	T1c	N0	negativ	10	7	≤3+3	1	17,6
2184	Pro 6.1	A 6l	62,2	4,04	3+4	3+4 31-49%	T1c	N0	negativ	10	3	3+4	0	97,1
2185	Pro 6.1	A 6m	67,3	15,94	≤3+3	≤3+3	T1c	N0	negativ	6	1	3+4	1	96,8
2186	Pro 6.1	A 6n	62,2	8,6	3+4	3+4 11-20%	T1c	N0	negativ	10	3	3+4	1	144,8
2187	Pro 6.1	A 6o	75,1	4,3	≤3+3	≤3+3	T1c	N0	positiv			≤3+3	1	122,4
2188	Pro 6.1	A 6p	65,5	8,57	3+4	3+4 6-10%	T1c	N0	negativ			3+4	0	90,6
2189	Pro 6.1	A 6q	60,5	12,39	≤3+3	≤3+3	T1c	N0	negativ	10	1	≤3+3	1	17,2
2190	Pro 6.1	A 6r	42,5	24,9	3+4	3+4 6-10%	T2b	N0	negativ			3+4	0	34,7
2191	Pro 6.1	A 7a	58,3	7,54	3+4	3+4 ≤5%	T1c	N0	positiv			≤3+3	1	72
2192	Pro 6.1	A 7b	70,1	0,51	3+4	3+4 11-20%	T1c	N0	negativ			3+4	0	111,5
2193	Pro 6.1	A 7c	64,4	9,67	3+4	3+4 ≤5%	T1c	N0	negativ	6	3	3+4	1	144,6
2194	Pro 6.1	A 7d	59,5	17,33	≤3+3	≤3+3	T1c	N0	negativ			≤3+3	0	27,7
2195	Pro 6.1	A 7e	64,5	8,4	≤3+3	≤3+3	T1c	N0	negativ	6	2	≤3+3	1	6,7
2196	Pro 6.1	A 7f	57,3	2	3+4	3+4 11-20%	T2b	N0	negativ	6	5	3+4	0	28,7
2197	Pro 6.1	A 7g	58,8	3,8	≤3+3	≤3+3	T1c	N0	negativ	8	2	≤3+3	0	86
2198	Pro 6.1	A 7h	57,2	5,56	3+4	3+4 ≤5%	T1c	N0	positiv	6		≤3+3	1	146
2199	Pro 6.1	A 7i	60,9	3,6	3+4	3+4 6-10%	T2a	N0	negativ	6	3	≤3+3	0	36,5
2200	Pro 6.1	A 7k	66,1	3,71	≤3+3	≤3+3	T2a	N0	negativ	6	1	≤3+3	1	144,4
2201	Pro 6.1	A 7l	68,4	8,36	≤3+3	≤3+3	T1c	N0	negativ	6	1	≤3+3	1	144,4
2202	Pro 6.1	A 7m	64	3,54	3+4	3+4 21-30%	T2b	N0	positiv			3+4		
2203	Pro 6.1	A 7n	64,1	10,61	3+4	3+4 6-10%	T1c	N0	negativ	10	1	≤3+3	0	108,6
2204	Pro 6.1	A 7o	64,4	4,38	≤3+3	≤3+3	T1c	N0	negativ	6		≤3+3	0	89,4

### 2.3 Immunhistochemie

Die IHC dient dem Nachweis von Proteinen direkt im Gewebe mittels einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Um ein optimales Färbeergebnis zu erzielen, wurden frische TMA-Schnitte (maximal 5 Tage alt) in einem Versuchsdurchlauf unter Verwendung des Dako REAL™ EnVision™ Detection System Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse, K5007 Kit wie folgt gefärbt:

- Entparaffinierung in Xylol und einer absteigenden Ethanolreihe (99%, 96%, 80%, 70%),
- Waschen in dH<sub>2</sub>O,
- Antigenemaskierung für 5 Minuten in Tris-EDTA-Citrat-Puffer (pH 7,8) bei 121°C im Autoklaven,
- 2-maliges Waschen für 5 Minuten in EnVision™ Flex Wash Buffer (TBST-Waschpufferlösung),
- Blocking der endogenen Peroxidase für 10 Minuten mit Dako REAL™ Peroxidase -Blocking Solution S2023 (Wasserstoffperoxid),
- 2-maliges Waschen für 5 Minuten in EnVision™ Flex Wash Buffer (TBST-Waschpufferlösung),
- 1:450 Verdünnung des MYBL2 Antikörpers (primärer Antikörper, Rabbit, polyklonal, HPA030530, Sigma) mit Dako REAL™ Antibody Diluent,
- Inkubation des MYBL2 Antikörpers für 60 Minuten bei 37°C,
- 2-maliges Waschen für 5 Minuten in EnVision™ Flex Wash Buffer (TBST-Waschpufferlösung),
- Inkubation des EnVision rabbit/mouse DAKO K5007 (sekundärer Antikörper) für 30 Minuten bei 37°C,
- 2-maliges Waschen für 5 Minuten in EnVision™ Flex Wash Buffer (TBST-Waschpufferlösung),

- Inkubation des DAB+ Chromogen (50x) K5007 (Diaminobenzidin) (1:50 Verdünnung: 0,1 mL DAB+ und 4,9 mL Substratpuffer Dako REAL™) für 10 Minuten bei Raumtemperatur zur Visualisierung der Antikörperbindung,
- Waschen in dH<sub>2</sub>O,
- Inkubation in Haemalaun für 3 Minuten mit anschließendem Spülen in Leitungswasser zur Gegenfärbung (Einbläuen) und
- Entwässerung in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70%, 80%, 96%, 99%, Xylol).

In der mikroskopischen IHC-Auswertung wurden die Färbeintensität und der prozentuale Anteil der angefärbten Tumorzellen beurteilt. Die Färbeintensität wurde eingeteilt in 0 (keine Färbung), 1+ (leichte Färbung), 2+ (mittelstarke Färbung) und 3+ (starke Färbung). Die Färbeintensität und der prozentuale Anteil wurden in einem IHC-Score wie folgt zusammengefasst: *negativ*: Färbeintensität = 0, *schwach*: Färbeintensität von 1+ in < 70% der Tumorzellen oder von 2+ in < 30% der Tumorzellen, *moderat*: Färbeintensität von 1+ in >70% der Tumorzellen, von 2+ in >30 % aber <70 % der Tumorzellen oder von 3+ in <30 % der Tumorzellen, *stark*: Färbeintensität von 2+ in >70 % der Tumorzellen oder von 3+ in >30 % der Tumorzellen.

## 2.4 Datenbank

Die Hamburger Prostatakarzinomsammlung war in zahlreichen früheren Untersuchungen mit multiplen molekularen Markern untersucht worden. Daraus resultierte eine Datenbank, welche mehr als 100 molekulare Parameter beinhaltet. Für die aktuelle Untersuchung wurden aus dieser Datenbank die folgenden Parameter untersucht:

- a) ERG-Status, weil die TMPRSS/ERG-Fusion die beim Prostatakarzinom am häufigsten vorkommende molekulare Alteration darstellt,
- b) chromosomale Deletionen von 3p14, 5q21, 6q15, 8p21, 10q23 (PTEN), 12p13, 12q24, 13q14, 16q24, 17p13 und 18q21. Die Deletionen wurden untersucht, weil, chromosomale Deletionen nach der TMPRSS/ERG-Fusion die am häufigsten vorkommenden rekurrenten genomischen Alterationen beim Prostatakarzinom

sind. Zudem ist ihr Auftreten ein Indikator für das Vorhandensein einer genetischen Instabilität,

- c) KI67-Labeling Index. KI67-Protein wird in allen proliferierenden Zellen in der G1-, S-, G2- und M- Phase exprimiert. Die Bestimmung des prozentualen Anteils Ki-67-positiver Tumorzellen (Ki-67-Labeling Index) ist ein Maß für die Tumorzellproliferation. Dieser Parameter war für die vorliegende Untersuchung interessant, weil MYBL2 eine Rolle bei der Proliferationskontrolle ausübt,
- d) p53-Immunhistochemie. Die p53-Expression wurde wegen der bekannten Interaktion von MYBL2 mit p53 untersucht und
- e) BCL2-Expression. BCL2 hemmt das Eintreten einer Zelle in die Apoptose. Die Expression von BCL2 wurde wegen der bekannten Interaktion von MYBL2 mit BCL2 untersucht.

## 2.5 Statistik

Alle statistischen Untersuchungen wurden mit dem Softwareprogramm JMP® 10.0.2 (SAS Institute Inc., NC, USA) durchgeführt. Mehrfeldertest und Chi-Quadrat-Test wurden verwendet, um Assoziationen zwischen kategorischen Parametern, wie beispielsweise der MYBL2-Expression und dem Tumorphänotyp zu untersuchen. Überlebenskurven wurden nach der Kaplan-Meier-Methode hergestellt. Ein log-rank Test wurde hierbei verwendet, um signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen zu identifizieren. Eine Cox-proportional-hazard-Regressionsanalyse wurde durchgeführt, um die statistische Unabhängigkeit multipler Parameter auf das rezidivfreie Überleben zu berechnen. Für diese Untersuchungen wurden verschiedene Modelle mit unterschiedlichen Gruppen von Parametern durchgeführt, je nachdem, ob die Parameter vor oder erst nach der Prostatektomie zur Verfügung standen.



### 3. Ergebnisse

#### 3.1. MYBL2-Expression in Normalgeweben und Tumoren

Die überwiegende Mehrzahl der Tumoren zeigte eine nukleäre und zytoplasmatische MYBL2-Anfärbung, wobei die MYBL2-Anfärbung in Tumoren tendenziell eher stärker war, als in Normalgewebe. Die Quantifizierung der MYBL2-Expression hatte eine nachweisbare Positivität in 93,4% der Tumoren ergeben, wovon 70% eine schwache, 20,7% eine mäßiggradige und 2,7% eine starke Positivität aufwiesen. Beispiele von Tumoren mit unterschiedlich starker MYBL2-Expression sind in den Abbildungen 5a)-d) gezeigt. Die Abbildung 6 zeigt nebeneinander gelegene Areale von normalem Prostataepithel und von Tumordrüsen. Insgesamt waren 14.489 von 17.747 Karzinomen bezüglich immunhistochemischer MYBL2-Färbung auswertbar.

Abbildung 5a) - d): Tumoren mit unterschiedlich starker MYBL2-Expression

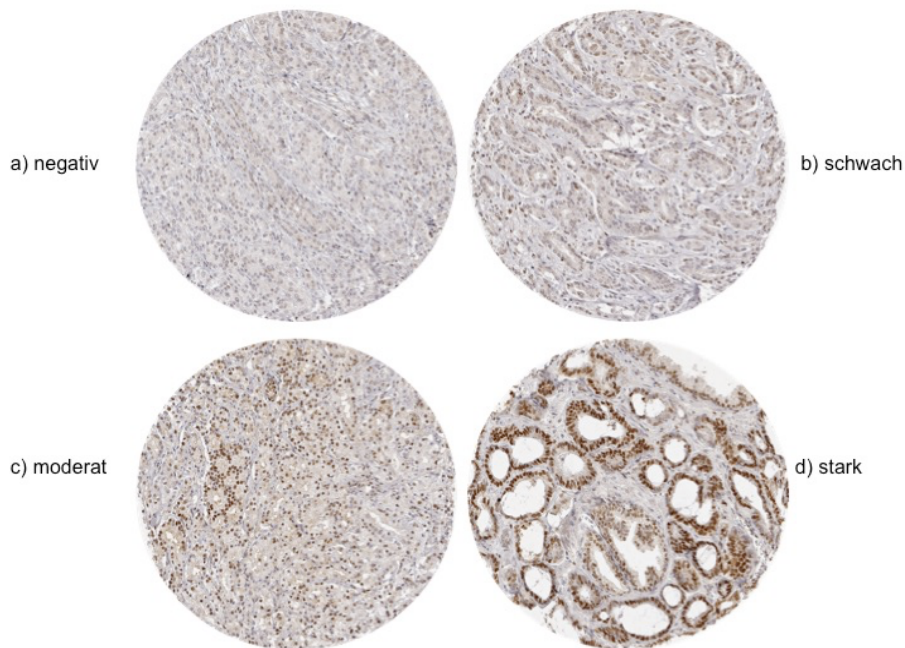
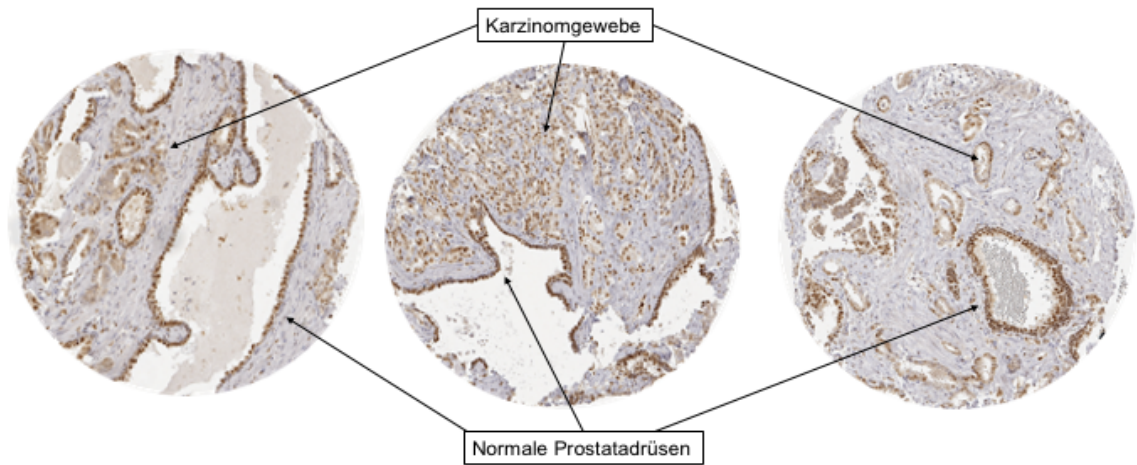


Abbildung 6: Nebeneinander liegende Areale von physiologischem Prostataepithel und Tumorgewebe



Die Beziehung zwischen der Intensität der MYBL2-Immunfärbung und dem Tumorphänotyp ist in Tabelle 2 dargestellt. Dabei zeigte sich ein hochsignifikanter Zusammenhang mit dem pT-Stadium, dem traditionellen Gleason-Grad, dem quantitativen Gleason-Grad und dem präoperativen Serum-PSA-Wert ( $p$  jeweils  $<0,0001$ ) und auch dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen ( $p=0,0003$ ). Allerdings waren die Expressionsunterschiede in absoluten Zahlen weniger ausgeprägt als der  $p$ -Wert vermuten ließe. So sank die Zahl der MYBL2-negativen Tumoren von 7,2% bei pT2-Tumoren auf 3,7% bei pT3b/pT4-Karzinomen, wobei in dieser Analyse der Anteil der stark positiven von 2,5% bei pT2 auf 3,5% bei pT3b/pT4-Karzinome stieg. Auch für den Gleason-Grad waren die Unterschiede gering. Der Anteil der negativen Tumoren ging von 8,8% bei Gleason 3+3-Karzinome auf 5,2% bei  $\geq$  Gleason 4+4-Karzinome zurück, wobei hier auch die Zahl der stark positiven Tumoren lediglich von 4,6% bei Gleason 3+3 auf 2,4% bei Gleason  $\geq$ 4+4 zurückging. Der wesentliche Unterschied zwischen den durch Gleason-Grad definierten Gruppen lag in einem Anstieg der schwach positiven auf Kosten der mäßig stark positiven Tumoren mit ansteigendem Gleason Score.

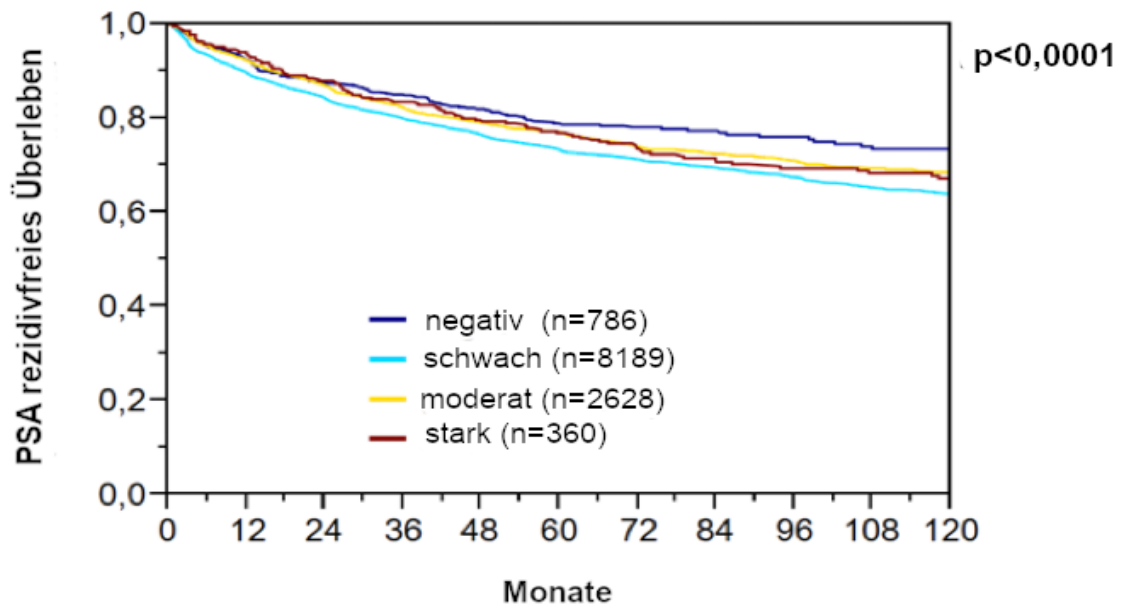
Auch die Prognoseunterschiede zwischen Tumoren mit unterschiedlicher MYBL2-Expression waren statistisch hoch signifikant (Abbildung 7,  $p<0,0001$ ), allerdings in ab-

soluten Zahlen gering. Auffallend war bei der Untersuchung aller Tumoren die besonders günstige Prognose bei negativen und stark positiven Tumoren.

Tabelle 2: MYBL2-Immunfärbung und Tumorphänotyp (alle Tumoren)

Parameter	n auswertbar	Negativ (%)	Schwach positiv (%)	Moderat positiv (%)	Stark positiv (%)	p-Wert
<b>Alle Tumoren</b>	14489	8,0	70,0	20,7	2,7	
<b>Tumorstadium</b>						<0,0001
pT2	9312	7,2	69,3	21,0	2,5	
pT3a	3188	6,5	70,7	20,1	2,7	
pT3b-pT4	1932	3,7	72,7	20,1	3,5	
<b>Gleason-Grad</b>						<0,0001
≤3+3	2872	8,8	60,5	26,0	4,6	
3+4	7638	6,9	70,5	20,2	2,4	
3+4 Tert.5	657	5,0	80,4	14,2	0,5	
4+3	1419	4,7	69,6	22,6	3,1	
4+3 Tert.5	992	2,8	81,7	14,6	0,9	
≥4+4	807	5,2	77,3	15,1	2,4	
<b>Quantitativer Gleason-Grad</b>						<0,0001
≤3+3	2872	8,8	60,5	26,0	4,6	
3+4 ≤5%	1968	8,1	68,6	21,3	2,0	
3+4 6-10%	1922	7,1	70,1	21,0	1,8	
3+4 11-20%	1663	6,9	73,5	18,1	1,6	
3+4 21-30%	850	5,3	72,2	20,5	2,0	
3+4 31-49%	689	4,9	75,9	17,6	1,6	
3+4 Tert.5	657	5,0	80,4	14,2	0,5	
4+3 50-60%	577	4,3	70,7	22,4	2,6	
4+3 Tert.5	992	2,8	81,7	14,6	0,9	
4+3 61-100%	641	4,5	72,4	21,1	2,0	
≥4+4	703	5,4	78,9	13,8	1,8	
<b>Lymphknotenmetastasen</b>						0,0003
N0	8670	6,2	71,3	19,9	2,6	
N+	1020	4,3	77,5	16,2	2,0	
<b>Präoperativer PSA Level (ng/ml)</b>						<0,0001
<4	1765	4,9	66,7	24,4	4,0	
4-10	8581	6,5	69,6	21,2	2,6	
10-20	3019	7,5	72,1	18,1	2,3	
>20	1034	7,5	74,2	16,8	1,5	
<b>Chirurgischer Resektionsrand</b>						0,0246
negativ	11549	6,5	69,7	21,1	2,8	
positiv	2888	7,0	71,7	18,9	2,3	

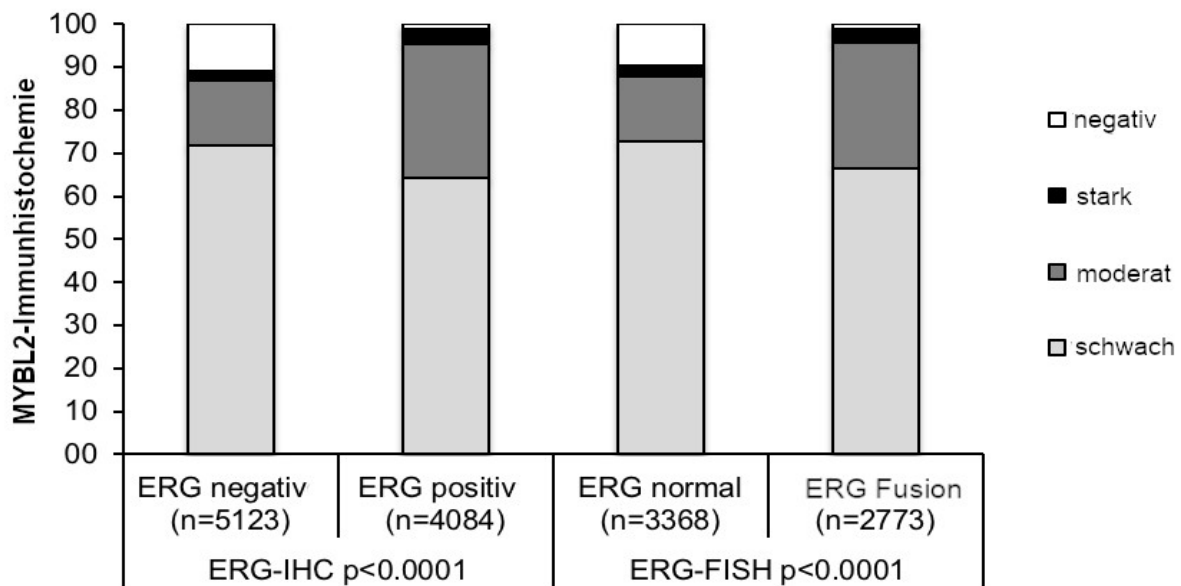
Abbildung 7: MYBL2-Expression und biochemisches Rezidiv (alle Tumoren)



### 3.2. MYBL2-Expression und TMPRSS2/ERG-Fusionsstatus

Generell fand sich eine nachweisbare MYBL2-Expression bei ERG-positiven Tumoren häufiger und deutlicher ausgeprägt als bei ERG-negativen Tumoren. Dies fand sich sowohl bei immunhistochemischer Bestimmung des ERG-Status wie auch beim Nachweis der TMPRSS2/ERG-Fusionen mittels Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung (Abbildung 8, p jeweils  $< 0,0001$ ).

Abbildung 8: MYBL2-Immunfärbung und ERG-Fusionsstatus

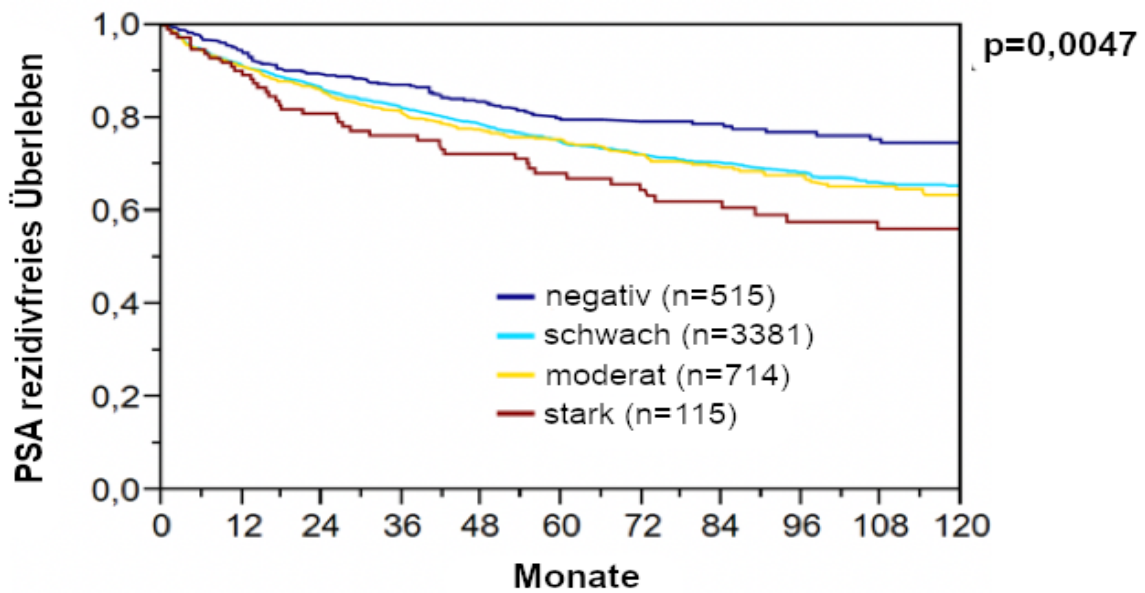


Aufgrund der deutlichen Unterschiede im MYBL2-Expressionsverhalten zwischen ERG-positiven und ERG-negativen Tumoren wurde die Beziehung zwischen der MYBL2-Expression und dem Tumorphänotyp in beiden molekulardefinierten Subgruppen separat untersucht. Dabei fand sich in den ERG-negativen Tumoren (Tabelle 3) ein statistisch hochsignifikanter Zusammenhang zwischen der MYBL2-Expression und dem pT-Stadium, dem traditionellen Gleason-Grad und dem quantitativen Gleason-Grad ( $p$  jeweils  $<0,0001$ ), wobei sich aber kein statistischer Zusammenhang zum Lymphknotenstatus, dem präoperativen PSA und dem R-Status nachweisen ließ. Auch in dieser Untergruppe waren die statistischen Unterschiede hochsignifikant, die absoluten numerischen Unterschiede jedoch verhältnismäßig gering. Die Untersuchung der Prognoserelevanz ergab allerdings einen eindeutigen Befund (Abbildung 9,  $p=0,0047$ ). Bei dieser Untersuchung fällt auf, dass die stark positiven Tumoren eine ungünstige Prognose zeigen und die negativen eine günstige. Die schwach und mäßig stark positiven Tumoren zeigen annähernd identische klinische Verläufe.

Tabelle 3: MYBL2-Immunfärbung und Tumorphänotyp (ERG-negative Tumoren)

Parameter	n auswertbar	Negativ (%)	Schwach positiv (%)	Moderat positiv (%)	Stark positiv (%)	p-Wert
<b>Alle Tumoren</b>	5123	10,8	71,7	15,2	2,4	
<b>Tumorstadium</b>						<0,0001
pT2	3441	11,5	71,5	14,7	2,3	
pT3a	1035	11,6	72,9	13,8	1,7	
pT3b-pT4	633	5,2	71,4	19,4	3,9	
<b>Gleason-Grad</b>						<0,0001
≤3+3	1040	16,9	62,5	16,4	4,1	
3+4	2708	10,8	72,9	14,6	1,7	
3+4 Tert.5	219	5,9	84,0	9,6	0,5	
4+3	554	7,0	71,7	17,3	4,0	
4+3 Tert.5	305	3,0	80,3	15,4	1,3	
≥4+4	294	7,5	75,5	15,0	2,0	
<b>Quantitativer Gleason-Grad</b>						<0,0001
≤3+3	1040	16,9	62,5	16,4	4,1	
3+4 ≤5%	718	12,4	69,4	16,7	1,5	
3+4 6-10%	710	10,8	74,2	13,7	1,3	
3+4 11-20%	609	10,3	75,5	12,8	1,3	
3+4 21-30%	296	9,1	74,7	14,2	2,0	
3+4 31-49%	272	9,6	77,6	11,8	1,1	
3+4 Tert.5	219	5,9	84,0	9,6	0,5	
4+3 50-60%	231	6,9	73,2	14,7	5,2	
4+3 Tert.5	305	3,0	80,3	15,4	1,3	
4+3 61-100%	270	6,3	73,7	17,8	2,2	
≥4+4	263	7,2	77,9	12,9	1,9	
<b>Lymphknotenmetastasen</b>						0,1445
N0	2993	9,5	73,2	14,9	2,4	
N+	281	6,4	72,6	18,9	2,1	
<b>Präoperativer PSA-Level (ng/ml)</b>						0,3266
<4	544	9,6	70,6	16,0	3,9	
4-10	3029	10,9	71,6	15,3	2,3	
10-20	1128	11,1	71,5	15,2	2,2	
>20	396	10,4	75,8	12,4	1,5	
<b>Chirurgischer Resektionsrand</b>						0,2037
negativ	4091	10,4	71,8	15,5	2,4	
positiv	1019	12,4	71,5	13,7	2,4	

Abbildung 9: MYBL2-Expression und biochemisches Rezidiv (ERG-negative Tumoren)



Die Beziehung zwischen der MYBL2-Expression und dem Tumorphänotyp ist für die ERG-positiven Tumoren in Tabelle 4 dargestellt. Auch hier findet sich ein hochsignifikanter Zusammenhang zwischen der MYBL2-Expression und dem traditionellen und quantitativen Gleason-Grad ( $p$  jeweils  $<0,00001$ ) und auch die Beziehung zur Lymphknotenmetastasierung ist statistisch signifikant ( $p=0,0006$ ). Keine signifikante Beziehung findet sich aber zwischen der MYBL2-Expression und dem pT-Stadium ( $p=0,0787$ ), dem präoperativen Serum-PSA ( $p=0,0875$ ) und dem R-Status ( $p=0,2569$ ). Wie in den anderen evaluierten Gruppen waren die absoluten Zahlen trotz hochsignifikanter statistischer Unterschiede nur wenig divergent.

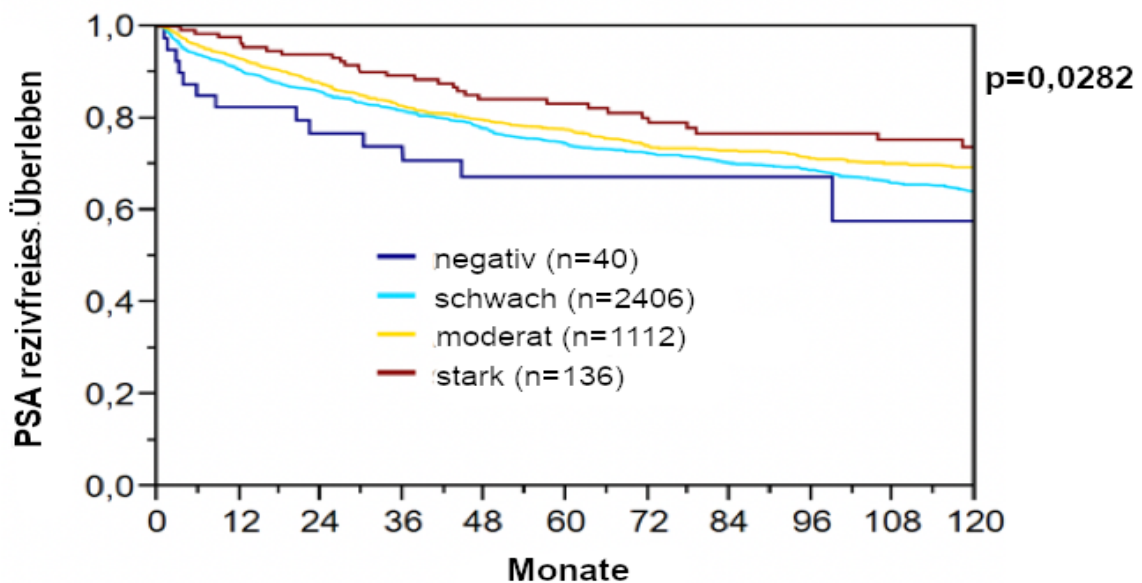
Tabelle 4: MYBL2-Immunfärbung und Tumorphänotyp (ERG-positive Tumoren)

Parameter	n auswertbar	Negativ (%)	Schwach positiv (%)	Moderat positiv (%)	Stark positiv (%)	p-Wert
<b>Alle Tumoren</b>	4084	1,1	64,2	31,0	3,6	
<b>Tumorstadium</b>						0,0787
pT2	2459	1,0	63,4	32,5	3,1	
pT3a	1073	1,1	65,1	29,4	4,4	
pT3b-pT4	535	1,7	67,1	27,3	3,9	
<b>Gleason-Grad</b>						<0,0001
≤3+3	857	0,9	56,4	37,1	5,6	
3+4	2345	1,1	64,7	30,7	3,5	
3+4 Tert.5	123	0,8	72,4	26,0	0,8	
4+3	394	1,0	64,7	32,5	1,8	
4+3 Tert.5	218	1,4	78,4	18,3	1,8	
≥4+4	144	3,5	72,9	21,5	2,1	
<b>Quantitativer Gleason-Grad</b>						<0,0001
≤3+3	857	0,9	56,4	37,1	5,6	
3+4 ≤5%	596	1,0	64,8	31,9	2,3	
3+4 6-10%	624	1,1	64,9	30,8	3,2	
3+4 11-20%	500	1,4	68,0	28,0	2,6	
3+4 21-30%	293	1,4	66,2	29,0	3,4	
3+4 31-49%	201	0,0	68,2	28,9	3,0	
3+4 Tert.5	123	0,8	72,4	26,0	0,8	
4+3 50-60%	174	1,1	65,5	32,8	0,6	
4+3 Tert.5	218	1,4	78,4	18,3	1,8	
4+3 61-100%	175	0,6	69,1	28,0	2,3	
≥4+4	120	4,2	76,7	18,3	0,8	
<b>Lymphknotenmetastasen</b>						0,0006
N0	2342	1,1	64,9	30,7	3,3	
N+	243	3,3	73,7	21,0	2,1	
<b>Präoperativer PSA-Level (ng/ml)</b>						0,0875
<4	565	0,5	59,6	35,2	4,6	
4-10	2520	1,2	65,0	30,7	3,2	
10-20	719	1,7	65,6	28,9	3,8	
>20	250	0,8	66,0	31,2	2,0	
<b>Chirurgischer Resektionsrand</b>						0,2569
negativ	3208	1,1	63,7	31,5	3,7	
positiv	858	1,3	67,0	28,7	3,0	



Die Untersuchung der Beziehung zwischen MYBL2-Expression und der Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines PSA-Rezidivs ergab eine statistisch signifikante Beziehung (Abbildung 10,  $p=0,0282$ ). In diesem Kollektiv fand sich allerdings eine besonders ungünstige Prognose der MYBL2-negativen Tumoren, während die stark MYBL2-positiven Tumoren die günstigste Prognose aufwiesen. Wiederum zeigten die geringgradig positiven und die mäßiggradig positiven Tumoren keine relevanten klinischen Unterschiede.

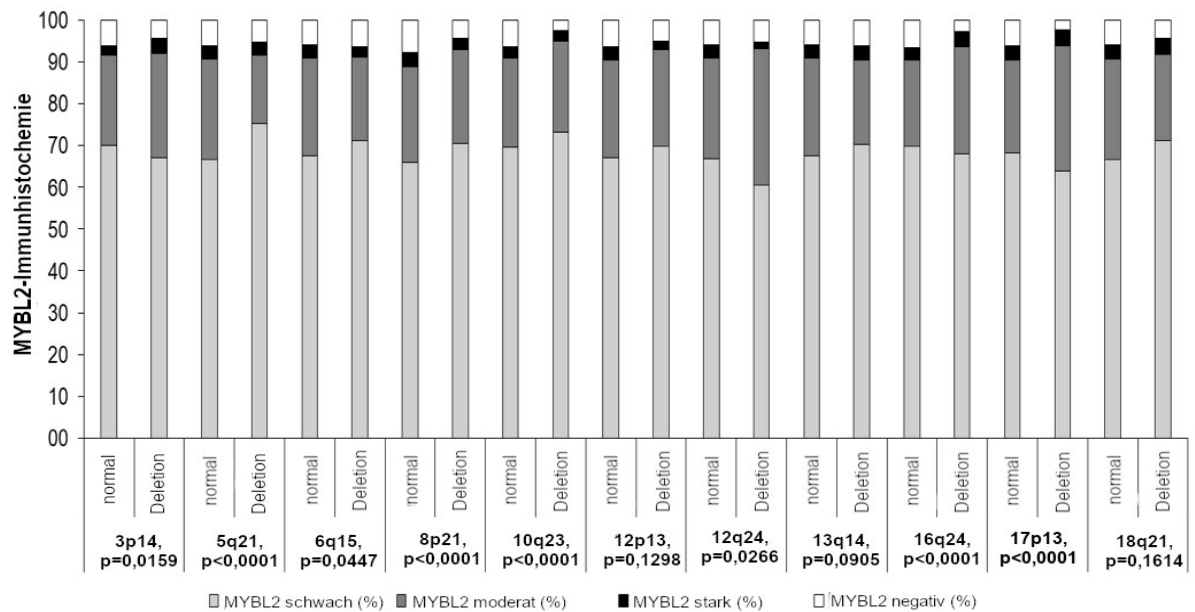
Abbildung 10: MYBL2-Expression und biochemisches Rezidiv (ERG-positive Tumoren)



### 3.3. MYBL2-Expression und Deletionen

Die Beziehung zwischen der MYBL2-Expression und Deletionen von 3p14, 5q21, 6q15, 8p21, 10q23(PTEN), 12p13, 12q24, 13q14, 16q24, 17p13 und 18q21 ist für das Gesamtkollektiv in Abbildung 11 dargestellt. Dabei zeigt sich für 8 von 11 untersuchten Parametern ein signifikanter Zusammenhang zwischen der MYBL2-Expression und dem Vorliegen von Deletionen. In den meisten Fällen zeigten deletierte Tumoren dabei eine stärkere MYBL2-Expression als nicht deletierte.

Abbildung 11: MYBL2-Expression und Deletionen (alle Tumoren)



Da die MYBL2-Expression ebenso wie die meisten Deletionen mit dem ERG-Status assoziiert ist, können derartige statistische Zusammenhänge indirekt durch die Beziehung zwischen ERG und dem Deletionsstatus ausgelöst werden. Zur Klärung einer solchen Interdependenz wurden separate Untersuchungen der Beziehung zwischen MYBL2-Expression und Deletionen in ERG-negativen und ERG-positiven Untergruppen durchgeführt. Die Untersuchung zeigt für die ERG-negativen Tumoren für immerhin 5 von 11 untersuchten Deletionen einen statistisch signifikanten Zusammenhang (Abbildung 12). In ERG-positiven Tumoren wurde hingegen nur noch für drei Deletionen (PTEN, 12q24, 13q14) ein signifikanter Zusammenhang zur MYBL2-Expression gefunden (Abbildung 13).

Abbildung 12: MYBL2-Expression und Deletionen (ERG-negative Tumoren)

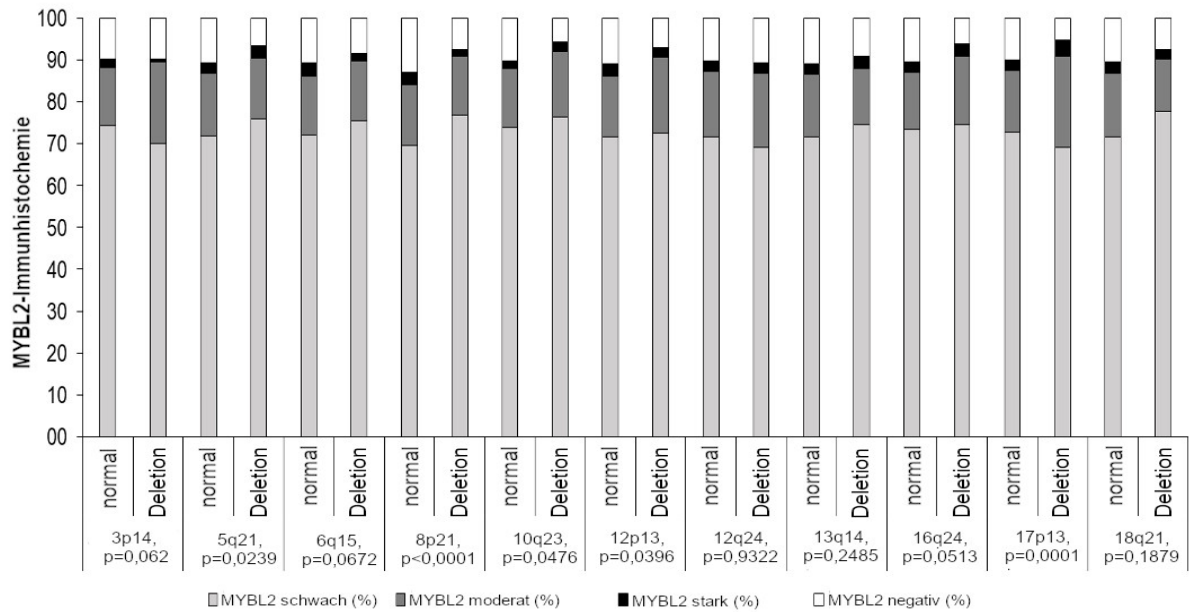
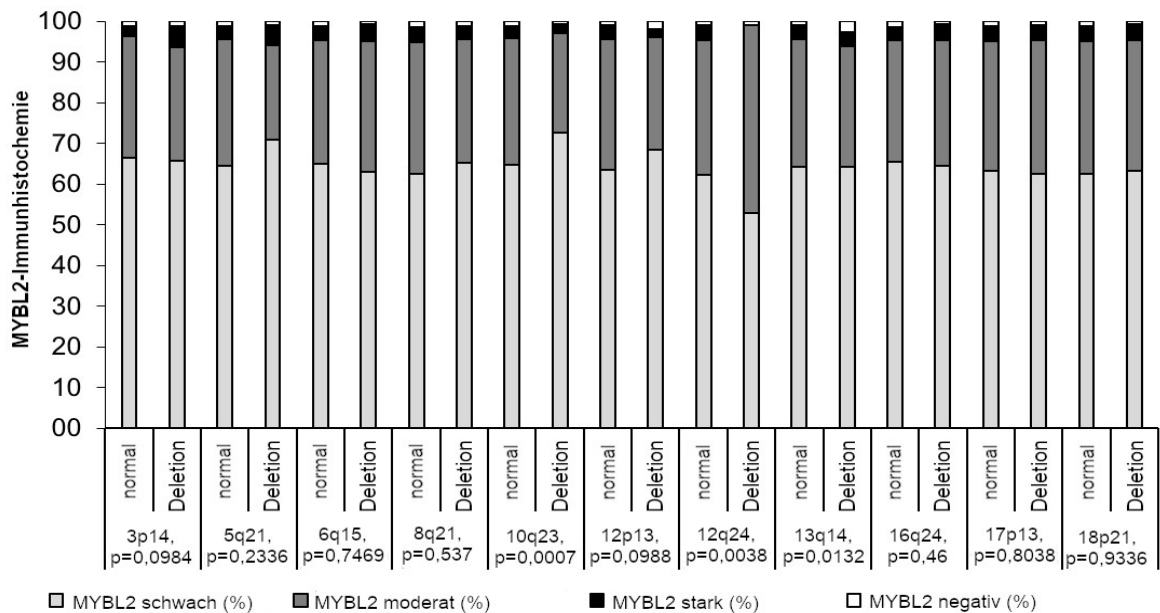


Abbildung 13: MYBL2-Expression und Deletionen (ERG-positive Tumoren)



### 3.4. MYBL2 und Tumorzellproliferation, p53-Status, BCL2-Expression

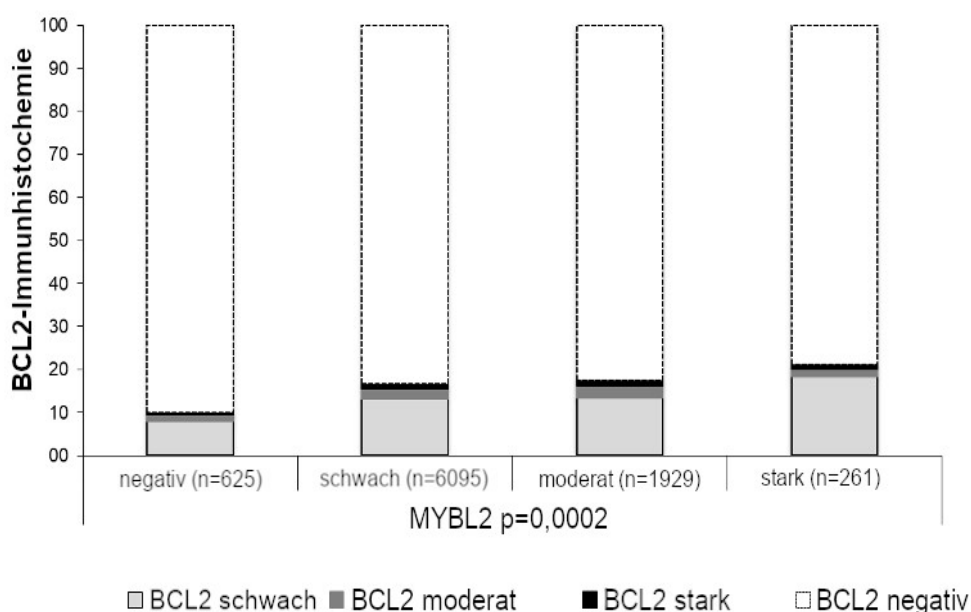
Die Beziehung zwischen der MYBL2-Expression und dem Ki67-Labeling-Index ist für das Gesamtumorkollektiv und morphologisch definierte Untergruppen in Abbildung 14 dargestellt. Dabei zeigt sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der MYBL2-Expression und dem Ki67-Labeling-Index, sowohl im Gesamtkollektiv als auch in den Gleason 3+3- und Gleason 3+4-Karzinomen. In allen diesen Gruppen fällt auf, dass der Ki67-Labeling-Index in den MYBL2-negativen Tumoren gering ist, dann zu Maximalwerten in mäßig und moderat positiven Tumoren ansteigt und dann aber in den stark positiven Tumoren wieder etwas geringer wird.

Abbildung 14: MYBL2-Expression und Ki67-Labeling-Index

ki67	MYBL2 IHC	n=	Ki67 Li (Mittelwert)		Standart- abweichung
Alle Tumoren p<0,0001	negativ	412	1,65	±	0,13
	schwach	4.279	2,83	±	0,04
	moderat	1.382	2,73	±	0,07
	stark	177	2,58	±	0,20
Gleason ≤3+3 p<0,0001	negativ	145	1,26	±	0,17
	schwach	814	2,17	±	0,07
	moderat	345	2,40	±	0,11
	stark	65	2,17	±	0,25
Gleason 3+4 p<0,0001	negativ	212	1,52	±	0,16
	schwach	2.397	2,69	±	0,05
	moderat	771	2,64	±	0,08
	stark	78	2,54	±	0,26
Gleason 3+4 Tert.5 p=0,7393	negativ	8	2,38	±	0,89
	schwach	191	3,26	±	0,18
	moderat	37	3,08	±	0,41
	stark	2	4,00	±	1,78
Gleason 4+3 p=0,2131	negativ	26	2,00	±	0,64
	schwach	429	3,36	±	0,16
	moderat	134	3,34	±	0,28
	stark	19	2,89	±	0,75
Gleason 4+3 Tert.5 p=0,5143	negativ	5	2,80	±	1,70
	schwach	246	3,98	±	0,24
	moderat	54	3,20	±	0,52
	stark	5	3,40	±	1,70
Gleason ≥4+4 p=0,6925	negativ	16	5,50	±	1,09
	schwach	201	4,31	±	0,31
	moderat	40	4,13	±	0,69
	stark	7	5,14	±	1,65

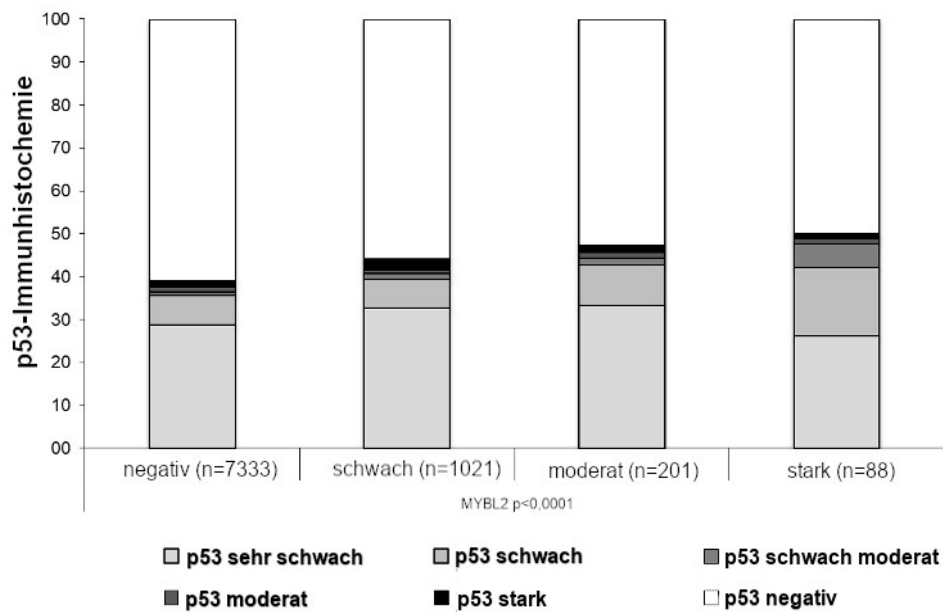
Die Beziehung zwischen der MYBL2-Expression und dem BCL2-Status ist in Abbildung 15 dargestellt. Es zeigt sich ein geringer Anstieg der BCL2-Expression von MYBL2-negativen zu schwach positiven Tumoren, wobei kein markanter weiterer Anstieg von schwach zu stark MYBL2-positiven Tumoren erkennbar ist. Die Beziehung der Expression dieser beiden Proteine ist statistisch signifikant ( $p=0,0002$ ).

Abbildung 15: MYBL2-Expression und BCL2-Status



Auch für den immunhistochemischen p53-Nachweis ergab sich ein signifikanter Anstieg der Färbintensität mit zunehmender MYBL2-Expression, wobei im Falle von p53 eine kontinuierliche Zunahme der nachgewiesenen Anfärbung von MYBL2-negativen über schwach und mäßig stark positiven bis zu stark positiven Tumoren gefunden werden konnte (Abbildung 16,  $p<0,0001$ ).

Abbildung 16: MYBL2-Expression und immunhistochemischer p53-Nachweis



### 3.5. Multivariate Analyse

Zur Klärung der Frage, ob die MYBL2-Expression in unserem Patientenkollektiv eine zusätzliche, von den etablierten prognostischen Parametern unabhängige Prognosevo-  
 aussage ergeben würde, wurden umfangreiche multivariate Analysen durchgeführt.  
 Diese Analysen verwendeten mehrere Modelle, welche unterschiedliche diagnostisch  
 relevante Situationen simulieren sollten. Die Modelle 1 und 2 schlossen überwiegend  
 Prognoseparameter ein, welche postoperativ, also nach der Prostatektomie zur Verfü-  
 gung stehen. In Modell 1 wurde dabei der präoperative Serum-PSA-Wert, das pT-  
 Stadium, der Gleason-Grad an der Prostatektomie, pN und der R-Status verwendet. In  
 Modell 2 wurden die gleichen Parameter verwendet. Nur der pN-Status wurde nicht be-  
 rücksichtigt, da die Lymphadenektomie beim Prostatakarzinom vorwiegend bei prog-  
 nostisch ungünstigeren Tumoren vorgenommen wird, sodass eine Reduktion der Analy-  
 se auf Patienten mit untersuchten Lymphknoten einen statistisch „Bias“ in Richtung hö-  
 hergradiger Tumoren einführen könnte. Die Modelle 3 und 4 versuchten so weit wie  
 möglich die präoperative Situation zu imitieren. Hier stehen die postoperativ ermittelba-  
 ren Parameter wie pT, Gleason-Grad an der Prostatektomie, pN oder R-Staus naturge-  
 mäß nicht zur Verfügung. Stattdessen stehen für die Prognoseabschätzung präoperativ

das Serum-PSA, das klinische Stadium und der Gleason-Grad der Biopsie zur Verfügung. In Modell 4 wurde dementsprechend der präoperative Serum-PSA-Wert, das klinische Stadium und der Biopsie-Gleason-Grad mit der MYBL2-Expression zusammen untersucht. Da der Gleason-Grad an der Biopsie von zahlreichen verschiedenen Pathologen in hunderten verschiedener Pathologiepraxen erhoben worden war und dementsprechend wahrscheinlich qualitativ „weniger gut“ oder zumindest weniger standardisiert als an einem Prostatazentrum erhoben wurde, wurde einer möglichen Verfälschung der Daten durch eine ungewöhnlich schlechte Gleason-Gradierung dahingehend entgegengewirkt, dass eine weitere Berechnung (Modell 3) durchgeführt wurde, bei dem der präoperative Biopsie-Gleason-Grad durch den Prostatektomie-Gleason-Grad ersetzt wurde. Alle diese Analysen sind in Tabelle 5 zusammengefasst. Sie zeigten lediglich für Modell 3 (präoperativ, Gleason-Grad Biopsie) einen signifikanten Wert für MYBL2 ( $p=0,01$ ). Alle anderen Szenarien ergaben für MYBL2 keine unabhängige prognostische Voraussagekraft.

Tabelle 5: Multivariate Analyse in a) allen Tumoren, b) ERG-negativen und c) ERG-positiven Tumoren

Tumor Teilmenge	Szenario	n analysierbarer	p-Wert							
			präoperativer PSA-Level	pT Stadium	cT Stadium	Gleason-Grad Prostatektomie	Gleason-Grad Biopsie	pN Stadium	R Stadium	MYBL2-Expression
a) Alle Tumore	1	7683	<0.0001	<0.0001	-	<0.0001	-	<0.0001	<0.0001	0.64
	2	11834	<0.0001	<0.0001	-	<0.0001	-	-	<0.0001	0.65
	3	11644	<0.0001	-	<0.0001	<0.0001	-	-	-	0.49
	4	10039	<0.0001	-	<0.0001	-	<0.0001	-	-	0.16
b) ERG-negative Tumore	1	3024	0.0001	<0.0001	-	<0.0001	-	<0.0001	0.0417	0.06
	2	4712	<0.0001	<0.0001	-	<0.0001	-	-	0.0004	0.1
	3	4664	<0.0001	-	<0.0001	<0.0001	-	-	-	0.01
	4	4588	<0.0001	-	<0.0001	-	<0.0001	-	-	0.16
c) ERG-positive Tumore	1	2382	0.0157	<0.0001	-	<0.0001	-	0.0145	0.0004	0.51
	2	3740	<0.0001	<0.0001	-	<0.0001	-	-	<0.0001	0.65
	3	3676	<0.0001	-	<0.0001	<0.0001	-	-	-	0.89
	4	3616	<0.0001	-	<0.0001	-	<0.0001	-	-	0.17

Eine weitere Maßnahme, um eine unabhängige Bedeutung der MYBL2-Expression zu dokumentieren, ist die separate Untersuchung von homogenen Tumorkollektiven, wie beispielsweise von Tumoren mit identischem Gleason-Grad. Die Abbildungen 17 a-h) zeigen die prognostische Bedeutung der MYBL2-Expression in Tumoren mit identischem traditionellen und quantitativem Gleason-Grad. Die Abbildungen zeigen in keiner dieser Gruppen eine signifikante prognostische Bedeutung der MYBL2-Expression. Die gleiche Analyse ist für die Untergruppe der ERG-negativen Tumoren in Abbildung 18 a-h) dargestellt. Auch in dieser Untersuchung findet sich in keiner der untersuchten Gruppen eine statistisch signifikante Prognoserelevanz der MYBL2-Expression.



Abbildung 17 a) - h): Prognostische Bedeutung der MYBL2-Expression in allen Tumoren mit identischem Gleason-Grad

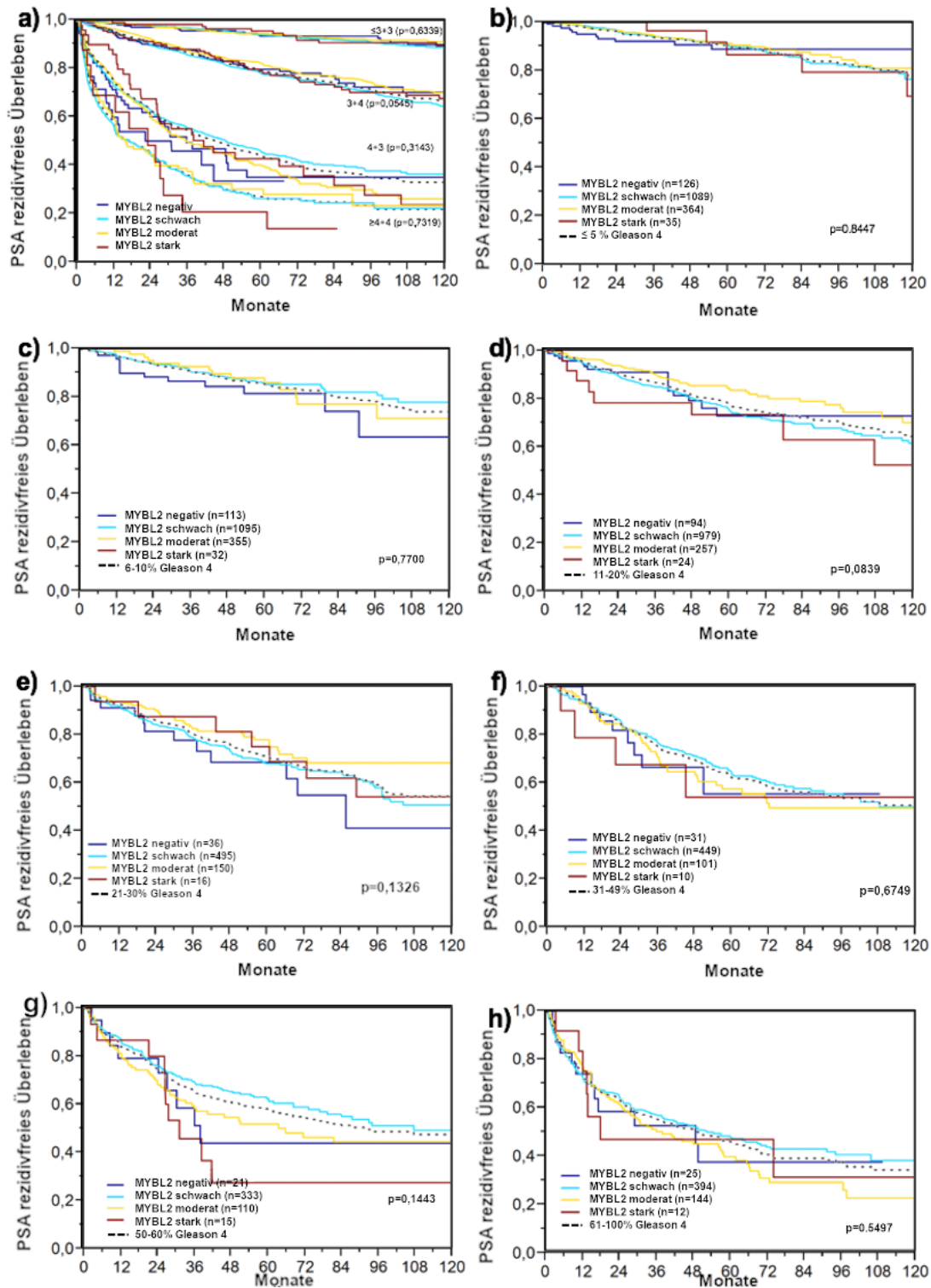
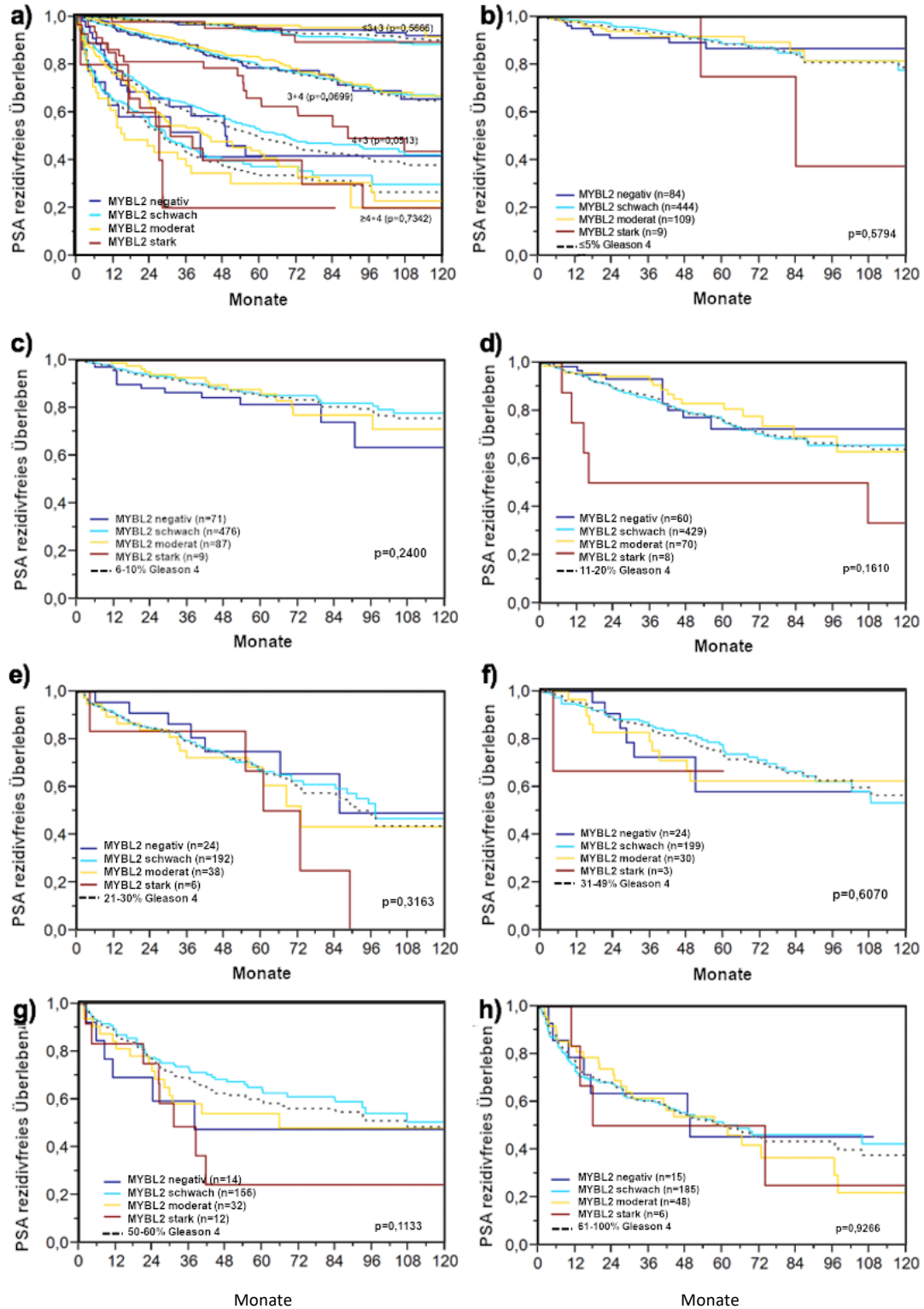
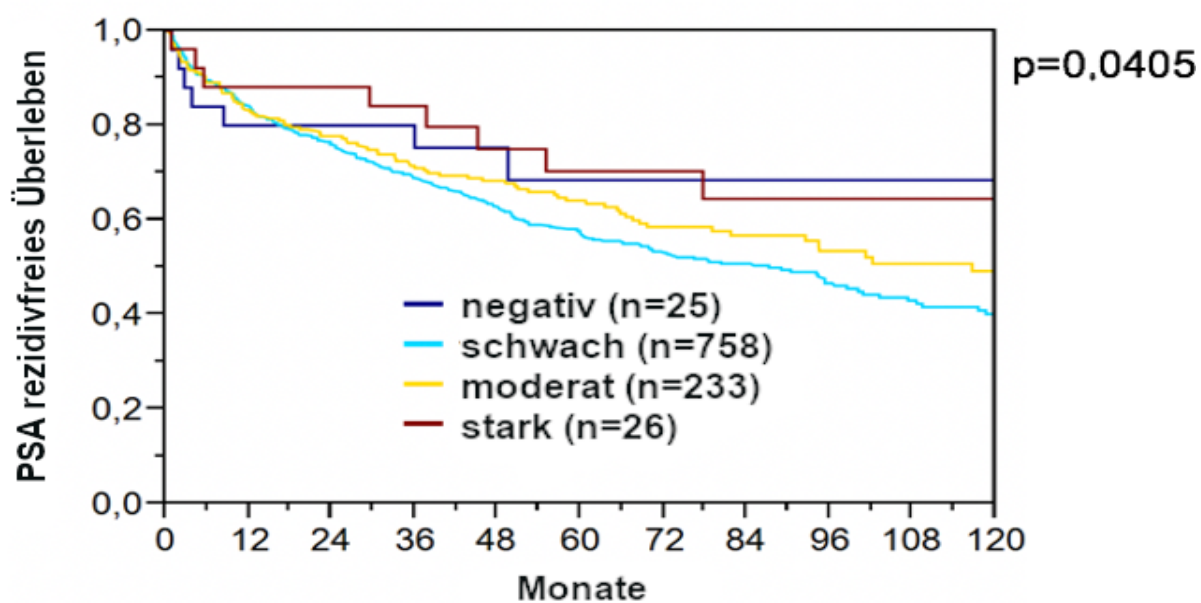


Abbildung 18 a) - h): Prognostische Bedeutung der MYBL2-Expression in ERG-negativen Tumoren mit identischem Gleason-Grad



Die am besten etablierte prognostische molekulare Veränderung beim Prostata-Karzinom ist die PTEN-Deletion. In dem erfolgreich auf MYBL2 untersuchten Patientenkollektiv wiesen insgesamt 1.116 Tumoren eine PTEN-Deletion auf. Die separate Untersuchung dieser Patientengruppe auf eine prognostische Bedeutung der MYBL2-Expression ergab ein statistisch signifikantes Ergebnis (Abbildung 19,  $p=0,0405$ ). Allerdings zeigt die Untersuchung eine besonders günstige Prognose von stark MYBL2-positiven und von MYBL2-negativen Tumoren, während die schwach und mäßig stark positiven Tumoren beide ungünstiger verlaufen.

Abbildung 19: MYBL2-Expression und biochemisches Rezidiv (Tumoren mit PTEN-Deletion)



## 4. Diskussion

Die erfolgreiche Untersuchung von fast 15.000 Prostatakarzinomen auf die Expression von MYBL2 ergab eine geringe bis mäßig starke MYBL2-Anfärbung in den meisten Karzinomen. Eine systematische Untersuchung von Normalgewebe war nicht Teil dieses Projektes, doch konnte bei zahlreichen Tumoren, bei denen neben Tumordrüsen auch normales Prostatagewebe vorhanden war, eine im Tumor etwas vermehrte Expression beobachtet werden. Aufgrund dieser Befunde wäre davon auszugehen, dass zumindest in einem Teil der Prostatakarzinome im Vergleich zu normalem Prostataepithel eine Überexpression besteht. Eine vergleichende Untersuchung der MYBL2-Expression in normalen und neoplastischem Prostataepithel wurde bisher auch von anderen Autoren nicht durchgeführt. Eine Überexpression im Prostatakarzinom im Vergleich zu Normalgewebe wäre aber konsistent mit den Befunden in anderen Tumorarten (Astbury K, 2011), (Jin Y, 2017). Vergleichende immunhistochemische Untersuchungen von normalem und neoplastischem Epithel wurden beim Magenkarzinom (Jia Y, 2019), beim Gallenblasenkarzinom (Liang HB, 2017) und beim Pankreas-Adenokarzinom (Yu R, 2017) durchgeführt, wobei in allen Fällen eine im Tumor vermehrte Expression von MYBL2 beschrieben wurde.

Eine indirekte Validierung unserer MYBL2 Quantifizierung ergibt sich aus dem Nachweis einer signifikanten Beziehung zur Expression von p53 und BCL2, welche aufgrund von einer früheren funktionellen Untersuchung zu erwarten war (Mellentin, 2001). Auch die signifikante Beziehung zur Tumorzellproliferation passt zu früheren Befunden, eine Hauptfunktion von MYBL2 liegt nämlich in der Zellzyklusregulation als wichtiges Element des DREAM-Multiprotein-Komplexes (Musa J, 2017). Die klarste Assoziation mit einem molekularen Parameter bestand allerdings zur Expression von ERG. ERG ist ein Transkriptionsfaktor, der normalerweise im Lymphozyten und Endothelzellen exprimiert wird, nicht aber im Prostataepithel (Adamo P, 2016). In circa 50% der Prostatakarzinome kommt es allerdings zu einer Fusion des ERG-Gens mit TMPRSS2, einem androgenreguliertem Gen ohne tumorrelevante Funktion (Tomlins SA, 2005), (Kumar-Sinha C, 2008), (Wang Z, 2017). Durch diese Fusion gerät der Transkriptionsfaktor ERG in die Abhängigkeit des TMPRSS2-Promoters und wird so-

mit androgenabhängig exprimiert. Die TMPRSS2-ERG-Fusion tritt insbesondere bei jüngeren Prostatakarzinompatienten auf, möglicherweise bedingt durch die bei jüngeren Männern noch etwas höheren Serumtestosteronwerte. Die TMPRSS2-ERG-Fusion tritt insbesondere bei einem stark aktivierten Androgenrezeptor auf. Die TMPRSS2-ERG-Fusion lässt sich sowohl durch den Nachweis des genomischen Rearrangements in einer Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung (FISH) Analyse nachweisen, als auch durch den immunhistochemischen Nachweis des aberrant exprimierten ERG-Proteins. Tumoren mit TMPRSS2-ERG-Fusion zeigten eine deutlich häufigere und stärkere Immunfärbung für MYBL2 als Fusions-negative Tumoren. Eine Abfrage verschiedener Promoter-Datenbanken im Rahmen der Gene Cards Suite (Stelzer G, 2016) ergab, dass MYBL2 durch eine besonders hohe Anzahl anderer Transkriptionsfaktoren (>100) reguliert wird. Darunter befinden sich auch Transkriptionsfaktoren der Zellzyklus-Regulation, die massiv in ERG-positiven Tumoren überexprimiert werden, wie SMAD5 (Brase, 2011) TRIM24 oder CTCF (Höflmayer D, 2020). Obwohl MYBL2 selbst nicht zu den ERG-regulierten Genen zählt, kann hier also eine indirekte Heraufregulierung durch ERG vermutet werden. Das experimentelle Ausschalten des MYBL2-analogen Genes D-MYB in *Drosophila* führt zu einer substanziellen genetischen Instabilität mit abnormen Mitosen, multiplen funktionellen Zentrosomen, ungleicher Chromosomensegregation und der Bildung von Mikronuklei (Fung SM, 2002). Aufgrund dieser Befunde wäre ein genereller Zusammenhang zwischen einer MYBL2-Dysfunktion und genomischer Instabilität denkbar. Die aus diesem Grund durchgeführte statistische Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der MYBL2-Expression und dem Vorliegen von elf verschiedenen chromosomalen Deletionen ergab allerdings keinen deutlichen Zusammenhang zwischen der MYBL2-Expression und der Form einer genomischen Instabilität, welche zu Deletionen führt. Zwar hatte die Untersuchung des Gesamtkollektivs in acht von elf Deletionen einen signifikanten Zusammenhang zwischen der MYBL2-Expression und dem Nachweis von Deletionen ergeben, doch dürfte dieser Zusammenhang in den meisten Fällen der Tatsache geschuldet sein, dass die meisten chromosomalen Deletionen mit dem ERG-Status assoziiert sind. Da auch der MYBL2-Expressionsstatus ERG-abhängig ist, ist ein Zusammenhang zwischen ERG-abhängigen Deletionen und dem MYBL2-Status zu erwarten. Die separate Analyse von ERG-positiven und ERG-negativen Tumoren hatte nur in vier bzw. drei von elf Deletionen

einen statistisch signifikanten Zusammenhang ergeben, wobei dieser Zusammenhang teilweise in absoluten Zahlen wenig bedeutsam war. PTEN (10q23) ist die einzige Deletion, die sowohl bei ERG-negativen ( $p=0,0476$ ), als auch ERG-positiven ( $p=0,0007$ ) Tumoren mit der MYBL2-Expression assoziiert war, sodass möglicherweise eine funktionelle Interaktion zwischen MYBL2 und dem PTEN/AK-Regelsystem besteht. Da sowohl MYBL2 als auch PTEN mit p53 interagieren, könnte hierin ein Erklärungsansatz gesehen werden (Musa J, 2017), (Inoue K, 2018).

Hauptintention der durchgeführten Studie war die Klärung der prognostischen Bedeutung von MYBL2. Tatsächlich identifizierte unsere Studie eine signifikante prognostische Bedeutung der MYBL2-Expression beim Prostatakarzinom, diese ist aber geringgradig und zudem komplex. Die erfolgreiche Untersuchung von mehr als 12.000 Tumoren ergab einen statistisch hoch signifikanten Zusammenhang ( $p<0,0001$ ) zwischen der MYBL2 Expression und der Patientenprognose. Die absoluten Unterschiede waren aber nur gering (Abbildung 7, Seite 27) und es fiel auf, dass die beste Prognose bei MYBL2-negativen Tumoren gefunden wurde und auch die Gruppe mit starker Positivität zu den eher günstigen Kategorien zählte, während die Tumoren mit schwacher MYBL2-Expression am ungünstigsten verliefen. Dieser ungewöhnliche Befund scheint durch die unterschiedliche prognostische Bedeutung der MYBL2-Expression in ERG-negativen und ERG-positiven Tumoren hervorgerufen zu werden. Die separate Untersuchung dieser Tumorgruppen ergab jeweils eindeutige Befunde. In ERG-negativen Tumoren zeigten die MYBL2-negativen Tumoren eine besonders günstige Prognose, die stark MYBL2-positiven Tumoren eine besonders ungünstige Prognose und die Tumoren mit schwach oder mäßig starker Expression von MYBL2 eine intermediäre Prognose. Genau umgekehrt waren die Befunde bei ERG-positiven Tumoren, bei denen die MYBL2-negativen Karzinome eine besonders ungünstige, stark positive eine besonders günstige und Tumoren mit schwacher und mäßiggradiger MYBL2-Expression eine intermediäre Prognose aufwiesen. Aufgrund der Tatsache, dass vor allem in ERG-positiven aber auch in ERG-negativen Tumoren die Gruppen der stark MYBL2-positiven bzw. MYBL2-negativen Tumoren verhältnismäßig klein waren, kann ein statistisches Artefakt bei ungenügender Kohortengröße nicht vollständig ausgeschlossen werden. Die reziproke prognostische Bedeutung der MYBL2-Expression in ERG-positiven und ERG-

negativen Tumoren passt aber prinzipiell gut zu Daten früherer Untersuchungen am Hamburger Prostatakarzinomkollektiv, wo für eine Vielzahl von molekularen Parametern eine prognostische Bedeutung entweder nur bei ERG-negativen (Juhnke M H. A., 2017), (Büscheck F, 2019) oder nur bei ERG-positiven (Burdelski C M. D., 2015) Tumoren gefunden worden war (Quaas A, 2015), (Tsourlakis MC, 2017). Eine ausschließliche Prognoserelevanz in ERG-positiven Tumoren war beispielsweise für die Proteine SOX9 (Burdelski C B. E., 2015) und mTOR (Müller J, 2013) gefunden worden. Eine alleinige Prognoserelevanz in ERG-negativen Tumoren war z.B. für die Proteine APE1 (Juhnke M H. A., 2017), GGH (Melling N, 2017) und p16 (Burdelski C D. T., 2016) beobachtet worden. Obwohl die Expression von ERG per se nicht prognoserelevant ist, führt sie jedoch zur Dysregulation von mindestens 1.600 Genen in von einer ERG-Fusion befallenen Zelle und damit zu einer deutlichen Veränderung des zellulären Mikroenvironments. Es ist gut denkbar, dass Gene, welche mit einem oder mehreren dieser ERG-abhängigen Parameter interagieren, in ERG-positiven und ERG-negativen Tumoren eine unterschiedliche Funktion aufweisen.

Eine Assoziation einer kräftigen MYBL2-Expression mit guter Prognose in ERG-positiven Tumoren aber mit einer schlechten Prognose in ERG-negativen Tumoren lässt sich am besten mit einer unterschiedlichen Rolle von MYBL2 in diesen „ERG-Konstellationen“ erklären. Die molekularen Mechanismen, welche zu dieser reziproken prognostischen Bedeutung der MYBL2-Expression führen, sind unklar. Da MYBL2 eine Rolle bei der androgenunabhängigen Proliferationskontrolle von Prostataepithelzellen spielt, könnte spekuliert werden, dass MYBL2 unter dem Einfluss der androgenabhängigen ERG-Aktivierung eine andere Rolle spielt als in einem normalen zellulären Mikroenvironment. MYBL2 gehört zu den bisher wenig erforschten Krebsgenen. Eine Medline-Suche zu „MYBL2“ und „Cancer“ ergab am 16. Mai 2019 200 Einträge. Obwohl unsere Daten diese unerwarteten prognostischen Daten nicht zu erklären vermögen weisen sie doch darauf hin, dass MYBL2 eine ungewöhnlich komplexe Rolle in der Tumorbilogie spielt. In einer früheren Untersuchung zur prognostischen Bedeutung von Aquaporin-5 war am Institut für Pathologie des UKE ein analoges Ergebnis gefunden worden. Während Aquaporin-5 im Gesamtkollektiv von ebenfalls mehr als 9.000 Tumoren nur eine marginale prognostische Bedeutung aufwies, war im ERG-negativen

eine kräftige Aquaporin-5-Expression und in ERG-positiven Tumoren ein negativer Ausfall der Aquaporin-5-Immunfärbung signifikant mit einer ungünstigen Prognose assoziiert (Pust A, 2016). Bei Aquaporin-5 handelt es sich um ein Protein mit mindestens zwei tumorrelevanten Funktionen. Aquaporin-5 ist ein hydrophobes transmembranöses Wasserkanalprotein, welches eine Rolle bei der Regulation der zellulären Wasserhämöostase ausübt und somit über die Formationen von hydraulischen motilen Protrusionen zur Zellmigration und Zellinvasion beiträgt (Matsuzaki T, 2012). Darüber hinaus aktiviert Aquaporin-5 den RAS/MAPK-Signalweg. Aus den UKE-Befunden hatten Pust et al. geschlossen, dass möglicherweise unterschiedliche tumorbegünstigende oder tumorhemmende Funktionen von Aquaporin-5 in ERG-negativen und ERG-positiven Tumoren eine prädominante Rolle spielen könnten (Pust A, 2016). In einer anderen Studie zur cyclinabhängigen Kinase 6 (CDK6) hatte Teherani (Dissertation 2019) die prognostische Bedeutung dieses Proteins in knapp 10.000 Prostatakarzinomen untersucht und dabei sowohl für stark CDK6-positive als auch für CDK6-negative Tumoren eine ungünstigere Prognose gefunden als in Tumoren mit mäßig starker oder schwacher CDK6-Expression. Aus dieser Untersuchung wurde gefolgert, dass sowohl eine verminderte als auch eine verstärkte Expression von CDK6 in Prostatakarzinomen einen tumorgünstigeren Effekt ausüben können. Die in dieser Studie vorliegenden Daten zu MYBL2, aber auch die früheren Ergebnisse wie beispielsweise zu CDK6 und AQP-5, illustrieren die einzigartigen Möglichkeiten, welche die molekulare Untersuchung des Hamburger Prostatakarzinomkollektivs erlauben. Eine Datenbankabfrage mit den Suchbegriffen „prostate, cancer, prognosis, immunohistochemistry“ ergab am 16. Mai 2019 2.582 Ergebnisse. Die meisten dieser Untersuchungen beschäftigen sich mit Patientenkollektiven von meistens um die 100, maximal 500 Tumoren. Dementsprechend erstaunt es nicht, dass statistische Auswertungen zur Prognose in der Regel nur an dem den Autoren zur Verfügung stehenden Gesamtkollektiv durchgeführt werden. Die zahlreichen früheren Untersuchungen aus dem UKE zeigen allerdings, dass sich beim Prostatakarzinom ERG-positive und ERG-negative Tumoren bezüglich der Bedeutung prognostischer molekularer Marker häufig unterscheiden. Die Situation am UKE ist bezüglich der Prostatakarzinomforschung tatsächlich einzigartig. Die Gründung der Martiniklinik im Jahr 2005 führte zur Etablierung der ersten universitären Spezialklinik für Prostatakarzinombehandlung weltweit. Es ist eine Besonderheit der Martiniklinik, dass



auch die Langzeitergebnisse der Operationen genauestens untersucht werden. Dazu gehört nicht nur der Frühverlauf in der stationären Phase des Klinikaufenthaltes. Sämtliche Patienten werden jährlich zu dem weiteren Verlauf ihrer Erkrankung befragt. Aus dieser Qualitätsmanagementmaßnahme ist mittlerweile die weltweit wohl größte Datenbank zum klinischen Verlauf prostatektomierter Karzinompatienten entstanden. Die rigorose Erhebung der Qualitätsdaten hat nicht nur zu einer konstanten Verbesserung der operativen Qualität geführt, sondern auch zu der Möglichkeit einer Erforschung prognostisch relevanter Biomarker. Hierzu ist das Tissue Microarray-Verfahren optimal geeignet (Jawhar, 2009), (Dancau AM, 2010). Die gleichzeitige Untersuchung von 600 Tumoren auf einem einzigen Objektträger verringert die Reagenzienkosten und die Kosten für die Manpower für die immunhistochemischen Färbungen um den Faktor 600. Damit werden Untersuchungen an Tausenden von Tumoren auch mit teuren Reagenzien ohne weiteres machbar. Die vorliegende Untersuchung erforderte die Färbung von 39 Gewebeschnitten. Hierzu musste eine MTA einen Tag lang arbeiten und es wurden für weniger als 500 € Antikörper verbraucht. Ein weiterer Vorteil der TMA-Technik ist das hohe Ausmaß der Standardisierung. Alle Schnitte unserer Patienten wurden an einem Tag in einem Satz von Reagenzien bei absolut identischen Bedingungen inkubiert. Das TMA-Verfahren erlaubt nicht nur eine Standardisierung von Parametern, welche auch in Färbeautomaten automatisiert werden können wie beispielsweise Inkubationszeiten und Temperaturen, sondern auch die Standardisierungen von weiteren relevanten Faktoren wie beispielsweise der Schnittlagerungsdauer. Studien verschiedener Autoren hatten gezeigt, dass die Färbeintensität immunhistochemischer Untersuchungen nachlässt, wenn Schnitte nach ihrer Anfertigung für mehr als eine Woche gelagert werden (Jacobs TW, 1996), (Simon R, 2004). Es ist eine wesentliche Stärke unserer Studie, dass alle Schnitte dieses Projektes an einem Tag hergestellt wurden und an einem anderen Tag innerhalb der gleichen Woche auch immunhistochemisch gefärbt wurden. Auch die vergleichende Analyse der Färbeintensität ist am Tissue Microarray erleichtert, da ein Pathologe die Quantifizierung der Intensität von 15.000 Tumoren in weniger als einer Woche vollziehen kann. Das gleichzeitige Vorliegen von Tumoren mit unterschiedlichster Färbeintensität auf einem Schnittpräparat erlaubt es dem Pathologen seine Bewertung konstanter zu halten, als wenn er Großschnitte von Patienten be-

urteilen muss, bei denen die Anfärbung regional unterschiedlich sein kann (G. Sauter, persönliche Mitteilung, 2019).

Die Kombination einer großen Zahl von untersuchten Tumoren und einer hoch standardisierten Analyse erlaubte es in unserem Fall eine prognostische Bedeutung von MYBL2 zu identifizieren, obwohl die Färbeunterschiede zwischen den Tumoren insgesamt eher gering waren. Die meisten Tumoren zeigten eine geringe bis mäßige Anfärbung, nur wenige eine fehlende oder sehr starke Anfärbung. Die große Zahl von Tumoren erlaubte es aber diesen „Ausreißern“ eine prognostische Bedeutung zuzuordnen.

Das wesentlichste Ergebnis dieser Studie ist die Identifikation einer offenbar komplexen tumorbiologischen Rolle von MYBL2. Zumindest beim Prostatakarzinom deutet die reziproke prognostische Bedeutung auf eine variable Rolle von MYBL2 hin. Auch in anderen Tumoren wurde eine klinische Relevanz der MYBL2-Expression postuliert (Jia Y, 2019), (Liang HB, 2017). Da die in diesen Studien untersuchten Tumorkollektive mit 20 bis 403 Proben verhältnismäßig klein waren ist nicht auszuschließen, dass die MYBL2- Rolle auch in diesen Tumoren komplexer sein könnte als bisher angenommen. Die komplexe prognostische Situation dürfte MYBL2 zu einem interessanten Kandidaten für weitere funktionellen Untersuchungen seiner Rolle in der Tumorbiologie machen. Aus klinischer Sicht spielt die Untersuchung von MYBL2 allerdings eine untergeordnete Rolle. Die Bestimmung von MYBL2 zur Prognosevorhersage scheint angesichts der geringen prognostischen Bedeutung wenig sinnvoll. Dies wird auch durch die Ergebnisse der multivariaten Analysen unterstrichen, welche der MYBL2-Expression keine unabhängige prognostische Bedeutung zuschreiben.

## 5. Zusammenfassung

Das Avian Myeloblastosis Viral Oncogene Homolog-Like 2 -Protein (MYBL2) ist ein auf 20q13.12 lokalisierter Transkriptionsfaktor, welcher offenbar bei verschiedenen Tumorarten überexprimiert wird und prognostisch relevant ist. Da Untersuchungen zur Prognoserelevanz von MYBL2 beim Prostatakarzinom bisher fehlen wurden in der vorliegenden Untersuchung ein Tissue Microarray bestehend aus 17.747 Tumoren mit klinischen Verlaufsdaten immunhistochemisch auf die MYBL2-Expression untersucht. Die MYBL2-Immunfärbung war in 14.489 von 17.747 (81,64%) auswertbar. Die MYBL2-Immunhistochemie wurde in 2,7% als stark positiv, in 20,7% als mäßig stark positiv, in 70% als geringgradig positiv und in 6,6% als negativ klassifiziert. Die MYBL2-Expression war stark mit einem positiven ERG-Status assoziiert. Eine mäßig starke oder starke Expression kam bei ERG-positiven Tumoren fast doppelt so häufig vor (34,6%), wie bei ERG-negativen Tumoren (17,6%,  $p=0,0001$ ). Bei Betrachtung aller Tumoren war die MYBL2-Expression signifikant mit der Patientenprognose assoziiert ( $p<0,0001$ ), allerdings war die Prognose am günstigsten bei MYBL2-negativen Tumoren und am ungünstigsten bei schwach positiven Tumoren mit einer intermediären Rolle von Tumoren mit mäßig starker und starker Positivität. Die separate Untersuchung der prognostischen Bedeutung der MYBL2-Expression in ERG-positiven und ERG-negativen Tumoren ergab, dass diese Befunde durch Unterschiedlichkeiten in diesen beiden Subgruppen bedingt waren. In ERG-negativen Tumoren war die Prognose bei MYBL2-negativen Tumoren besonders günstig und bei stark MYBL2-positiven Tumoren besonders ungünstig mit einer intermediären Prognose bei schwachen und moderat positiven Tumoren ( $p=0,0047$ ). Die Befunde waren umgekehrt bei ERG-positiven Tumoren. Hier war die Prognose von stark MYBL2-positiven Tumoren besonders günstig, von MYBL2-negativen besonders ungünstig und intermediär bei schwach und mäßig stark positiven Tumoren ( $p=0,0282$ ). Signifikante Assoziationen fanden sich auch zwischen der MYBL2-Expression und dem traditionellen Gleason Grad, dem quantitativen Gleason Grad, der Lymphknotenmetastasierung und der Expression von p53 (jeweils  $p<0,02$ ). In der multivariaten Analyse war MYBL2 weder im Gesamtkollektiv noch in den Untergruppen der ERG-negativen und ERG-positiven Tumoren unabhängig prognoserelevant. Dies galt sowohl bei Betrachtung postoperativ verfügbarer Parameter

als auch bei Betrachtung von präoperativ verfügbaren Parametern. Aus den Befunden wird geschlossen, dass der Nachweis der MYBL2-Expression sich nicht als Prognosemarker eignet. Die Identifikation einer reziproken prognostischen Bedeutung der MYBL2-Expression bei ERG-positiven und ERG-negativen Tumoren weist auf eine komplexe tumorbiologische Bedeutung von MYBL2 hin, die auf der funktionellen Ebene weiter aufgeklärt werden muss. Die Studie ist auch ein Beispiel für die Effektivität der TMA-Methode, um an sehr großen Tumorkollektiven auch subtile klinische Effekte von molekularen Parametern zu identifizieren.

## 6. Abstract

### Background:

MYBL2, a member of the MYB transcription factor family, is a physiological regulator of the cell cycle progression, but can have oncogen potential, when deregulated. Although in numerous cancer entities an overexpression of MYBL2 is associated with poor patients outcome, its role in prostate cancer is still uncertain.

### Methods:

In this study, MYBL2 expression was analysed by immunohistochemistry on a tissue micorarray with 17747 prostate cancers.

### Results:

In total 14489 of 17747 prostate cancers were interpretable.

Nuclear and cytoplasmic staining was identified in 93.4%; 70% was considered a weak, 20.7% a moderate and 2.7% a strong positivity.

Positive MYBL2 expression was statistically associated with p-T stage, the traditional and quantitative Gleason grade, the preoperative PSA (p each  $>0.0001$ ) and lymph node metastasis (p=0.0003), however in total numbers the differences were less noticeable.

The prognosis differences between tumours with different MYBL2 expression were also statistically highly significant (p $<0,0001$ ), but small in absolute numbers.

Immunohistochemistry and FISH analysis revealed, that MYBL2 overexpression was more common in ERG positive than in ERG-negative (p each  $<0.0001$ ). Strong MYBL2 positivity predicted poor prognosis in ERG negative and good prognosis in ERG negative cancers. Due to the fact that the groups of strong MYBL2 positive and MYBL2 negative tumours were relatively small, especially in ERG-positive but also in ERG-negative tumours, a statistical artefact cannot be completely ruled out if the cohort size is insufficient.

### Conclusion:

In summary, the results of our study show that the prognostic significance of MYBL2 is too slight and too complex, so MYBL2 cannot be used as an independent prognostic marker in prostate cancer.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Adamo P, L. M. (2016). The oncogene ERG: a key factor in prostate cancer. *Oncogene*, S. 403-414.
2. Alberti, C. (2008). Genetic and microenvironmental implications in prostate cancer progression and metastasis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, S. 167-175.
3. Anat Bar-Shira, J. H.-U. (2002). Multiple Genes in Human 20q13 Chromosomal Region Are Involved in an Advanced Prostate Cancer Xenograft. *Cancer Research*, 62(23), 6803-7.
4. Astbury K, M. L. (2011). MYBL2 (B-MYB) in cervical cancer: putative biomarker. *Int J Gynecol Cancer*, S. 206-212.
5. Böcker W, D. H. (2006). Pathologie. München: Elsevier, Urban und Fischer.
6. Büscheck F, Z. M. (Juli 2019). *The independent prognostic impact of the GATA2 pioneering factor is restricted to ERG-negative prostate cancer*. Von PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31296150/> abgerufen
7. Bailar JC, M. G. (1966). Survival rates of patients with prostatic cancer, tumor stage, and differentiation-preliminary report. *Cancer Chemother Rep*(50), 129-36.
8. Barakzai MA, M. M. (2011). Histopathological lesions in transrectal ultrasound guided biopsies of prostate in patients with raised serum prostate specific antigen: A preliminary report. *Nephro-Urol*(3), 186-90.
9. Brase, J. J. (2011). TMPRSS2-ERG -specific transcriptional modulation is associated with prostate cancer biomarkers and TGF- $\beta$  signaling. *BMC Cancer*, 507.
10. Bubendorf L., A. N. (2001). Tissue Microarray (TMA) Technology: Miniaturized Pathology Archives for High-Throughput in Situ Studies. *J Pathol*, 195(1), 72-9.
11. Burdelski C, B. E. (2015). Loss of SOX9 Expression Is Associated with PSA Recurrence in ERG-Positive and PTEN Deleted Prostate Cancers. *PLoS One*, S. e0128525.
12. Burdelski C, D. T. (2016). p16 upregulation is linked to poor prognosis in ERG negative prostate cancer. *Tumour Biol*, S. 12655-12663.

13. Burdelski C, M. D. (2015). The prognostic value of SUMO1/Sentrin specific peptidase 1 (SEN1) in prostate cancer is limited to ERG-fusion positive tumors lacking PTEN deletion. *BMC Cancer*, 538.
14. Burkhard FC, S. M. (2005). The role of lymphadenectomy in prostate cancer. *Nat Clin Pract Urol*, S. 336-342.
15. Charrasse S, C. I. (2000). Degradation of B-Myb by ubiquitin-mediated proteolysis: involvement of the Cdc34-SCF(p45Skp2) pathway. *Oncogene*, S. 2986-2995.
16. Chen J, C. X. (2018). MYBL2 Is Targeted by miR-143-3p and Regulates Breast Cancer Cell Proliferation and Apoptosis. *Oncol Res*, S. 913-922.
17. Conti A, S. M. (2017). Update on histopathological evaluation of lymphadenectomy specimens from prostate cancer patients. *World J Urol.* , S. 517-526.
18. Dancau AM, S. R. (2010). Tissue microarrays. *Methods Mol Biol*, 49-60.
19. Davidson CJ, T. R. (2005). Functional evolution of the vertebrate Myb gene family: B-Myb, but neither A-Myb nor c-Myb, complements Drosophila Myb in hemocytes. *Genetics*, S. 215-229.
20. Delahunt B, M. R. (2012). Gleason grading: past, present and future. *Histopathology*(60), 75-86.
21. Deng S, C. G. (2008). Mechanisms of microRNA deregulation in human cancer. *Cell Cycle*, S. 2643-2646.
22. Egevad L, A. A. (2013). Standardization of Gleason grading among 337 European pathologists. *Histopathology*, S. 247-256.
23. Ehteshami Bejnordi B, V. M. (2017). Diagnostic Assessment of Deep Learning Algorithms for Detection of Lymph Node Metastases in Women With Breast Cancer. *JAMA*, S. 2199-2210.
24. Filella X, F.-G. E. (2018). Emerging biomarkers in the diagnosis of prostate cancer. *Pharmgenomics Pers Med.*, S. 83-94.
25. Fischer M, Q. M. (2015). Indirect p53-dependent transcriptional repression of Survivin, CDC25C, and PLK1 genes requires the cyclin-dependent kinase inhibitor p21/CDKN1A and CDE/CHR promoter sites binding the DREAM complex. *Oncotarget*, S. 41402-41417.
26. Fischer M, Q. M. (2016). The p53-p21-DREAM-CDE/CHR pathway regulates G2/M cell cycle genes. *Nucleic Acids Res*, S. 164-174.

27. Fu Z, M. L. (2008). Plk1-dependent phosphorylation of FoxM1 regulates a transcriptional programme required for mitotic progression. *Nat Cell Biol*, S. 1076-1082.
28. Fung SM, R. G. (2002). Mutations in *Drosophila myb* lead to centrosome amplification and genomic instability. *Development*, S. 347-359.
29. Fuster O, L. M. (2013). Adverse prognostic value of MYBL2 overexpression and association with microRNA-30 family in acute myeloid leukemia patients. *Leuk Res*, S. 1690-1696.
30. Geng GJ, Y. Y. (2018). MicroRNA-30a suppresses non-small-cell lung cancer by targeting Myb-related protein B. *Exp Ther Med*, S. 1633-1639.
31. Grassilli E, S. P. (1999). Resistance to apoptosis in CTLL-2 cells overexpressing B-Myb is associated with B-Myb-dependent bcl-2 induction. *Cancer Res*, S. 2451-2456.
32. Guiley KZ, I. A. (2018). Structural mechanism of Myb-MuvB assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A*, S. 10016-10021.
33. Höflmayer D, S. A.-M. (2020). Expression of CCCTC-binding factor (CTCF) is linked to poor prognosis in prostate cancer. *Mol Oncol*, S. 129-138.
34. Häring J, S. M. (2012). Estrogen receptor  $\beta$  transcript variants associate with oncogene expression in endometrial cancer. *Int J Mol Med*, S. 1127-1136.
35. Hara M, K. Y. (1971). Some Physico-Chemical Characteristics of gamma-Seminoprotein, an Antigenic Component Specific for Human Seminal Plasma. Forensic Immunological Study of Body Fluids and Secretion. VII. *Nihon Hoigaku Zasshi*, S. 322-324.
36. Heidenreich A, B. P. (2014). EAU guidelines on prostate cancer. part 1: screening, diagnosis, and local treatment with curative intent-update 2013. *Eur Urol.*, S. 124-37.
37. Inoue K, F. E. (2018). Tumor suppression by the EGR1, DMP1, ARF, p53, and PTEN Network . *Cancer Invest*, S. 1-17.
38. Jacobs TW, P. J. (1996). Loss of Tumor Marker-Immunostaining Intensity on Stored Paraffin Slides of Breast Cancer. *J Natl Cancer Inst*, 1054-1059.
39. Jawhar, N. M. (2009). Tissue Microarray: A rapidly evolving diagnostic and research tool. *Ann Saudi Med*, 123-127.
40. Jia Y, G. Y. (2019). Prognostic implications of MYBL2 in resected Chinese gastric adenocarcinoma patients. *Oncotargets Ther*, S. 1129-1135.



41. Jin Y, Z. H. (2017). B-Myb Is Up-Regulated and Promotes Cell Growth and Motility in Non-Small Cell Lung Cancer. *Int J Mol Sci*, S. 860.
42. Juhnke M, H. A. (2017). Apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 (APE1/Ref-1) overexpression is an independent prognostic marker in prostate cancer without TMPRSS2:ERG fusion. *Mol Carcinog*, S. 2135-2145.
43. Juhnke M, H. A. (2017). Apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 (APE1/Ref-1) overexpression is an independent prognostic marker in prostate cancer without TMPRSS2:ERG fusion. *Mol Carcinog*, 2135-2145.
44. Katzen AL, J. J. (1998). Drosophila myb is required for the G2/M transition and maintenance of diploidy. *Genes Dev*, S. 831-843.
45. Kumar-Sinha C, T. S. (2008). Recurrent gene fusions in prostate cancer. *Nat Rev Cancer*, S. 497-511.
46. Lassmann S, W. R. (2007). Array CGH identifies distinct DNA copy number profiles of oncogenes and tumor suppressor genes in chromosomal- and microsatellite-unstable sporadic colorectal carcinomas. *J Mol Med (Berl)*, S. 293-304.
47. Leitlinienprogramm Onkologie der deutschen Krebsgesellschaft. (2019). *Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms, Version 5.1, 2019, AWMF Registernummer: 043/022OL*,. Abgerufen 16.10.2020, 16:46 Uhr von awmf.org: [https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user\\_upload/Downloads/Leitlinien/Prostata\\_5\\_0/LL\\_Prostatak\\_Prostat\\_Langversion\\_5.1.pdf](https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Prostata_5_0/LL_Prostatak_Prostat_Langversion_5.1.pdf) .
48. Liang HB, C. Y. (2017). MYBL2 is a Potential Prognostic Marker that Promotes Cell Proliferation in Gallbladder Cancer. *Cell Physiol Biochem.*, S. 2117-2131.
49. Litovchick L, S. S. (2007). Evolutionarily conserved multisubunit RBL2/p130 and E2F4 protein complex represses human cell cycle-dependent genes in quiescence. *Mol Cell*, S. 539-551.
50. Liu DX, B. S. (2004). B-myb and C-myb play required roles in neuronal apoptosis evoked by nerve growth factor deprivation and DNA damage. *J Neurosci*, S. 8720-8725.

51. Müller J, E. A. (2013). Loss of pSer2448-mTOR expression is linked to adverse prognosis and tumor progression in ERG-fusion-positive cancers. *Int J Cancer*, S. 1333-1340.
52. Mahal BA, B. S. (2019). Use of Active Surveillance or Watchful Waiting for Low-Risk Prostate Cancer and Management Trends Across Risk Groups in the United States, 2010-2015. *JAMA*, S. 704-706.
53. Manak JR, M. N. (2002). Mutation of the Drosophila homologue of the Myb protooncogene causes genomic instability. *Proc Natl Acad U S A*, S. 7438-7443.
54. Matsuzaki T, S. T. (2012). Function of the membrane water channel aquaporin-5 in the salivary gland. *Acta Histochem Cytochem*, S. 251-259.
55. Mellentin, E-G F (2001). *Ediss Uni Hamburg*. Abgerufen am 24. März 2020 von Ediss Uni Hamburg: <http://ediss.sub.uni-hamburg.de/volltexte/2011/5414/>
56. Melling N, R. M. (2017). High-Level  $\gamma$ -Glutamyl-Hydrolase (GGH) Expression is Linked to Poor Prognosis in ERG Negative Prostate Cancer. *Int J Mol*, S. 286.
57. Meyer D, S. H. (2013). Miktionsbeschwerden beim Mann: Differenzialdiagnosen und Therapie des benignen Prostatasyndroms [Urination disorders in the man: differential diagnoses and therapy of benign prostate syndrome]. *Praxis (Bern 1994)*, S. 1237-42.
58. Mulder JH, d. R. (1983). Model studies in adjuvant chemotherapy. *Cancer Treat Rep*, 45-50.
59. Musa J, A. M. (2017). MYBL2 (B-Myb): a central regulator of cell proliferation, cell survival and differentiation involved in tumorigenesis. *Cell Death Dis*, S. e2895. doi: 10.1038/cddis.2017.244.
60. Ness, S. (2003). Myb protein specificity: evidence of a context-specific transcription factor code. *Blood Cells Mol Dis*, S. 192-200.
61. Niall M Corcoran, C. M. (2012). Underestimation of Gleason Score at Prostate Biopsy Reflects Sampling Error in Lower Volume Tumours. *BJU Int.* , 660-664.
62. Okada M, A. H. (2002). Myb controls G(2)/M progression by inducing cyclin B expression in the Drosophila eye imaginal disc. *EMBO J*, S. 675-684.
63. Osterloh L, v. E. (2007). The human synMuv-like protein LIN-9 is required for transcription of G2/M genes and for entry into mitosis. *EMBO J*, S. 144-157.
64. Papetti M, A. L. (2011). MYBL2, a link between proliferation and differentiation in maturing colon epithelial cells. *J Cell Physiol*, S. 785-791.

65. Park HJ, C. R. (2008). Anaphase-promoting complex/cyclosome-CDH1-mediated proteolysis of the forkhead box M1 transcription factor is critical for regulated entry into S phase. *Mol Cell Biol.*, S. 5162-5171.
66. Parker, C. (2004). Active Surveillance: Towards a New Paradigm in the Management of Early Prostate Cancer. *Lancet Oncol.*, S. 101-106.
67. Peneau M, V. A. (2004). Indications de la lymphadénectomie ilio-obturatrice dans le cancer de la prostate cliniquement localisé [Indications for pelvic lymphadenectomy in clinically localized prostate cancer]. *Prog Urol*, S. 287-294.
68. Pust A, K. D.-M. (2016). Aquaporin 5 expression is frequent in prostate cancer and shows a dichotomous correlation with tumor phenotype and PSA recurrence. *Hum Pathol.*, 102-110.
69. Qin HD, L. X. (2016). Genomic Characterization of Esophageal Squamous Cell Carcinoma Reveals Critical Genes Underlying Tumorigenesis and Poor Prognosis. *Am J Hum Genet*, S. 709-727.
70. Quaas A, R. A. (2015).  $\beta$ III-tubulin overexpression is linked to aggressive tumor features and shortened survival in clear cell renal cell carcinoma. *World J Urol*, S. 1561-1569.
71. Quaas M, M. G. (2012). p53 can repress transcription of cell cycle genes through a p21(WAF1/CIP1)-dependent switch from MMB to DREAM protein complex binding at CHR promoter elements. *Cell Cycle*, S. 4661-4672.
72. Ren F, W. L. (2015). MYBL2 is an independent prognostic marker that has tumor-promoting functions in colorectal cancer. *Am J Cancer Res*, S. 1542-1552.
73. Rohde V, K. A. (2007). *Gesundheitsberichterstattung des Bundes; Heft 36: Prostataerkrankungen*. Robert Koch Institut.
74. Rosa-Ribeiro R, N. U. (2014). Transcription factors involved in prostate gland adaptation to androgen deprivation. *PLoS ONE*, S. e97080 doi: 10.1371/journal.pone.0097080. eCollection 2014.
75. Sadasivam S, D. J. (2013). The DREAM complex: master coordinator of cell cycle-dependent gene expression [published correction appears in Nat Rev Cancer. 2013 Oct;13(10):752]. *Nat Rev Cancer*, S. 585-595.
76. Sadasivam S, D. S. (2012). The MuvB complex sequentially recruits B-Myb and FoxM1 to promote mitotic gene expression. *Genes Dev*, S. 474-489.

77. Sandberg ML, S. S. (2005). c-Myb and p300 regulate hematopoietic stem cell proliferation and differentiation. *Dev Cell.*, S. 153-166.
78. Sauter G, S. R. (2003). Tissue microarrays in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*, 2(12), 962-72.
79. Sauter G, S. S. (2016). Clinical Utility of Quantitative Gleason Grading in Prostate Biopsies and Prostatectomy Specimens. *Eur Urol.*, S. 592-598.
80. Sauter G (2019). persönliche Mitteilung.
81. Shepard JL, A. J. (2005). A zebrafish bmyb mutation causes genome instability and increased cancer susceptibility. *Proc Natl Acad Sci U S A*, S. 13194-13199.
82. Shi H, B. M. (2011). Single nucleotide polymorphisms in the 20q13 amplicon genes in relation to breast cancer risk and clinical outcome. *Breast Cancer Res Treat*, S. 905-916.
83. Simon R, M. M. (2004). Tissue microarrays. *Methods Mol Med* , 377-389.
84. Stelzer G, R. N. (2016). *The GeneCards suite: from gene data mining to disease genome sequence analyses. Curr. Protoc. Bioinform. 54: 1.30.1- 1.30.33. doi: 10.1002/cpbi.5.* Von Current Protocols: <https://doi.org/10.1002/cpbi.5> abgerufen
85. Tanner MM, G. S. (2000). Frequent amplification of chromosomal region 20q12-q13 in ovarian cancer. *Clin Cancer Res*, S. 1833-1839.
86. Tarasov KV, T. Y. (2008). B-MYB is essential for normal cell cycle progression and chromosomal stability of embryonic stem cells. *PLoS ONE*, S. e2478. doi: 10.1371/journal.pone.0002478.
87. Thomsen FB, J. H. (2019). Active Surveillance for Localized Prostate Cancer: Nationwide Observational Study. *J Urol.*, S. 520-527.
88. Tomlins SA, R. D. (2005). Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science*, S. 644-648.
89. Toscani A, M. R. (1997). Arrest of spermatogenesis and defective breast development in mice lacking A-myb. *Nature*, S. 713-717.
90. Trauth K, M. B. (1994). Mouse A-myb encodes a trans-activator and is expressed in mitotically active cells of the developing central nervous system, adult testis and B lymphocytes. *EMBO J*, S. 5994-6005.

91. Tsourlakis MC, E. A. (2017). FOXA1 expression is a strong independent predictor of early PSA recurrence in ERG negative prostate cancers treated by radical prostatectomy. *Carcinogenesis*, S. 1180-1187.
92. Wang Z, W. Y. (2017). Significance of the TMPRSS2:ERG gene fusion in prostate cancer. *Mol Med Rep* , S. 5450-5458.
93. Wilczak W, W. C. (2018). Marked Prognostic Impact of Minimal Lymphatic Tumor Spread in Prostate Cancer. *Eur Urol*, 376-386.
94. M. Wirth et.al.(2019) Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms; Leitlinienprogramm Onkologie der AWMW, Deutschen Krebsgesellschaft e.V. und Deutschen Krebshilfe e.V., Deutsche Gesellschaft für Urologie e. V. (DGU); Version 5.1- Mai 2019
95. Wittekind, C. (2010). TNM-System 2010 : Zur 7. Auflage der TNM-Klassifikation maligner Tumoren [2010 TNM system: on the 7th edition of TNM classification of malignant tumors]. *Pathologe*, S. 331-332.
96. Yu R, L. C. (2017). Clinicopathologic features and prognostic implications of MYBL2 protein expression in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pathol Res Pract*, S. 964-968.
97. Yuan J, Z. Y. (2015). MYBL2 guides autophagy suppressor VDAC2 in the developing ovary to inhibit autophagy through a complex of VDAC2-BECN1-BCL2L1 in mammals. *Autophagy*, S. 1081-1098.
98. Zhang C, W. L. (2011). Definition of a FoxA1 Cistrome that is crucial for G1 to S-phase cell-cycle transit in castration-resistant prostate cancer [published correction appears in *Cancer Res*. 2011 Dec 15;71(24):7718]. *Cancer Res*, S. 6738-6748.
99. Zhang X, L. Q. (2017). Akt/FoxM1 signaling pathway-mediated upregulation of MYBL2 promotes progression of human glioma. *J Exp Clin Cancer Res*, S. 105.
100. Zhu W, G. P. (2004). E2Fs link the control of G1/S and G2/M transcription. *EMBO J*, S. 4615-4626.

## 8. Abbildungs- u. Tabellenverzeichnis

Abbildungen:

Abbildung 3: MYBL2 Expression im Zellzyklus (Musa J., 2017).....	13
Abbildung 4a: Übersichtsaufnahme eines TMA-Schnittes.....	18
Abbildung 2b: Detailaufnahme einer einzelnen Stanze bei 7-facher Vergrößerung.....	19
Abbildung 3: Schematische Darstellung eines TMA-Blockes.....	20
Abbildung 4: Prostatakarzinom-TMA-Kollektiv.....	21
Abbildung 5a) - d): Tumoren mit unterschiedlich starker MYBL2-Expression.....	26
Abbildung 6: Nebeneinander liegende Areale von physiologischem Prostataepithel und Tumorgewebe.....	27
Abbildung 7: MYBL2-Expression und biochemisches Rezidiv (alle Tumoren).....	26
Abbildung 8: MYBL2-Immunfärbung und ERG-Fusionsstatus.....	29
Abbildung 9: MYBL2-Expression und biochemisches Rezidiv (ERG-negative Tumoren).....	31
Abbildung 10: MYBL2-Expression und biochemisches Rezidiv (ERG-positive Tumoren).....	33
Abbildung 11: MYBL2-Expression und Deletionen (alle Tumoren).....	34
Abbildung 12: MYBL2-Expression und Deletionen (ERG-negative Tumoren).....	35
Abbildung 13: MYBL2-Expression und Deletionen (ERG-positive Tumoren).....	35
Abbildung 14: MYBL2-Expression und Ki67-Labeling-Index.....	36
Abbildung 15: MYBL2-Expression und BCL2-Status.....	37
Abbildung 16: MYBL2-Expression und immunhistochemischer p53-Nachweis.....	38
Abbildung 17 a) - h): Prognostische Bedeutung der MYBL2-Expression in allen Tumoren mit identischem Gleason-Grad.....	41
Abbildung 18 a) - h): Prognostische Bedeutung der MYBL2-Expression in ERG-negativen Tumoren mit identischem Gleason-Grad.....	42
Abbildung 19: MYBL2-Expression und biochemisches Rezidiv (Tumoren mit PTEN-Deletion) .....	43

Tabellen:

Tabelle 1: Patientendaten.....	22
Tabelle 2: MYBL2-Immunfärbung und Tumorphänotyp (alle Tumoren).....	28
Tabelle 3: MYBL2-Immunfärbung und Tumorphänotyp (ERG-negative Tumoren)...	30
Tabelle 4: MYBL2-Immunfärbung und Tumorphänotyp (ERG-positive Tumoren).....	32
Tabelle 5: Multivariate Analyse in a) allen Tumoren, b) ERG-negativen und c) ERG-positiven Tumoren.....	40

## 9. Abkürzungsverzeichnis

APE1	Apurin / Apyrimidin-Endonuklease
AqP-5	Aquaporin-5
AS	Active Surveillance
BCL-2	B-cell lymphoma 2; Apoptoseregulierendes Protein
CDK	Cyclin-abhängige Kinase
CTCF	1-Zinkfingerprotein, Transkriptionsfaktor
D-Myb	in Drosophilafliegen vorkommender Transkriptionsfaktor
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DP1, -2,-3	Dimerisierungspartner 1,2 und 3; Bestandteil des DREAM-Komplexes
DREAM-Komplex	DP, RB-like, E2F und MuvB-Komplex
DYKRA	Tyrosinphosphorylierungs-regulierte Kinase 1A
E2F4,-5	Transkriptionsfaktoren (Repressoren) des Zellzyklus
E2F1,-2,-3	Transkriptionsfaktoren (Aktivatoren) des Zellzyklus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERG	Regulatorisches Gen, kodiert für Transkriptionsfaktoren
FISH	Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung
FOXM1	Forkhead-Box-Protein M1
G-Phase	g = gap, engl. für Lücke; Phase des Zellzyklus
GGH	Gamma-Glutamylhydrolase
HPV	Humanes Papillomvirus
IHC	Immunhistochemie
KI67	Protein, zur Markierung von sich teilenden menschlichen Zellen geeignetes
LIN9	Protein lin9-homolog; Kernprotein des MuvB-Komplexes
LIN37	Protein lin37-homolog; Kernprotein des MuvB-Komplexes
LIN52	Protein lin52-homolog; Kernprotein des MuvB-Komplexes
LIN54	Protein lin54-homolog; Kernprotein des MuvB-Komplexes



M-Phase	Mitose-Phase des Zellzyklus
mirco-RNA	kurze, hoch konservierte, nichtcodierende Ribonukleinsäure (miRNA oder miR)
MMB	MYBL2-MuvB-FOXM1-Komplex
MRI	Magnetresonanzbildgebung
mRNA	m = messenger, engl. für Bote; einzelsträngige Boten-Ribonukleinsäure
MTA	Medizinisch-technische Assistentin
mTOR	mechanistic Target of Rapamycin; indirekt an das Immunsuppressivum Rapamycin bindendes Protein
MuvB-Komplex	Transkriptionsregulationskomplex des Zellzyklus
MYBL1	Avian Myeloblastosis Viral Homolog-Like-1-Protein, Transkriptionsfaktor
MYBL2	Avian Myeloblastosis Viral Homolog-Like-2-Protein, Transkriptionsfaktor
MYBL3	Avian Myeloblastosis Viral Homolog-Like-3-Protein, Transkriptionsfaktor
µl	Mikroliter
p-Wert	p = probability, engl. für Wahrscheinlichkeit; Signifikanzwert
p16	cyclin dependent kinase inhibitor 2A (auch CDK-Inhibitor 2A genannt)
p21	cyclin dependent kinase inhibitor 1 (auch CDK-Inhibitor 1 genannt)
p53	Tumorsuppressorprotein, nukleäres Phosphoprotein
p107	Retinoblastoma-like protein 1
p130	Retinoblastoma-like protein 2
pN-Stadium	pathologischer Lymphknotenmetastasenbefall entsprechend der TNM-Klassifikation
PSA	Prostata spezifisches Antigen
pT-Stadium	pathologische Tumorausdehnung entsprechend der TNM-Klassifikation

PTEN	Phosphatase and Tensin homolog; als Tumorsuppressor agierende Phosphatase
R-Status	r = residual, engl. für übrigbleibend; das Vorhandensein von Tumorgewebe nach Resektion
RB-ähnliche Proteine	Bestandteile des DREAM-Komplexes
RBBP4	Histone-binding protein RBBP4
S-Phase	Synthese-Phase des Zellzyklus
SMAD5	Mothers against decapentaplegic homolog 5
SOX9	Transkriptionsfaktor
T-Zellen	T-Lymphozyten
TBST	Tris-buffered saline mit Tween20
Tert.	Tertiärgrad
TMA	Tissue Microarray, Gewebemikroarray
TMPRSS2	Transmembrane protease serine 2
TRIM24	Tripartite motif-containing 24 (auch transcriptional intermediary factor 1 $\alpha$ (TIF1 $\alpha$ ) genannt)
UKE	Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf

## **10. Danksagung**

Die Danksagung wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

## **11. Lebenslauf**

Der Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

## **12. Eidesstattliche Versicherung**

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

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe. Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: .....