

Aus dem Institut für Pathologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Helmut Erich Gabbert

**Häufigkeit und prognostische Relevanz rekurrenter
Genfusionen von TMPRSS2- und ETS-Transkriptionsfaktoren im
Prostatakarzinom**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Martin Olaf Schoppe

2013

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Windolf

Referent: Prof. Dr. Engers

Koreferent: Prof. Dr. Schulz

Abkürzungsverzeichnis:

AXL	Tyrosin Protein Kinase Rezeptor, der nach dem griechischen Wort anelekto (= unkontrolliert) benannt ist
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
Bcl2	B-cell lymphoma 2
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CAS-Block	Universelle Blockungslösung der Firma Life Technologies zur Reduzierung unspezifischer Hintergrundfärbung bei Techniken mit Immunmarkierung, die Bedeutung der Abkürzung ist nicht veröffentlicht.
CD10	Cluster of Differentiation 10
CD166	Cluster of Differentiation 166
CK 903	Zytokeratin 903
Cot 1 = Cot 1-DNA	Überwiegend 50-300 Basenpaare große plazentare DNA, welche mit repetitiven DNA-Sequenzen angereichert ist und im Allgemeinen dazu benutzt wird unspezifische Hybridisierungen in Microassays zu blocken.
CT	Computertomographie
cT	klinisches Tumorstadium
DAPI-Färbung	4',6-Diamidino-2-Phenylindole-Färbung
ddH2O	doppelt destilliertes Wasser
dH2O	destilliertes Wasser
Dig	Digoxigenin
DNA = DNS	Desoxyribonukleinsäure
DNTP	Desoxynukleosid Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
Eppi	Eppendorf-Tube
ERG	ETS-Related-Gene
ETS	Erythroblast transformation specific-Transkriptionsfaktorenfamilie
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FITC-anti-DIG	Anti-Digoxigenin-Fluorescein
g	Gramm
Gas6	Growth arrest-specific 6
ggf.	gegebenenfalls
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunden
HCl	Salzsäure
HDR	high dose rate
HE	Haematoxylin Eosin
Her2-neu	Human epidermal growth factor receptor 2
HIFU	Hochintensiver Fokussierter Ultraschall
H2O	Wasser
kb	Kilobase

l	Liter
LB-Medium, LB-Agar	lysogeny broth (=„Lysin produzierende Brühe“). Komplexes Nährmedium zur Kultivierung von Bakterien.
LDR	low dose rate
LHRH	luteinisierendes Hormon Releasing-Hormon
MicroSpin S-200 HR Säule	“MicroSpin-Säule“ der Firma Amersham/GE Healthcare zur schnellen Aufreinigung von Nukleinsäuren. Eine gute Nukleinsäureausbeute und -reinheit wird mit Probengrößen von 25-100 µl sowie DNA-Mengen im Nanogramm- bis Milligrammbereich erreicht.
min.	Minuten
ml	Milliliter
mM	millimolar
mm	Millimeter
mRNA = mRNS	messenger Ribonukleinsäure
MRT	Magnet Resonanz Tomographie
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat = Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NaOAc = NaAc	Natriumacetat
NaOH	Natriumhydroxyd
ng	Nanogramm
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBS-T	Phosphate Buffered Saline und Tween
pH	pondus Hydrogenii
PIN	prostatistische intraepitheliale Neoplasie
pN	pathologisches Lymphknotenstadium
PSA	Prostataspezifisches Antigen
pT	pathologisches Tumorstadium
p53	Tumorsuppressorgen p53
p63	Protein p63, Mitglied der p53-Familie
Rac	Rho family of GTPases
Rb1	Retinoblastom-Protein 1
reconstituted Buffer DLB	Eigenname einer Pufferlösung aus dem REPLI-g Midi Kit der Firma Qiagen
REPLI-g Midi Kit	Kit der Firma Qiagen mit Reagenzien zur Amplifikation des gesamten Genoms. Die zu erwartende DNA-Ausbeute einer 50 µl Reaktion beträgt bis zu 40 µg, mit einer durchschnittlichen Produktlänge größer 10 kb (zu erwartende Produkte mit einer Größe zwischen 2 kb und 100 kb).
REPLI-g Mini Kit	Kit der Firma Qiagen mit Reagenzien zur Amplifikation des gesamten Genoms. Die zu erwartende DNA-Ausbeute einer 50 µl Reaktion beträgt bis zu 10 µg, mit einer durchschnittlichen Produktlänge größer 10 kb (zu erwartende Produkte mit einer Größe zwischen 2 kb und 100 kb).
RNA = RNS	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease

rpm	rotations per minute
R-Stadium, R-Status	Residualtumor-Stadium, -Status
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
SAV	Streptavidin
sog.	so genannter, so genannte, so genanntes
SSC	Standard Saline Citrate
Tiam1	T-cell lymphoma invasion and metastasis-inducing protein 1
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinase
TMA	Tissue Micro Array
TMPRSS2	Transmembrane Protease Serin 2
TNM- Klassifikation	Von der UICC herausgegebene Tumor-Klassifikation welche die Parameter Primärtumor (T), Lymphknotenmetastasen (N) und Fernmetastasen (M) umfasst.
TP53	Tumor Protein 53
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, auch Tromethamin oder Trometamo
TRUS	Transrektaler Ultraschall
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
vergl.	vergleiche
z. B.	zum Beispiel
Z. n.	Zustand nach
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
594-SAV	Streptavidin, Alexa Fluor
%	Prozent

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung:.....	1
1.1	Anatomie der Prostata:.....	1
1.2	Epidemiologie des Prostatakarzinoms:.....	2
1.3	Klinik und Pathologie des Prostatakarzinoms:.....	3
1.4	Diagnostik des Prostatakarzinoms:.....	6
1.5	Therapie des Prostatakarzinoms:.....	10
1.6	Molekularpathologische Veränderungen des Prostatakarzinoms:	14
1.6.1	Einleitung Molekularpathologie:	14
1.6.2	Androgenrezeptor:	14
1.6.3	TMPRSS2-ERG-Gen:	15
1.6.4	Rac:.....	17
1.6.5	Tiam1:	18
1.6.6	AXL und Gas6:	18
1.6.7	Her2-neu:.....	20
1.6.8	Andere Tumorsuppressorgene:	20
1.6.9	Resümee Molekularpathologie:	20
1.7	Zielsetzung der Arbeit:	21
2	Material und Methoden:.....	22
2.1	Patientenkollektiv und Patientencharakteristika:	22
2.2	Ethikvotum:	23
2.3	Mikroskopieren der Prostatakarzinomfälle:	23
2.4	Anfertigung der Tissue Micro Array Schnittpräparate:.....	23
2.5	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung:	24
2.5.1	Prinzip der Untersuchung:	24
2.5.2	Benötigte Reagenzien:	26
2.5.3	Herstellung der DNA-Sonden:.....	30
2.5.4	Markierung der DNA-Sonden mit Biotin (rot) und Digoxigenin (grün):	33
2.5.5	Durchführung der FISH:	35
2.6	Angewandte statistische Methoden:.....	37
3	Ergebnisse:.....	38
3.1	Fotodokumentation der Befundkonstellation im <i>ERG-break-apart-assay</i> :.....	38
3.2	Ergebnisse im Detail:.....	42
3.3	Korrelation der TMPRSS2-ERG-Genfusion mit anderen Parametern:	45
3.4	Prognostische Relevanz:	46
4	Diskussion:	47
5	Zusammenfassung:.....	52
6	Literaturverzeichnis:.....	53
7	Danksagung:	59

1 Einleitung:

1.1 Anatomie der Prostata:

Die Prostata des erwachsenen Mannes ist ca. kastaniengroß und wiegt ca. 20-30 g. Sie umschließt die Urethra am Blasengrund und lagert auf dem Diaphragma urogenitale. Dorsal grenzt sie an das Rektum. Sie wird aufgrund anatomischer, embryonaler und funktioneller Unterschiede in Lappen und Zonen unterteilt. Anatomisch unterscheidet man Lobus dexter und Lobus sinister (Rohen 1992). Funktionell unterscheidet man eine zentrale Zone, welche die Urethra und die Ductus ejaculatorii umschließt, eine periphere Zone, welche drei Viertel des Organs ausmacht und dorsal und lateral der zentralen Zone liegt und eine transitionale Zone welche sich periurethral vom Blasen Hals bis zum Colliculus erstreckt (Böcker et al. 2008). Klinisch unterscheidet man zwei Seitenlappen und einen diese verbindenden Mittellappen. Dieser Mittellappen, welcher die zentrale Zone beinhaltet, stellt embryonal eine eigenständige Struktur dar, da er in der Embryonalzeit aus Drüsenkonvoluten, die aus der Hinterwand der primären Harnröhre aussprossen entsteht und im Gegensatz zum übrigen Prostatagewebe auf weibliche Geschlechtshormone anspricht. Die beiden Seitenlappen erreichen unter dem Einfluss der männlichen Geschlechtshormone erst in der Pubertät ihre endgültige Größe. Im Greisenalter bilden sich die Seitenlappen mit dem Absinken des Testosteronspiegels wieder zurück und atrophieren, während die periurethralen Drüsenkomplexe des Mittellappens proliferieren können (Böcker et al. 2008, Rohen 1992).

Histologisch besteht die Prostata aus 30-50 verzweigten tubuloalveolären Drüsen, deren Ausführungsgänge beiderseits der Pars prostatica der Urethra münden (Junqueira et al. 1996). Die Prostatadrüsen sind vielgestaltig: Teilweise weitlumig, teilweise eng, häufig verzweigt. Das Drüsenlumen ist durch kleine Schleimhautfalten unterkammert. Das Drüsenepithel ist uneinheitlich, meist einschichtig hochprismatisch, aber auch mehrschichtig oder mehrreihig sowie in weitlumigen Arealen flach oder kubisch. Es finden sich überwiegend so genannte sekretorische Hauptzellen und deren Vorläuferzellen (Basalzellen) sowie in geringer Anzahl

enterochromaffine Zellen, wobei es sich um kleine sialomuzinbildende Zellen handelt. In den Drüsenlumina finden sich häufig so genannte Prostatasteinchen (corpora amylacea) welche Durchmesser von bis zu 1-2 mm erreichen können. Die Drüsen liegen locker verteilt in einem aus dichtem Bindegewebe mit zahlreichen kollagenen Fasern, einem Netzwerk elastischer Fasern sowie vielen glatten Muskelfasern bestehenden Stroma. Außerdem kommen im Stroma reichlich Gefäße und Nerven vor (Junqueira et al. 1996).

1.2 Epidemiologie des Prostatakarzinoms:

Das Prostatakarzinom ist mit 25,4% aller diagnostizierten Krebserkrankungen die häufigste Krebserkrankung des Mannes in Deutschland (Interdisziplinäre S3-Leitlinie des Prostatakarzinoms 2011). Jährlich erkranken etwa 58000 Männer in Deutschland neu an diesem Tumor. Aus internationalen Studien lassen sich für die Altersgruppe zwischen 60 und 70 Jahren Prävalenzen zwischen 70/100000 (US-afroamerikanische Männer) und 14/100000 (griechische Männer) ableiten. Die altersstandardisierte Inzidenz ist weltweit unterschiedlich. In Europa zeigt sich ein Nord-Süd-Gefälle. Für Schweden liegen Inzidenzen von 90,9 Erkrankte/100000 Männer vor, für Spanien werden 35,9 Erkrankte/100000 Männer angegeben. Die höchste Inzidenz findet sich in den USA (124,8/100000), insbesondere bei afroamerikanischen Männern (185/100000) (Interdisziplinäre S3-Leitlinie des Prostatakarzinoms 2011). Für diese geographischen Unterschiede sind wohl nicht nur genetische, sondern auch unbekannte exogene Faktoren verantwortlich. So ist das Karzinomrisiko bei nach Amerika ausgewanderten Asiaten deutlich höher, als in ihren Heimatländern (Böcker et al. 2008).

Bei den Krebstodesfällen des Mannes steht das Prostatakarzinom mit 10,1% an dritter Stelle, nach dem Bronchial- und Kolonkarzinom (Rohde et al. 2009, Interdisziplinäre S3-Leitlinie des Prostatakarzinoms 2011). Von den betroffenen Männern sind 96% älter als 60 Jahre (Rohde et al. 2009). Bis zum Jahr 2050 wird der Anteil der über 60-Jährigen in der Bevölkerung in Deutschland auf ca. 28 Millionen Männer anwachsen und damit doppelt so hoch sein wie heute. Im gleichen Umfang ist eine Zunahme des

Prostatakarzinoms zu erwarten, so dass dieser demographischen Entwicklung in Diagnostik und Therapie des Prostatakarzinoms Rechnung getragen werden muss (Interdisziplinäre S3-Leitlinie des Prostatakarzinoms 2011).

Die Inzidenz des Prostatakarzinoms stieg in Deutschland von 1970 bis 1990 nur geringfügig an. Ab 1990 zeigt sich aber ein deutlicher Anstieg der altersstandardisierten Inzidenzrate (Rohde et al. 2009). Insbesondere der Anteil früher Stadien ist deutlich angestiegen (Interdisziplinäre S3-Leitlinie des Prostatakarzinoms 2011). Die Sterberate hingegen verblieb über die Jahre auf relativ konstantem Niveau (Rohde et al. 2009). Diese Veränderungen werden auf die intensiviertere Diagnostik mit Bestimmung des PSA-Wertes im Serum zurückgeführt (Interdisziplinäre S3-Leitlinie des Prostatakarzinoms 2011, Rohde et al. 2009). Ob mit der Bestimmung des PSA-Wertes als einem Parameter der Krebsfrüherkennung die Mortalitätsrate gesenkt werden kann, oder ob nur die Nachweisquote weniger aggressiver Prostatakarzinome erhöht wird, ist momentan Gegenstand kontroverser Diskussionen und kann erst nach Vorliegen entsprechender Studienergebnisse abschließend beurteilt werden (Rohde et al. 2009). Es tragen nämlich momentan ca. 40% der männlichen Bevölkerung in den westlichen Industrieländern das Risiko im Laufe ihres Lebens ein Prostatakarzinom zu entwickeln, aber nur 10% werden symptomatisch und nur 3% versterben daran (Interdisziplinäre S3-Leitlinie des Prostatakarzinoms 2011).

1.3 Klinik und Pathologie des Prostatakarzinoms:

Der wichtigste Risikofaktor zur Entstehung eines Prostatakarzinoms ist das Alter, da das Prostatakarzinom eine starke altersabhängige Inzidenz zeigt. In der Altersgruppe der 30- bis 34-jährigen liegt die Inzidenz in den USA bei 1/100000, während sie mit 58/100000 ihren Gipfel in der Altersgruppe der 65- bis 69-jährigen erreicht. Auch genetische Faktoren sind als Risikofaktor anzusehen, denn Männer, deren Brüder und/oder Väter an einem Prostatakarzinom erkrankt sind, weisen ein zweifach erhöhtes Risiko auf, im Laufe ihres Lebens selbst an einem Prostatakarzinom zu erkranken. Außerdem erhöhen ein jüngeres Alter der betroffenen Familienmitglieder, eine steigende genetische Übereinstimmung zum betroffenen Familienmitglied sowie

die steigende Anzahl betroffener Familienmitglieder das relative Prostatakarzinomrisiko (Interdisziplinäre S3-Leitlinie des Prostatakarzinoms 2011). Wie im Abschnitt über die Epidemiologie bereits erläutert, ist auch die ethnische Herkunft als Risikofaktor anzusehen, wobei das Risiko für afroamerikanische Männer am höchsten ist (Böcker et al. 2008, Rübben 2009). Darüber hinaus scheint auch eine chronische Prostatitis z. B. im Rahmen von sexuell übertragbaren Erkrankungen einen Risikofaktor zur Entstehung des Prostatakarzinoms darzustellen (Interdisziplinäre S3-Leitlinie des Prostatakarzinoms 2011).

Bezüglich der Möglichkeit einer Prävention wird eine gesunde Lebensweise empfohlen mit einer ausgewogenen Ernährung mit Schwerpunkt auf pflanzlichen Produkten sowie mindestens 30 Minuten körperlicher Betätigung an mindestens fünf Tagen in der Woche. Durch die Einnahme von 5-alpha-Reduktase-Hemmern lässt sich die Häufigkeit des Nachweises von Prostatakarzinomen und Präneoplasien (high-grade prostatic intraepitheliale Neoplasie; PIN) reduzieren und die Höhe des PSA-Wertes absenken. Da allerdings keine Hinweise zur Auswirkung auf die tumorspezifische Mortalität oder die Gesamtmortalität vorliegen, sind 5-alpha-Reduktase-Hemmer momentan in Deutschland zur Prävention des Prostatakarzinoms nicht zugelassen (Rübben 2009, Interdisziplinäre S3-Leitlinie des Prostatakarzinoms 2011).

Klinisch ist das Prostatakarzinom zumeist symptomlos und wird erst in höheren Stadien symptomatisch. Primär kann es sich durch eine subvesikale Obstruktion, und/oder Schmerzen für den Patienten bemerkbar machen (Rübben 2009). Die meisten klinischen Symptome werden jedoch erst durch die Metastasen ausgelöst. Hierbei zeigen sich lymphogene Metastasen zuerst in den retroperitonealen Lymphknoten. Hämatogene Metastasen verteilen sich überwiegend retrograd über den klappenlosen prävertebralen Venenplexus in Wirbelsäule, Femur und Beckenknochen. Da die Tumorzellen in 90% der Fälle den sogenannten *prostatic osteoblastic factor* produzieren, finden sich zumeist osteoblastische Knochenmetastasen (Böcker et al. 2008). Die mediane Überlebenszeit beim Vorliegen von Knochenmetastasen beträgt ca. drei Jahre. Die Metastasen können zu Schmerzen,

Hyperkalzämie, pathologischen Frakturen und zur Kompression der Spinalnerven führen (Interdisziplinäre S3-Leitlinie des Prostatakarzinoms 2011).

Der unbehandelte Verlauf eines lokal begrenzten Prostatakarzinoms mit einem Gleason-Score ≤ 6 (siehe 1.4) ist in vielen Fällen primär protrahiert, weniger aggressiv. Bei im Rahmen einer transurethralen Resektion diagnostizierten sog. inzidentiellen Karzinomen lag das prostatakarzinomspezifische Überleben nach 15 Jahren Nachbeobachtungszeit bei ca. 79% und nach 20 Jahren bei ca. 54%. Bei mittels PSA-Screening diagnostizierten Prostatakarzinomen ist jedoch mit einem vorgezogenen Diagnosezeitpunkt zu rechnen, so dass bei einer möglichen Überdiagnose von einem klinisch insignifikanten Tumor ausgegangen werden kann. Bei einem durch ein PSA-Screening diagnostizierten Prostatakarzinom mit einem Gleason-Score von 6 wird das tumorspezifische Überleben bei konservativer Therapie auf 90% oder höher geschätzt (Rübben 2009).

Makroskopisch zeigen sich derbe, graugelbe, relativ scharf begrenzte Herdbefunde auf der Prostataschnittfläche. Diese entstehen ganz überwiegend im Bereich der peripheren, androgenabhängigen Zone und breiten sich von dort aus (Böcker et al. 2008).

Histologisch handelt es sich beim Prostatakarzinom fast immer um ein Adenokarzinom. In ca. 95 % der Fälle liegt ein azinäres Adenokarzinom vor. Seltener zeigen sich ein duktales, ein muzinöses oder ein siegelringzelliges Adenokarzinom, welche jeweils eine schlechtere Prognose als das azinäre Adenokarzinom aufweisen. Sehr selten finden sich kleinzellige neuroendokrine oder sarkomatoide Prostatakarzinome, welche jeweils mit einem medianen Überleben von unter 3 Jahren prognostisch sehr ungünstig sind (Rübben 2009, Böcker et al. 2008). Noch seltener kommen Basalzellkarzinome der Prostata vor. Da bislang nur wenige Fälle von Basalzellkarzinomen der Prostata wissenschaftlich untersucht wurden und zudem meist nur ein sehr kurzes follow up vorliegt, sind Aussagen zur Prognose dieser äußerst seltenen Karzinome bislang nicht zu machen (Eble et al. 2004).

Im Bereich der Molekularpathologie wurde in den letzten Jahren in über 10000 Studien eine Vielzahl von molekularpathologischen Markern für das Prostatakarzinom entdeckt (Rübben 2009) (vergleiche hierzu 1.6).

1.4 Diagnostik des Prostatakarzinoms:

Je nachdem zu welchem Zeitpunkt ein Prostatakarzinom diagnostiziert wird, unterscheidet man drei Typen: Als inzidentielles Karzinom bezeichnet man ein im Rahmen einer transurethralen Prostataresektion bei der nodulären Hyperplasie aufgefallenes Karzinom. Von einem okkulten Karzinom spricht man bei einem erst aufgrund von Metastasen diagnostizierten Karzinom. Ein latentes Karzinom bezeichnet ein erst bei einer Obduktion entdecktes Prostatakarzinom (Böcker et al. 2008).

Die am einfachsten durchzuführende Untersuchung zur Diagnose eines Prostatakarzinoms stellt die digitale rektale Untersuchung dar. Allerdings haben bei suspektem rektalem Tastbefund schon 40% der Karzinome die Organkapsel überschritten und sind somit potentiell nicht mehr kurativ therapierbar (Rübben 2009).

Die transrektale Ultraschalluntersuchung (= TRUS) ist ebenso eine Möglichkeit um Hinweise auf ein Prostatakarzinom zu erhalten, wobei echoarme Zonen als malignitätsverdächtig, jedoch nicht als malignitätsbeweisend zu werten sind. Die TRUS-Untersuchung ist trotz hochauflösender Ultraschallsonden der digitalen rektalen Untersuchung nicht überlegen (Rübben 2009).

Relativ einfach zu bestimmen ist der PSA-Wert im Blutserum. Hierbei handelt es sich um eine chymotrypsinartige Serinprotease, welche hauptsächlich von den Epithelzellen der Azini und Ductuli der Prostata synthetisiert wird und welche, obwohl sie in ganz geringen Mengen auch in Brustdrüsen, Mammatumoren, Nebennierentumoren, Nierenzellkarzinomen, paraurethralen sowie paraanalen Drüsen vorkommt, in praxi als organspezifischer Marker gilt. Von den meisten Autoren werden Werte von <4 ng/ml als normwertig angesehen, wobei aber auch das Patientenalter und die Prostatagröße zu berücksichtigen sind. Außerdem sollte die PSA-

Anstiegsgeschwindigkeit berücksichtigt werden. Hierbei sollten drei PSA-Serumbestimmungen in zwei Jahren erfolgen, wobei ein Anstieg von 0,75 ng/ml/Jahr als ein Hinweis auf ein mögliches Prostatakarzinom zu werten ist (Rübben 2009). Es ist allerdings zu berücksichtigen, dass es zu falsch negativen Befunden bei sehr kleinen Karzinomen und zu falsch positiven Befunden bei Prostatitis, Prostatahyperplasie, Z. n. Prostatastanzbiopsien, Z. n. digital rektaler Untersuchung, Z. n. transurethraler Katheterisierung sowie nach Einnahme von 5-alpha-Reduktase-Hemmern, LHRH-Analoga und Antiandrogenen kommen kann (Böcker et al. 2008 und Rübben 2009).

Eine Sicherung der Karzinomdiagnose ist nur durch eine Prostatabiopsie möglich (Rübben 2009). Eine absolute Indikation zur Entnahmen von Stanzbiopsien stellen ein suspekter Palpationsbefund sowie ein PSA-Wert von >4ng/ml dar. Eine relative Biopsieindikation ist bei einem PSA-Wert von <4ng/ml mit positiver Familienanamnese oder einem suspekten TRUS-Befund gegeben (Treiber und Zaak 2008).

Die Stanzbiopsie sollte unter transrektaler sonografischer Kontrolle durchgeführt werden und es sollten 10 bis 12 Gewebestanzungen entnommen werden (Interdisziplinäre S3-Leitlinie des Prostatakarzinoms 2011).

Für die histopathologische Untersuchung sollten die Stanzzyylinder vollständig eingebettet werden, in ganzer Länge angeschnitten und in mindestens fünf Schnittstufen aufgearbeitet werden (Interdisziplinäre S3-Leitlinie des Prostatakarzinoms 2011). Der Pathologe sollte an den Prostatastanzen ein Grading des Prostatakarzinoms auf dem Boden des „modifizierten Gleason-Gradings an Stanzbiopsien“ vornehmen. Hierbei wird an Stanzbiopsien ein Summenwert aus dem häufigsten und dem am niedrigsten differenzierten Gleason-Pattern gebildet, der sog. Gleason-Score. Im Unterschied zum „modifizierten Gleason-Grading an Stanzbiopsien“ wird beim radikalen Prostatektomiepräparat, aus den beiden am häufigsten beobachteten Gleason-Pattern ein Gleason-Score addiert (Rübben 2009).

Es werden 5 Gleason-Pattern unterschieden: Bei Pattern 1 zeigt sich ein umschriebener Tumorherd mit dicht beieinander liegenden, gut voneinander abgrenzbaren, gleichförmigen, runden bis ovalären, mittelgroßen Drüsenazini. Pattern 2 ist durch ein ähnliches histologisches Erscheinungsbild wie Pattern 1 gekennzeichnet. Im

Randbereich des Tumorherdes findet sich jedoch bereits eine minimale Infiltrationstendenz. Außerdem sind die Drüsen weniger dicht beieinander gelegen und weniger gleichförmig konfiguriert. Bei Pattern 3 findet man eine deutliche Variation der Größe und Form der Tumordrüsen. Die Tumordrüsen sind kleiner als in Pattern 1 und 2. Es zeigt sich ein infiltratives Wachstum zwischen benignen Drüsen. Pattern 4 ist durch verschmolzene, mikroazinäre Drüsen gekennzeichnet, welche nicht voneinander abgrenzbar sind und schlecht entwickelte Drüsenlumina zeigen. Außerdem können sich große kribiforme Drüsen zeigen mit unregelmäßiger Randkontur. Pattern 5 zeigt keine oder nur eine minimale drüsige Differenzierung mit einem soliden, in Strängen angeordneten oder als Einzelzellen angeordnetem Wachstumsmuster. Es können sich auch zentrale Nekrosen zeigen, welche von papillären, kribiformen oder soliden Tumormassen umgeben sind (Rübben 2009).

Für jede einzelne Gewebestanze ist ein Gleason-Score zu erstellen. Anhand des Befallsmusters der Gewebestancen kann der Kliniker dann ggf. eine nervenschonende Operation planen. Der Pathologe sollte den Infiltratanteil des Tumors entweder in Prozent oder in absoluter Länge angeben, da der Infiltratanteil mit negativen prognostischen Faktoren sowie mit einigen direkten und indirekten Anzeichen einer Tumorprogression korreliert. Obwohl die Datenlage bezüglich der prognostischen Bedeutung einer Perineuralscheideninfiltration widersprüchlich ist, wird deren Angabe im pathologischen Bericht empfohlen. Da eine Blut- und/oder Lymphgefäßinfiltration in Prostatektomiepräparaten ein unabhängiger prognostischer Faktor ist, wird dies auch bei Stanzbiopsien angenommen. Ein Verdacht auf eine Blut- oder Lymphgefäßinfiltration muss immunhistologisch abgeklärt werden, z. B. durch Anfertigung einer immunhistologischen Untersuchung mit dem Antikörper gegen CD34. Nachweis von tumorinfiltriertem, periprostatem Fettgewebe oder Samenblasengewebe in der Stanzbiopsie gilt als Zeichen eines pT3-Stadiums (Rübben 2009). Bei histomorphologisch unklaren Fällen wird zum Nachweis eines Durchbruchs der Basalmembran eine immunhistologische Untersuchung sowohl für p63, als auch für Basalkeratine (z. B. CK 903) empfohlen (Interdisziplinäre S3-Leitlinie des Prostatakarzinoms 2011).

Zum klinischen Staging sollte die aktuelle Kurzklassifikation nach der UICC benutzt werden. Bei lokal beschränktem Tumorwachstum lassen sich bezüglich der Entwicklung eines Tumorrezidivs drei Risikogruppen unterscheiden: Bei einem PSA-Wert <10 ng/ml, einem Gleason-Score von ≤ 6 und einem cT-Stadium $<2a$ liegt ein niedriges Risiko, bei einem PSA-Wert >10 ng/ml – 20 ng/ml, oder einem Gleason-Score von 7, oder einem cT-Stadium 2b liegt ein mittleres Risiko sowie bei einem PSA-Wert >20 ng/ml, oder einem Gleason-Score ≥ 8 oder einem cT-Stadium 2c liegt ein hohes Risiko vor. Bei Patienten mit einem geringen Risiko sind keine bildgebenden Untersuchungen zum Staging erforderlich. Bei mittlerem Risiko sind wegen der mangelhaften Datenlage keine evidenzbasierten Aussagen bezüglich einer Bildgebung im Rahmen des klinischen Stagings möglich. Bei Patienten mit hohem Risiko werden momentan eine MRT- oder eine CT-Untersuchung empfohlen (Interdisziplinäre S3-Leitlinie des Prostatakarzinoms 2011).

Falls die Erkrankung mit einer radikalen Prostatektomie behandelt wurde, soll das Prostatektomiepräparat vom Urologen ohne Gewebsentnahme an den Pathologen übersandt werden, um Artdiagnose des Tumors, pathologisches Staging und Beurteilung des Resektionsstatus nicht zu beeinträchtigen. Es wird empfohlen, die Präparateoberfläche im Zuschnitt mit verschiedenfarbiger Tusche zu markieren. Die vesikale, apikale und die beiden Samenleiterabsetzungen sollten histologisch untersucht werden. Das Prostatektomiepräparat sollte in 3-5 mm dicke Scheiben transversal lamelliert und vollständig eingebettet werden. Histologisch sollten dann die Karzinomlokalisierung, das pT-Stadium, der Gleason-Score, eine Blut- und/oder Lymphgefäßinfiltration sowie eine Perineuralscheideninfiltration beurteilt werden. Außerdem sollte eine Aussage bezüglich des R-Status getroffen werden, wobei der minimale Sicherheitsabstand in mm angegeben werden sollte. Bei einer R1-Situation (= mikroskopisch positiver Resektionsrand) wird empfohlen die Lokalisation der Schnittrandinfiltration sowie die Ausdehnung dieser in mm zu bestimmen und über das Fehlen oder Vorhandensein der Prostatakapself im kritischen Areal zu berichten (Interdisziplinäre S3-Leitlinie des Prostatakarzinoms 2011).

Falls eine Lymphadenektomie durchgeführt wurde, sollten die Lymphknoten getrennt nach Regionen, vollständig an den Pathologen übersandt werden. Dieser sollte die makroskopische Anzahl der Lymphknoten bestimmen und die Lymphknoten vollständig einbetten. Nach histologischer Untersuchung wird vom Pathologen das pN-Stadium festgelegt wobei die Anzahl der tumorbefallenen Lymphknoten pro Zahl der untersuchten Lymphknoten angegeben wird (Interdisziplinäre S3-Leitlinie des Prostatakarzinoms 2011).

Molekularpathologische Untersuchungen konnten sich bislang in der klinischen Routine noch nicht durchsetzen (Rübben 2009) (vergleiche hierzu 1.6).

Für die Prognose des Prostatakarzinoms sind insbesondere der Gleason-Score, die TNM-Klassifikation nach der UICC sowie der Resektionsstatus ausschlaggebend. (Interdisziplinäre S3-Leitlinie des Prostatakarzinoms 2011).

1.5 Therapie des Prostatakarzinoms:

Das Therapieverfahren der ersten Wahl für Patienten mit einem lokal begrenzten Prostatakarzinom aller Risikogruppen ist die radikale Prostatektomie (Interdisziplinäre S3-Leitlinie des Prostatakarzinoms 2011). Die radikale Prostatektomie erlaubt die höchste lokale Tumorkontrolle, ermöglicht ein exaktes Staging durch den Pathologen und bietet dem Patienten den psychologischen Vorteil zu wissen, dass der Tumor entfernt wurde. Ein weiterer Vorteil gegenüber der Radiotherapie ist, dass weitere Therapien im Falle eines Tumorrezidivs besser ansprechen (Treiber und Zaak 2008). Als Nachteil der radikalen Prostatektomie sind jedoch perioperative Komplikationen, wie größere Blutungen, Rektumverletzungen, tiefe Venenthrombosen und Lungenarterienembolien zu nennen. Als mögliche späte Komplikationen sind Lymphozellenbildung, Anastomosenstenose, Urinleckage und/oder -fistel, Harnleiterobstruktion, Harnröhrenstriktur, Harninkontinenz und erektile Dysfunktion zu berücksichtigen. Je nach Autor und Operationsverfahren wird die Rate für eine Harninkontinenz bei 5-22% und für eine erektile Dysfunktion bei 7-66% angegeben (Rübben 2009).

Um eine chirurgische Übertherapie mit dem Risiko der oben genannten Komplikationen eines klinisch insignifikanten Tumors zu verhindern, besteht die Möglichkeit eines abwartenden Procedere, wobei zwei unterschiedliche Vorgehensweisen zu differenzieren sind:

Bei der sog. *Active Surveillance Strategie* wird die rechtzeitige kurative Behandlung des Karzinoms bis zu einem späteren Zeitpunkt aufgeschoben, an dem sich entweder die Tumorbilologie oder der Patientenwillen ändert. Für *Active Surveillance* sind Patienten mit einem PSA-Wert <10 ng/ml, einem Gleason-Score ≤ 6 , einem cT1c- oder cT2a-Stadium, Tumornachweis in ≤ 2 Stanzen und einem Tumoranteil von $\leq 50\%$ pro Stanze geeignet. Zur Kontrolle werden in den ersten drei Jahren alle drei Monate PSA-Wert-Bestimmungen und digitale rektale Untersuchungen durchgeführt. Bei gleichbleibendem PSA-Wert kann anschließend auf sechsmonatige PSA-Wert-Kontrollen umgestellt werden. Biopsien sollten in den ersten drei Jahren alle 12-18 Monate entnommen werden. Bei unverändertem bioptischem Befund sollten anschließend in dreijährigen Intervallen Stanzbiopsien entnommen werden. Es wird empfohlen, die Strategie der *Active Surveillance* aufzugeben, wenn sich die PSA-Verdoppelungszeit auf weniger als drei Jahre verkürzt, der Gleason-Score höher als sechs wird, der Tumor in mehr als zwei Biopsiestanzen nachweisbar ist oder ein Tumoranteil von $>50\%$ in einer Stanze nachgewiesen ist.

Bei der sog. *Watchful Waiting Strategie* wird der Patient erst bei einer symptomatischen Progression palliativ behandelt. *Watchful Waiting* kann bei einem Patienten mit einer wahrscheinlichen Lebenserwartung von <10 Jahren, einem cT1-4 Karzinom, einem Gleason-Score ≤ 7 und einem beliebigen PSA-Wert in Betracht gezogen werden, da hier die Chance sehr hoch ist, dass der Patient an einer anderen Erkrankung verstirbt, bevor das Prostatakarzinom zum Tode des Patienten führen würde (Interdisziplinäre S3-Leitlinie des Prostatakarzinoms 2011).

Als weitere primäre Therapieoption besteht beim lokal begrenzten Prostatakarzinom mit mittlerem bis hohem Risikoprofil sowie auch beim lokal fortgeschrittenen Karzinom die Möglichkeit einer perkutanen Strahlentherapie auf Grundlage eines dreidimensionalen Bestrahlungsplans. Durch die dreidimensionale Planung der

Radiatio ist es möglich höhere Bestrahlungsdosen zur besseren Tumorkontrolle zu applizieren. Je höher allerdings die Strahlendosis gewählt wird, desto höher ist auch das Risiko einer strahlenbedingten Toxizität. Ob zusätzlich zur Bestrahlung der Prostata auch eine Bestrahlung der pelvinen Lymphabflusswege sinnvoll sein kann ist momentan nicht abschließend geklärt. Bei einem primär mit Radiatio behandelten, lokal fortgeschrittenen Prostatakarzinom wird momentan zusätzlich eine antihormonelle Therapie empfohlen. Diese antihormonelle Therapie sollte über einen Zeitraum von zwei, besser drei Jahren erfolgen, wovon bis zu sechs Monate neoadjuvant durchgeführt werden können (Interdisziplinäre S3-Leitlinie des Prostatakarzinoms 2011).

Bei einem Patienten mit einem R1 resezierten pT2 oder pT3a Prostatakarzinom oder einem R0 resezierten pT3b Prostatakarzinom kann eine adjuvante Radiotherapie durchgeführt werden. Alternativ kann diese Strahlentherapie aber auch erst bei einem postoperativen PSA-Anstieg eingeleitet werden (Interdisziplinäre S3-Leitlinie des Prostatakarzinoms 2011).

Eine HDR-Brachytherapie kann bei Patienten mit einem lokal begrenzten Prostatakarzinom mit mittlerem bis hohem Risiko in Kombination mit einer perkutanen Strahlentherapie als primäre Therapie durchgeführt werden. Eine LDR-Brachytherapie sollte nur bei Prostatakarzinompatienten mit einem lokal begrenzten Karzinom mit niedrigem Risikoprofil als Primärtherapie in Betracht gezogen werden. Bei lokal fortgeschrittenem cT3-Karzinom besteht mit der HDR-Brachytherapie eine weitere Therapieoption. Bei einem cT4-Stadium ist eine HDR-Brachytherapie jedoch nicht indiziert. Ob zu einer Brachytherapie zusätzlich eine hormonablative Therapie sinnvoll ist, ist derzeit noch unklar (Interdisziplinäre S3-Leitlinie des Prostatakarzinoms 2011).

Eine Lymphadenektomie der pelvinen Lymphknoten scheint sich positiv auf das progressionsfreie Überleben auszuwirken, wobei die Ausdehnung des Lymphknotendissektionsgebietes sowie eine kategorische Empfehlung zur Indikation einer Lymphadenektomie momentan noch nicht abschließend geklärt sind. Als mögliche Komplikationen können sich nämlich Lymphozelen, Thrombosen und Lymphödeme ergeben, so dass es momentan die Empfehlung gibt, bei einem

Prostatakarzinom mit niedrigem Risiko (cT1c und PSA <10 und Gleason-Score ≤6) auf eine Lymphadenektomie zu verzichten. Allerdings ist die pelvine Lymphadenektomie die Grundlage für die Entscheidung über eine adjuvante Therapie. Bei histologischem Nachweis von Lymphknotenmetastasen sollten diese chirurgisch entfernt werden, bestrahlt werden oder mit einer hormonablativen Therapie behandelt werden. Falls sich der Patient für eine Strahlentherapie der Lymphknotenmetastasen entscheidet, wird empfohlen, zusätzlich eine hormonablative Therapie für zwei bis drei Jahre durchzuführen. Falls eine Lymphadenektomie durchgeführt wird, sollten mindestens 10 Lymphknoten chirurgisch entfernt werden (Rübben 2009, Interdisziplinäre S3-Leitlinie des Prostatakarzinoms 2011).

Eine antihormonelle Therapie wird weder als Primärtherapie noch als adjuvante Therapie des lokal begrenzten Prostatakarzinoms von geringem oder mittlerem Risikoprofil empfohlen. Bei einem hohen Risikoprofil zeigte sich jedoch ein höheres Überleben sowohl bei einer sechsmonatigen neoadjuvanten und/oder adjuvanten antihormonellen Therapie, als auch bei einer zwei bis drei Jahre durchgeführten antihormonellen Therapie jeweils in Kombination mit einer perkutanen Strahlentherapie. Bei einem metastasierten Prostatakarzinom ist die antihormonelle Therapie als sinnvolle, palliative Therapieoption anzusehen, da sie zu einer Verlängerung des progressionsfreien Überlebens und einer Verbesserung der Lebensqualität führt. Die Verlängerung des Gesamtüberlebens ist in dieser Situation jedoch nicht bewiesen (Interdisziplinäre S3-Leitlinie des Prostatakarzinoms 2011). Eine hormonablative Therapie wird zumeist in Form einer kombinierten Androgenblockade durchgeführt (Rübben 2009).

Alternative Behandlungsansätze wie z. B. die Hyperthermietherapie oder die Kryotherapie werden weder zur Primärtherapie des lokal begrenzten Prostatakarzinoms, noch zur Primärtherapie des lokal fortgeschrittenen Karzinoms empfohlen. Eine HIFU-Therapie (Hochintensiver Fokussierter Ultraschall) zur Primärtherapie des lokal begrenzten Prostatakarzinoms sollte nur im Rahmen von prospektiven Studien erfolgen. Sie ist beim lokal fortgeschrittenen Prostatakarzinom nicht empfohlen (Interdisziplinäre S3-Leitlinie des Prostatakarzinoms 2011).

Beim metastasierten Prostatakarzinom ist nur noch eine palliative Therapie möglich. Hierbei kann eine antihormonelle Therapie, eine Chemotherapie, eine lokale Radiatio, ggf. mit zusätzlicher chirurgischer Intervention bei spinaler Kompression angewendet werden. Außerdem kann die Gabe von Bisphosphonat und von Denosunab sowie die Applikation von Radionukleotiden erwogen werden. Darüberhinaus sollte eine Schmerztherapie nach dem „WHO-Schema zur Schmerztherapie“ erfolgen, eine angemessene physikalische Therapie (z. B. Lagerung, Lymphdrainage oder aktivierende Pflege) durchgeführt werden und dem Patienten eine psychoonkologische Begleitung angeboten werden (Interdisziplinäre S3-Leitlinie des Prostatakarzinoms 2011).

1.6 Molekularpathologische Veränderungen des Prostatakarzinoms:

1.6.1 Einleitung Molekularpathologie:

Aufgrund der Gefahr der Übertherapie des Prostatakarzinoms gibt es vielfältige Bestrebungen einen Biomarker zu identifizieren. Als Übertherapie ist die Behandlung eines Patienten, der während seines Lebens keine Symptome entwickelt hätte, anzusehen. Durch einen Biomarker sollte entweder die Diagnosestellung eines Prostatakarzinoms und/oder eine Prognoseaussage möglich sein. Hier sind in den letzten Jahren zunehmend molekularpathologische Marker in das Zentrum der Aufmerksamkeit gerückt (Killick et al. 2012). So wurden im Bereich der Molekularpathologie in den letzten Jahren in über 10000 Studien eine Vielzahl von molekularpathologischen Markern für das Prostatakarzinom entdeckt (Rübben 2009).

1.6.2 Androgenrezeptor:

Insbesondere der Androgenrezeptor nimmt in der Biologie des Prostatakarzinoms eine zentrale Rolle ein, obwohl nicht in allen Prostatakarzinomen Mutationen beobachtet werden können (Böcker et al. 2008). Der Androgenrezeptor ist ein Androgen-regulierter Transkriptionsfaktor, welcher andere Gene je nach Androgenbindung aktivieren oder deaktivieren kann. Er gehört zur Unterfamilie 3C der nukleären

Rezeptor-Superfamilie und besteht aus einer N-terminalen Domäne, einer DNA-bindenden Domäne, einer Gelenkregion sowie einer ligandbindenden Domäne (Gong et al. 2012, Lu et al. 2006). In Abwesenheit von Androgenen ist der Rezeptor im Zytoplasma lokalisiert. Sobald Androgene an den Rezeptor gebunden sind transloziert sich der Rezeptor in den Zellkern und aktiviert dort weitere Gene. Er reguliert ebenso Genexpressionsmuster durch direkte Protein-Protein-Interaktionen, hauptsächlich mit anderen Transkriptionsfaktoren (Gong et al. 2012, Lu et al. 2006). Der Androgensignalweg ist in allen Stadien der Prostatakarzinomentstehung, des Fortschreitens des Prostatakarzinoms sowie auch an der Entwicklung einer Resistenz gegenüber einer antihormonellen Therapie beteiligt. Initial ist das Prostatakarzinom ein androgenabhängiger Tumor. Diese Androgenabhängigkeit kann jedoch im Laufe einer antihormonellen Therapie verloren gehen, so dass diese Therapie ihre Wirksamkeit verliert (Gong et al. 2012). Dieser Verlust der Androgenabhängigkeit ist durch eine gesteigerte Expression des Androgenrezeptors zu erklären, welche durch eine Amplifikation des Androgenrezeptorgens entsteht (Urbanucci et al. 2012). Außerdem spielen, wie oben bereits erwähnt, Mutationen des Androgenrezeptors eine Rolle (Lu et al. 2006).

1.6.3 TMPRSS2-ERG-Gen:

Bei TMPRSS2-ERG handelt es sich um eine Abkürzung, die für *Transmembrane Protease Serin 2* und *ETS-Related-Gene* steht. Das androgenregulierte TMPRSS2-ERG-Gen wurde erstmals 2005 von Tomlins als eine für das Prostatakarzinom spezifische Mutation beschrieben (Tomlins et al. 2005). Es handelt sich hierbei um ein androgenabhängiges Fusionsonkogen, welches durch eine genetische Reorganisation, die das 3' Ende des ERG-Gens (21q22.3) mit dem 5' Ende des TMPRSS2-Gens (21q22.2) verbindet, entsteht. Sowohl das TMPRSS2-, als auch das ERG-Gen sind beide auf Chromosom 21 lokalisiert. Die genetische Reorganisation, die zur Entstehung des TMPRSS2-ERG-Fusionsonkogens führt, kann entweder durch eine Translokation oder durch eine Deletion auf Chromosom 21 entstehen (Mertz et al. 2007, Perner et al. 2006, Perner et al. 2007 a, Tomlins et al. 2005). Das TMPRSS2-Gen codiert für eine Serinprotease und wird sowohl in normalem Prostataparenchym, als auch in

Prostatakarzinomen unter Androgenkontrolle von epithelialen Zellen exprimiert. Das ERG-Gen gehört zur ETS-Onkogenfamilie und wirkt als ein Transkriptionsfaktor, der je nach Phosphorylierungsstatus die Transkription inhibieren oder aktivieren kann (Killick et al. 2012). Durch die Fusion des TMPRSS2-Gens mit dem ERG-Gen zu einem sog. Fusionsonkogen gelangt dieses TMPRSS2-ERG-Fusionsonkogen unter die Kontrolle des Androgenrezeptors und führt auf Proteinebene zu einer Überexpression der ETS-Transkriptionsfaktoren (Gopalan et al. 2009, Mertz et al. 2007, Perner et al. 2006, Perner et al. 2007 a, Tomlins et al. 2005). In der Literatur sind Häufigkeiten der TMPRSS2-ERG-Genfusion in Europa und Nord-Amerika zwischen ca. 50% (Killick et al. 2012) bis 79% (Tomlins et al. 2005) beschrieben. Mitunter haben sich aber auch niedrigere Mutationswerte nachweisen lassen, z. B. 42 % bei Gopalan et al. 2009, 35,5% bei FitzGerald et al. 2008 oder 20,9% bei Lee et al. 2010. Die Mutation weist eine relativ hohe Spezifität für das Prostatakarzinom auf, ihre Einsatzmöglichkeit als ein Biomarker für das Prostatakarzinom wird jedoch durch ihre relativ niedrige Sensitivität begrenzt (Rübber 2009). Die Mutation lässt sich nämlich außer im Prostatakarzinom auch in der high-grade intraprostatistischen Neoplasie nachweisen (Sreenath et al. 2011). Sie ist aber im Prostatakarzinom deutlich häufiger zu finden, als in der high-grade intraprostatistischen Neoplasie (Darnel et al. 2009). Darüber hinaus wurde die Genmutation auch in Prostatahyperplasie- und vereinzelt sogar in an Prostatakarzinomen angrenzendem normalem Prostatagewebe nachgewiesen (FitzGerald et al. 2008). Weiterhin wird die Einsatzmöglichkeit dieser Mutation als molekularpathologischer Marker dadurch eingeschränkt, dass der TMPRSS2-ERG-Mutationsstatus in verschiedenen Karzinomherden in ein und derselben Prostata unterschiedlich ausfallen kann (Barry et al. 2007, Clark et al. 2007, Mehra et al. 2007). Als positiver Aspekt ist zu berücksichtigen, dass die Mutation auch in Urinproben nach digital rektaler Untersuchung bestimmt werden kann und somit potentiell als ein nicht invasiver Biomarker genutzt werden könnte (Demichelis und Rubin 2008, Sreenath et al. 2011). Außerdem gibt es auch Überlegungen, dass es zukünftig möglich sein könnte, dass Prostatakarzinome, die eine TMPRSS2-ERG-Genfusion aufweisen, mit ERG-Inhibitoren behandelt werden könnten. Hierzu wurden bereits Studien durchgeführt, die in vitro eine Wachstumshemmung von Prostatakarzinomzellen durch ERG-Inhibitoren gezeigt haben (Sreenath et al. 2011).

1.6.4 Rac:

Bei Rac handelt es sich um eine GTPase aus der Familie der Rho-GTPasen (Ridley et al. 2006). Diese sind kleine GTP-bindende Proteine (Lian et al. 2000). Rho-GTPasen finden sich in allen eukaryoten Zellen und regulieren die Zellpolarität und Zellmotilität über die Beeinflussung des Zytoskeletts, des Membrantransports sowie der Zelladhäsion. Beim Menschen sind 22 verschiedene Rho-GTPasen bekannt (Ridley 2006). Die Isoform Rac spielt eine spezifische Rolle bei der Aktivierung der phagozytischen NADPH-Oxidase (Lian et al. 2000). Rho-GTPasen werden durch sogenannte *guanine nucleotide dissociation stimulators*, welche auch als *guanine nucleotide exchange factors* bezeichnet werden, aktiviert (z. B. Tiam1, siehe 1.6.5). Eine Inaktivierung der Rho-GTPasen erfolgt durch die Hydrolyse von gebundenem GTP (Michiels et al. 1997).

Bislang sind drei verschiedene Rac-Proteine bekannt (Engers et al. 2007):

Rac 1 kommt ubiquitär vor und stellt einen wichtigen Regulator des Zytoskeletts dar, wodurch der Zellzyklus (Olson et al. 1995), die Zelladhäsion (Hordijk et al. 1997), die Zellmigration (Keely et al. 1997), die Zellinvasion (Hordijk et al. 1997) und das Metastasierungsverhalten (Shan et al. 2005) beeinflusst werden. Außerdem spielt Rac1 eine wichtige Rolle bei der onkogenen Transformation von Zellen (Qiu et al. 1995). Es konnte gezeigt werden, dass Mäuse, die einen Mangel des Rac-spezifischen Aktivators Tiam1 aufweisen, resistent gegen die Entwicklung von Ras-induzierten Hauttumoren sind (Malliri et al. 2002). Rac 1 Knockouttiere dagegen überleben nicht die Embryogenese (Sugihara et al. 1998). Beim Ganglioblastom und beim Mammakarzinom spielt Rac 1 eine Rolle bei der Zellwanderung und der Zellinvasion (Chan et al. 2005).

Rac 2 wird spezifisch in Zellen der Hämatopoese exprimiert (Didsburg et al. 1989). Mäuse, die einen genetisch bedingten Mangel von Rac 2 aufweisen, leiden unter Defekten der zellulären Funktionen verschiedener hämatopoetischer Zellen (Crocker et al. 2002).

Rac 3 wird am stärksten im Gehirn exprimiert, es kommt aber auch in anderen Organen, wie z. B. der Prostata, der Plazenta, der Niere, dem Pankreas und dem Herz

vor (Haataja et al. 1997). Rac 3 Knockouttiere zeigen keine offensichtlichen Entwicklungsstörungen (Corbetta et al. 2005). Im Mammakarzinom ist Rac 3 hyperaktiv (Mira et al. 2000).

Im Bezug auf die Prostata konnte gezeigt werden, dass die Rac-Expression in high-grade prostaticen intraepithelialen Neoplasie-Läsionen sowie in Prostatakarzinomen deutlich gesteigert ist, wobei diese Steigerung insbesondere durch die Isoform Rac 3 zu erklären ist. Die Höhe der Rac-Überexpression in Bezug zum gutartigen Epithel hat sich als ein unabhängiger Prognosefaktor für das krankheitsfreie Überleben von Prostatakarzinompatienten erwiesen (Engers et al. 2007).

1.6.5 Tiam1:

Tiam1 steht für *T-cell lymphoma invasion and metastasis-inducing protein 1* und wurde erstmals in Zellen eines T-Zell-Lymphoms beschrieben. Es handelt sich hierbei um einen Rac-spezifischen Aktivator, einen sog. *guanine nucleotide dissociation stimulator* oder auch *guanine nucleotide exchange factor* (siehe 1.6.4) (Michiels et al. 1997). Tiam1 wurde bislang in menschlichen Kolon- sowie Nierenzellkarzinomzellen beschrieben, bei denen es die transkriptionelle Hochregulation des sogenannten *tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1* induziert, sowie die post-transkriptionelle Hochregulierung von TIMP-2 bewirkt (Engers et al. 2006 a). Tiam1 wird in nahezu allen Prostatakarzinomen und high-grade prostaticen intraepithelialen Neoplasien im Vergleich zum Normalgewebe signifikant überexprimiert und stellt einen unabhängigen Prognosefaktor für das krankheitsfreie Überleben für Patienten mit einem Prostatakarzinom dar (Engers et al. 2006 b).

1.6.6 AXL und Gas6:

AXL ist ein Tyrosin-Kinase-Rezeptor, der nach dem griechischen Wort anexelekto, benannt ist, was soviel wie „unkontrolliert“ bedeutet (Shiozawa et al. 2010).

Gas6 ist der Ligand des Rezeptors AXL (Shiozawa et al. 2010).

Gas6 (*Growth arrest-specific 6*) wurde ursprünglich als ein wachstumsstop-spezifisches Gen isoliert, dessen Expression in der G0-G1-Phase des Zellzyklus hochreguliert ist (Sainaghi et al. 2005).

Für die Aktivierung und die Fähigkeit von Gas6 an AXL zu binden wird Vitamin K benötigt (Sainaghi et al. 2005). Die Bindung des Liganden Gas6 an den Rezeptor AXL führt zur Rezeptordimerisation, einer Autophosphorylierung und somit zur Aktivierung von AXL. Die Aktivierung von AXL hat *in vitro* einen anti-apoptotischen Effekt und spielt sowohl bei der Zelladhäsion, als auch bei der interzellulären Signalübertragung eine wichtige Rolle (Sainaghi et al. 2005).

Das Expressionslevel von AXL wird über seinen Liganden Gas6 negativ reguliert. Diese Herunterregulation von AXL durch Gas 6 wird jedoch in einer hypoxischen Umgebung, wie z. B. bei Knochenmetastasen unterdrückt (Mishra et al. 2012).

AXL wird in vielen verschiedenen normalen Zellen ubiquitär exprimiert, wie z. B. in hämatopoetischen Zellen, in Endothelzellen und in mesenchymalen Zellen. Eine Überexpression findet sich in vielen malignen Zellen, wie z. B. in myeloischen Leukämiezellen, in Kolonkarzinomzellen, in Melanomzellen, in Mammakarzinomzellen und in Schilddrüsenkarzinomzellen (Sainaghi et al. 2005). Das Expressionsniveau des AXL-Rezeptors ist beim Mammakarzinom, dem Pankreaskarzinom, dem Glioblastom, dem hepatozellulären Karzinom sowie dem Nierenzellkarzinom direkt proportional zum Tumorgrading und ein schlechter Prädiktor für das Gesamtüberleben der Patienten (Mishra et al. 2012).

AXL mRNA wurde sowohl in normalem Prostatazellen, als auch in neoplastischem Prostatagewebe nachgewiesen, wobei sich bei Prostatakarzinomzellen eine deutliche Überexpression nachweisen ließ (Sainaghi et al. 2005).

Es finden sich sowohl Studien die eine Hemmung der Zellproliferation (Shiozawa 2010), als auch Studien, die eine Stimulation der Zellproliferation von Prostatakarzinomzellen beschreiben (Sainaghi et al. 2005):

Shiozawa beschreibt bei Prostatakarzinomzellen *in vitro* eine Hemmung der Zellproliferation und eine Induktion der Zellruhe. Diese Induktion der Zellruhe ermöglicht es vereinzelt Tumorzellen, die sich vom Haupttumor abgetrennt haben, über eine längere Zeit im Knochenmark zu überleben und dort zu einem späteren Zeitpunkt Knochenmetastasen zu bilden (Shiozawa et al. 2010).

Sainaghi dagegen berichtet über eine *in vitro* beobachtete Stimulation der Proliferation von Prostatakarzinomzellen durch Gas6, wobei das Ausmaß der Proliferation streng mit der Expression des AXL-Rezeptors korrelierte (Sainaghi et al. 2005).

1.6.7 Her2-neu:

Das Her2-neu-Onkogen kodiert für einen transmembranären Tyrosinkinase-Rezeptor, welcher eine starke Homologie mit dem epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptor (EGFR) aufweist. Beim Mammakarzinom wird der Her2-Rezeptor bereits routinemäßig als ein molekularpathologischer Prognosefaktor sowie als ein prädiktiver Faktor für das Ansprechen auf eine Trastuzumab-Therapie (= Herceptin) angewendet (Ross et al. 2003). Ein Teil der Prostatakarzinome exprimiert Her2-neu. Am häufigsten zeigt sich ein Allelverlust am Chromosom 8p, wo scheinbar ein Tumorsuppressorgen lokalisiert ist (Böcker et al. 2008). Neuere Studien haben jedoch nur sehr geringe Werte einer Her2-Expression bzw. einer Her2-Amplifikation beim Prostatakarzinom ergeben. Es fanden sich Expressionswerte zwischen 1,5-8 % und Amplifikationswerte von 0-2 % (Baek et al. 2012, Ramieri et al. 2010).

1.6.8 Andere Tumorsuppressorgene:

Andere Tumorsuppressorgene wie TP53 und Rb1 werden nur in höheren Stadien und auch dann nur bei ca. 25% der Fälle beobachtet (Böcker et al. 2008).

1.6.9 Resümee Molekularpathologie:

Bislang konnten sich molekularpathologische Marker wegen zu geringen Stichprobengrößen, fehlendem Follow-up, nicht standardisierten Versuchsprotokollen, subjektiven Auswahlkriterien sowie der hohen Wahrscheinlichkeit, dass viele wichtige Prozesse in der Tumorbiologie des Prostatakarzinoms noch nicht vollständig entschlüsselt sind, in der klinischen Routine für die Prognosebeurteilung des Prostatakarzinoms noch nicht durchsetzen (Rübben 2009).

1.7 Zielsetzung der Arbeit:

Bei der nun vorliegenden Arbeit soll das von Herrn Professor Engers bereits etablierte, gut charakterisierte, repräsentative Kollektiv von Prostatektomiepräparaten aus dem Routineeingang des Instituts für Pathologie am Universitätsklinikum Düsseldorf mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) auf das Vorliegen einer TMPRSS2-ERG Genfusion und deren prognostische Relevanz untersucht werden.

Im Rahmen dieser Untersuchung soll auch geklärt werden, ob es sich dabei um eine Genfusion auf dem Boden einer Deletion oder einer Translokation handelt.

Insbesondere soll geklärt werden, ob das Vorliegen oder Fehlen einer TMPRSS2-ERG Genfusion eine prognostische Aussage für das Prostatakarzinom erlaubt und ob der Fusionsstatus mit verschiedenen klinischen, histopathologischen und molekularpathologischen Charakteristika korreliert.

Das bislang vorliegende Kollektiv soll außerdem um weitere Prostatektomiefälle aus dem Routineeingang des Instituts für Pathologie am Universitätsklinikum Düsseldorf erweitert werden, um die Aussagekraft der Untersuchung zu erhöhen.

2 Material und Methoden:

2.1 Patientenkollektiv und Patientencharakteristika:

Insgesamt wurden in der hier vorliegenden Arbeit 142 radikale Prostatektomiepräparate von Prostatakarzinompatienten im Zeitraum von 2007 bis 2010 untersucht.

Es wurden 142 Prostatakarzinomproben mittels der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung analysiert. Bei allen untersuchten Präparaten handelt es sich um radikale Prostatektomiepräparate aus dem Routineeingang des Instituts für Pathologie am Universitätsklinikum Düsseldorf aus den Jahren 1995 bis 2007 welche in der Klinik für Urologie am Universitätsklinikum Düsseldorf operiert wurden. Klinische Daten standen für alle 142 Patienten zur Verfügung.

Bei allen Präparaten ist im Rahmen der im Institut für Pathologie am Universitätsklinikum Düsseldorf durchgeführten histopathologischen Untersuchung ein azinäres Adenokarzinom der Prostata diagnostiziert worden, bei dem jeweils der Gleason-Score bestimmt wurde. Außerdem wurde jeweils eine Kurzklassifikation nach der UICC angefertigt mit Bestimmung des pT-Stadiums, des pN-Stadiums sowie des R-Status (vergl. Wittekind und Meyer 2010). Darüber hinaus wurden die Präparate jeweils auf das Vorliegen einer Blut- und/oder Lymphgefäßinfiltration sowie einer Perineuralscheideninfiltration untersucht.

Durch Konsultation der elektronischen Krankenakte (sog. „Medico-System“) des Universitätsklinikums Düsseldorf wurde -soweit verfügbar- außerdem bestimmt, ob hämatogene Fernmetastasen vorlagen, ob es zu einem Tumorrezidiv gekommen war (unter Berücksichtigung des Rezidivzeitpunkts) und wie hoch der prätherapeutische PSA-Wert war (in ng/ml).

Das Alter der Prostatakarzinompatienten zum Zeitpunkt der Operation betrug im Median 65 Jahre.

2.2 Ethikvotum:

Ein positives **Ethikvotum** der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf liegt unter der **Studiennummer 4130** vom 25.01.2013 vor.

2.3 Mikroskopieren der Prostatakarzinomfälle:

Zuerst wurden alle 142 zu untersuchenden Prostatakarzinomfälle vollständig mikroskopiert und für die FISH-Untersuchung geeignete Schnittpräparate identifiziert. Auf diesen geeigneten Schnittpräparaten wurden jeweils zwei Karzinomareale, sowie zwei Areale normalen Prostatakarzinomgewebes mit zwei verschiedenfarbigen Filzstiften zirkulär markiert (blau = Tumor und grün = Normalgewebe). Das Normalgewebe diente später bei der FISH-Untersuchung jeweils als Negativkontrolle, um die Eignung des jeweiligen Gewebeblocks für die Untersuchung zu bestätigen. Die histopathologische Eignung der Areale wurde jeweils von Herrn Professor Dr. Engers validiert.

2.4 Anfertigung der Tissue Micro Array Schnittpräparate:

Herstellung der Tissue Micro Array Blöcke:

Aus den Paraffinblöcken dieser Prostatakarzinomfälle wurden jeweils die auf den histologischen Schnittpräparaten markierten Areale mittels 0,2 cm breiter Gewebestangen herausgestanzt und in einen leeren Paraffinblock eingebracht. Die so entstandenen Paraffinblöcke werden als *Tissue Micro Array Blöcke* (sog. TMA-Blöcke) bezeichnet. Diese TMA-Blöcke bieten den Vorteil gegenüber den aus der Routine des Instituts stammenden Paraffinblöcken, dass die einzelnen Gewebeproben über ihre Position im TMA-Block eindeutig als Tumorgewebe bzw. Normalgewebe zu identifizieren sind und dass mehrere Patientenproben pro TMA-Block untersucht werden können. Bei den für die hier vorliegende Promotionsarbeit angefertigten TMA-Blöcken wurden jeweils zwei Tumorproben und zwei Proben normalen Prostataparenchyms pro Patient eingebracht. So wurden pro TMA-Block sieben Patienten untersucht.

Anfertigung von Paraffinschnitten der TMA-Blöcke:

Mittels eines Mikrotoms wurden von den TMA-Blöcken histologische Schnittpräparate angefertigt, welche auf Objektträger aufgezogen wurden.

Trocknen und Backen der Tissue Micro Array Schnitte:

Die TMA-Schnitte wurden bei 37°C für 1-2 h getrocknet und danach bei 55°C über Nacht gebacken.

2.5 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung:

2.5.1 Prinzip der Untersuchung:

Bei der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (= FISH) handelt es sich um eine schon seit ca. 20 Jahren bekannte, jedoch stetig weiterentwickelte molekularbiologische Methode zur Untersuchung der Genexpression und -aberration auf DNA- oder RNA-Ebene. Bei der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung auf DNA-Ebene wird mit sog. DNA-Sonden gearbeitet. Hierbei handelt es sich um kurze, mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierte, komplementäre DNA-Abschnitte, welche sich an der zu untersuchenden DNA nach Denaturierung des DNA-Doppelstrangs anlagern (=Hybridisierung). Nach weiteren Waschschrritten können die Fluoreszenzsignale, der an der zu untersuchenden DNA gebundenen DNA-Sonden mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops betrachtet werden (Levsky und Singer 2003).

Bei der für die Untersuchung der TMPRSS2-ERG-Genfusion eingesetzten FISH-Untersuchung handelt es sich um ein sog. *Dual-color-FISH-break-apart-assay*. Das bedeutet, dass insgesamt zwei DNA-Sonden zum Einsatz kommen, welche jeweils mit einem unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoff markiert sind, so dass die zu untersuchende Probe je nach Mutationsstatus Fluoreszenzsignale in unterschiedlicher Lage aufweist (Perner et al. 2007 a, Mertz et al. 2007).

Das androgenregulierte TMPRSS2-Gen, sowie das ERG-Gen aus der Gruppe der ETS-Transkriptionsfaktoren sind beide auf Chromosom 21 lokalisiert. Durch eine genetische Reorganisation, die das 3' Ende des ERG-Gens (21q22.3) mit dem 5' Ende des

TMPRSS2-Gens (21q22.2) verbindet, entsteht ein androgenabhängiges Fusionsoncogen, welches auf Proteinebene zu einer Überexpression der ETS-Transkriptionsfaktoren führt. Dieses Fusionsoncogen kann auf zwei Wegen entstehen und zwar einmal durch eine Translokation oder alternativ durch eine Deletion. Das *Dual-color-FISH-break-apart-assay* besitzt den Vorteil, dass es nicht nur das Vorliegen einer Genfusion diagnostizieren kann, sondern auch noch bestimmen kann, ob diese Genfusion durch eine Translokation oder eine Deletion entstanden ist (Mertz et al. 2007, Mosquera et al. 2007, Perner et al. 2006, Perner et al. 2007 a, Tomlins et al. 2005).

Indem nun die beiden verwendeten DNA-Sonden vor bzw. hinter dem ERG-Gen (sog. *ERG break-apart-assay*) oder alternativ vor und hinter dem TMPRSS2-Gen (sog. *TMPRSS2 break-apart-assay*) lokalisiert werden (rot markierte Sonde vor und grün markierte Sonde hinter dem zu untersuchenden Gen) (vergl. Abb. 2.4). Im Rahmen der Arbeit wurde das *ERG break-apart-assay* durchgeführt, bei welchem sich drei verschiedene fluoreszenzmikroskopische Befundmöglichkeiten ergeben: Bei einem Prostatakarzinom ohne eine TMPRSS2-ERG-Fusion zeigt sich ein grünes Fluoreszenzsignal, welches dicht bei einem roten Fluoreszenzsignal gelegen ist und evtl. zu einem einzelnen gelben Mischsignal verschmolzen ist. Pro Zelle finden sich diese Signale jeweils zweimal. Bei einem Prostatakarzinom mit einer TMPRSS2-ERG-Fusion auf Grund einer Translokation findet sich neben einem dicht beieinander gelegenen rot-grünen Signalpaar ein weiter von einander entferntes rotes und grünes Signalpaar. Bei einem Prostatakarzinom mit einer TMPRSS2-ERG-Fusion auf Grund einer Deletion findet sich neben einem dicht beieinander gelegenen rot-grünen Signalpaar ein einzelnes rotes Signal, da das grüne Signale durch die Deletion verloren gegangen ist (Mertz et al. 2007, Mosquera et al. 2007, Perner et al. 2006, Perner et al. 2007 a, Tomlins et al. 2005).

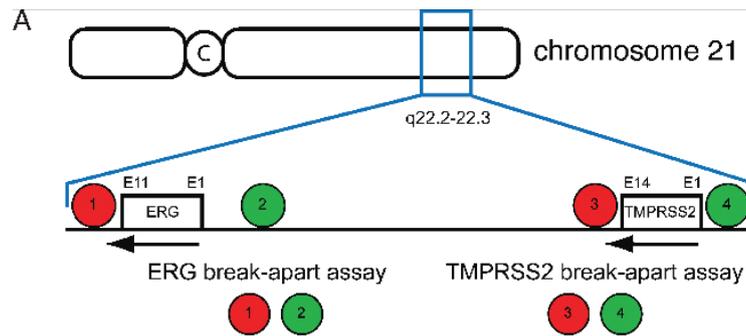


Abb. 2.4.

Nachweis der TMPRSS2–ERG-Fusion durch ein „*dual-color TMPRSS2 and ERG break-apart-FISH-assay*“. Die Anordnung der Gene ist auf dem Chromosom angezeigt. Für beide *assays* ist die relative Anordnung der verschieden markierten telomeren- und zentromeren-DNA-Sonden durch die grünen und roten Kreise dargestellt (aus Mertz, K. D. (2007) *Neoplasia*. 2007 9(3), 200-6).

2.5.2 Benötigte Reagenzien:

BAC-Klone:

	BAC-Klon	Wofür	Bezeichnung
1	RP11-24A11	5' von ERG	RPCIB753A1124Q
2	RP11-372O17	3' von ERG	RPCIB753O17372Q
3	RP11-662D5	5' von TMPRSS2	RPCIB753DO5662Q
4	RP11-260O11	3' von TMPRSS2	RPCIB753O11260Q

Die BAC-Klone wurden über Herrn Professor Dr. Perner, Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Bonn bezogen.

BioPrime DNA Labeling Kit:

Firma Invitrogen, Katalognummer 18094-011

Bio-SAV:

Firma Vector Laboratories, Katalognummer VC-BA-0500

CAS-Block:

10 ml normal Goat Serum in 100 ml PBS auflösen

Chloramphenicol:

Firma Sigma, Katalognummer C0378-200G

Cot-1 Preparation:

180 µl human Cot-1 DNA (1µg/µl)

60 µl 7,5 M Amonium-Acetat

480 µl 100 %iges Ethanol

Herstellung:

- Gemisch vortexen, bei -80 °C über Nacht lagern
- bei 14000 rpm für 15 min. bei 4 °C zentifugieren
- in umgekehrtem Eppi trocknen
- Pellet in 120 µl Hybridisationspuffer resuspendieren

DAPI-Färbung:

Firma Sigma-Aldrich, Katalognummer 32670

DIG DNA Labeling Mix:

Firma Roche, Katalognummer 11277065910

Digest All III (Pepsin):

Firma Invitrogen, Katalognummer 00-3009

Dextran Sulfate:

Firma Sigma-Aldrich, Katalognummer D8906-50G

FITC-anti-DIG Anti-Digoxigenin-Fluorescein:

Firma Roche, Katalognummer 11207741910

FITC goat anti-rabbit:

Firma Invitrogen, Katalognummer 65-6111

Glykogen:

Firma Roche, Katalognummer 10901393001

Goat Serum Donor Herd:

Firma Sigma-Aldrich, Katalognummer G6767-100ML

Human Cot-1 DNA:

Firma Invitrogen, Katalognummer 15279-011

Hybridisationspuffer:

50 ml 4 x SSC = 10 ml 20 x SSC in 40 ml dH₂O lösen

12,5 ml 4 x SSC + 12,5 ml Formamide + 2,5 g Dextran Sulfat

Herstellung:

- Gemisch für eine Stunde bei Raumtemperatur rühren
- fertigen Puffer bei -20 °C lagern

IlustraMicroSpin S-200 HR Säulen:

Firma Amersham/GE Healthcare, Katalognummer 27-5120-01

Maxi Präp Kit:

Kit bestehend aus:

Buffer P1: Firma Qiagen, Katalognummer 19051

Buffer P2: Firma Qiagen, Katalognummer 19052

Buffer P3: Firma Qiagen, Katalognummer 19053

Rabbit anti-FITC:

Firma Invitrogen, Katalognummer 71-1900

PBS-T (0,025% Tween):

250 µl Tween in 1000 ml PBS lösen

Repli-g-Midi Kit (40 µg/50 µl):

Firma Qiagen, Katalognummer 150045

Repli-g-Mini Kit (10 µg/50 µl):

Firma Qiagen, Katalognummer 150025

594-SAV (streptavidin, AlexaFluor® 594):

Firma Invitrogen, Katalognummer S11227

20 x SSC:

3M NaCl + 0,3M tri-Na-citrat pH 7,0

100 mM Tris-Base + 50mM EDTA pH 7,0:

1 l dH₂O

12,12 g Tris

14,62 g EDTA

NaOH/HCL um den pH bei 7,0 einzustellen

Tween:

Firma Sigma-Aldrich, Produktnummer : P1379, CAS-Nr. : 9005-64-5

Die **allgemeinen Laborreagenzien** wurden von den Firmen Merck und Sigma-Aldrich bezogen.

2.5.3 Herstellung der DNA-Sonden:

2.5.3.1 Herstellung von Agarplatten:

- Lösen von 20 g LB-Agar in 500 ml Wasser
- solange rühren und aufkochen, bis das Agarpulver vollständig aufgelöst ist
- 30 min. autoklavieren
- Flüssigkeit unter umrühren abkühlen lassen (auf ca. 65 °C)
- Antibiotikum (62,5 µl von 100 mg/ml Chloramphenicol) hinzugeben um eine Konzentration von 12,5 µg/ml in 500 ml Agar zu erreichen
- LB-Agar in Agar-Platten ausgießen
- Platten abkühlen lassen, bis der Agar fest ist und Platten umgedreht bei 4 °C lagern

2.5.3.2 Herstellung eines BAC-Stocks:

- 100 µl BAC auf Agar-Platten geben, BAC-Nummern:

	BAC-Klon	Wofür	Bezeichnung
1	RP11-24A11	5' von ERG	RPCIB753A1124Q
2	RP11-372O17	3' von ERG	RPCIB753O17372Q
3	RP11-662D5	5' von TMPRSS2	RPCIB753DO5662Q
4	RP11-260O11	3' von TMPRSS2	RPCIB753O11260Q

- bei 37 °C über Nacht in Brutschrank stellen
- 500 µl Glycerol in 1,5 ml Eppi geben
- 50 ml LB-Medium in Falkontube geben, 50 µl Chloramphenicol hinzugeben
- 1 ml LB-Medium (mit Chloramphenicol) an Flamme auf Agarplatte geben
- mit Schaber Bakterienrasen abschaben, bis milchige Flüssigkeit entsteht
- 500 µl der Flüssigkeit abpipetieren und in vorbereitetes 1,5 ml Eppi zum Glycerol hinzugeben
- BAC-Stocks sofort bei -80 °C einfrieren

2.5.3.3 Extraktion der BAC-DNA:

- einen Krümel aus jedem BAC-Stock abkratzen und in 10 ml LB-Medium (mit Chloramphenicol) geben
- bei 37 °C über Nacht in „*shaking incubator*“ geben
- Gemisch in ein 15 ml Falkontube überführen
- bei 3600 rpm für 15 min. bei 4 °C zentrifugieren
- Überstand abgießen
- Pellet in 2 ml Qiagen Buffer P1 (=Resuspension buffer) des Maxi Präp Kits von Qiagen mit RNase A resuspendieren
- vorsichtig 2 ml Qiagen Buffer P 2 (=Lysis buffer) des Maxi Präp Kits von Qiagen entlang der Falkontubewand hinzugeben
- Falkontube vorsichtig 2 min. lang bei RT hin und her rollen um Zellen zu lysieren
- vorsichtig 2 ml Qiagen Buffer P 3 (=Neutralisation buffer) des Maxi Präp Kits von Qiagen entlang der Falkontubewand hinzugeben
- Falkontube vorsichtig hin und her umdrehen
- 20 min. auf Eis stellen
- Lysat herauszentrifugieren: Bei 4000 rpm für 30 min. bei 4 °C zentrifugieren
- Überstand in ein neues 15 ml Falkontube überführen
- 5 ml Isopropanol hinzugeben dann Falkontube vorsichtig hin und her umdrehen, um DNA zu präzipitieren
- bei 4000 rpm für 20 min. zentrifugieren
- Überstand abgießen
- 10 ml eiskaltes 70 %iges Ethanol hinzugeben
- bei 4000 rpm für 10 min. zentrifugieren
- Ethanol abgießen
- Pellet in umgekehrtem Falkontube für 5 bis 10 min. trocknen
- Pellet in 50 µl sterilem H₂O resuspendieren
- Lagerung der extrahierte BAC-DNA bei -20 °C

2.5.3.4 Messung der BAC-DNA-Konzentration:

- 2 µl der extrahierten BAC-DNA in 98 µl 10mM Tris ph 7,5 geben
- Konzentration der DNA am Photometer messen:

	µg/µl (Konzentration)	260/280 (Reinheit)	E260 (Extinktion)
1	51	0,43	0,020
2	37	0,31	0,015
3	54	0,43	0,021
4	47	0,61	0,019

2.5.3.5 Amplifikation der BAC-DNA mit Hilfe des REPLI-g Mini Kits:

- Buffer D1 vorbereiten: 5 µl *reconstituted Buffer DLB* mit 35 µl nukleasefreiem H₂O mischen
- Buffer N1 vorbereiten: 8 µl *Stop Solution* mit 72 µl nukleasefreiem H₂O mischen
- je 2,5 µl der BAC-DNA in Mikrotube geben
- je 2,5 µl *Buffer D1* zur BAC-DNA hinzugeben, vortexen, kurz abzentrifugieren
- für 3 min. bei Raumtemperatur inkubieren
- je 5 µl *Buffer N1* zur BAC-DNA hinzugeben, vortexen, kurz abzentrifugieren
- REPLI-g Mini DNA Polymerase auf Eis auftauen, vortexen, kurz abzentrifugieren
- REPLI-g Mini *Reaction Buffer* bei RT auftauen, vortexen, kurz abzentrifugieren
- *Mastermix* in unten aufgelisteter Reihenfolge auf Eis vorbereiten:

	für eine Reaktion	für 4+1 Reaktionen
Nukleasefreies H ₂ O	10 µl	50 µl
REPLI-g Mini <i>Reaction Buffer</i>	29 µl	145 µl
REPLI-g Mini DNA Polymerase	1 µl	5 µl
Gesamtvolumen	40 µl	200 µl

- jeweils 40 µl des *Mastermixes* mit 10 µl der BAC-DNA mischen
- jeweils bei 30 °C für 16 h inkubieren
- Inaktivierung der REPLI-g Mini DNA Polymerase durch Erhitzen der Probe auf 65 °C für 3 min
- Lagerung der extrahierten und amplifizierten BAC-DNA bei -20°C

2.5.3.6 Beendigung der Amplifikation der extrahierten BAC-DNA:

- amplifizierte BAC-DNA mit 50 µl H₂O verdünnen um die Präzipitation zu fördern
- Gemisch in jeweils 1,5 ml Eppi überführen
- jeweils 10 µl NaOAc hinzugeben
- jeweils 250 µl 100%iges Ethanol hinzugeben und mischen
- bei -80 °C für 2 h oder bei -20 °C über Nacht lagern
- Pellet auf der höchsten Stufe für 10 min. herunterzentrifugieren
- Überstand abgießen und jeweils 1 ml eiskaltes Ethanol hinzugeben
- erneut jeweils Pellet auf der höchsten Stufe für 10 min. herunterzentrifugieren
- Überstand abgießen und Pellet in umgekehrtem Eppi für 5-10 min. trocknen
- Pellet in 50 µl sterilem ddH₂O resuspendieren
- Gemisch bei 55 °C für 10 min. inkubieren
- dann jeweils bei 4 °C über Nacht lagern

2.5.4 Markierung der DNA-Sonden mit Biotin (rot) und Digoxigenin (grün):

2.5.4.1 Markierungsreaktion:

- 2 µl der extrahierten und amplifizierten BAC-DNA mit 2,5 x „*Random Primers Solution*“ mischen
- Gemisch jeweils 5 min. lang auf 99°C erhitzen
- sofort auf Eis kaltstellen
- zu BAC 1 und 3 je 5 µl Bio-dNTP und zu BAC 2 und 4 je 5 µl Dig-dNTP hinzugeben
- jeweils 1 µl Klenow Fragment hinzugeben
- jeweils 22 µl dH₂O hinzugeben
- vorsichtig mischen
- bei 37°C über Nacht inkubieren

2.5.4.2 DNA Aufreinigung mit der MicroSpin S-200 HR Säule:

- 4 Microspin-Säulen vortexen, so dass das Harz resuspendiert wird
- Deckel eine viertel Drehung öffnen und den unteren Verschluss abbrechen
- Säulen jeweils in ein 1,5 ml Eppi stecken
- Säulen bei 3400 rpm für 1 min. anzentrifugieren
- Säulen in neue 1,5 ml Eppis stecken, Deckel abschrauben und wegwerfen
- jeweils Gemisch der extrahierten, amplifizierten und markierten BAC-DNA vorsichtig in die Mitte der Säule geben
- Säulen bei 3400 rpm für 2 min. zentrifugieren
- die aufgereinigte BAC-DNA wird im Eppi unter der MicroSpin-Säule aufgefangen

2.5.4.3 Ausfällung der BAC-DNA und Vorbereitung der fertigen DNA-Sonden:

- zu der aufgereinigten BAC-DNA 1 µl Glykogen (20 µg/µl) hinzugeben
- 13 µl 7,5 M Amonium acetat hinzugeben
- 500 µl 100 %iges Ethanol hinzugeben
- Gemisch vortexen
- bei 14000 rpm für 15 min. bei 4°C zentrifugieren
- mit 70 %igem Ethanol waschen
- vorsichtig Überstand abpipetieren, um das Ethanol zu entfernen
- Pellet in umgekehrtem Eppi für 5-10 min. trocknen
- 50 µl Hybridisationspuffer hinzugeben
- Lagerung der fertigen, extrahierten, amplifizierten, markierten und aufgereinigten BAC-DNA-Sonden bei -20°C

2.5.5 Durchführung der FISH:

2.5.5.1 Vorbehandlung der Schnitte:

- Xylolbad 2 h bis über Nacht, dann erneut 10 min.
- absteigende Alkoholreihe: 100 %, 95 %, 80 %, 70 % je 2 min.
- lufttrocknen
- in Wasserbad 100mM Tris/50 mM EDTA pH 7,0 bei 92,8 °C für 15 min.
- PBS-Bad
- Schnitte in feuchte Kammer legen
- Digest-All III bei 37 °C für 12 min. auf Schnitte geben und ein Deckgläschen auflegen
- Deckgläschen wieder entfernen
- PBS-Bad
- aufsteigende Alkoholreihe: 70 %, 85 %, 95 %, 100 % je 2 min.
- lufttrocknen

2.5.5.2 Vorbereitung der DNA-Sonden:

TMPRSS2 break apart	ERG break apart
11 µl Hybridisierungspuffer	11 µl Hybridisierungspuffer
3 µl Cot-1	3 µl Cot-1
3 µl DNA-Sonde Biotin = BAC 3	3 µl DNA-Sonde Biotin = BAC 1
3 µl DNA-Sonde Digoxigenin = BAC 4	3 µl DNA-Sonde Digoxigenin = BAC 2

2.5.5.3 Hybridisierung:

- je 20 µl des jeweiligen DNA-Sonden-Gemisches (TMPRSS2 oder ERG break apart) auf den jeweiligen Objektträger geben
- Deckgläschen auflegen
- Deckgläschen mit Fixogum abdichten
- Schnitt in Hybridisierungssofen legen: Programm: 94 °C, 3 min., dann 37 °C über Nacht

2.5.5.4 Post-Hybridisierungswäsche:

- Fixogum und Deckgläschen entfernen
- Schnitte in Wasserbad 0,5 x SSC bei 75 °C für 5 min.

2.5.5.5 Detektion:

- PBS-T-Bad 3 x 2 min.
- CAS-Block-Bad 10 min.
- Schnitte in feuchte Kammer legen
- insgesamt 30 µl FITC-anti-DIG (= Anti Digoxigenin-Fluorescin) und 594-SAV (= Streptavidin, Alexa Fluor) je 1:500 in CAS-Block verdünnt auf Schnitte geben
- Deckgläschen auflegen
- 1 h in feuchter Kammer liegen lassen
- Deckgläschen entfernen
- PBS-T-Bad 3 x 2 min.
- DAPI-Färbung
- Deckgläschen auflegen

2.5.5.6 Auswertung der FISH:

- Auswertung der Schnitte am Fluoreszenzmikroskop
- es ergeben sich drei mögliche Ergebnisse (*ERG break-apart-assay*):
 1. Keine Fusion: Ein gelbes Mischsignal oder ein grünes und ein rotes Signal dicht nebeneinander gelegen.
 2. Fusion durch Translokation: Ein rotes und ein grünes Signal weit auseinander.
 3. Fusion durch Deletion: Nur ein rotes Signal, das grüne Signal ist verloren gegangen.

2.5.5.7 Archivierung der Schnitte:

- Lagerung der Schnitte im Kühlschrank bei 4 °C

2.6 Angewandte statistische Methoden:

Zur Auswertung der erhobenen Parameter wurde das Computerprogramm SPSS Statistics Version 20 benutzt (SPSS GmbH, München).

Es wurde die absolute Anzahl des jeweiligen Ereignisses, der Prozentwert, der Median, der Mittelwert, die Standardabweichung, die Varianz, der Maximalwert und der Minimalwert bestimmt (vergl. 3.2).

Danach wurden die Korrelation nach Pearson und das Signifikanzniveau bestimmt (vergl. 3.3).

3 Ergebnisse:

3.1 Fotodokumentation der Befundkonstellation im *ERG-break-apart-assay*:

Die hier vorliegenden fluoreszenzmikroskopischen Fotografien wurden zusammen mit Herrn Professor Dr. Perner (Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Bonn) und Herrn Professor Dr. Wild (Institut für Pathologie, Universitätsspital Zürich) im Institut für Pathologie des Weill Cornell Medical College, New York, USA bei Herrn Professor Dr. Rubin angefertigt.

Sie zeigen Zellen eines Prostatakarzinoms ohne eine TMPRSS2-ERG-Genfusion (Abb 3.1.A und B), eines Prostatakarzinoms mit einer TMPRSS2-ERG-Genfusion welche durch eine Deletion bedingt ist (Abb 3.1.C) und eines Prostatakarzinoms mit einer TMPRSS2-ERG-Genfusion welche durch eine Translokation bedingt ist (Abb 3.1.D) im *ERG-break apart assay*.

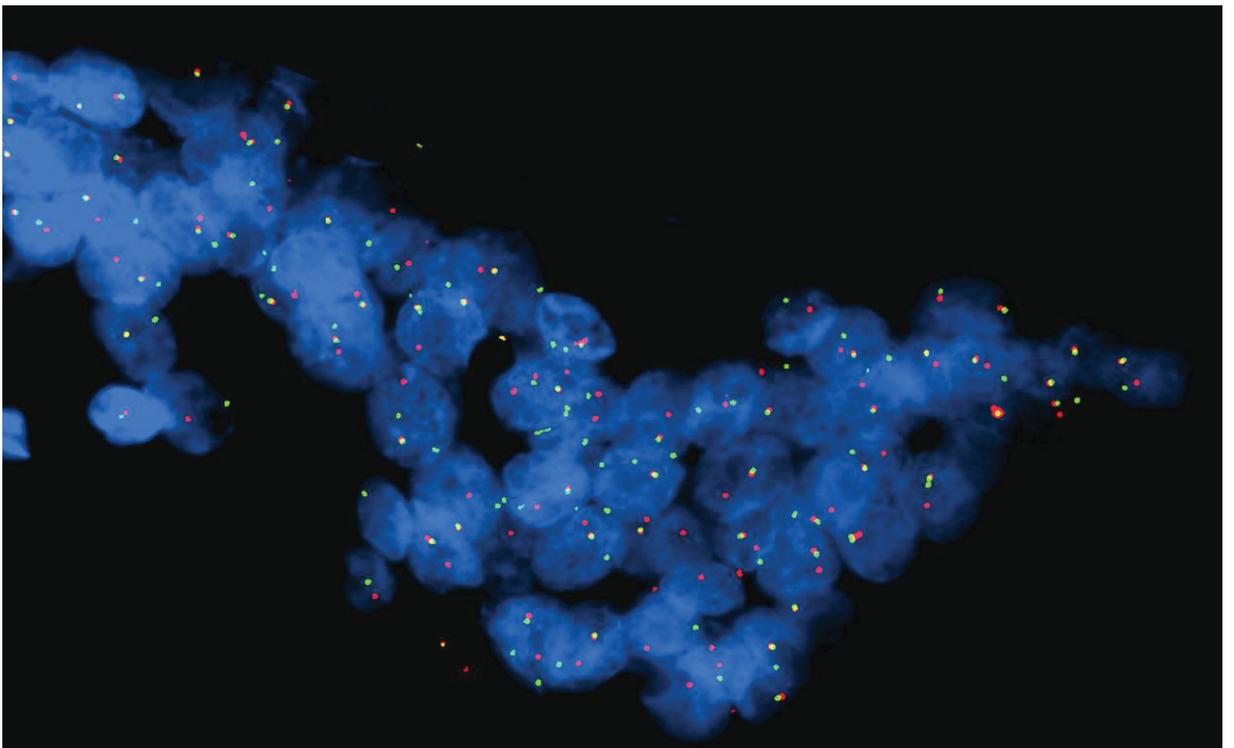


Abb 3.1.A ERG-break apart assay: Keine TMPRSS2-ERG-Genfusion, Übersichtsfoto (600-fache Vergrößerung)

Bei einem Prostatakarzinom ohne eine TMPRSS2-ERG-Genfusion zeigt sich ein grünes Fluoreszenzsignal, welches dicht neben einem roten Fluoreszenzsignal gelegen ist und evtl. zu einem einzelnen gelben Mischsignal verschmolzen ist. Pro Zelle finden sich diese Signale jeweils zweimal.

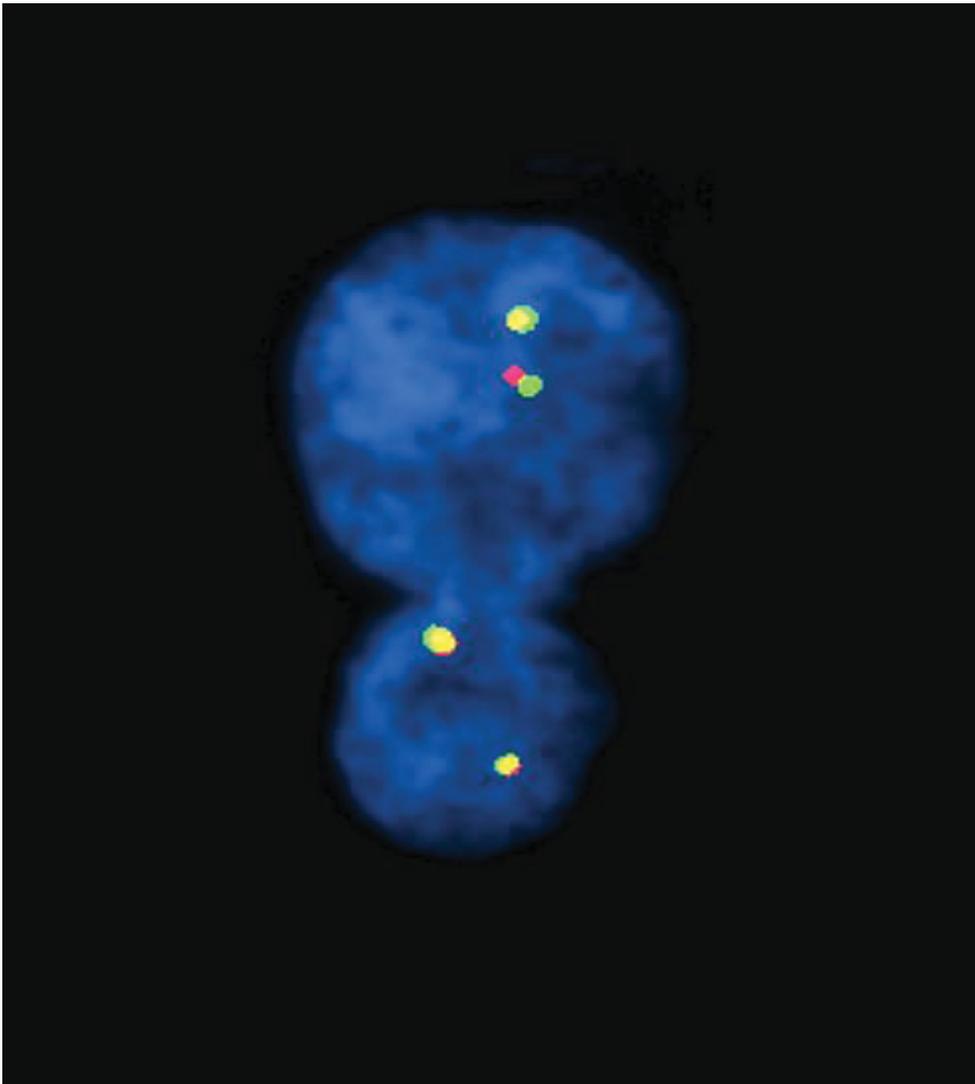


Abb. 3.1.B ERG-break apart assay: Keine TMPRSS2-ERG-Genfusion, Detailfoto (1000-fache Vergrößerung)

Diese Detailaufnahme aus Abb. 3.1.A zeigt zwei dicht nebeneinander gelegene Prostatakarzinomzellen. In der unteren Tumorzelle erkennt man zwei gelbe Mischsignale, welche dadurch zu Stande gekommen sind, dass das rote und das grüne FISH-Signal so dicht beieinander liegen, dass diese nur als ein Signal wahrgenommen werden können. In der oberen Tumorzelle erkennt man neben einem Mischsignal ein rotes Fluoreszenzsignal, welches dicht neben einem grünen Fluoreszenzsignal gelegen ist.

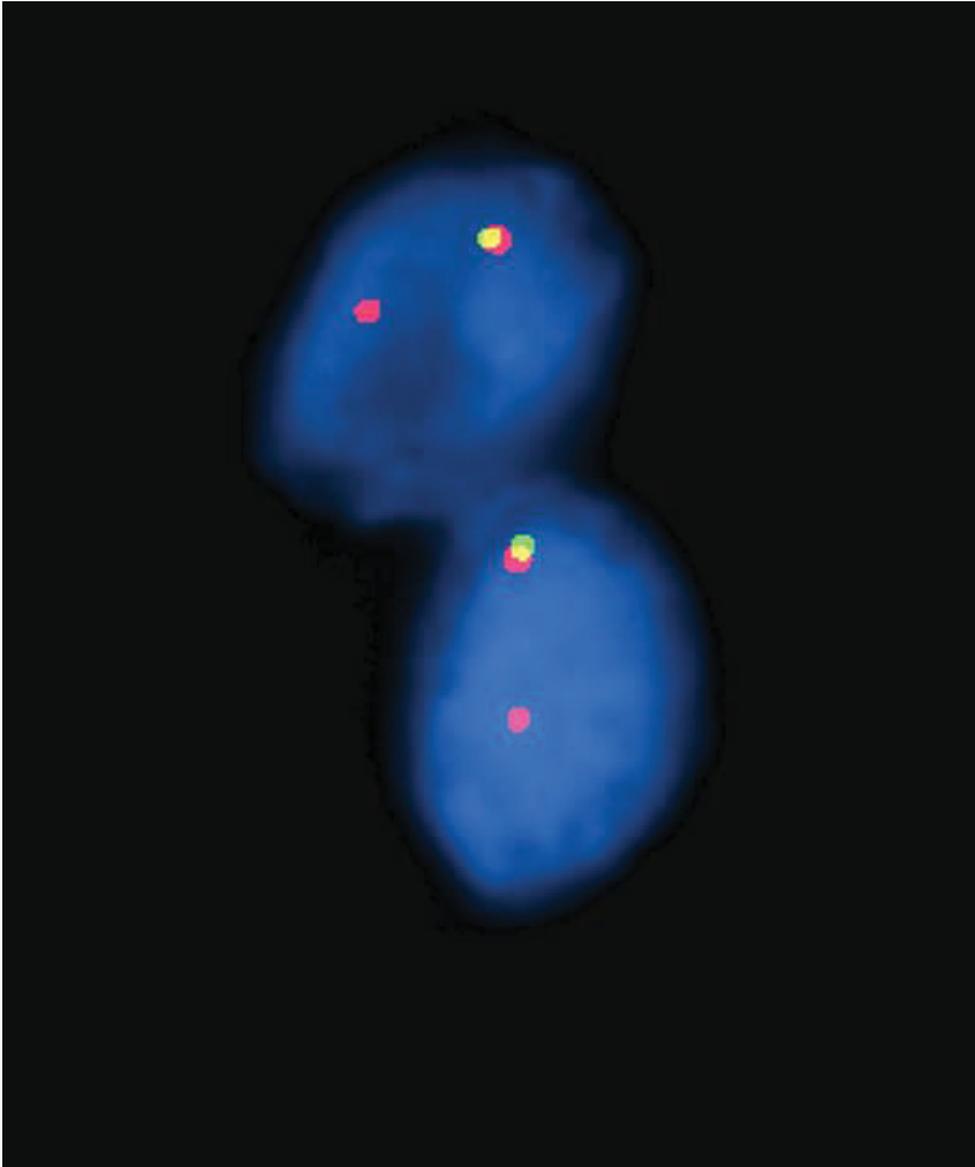


Abb 3.1.C ERG-break apart assay: TMRSS2-ERG-Genfusion durch Deletion, Detailfoto (1000-fache Vergrößerung)

Bei einem Prostatakarzinom mit einer TMRSS2-ERG-Genfusion auf Grund einer Deletion findet sich neben einem dicht beieinander gelegenen rot-grünen Signalpaar ein einzelnes rotes Fluoreszenzsignal, da das grüne Fluoreszenzsignal durch die Deletion verloren gegangen ist.

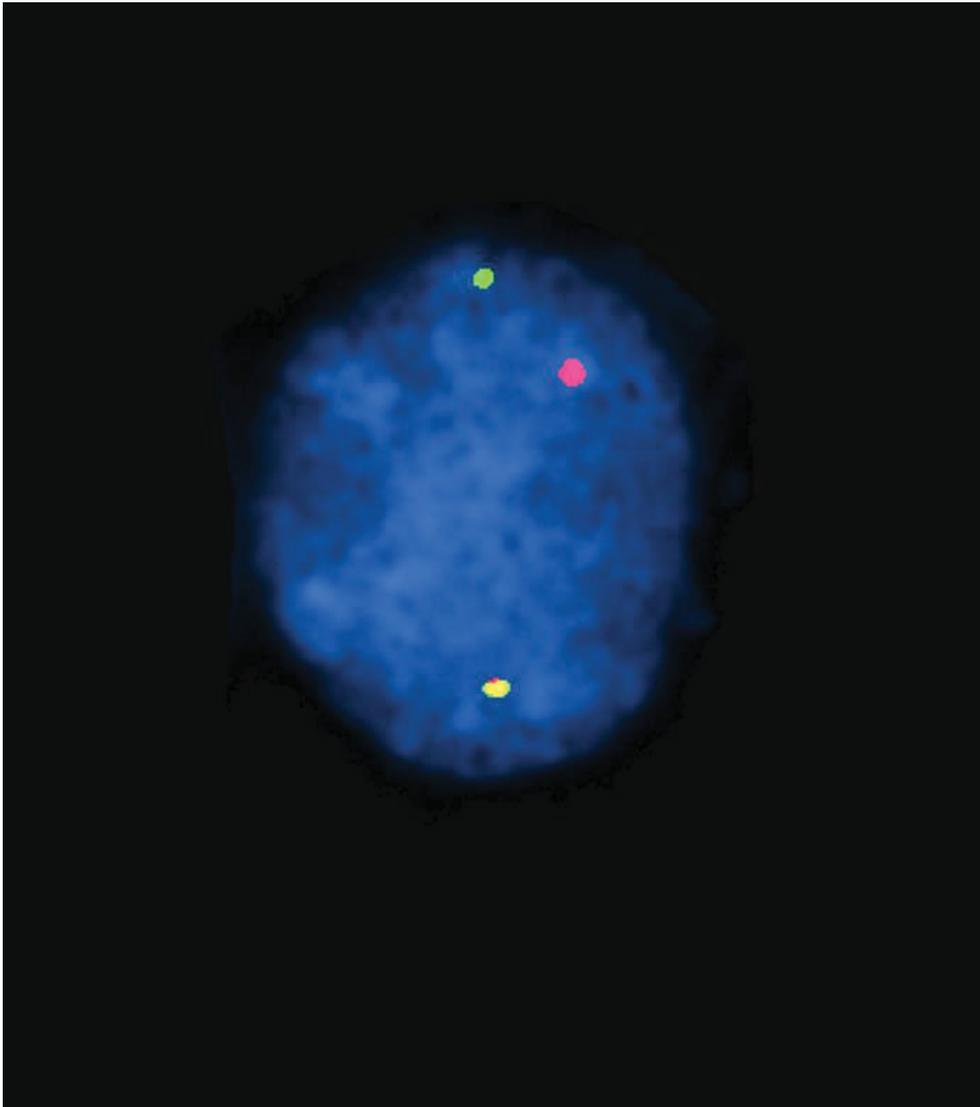


Abb 3.1.D ERG-break apart assay: TMPRSS2-ERG-Genfusion durch Translokation, Detailfoto (1000-fache Vergrößerung)

Bei einem Prostatakarzinom mit einer TMPRSS2-ERG-Genfusion auf Grund einer Translokation findet sich neben einem dicht beieinander gelegenen rot-grünen Signalpaar ein weiter von einander entferntes rotes und grünes Signalpaar.

3.2 Ergebnisse im Detail:

Zur Erstellung der vorliegenden Arbeit wurden im Zeitraum von 2007 bis 2010 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungs-Untersuchungen an 142 Prostatektomiepräparaten durchgeführt.

Von allen 142 Patienten (100%) war das Alter zum Zeitpunkt der Operation bekannt. Das mediane Patientenalter zum Zeitpunkt der Operation betrug 65,0 Jahre (Minimum 52 Jahre und Maximum 79 Jahre), der Mittelwert 64,73 Jahre und die Standardabweichung 6,19 Jahre.

Der prätherapeutische PSA-Wert stand für 101 Patienten (71%) zur Verfügung und betrug im Median 9,6 ng/ml (Minimum 0,1 ng/ml und Maximum 60,5 ng/ml), der Mittelwert 12,67 ng/ml und die Standardabweichung 10,12 ng/ml. Um statistische Untersuchungen hinsichtlich einer möglichen Korrelation mit dem TMPRSS2-ERG-Fusionsstatus durchführen zu können, wurde die Variable gruppiert in Fälle mit einem prätherapeutischen PSA-Wert von <10 ng/ml (54 Patienten, 53,5%) und in Fälle mit einem PSA-Wert von ≥ 10 ng/ml (47 Patienten, 46,5%).

Bei 111 Patienten (78,2%) standen Daten über den postoperativen Verlauf zur Verfügung mit einer medianen Nachbeobachtungszeit von 81 Monaten (Minimum 3 Monate und Maximum 255 Monate), einem Mittelwert von 88,5 Monaten und einer Standardabweichung von 51,61 Monaten.

Über das Auftreten eines Rezidivs lagen bei insgesamt 111 Patienten (78,2%) Daten vor. 81 Patienten (73,0% von 111 Patienten) waren bislang rezidivfrei, während es bei 30 Patienten (27,0% von 111 Patienten) zu einem Rezidiv gekommen war.

Daten über ein tumorbedingtes Versterben waren bei 84 Patienten (59,2%) vorhanden. So waren bis zur Datenerhebung von den Verstorbenen 7 Patienten (8,3% von 84 Patienten) am Prostatakarzinom verstorben, während 77 Patienten (91,7% von

84 Patienten) an anderen Ursachen verstorben waren. Bei 58 Patienten (40,9%) fehlten die Angaben über ein tumorbedingtes Versterben.

Aussagen bezüglich des pT-Stadiums, dem Vorliegen einer Blutgefäßinfiltration und einer Lymphgefäßinfiltration waren jeweils bei 140 Patienten (98,6%), bezüglich des pN-Stadiums bei 142 Patienten (100%), bezüglich des R-Stadiums bei 135 Patienten (95%) und bezüglich einer Perineuralscheideninfiltration bei 139 Patienten (97,9%) verfügbar.

Um statistische Untersuchungen hinsichtlich einer möglichen Korrelation des pT-Stadiums mit dem TMPRSS2-ERG-Fusionsstatus durchführen zu können, wurde die Variable gruppiert in Fälle mit einem pT2a-, ein pT2b- oder ein pT2c-Stadium (organbegrenztet Tumorwachstum) (76 Patienten, 54,3%) und in Fälle mit einem pT3a- oder pT3b-Stadium (extraprostatiches Tumorwachstum) (64 Patienten, 45,7%).

Lymphknotenmetastasen lagen bei 30 Patienten (21,1%) vor.

Eine Blutgefäßinfiltration fand sich bei 9 Patienten (6,4%), bei 18 Patienten (12,9%) lag eine Lymphgefäßinfiltration vor und bei 114 Patienten (82%) war eine Perineuralscheideninfiltration nachweisbar.

Das Karzinom wurde bei 20 Patienten (14,8%) nicht in sano reseziert (sog. R1-Resektion), während bei 115 Patienten (85,2%) eine in sano Resektion vorlag (sog. R0-Resektion).

Bezüglich des Gleason-Scores lagen für 138 Patienten (97,2%) Informationen vor. Um statistische Untersuchungen hinsichtlich einer möglichen Korrelation mit dem TMPRSS2-ERG-Fusionsstatus durchführen zu können, wurde die Variable gruppiert in Fälle mit einem Gleason-Score von ≤ 6 (33 Patienten, 23,9%) und in Fälle mit einem Gleason-Score von >6 (105 Patienten, 76,1%)

Hinsichtlich anderer molekularpathologischer Marker lagen Ergebnisse zur Tiam1-Expression für 60 Patienten (42,3%) zur Rac-Expression für 59 Patienten (41,5%) und zur AXL- und Gas6-Expression für jeweils 91 Patienten (64,1%) vor.

Eine Tiam1-Überexpression von <3,5-fach im Tumor verglichen mit dem Normalgewebe fand sich bei 26 Patienten (43,3% von 60 Patienten) sowie von $\geq 3,5$ -fach bei 34 Patienten (56,7% von 60 Patienten).

Eine Rac-Überexpression im Tumorgewebe verglichen mit dem Normalgewebe (>1) war bei 29 Patienten (48,3% von 59 Patienten) nachweisbar, während bei 31 Patienten (51,7% von 59 Patienten) keine Überexpression vorlag.

Eine AXL-Überexpression im Tumorgewebe verglichen mit dem Normalgewebe (>1) war bei 54 Patienten (59,3% von 91 Patienten) nachweisbar, während bei 37 Patienten (40,7% von 91 Patienten) keine Überexpression vorlag.

Eine Gas6-Überexpression im Tumorgewebe verglichen mit dem Normalgewebe (>1) war bei 35 Patienten (38,5% von 91 Patienten) nachweisbar, während bei 56 Patienten (61,5% von 91 Patienten) keine Überexpression vorlag.

Von den insgesamt 142 ausgewerteten Patienten (100%) war die TMPRSS2-ERG-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung bei 106 Untersuchungen (74,6%) auswertbar, während 36 Untersuchungen (25,4%) nicht auswertbar waren. Bei 56 Patienten (52,8% der 106 auswertbaren Proben) war eine TMPRSS2-ERG-Genfusion nachweisbar, während bei 50 Patienten (47,2% der 106 auswertbaren Proben) keine derartige Mutation nachweisbar war. Diese Genfusion war bei 23 Patienten (41,1% der 56 mutierten Proben) durch eine Translokation bedingt, sowie bei 33 Patienten (58,9% der 56 mutierten Proben) durch eine Deletion ausgelöst.

3.3 Korrelation der TMPRSS2-ERG-Genfusion mit anderen Parametern:

Beim Vergleich mit anderen klinisch oder pathologisch relevanten Parametern ließ sich eine signifikante Korrelation der TMPRSS2-ERG-Genfusion (Signifikanzniveau $<0,05$, zweiseitig) sowohl mit einem hohen pT-Stadium ($p= 0,035$), als auch mit dem Vorliegen einer Perineuralscheideninvasion ($p= 0,002$) nachweisen, während für alle anderen Parameter keine Korrelation zu beobachten war (vergl. Tab. 3.1).

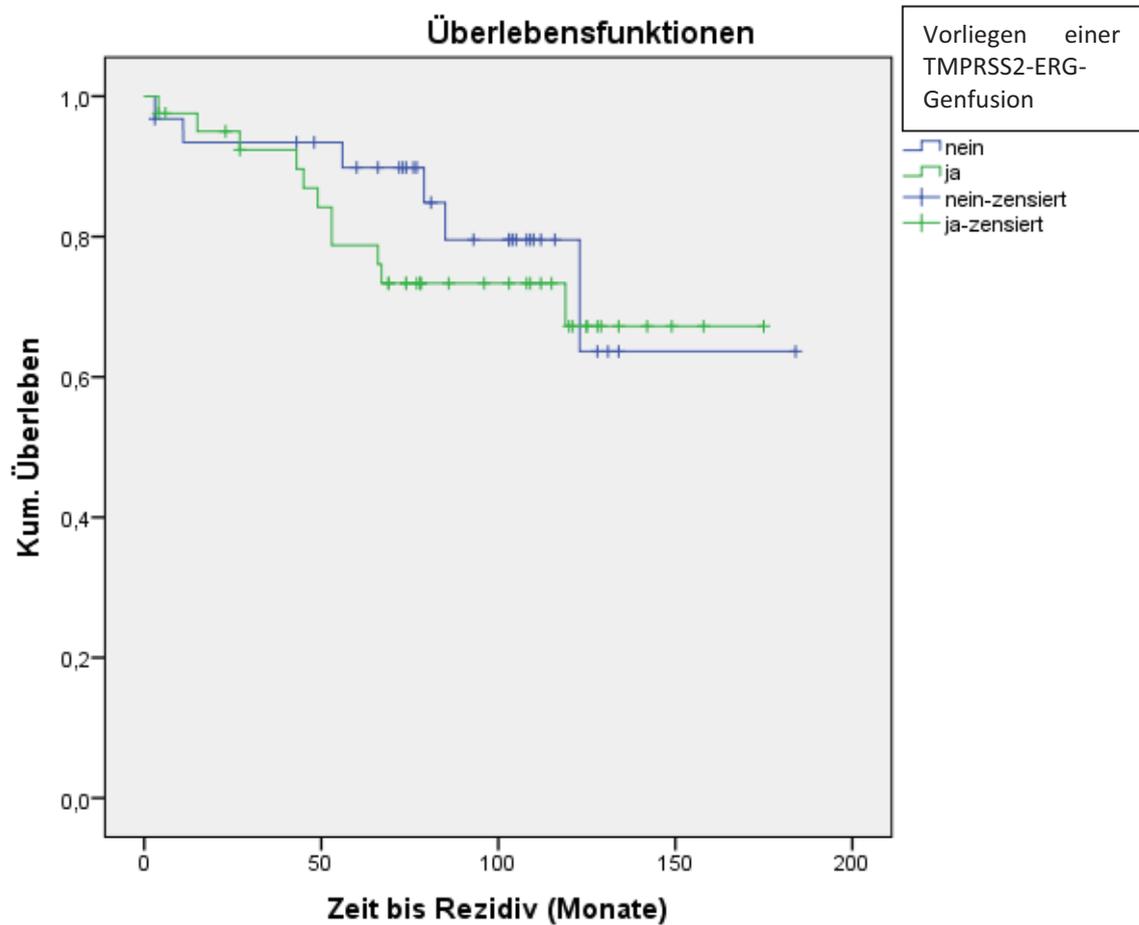
Tab. 3.1 Korrelationsuntersuchung zwischen dem Vorliegen einer TMPRSS2-ERG-Genfusion und anderen klinisch oder pathologisch relevanten Parametern:

Parameter	Signifikanzniveau
Patientenalter	$p= 0,526$
Prätherapeutischer PSA-Wert	$p= 0,436$
Auftreten eines Rezidivs	$p= 0,418$
pT-Stadium	$p= 0,035$
pN-Stadium	$p= 0,949$
Lymphgefäßinfiltration	$p= 0,850$
Blutgefäßinfiltration	$p= 0,120$
Perineuralscheideninvasion	$p= 0,002$
Gleason Score	$p= 0,284$
Residual-Status	$p= 0,228$
Tiam1-Überexpression	$p= 0,320$
Rac-Überexpression	$p= 0,136$
AXL-Überexpression	$p= 0,177$
Gas6-Überexpression	$p= 0,940$

3.4 Prognostische Relevanz:

Bezogen auf das Rezidiv-freie Überleben hat sich in der Kaplan-Meier Analyse und dem log-Rank-Test keine prognostische Relevanz der Tmprss2-ERG-Genfusion nachweisen lassen (vergl. Abb. 3.4).

Abb. 3.4 Kaplan-Meier Kurven:



$p = 0,499$

4 Diskussion:

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das TMPRSS2-ERG-Gen mit dem *Dual-color-FISH-break-apart-assay* untersucht.

Das TMPRSS2-ERG-Gen wurde erstmals 2005 im Prostatakarzinom beschrieben (Tomlins et al. 2005). Es handelt sich hierbei um ein Fusionsonkogen, welches durch eine Mutation, die das 3' Ende des ERG-Gens (21q22.3) mit dem 5' Ende des TMPRSS2-Gens (21q22.2) verbindet, charakterisiert ist und entweder durch eine Translokation oder durch eine Deletion entsteht (Mertz et al. 2007, Perner et al. 2006, Perner et al. 2007 a, Tomlins et al. 2005).

Das TMPRSS2- und das ERG-Gen sind beide auf Chromosom 21 lokalisiert (Mertz et al. 2007, Perner et al. 2006, Perner et al. 2007 a, Tomlins et al. 2005). Das TMPRSS2-Gen codiert für eine Serinprotease, während das ERG-Gen zur ETS-Onkogenfamilie gehört und als ein Transkriptionsfaktor wirkt, der je nach Phosphorylierungsstatus die Transkription inhibieren oder aktivieren kann (Killick et al. 2012).

Durch die Fusion des TMPRSS2-Gens mit dem ERG-Gen gelangt das ERG-Gen unter die Kontrolle des Androgenrezeptors und aufgrund dessen Aktivität in der Prostata folgt eine Überexpression des Transkriptionsfaktors ERG auf Proteinebene (Gopalan et al. 2009, Mertz et al. 2007, Perner et al. 2006, Perner et al. 2007 a, Tomlins et al. 2005).

Die Genfusion lässt sich morphologisch mit Hilfe der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (sog. FISH) nachweisen (Levsky und Singer 2003).

Bei dem *Dual-color-FISH-break-apart-assay* wird mit zwei verschiedenen DNA-Sonden gearbeitet, welche jeweils mit einem unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoff markiert sind, so dass die zu untersuchende Probe je nach Mutationsstatus Fluoreszenzsignale in unterschiedlicher Lage aufweist (Perner et al. 2007 a, Mertz et al. 2007).

Der Vorteil des *Dual-color-FISH-break-apart-assays* ist der, dass es nicht nur das Vorliegen einer Genfusion diagnostizieren kann, sondern auch noch bestimmen kann, ob diese Genfusion durch eine Translokation oder eine Deletion entstanden ist (Mertz

et al. 2007, Mosquera et al. 2007, Perner et al. 2006, Perner et al. 2007 a, Tomlins et al. 2005).

Das *Dual-color-FISH-break-apart-assay* wird deshalb als der Goldstandard zur Diagnostik der TMPRSS2-ERG-Genfusion im Prostatakarzinom bezeichnet (Tu et al. 2007).

Bei den im Rahmen dieser Arbeit im Zeitraum von 2007 bis 2010 untersuchten 142 totalen Prostatektomiepräparaten war bei 106 Proben (74,6%) die durchgeführte Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung auswertbar. Bei 56 (52,8%) dieser 106 Präparate war in dem Prostatakarzinomgewebe eine TMPRSS2-ERG-Genfusion nachweisbar. Diese Genfusion war bei 33 Proben (58,9% der 56 mutierten Proben) durch eine Deletion sowie bei 23 Proben (41,1% der 56 mutierten Proben) durch eine Translokation bedingt. Im als Negativkontrolle mituntersuchten Normalgewebe konnte in keinem Fall eine Genfusion nachgewiesen werden.

Eine signifikante Korrelation der TMPRSS2-ERG-Genfusion fand sich mit einem hohen pT-Stadium des Prostatakarzinoms ($p= 0,035$) und dem Vorliegen einer Perineuralscheideninvasion ($p= 0,002$).

Keine Korrelation der TMPRSS2-ERG-Genfusion fand sich mit dem Auftreten eines Prostatakarzinomrezidivs, dem Versterben des Patienten, dem krankheitsbedingten Versterben des Patienten, dem Patientenalter, dem Resektionsstatus des Prostatakarzinoms, dem Vorliegen von Lymphknotenmetastasen, dem Vorliegen einer Blutgefäßinfiltration, dem Vorliegen einer Lymphgefäßinfiltration, dem Gleason Score, dem Vorliegen einer Tiam1-Überexpression, dem Vorliegen einer Rac-Überexpression, dem Vorliegen einer Axl-Überexpression und dem Vorliegen einer Gas6-Überexpression.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit reihen sich gut in die bis dato vorliegenden Studienergebnisse anderer Arbeitsgruppen ein. Sie belegen, dass das im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Patientenkollektiv repräsentativ ist und bestätigen darüber hinaus auch die Ergebnisse anderer Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler.

Die untersuchte TMPRSS2-ERG-Genfusion wird als ein in Europa und Nordamerika bei ca. 50% der Prostatakarzinomfälle anzutreffendes Phänomen charakterisiert (Minner und Enodien et al. 2011, Perner et al. 2006, Perner et al. 2007 a, Pettersson et al. 2012 und Rajput et al. 2007), welches seltener in afrikanischen und am seltensten in asiatischen Kohorten anzutreffen ist (FitzGerald et al. 2008, Lee et al. 2010 und Minner und Enodien et al. 2011).

Die Genfusion wird häufiger durch eine Deletion (ca. 60%), als durch eine Translokation (ca. 40%) bedingt (Darnel et al. 2009, Lee et al. 2010, Perner et al. 2006 und Rajput et al. 2007).

Die TMPRSS2-ERG-Genfusion weist eine relativ hohe Spezifität für das Prostatakarzinom auf, ihre Einsatzmöglichkeit als ein diagnostischer Marker für das Prostatakarzinom wird jedoch durch ihre relativ niedrige Sensitivität eingeschränkt (Rübben 2009). Die Genfusion ist außer in Prostatakarzinomzellen nämlich auch in Zellen der high-grade intraprostatistischen Neoplasie nachweisbar (Sreenath et al. 2011) und wurde auch in Prostatahyperplasie- und vereinzelt sogar in an Prostatakarzinomen angrenzendem normalem Prostatagewebe nachgewiesen (FitzGerald et al. 2008). Die Mutation ist allerdings im Prostatakarzinom deutlich häufiger zu finden, als in der high-grade intraprostatistischen Neoplasie (Darnel et al. 2009).

Als Vorteil der TMPRSS2-ERG-Genfusion beim Prostatakarzinom ist anzusehen, dass die Mutation auch in Urinproben nach digital rektaler Untersuchung bestimmt werden kann. Sie bietet sich somit als ein potentiell nicht invasiver diagnostischer Marker an (Demichelis und Rubin 2008, Sreenath et al. 2011).

Darüberhinaus könnte eine neue Therapiestrategie darin bestehen TMPRSS2-ERG-Fusions-positive Prostatakarzinome mit ERG-Inhibitoren zu behandeln. In den bereits durchgeführten Studien ließ sich *in vitro* eine Wachstumshemmung von Prostatakarzinomzellen durch ERG-Inhibitoren zeigen (Sreenath et al. 2011).

Da ein Großteil der Prostatakarzinome ein multifokales Wachstumsmuster zeigt besteht auch im Hinblick auf die TMPRSS2-ERG-Genfusion die Möglichkeit einer

Tumorheterogenität. So findet sich in ein und dem selben Prostatektomiepräparat an der einen Stelle eine TMPRSS2-ERG-Genfusion, während diese an anderer Stelle nicht vorliegt oder an der einen Stelle ist die Genfusion durch eine Translokation und an anderer durch eine Deletion bedingt. Eine solche Tumorheterogenität der TMPRSS2-ERG-Genfusion wurde in zwischen 10% (Mehra et al. 2007) und 76,5% (Barry et al. 2007) der untersuchten Fälle beschrieben. Wir konnten eine solche Heterogenität der TMPRSS2-ERG-Genfusion in unsere Kollektiv nicht nachweisen. Allerdings wurde bei der Auswahl unsere Proben auch nicht explizit darauf geachtet, histomorphologisch unterschiedliche Areale zu untersuchen, sondern es wurden zumeist zwei benachbarte Tumorareale aus ein und demselben Paraffinblock untersucht. Bei den Untersuchungen von Mehra et al. und Barry et al. wurden jedoch histomorphologisch unterschiedliche Areale miteinander verglichen.

In verschiedenen Studien konnten signifikante Korrelationen der TMPRSS2-ERG-Genfusion mit unterschiedlichen Parametern gezeigt werden:

Häufig fand sich, wie auch in unserer Untersuchung, eine signifikante Korrelation mit dem pT-Stadium (Minner und Enodien et al. 2011, Perner et al. 2006 und Pettersson et al. 2012).

In manchen Studien zeigten sich signifikante Korrelationen der Genfusion mit einem höheren präoperativen PSA-Wert (Perner et al. 2006), einem höheren Gleason Score (Darnel et al. 2009, Minner und Enodien et al. 2011 und Rajput et al. 2007) oder einem niedrigeren Gleason Score (Lee et al. 2010), dem Vorliegen von Lymphknotenmetastasen (Perner et al. 2006) oder einem hohen Expressionslevel des Androgenrezeptors (Minner und Enodien et al. 2011).

Die in unserer Kohorte aufgefallene Korrelation der TMPRSS2-ERG-Genfusion mit dem Vorliegen einer Perineuralscheideninvasion wurde von keiner anderen Arbeitsgruppe untersucht.

Eine Korrelation der Genfusion mit anderen molekularpathologischen Markern wie z. B. Bcl2, CD10, CD166, Chromogranin A, EGFR, Her2, p53 und Synaptophysin ließ sich bislang nicht nachweisen (Minner und Enodien et al. 2011). Die von uns untersuchten

molekularpathologischen Marker Tiam1, Rac, Axl oder Gas6 wurden jedoch von keiner anderen Arbeitsgruppe in Korrelation zur TMPRSS2-ERG-Genfusion analysiert.

Signifikante Korrelationen der TMPRSS2-ERG-Genfusion mit deutlich interessanteren Endpunkten, wie z. B. dem krankheitsfreien Überleben oder dem Rezidivrisiko eines Prostatakarzinoms wurden jedoch außer von der Arbeitsgruppe um Perner und Rubin, die eine schlechtere Prognose beim Vorliegen der Genfusion beschrieben (Perner et al. 2007 b), von keiner Arbeitsgruppe bestätigt, so dass diese Frage nicht abschließend geklärt ist (Minner und Enodien et al. 2011 und Pettersson et al. 2012). Darüber hinaus fanden sich auch keine Hinweise darauf, dass eine durch eine Deletion bedingte Genmutation eine schlechtere Prognose aufweist, als eine durch eine Translokation bedingte Genmutation (Pettersson et al. 2012).

Zusammenfassend hat sich in der vorliegenden Arbeit und in Übereinstimmung mit den Daten anderer Arbeitsgruppen eine TMPRSS2-ERG-Genfusion in ca. 50% der Prostatakarzinome nachweisen lassen. Der Nachweis dieser Fusion korrelierte signifikant mit einem hohen pT-Stadium und dem Vorliegen einer Perineuralscheideninvasion, nicht aber mit zahlreichen anderen klinisch-pathologisch relevanten Parametern. Insbesondere hat sich auch im vorliegenden Patientenkollektiv – wie in den meisten bislang publizierten Arbeiten – keine prognostische Relevanz der TMPRSS2-ERG-Genfusion im Prostatakarzinom nachweisen lassen.

Somit liefert der Nachweis einer TMPRSS2-ERG-Genfusion zum jetzigen Zeitpunkt zwar zusätzliche Erkenntnisse im Hinblick auf die molekularen Entstehungsmechanismen des Prostatakarzinoms und möglicherweise auch eine Hilfestellung bei ganz bestimmten differentialdiagnostischen Fragestellungen in der histopathologischen Diagnostik des Prostatakarzinoms. Zur besseren Prognosebestimmung scheint diese Genfusion jedoch eher nicht geeignet zu sein. Allerdings bleibt zu hoffen, dass sich die TMPRSS2-ERG-Genfusion künftig wird therapeutisch nutzen lassen.

5 Zusammenfassung:

Das Prostatakarzinom ist die häufigste Krebserkrankung des Mannes in Deutschland und steht bei den Krebstodesfällen des Mannes an dritter Stelle. 96% der betroffenen Patienten sind älter als 60 Jahre. Da der Anteil der über 60-Jährigen in der Bevölkerung bis zum Jahr 2050 doppelt so hoch sein wird wie heute, ist im gleichen Umfang eine Zunahme des Prostatakarzinoms zu erwarten. Seit 1990 ist der Anteil früher Stadien des Prostatakarzinoms deutlich angestiegen. Die Sterberate hingegen verblieb über die Jahre auf relativ konstantem Niveau. Diese Veränderungen werden auf die intensiviertere Diagnostik mit Bestimmung des PSA-Wertes im Serum zurückgeführt.

Das Therapieverfahren der ersten Wahl für Patienten mit einem lokal begrenzten Prostatakarzinom ist die radikale Prostatektomie.

Um bei sehr unterschiedlichen Krankheitsverläufen die Gefahr einer Übertherapie zu reduzieren, werden nun Marker benötigt, die die Aggressivität des Prostatakarzinoms besser voraussagen helfen.

Als interessanteste molekularepathologische Marker haben sich in den letzten Jahren die TMPRSS2-ETS-Genfusionen beim Prostatakarzinom erwiesen. Die häufigste dieser Mutationen ist die Fusion des TMPRSS2-Gens mit dem ERG-Gen. Durch eine Deletion oder eine Translokation entsteht ein androgenabhängiges Fusionsonkogen.

In der Literatur sind Häufigkeiten der TMPRSS2-ERG-Genfusion in Europa und Nordamerika zwischen ca. 50%-70% beschrieben.

Die Mutation ist am häufigsten beim Prostatakarzinom, seltener bei der intraprostatatischen Neoplasie, sehr viel seltener bei der Prostatahyperplasie und ganz vereinzelt auch in normalem Prostataparenchym nachweisbar.

In der vorliegenden Arbeit wurden 142 Prostatakarzinompräparate auf das Vorliegen einer TMPRSS2-ERG-Genfusion mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung untersucht. Darüber hinaus wurde geklärt, ob es sich um eine durch Deletion oder durch Translokation bedingte Genfusion handelt, ob sich prognostische Aussagen für das Prostatakarzinom treffen lassen und ob der Fusionsstatus mit verschiedenen klinischen und pathologischen Parametern korreliert.

Bei 52,8% der auswertbaren Proben ließ sich eine TMPRSS2-ERG-Genfusion nachweisen. Diese Genfusion war bei 58,9% durch eine Deletion sowie bei 41,1% durch eine Translokation bedingt.

Beim Vergleich mit zahlreichen klinisch-pathologischen Parametern fand sich eine signifikante Korrelation der TMPRSS2-ERG-Genfusion mit einem hohen pT-Stadium des Prostatakarzinoms sowie dem Vorliegen einer Perineuralscheideninvasion, eine prognostische Relevanz hat sich jedoch nicht nachweisen lassen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit reihen sich gut in die bis dato vorliegende Literatur ein und sprechen gegen eine prognostische Relevanz dieser Genfusion.

Allerdings bleibt zu hoffen, dass sich das Vorliegen dieser Genfusion künftig für eine sog. „targeted therapy“ nutzen lassen.

6 Literaturverzeichnis:

Baek, K. H., Hong, M. E., Jung, Y. Y., Lee, C. H., Lee, T. J., Park, E. S., Kim, M. K., Yoo, J. H., Lee, S. W. **(2012)**. Correlation of AR, EGFR, and HER2 Expression Levels in Prostate Cancer: Immunohistochemical Analysis and Chromogenic In Situ Hybridization. *Cancer Res. Treat.* 44(1), 50-56.

Barry, M., Perner, S., Demichelis, F., Rubin, M. A. **(2007)**. TMPRSS2-ERG fusion heterogeneity in multifocal prostate cancer: clinical and biologic implications. *Urology* 70(4), 630-633.

Böcker, W., Denk, H., Heitz, P. U., Moch, H. **(2008)**. *Pathologie*, Urban & Fischer Verlag, 4. Auflage, 918-920.

Chan, A. Y., Coniglio, S. J., Chuang, Y. Y., Michaelson, D., Knaus, U. G., Philips, M. R., Symons, M. **(2005)**. Roles of the Rac1 and Rac3 GTPases in human tumor cell invasion. *Oncogene*. 24(53), 7821-7829.

Clark, J., Merson, S., Jhavar, S., Flohr, P., Edwards, S., Foster, C. S., Eeles, R., Martin, F. L., Phillips, D. H., Crundwell, M., Christmas, T., Thompson, A., Fisher, C., Kovacs, G., Cooper, C. S. **(2007)**. Diversity of TMPRSS2-ERG fusion transcripts in the human prostate. *Oncogene* 26(18), 2667-2673.

Crocker, B. A., Tarlinton, D. M., Cluse, L. A., Tuxen, A. J., Light, A., Yang, F. C., Williams, D. A., Roberts, A. W. **(2002)**. The Rac2 guanosine triphosphatase regulates B lymphocyte antigen receptor responses and chemotaxis and is required for establishment of B-1a and marginal zone B lymphocytes. *J. Immunol.* 168(7), 3376-3386.

Darnel, A. D., Lafargue, C. J., Vollmer, R. T., Corcos, J., Bismar, T. A. **(2009)**. TMPRSS2-ERG fusion is frequently observed in Gleason pattern 3 prostate cancer in a Canadian cohort. *Cancer Biol. Ther.* 8(2), 125-130.

Demichelis, F., Rubin, M. A. **(2007)**. TMPRSS2-ETS fusion prostate cancer: biological and clinical implications. *J. Clin. Pathol.* 60(11), 1185-1186.

Didsbury, J., Weber, R. F., Bokoch, G. M., Evans, T., Snyderman, R. **(1989)**. rac, a novel ras-related family of proteins that are botulinum toxin substrates. *J. Biol. Chem.* 264(28), 16378-1682.

Eble, J. N., Sauter, G., Epstein J. I. **(2004)**. *WHO Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs*, World Health Organisation, 159-214.

Engers, R., Springer, E., Kehren, V., Simic, T., Young, D. A., Beier, J., Klotz, L. O., Clark, I. M., Sies, H., Gabbert, H. E. **(2006)**. Rac upregulates tissue inhibitor of

metalloproteinase-1 expression by redox-dependent activation of extracellular signal-regulated kinase signaling. *FEBS J.* 273(20), 4754-4769. a

Engers, R., Mueller, M., Walter, A., Collard, J. G., Willers, R., Gabbert, H. E. **(2006)**. Prognostic relevance of Tiam1 protein expression in prostate carcinomas. *Br. J. Cancer* 95(8), 1081-1086. b

Engers, R., Ziegler, S., Mueller, M., Walter, A., Willers, R., Gabbert, H. E. **(2007)**. Prognostic relevance of increased Rac GTPase expression in prostate carcinomas. *Endocr. Relat. Cancer* 14(2), 245-256.

FitzGerald, L. M., Agalliu, I., Johnson, K., Miller, M. A., Kwon, E. M., Hurtado-Coll, A., Fazli, L., Rajput, A. B., Gleave, M. E., Cox, M. E., Ostrander, E. A., Stanford, J. L., Huntsman, D. G. **(2008)**. Association of TMPRSS2-ERG gene fusion with clinical characteristics and outcomes: results from a population-based study of prostate cancer. *BMC Cancer* 11, 230.

Gong, Y., Wang, D., Dar, J. A., Singh, P., Graham, L., Liu, W., Ai, J., Xin, Z., Guo, Y., Wang, Z. **(2012)**. Nuclear Export Signal of Androgen Receptor (NESAR) Regulation of Androgen Receptor Level in Human Prostate Cell Lines via Ubiquitination and Proteasome-Dependent Degradation. *Endocrinology* 53(12), 5716-5725.

Gopalan, A., Leversha, M. A., Satagopan, J. M., Zhou, Q., Al-Ahmadie, H. A., Fine S. W., Eastham, J. A., Scardino, P. T., Scher, H. I., Tickoo, S. K., Reuter, V. E., Gerald W. L. **(2009)**. TMPRSS2-ERG gene fusion is not associated with outcome in patients treated by prostatectomy. *Cancer Res.* 69(4), 1400-1406.

Haataja, L., Groffen, J., Heisterkamp, N. **(1997)**. Characterization of RAC3, a novel member of the Rho family. *J. Biol. Chem.* 272(33), 20384-20388.

Hordijk, P. L., ten Klooster, J. P., van der Kammen, R. A., Michiels, F., Oomen, L. C., Collard, J. G. **(1997)**. Inhibition of invasion of epithelial cells by Tiam1-Rac signaling. *Science.* 278(5342), 1464-1466.

Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms, Version 2.0 – 1. Aktualisierung **(2011)**, AWMF-Registrier-Nummer 043-022OL.

Junqueira, L. C., Carneiro, J., Schiebler, T. H., **(1996)**. *Histologie*, Springer Verlag, 4. Auflage, 640-642.

Keely, P. J., Westwick, J. K., Whitehead, I. P., Der, C. J., Parise, L. V. **(1997)**. Cdc42 and Rac1 induce integrin-mediated cell motility and invasiveness through PI(3)K. *Nature* 390(6660), 632-636.

Killick, E., Bancroft, E., Kote-Jarai, Z., Eeles, R. **(2012)**. Beyond prostate-specific antigen - future biomarkers for the early detection and management of prostate cancer. *Clin. Oncol. (R. Coll. Radiol.)* 24(8), 545-555.

Lee, K., Chae, J. Y., Kwak, C., Ku, J. H., Moon, K. C. **(2010)**. TMPRSS2-ERG gene fusion and clinicopathologic characteristics of Korean prostate cancer patients. *Urology* 76(5), 1268.

Levsky, J. M., Singer, R. H. **(2003)**. Fluorescence in situ hybridization: past, present and future. *J. Cell. Sci.* 116(14), 2833-2838.

Lian, L. Y., Barsukov, I., Golovanov, A. P., Hawkins, D. I., Badii, R., Sze, K. H., Keep, N. H., Bokoch, G. M., Roberts, G. C. **(2000)**. Mapping the binding site for the GTP-binding protein Rac-1 on its inhibitor RhoGDI-1. *Structure* 15(8), 47-55.

Lu, N. Z., Wardell, S. E., Burnstein, K. L., Defranco, D., Fuller, P. J., Giguere, V., Hochberg, R. B., McKay, L., Renoir, J. M., Weigel, N. L., Wilson, E. M., McDonnell, D. P., Cidlowski, J. A. **(2006)**. International Union of Pharmacology. LXV. The pharmacology and classification of the nuclear receptor superfamily: glucocorticoid, mineralocorticoid, progesterone, and androgen receptors. *Pharmacol. Rev.* 58(4), 782-797.

Malliri, A., van der Kammen, R. A., Clark, K., van der Valk, M., Michiels, F., Collard, J. G. **(2002)**. Mice deficient in the Rac activator Tiam1 are resistant to Ras-induced skin tumours. *Nature* 417(6891), 867-871.

Mehra, R., Han, B., Tomlins, S. A., Wang, L., Menon, A., Wasco, M. J., Shen, R., Montie, J. E., Chinnaiyan, A. M., Shah, R. B. **(2007)**. Heterogeneity of TMPRSS2 gene rearrangements in multifocal prostate adenocarcinoma: molecular evidence for an independent group of diseases. *Cancer. Res.* 1(67), 7991-7995.

Mertz, K. D., Setlur, S. R., Dhanasekaran, S. M., Demichelis, F., Perner, S., Tomlins, S., Tchinda, J., Laxman, B., Vessella, R. L., Beroukhim, R., Lee, C., Chinnaiyan, A. M., Rubin, M. A. **(2007)**. Molecular characterization of TMPRSS2-ERG gene fusion in the NCI-H660 prostate cancer cell line: a new perspective for an old model. *Neoplasia* 9(3), 200-206.

Mira, J. P., Benard, V., Groffen, J., Sanders, L. C., Knaus, U. G. **(2000)**. Endogenous, hyperactive Rac3 controls proliferation of breast cancer cells by a p21-activated kinase-dependent pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97(1), 185-189.

Michiels, F., Stam, J. C., Hordijk, P. L., van der Kammen, R. A., Ruuls-Van Stalle, L., Feltkamp, C. A., Collard, J. G. **(1997)**. Regulated membrane localization of Tiam1, mediated by the NH2-terminal pleckstrin homology domain, is required for Rac-dependent membrane ruffling and C-Jun NH2-terminal kinase activation. *J. Cell. Biol.* 21(137), 387-398.

Minner, S., Enodien, M., Sirma, H., Luebke, A. M., Krohn, A., Mayer, P. S., Simon, R., Tennstedt, P., Müller, J., Scholz, L., Brase, J. C., Liu, A. Y., Schlüter, H., Pantel, K., Schumacher, U., Bokemeyer, C., Steuber, T., Graefen, M., Sauter, G., Schlomm, T. **(2011)**. ERG status is unrelated to PSA recurrence in radically operated prostate cancer in the absence of antihormonal therapy. *Clin. Cancer Res.*15(17), 5878-5888.

Mishra, A., Wang, J., Shiozawa, Y., McGee, S., Kim, J., Jung, Y., Joseph, J., Berry, J. E., Havens, A., Pienta, K. J., Taichman, R. S. **(2012)**. Hypoxia stabilizes GAS6/Axl signaling in metastatic prostate cancer. *Mol. Cancer Res.* 10(6), 703-712.

Mosquera, J. M., Perner, S., Demichelis, F., Kim, R., Hofer, M. D., Mertz, K. D., Paris, P. L., Simko, J., Collins, C., Bismar, T. A., Chinnaiyan, A. M., Rubin, M. A. **(2007)**. Morphological features of TMPRSS2-ERG gene fusion prostate cancer. *J. Pathol.* 212(1), 91-101.

Olson, M. F., Ashworth, A., Hall, A. **(1995)**. An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1. *Science* 269(5228), 1270-1272.

Perner, S., Demichelis, F., Beroukhim, R., Schmidt, F. H., Mosquera, J. M., Setlur, S., Tchinda, J., Tomlins, S. A., Hofer, M. D., Pienta, K. G., Kuefer, R., Vessella, R., Sun, X. W., Meyerson, M., Lee, C., Sellers, W. R., Chinnaiyan, A. M., Rubin, M. A. **(2006)**. TMPRSS2:ERG fusion-associated deletions provide insight into the heterogeneity of prostate cancer. *Cancer Res.*1(66), 8337-8341.

Perner, S., Mosquera, J. M., Demichelis, F., Hofer, M. D., Paris, P. L., Simko, J., Collins, C., Bismar, T. A., Chinnaiyan, A. M., De Marzo, A. M., Rubin, M. A. **(2007)**. TMPRSS2-ERG fusion prostate cancer: an early molecular event associated with invasion. *Am. J. Surg. Pathol.* 31(6), 882-888. a

Perner, S., Schmidt, F. H., Hofer, M. D., Kuefer, R., Rubin, M. **(2007)** TMPRSS2-ETS gene fusion in prostate cancer. *Urologe A.* 46(7), 754-760. b

Pettersson, A., Graff, R. E., Bauer, S. R., Pitt, M. J., Lis, R. T., Stack, E. C., Martin, N. E., Kunz, L., Penney, K. L., Ligon, A. H., Suppan, C., Flavin, R., Sesso, H. D., Rider, J. R., Sweeney, C., Stampfer, M. J., Fiorentino, M., Kantoff, P. W., Sanda, M. G., Giovannucci, E. L., Ding, E. L., Loda, M., Mucci, L. A. **(2012)**. The TMPRSS2:ERG rearrangement, ERG expression, and prostate cancer outcomes: a cohort study and meta-analysis. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 21(9), 1497-1509.

Qiu, R. G., Chen, J., Kirn, D., McCormick, F., Symons, M. **(1995)**. An essential role for Rac in Ras transformation. *Nature* 374(6521), 457-459.

Rajput, A. B., Miller, M. A., De Luca, A., Boyd, N., Leung, S., Hurtado-Coll, A., Fazli, L., Jones, E. C., Palmer, J. B., Gleave, M. E., Cox, M. E., Huntsman, D. G. **(2007)**. Frequency of the TMPRSS2:ERG gene fusion is increased in moderate to poorly differentiated prostate cancers. *J. Clin. Pathol.* 60(11), 1238-1243.

Ramieri, M. T., Murari, R., Botti, C., Pica, E., Zotti, G., Alo, P. L. **(2010)**. Detection of HER2 amplification using the SISH technique in breast, colon, prostate, lung and ovarian carcinoma. *Anticancer Res.* 30 (4), 1287-1292.

Ridley, A. J. **(2006)**. Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. *Trends Cell. Biol.* 16(10), 522-529.

Ridley, A. J., Paterson, H. F., Johnston, C. L., Diekmann, D., Hall, A. **(1992)**. The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* 70(3), 401-410.

Rohde, V., Katalinic, A., Wasem J., Aidelsburger P. **(2009)**. Prostataerkrankungen. Robert Koch Institut und Statisches Bundesamt, Gesundheitsberichterstattung des Bundes, Heft 36, 7-21.

Rohen J. W. **(1992)**. Topographische Anatomie, Schattauer Verlag, 9. verbesserte Auflage, 213-214.

Ross, J. S., Fletcher, J. A., Linette, G. P., Stec, J., Clark, E., Ayers, M., Symmans, W. F., Pusztai, L., Bloom, K. J. **(2003)**. The Her-2/neu gene and protein in breast cancer: biomarker and target of therapy. *The Oncologist* 8(4), 307-325.

Rübgen H. **(2009)**. Uroonkologie, Springer Verlag, 5. Auflage, 485-601.

Sainaghi, P. P., Castello, L., Bergamasco, L., Galletti, M., Bellosta, P., Avanzi, G. C. **(2005)**. Gas6 induces proliferation in prostate carcinoma cell lines expressing the Axl receptor. *J. Cell. Physiol.* 204(1), 36-44.

Shan, D., Chen, L., Njardarson, J. T., Gaul, C., Ma, X., Danishefsky, S. J., Huang, X. Y. **(2005)**. Synthetic analogues of migrastatin that inhibit mammary tumor metastasis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102(10), 3772-3776.

Shiozawa, Y., Pedersen, E., Patel, L., Ziegler, A. **(2010)**. GAS6/AXL Axis Regulates Prostate Cancer Invasion, Proliferation, and Survival in the Bone Marrow Niche, *Neoplasia* 12(2), 116-127.

Sreenath, T. L., Dobi, A., Petrovics, G., Srivastava, S. **(2011)**. Oncogenic activation of ERG: A predominant mechanism in prostate cancer. *J. Carcinog.* 10(37), 1477-1499.

Sugihara, K., Nakatsuji, N., Nakamura, K., Nakao, K., Hashimoto, R., Otani, H., Sakagami, H., Kondo, H., Nozawa, S., Aiba, A., Katsuki, M. **(1998)**. Rac1 is required for the formation of three germ layers during gastrulation. *Oncogene* 17(26), 3427-3433.

Tomlins, S. A., Rhodes, D. R., Perner, S., Dhanasekaran, S. M., Mehra, R., Sun, X. W., Varambally, S., Cao, X., Tchinda, J., Kuefer, R., Lee, C., Montie, J. E., Shah, R. B., Pienta, K. J., Rubin, M. A., Chinnaiyan, A. M. **(2005)**. Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science* 28(310), 644-648.

Treiber, U., Zaak, D. **(2008)**. Manual Urogenitale Tumoren, Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. Tumorzentrum München, Zuckschwerdt Verlag, 4. Auflage, 1-65.

Tu, J. J., Rohan, S., Kao, J., Kitabayashi, N., Mathew, S., Chen, Y. T. **(2007)**. Gene fusions between TMPRSS2 and ETS family genes in prostate cancer: frequency and transcript variant analysis by RT-PCR and FISH on paraffin-embedded tissues. *Mod. Pathol.* 20(9), 921-928.

Urbanucci, A., Sahu, B., Seppälä, J., Larjo, A., Latonen, L. M., Waltering, K. K., Tammela, T. L., Vessella, R. L., Lähdesmäki, H., Jänne, O. A., Visakorpi, T. **(2012)**. Overexpression of androgen receptor enhances the binding of the receptor to the chromatin in prostate cancer. *Oncogenen* 31(17), 2153-2163.

Wittekind, C., Meyer, H. J. **(2010)**. TNM Klassifikation maligner Tumoren, International Union Against Cancer, Wiley-Blackwell Verlag, 7. Auflage, 229-233.

7 Danksagung:

Herrn Prof. Dr. Gabbert danke ich für die Möglichkeit der Nutzung des Labors des Instituts für Pathologie sowie für die Hilfe bei der Bewerbung um das Forschungs-Stipendium der Deutschen Gesellschaft für Pathologie.

Insbesondere möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Engers für die Überlassung des interessanten Dissertationsthemas, die kompetente Betreuung und die Unterstützung bei der Erstellung der Arbeit bedanken.

Für die Möglichkeit, die Technik sowie die Auswertung der FISH-Untersuchung zu erlernen, danke ich Herrn Prof. Dr. Perner (Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Bonn) und Herrn Prof. Dr. Rubin (Institut für Pathologie, Weill Cornell Medical College, New York, USA).

Für die Unterstützung während des praktischen Teils der Arbeit danke ich recht herzlich Herrn C. LaFargue (Institut für Pathologie, Weill Cornell Medical College, New York, USA), Herrn Prof. Dr. Wild (Institut für Pathologie, Universitätsspital Zürich, Schweiz), Frau K. Petersen (Institut für Pathologie Universitätsklinikum Tübingen), sowie Frau M. Niermann, Frau S. Khalil, Frau C. Feldhoff und Frau S. Schneeloch (alle Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Düsseldorf).

Außerdem danke ich herzlich meiner Ehefrau Johanna für die guten Ratschläge, die Unterstützung und die Bestärkung bei der Erstellung der Arbeit, meinen Eltern für die Ermöglichung meines Studiums und für das positive Feedback im Rahmen der Arbeit sowie meiner Schwägerin Maria für die Unterstützung bei EDV-technischen Fragen.

Eidesstattliche Versicherung:

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

26.04.2013, Martin Olaf Schoppe