

Aus der Urologischen Klinik
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Peter Albers

**Klinische und biologische Implikationen von
Genexpressionsveränderungen im Prostatakarzinom
– von Ergebnissen zu Hypothesen –**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Marc Ingenwerth

2016

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

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Referent: Prof. Dr. Schulz

Korreferentin: Prof. Dr. Reinecke

Für meine Eltern, in Dankbarkeit.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Ribarska T, Goering W, Droop J, Bastian KM, Ingenwerth M, Schulz WA.
Deregulation of an imprinted gene network in prostate cancer. *Epigenetics*.
2014 May 1;9(5):704-17. doi: 10.4161/epi.28006.

Vinarskaja A, Schulz WA, Ingenwerth M, Hader C, Arsov C.
Association of PITX2 mRNA down-regulation in prostate cancer with promoter
hypermethylation and poor prognosis. *Urol Oncol*. 2013 Jul;31(5):622-7. doi:
10.1016/j.urolonc.2011.04.010.

Vinarskaja A, Goering W, Ingenwerth M, Schulz WA.
ID4 is frequently downregulated and partially hypermethylated in prostate
cancer. *World J Urol*. 2012 Jun;30(3):319-25. doi: 10.1007/s00345-011-0750-8.

Vinarskaja A, Yamanaka M, Ingenwerth M, Schulz WA.
DNA Methylation and the HOXC6 Paradox in Prostate Cancer. *Cancers (Basel)*.
2011 Sep 27;3(4):3714-25. doi: 10.3390/cancers3043714.

Schulz WA, Ingenwerth M, Djuidje CE, Hader C, Rahnenführer J, Engers R.
Changes in cortical cytoskeletal and extracellular matrix gene expression in
prostate cancer are related to oncogenic ERG deregulation. *BMC Cancer*. 2010
Sep 22;10:505. doi: 10.1186/1471-2407-10-505.

Ribarska T, Ingenwerth M, Goering W, Engers R, Schulz WA.
Epigenetic inactivation of the placentally imprinted tumor suppressor gene
TFPI2 in prostate carcinoma. *Cancer Genomics Proteomics*. 2010 Mar-
Apr;7(2):51-60

Zusammenfassung

Genexpressionsanalysen stellen eine wichtige Säule der Krebsforschung dar, so auch bei der systematischen Erforschung des Prostatakarzinoms. Sie tragen zum biologischen Verständnis, der Klassifikation und der Biomarker-Entwicklung bei. Im Laufe der Zeit sind an einer Gewebeprobe-Serie der Urologischen Klinik viele einzelne Expressionsanalysen mittels quantitativer RT-PCR vorgenommen wurden. Diese wurden nunmehr im Vergleich analysiert, um Zusammenhänge zwischen den untersuchten Genen sowie mit klinischen Parametern neu zu beleuchten.

Dazu wurden klinische Daten für 45 Prostatakarzinome und die Expressionsdaten für 71 untersuchte Gene zusammengeführt und normalisiert. Die Informationen über den Krankheitsverlauf bei den Patienten wurden aktualisiert. Die Expressionsdaten wurden für jedes Gen mit den klinischen Parametern (Stadium, Gleason-Score, Rezidivierung) in Beziehung gesetzt. Zwischen allen Genen wurden Korrelationsanalysen durchgeführt. Speziell wurden die Expressionswerte in Subtypen des Prostatakarzinoms verglichen, die über die Überexpression der Gene *ERG* bzw. *SPINK1* definiert waren.

Jeweils mehrere Gene korrelierten in der Expression signifikant zu einzelnen klinischen Parametern, besonders deutlich *DKC1* mit Tumorstadium, *DNMT1* mit Lymphknotenstatus und *PPP3CC* mit dem Auftreten von Rezidiven; doch ergab sich kein Gen mit über alle Kategorien signifikanter Korrelation. Es wurden mehrere Cluster von Genen mit ähnlichen Expressionsmustern identifiziert, darunter auffällig *JMJD1A*, *SHH*, *PON2*, *PPP2CB* und *HIP*.

Eine ganze Anzahl von Genen war in Karzinomen mit *ERG*-Überexpression signifikant höher oder niedriger exprimiert, darunter besonders Gene der EPB-Familie und Fibuline.

Die Analysen haben mehrere Gene hervorgebracht, die als Kandidaten für molekular basiertes Staging oder zur Prognose geeignet scheinen. Weiterhin wurden aus den Korrelationsanalysen Hinweise auf bisher unvermutete funktionelle Zusammenhänge gewonnen. Dies gilt besonders für den Zusammenhang von Zytoskelett- und Matrixproteinen mit einer *ERG*-Deregulation. Die Deregulation dieser Gene im *ERG* überexprimierenden Subtyp des Prostatakarzinoms könnte zur Tumor-Invasion und -Metastasierung beitragen.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
1. Einleitung	1
1.1 Das Prostatakarzinom	1
1.1.1. Epidemiologie	1
1.1.2. Stadieneinteilung	1
1.1.3. Diagnostik, Staging und Therapie	3
1.2 Bedeutung von Genexpressionsveränderungen für die Pathogenese des Prostatakarzinoms.....	5
1.2.1 Genexpression	5
1.2.2 Zielsetzung der Arbeit.....	7
2. Material und Methoden	9
2.1 Material	9
2.1.1 Gewebeprobe(n)	9
2.1.2 Expressionsbestimmung.....	11
2.1.3 Excel-Version 2003/2010.....	15
2.1.4 PAWS/SPSS Statistik-Programm	15
2.2 Methoden	16
2.2.1 qRT-PCR.....	16
2.2.2 Klinische Datenakquise.....	20
2.2.3 Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test	21
2.2.4 Kruskal-Wallis-Test.....	21
2.2.5 Korrelationsbestimmung nach Pearson	21
2.2.6 Korrelationsbestimmung nach Spearman	22
2.2.7 Hierarchische Clusteranalyse	22
2.2.8 Kaplan-Meier- und Log Rank-Test	22
3. Ergebnisteil	23
3.1 Allgemeiner Teil.....	23
3.1.1 Summarischer Verlauf Follow-Up	23
3.1.2 Genexpression	25
3.1.2.1 Genexpressionsvergleich von Tumorproben zu Normalproben.....	25
3.1.2.2 Korrelationsanalysen	27
3.1.2.3 Hierarchische Clusteranalyse der Gene.....	30
3.1.3 Klinische Daten.....	34
3.1.3.1 Analyse der Genexpression im Verhältnis zum Tumorstadium	34
3.1.3.2 Analyse von Genexpression im Verhältnis zum Lymphknotenstatus.....	36

3.1.3.3 Analyse von Genexpression im Verhältnis zum Gleason-Score.....	37
3.1.3.4 Analyse von Genexpression im Bezug zum Rezidivstatus	38
3.1.3.5 Kaplan-Meier-Analyse der Beziehung von Genexpression zur Rezidivhäufigkeit	40
3.2 Spezieller Teil.....	42
3.2.1 ERG-Translokation	42
3.2.2 Gene der EPB-Familie im Zusammenhang mit ERG-Expression.....	45
3.2.3 SPINK1	46
3.2.4 SPINK1 und ERG	47
4. Diskussion	49
4.1 Genexpressionsvergleich von Tumorproben zu Normalproben und klinischen Daten	49
4.2 Korrelationsanalyse und funktionelle Aspekte.....	53
4.3. Zusammenhänge mit molekularen Subtypen des Prostatakarzinoms	58
4.3.1 Verhältnis von SPINK1 und ERG.....	58
4.3.2 Gene im ERG-Subtyp	58
4.3.3 Gene im SPINK1-Subtyp	59
5. Literaturverzeichnis	62
6. Anhang.....	77

1. Einleitung

Das Prostatakarzinom ist der häufigste Tumor des Mannes [1]. Es finden sich in diesem Malignom viele Änderungen in der Genexpression gegenüber normalem Prostatagewebe [2]. Diese haben unterschiedliche Auswirkungen auf die biologische Aggressivität und klinische Progression des Tumors.

1.1 Das Prostatakarzinom

1.1.1. Epidemiologie

Das Prostatakarzinom als häufigster Tumor des Mannes ist vor allem eine Erkrankung des höheren Alters. Es ist nicht auf bestimmte Regionen beschränkt, allerdings ist die Inzidenz in den westlichen Industrienationen, allen voran den USA, am größten [1]. Deutschlandweit werden jährlich 58.000 Prostatakarzinome diagnostiziert; bei den zum Tode führenden Krebserkrankungen liegt es mit 10,1 % auf insgesamt Platz 3. Hingegen ist der asiatische Raum signifikant weniger betroffen. Niedrige Inzidenzraten werden auch in den mediterranen Regionen gefunden. Die geografischen Unterschiede werden vor allem der Ernährung zugesprochen, möglicherweise dem Anteil an Antioxidantien in den Nahrungsmitteln [3]. Als weitere Risikofaktoren gelten ethnische Zugehörigkeit, Hormonstatus und die familiäre Vorbelastung bei Verwandten ersten Grades [4].

1.1.2. Stadieneinteilung

Das Prostatakarzinom wird nach der TNM-Klassifikation eingeteilt [5]. Das T steht für die Ausdehnung des Tumors, das N für den Status von Lymphknotenmetastasen und das M für das Vorhandensein von Fernmetastasen. Tabelle 1.1 fasst die gültige Einteilung zusammen [6].

Tabelle 1.1: TNM-Klassifikation des Prostatakarzinoms nach der UICC (2010)

Stadium	Beschreibung
Tx	Es kann keine Aussage zur Ausdehnung des Primärtumors getroffen werden.
T1	Der Tumor ist klein und nicht tastbar. Er wird zufällig im Rahmen einer Prostataoperation wegen BPH oder erhöhter PSA-Werte gefunden (Inzidentaltumor).
T1a	Der Tumor befällt weniger als 5 % des Gewebes.
T1b	Der Tumor befällt mehr als 5 % des Gewebes.
T1c	Der Tumor wurde durch eine Nadelbiopsie diagnostiziert.
T2	Der Tumor liegt noch innerhalb der Prostatakapsel.
T2a	Der Tumor befällt weniger als 50 % eines Seitenlappens.
T2b	Der Tumor befällt mehr als 50 % eines Seitenlappens.
T2c	Der Tumor befällt beide Seitenlappen.
T3	Der Tumor hat sich über die Prostatakapsel hinaus ausgebreitet.
T3a	Der Tumor hat sich über die Prostatakapsel ausgebreitet, ohne die Samenblasen zu befallen.
T3b	Der Tumor hat sich über die Prostatakapsel ausgebreitet und befällt die Samenblasen.
T4	Der Tumor hat Nachbarstrukturen infiltriert oder ist fixiert (unverschieblich).
Nx	Es kann keine Aussage zu regionären Lymphknotenmetastasen getroffen werden.
N0	Keine Metastasen in den regionären Lymphknoten.
N1	Metastasen in den regionären Lymphknoten.
M0	Keine Fernmetastasen nachweisbar.
M1a	Metastasen in anderen Lymphknoten (nicht regionäre Lymphknoten).
M1b	Metastasen in den Knochen.
M1c	Metastasen in anderen Organen und/oder Strukturen.

Das histopathologische Grading erfolgt heute überwiegend nach Gleason. Dabei werden folgende Parameter auf ihre Veränderungen untersucht: Drüsenform, Drüsengröße, Drüsenabstand, Herdgrenze und Stromainvasion (siehe Abbildung 1.1). Entsprechend dem Muster dieser Kategorien verteilt man einen Wert von 1 bis 5 jeweils für das Primärmuster und das Sekundärmuster. Die Addition beider Werte ergibt den endgültigen Gleason-Score, z. B. $4 + 3 = 7$. Der Gleason-Score korreliert gut mit der Malignität des Prostatakarzinoms. Dabei gilt ein Gleason-Score von 2–6 als gut differenziert und ein Score von 8–10 als schlecht differenziert, die häufigen mäßig differenzierten Karzinome mit Score 7 können noch in die Untergruppen $3 + 4$ und $4 + 3$ unterschieden werden. Die Bedeutung des Gleason-Scores liegt in seiner guten Beziehung zum Gesamtüberleben. Patienten mit einem hohen Gleason-Score haben eine hohe Wahrscheinlichkeit am Prostatakarzinom zu versterben [7]. Das Gleason-Grading ist seit seiner breiten Einführung in den 1990er-Jahren mehrfach modifiziert worden [8, 9]. In dieser Arbeit wird das System nach der zum Zeitpunkt der Diagnostik (1997–2003) gültigen Fassung verstanden.

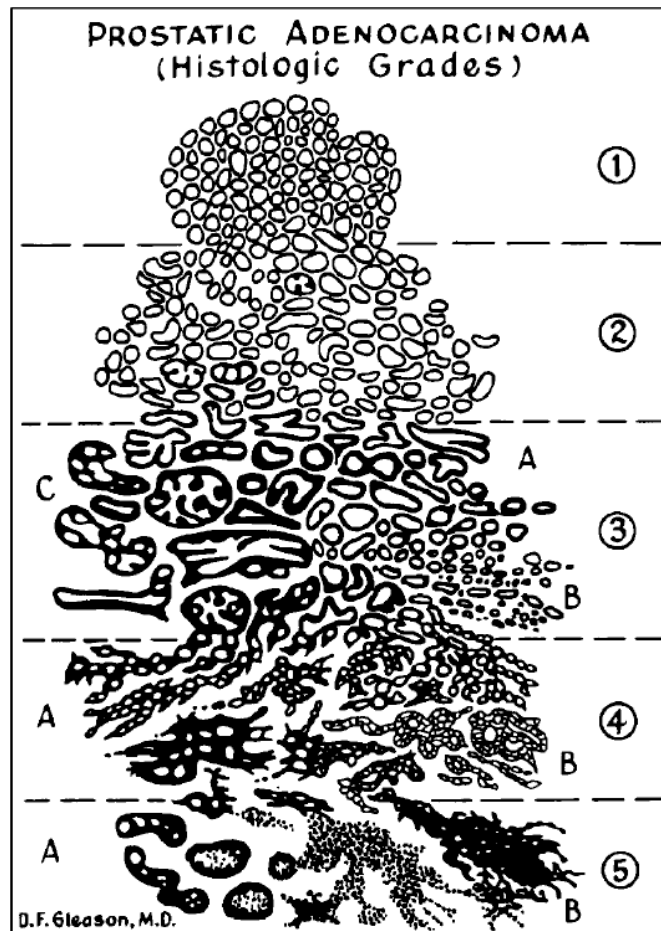


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Gleason-Grade nach Gleason [7]. Die Differenzierung des dargestellten Prostatagewebes nimmt bei steigendem Grad ab.

1.1.3. Diagnostik, Staging und Therapie

Das Prostatakarzinom bereitet im Frühstadium nur selten Schmerzen und Symptome. Das liegt daran, dass es überwiegend in der peripheren Zone der Prostata entsteht. Es kommt dadurch seltener zur Beeinträchtigung der Harnröhre als zum Beispiel bei der benignen Prostatahyperplasie. Dementsprechend ist eine Früherkennung sinnvoll. Von der deutschen Gesellschaft für Urologie wird diese in Deutschland ab dem 45. Lebensjahr empfohlen, ist ein Verwandter ersten Grades betroffen, auch schon ab dem 40. Lebensjahr [10]. Sie besteht aus einer digital-rektalen Untersuchung und der Bestimmung des prostataspezifischen Antigens (PSA). Letztere ist eine von den Krankenkassen nicht bezahlte Zusatzleistung, da die PSA-Bestimmung auch heute noch kontrovers diskutiert wird [11]. Bei auffälligem Tastbefund oder

einem PSA > 4 ng/ml beziehungsweise einem jährlichen Anstieg um > 0,5 ng/ml sollte eine Stanzbiopsie vorgenommen werden. Diese aus gewöhnlich zwölf Stanzzyllindern bestehende Gewebeentnahme sichert die Diagnose. Liegt ein Prostatakarzinom vor, muss es genauer klassifiziert werden. Dazu zählen der bereits erwähnte Gleason-Score und die Anzahl der positiven Stanzzyylinder. Zur Festlegung des lokalen (klinischen) Tumorstadiums cT wird neben der digital-rektalen Untersuchung ein transrektaler Ultraschall eingesetzt. Zunehmend wird auch auf ein Prostata-MRT zurückgegriffen. Zur Bestimmung von Metastasen wird eine Computertomografie durchgeführt sowie eine Skelettszintigrafie, da das Prostatakarzinom regelmäßig in Knochen streut. Bei PSA-Werten unter 10 ng/ml kann man davon ausgehen, dass keine Metastasen erkennbar sind und es wird in der Regel auf eine Szintigrafie verzichtet.

Liegt laut klinischer Untersuchung nur eine lokale Tumorausbreitung vor, kann man in kurativer Absicht therapieren. Operation der Wahl ist eine radikale Prostatovesikulektomie mit Lymphadenektomie oder eine lokale Strahlentherapie durch externe Bestrahlung oder Implantation von radioaktiven Partikeln (Brachytherapie). Bei Vorliegen von Metastasen eignet sich initial eine systemische Therapie mit Antiandrogenen und/oder GnRH-Analoga. Ziel ist dabei, den Testosteronspiegel im Sinne einer chemischen Kastration zu minimieren, da das Prostatakarzinomwachstum meist deutlich durch Androgene gefördert wird. Bei Skelettmetastasen wird zusätzlich eine Radiotherapie zur symptomatischen Behandlung durchgeführt. Kommt es unter antiandrogener Therapie zu einer Aktivitäts- und Größenzunahme des Prostatakarzinoms, erkennbar unter anderem durch wieder ansteigende PSA-Werte, spricht man von einem kastrationsresistenten Prostatakarzinom. In solchen Fällen war bis vor kurzem eine zytostatische Therapie mit Docetaxel Mittel der Wahl [10, 12]. In den letzten Jahren sind mehrere geeignete Medikamente hinzugekommen. Sie basieren zumeist auf neuen Einsichten in die molekularen Mechanismen der Prostatakarzinomprogression [13-17].

1.2 Bedeutung von Genexpressionsveränderungen für die Pathogenese des Prostatakarzinoms

1.2.1 Genexpression

Unter Genexpression versteht man im Wesentlichen die Ausprägung des Genotyps auf der Ebene der mRNA- und Proteinbiosynthese. Sie kann mit verschiedenen Techniken quantitativ und qualitativ erfasst werden. Für die Bestimmung von mRNA-Mengen steht mit der quantitativen Reverse-Transkriptase Polymerasekettenreaktion RT-PCR (qRT-PCR) eine Technik zur Verfügung, die für praktisch alle mRNAs über sehr große Konzentrationsbereiche hinweg eine präzise Quantifizierung erlaubt. Vergleichbar universelle Methoden stehen für die Untersuchung von Proteinen derzeit noch nicht zur Verfügung. Daher stützen sich viele Untersuchungen zur Veränderung der Genexpression in Tumoren, wie auch im Prostatakarzinom, auf die Methodik der qRT-PCR. Um die Expression verschiedener Gene miteinander vergleichen zu können, wird ein Referenzgen („Haushaltsgen“) zu Hilfe genommen, beispielsweise *TBP*, das für das in allen Zellen in etwa vorkommende *TATA box binding protein* kodiert. Dieses Gen weist sowohl im Prostatakarzinom als auch im normalem Prostatagewebe eine gleichbleibende Expression auf [18].

Bei der qRT-PCR wird meist die Expression eines einzelnen Gens bestimmt; durch geeignete Modifikationen können zwei oder mehr gleichzeitig erfasst werden. Zur Bestimmung der Expression einer großen Anzahl von Genen (bis hin zu allen bekannten) sind andere Techniken notwendig. Diese Verfahren sind aber nicht so präzise und v. a. nicht über einen so großen Expressionsbereich aussagekräftig. In der Prostatakarzinomforschung hat die Verwendung von Microarray-basierten Expressionsmessungen dennoch zu wichtigen Fortschritten geführt [19]. Dazu gehören die Entdeckung von Markerproteinen wie AMACR und Hepsin (Gen: *HPN*) [20, 21] und wichtige Einsichten in pathogenetische Mechanismen wie die Entdeckung von Fusionsgenen mit ETS-Transkriptionsfaktoren (Gene: *ERG*, *ETV1*) [22] und die Überexpression des Chromatinregulatorproteins EZH2 [23].

Veränderte Genexpression in Tumoren spiegelt letztendlich die genetischen und epigenetischen Aberrationen in den Tumorzellen wider. Im Prostatakarzinom sind v. a. numerische und strukturelle chromosomale Veränderungen von Bedeutung. Dies betrifft den Verlust, aber auch die Zunahme von bestimmten Chromosomenabschnitten in den Tumorzellen [2, 24, 25]. Ein gut untersuchtes Beispiel ist Chromosom 8, mit häufigen Zugewinnen im langen Arm (8q22, 8q24) und häufigen Verlusten im kurzen Arm (8p21–22). Dabei wird man zunächst davon ausgehen, dass chromosomale Verluste zu verminderter Expression der betroffenen Gene führen, Zugewinne (einschließlich Amplifikationen) zu verstärkter Expression. Allerdings kann dieses Prinzip durch regulatorische und epigenetische Effekte modifiziert werden. Charakteristisch für das Prostatakarzinom sind strukturelle chromosomale Veränderungen in Form von Translokationen, Inversionen und anderen Rekombinationen. Diese Veränderungen geschehen oftmals in Form einer Kettenreaktion, bei der mehrere strukturelle Veränderungen gleichzeitig gebildet werden [2, 26].

Die Rate an Punktmutationen ist im Prostatakarzinom im Vergleich zu anderen Karzinomen recht niedrig [2, 27]. Betroffen ist beispielsweise HOXB13, bei dem zusätzlich bestimmte Genpolymorphismen mit einer aggressiveren Form der Erkrankung einhergehen [28, 29]. Ein weiteres Beispiel ist der Androgenrezeptor, dessen Mutation in Primärtumoren selten ist. In kastrationsresistenten Tumoren finden sich jedoch vermehrt Punktmutationen oder Genamplifikationen [30, 31]. Mutationen der Tumorsuppressoren p53 und PTEN treten ebenfalls nur in einem kleinen Prozentsatz der Primärtumoren auf, werden mit der Progression jedoch häufiger. PTEN ist häufig von Deletionen betroffen. Das am häufigsten mutierte Gen ist SPOP in bis zu 15 % der Fälle; seine Funktion ist noch nicht völlig geklärt [32]. Messungen der Genexpression erfassen Punktmutationen nur dann, wenn sie sich in einer verringerten oder erhöhten Stabilität der mRNA niederschlagen (z. B. bei manchen Nonsense-Mutationen). Die indirekten Konsequenzen der Mutationen, also beispielsweise die veränderte Expression von Zielgenen eines mutierten Transkriptionsfaktors, werden aber erfasst. Wesentliche Veränderungen der Genexpression in Tumoren kommen weiterhin durch epigenetische Veränderungen zustande. Im Prostatakarzinom ist besonders die DNA-Hypermethylierung von großer

Bedeutung. Sie erfasst die CpG-reichen Promotoren einer ganzen Anzahl von Genen und geht häufig mit verminderter Expression des betroffenen Gens einher [33-35].

Eine weitere wichtige Rolle im Prostatakarzinom spielen die Gene (beziehungsweise deren Genprodukte) der ETS-Familie. Dabei handelt es sich um eine größere Gruppe von Transkriptionsfaktoren, die verschiedene Funktionen auf Zelldifferenzierung [36], Zellzyklus [37], Zellproliferation [38] und Apoptose [39] ausüben. Gemein ist allen eine hochkonservierte DNA-Bindestelle im Promoter ihrer Zielgene [40]. Ein wichtiges Mitglied der ETS-Familie ist das Gen *ERG*. In 50 % der Fälle von Prostatakarzinom kommt es zu einer Genfusion von *TMPRSS2* mit diesem Gen, sodass ERG deutlich überexprimiert wird. Dies rührt daher, dass ERG nach Translokation unter die Kontrolle des Androgen-Rezeptors gerät [22, 41]. Seine Überexpression ist vor allem mit Übergang zum eigentlichen invasiven Karzinom assoziiert [42]. Heute dient dieser Umstand zunehmend der Klassifizierung des Prostatakarzinoms [43]. Ein weiteres Mitglied der ETS-Familie ist *ETV1*. Es kann ebenfalls zu einer Translokation mit *TMPRSS2* kommen, die dann in Verbindung mit einem *PTEN*-Verlust zu einem deutlich aggressiven Karzinom führt, über Verstärkung und Veränderung der Wirkung des Androgen-Rezeptors [44, 45].

1.2.2 Zielsetzung der Arbeit

Im Laufe der Zeit wurden im Forschungslabor der Urologischen Klinik im Rahmen verschiedener eigenständiger Einzelprojekte von verschiedenen Personen die Genexpressionen von über 71 Genen per qRT-PCR gemessen. Beispielsweise wurde in einer Dissertation die Auswirkung von Allelverlusten auf Chromosom 8p auf die Expression darauf lokalisierter Gene wie *CSMD1*, *DLC1*, *NKX3.1*, *TNFRSF10A-D* und anderer betrachtet [46]. Eine andere Arbeit beschäftigte sich mit Veränderungen von epigenetischen Regulatoren der Polycomb-Gene *BMI-1*, *EZH2* und *SIRT1* sowie DNA-Methyltransferasen (*DNMT* Gene) [23]. Viele Messungen schlossen an Ergebnisse einer Microarraystudie der Arbeitsgruppe [47] an, die u. a. auf eine veränderte Expression von Fibulinen (FBLN-Gene), extrazellulären Matrixproteinen,

hinwies, die in Tumoren im Zusammenhang mit Invasion und Progression diskutiert werden [48].

In meiner Arbeit sind diese Genexpressionsdaten zum einen nochmals auf ihren Zusammenhang mit aktualisierten klinischen Daten ausgewertet worden. Dies umfasst die Betrachtung jeder Genexpression im Verhältnis mit Tumorstadium, Lymphknotenstatus, Gleason-Score und einer Kaplan-Meier-Analyse zum biochemischen Rezidiv. Zum anderen wurde das Verhältnis der Genexpression der verschiedenen Gene zueinander in ihrer Gesamtheit in einer Korrelations- und Clusteranalyse ermittelt. Durch die Entdeckung onkogener Fusionsgene im Prostatakarzinom in den Jahren 2005/2006 ergab sich eine weitere neue Fragestellung. Es wurde analysiert, inwieweit die in der Arbeitsgruppe gemessenen Veränderungen der Genexpression in Karzinomen mit oder ohne ERG-Überexpression unterschiedlich waren. Es war ferner berichtet worden, dass in etwa 10 % aller Prostatakarzinome eine gesteigerte Expression des Gens *SPINK1* auftritt, jedoch so gut wie nie zusammen mit der *ERG*-Translokation [49]. Dies ist von besonderem Interesse, da solche Karzinome möglicherweise mit Antikörpern gegen *SPINK1* therapiert werden könnten [50]. Daher wurde auch der Zusammenhang der Genexpression mit *SPINK1* analysiert.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Gewebeproben

Grundlage der Studie waren Gewebeproben von Patienten mit Prostatakarzinom, die in der Urologischen Klinik Düsseldorf im Zeitraum von 1995 bis 2002 mittels radikaler Prostatektomie behandelt wurden. Nach pathologischer Begutachtung der Proben wurden diese unverzüglich in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Gemeinsame Expressionsdaten lagen für 45 Proben vor, aus denen qualitativ hochwertige RNA gewonnen worden war. Diese sind klinisch vollständig klassifiziert worden. Bei den erhobenen Parametern handelt es sich um die klassische TNM-Klassifikation, den Gleason-Score sowie im Verlauf aufgetretene biochemische Rezidive. Ansonsten liegen noch weitere Daten vor, wie Datum der Operation, prä- und postoperativer PSA-Wert und ob eine R0-Resektion erreicht werden konnte oder nicht. Die jeweiligen Untersuchungen wurden durch mehrfache Voten der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität gebilligt (Ethikvoten der Ethikkommission der Heinrich-Heine Universität 1352, 2114, 2957).

In der folgenden Tabelle 2.1.1 sind die wichtigen klinischen Parameter aufgeführt.

Tabelle 2.1.1: Untersuchte Proben

P.-Nr.	Alter bei OP	T	N	M	Gleason 1	Gleason 2	Gleason-Score	R0-Resektion	Präop. PSA-Wert (ng/ml)	Postop. PSA-Wert (ng/ml)
36	73	pT3b	N0	M0	4	3	7	1	32,0	0,8
38	75	pT2b	N0	M0	3	4	7	0	6,7	0,1
50	56	pT3b	N1	M0	4	3	7	1	0,9	0,5

Material und Methoden

65	59	pT3b	N0	M0	4	3	7	0	17,1	0,8
83	70	pT3b	N0	M0	3	4	7	1	36,9	0,9
89	67	pT2b	N0	M0	2	1	3	1	4,3	0,2
93	72	pT3b	N0	M0	3	4	7	0	5,0	0,1
95	74	pT3b	N1	M0	5	5	10	1	28,0	0,6
97	71	pT3a	N0	M0	3	4	7	1	8,3	
99	67	pT2b	N0	M0	3	2	5	1	10,6	0,3
105	59	pT3a	N0	M0	3	2	5	0	8,3	0,8
107	59	pT3a	N0	M0	3	4	7	1	24,5	0,7
117	67	pT3b	N0	M0	3	2	5	1	11,3	0
121	65	pT2b	N0	M0	2	4	6	1	15,6	0,5
127	71	pT2b	N0	M0	3	3	6	1	12,3	0,3
133	72	pT2b	N1	M0	4	3	7	1	11,5	0,1
137	73	pT2b	N0	M0	3	5	8	1	n. b.	n. b.
139	64	pT3b	N1	M0	4	5	9	1	0,3	0
141	68	pT2b	N0	M0	3	1	4	1	12,5	0
145	70	pT4	N1	M0	4	3	7	0	39,1	5,2
161	63	pT2b	N0	M0	3	2	5	0	9,9	0,1
163	65	pT3a	N1	M0	3	2	5	1	7,8	0,3
169	71	pT3a	N0	M0	3	4	7	0	12,6	0,3
171	60	pT2b	N0	M0	3	2	5	1	23,9	0,7
175	73	pT2b	N0	M0	5	3	8	0	13,8	0,3
183	67	pT3a	N0	M0	4	2	6	0	21,0	0,8
187	68	pT2b	N0	M0	3	5	8	1	1,5	0
189	63	pT2b	N0	M0	4	3	7	0	5,3	n. b.
191	71	pT2b	N0	M0	3	4	7	1	5,0	0,2
205	72	pT3a	N0	M0	4	3	7	1	17,0	0,4
209	70	pT3a	N0	M0	4	3	7	1	n. b.	n. b.
213	59	pT2a	N0	M0	4	3	7	0	4,4	0,2
215	58	pT3a	N0	M0	3	4	7	1	0,1	0,8
217	62	pT2b	N0	M0	3	5	8	0	12,5	0,7
219	63	pT4	N1	M0	4	3	7	1	155	0,4
225	61	pT3b	N0	M0	3	3	6	0	10,7	1,9

227	71	pT2a	N1	M0	3	4	7	0	5,7	0,4
230	67	pT2a	N0	M0	3	4	7	0	12,9	n. b.
232	69	pT2b	N1	M0	3	4	7	0	10,0	0,5
236	73	pT3a	N0	M0	3	4	7	1	5,0	0,2
238	61	pT2a	N0	M0	3	3	6	1	4,1	0,3
245	65	pT3a	N0	M0	4	3	7	0	1,4	0,1
247	54	pT3b	N1	M0	4	3	7	1	40,5	2
253	71	pT3a	N1	M0	3	4	7	1	6,5	0,5
256	71	pT3b	N0	M0	4	3	7	0	9,6	0,7

2.1.2 Expressionsbestimmung

An diesen Proben wurden die mRNA-Expression von verschiedenen Genen von unterschiedlichen Mitarbeitern des Urologischen Forschungslabors gemessen. Die Ergebnisse sind zumeist publiziert. In der folgenden Tabelle 2.1.2 sind die gemessenen Gene, die jeweiligen Mitarbeiter sowie die zugehörigen Publikationen aufgeführt.

Tabelle 2.1.2: Untersuchte Gene, Untersucher und Publikation

Gen	Gen-Kurzbezeichnung	Mitarbeiter des urologischen Labors, der die Messung vorgenommen hat	Publikation
Angiopoeitin 2	<i>ANGPT2</i>	C Hader	n. p.
AXL receptor tyrosine kinase	<i>AXL</i>	C Hader	n. p.
BRCA2 and CDKN1A interacting protein	<i>BCCIP</i>	C Hader	n. p.
BMI1 polycomb ring finger oncogene	<i>BMI1</i>	M Hoffmann	[23]
caspase recruitment domain family, member 8	<i>CARD8</i>	S Bleckmann	n. p.
CUB and Sushi multiple domains 1	<i>CSMD1</i>	M Hornstein	[46]
contactin 1	<i>CNTN1</i>	A Vinarskaja	n. p.

coenzyme Q7 homolog	<i>COQ7</i>	P Sieron	n. p.
dyskeratosis congenita 1	<i>DKC1</i>	P Sieron	[51]
deleted in liver cancer 1	<i>DLC1</i>	M Hornstein	[46]
discs, large homolog 1	<i>DLG1</i>	C Djuidje	[52]
DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1	<i>DNMT1</i>	F Kimura, M Hoffmann	[23]
DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3 beta	<i>DNMT3B</i>	F Kimura, M Hoffmann	[23]
erythrocyte membrane protein band 4.1-like 2	<i>EPB41L2</i>	C Hader	[52]
erythrocyte membrane protein band 4.1-like 3	<i>EPB41L3</i>	C Djuidje, C Hader	[47]
erythrocyte membrane protein band 4.1 like 4B	<i>EPB41L4B</i>	C Djuidje, C Hader	[47]
erythrocyte membrane protein band 4.1 like 5	<i>EPB41L5</i>	C Djuidje	[52]
erythrocyte membrane protein band 4.9 (dematin)	<i>EPB49</i>	C Djuidje	[52]
ets variant 1	<i>ETV1</i>	W Göring	[52]
v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog	<i>ERG</i>	T Ribarska	[52]
enhancer of zeste homolog 2	<i>EZH2</i>	M Hoffmann	[23]
fibulin 1C/D	<i>FBLN1C/D</i>	A Wlazlinski	[48]
EGF containing fibulin-like extracellular matrix protein 2	<i>FBLN4</i>	A Wlazlinski	[48]
fibulin 5	<i>FBLN5</i>	A Wlazlinski	[48]
fibroblast growth factor receptor 1	<i>FGFR1</i>	M Hornstein	[46]
forkhead box A1	<i>FOXA1</i>	M Yamanaka	n. p.
growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha	<i>GADD45A</i>	C Hader	[53]
growth arrest-specific 6	<i>GAS6</i>	C Hader	n. p.
GATA binding protein 3	<i>GATA3</i>	C Hader	n. p.

GLI family zinc finger 1	<i>GLI1</i>	C Hader	n. p.
hedgehog interacting protein	<i>HIP/HHIP</i>	C Hader	n. p.
homeobox B13	<i>HOXB13</i>	M Yamanaka	[47]
homeobox C6	<i>HOXC6</i>	M Yamanaka	[54]
hepsin	<i>HPN</i>	C Hader	[47]
human telomerase RNA-subunit 1	<i>HTR1</i>	P Sieron	[51]
inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase epsilon	<i>IKBKE</i>	S Bleckmann	n. p.
inhibitor of DNA binding 4, dominant negative helix-loop-helix protein	<i>ID4</i>	A Vinarskaja	[55]
interleukin 24	<i>IL24</i>	S Bleckmann, C Hader	n. p.
insulin receptor substrate 2	<i>IRS2</i>	S Fritzsche	n. p.
Janus kinase 1	<i>JAK1</i>	S Bleckmann	n. p.
lysine (K)-specific demethylase 3A	<i>JMJD1A</i>	T Ribarska	n. p.
klotho	<i>KL</i>	P Sieron	n. p.
latexin	<i>LXN</i>	M Kloth	[56]
antigen identified by monoclonal antibody Ki-67	<i>MKI67</i>	A Wlazlinski	[57]
macrophage scavenger receptor 1	<i>MSR1</i>	C Hader	n. p.
myxovirus (influenza virus) resistance 1, interferon-inducible protein p78	<i>MX1</i>	C Hader	[47]
NK3 homeobox 1	<i>NKX3.1</i>	M Yamanaka	[46]
tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b	<i>OPG</i>	M Hornstein	[46]
proliferating cell nuclear antigen	<i>PCNA</i>	C Hader	n. p.
protein phosphatase 2, catalytic subunit, beta isozyme	<i>PPP2CB</i>	M Hornstein	[46]
protein phosphatase 3,	<i>PPP3CC</i>	M Hornstein	[46]

catalytic subunit, gamma isozyme			
patched 1	<i>PTCH1</i>	C Hader	n. p.
paraoxonase 2	<i>PON2</i>	T Ribarska	[58]
sonic hedgehog	<i>SHH</i>	C Hader	n. p.
sirtuin 1	<i>SIRT1</i>	M Hoffmann	[23]
SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily d, member 3	<i>SMARCD3</i>	C Hader	n. p.
smoothened, frizzled family receptor	<i>SMO</i>	C Hader	n. p.
serine peptidase inhibitor, Kazal type 1	<i>SPINK1</i>	J Iken	n. p.
sparc/osteonectin, cwcw and kazal- like domains proteoglycan (testican) 1	<i>SPOCK1</i>	A Wlazlinski	[52]
sprouty homolog 1, antagonist of FGF signaling	<i>SPRY1</i>	S Fritzsche	[59]
sprouty homolog 2	<i>SPRY2</i>	S. Fritzsche	[59]
tenascin C	<i>TENASCIN</i>	A Wlazlinski	[48]
tissue factor pathway inhibitor (lipoprotein- associated coagulation inhibitor)	<i>TFPI1</i>	T Ribarska	[58]
tissue factor pathway inhibitor 2	<i>TFPI2</i>	T Ribarska	[58]
toll-like receptor 3	<i>TLR3</i>	C Hader	[47]
tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10a	<i>TNFRSF10A/DR4</i>	M Hornstein	[46]
tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b	<i>TNFRSF10B/DR5</i>	M Hornstein	[46]
tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10c	<i>TNFRSF10C/DcR1</i>	M Hornstein	[46]
tumor necrosis factor receptor superfamily,	<i>TNFRSF10D/DcR2</i>	M Hornstein	[46]

member 10d			
ezrin	VIL2	C Djuidje	[52]

2.1.3 Excel-Version 2003/2010

Zur Zusammenführung der Genexpressionsdaten wurde das von der Firma Microsoft produzierte Excel-Programm genutzt. Zwischenzeitlich wurde im Verlauf der Arbeit auf die aktuelle Version aus dem Jahre 2010 gewechselt.

2.1.4 PAWS/SPSS Statistik-Programm

Zur statistischen Auswertung und zur Zusammenführung der Expressionsdaten mit den Patientendaten wurde das von IBM herausgegebene Statistikprogramm SPSS/PAWS verwendet. Aufgrund von nur immer jährlich vorhandenen Jahreslizenzen wurden die Versionen 17-21 verwendet. Die Ergebnisse sind in den jeweiligen Versionen konstant geblieben.

2.2 Methoden

2.2.1 qRT-PCR

Alle Genexpressionen wurden mit der Methode der quantitativen Reverse-Transkriptase PCR (qRT-PCR) bestimmt. Die betrachteten Messungen wurden im Zeitraum von etwa acht Jahren vorgenommen. Daher ergaben sich im Einzelnen Veränderungen der Methodik; es wurden prinzipiell zwei Verfahren angewendet. Berücksichtigt wurden nur Expressionsmessungen, die auf das Referenzgen TBP adjustiert waren.

Alle verwendeten RNA-Präparationen wurden von derselben Person (C Hader) mit der gleichen Methodik isoliert. Verwendetes Verfahren war das Homogenisieren der Proben in Trizol-Reagenz. Nach Inkubation bei Raumtemperatur (RT) wurde Chloroform zugegeben und durchmischt. Nach erneuter Inkubation bei RT und anschließender Zentrifugation wurde die RNA-haltige Phase abpipettiert und mit Isopropanol versetzt. Nach erneuter Inkubation und Zentrifugation verblieb die RNA als Niederschlag. Dieser wurde mit Ethanol gewaschen und nach Trocknen wurde die RNA-Phase in RNase-freiem Wasser resuspendiert. Anschließend wurde die RNA zu cDNA umgeschrieben; dabei wurde durchgehend die Reverse Transkriptase SuperScript II (Fa. Invitrogen) verwendet.

Die qRT-PCR wurde entweder mittels Taqman-Verfahren oder mit einem SYBRGreen-MasterMix der Fa. Qiagen durchgeführt. Im letzteren Falle wurden entweder eigene Primer entworfen oder Primerpaare der Fa. Qiagen käuflich erworben. Als Messinstrumente kamen PCR-Cycler der Fa. Applied Biosystems oder der Roche-Lightcycler 2.0 zum Einsatz. Für jedes Gen wurde in jeder Messung eine Standardkurve zur Qualitätskontrolle und relativen Quantifizierung mitgeführt. Als Standard wurde in der Regel eine cDNA aus einer Zelllinie oder einem benignen Prostatagewebe mit maximaler Expression verwendet. Die Höhe der Expressionswerte ist insofern willkürlich und daher nicht zwischen verschiedenen Genen absolut vergleichbar. Alle PCR-Produkte wurden über Schmelzkurven und zumeist zusätzlich über Agarose-Elektrophorese auf Spezifität kontrolliert. Die Auswertung der Ergebnisse

erfolgte mit der zum Cyclor gehörenden Software und weiter nach deren Übertragung in Excel.

Das beispielsweise von Max Hornstein verwendete Verfahren für die qRT-PCR mittels SYBRGreen-MasterMix beruht auf einem Fluoreszenzfarbstoff, der sich spezifisch an Doppelstrang-DNA anlagert. Nach Bindung steigt die Fluoreszenzintensität an, welche vom PCR-Cyclor in Echtzeit gemessen wird. In jedem Zyklus kommt es zu einer Verdopplung der DNA mit einer im Verhältnis dazu stehenden Verstärkung der Fluoreszenz. Anhand der im gleichen Lauf ermittelten Standardkurven kann dann die relative Expression abgeleitet werden. Nachteil dieses Verfahrens ist, dass der Fluoreszenzfarbstoff an jede Doppelstrang-DNA bindet, das heißt auch an unspezifische PCR-Produkte und Primer-Dimere. Als weitere Qualitätskontrolle wird daher routinemäßig eine Prüfung des Schmelzpunkts des entstandenen Produkts durchgeführt.

Das von Agnes Wlazlinski verwendete Verfahren mittels TaqMan-Sonden beruht auf einem etwas anderen Mechanismus. Dabei handelt es sich um eine Hydrolyse-Sonde, die an den Enden mit einem sogenannten Quencher bzw. einem Fluorophor markiert ist. Die Sonde bindet spezifisch am Amplifikat zwischen dem verwendeten Primer-Paar für das Zielgen. Es wird regulär durch die Primer das entsprechende Gen amplifiziert. Aufgrund einer 5'-3'-Exonucleaseaktivität der verwendeten Polymerase bei dieser PCR kommt es dann zum Abbau der Sonde. Dadurch geraten Fluorophor und Quencher auseinander, wodurch die Fluoreszenz detektierbar wird. Der Vorteil dieses Verfahrens ist, dass die Spezifität der so durchgeführten qRT-PCR gegenüber dem Verfahren mittels SYBR-Green-Detektion größer ist, allerdings ist es im Vergleich teurer.

Die so für die zahlreich gemessenen Gene entstandenen Daten wurden im Labor zentral digital gesammelt. Sie wurden in eine neue Datenbank überführt, die Grundlage für die hier beschriebenen Untersuchungen gewesen ist. Dabei wurden die Daten sowohl als Ct-Werte der Zielgene im Verhältnis zu entsprechenden Ct-Werten des Referenzgens TBP eingefügt. Zusätzlich erfolgte eine Normierung zu prozentualen Werten der Expression ausgehend

vom Verhältnis zu den gemessenen relativen Expressionswerten in benignen Geweben. Der Mittelwert der Expression in den benignen Proben wurde dabei als 100 % definiert. Im Ergebnisteil sind die Expressionsdaten meistens als Boxplots dargestellt, da nicht alle Messwerte normal verteilt sind.

Die erarbeitete Datenbank erfasst die in folgender Tabelle 2.2.1 enthaltenen Gene.

Tabelle 2.2.1: Liste der in der Datenbank enthaltenen Gene

Gen	Gen-Kurzbezeichnung	Chromosomenlokalisierung
Angiopoeitin 2	<i>ANGPT2</i>	8p23.1
AXL receptor tyrosine kinase	<i>AXL</i>	19q13.2
BRCA2 and CDKN1A interacting protein	<i>BCCIP</i>	10q26.2
BMI1 polycomb ring finger oncogene	<i>BMI1</i>	10p12.2
caspase recruitment domain family, member 8	<i>CARD8</i>	19q13.33
CUB and Sushi multiple domains 1	<i>CSMD1</i>	8p23.2
contactin 1	<i>CNTN1</i>	12q12
coenzyme Q7 homolog	<i>COQ7</i>	16p12.3
dyskeratosis congenita 1	<i>DKC1</i>	Xq28
deleted in liver cancer 1	<i>DLC1</i>	8p22
discs, large homolog 1	<i>DLG1</i>	3q29
DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 1	<i>DNMT1</i>	19p13.2
DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 beta	<i>DNMT3B</i>	20q11.21
erythrocyte membrane protein band 4.1-like 2	<i>EPB41L2</i>	6q21.2
erythrocyte membrane protein band 4.1-like 3	<i>EPB41L3</i>	18p11.31
erythrocyte membrane protein band 4.1 like 4B	<i>EPB41L4B</i>	9q31.3
erythrocyte membrane protein band 4.1 like 5	<i>EPB41L5</i>	2q14.2
erythrocyte membrane protein band 4.9 (dematin)	<i>EPB49</i>	8p21.3
ets variant 1	<i>ETV1</i>	7p21.2
v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog	<i>ERG</i>	21q22.2
enhancer of zeste homolog 2	<i>EZH2</i>	7q36.1

fibulin 1C/D	<i>FBLN1C/D*</i>	22q13.31
EGF containing fibulin-like extracellular matrix protein 2	<i>FBLN4</i>	11q13.1
fibulin 5	<i>FBLN5</i>	14q32.12
fibroblast growth factor receptor 1	<i>FGFR1</i>	8p11.22-11.23
forkhead box A1	<i>FOXA1</i>	14q21.1
growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha	<i>GADD45A</i>	1p31.3
growth arrest-specific 6	<i>GAS6</i>	13q34
GATA binding protein 3	<i>GATA3</i>	10p14
GLI family zinc finger 1	<i>GLI1</i>	12q13.3
hedgehog interacting protein	<i>HIP/HHIP</i>	4q31.21
homeobox B13	<i>HOXB13</i>	17q21.31
homeobox C6	<i>HOXC6</i>	12q13.13
hepsin	<i>HPN</i>	19q13.12
human telomerase RNA-subunit 1	<i>HTR1</i>	
inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase epsilon	<i>IKBKE</i>	1q32.1
inhibitor of DNA binding 4, dominant negative helix-loop-helix protein	<i>ID4</i>	6p22.3
interleukin 24	<i>IL24</i>	1q32.1
insulin receptor substrate 2	<i>IRS2</i>	13q34
Janus kinase 1	<i>JAK1</i>	1p31.3
lysine (K)-specific demethylase 3A	<i>JMJD1A</i>	2p11.2
klotho	<i>KL</i>	13q13.1
latexin	<i>LXN</i>	3q25.32
antigen identified by monoclonal antibody Ki-67	<i>MKI67</i>	10q26.2
macrophage scavenger receptor 1	<i>MSR1</i>	8p22
myxovirus (influenza virus) resistance 1, interferon-inducible protein p78	<i>MX1</i>	21q22.3
NK3 homeobox 1	<i>NKX3.1</i>	8p21.2
tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b	<i>OPG</i>	8q24.12
proliferating cell nuclear antigen	<i>PCNA</i>	20p12.3
protein phosphatase 2, catalytic subunit, beta isozyme	<i>PPP2CB</i>	8p12
protein phosphatase 3, catalytic subunit, gamma	<i>PPP3CC</i>	8p21.3

isozyme		
patched 1	<i>PTC1</i>	9q22.32
paraoxonase 2	<i>PON2</i>	7q21.3
sonic hedgehog	<i>SHH</i>	7q36.3
sirtuin 1	<i>SIRT1</i>	10q21.3
SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily d, member 3	<i>SMARCD3</i>	7q36.1
smoothened, frizzled family receptor	<i>SMO</i>	7q32.1
serine peptidase inhibitor, Kazal type 1	<i>SPINK1</i>	5q32
sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan (testican) 1	<i>SPOCK</i>	5q31.2
sprouty homolog 1, antagonist of FGF signaling	<i>SPRY1</i>	4q28.1
sprouty homolog 2	<i>SPRY2</i>	13q31.3
tenascin C	<i>TENASCIN</i>	9q33.1
tissue factor pathway inhibitor (lipoprotein-associated coagulation inhibitor)	<i>TFPI1</i>	2q32.1
tissue factor pathway inhibitor 2	<i>TFPI2</i>	7q21.3
toll-like receptor 3	<i>TLR3</i>	4q35.1
tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10a	<i>TNFRSF10A/DR4</i>	8p21.2-21.3
tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b	<i>TNFRSF10B/DR5</i>	8p21.2-21.3
tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10c	<i>TNFRSF10C/DcR1</i>	8p21.3
tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10d	<i>TNFRSF10D/DcR2</i>	8p21.3
ezrin	<i>VIL2</i>	6q25.3

*Von *FBLN1* wurden zwei Spleißvarianten bestimmt, die als differentiell exprimiert beschrieben waren. Dies war jedoch in den prostatistischen Geweben nicht der Fall.

2.2.2 Klinische Datenakquise

Zur Aktualisierung der schon vorhandenen Patientendaten sind mir freundlicherweise von den Studienassistentinnen der Urologischen Klinik die

Patientenakten zur Verfügung gestellt worden. Die klinischen Daten wurden mit den vorhandenen Tabellen abgeglichen. Die Verlaufsdaten wurden telefonisch bei den nachsorgenden niedergelassenen Ärzten erhoben, soweit die Patienten nicht an der hiesigen Klinik betreut wurden. Als Nachweis eines biochemischen Rezidivs wurde ein Wert von Serum-PSA $> 0,2$ ng/ml in zwei aufeinander folgenden Messungen gewertet. Der mittlere Zeitpunkt zwischen diesen beiden Messungen wurde gewertet.

2.2.3 Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test

Alle Vergleiche von zwei Gruppen, die auf Expressionsdaten von Genen beruhen, wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test/Wilcoxon-Test durchgeführt. Dieser Test beruht im Gegensatz zum T-Test nicht auf einer parametrischen Verteilungsannahme für die Expressionsdaten. Er untersucht, ob sich die Verteilungen zweier Variablen unterscheiden, also speziell, ob die Genexpression von Tumorgewebe und Normalgewebe gleich ist oder ob ein Unterschied besteht.

2.2.4 Kruskal-Wallis-Test

Der Kruskal-Wallis-Test ist vergleichbar mit dem Mann-Whitney-U-Test. Er benötigt ebenfalls keine parametrische Verteilungsannahme für die Daten, allerdings können damit mehr als zwei Gruppen miteinander verglichen werden.

2.2.5 Korrelationsbestimmung nach Pearson

Die Korrelationsanalyse nach Pearson ist Mittel der Wahl bei parametrisch verteilten Daten. Voraussetzung für diesen Test ist mindestens die Annäherung an eine Normalverteilung. Der Korrelationsberechnung liegt des Weiteren die Bedingung zu Grunde, dass sich zwei Messgruppen linear zueinander verhalten. Daraus ergibt sich, dass dieser Test Zusammenhänge schlecht erkennt, die nicht linear sind.

2.2.6 Korrelationsbestimmung nach Spearman

Diese Korrelationsbestimmung ist geeignet für große Gruppen, in der nicht jede Messgruppe parametrisch verteilt ist. Basis dieses Tests ist die Bildung von Rängen einzelner Messwerte der Messgruppen; daher auch die Bezeichnung Rangkorrelation. Aus diesem Vorgehen ergibt sich seine Robustheit in Bezug auf Ausreißer.

2.2.7 Hierarchische Clusteranalyse

Die hierarchische Clusteranalyse fügt aufgrund ihrer Homogenität Variablen zu Clustern zusammen. Als Merkmal gilt hier die Expression. Hierarchisch bedeutet, dass die einzelnen Gruppen beziehungsweise Cluster als Stufe zusammengefasst sind und sich der Abstand zu den anderen Clustern immer mehr erhöht. Daraus lassen sich einzelne Gruppen abgrenzen.

2.2.8 Kaplan-Meier- und Log Rank-Test

Die Kaplan-Meier-Analyse dient der Untersuchung, ob ein Merkmal über die Zeit nach Erreichen eines Zustandes aufgetreten ist, abhängig von einer bestimmten Variable. Dabei beginnt jede Gruppe mit 100 %. Immer wenn ein Mitglied der Gruppe das Merkmal ausprägt, wird dieses entfernt. Dadurch senkt sich dann der Kurvenverlauf um den entsprechenden Anteil stufenartig ab. Der Log Rank-Test dient dem Vergleich dieser gebildeten Gruppen und besagt, ob eine Merkmalsausprägung abhängig von der Variable ist.

3. Ergebnisteil

3.1 Allgemeiner Teil

3.1.1 Summarischer Verlauf Follow-Up

In der Tabelle 3.1.1 sind die Daten zum erhobenen Follow-Up dargestellt. Von den 45 Patienten haben in der Beobachtungszeit 18 ein biochemisches Rezidiv entwickelt. Dabei ist das erste Rezidiv nach drei Monaten erfasst worden, das letzte nach 101 Monaten Beobachtungszeit. Die anschließende Abbildung 3.1.1 zeigt den Verlauf grafisch.

Tabelle 3.1.1: Follow-Up des Patientenkollektivs

Probennummer	PSA-Rezidiv	Zeit bis Rezidiv in Monaten	Follow-Up-Zeitraum in Monaten
36	Ja	34	150
38	Nein		141
50	Ja	21	142
65	Ja	27	133
83	Nein		115
89	Nein		75
93	Ja	53	118
95	Ja	5	120
97	Nein		105
99	Ja	76	120
105	Nein		104
107	Ja	6	103
117	Nein		80
121	Nein		119
127	Nein		115
133	Ja	27	111

Ergebnisteil

137	Ja	101	101
139	Ja	17	104
141	Nein		110
145	Nein		103
161	Nein		96
163	Nein		62
169	Nein		98
171	Ja	26	98
175	Nein		91
183	Ja	53	86
187	Nein		80
189	Nein		97
191	Nein		86
205	Ja	60	104
209	Nein		104
213	Nein		93
215	Nein		49
217	Nein		49
219	Nein		89
225	Nein		92
227	Nein		87
230	Ja	44	46
232	Ja	3	47
236	Nein		46
238	Nein		45
245	Nein		16
247	Ja	66	177
253	Ja	44	91
256	Ja	44	85
Summe	18		

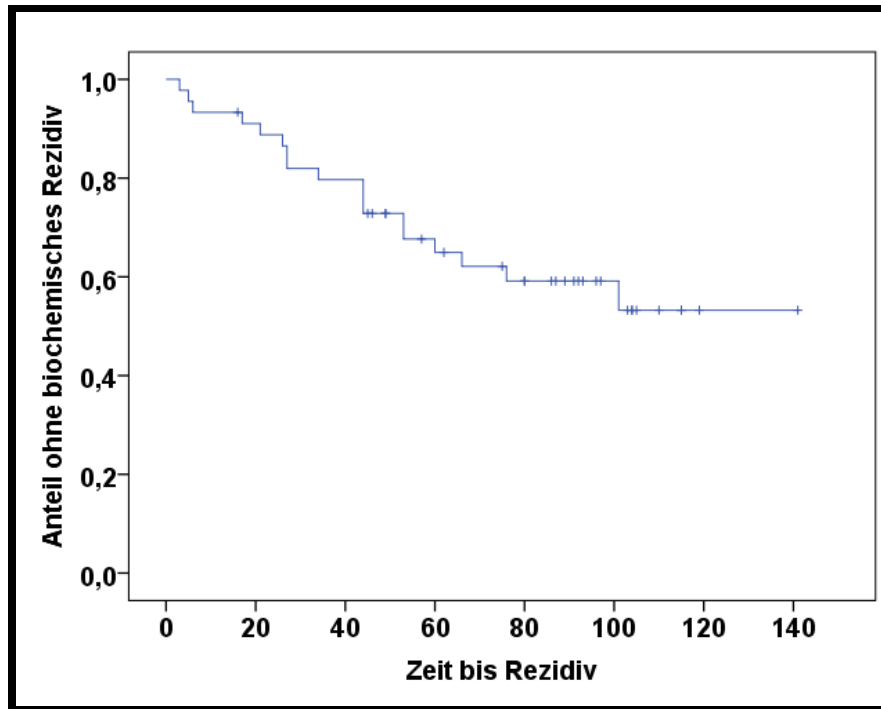


Abb. 3.1.1: Gesamtverlauf des Patientenkollektivs, bezogen auf das biochemische Rezidiv über die Beobachtungszeit in Monaten.

3.1.2 Genexpression

Die Genexpression ist anhand nachfolgender Parameter untersucht worden. In einem ersten Schritt wurde die quantitative Expression der im Material und Methoden-Teil aufgeführten Gene in den Tumorproben im Vergleich zu den Normalgewebeproben betrachtet. Daran anschließend erfolgte eine umfassendere Korrelationsanalyse der Gene untereinander. Darauf aufbauend wurde zuletzt eine hierarchische Clusteranalyse vorgenommen, welche aus den Expressionsdaten einzelne Gengruppen zusammenstellt, die eine ähnliche Expression in den Proben aufweisen.

3.1.2.1 Genexpressionsvergleich von Tumorproben zu Normalproben

In einem ersten Schritt sollte geklärt werden, welche gemessenen Gene überhaupt eine Veränderung in Karzinomgeweben aufweisen. Bei diesem Vergleich wurden die zuvor beschriebenen 45 Tumorproben und die 13 Proben aus als normal identifiziertem Prostatagewebe betrachtet (Tabelle 3.1.2). Für

jedes Gen wurden dann die qPCR-Daten verglichen. Als statistische Grundlage des Gruppenvergleichs wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet, da nicht alle Expressionswerte normal verteilt sind. Im Vergleich der Genexpression von Karzinom- und Normalgeweben zeigte sich eine Reihe signifikanter Unterschiede, die zum Teil schon vorher bekannt waren. Insgesamt waren 30 von 72 Genen signifikant verändert exprimiert, davon waren 16 vermindert und 14 verstärkt in Tumorgeweben. Die signifikanten Ergebnisse sind in Tabelle 3.1.2 aufgelistet und Abbildung 3.1.2 illustriert ausgewählte Beispiele. P-Werte sind deskriptiv zu verstehen, da nicht für multiples Testen korrigiert wird.

Tabelle 3.1.2: Verhältnis der Genexpression von Tumor- zu Normalgewebe

Gen	Regulation Tumor gegenüber Normalgewebe	Signifikanz p	Faktor der Regulation vom Median der Normalproben ausgehend
<i>CARD8</i>	Herunter	<0,001	0,53
<i>COQ7</i>	Herunter	<0,001	0,57
<i>DKC1</i>	Hoch	<0,001	1,29
<i>DNMT1</i>	Herunter	0,007	0,64
<i>DNMT3B</i>	Hoch	0,010	1,42
<i>TNFRS10C/DcR1</i>	Herunter	<0,001	0,62
<i>EPB41L3</i>	Herunter	<0,001	0,6
<i>EPB41L4B</i>	Hoch	0,001	1,78
<i>ERG</i>	Hoch	0,029	2,75
<i>FBLN1C</i>	Herunter	<0,001	0,44
<i>FBLN4</i>	Herunter	0,009	0,81
<i>FBLN5</i>	Herunter	0,004	0,71
<i>FOXA1</i>	Hoch	0,002	1,38
<i>GADD45A</i>	Herunter	<0,001	6,47
<i>GATA3</i>	Herunter	0,001	0,54
<i>HOXB13</i>	Hoch	0,013	1,34
<i>HOXC6</i>	Hoch	<0,001	14,1
<i>HPN</i>	Hoch	<0,001	4,19
<i>IRS-2</i>	Herunter	0,034	0,56
<i>JAK1</i>	Herunter	0,019	0,8
<i>MKI67</i>	Hoch	<0,001	2,38
<i>MX1</i>	Herunter	0,015	0,71
<i>NKX3.1</i>	Hoch	0,006	2,19
<i>PPP2CB</i>	Herunter	0,023	0,82
<i>PPP3CC</i>	Herunter	0,007	0,75
<i>PTC1</i>	Hoch	0,043	1,41
<i>SHH</i>	Hoch	0,004	3,52
<i>SMARCD3</i>	Herunter	<0,001	0,73

<i>SPOCK</i>	Hoch	0,047	1,43
<i>PON2</i>	Hoch	0,003	1,61

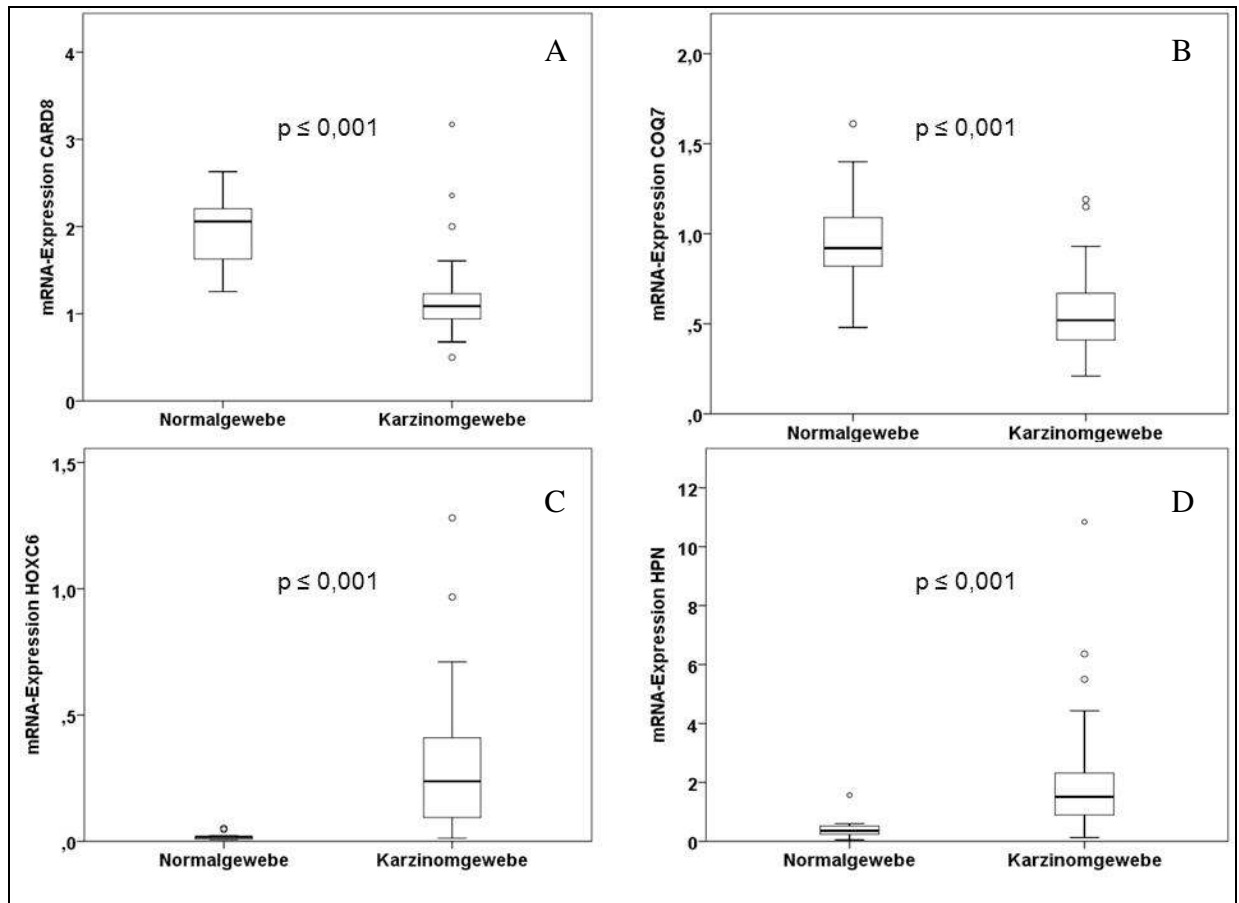


Abb. 3.1.2: Darstellung ausgewählter Beispiele zum Verhältnis der Genexpression im Karzinomgewebe zu normalem Prostatagewebe. Die Gene wurden ausgesucht entsprechend ihres Expressionsmusters mit deutlicher Regulation nach unten und oben. *CARD8* (A) und *COQ7* (B) sind im Karzinomgewebe signifikant schwächer exprimiert. *HOXC6* (C) und *HPN* (D) sind im Karzinomgewebe signifikant stärker exprimiert. *HPN* wird als Biomarker für das Prostatakarzinom diskutiert.

3.1.2.2 Korrelationsanalysen

In einem zweiten Schritt wurden die Genexpressionsdaten in einer Korrelationsanalyse paarweise untersucht. Hierfür wurden lediglich die Expressionsdaten der Karzinomgewebe verwendet. Ziel war dabei, Coexpressionen von Genen und damit etwaige gemeinsame Regulationsmechanismen auszumachen. In der Korrelationsanalyse nach Spearman zeigen sich zwischen einzelnen Genpaaren deutlich signifikante Werte mit jeweils hohem positiven beziehungsweise negativen Korrelationskoeffizienten. Eine positive Korrelation spricht für eine gleichgerichtete Veränderung der Expression. Eine negative Korrelation

bedeutet, dass vom Genpaar eines verstärkt, das andere in einem entsprechenden Verhältnis vermindert ist. Es wurden vor allem stark positiv korrelierte Genpaare gefunden, definiert über einen Korrelationskoeffizienten von $r > 0,7$ und einer Signifikanz von $p < 0,001$. Genpaare mit einem negativen Korrelationskoeffizienten von $r < -0,7$ und $p < 0,001$ waren deutlich seltener vorhanden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.1.3 zusammengestellt.

Tabelle 3.1.3: Genpaarungen mit entsprechenden Korrelationskoeffizienten

Genpaar	Korrelationskoeffizient
<i>EPB41L5 - EPB49</i>	0,860
<i>EPB41L4B - FOXA1</i>	0,860
<i>JAK1 - DKK3</i>	0,843
<i>FBLN1C - SMARCD3</i>	0,842
<i>FBLN4 - SMARCD3</i>	0,840
<i>EPB41L4B - SPOCK</i>	0,827
<i>EPB41L1 - GAS6</i>	0,787
<i>FBLN4 - GAS6</i>	0,783
<i>FOXA1 - HOXB13</i>	0,761
<i>FBLN1C - FBLN4</i>	0,752
<i>SPOCK - COQ7</i>	0,739
<i>FOXA1 - SPOCK</i>	0,727
<i>GATA3 - ID4</i>	0,716
<i>FBLN1D - SMARCD3</i>	0,713
<i>FBLN1C - CNTN1</i>	0,704
<i>EPB41L1 - FBLN4</i>	0,705
<i>FBLN4 - CNTN1</i>	0,704
<i>EPB41L3 - TNFRSF10C</i>	0,703
<i>EPB41L4B - FBLN1C</i>	-0,739
<i>FBLN1C - FOXA1</i>	-0,732
<i>FOXA1 - SMARCD3</i>	-0,782

Die Abbildung 3.1.3 zeigt ausgewählte Beispiele für hohe positive Korrelationen mit dem jeweiligen Streuungsmuster.

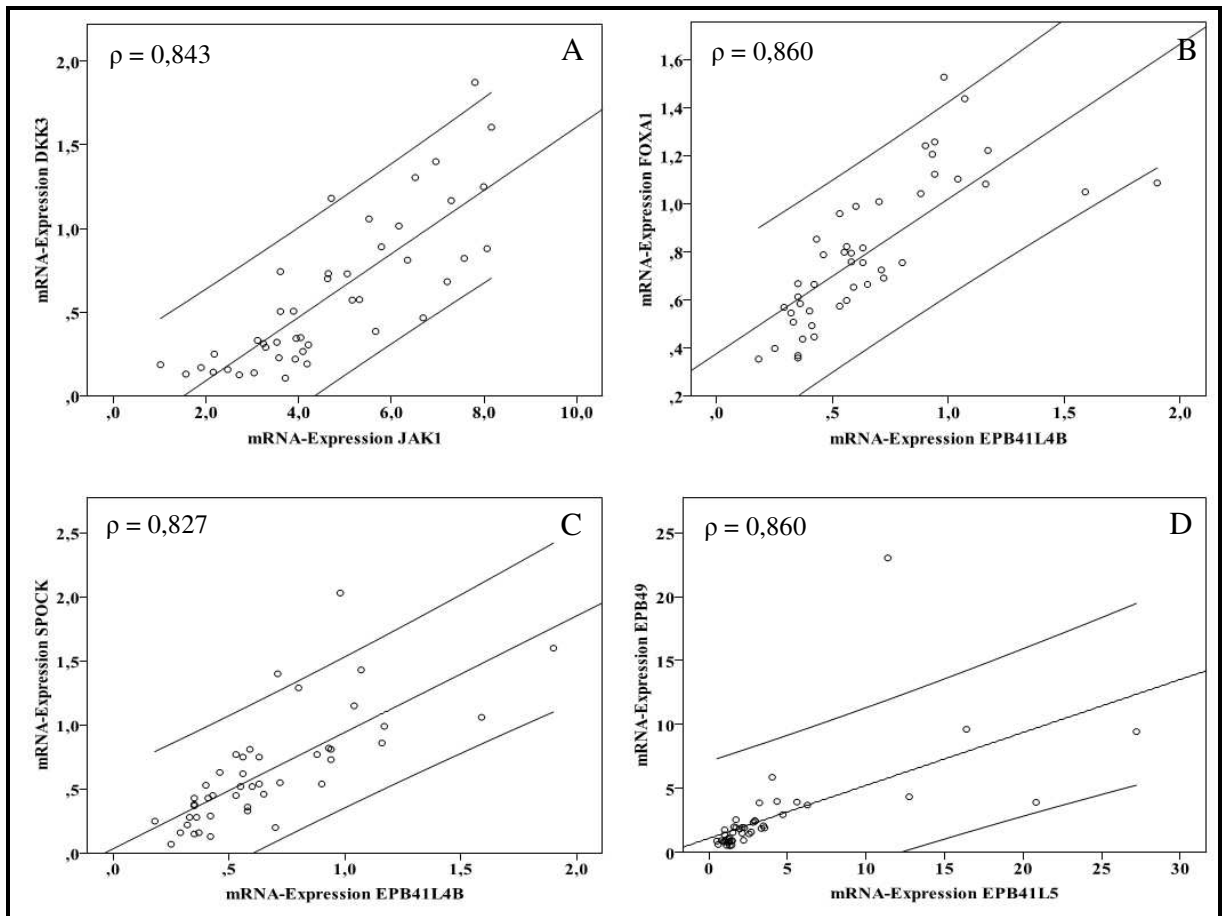


Abb. 3.1.3: Darstellung stark korrelierter Genexpressionen im Streudiagramm: Die relative Genexpression der Genpaare *JAK1* - *DKK3* (A), *EPB41L4B* - *FOXA1* (B), *EPB41L4B* - *SPOCK* (C) und *EPB41L5* - *EPB49* (D). Ergänzt werden die Streudiagramme mit einer Anpassungslinie und entsprechendem 95 %-Konfidenzintervall zu dieser.

Die Abbildung 3.1.4 zeigt diese Beispiele für hohe negative Korrelationen mit dem jeweiligen Streuungsmuster.

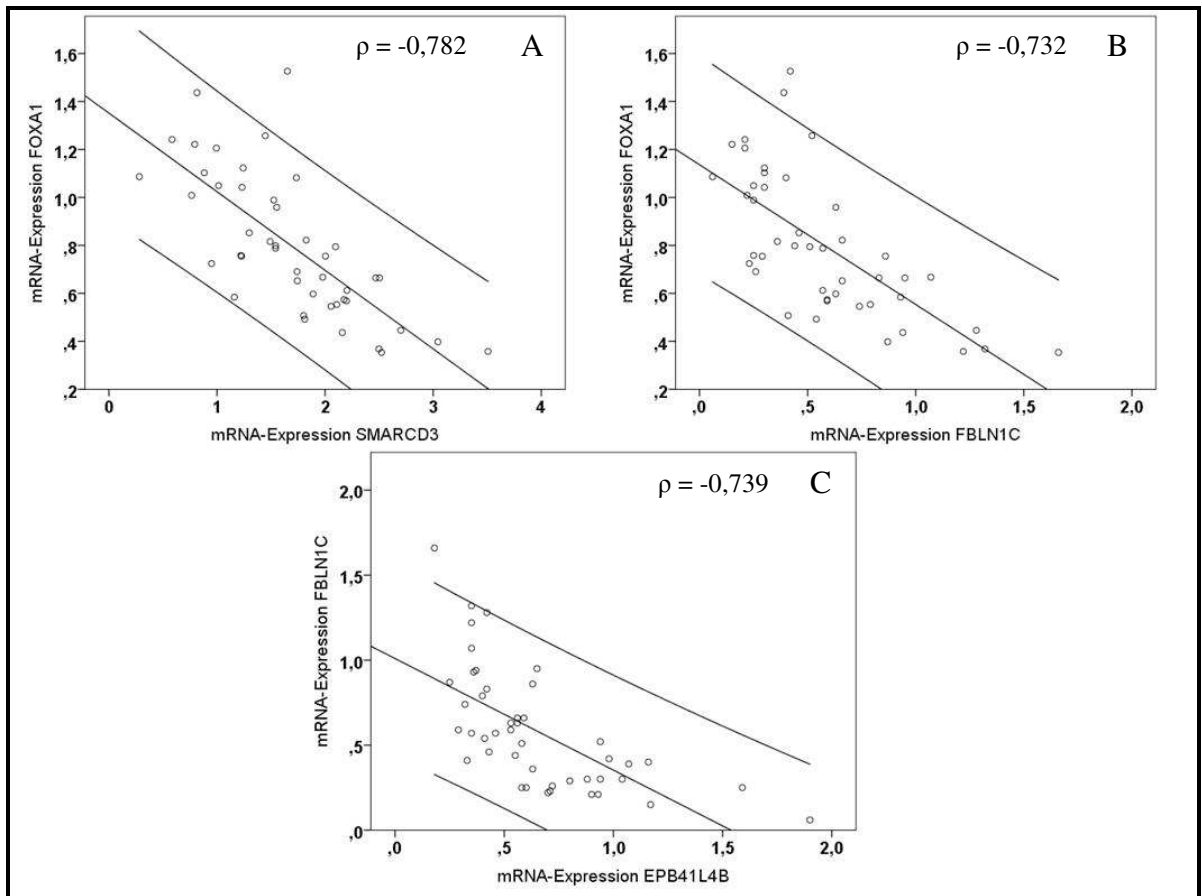


Abb. 3.1.4: Darstellung der negativ zueinander korrelierten Gene im Prostatakarzinom. Eine deutliche Ausrichtung ist im jeweiligen Streudiagramm zu erkennen. Zueinander (negativ) korreliert sind *FOXA1* - *SMARCD3* (A), *FOXA1* - *FBLN1C* (B) und *FBLN1C* - *EPB41L4B* (C). Ergänzt werden die Streudiagramme mit einer Anpassungslinie und entsprechendem 95 %-Konfidenzintervall zu dieser.

3.1.2.3 Hierarchische Clusteranalyse der Gene

Als Fortsetzung der Korrelationsanalyse in einem dritten Schritt kann die hierarchische Clusteranalyse gesehen werden. Mit der hierarchischen Clusteranalyse lassen sich Gruppen aus mehreren Genen finden, die aufgrund ihres sehr ähnlichen Expressionsverhältnisses als Cluster zusammengefasst werden können. Wie im Abschnitt 3.1.2.2 liegt in diesem Fall die Genexpression im Karzinomgewebe zugrunde. Statistische Methode zur Ermittlung der Cluster ist hier die Pearson-Korrelation. Diese Methode ist für nicht-parametrisch verteilte Werte nur bedingt aussagekräftig. Dennoch sind vor allem folgende in Tabelle 3.1.4 aufgelistete vier Gruppen durch den hohen gemeinsamen Korrelationskoeffizienten hervortretend.

Tabelle 3.1.4: Aus der Clusteranalyse hervorgegangene Gruppen

Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4
<i>JMJD1A</i>	<i>ERG</i>	<i>FBLN1C</i>	<i>JAK1</i>
<i>SHH</i>	<i>SPOCK</i>	<i>SMARCD3</i>	<i>TLR3</i>
<i>PON2</i>	<i>EPB41L4B</i>	<i>FBLN4</i>	<i>CARD8</i>
<i>PPP2CB</i>	<i>FOXA1</i>		<i>MKI67</i>
<i>HIP</i>			<i>IKBKE</i>
			<i>OPG</i>

Eine umfassendere Darstellung bietet das Dendrogramm in Abbildung 3.1.5.

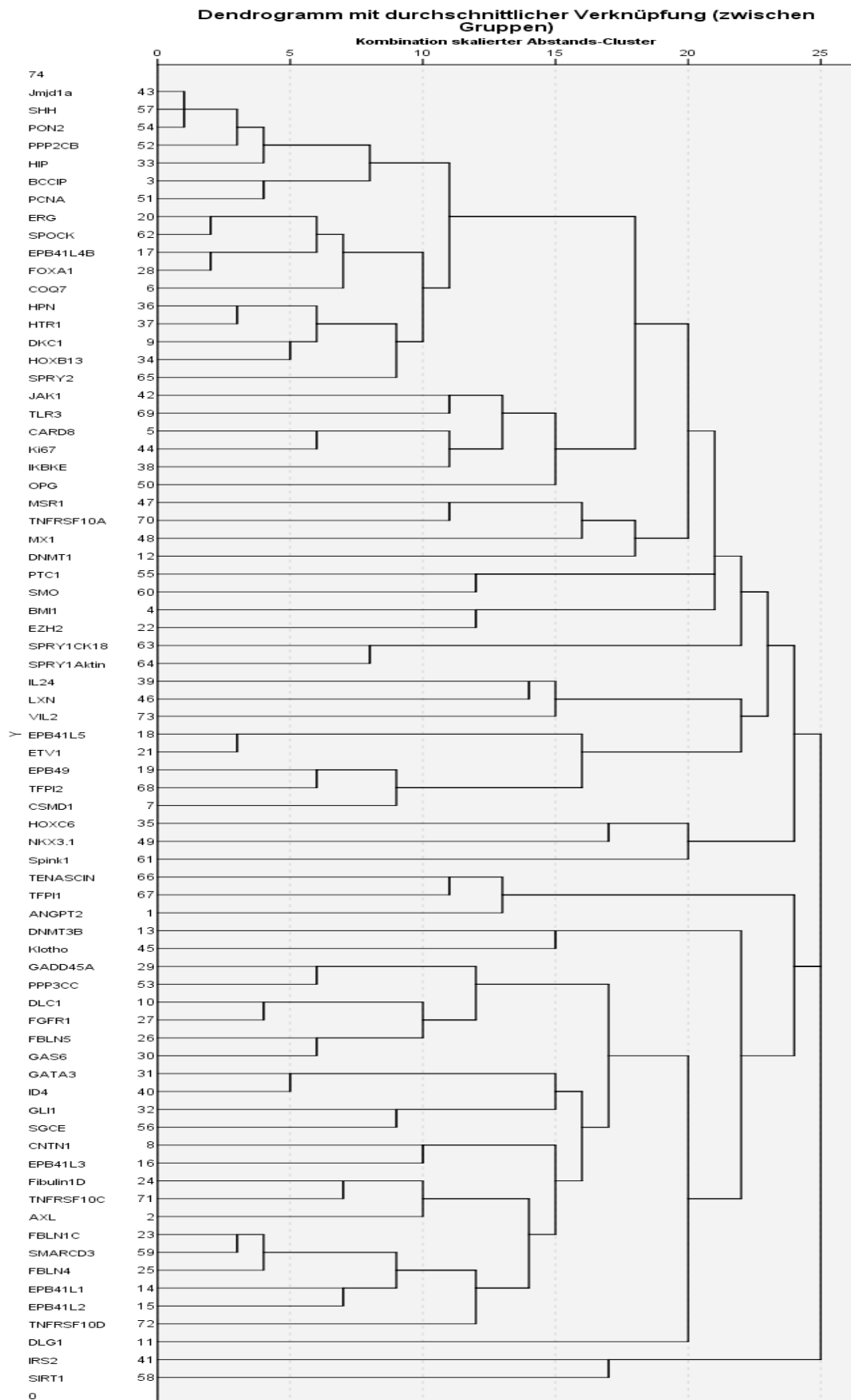


Abb. 3.1.5: Darstellung des Dendrogramms der Clusteranalyse. Gene mit kurzen Verzweigungen bilden ein Cluster.

Im Detail haben sich dabei folgende Werte für diese ermittelten Cluster ergeben:

		Korrelationen				
		<i>JMJD1A</i>	<i>SHH</i>	<i>PON2</i>	<i>PPP2CB</i>	<i>HIP</i>
<i>JMJD1A</i>	Korrelation nach Pearson	1	,834**	,650**	,807**	,728**
	Signifikanz (2-seitig)		,000	,000	,000	,000
<i>SHH</i>	Korrelation nach Pearson	,834**	1	,620**	,678**	,816**
	Signifikanz (2-seitig)	,000		,000	,000	,000
<i>PON2</i>	Korrelation nach Pearson	,650**	,620**	1	,622**	,633**
	Signifikanz (2-seitig)	,000	,000		,000	,000
<i>PPP2CB</i>	Korrelation nach Pearson	,807**	,678**	,622**	1	,615**
	Signifikanz (2-seitig)	,000	,000	,000		,000
<i>HIP</i>	Korrelation nach Pearson	,728**	,816**	,633**	,615**	1
	Signifikanz (2-seitig)	,000	,000	,000	,000	

** Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

		Korrelationen			
		<i>ERG</i>	<i>SPOCK</i>	<i>EPB41L4B</i>	<i>FOXA1</i>
<i>ERG</i>	Korrelation nach Pearson	1	,705**	,426**	,511**
	Signifikanz (2-seitig)		,000	,004	,000
<i>SPOCK</i>	Korrelation nach Pearson	,705**	1	,749**	,709**
	Signifikanz (2-seitig)	,000		,000	,000
<i>EPB41L4B</i>	Korrelation nach Pearson	,426**	,749**	1	,760**
	Signifikanz (2-seitig)	,004	,000		,000
<i>FOXA1</i>	Korrelation nach Pearson	,511**	,709**	,760**	1
	Signifikanz (2-seitig)	,000	,000	,000	

** Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

		Korrelationen		
		<i>FBLN1C</i>	<i>SMARCD3</i>	<i>FBLN4</i>
<i>FBLN1C</i>	Korrelation nach Pearson	1	,795**	,763**
	Signifikanz (2-seitig)		,000	,000
<i>SMARCD3</i>	Korrelation nach Pearson	,795**	1	,804**
	Signifikanz (2-seitig)	,000		,000
<i>FBLN4</i>	Korrelation nach Pearson	,763**	,804**	1
	Signifikanz (2-seitig)	,000	,000	

** Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

		Korrelationen					
		JAK1	TLR3	CARD8	MKI67	IKBKE	OPG
JAK1	Pearson-Korrelation	1	,478**	,494**	,185	,305	,258
	Sig. (2-seitig)		,001	,001	,223	,052	,087
TLR3	Pearson-Korrelation	,478**	1	,542**	,192	,442**	,377*
	Sig. (2-seitig)	,001		,000	,206	,004	,011
CARD8	Pearson-Korrelation	,494**	,542**	1	,520**	,485**	,390**
	Sig. (2-seitig)	,001	,000		,000	,001	,008
MKI67	Pearson-Korrelation	,185	,192	,520**	1	,315*	,276
	Sig. (2-seitig)	,223	,206	,000		,045	,067
IKBKE	Pearson-Korrelation	,305	,442**	,485**	,315*	1	,221
	Sig. (2-seitig)	,052	,004	,001	,045		,165
OPG	Pearson-Korrelation	,258	,377*	,390**	,276	,221	1
	Sig. (2-seitig)	,087	,011	,008	,067	,165	

** Korrelation ist bei Niveau 0,01 signifikant (zweiseitig).

* Korrelation ist bei Niveau 0,05 signifikant (zweiseitig).

3.1.3 Klinische Daten

Bei den folgenden Untersuchungen wurden die klinischen Daten aus Tabelle 2.1.1 im Verhältnis zu den entsprechenden Genexpressionen untersucht.

3.1.3.1 Analyse der Genexpression im Verhältnis zum Tumorstadium

Ziel dieser Untersuchung sollte sein, die Gene zu identifizieren, deren Expression sich mit steigendem Tumorstadium verändert. Verwendet wurden die Expressionsdaten und die den pathologischen Befunden entnommenen Tumorstadien. Von den 45 Proben waren 20 als T2-Tumor klassifiziert, 23 als T3a/b-Tumor und zwei als T4-Tumor. Die T4-Tumore wurden daher der Gruppe der T3-Tumore zugeschlagen. Anschließend wurde wiederum der Mann-Whitney-U-Test angewendet. Lediglich vier Gene waren bei hohem gegenüber niedrigerem Tumorstadium hoch- bzw. herunterreguliert (Tabelle 3.1.5 und Abbildung 3.1.6).

Tabelle 3.1.5: Vergleich der Genexpression mit dem Tumorstadium

Gen	Regulation in T3/4-Tumoren gegenüber T2-Tumoren	Signifikanz p =	Faktor der Regulation vom Median der T2-Tumoren ausgehend
<i>TNFRSF10C</i>	Herunter	0,049	0,68
<i>DKC1</i>	Hoch	0,026	1,13
<i>SMARCD3</i>	Herunter	0,049	0,77
<i>TLR3</i>	Herunter	0,044	0,63

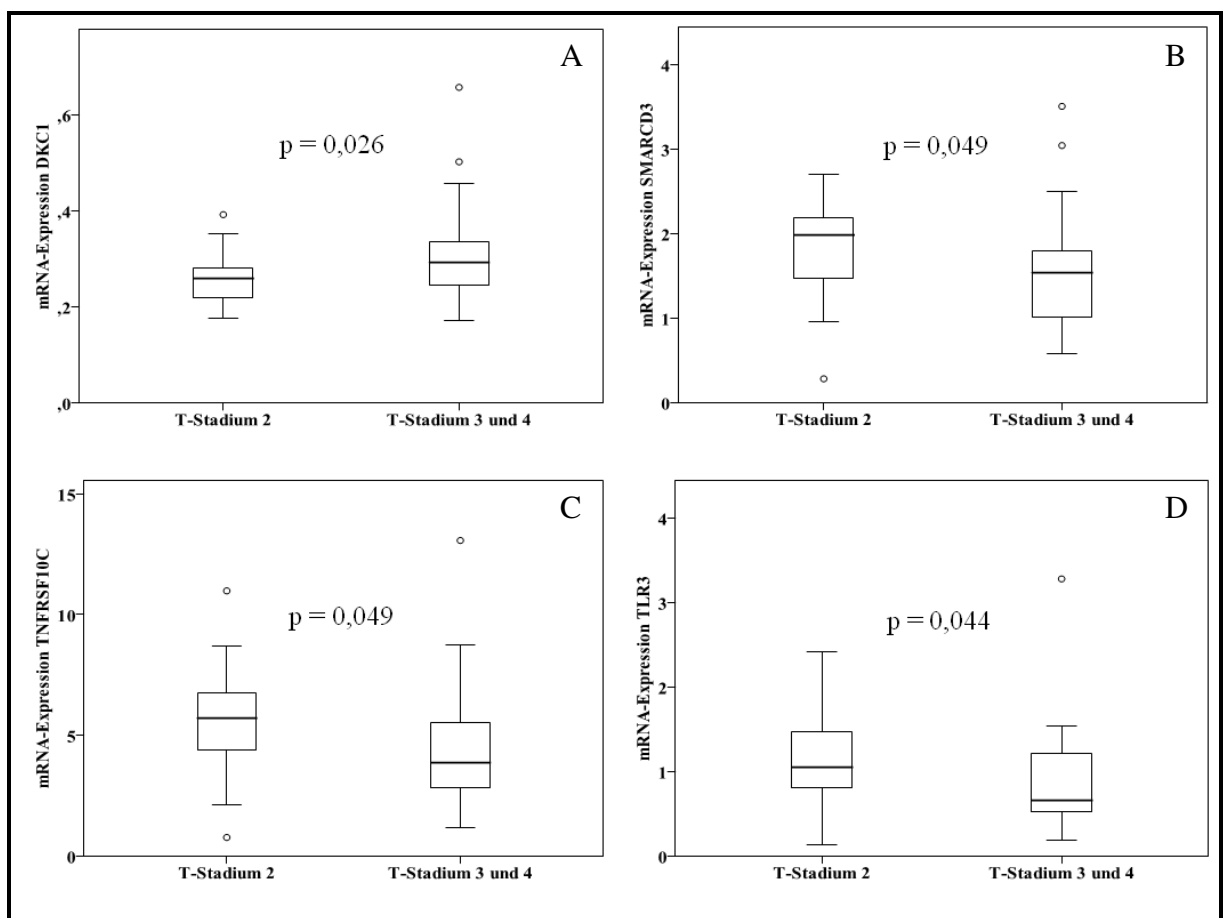


Abb. 3.1.6: Darstellung der Genexpression bei Proben im T2-Stadium und T3-/4-Stadium als Boxplot. Die Gene wurden ausgesucht entsprechend ihres Expressionsmusters mit deutlicher Regulation nach unten und oben. *DKC1* ist bei höherem T-Stadium signifikant stärker exprimiert (A). *SMARCD3* (B), *TNFRSF10C* (C) und *TLR3* (D) sind bei höherem T-Stadium signifikant schwächer exprimiert.

3.1.3.2 Analyse von Genexpression im Verhältnis zum Lymphknotenstatus

In gleicher Weise wurde untersucht, ob das Vorliegen von Lymphknotenmetastasen mit Expressionsveränderungen einhergeht. Aus dem Ergebnis könnten Hypothesen generiert werden, wonach entsprechende Genexpressionsveränderungen mit dem Entstehen von Lymphknotenmetastasen zusammenhängen. Von 45 Proben wurden bei elf Patienten zusätzlich zu dem Primärtumor Lymphknotenmetastasen festgestellt. Mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests wurde ein statistischer Vergleich zwischen Genexpression und Lymphknotenstatus vorgenommen. Hierbei ergab sich, dass mehrere Gene im Vergleich positiver gegenüber negativer Lymphknotenmetastasierung signifikant herunter- bzw. hochreguliert waren (Tabelle 3.1.6 und Beispiele in Abbildung 3.1.7). Keines der Ergebnisse lag allerdings in einem Signifikanzbereich von $p < 0,01$ %. *SPINK1* war als Einziges in Karzinomen mit Lymphknotenmetastasen niedriger exprimiert.

Tabelle 3.1.6: Vergleich der Genexpression bezüglich des Lymphknotenstatus

Gen	Regulation positivem gegenüber negativem Lymphknotenstatus	Signifikanz $p =$	Faktor der Regulation vom Median der Lymphknotenmetastasen-negativen Tumoren ausgehend
<i>DKC1</i>	Hoch	0,034	1,1
<i>DNMT1</i>	Hoch	0,021	1,49
<i>HOXC6</i>	Hoch	0,048	2,09
<i>IKBKE</i>	Hoch	0,043	1,37
<i>MSR1</i>	Hoch	0,032	1,54
<i>SPINK1</i>	Herunter	0,048	0,3

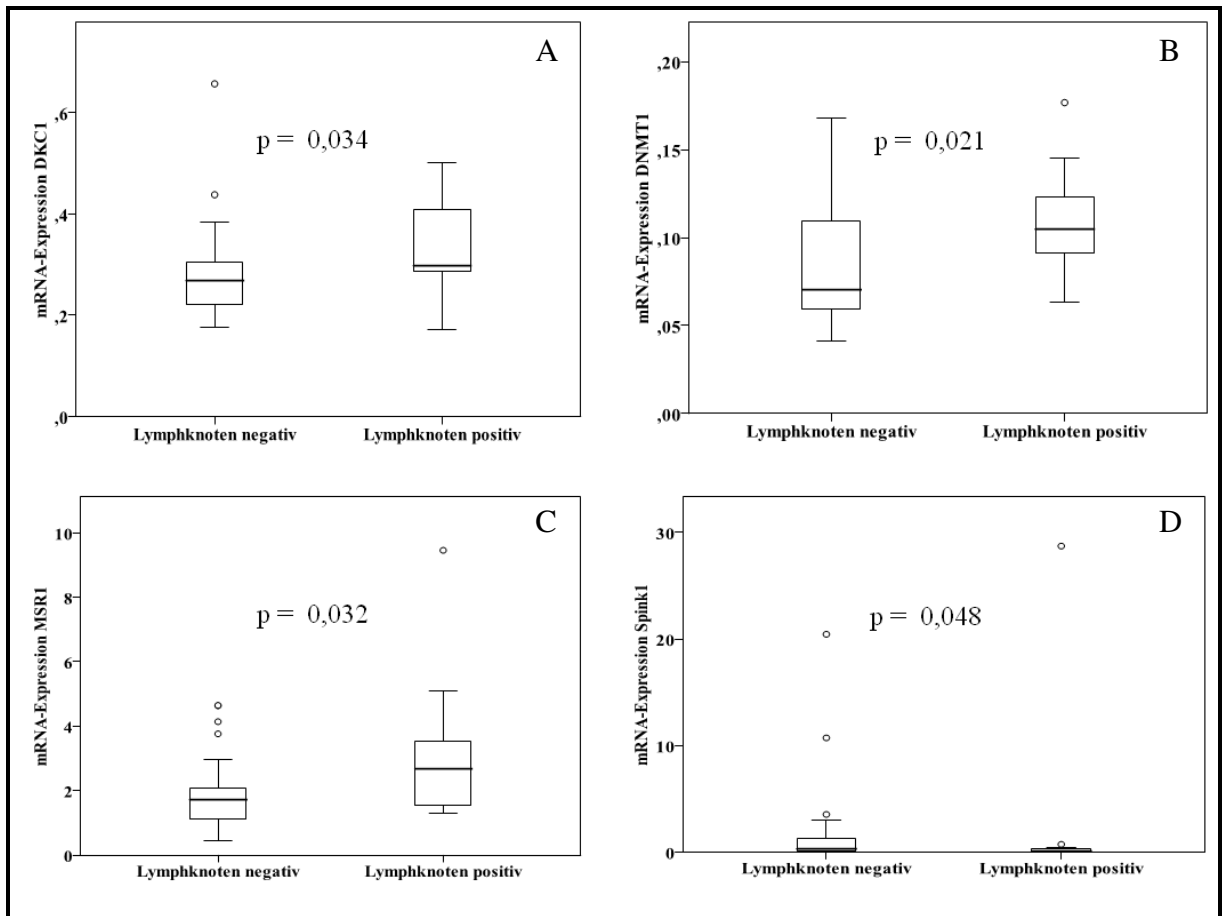


Abb. 3.1.7: Darstellung der Genexpression bei Karzinomproben mit oder ohne nachgewiesene Lymphknotenmetastasen. Die Gene wurden ausgesucht entsprechend ihres Expressionsmusters mit deutlicher Regulation nach unten und oben. DKC1 (A), DNMT1 (B) und MSR1 (C) sind signifikant stärker exprimiert bei lymphknotenpositiven Karzinomen. *SPINK1* ist signifikant schwächer exprimiert bei lymphknotenpositiven Karzinomen (D).

3.1.3.3 Analyse von Genexpression im Verhältnis zum Gleason-Score

Der Gleason-Score wurde ebenfalls im Verhältnis zur Genexpression gesetzt. Es erfolgte eine Unterscheidung aller Tumore mit einem Score < 7 , allen Proben mit einem Score $= 7$ sowie allen Proben mit einem Score > 7 . Durch diese Gruppenbildung verteilen sich in unserer Serie 13 Proben auf die Gruppe < 7 , 26 Proben auf die Gruppe $= 7$ und sechs Proben auf die Gruppe > 7 . Für die Auswertung aller Gene wurde hier der Kruskal-Wallis-Test angewendet, da insgesamt 3 Gruppen untersucht werden mussten. Es zeigte sich eine signifikante Assoziation einer erhöhten *CSMD1*- und *ID4*-Expression mit einem Gleason-Score < 7 , siehe Tabelle 3.1.7 und Abbildung 3.1.8.

Tabelle 3.1.7: Vergleich der Genexpression mit dem Gleason-Score

Gen	Regulation der Gruppen Gleason ≥ 7 gegenüber Gleason < 7	Signifikanz $p =$
<i>BCCIP</i>	Herunter	0,037
<i>CSMD1</i>	Herunter	0,039
<i>ID4</i>	Herunter	0,045

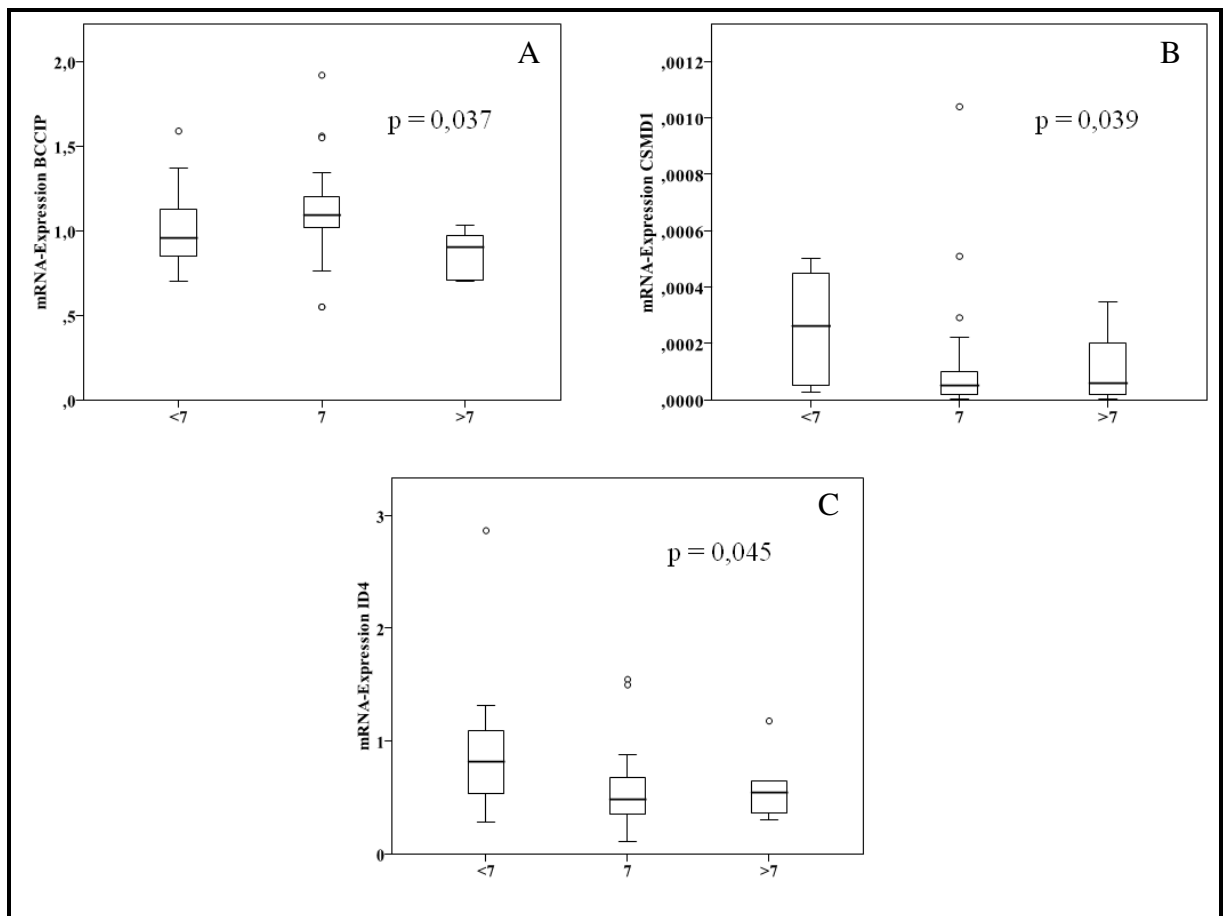


Abb. 3.1.8: Darstellung des Gleason-Scores in Bezug zur Genexpression von *BCCIP*, *CSMD1* und *ID4*. Die Gene wurden ausgesucht entsprechend ihres Expressionsmusters mit deutlicher Regulation nach unten. Bei *BCCIP* (A), *CSMD1* (B) und *ID4* (C) zeigt sich eine niedrigere Expression bei höheren Gleason-Scores.

3.1.3.4 Analyse von Genexpression im Bezug zum Rezidivstatus

Ebenfalls mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests wurde ein statistischer Vergleich zwischen Genexpression und Rezidivstatus vorgenommen. Eigentlich handelt es sich hierbei um keine zulässige Analyse, da Zensierungen vorliegen und man dann beispielsweise mit einem Cox-Modell oder Log Rank-Test rechnen

würde. Dennoch ist eine Vorabanalyse möglich. Als Indikator für ein Rezidiv diente der positive Nachweis von PSA (s. Methoden). Hierbei ergaben sich mehrere Gene, die im Vergleich von Tumoren die rezidierten zu solchen mit negativem Rezidivstatus signifikant herunter- bzw. hochreguliert sind (Tabelle 3.1.8 und Abbildung 3.1.9).

Tabelle 3.1.8: Beziehung zwischen Genexpression und Auftreten eines biochemischen Rezidivs

Gen	Regulation Rezidiv gegenüber kein Rezidiv	Signifikanz p =	Faktor der Regulation vom Median der Rezidiv-negativen Tumoren ausgehend
<i>DKC1</i>	Hoch	0,002	1,25
<i>FOXA1</i>	Hoch	0,035	1,46
<i>GATA3</i>	Herunter	0,033	0,72
<i>HOXC6</i>	Hoch	0,026	1,9
<i>MX1</i>	Herunter	0,021	0,84
<i>PPP3CC</i>	Herunter	0,008	0,78
<i>SMO</i>	Herunter	0,025	0,91

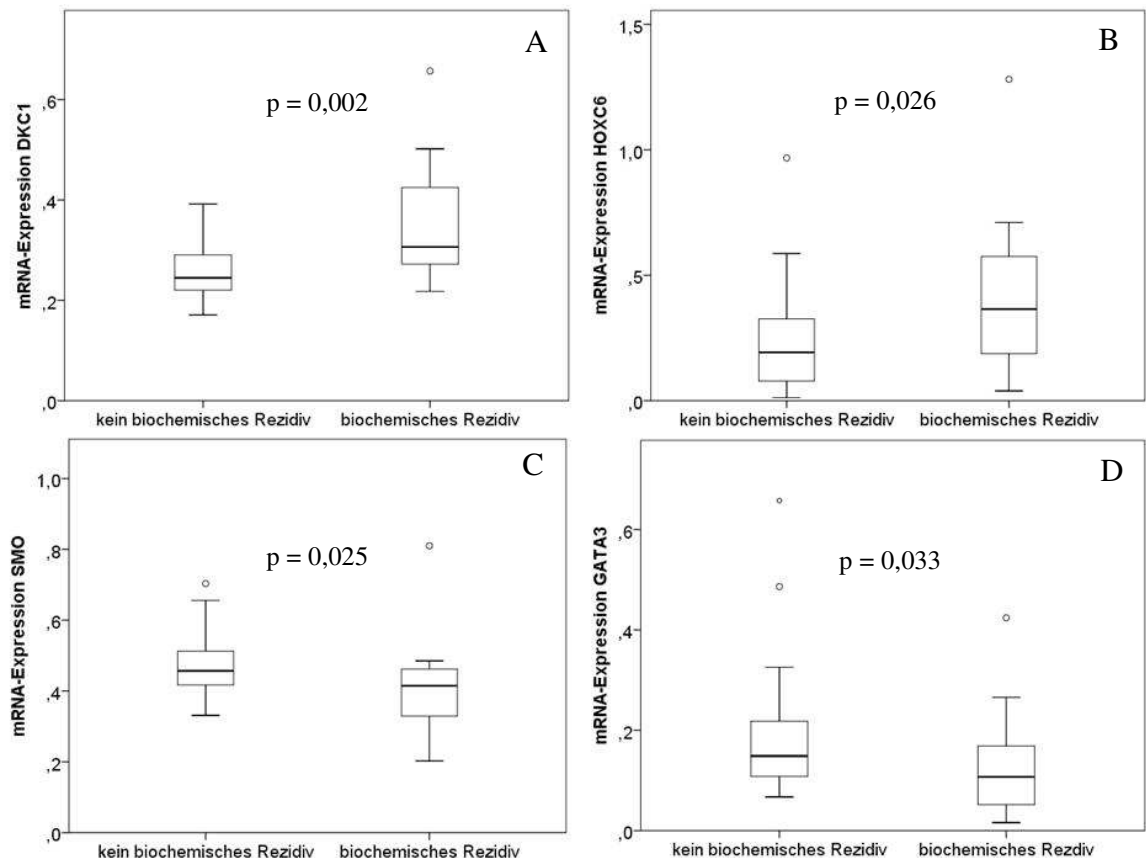


Abb. 3.1.9: Expression ausgewählter Gene mit unterschiedlicher Expression in rezidivierenden gegenüber nichtrezidivierenden Tumoren. Die Beispiele wurden ausgesucht entsprechend ihres Expressionsmusters mit deutlicher Regulation nach unten und oben. Bei *DKC1* (A) und *HOXC6* (B) geht eine erhöhte Expression mit einem Rezidiv ein. *SMO* (C) und *GATA3* (D) sind bei Rezidiven signifikant weniger exprimiert.

3.1.3.5 Kaplan-Meier-Analyse der Beziehung von Genexpression zur Rezidivhäufigkeit

Ein genauerer und für die Praxis sinnvollerer Parameter als das Auftreten von Rezidiven per se ist ihr Auftreten über die Zeit. Expressionswerte, die hierüber Aussagen liefern können, können als Kandidaten für prognostische Biomarker betrachtet werden. Zur Analyse dieser Beziehung wurden die Tumoren vereinfachend in solche klassifiziert, deren Genexpression über dem Gesamtmedian liegen und solche, deren Genexpression darunter liegt. Da die untersuchte Patientenkohorte relativ klein ist, wurde darauf verzichtet, die Analyse für kontinuierliche Variablen durchzuführen. Der statistische Zusammenhang wurde mit dem Log Rank-Test erhoben und die Beziehung mit Kaplan-Meier-Diagrammen dargestellt. Insgesamt neun Gene waren mit der

Rezidivierung assoziiert; bei fünf davon ging eine erhöhte Expression mit einer schlechteren Prognose einher, siehe Tabelle 3.1.9 und Abbildung 3.1.10.

Tabelle 3.1.9: Zusammenfassung der Gene, die in der Kaplan-Meier-Analyse nach Log Rank-Test eine statistische Signifikanz aufgewiesen haben

Gen	Genexpression, die mit erhöhter Rezidivwahrscheinlichkeit einhergeht	Statistische Signifikanz p =
<i>DKC1</i>	Oberhalb des Medians	0,010
<i>DNMT1</i>	Oberhalb des Medians	0,041
<i>EBP41L1</i>	Unterhalb des Medians	0,034
<i>EPB41L4B</i>	Oberhalb des Medians	0,017
<i>GATA3</i>	Unterhalb des Medians	0,039
<i>HOXC6</i>	Oberhalb des Medians	0,046
<i>HTR1</i>	Oberhalb des Medians	0,049
<i>OPG</i>	Unterhalb des Medians	0,037
<i>PPP3CC</i>	Unterhalb des Medians	0,026

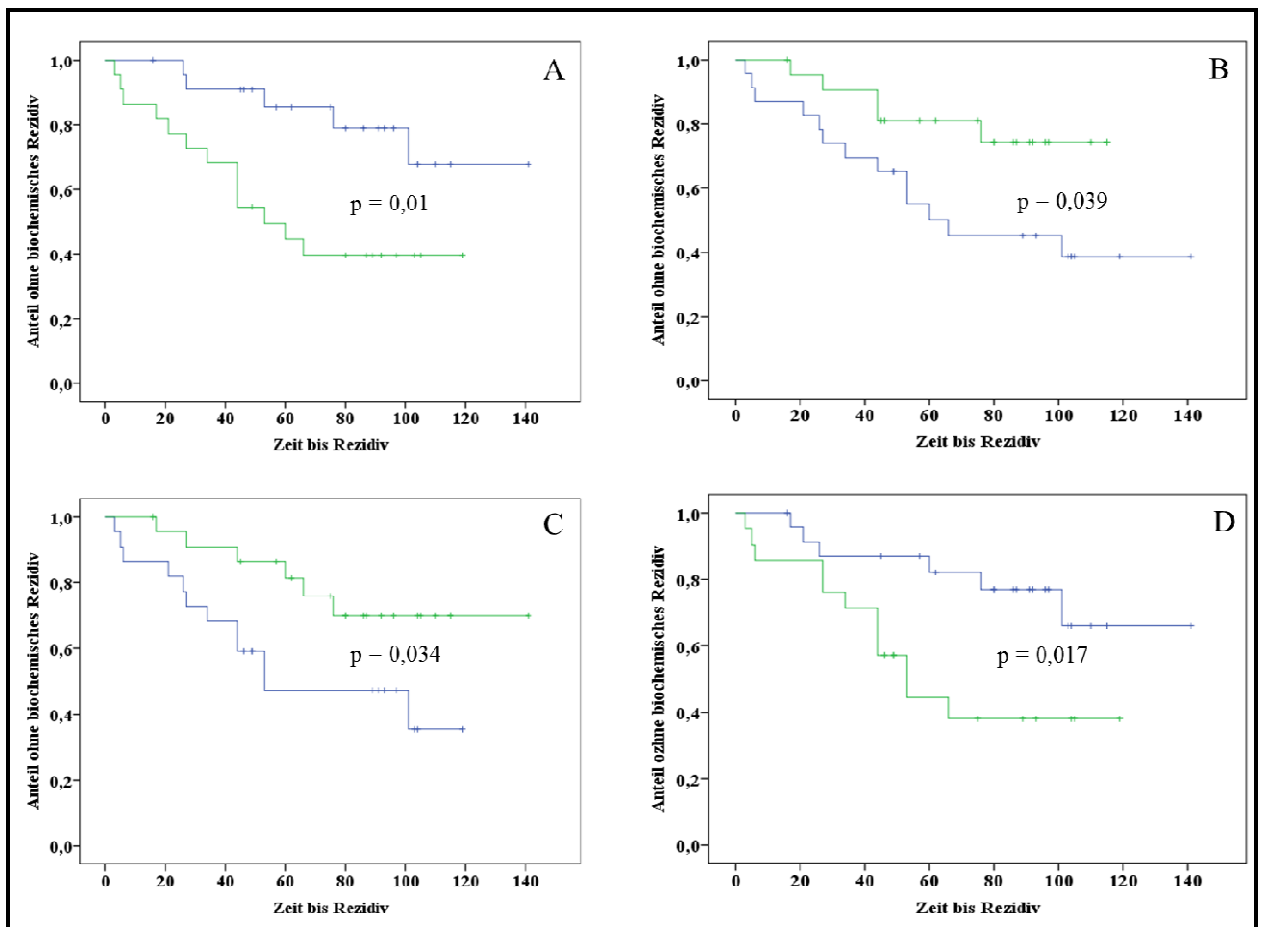


Abb. 3.1.10: Kaplan-Meier-Diagramm des biochemischen Rezidivs für ausgewählte Gene. (A) *DKC1*, Überexpression geht mit vermehrten Rezidiven einher. Analog dazu (C) *EPB41L1*. (B) *GATA3*, dessen verminderte Expression geht mit vermehrten Rezidiven einher. Analog dazu (D) *EPB41L4B*.

3.2 Spezieller Teil

3.2.1 ERG-Translokation

Da die *ERG*-Überexpression als Folge einer Gentranslokation für die Eigenschaften einer Untergruppe von Prostatakarzinomen als entscheidend gilt, wurde sie auch in der hiesigen Kohorte bestimmt. Mit der folgenden Untersuchung sollten dann weitere Gene identifiziert werden, die als Folge einer Veränderung der *ERG*-Expression oder parallel dazu ebenfalls Veränderungen erfahren. Unwahrscheinlich erscheint die theoretische Möglichkeit, dass eine Veränderung der Genexpression, die mit *ERG*-Expressionsveränderungen einhergeht, ursächlich für die Translokationen wäre. Bei Betrachtung der Genexpression von *ERG* in den Tumorgewebe sieht man, dass in 22 von 45 Fällen (entsprechend 49 %) eine erhöhte Expression vorliegt. Diese ist definiert als jegliche Expression, die über dem Maximum der *ERG*-Expression im gesunden Gewebe liegt. Dabei liegt der Mittelwert der Gruppe der Karzinome mit niedriger Expression bei 0,28 mit einer Standardabweichung von 0,16. Der Mittelwert der Gruppe mit hoher Expression liegt bei 5,92 bei starker Streuung mit einer Standardabweichung von 5,88 (Abb. 3.2.1).

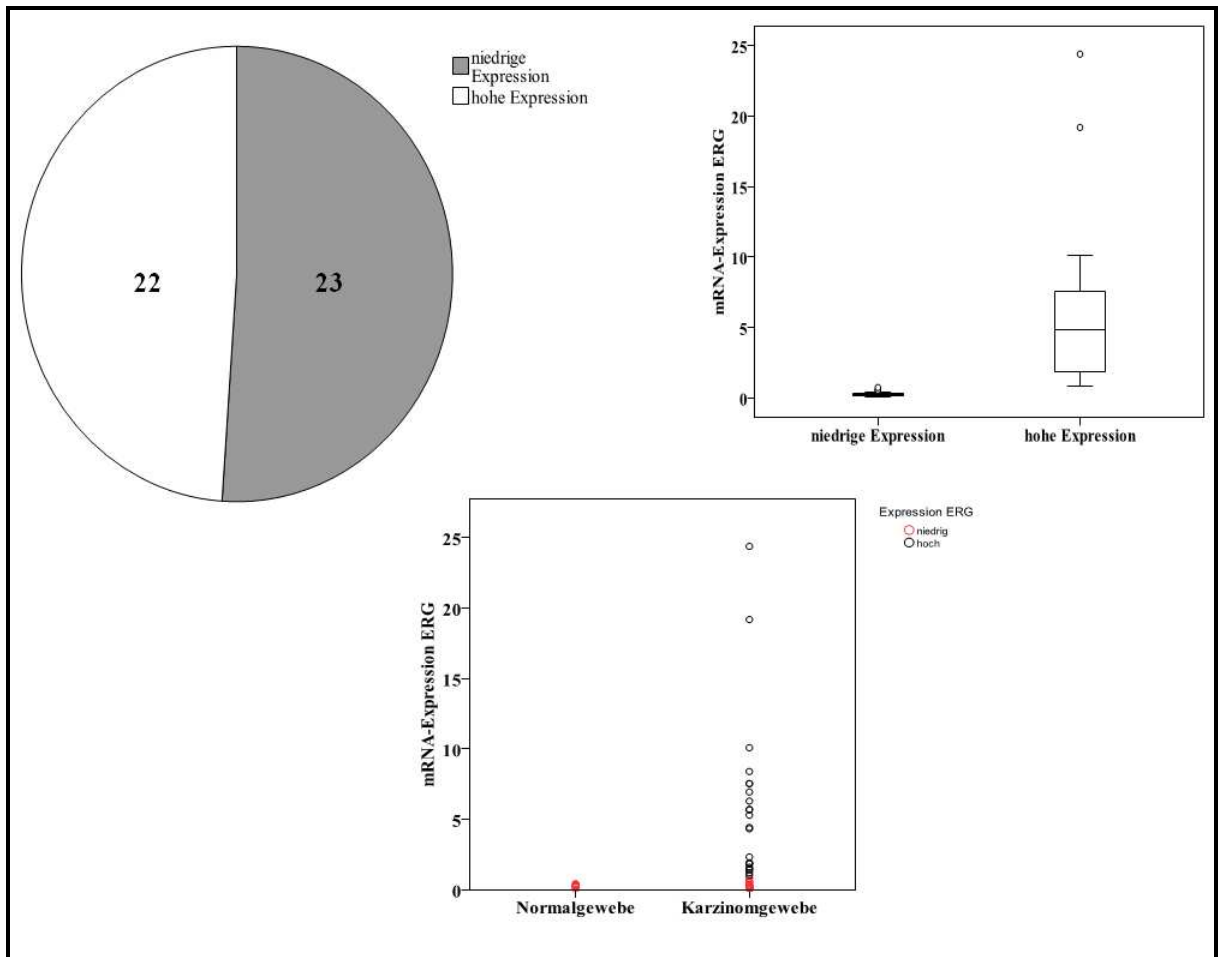


Abb. 3.2.1: Links: Kreisdiagramm der Häufigkeiten von niedriger und hoher *ERG*-Expression in den Prostatakarzinomgeweben. Rechts: Darstellung der Expressionsverteilung beider Gruppen. Unten: erweitert um die Darstellung der Expression in 13 Normalgeweben. Rote Kreise zeigen eine niedrige *ERG*-Expression an, schwarze Kreise eine hohe *ERG*-Expression.

Die Prostatakarzinome wurden nach Höhe der *ERG*-Expression in zwei Gruppen eingeteilt und die Expression aller anderen gemessenen Gene in diesen beiden Gruppen mittels Wilcoxon-Test auf signifikante Unterschiede verglichen. Die Ergebnisse sind dargestellt in Tabelle 3.2.1 und Abbildung 3.2.2. Es zeigen sich 13 Gene, deren Expressionsmuster in den Proben in einem ausgeprägten Verhältnis zur *ERG*-Expression stehen. Mit einer Signifikanz von $< 0,01$ % fallen besonders die Gene *EPB41L3*, *EPB41L4B*, *HOXB13*, *HPN*, *SHH* und *SPOCK1* als verstärkt exprimiert auf. Nur vier Gene wiesen in Tumoren mit starker *ERG*-Expression verminderte Expression auf.

Tabelle 3.2.1: Expressionsverhalten von Genen zur Gruppierung entsprechend der Genexpression von *ERG*

Gen	Verhältnis zur ERG-Gruppierung	Statistische Signifikanz p =
<i>CARD8</i>	gleichgerichtet	0,047
<i>COQ7</i>	gleichgerichtet	0,028
<i>CNTN1</i>	komplementär	0,039
<i>DKC1</i>	gleichgerichtet	0,027
<i>EPB41L3</i>	komplementär	0,01
<i>EPB41L4B</i>	gleichgerichtet	0,01
<i>FBLN1C</i>	komplementär	0,047
<i>FOXA1</i>	gleichgerichtet	0,028
<i>HOXB13</i>	gleichgerichtet	0,01
<i>HPN</i>	gleichgerichtet	0,003
<i>SHH</i>	gleichgerichtet	0,002
<i>SMARCD3</i>	komplementär	0,026
<i>SPOCK</i>	gleichgerichtet	0,002

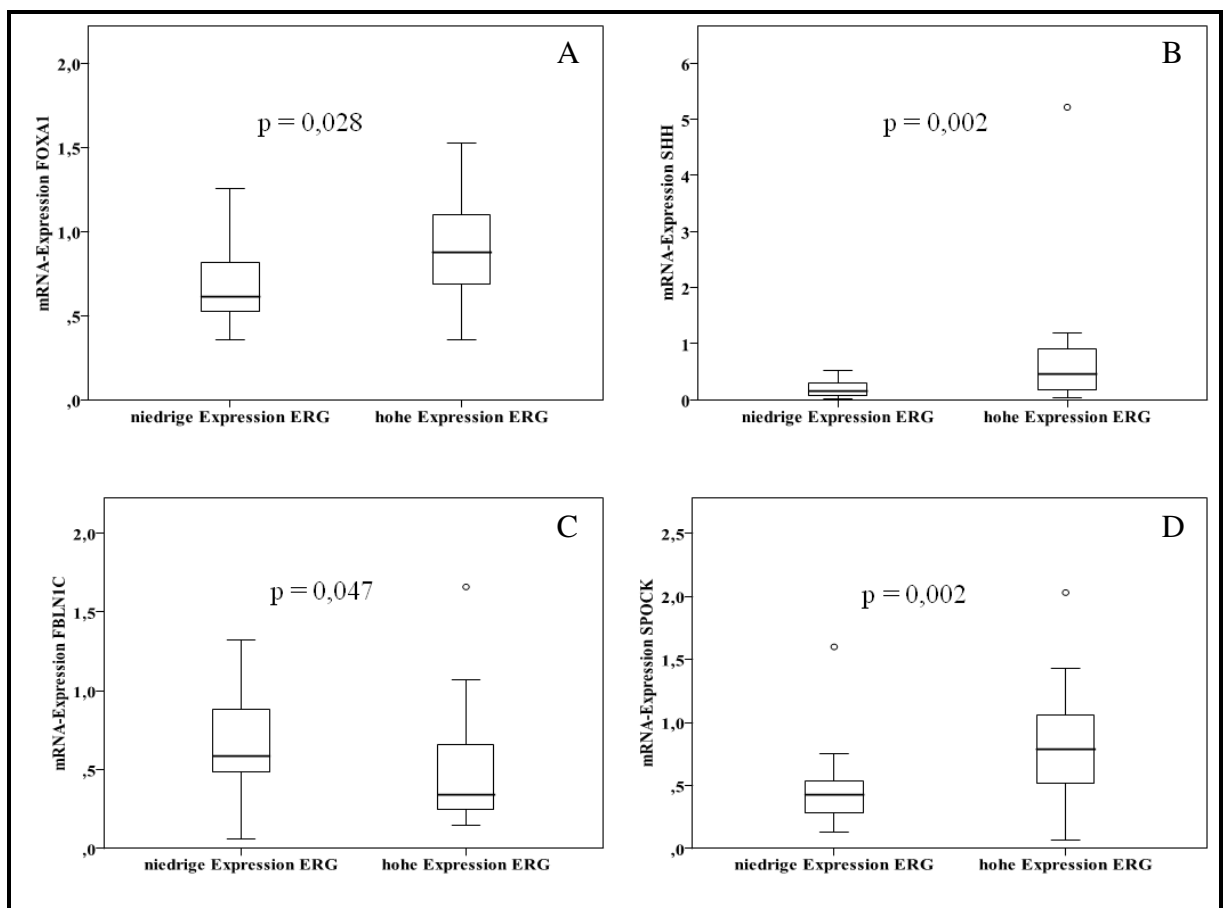


Abb. 3.2.2: Darstellung der Genexpression von *FOXA1*, *SHH*, *FBLN1C* und *SPOCK1* entsprechend der *ERG*-Gruppierung. Dabei verhält sich *FBLN1C* (A) komplementär zur *ERG*-Gruppierung und *FOXA1* (B), *SHH* (C) sowie *SPOCK1* (D) gleichgerichtet.

3.2.2 Gene der EPB-Familie im Zusammenhang mit ERG-Expression

Die Daten aus 3.2.1 werfen die Frage auf, ob es einen grundsätzlichen Zusammenhang mit der Expression von Genen der *EPB*-Familie gibt. Die oben schon aufgeführten Gene *EPB41L3* und *EPB41L4B* zeigen einen deutlichen statistischen Zusammenhang. Daher wurden die anderen *EPB*-Gene speziell daraufhin betrachtet, wie sie sich im Verhältnis zur *ERG*-Expression verhalten. Die anderen Gene der Familie stehen jedoch deutlich in keinem statistischen Zusammenhang. *EPB41L1* zeigt eine Abnahme in einigen *ERG*-positiven Karzinomen, doch keinen statistisch signifikanten Unterschied (Tabelle 3.2.2 und Abbildung 3.2.3).

Tabelle 3.2.2: Vergleich der Genexpression der EPB-Familie zur ERG-Gruppierung und deren Verhältnis dazu

Gen	Verhältnis zur ERG-Gruppierung	Statistische Signifikanz p =
<i>EPB41L1</i>	keines vorhanden	0,251
<i>EPB41L2</i>	keines vorhanden	0,982
<i>EPB41L3</i>	komplementär	0,01
<i>EPB41L4B</i>	gleichgerichtet	0,01
<i>EPB41L5</i>	keines vorhanden	0,220
<i>EPB49</i>	keines vorhanden	0,388

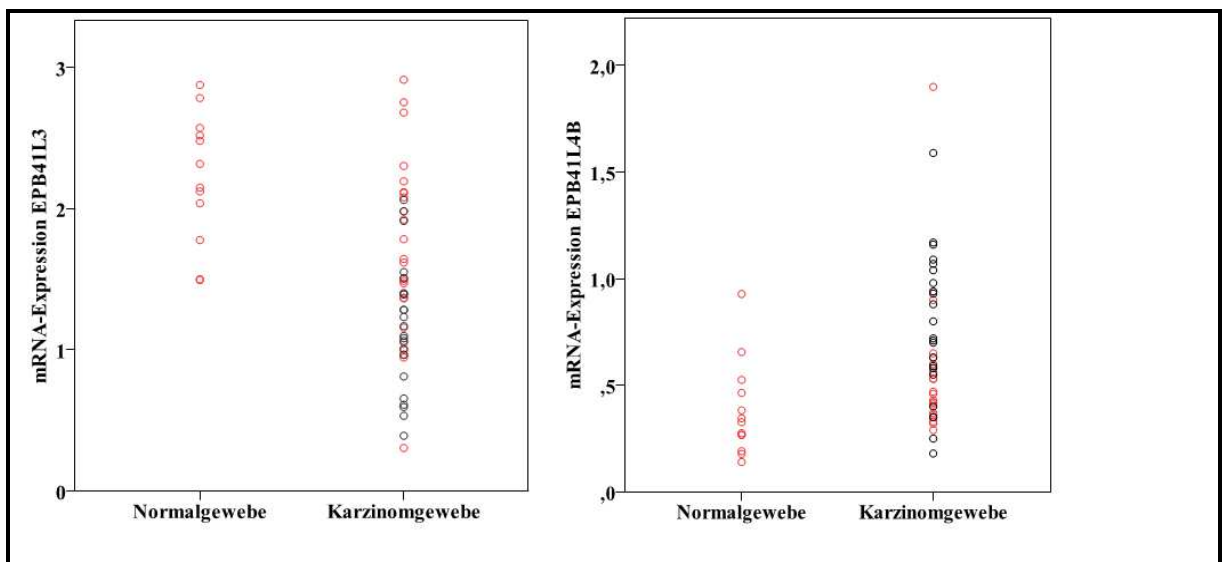


Abb. 3.2.3: Verteilung der Expression von *EPB41L3* (links) und *EPB41L4B* (rechts) in Normalgeweben und Karzinomgeweben. Die schwarzen Kreise entsprechen Proben mit *ERG*-Überexpression.

3.2.3 SPINK1

Bei Betrachtung der Genexpression von *SPINK1* im Tumorgewebe sieht man, dass in zwölf von 45 Fällen eine erhöhte Expression vorliegt. Dies entspricht 26,7 %. Trennwert zur Festlegung, ob eine hohe oder niedrige Expression vorliegt, ist eine relative Genexpression > 1 , da hier ein deutlicher Sprung der Expression auszumachen ist. Dabei liegt der Mittelwert der Gruppe der niedrigen Expression bei 0,2 mit einer Standardabweichung von 0,17. Der Mittelwert der Gruppe mit hoher Expression liegt bei 6,57 und einer starken Streuung mit Standardabweichung von 8,98, siehe dazu Abbildung 3.2.4.

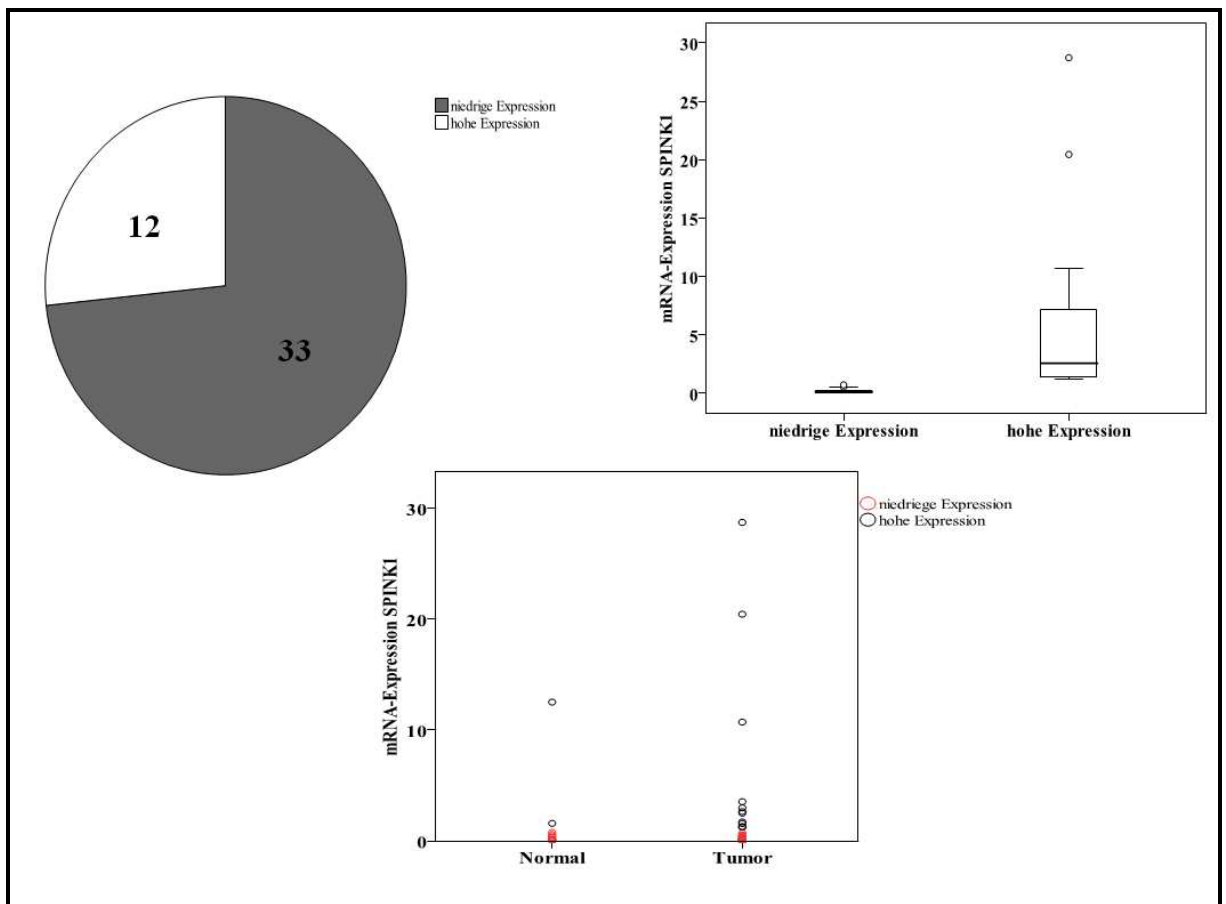


Abb. 3.2.4: Links: Kreisdiagramm der Häufigkeiten von niedriger und hoher *SPINK1*-Expression. Rechts: Darstellung der Expressionsverteilung beider Gruppen. Unten: Erweitert um die Darstellung der Expression in 13 Normalgeweben. Rote Kreise zeigen eine niedrige *SPINK1*-Expression, schwarze Kreise eine hohe *SPINK1*-Expression.

Analog zur Gruppierung der Proben anhand von *ERG* erfolgte die Bildung von zwei Gruppen nach Höhe der *SPINK1*-Expression zur weiteren Betrachtung des Verhaltens der anderen gemessenen Gene dazu. Dabei ergab sich für vier

Gene eine unterschiedliche Verteilung zwischen diesen Gruppen, dargestellt in Tabelle 3.2.3 und Abbildung 3.2.5.

Tabelle 3.2.3: Expressionsverhalten von Genen zur Gruppierung entsprechend der Genexpression von *SPINK1*

Gen	Verhältnis zur <i>SPINK1</i> -Gruppierung	Statistische Signifikanz p =
<i>IL24</i>	gleichgerichtet	0,046
<i>LXN</i>	gleichgerichtet	0,025
<i>SPRY2</i>	komplementär	0,043
<i>TNFRSF10C</i>	gleichgerichtet	0,009

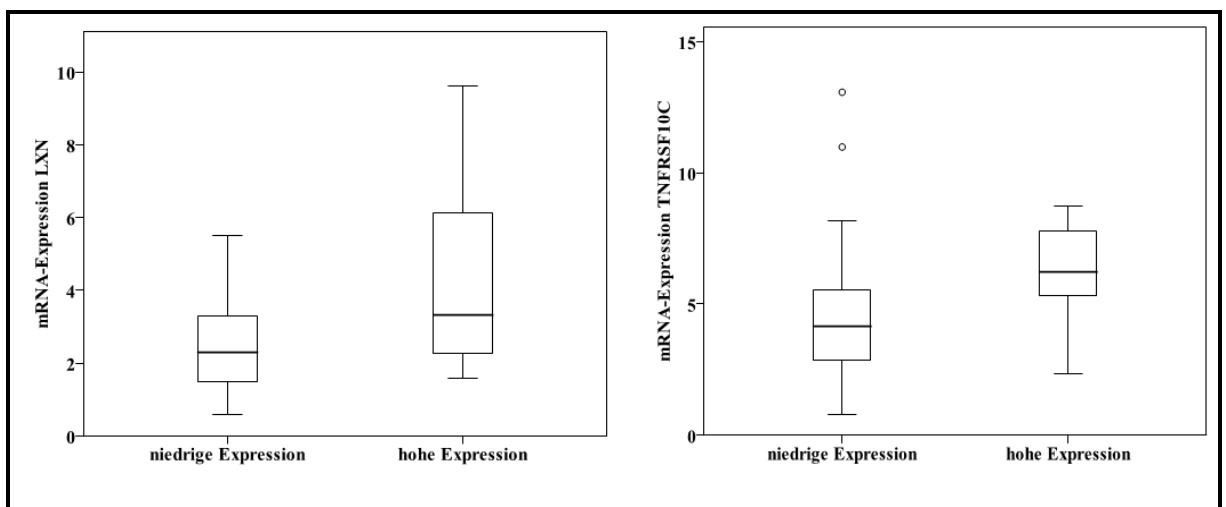


Abb. 3.2.5: Darstellung der Genexpression von LXN (links) und TNFRSF10C (rechts) entsprechend der *SPINK1*-Gruppierung. Beide Gene verhalten sich im Expressionsmuster gleichgerichtet.

3.2.4 *SPINK1* und *ERG*

Im Folgenden wurde die Expression von *SPINK1* und *ERG* im Verhältnis zueinander betrachtet. Nach der Literatur sollten *SPINK1*- und *ERG*-Überexpression nur selten zusammen in einem Tumor auftreten. Aus unseren Daten ergibt sich ebenfalls nur eine geringgradige Überschneidung der Expression. Von allen Tumorproben waren insgesamt nur vier sowohl für *SPINK1* als auch *ERG* positiv, dargestellt in den Tabellen 3.2.4 und der Abbildung 3.2.6. Bei der statistischen Untersuchung dieses Sachverhaltes ermittelt der Chi-Quadrat-Test mit Kontinuitätskorrektur eine Signifikanz von $p =$

0,357. Daraus ergibt sich, dass statistisch gesehen beide Merkmale unabhängig beziehungsweise separat voneinander ausgeprägt werden.

Tabelle 3.2.4: Kreuztabelle des Expressionsmusters von SPINK1 und ERG

		<i>SPINK1</i> -Expression		Gesamt
		niedrige Expression	hohe Expression	
<i>ERG</i> -Expression	niedrige Expression	15	8	23
	hohe Expression	18	4	22
Gesamt		33	12	45

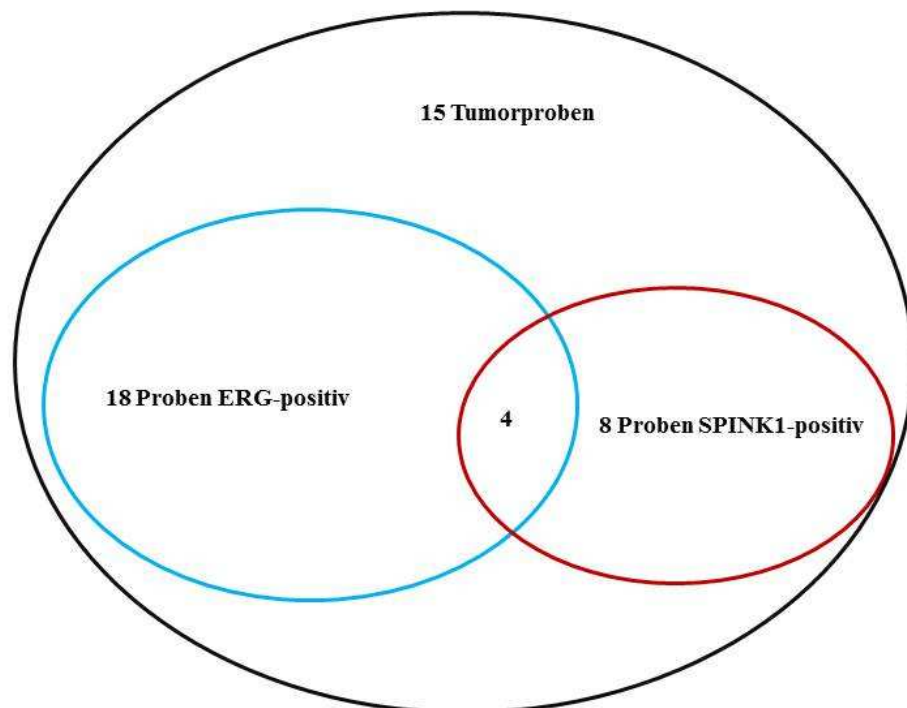


Abb. 3.2.6: Venn-Diagramm der Tumorproben bezüglich der Expression von *ERG* und *SPINK1*.

4. Diskussion

Der große Satz an Daten gibt Aufschluss über viele Veränderungen, die im Prostatakarzinom stattfinden, über ihren Zusammenhang untereinander, deren klinische Bedeutung und biologische Mechanismen.

4.1 Genexpressionsvergleich von Tumorproben zu Normalproben und klinischen Daten

Hier zeigen sich in der Auswertung zum Teil deutliche Unterschiede in der Genexpression von Prostatakarzinom und Normalgewebe der Prostata. Im Ergebnisteil ist aufgeführt, dass 30 von 72 Genen einer signifikant veränderten Regulation im Prostatakarzinom unterliegen. Von diesen 30 identifizierten Genen wurden bis auf acht alle schon von unserer Arbeitsgruppe diskutiert und publiziert. Funktion und Interaktion der verbliebenen im Prostatakarzinom deregulierten Gene werden im Zusammenhang mit den Korrelationsanalysen im Abschnitt 4.2 besprochen. Dort nicht einzubinden waren die Gene *COQ7*, *GATA3* und *IRS2*.

COQ7 kodiert für ein Enzym der Ubichinon-Biosynthese und ist das Ortholog des *C. elegans* Gens *clk-1*. Mutanten dieses Allels sind mit der Langlebigkeit des Fadenwurms assoziiert [60]; auch bei Mäusen konnte ein entsprechender Zusammenhang gefunden werden [61]. Da Vorversuche in der Arbeitsgruppe (Kloth, Ribarska & Schulz, unpubliziert) keine Hinweise auf eine tumorsuppressive Funktion ergaben, könnte die Abnahme der Genexpression eher eine Konsequenz als eine Ursache der Karzinombildung darstellen.

GATA3 ist ein Transkriptionsfaktor aus der GATA-Familie. Diese kontrollieren die gewebespezifische Genexpression, unter anderem gut untersucht im Nervensystem, Leber und Nebenschilddrüse [62-64]. Im Mammakarzinom ist *GATA3* schon als Tumorsuppressor identifiziert wurden [65]; seine Expression charakterisiert die weniger malignen Tumoren des luminalen Typs A [66]. Bei Prostatakarzinom mit *PTEN*-Verlust führt eine reduzierte Expression von *GATA3* zu verstärkter Invasion, eine verstärkte Expression dagegen zum langsamerem Fortschreiten des Tumors [67]. In unseren Daten zeigt sich

ebenfalls, dass eine verminderte Expression von *GATA3* mit vermehrten biochemischen Rezidiven einhergeht.

IRS2 spielt eine wichtige Rolle in der Signaltransduktionskette des Insulinrezeptors; Störungen seiner Funktion führen zu Obesitas und Diabetes [68]. Im Prostatakarzinom wurden IRS-Proteine schon mehrfach impliziert. Sowohl ein vermindertes *IRS1-/IRS2*-Verhältnis ist im Prostatakarzinom berichtet, als auch dass eine Reduktion der *IRS2*-Expression in Zusammenhang mit *PTEN*-Methylierung zu einer ausgeprägteren Invasion und Tumorwachstum führt [69, 70].

Das Tumorstadium ist wichtig für das Vorgehen bei der Therapie des Prostatakarzinoms, speziell sind organbegrenzte Tumoren bis zum Stadium pT2c häufiger kurativ chirurgisch behandelbar [10]. Daraus ergibt sich die Fragestellung, ob es über die pathologischen Einteilung hinaus geeignete Biomarker für ein „molekulares Staging“ gibt. In unseren Proben korrelierten insgesamt vier Gene mit dem Tumorstadium: *TNFRSF10C*, *DKC1*, *SMARCD3* und *TLR3*.

Die Expression von *TNFRSF10C*, auch als *DcR1* bezeichnet, ist im Prostatakarzinom vermindert. Die reduzierte Genexpression wird durch teilweise Hypermethylierung verursacht [46, 71, 72]. Das Gen befindet sich in einem Abschnitt von Chromosom 8, der besonders in aggressiveren Prostatakarzinomen häufig deletiert ist [73], wobei die Instabilität selber mit einer Hypomethylierung von LINE-1-Retroelementen einhergeht [74]. Als sogenannter „decoy receptor“ ist das Genprodukt in der Lage den TRAIL-Liganden zu binden, aber nicht die Apoptose auszulösen [75]. Dies erscheint paradox, weil ein Gen, das potenziell durch seine Funktion geeignet ist, die Tumorprogression zu unterstützen, im fortgeschrittenen Tumor herabreguliert ist. Eine Erklärung könnte sein, dass die Verminderung der DcR1-Expression ein Epiphänomen darstellt, z. B. als Nebeneffekt bei Deletionen auf Chromosom 8p21 auftritt. Jedoch gibt es tatsächlich Hinweise darauf, dass in bestimmten Tumorarten die proapoptotische Wirkung von TRAIL in eine überlebensfördernde verwandelt wird, wenn die Apoptosekaskade nicht ausgelöst werden kann, jedoch die Aktivierung von NFκB [76, 77]. *DKC1* zeigt sich in höheren Tumorstadien stärker exprimiert. Es ist schon länger bekannt, dass inaktivierende Mutationen dieses Gens zum Krankheitsbild der X-chromosomalen Dyskeratosis congenita führen, welches mit einem erhöhten

Leukämierisiko verbunden ist [78]. Dagegen ist eine Überaktivität von Dyskerin in verschiedenen Karzinomen zu finden; wahrscheinlich begünstigt sie dort sowohl die verstärkte Proteinbiosynthese als auch die Funktion der Telomerase. Dies wurde zuerst von Montanaro und Mitarbeitern im Mammakarzinom [79] und dann von unserer Arbeitsgruppe im Prostatakarzinom [51] entdeckt. Auch zeigt sich in einer neueren Publikation, dass im hepatozellulären Karzinom *DKC1* ebenfalls mit einem fortgeschrittenen Stadium und schlechter Prognose assoziiert ist [80]. Zudem wurde als Regulator GRIM-1 ausgemacht, welches für die Stabilität von *DKC1* eine Rolle zu spielen scheint [81].

SMARCD3 wurde als Bestandteil des „*SWI/SNF-like chromatin-remodeling protein complex*“ identifiziert [82]. Zu den anderen Bestandteilen dieses Komplexes gehören *SMARCC1* und *SMARCA2*. Eine erhöhte Expression von *SMARCC1* geht mit einem fortgeschrittenen Prostatakarzinom einher [83]. Die gleiche Arbeitsgruppe zeigte auch, dass im lokalisierten Prostatakarzinom *SMARCC1* als Prädiktor für ein verbessertes Überleben anzusehen ist [84]. *SMARCA2*, kodierend für eine ATPase des Komplexes, hat antiproliferative Wirkung und ist im Prostatakarzinom wie das von uns gemessene *SMARCD3* herabreguliert [85]. Dem gegenüber steht eine divergente Regulation durch *REST/NRSF*, welches transkriptionellen Einfluss auf die Gene des „*SWI/SNF-like chromatin-remodeling protein complex*“ nehmen, *SMARCCA2* herab- und *SMARCD3* heraufreguliert [86].

TLR3 fungiert als Teil der natürlichen Immunabwehr. Es ist als prognostischer Marker für das Prostatakarzinom beschrieben [87, 88], was in diesem Zusammenhang mit erniedrigter Expression bei erhöhtem Tumorstadium in dieser Untersuchung passt. Eine erhöhte *TLR3*-Expression tendiert dazu, durch teilweise Inaktivierung des PI3K/AKT-Signalweges Apoptose auszulösen [89]. Zwei weitere Gene der natürlichen Immunantwort, die in Lymphknoten-Metastasen positiven Primärtumoren signifikant stärker exprimiert werden, sind *IKBKE* und *MSR1*. Diese Beobachtungen passen zu dem Postulat von Schulz et al, wonach die Progression des Prostatakarzinoms häufig mit einer verringerten natürlichen Immunität einhergeht [47].

Das Verhalten von *DKC1* im Prostatakarzinom ist klinisch gut korreliert. Dieses Gen zeigt auch eine erhöhte Expression in Prostatakarzinomen, die schon Lymphknoten-Metastasen gebildet haben. Dieser Umstand macht *DKC1* umso

mehr zum Indikator für schon fortgeschrittene Prostatakarzinome. Tatsächlich erweist sich *DKC1* über alle Kategorien hinweg als am besten mit negativen klinischen Parametern assoziiertes Gen, wie schon publiziert [51].

Die mRNA-Expression von *DKC1* korreliert ebenfalls mit dem Rezidivstatus. Beschrieben wurde dies auch von unserer Arbeitsgruppe [51]. Darüber hinaus ist in der Literatur nichts bekannt. Hingegen wurde schon beschrieben, dass eine erhöhte Expression von *FOXA1* mit einem erhöhten Risiko für ein Rezidiv einhergeht [90]. Der in dieser Publikation beschriebene Zusammenhang von *FOXA1*-Expression mit Tumorstadium und Gleason-Score wird von uns leider nicht bestätigt. *GATA3* wurde vorab schon erwähnt. Verschiedene Studien haben die Expression von *GATA3* im Zusammenhang mit Rezidiven hauptsächlich in Mammakarzinomen untersucht. Studien dazu haben verschiedentliche Ergebnisse hervorgebracht; die eine Studie besagt, dass kein Zusammenhang zwischen Rezidiv und Expression vorliegt [91], andere wiederum schon [92]. *HOXC6* zeigt sich in unserer Tumorserie ebenfalls als Rezidivmarker [54]. In einer anderen Forschungsarbeit ist dieser Umstand auch auf Proteinebene nachgewiesen worden [93]. *PPP3CC* gehört zu den schon erwähnten Chromosom 8 Genen und ist eine Proteinphosphatasen-Untereinheit [94]. Metaanalysen haben gezeigt, dass Nukleotid-Polymorphismen im *PPP3CC*-Gen zu einem erhöhten Schizophrenie-Risiko führen [95]. Im Zusammenhang mit dem Prostatakarzinom ist dieses Gen bisher nur von uns besprochen [46].

In Zusammenschau all der mit dem Prostatakarzinom und seinen klinischen Parametern assoziierten Genexpressionsveränderungen zeigt sich leider kein „Supermarker“, der in jeder der Kategorien T-Status, Lymphknotenmetastase, Gleason-Score und Rezidiv auftritt; am ehesten breit aussagekräftig sind die Expression von DKC1 und HOXC6.

4.2 Korrelationsanalyse und funktionelle Aspekte

Die durchgeführte Korrelationsanalyse nach Spearman hat verschiedene Genpaarungen aufgezeigt, die ein ähnliches Expressionsmuster mit deutlichem Rangkorrelationskoeffizienten und einer Signifikanz $p < 0,001$ aufweisen. Das Genpaar mit dem höchsten Rangkorrelationskoeffizienten *EPB41L5* – *EPB49* illustriert die Kohärenz der Daten. Beide Gene kodieren für Proteine, welche am Aufbau des kortikalen Zytoskelettes [96, 97] beteiligt sind. Das Gen *EPB49* kodiert für das Protein Dematin; in frei zirkulierenden Tumorzellen kann es als Marker für eine signifikant erhöhte allelische Disbalance dienen kann [98]. Beide Gene sind jedoch insgesamt nicht differenziell zwischen den Tumor- und Normalgeweben exprimiert; ihre starke Korrelation könnte vielmehr die gemeinsame Regulation unter verschiedenen Bedingungen widerspiegeln.

Anderes gilt für *JAK1* und *DKK3*. Die Genexpression von *JAK1* ist im Tumor gegenüber Normalgewebe vermindert. *DKK3* bleibt allerdings unverändert. Dennoch zeigt sich im Tumorgewebe ein hoher Rangkorrelationskoeffizient. Dies ist möglicherweise Zeichen einer (mittel- oder unmittelbaren) Regulation von *DKK3* durch *JAK1*, das im Tumorgewebe als Regulator ausfällt. *DKK3* kodiert für das Dickkopf3-Protein, einen Antagonisten im Wnt-Signalweg, dessen Genexpression u. a. im Endometriumkarzinom vermindert ist [99]. Eine Überexpression stimuliert in Zelllinien aus Kolon- und Pankreaskarzinomen die Apoptose [100, 101]. *JAK1* ist namensgebend im JAK/STAT-Signaltransduktionsweg. Eine erhöhte Aktivität dieses Wegs, hauptsächlich durch IL-6 bedingt, kann den Übergang zum hormonrefraktären Prostatakarzinom begünstigen [102]. Überraschenderweise konnte man dagegen in gängigen Zelllinien des Prostatakarzinoms kaum Proteinexpression von *JAK1* nachweisen, aufgrund einer epigenetischen Repression [103, 104]. Dazu passt die bei uns in den Tumorgeweben nachgewiesene reduzierte Genexpression. Ein direkter Zusammenhang zwischen der Genexpression von *JAK1* und *DKK3* lässt sich am ehesten verstehen als mögliche Verbindung („Crosstalk“) zwischen JAK/STAT und Wnt-Signalweg.

Zu den negativ korrelierten Genpaaren gehört *SMARCD3* mit *FOXA1*. *FOXA1* ist im Prostatakarzinom deutlich hochreguliert. Die Expression von *SMARCD3* hingegen ist stark reduziert. In Abbildung 3.1.4 kann man einen deutlich linearen Verlauf erkennen. *FOXA1* bestimmt als Cofaktor des Androgen-Rezeptors die Transkription vieler vom Androgen-Rezeptor abhängiger Gene mit [105]. Von klinischer Bedeutung ist *FOXA1* insofern, als eine erhöhte Expression deutlich mit einer schlechteren Prognose und mit steigendem Gleason-Score einhergeht [57]. Mechanistisch geschieht dies zumindest teilweise über Senkung des insulin-like-growth-factor-binding-protein-3 (IGFBP3), wodurch es zur vermehrten Phosphorylierung von MAPK und AKT kommt und im Weiteren die Proliferation gefördert wird [106]. Dies geht auch mit einer früheren Beobachtung konform, wonach IGFBP3 bei zunehmenden Gleason-Score reduziert ist [107]. Eine andere retrospektive Studie konnte zwar auf Protein-Ebene keinen Zusammenhang zum Gleason-Score feststellen, jedoch eine deutliche Protein-Expression von FOXA1 im Metastasengewebe [108]. *SMARCD3* hat eine transkriptionelle Funktion, vermittelt durch Chromatin-Remodelierung [82, 109]. Von besonderer Bedeutung ist es in der Herzentwicklung, wo eine Reduzierung der Genexpression von *SMARCD3* zu einer schlechteren Differenzierung und Links-Rechts-Asymmetrie führt [110]. Der genaue Zusammenhang von *FOXA1* und *SMARCD3* ist unklar, aber auch *SMARCD3* ist ein Cofaktor bei der Androgen-Rezeptor-vermittelten Transkription [111].

Die in der Abbildung 3.1.5 dargestellten Cluster sind über die Pearson-Korrelation abgeleitet. Es hatten sich mehrere deutliche Cluster ergeben, innerhalb derer die Ähnlichkeit der Genexpression mehr oder minder plausibel ist.

Ein erstes Cluster besteht zentral aus JMJD1A, SHH, PON2, PPP2CB, HIP; es lässt sich am ehesten als „Morphogen-Cluster“ charakterisieren. *JMJD1a* kodiert für eine Histondemethylase, die an der zellulären Antwort auf Hypoxie beteiligt ist sowie an der Spermatogenese und damit der männlichen Fertilität [112-114]. In Nierenzellkarzinom-Zelllinien führt eine Abwesenheit von *JMJD1a* zu vermindertem Tumorwachstum [115]. Im Prostatakarzinom verändert ein hypoxisches Milieu offenbar die Expression von *JMJD1a* nicht, doch führen beide Faktoren gemeinsam zu einer Aktivierung des PSA-Gens *KLK3* mit

verstärkter Expression und Histonacetylierung [116]. Das Genprodukt von *SHH* gehört zu den Hedgehog-Morphogenen und ist maßgeblich an der Entwicklung vieler Gewebe beteiligt, so auch des Urogenitalsystems [117]. Im hepatozellulären Karzinom hat sich SHH als potenzieller prognostischer Faktor herausgestellt [118], im Prostatakarzinom gilt es als negativer Prädiktor bezüglich des biochemischen Rezidivs, Gleason-Scores und der Tumorausdehnung [119]. In unserem Probenkollektiv ist dieser Zusammenhang – auf RNA-Ebene – nicht nachvollziehbar. *PON2* wird vor allem mit Atherosklerose in Zusammenhang gebracht [120, 121]. Nach den Daten unserer Arbeitsgruppe ist es im Prostatakarzinom verstärkt exprimiert [58], möglicherweise wegen seiner zellprotektiven Wirkung [121]. *PON2* gehört zu einem Netzwerk von genomisch geprägten Genen, die das embryonale Wachstum steuern [122]. *PPP2CB* als kodierendes Gen für eine Isoform der katalytischen Untereinheit der Proteinphosphatase 2 ist für die Embryonal- und Organogenese ersetzbar, wie man mit geflochten Mausmodellen herausgefunden hat [123]. Seine Funktion könnte jedoch durch andere Isoformen kompensiert werden. Auf seine Bedeutung im Prostatakarzinom machte erstmals eine Publikation aus unserer Arbeitsgruppe aufmerksam [46]. *HIP* kodiert einen weiteren Bestandteil des Sonic-Hedgehog-Signalweges; das *Hedgehog inhibitory protein* ist in der Lage alle drei Isoformen des Hedgehog-Proteins zu binden und dadurch ihre Wirkung zu attenuieren; es wirkt als Feedback-Inhibitor des Signalwegs [124]. Es wird vermutet, dass seine verminderte Expression in Tumoren die Angiogenese fördert und dadurch das Tumorwachstum unterstützt, weil es zu einer verminderten Blockade des Hedgehog-Signalweges kommt [125]. In höhergradigem (Gleason > 8) Prostatakarzinom soll es vermehrt exprimiert sein [126]. Dies lässt sich mit unseren Daten allerdings nicht bestätigen; hier besteht vielmehr eine statistisch nicht signifikante Tendenz zu verminderter Expression bei steigendem Gleason-Score. Die Pearson-Korrelation zu *SHH* liegt bei 0,816, im Einklang mit der Funktion beider Genprodukte im gleichen Signalweg und der Vorstellung, dass *HIP* in Abhängigkeit von der Hedgehog-Aktivität induziert wird. Allerdings ist *HIP* im Gegensatz zu *SHH* im Prostatakarzinom nicht signifikant hochreguliert. Für das Gesamtcluster lässt sich vermuten, dass diese Gene im weiteren Zusammenhang mit dem Sonic-Hedgehog-Signalweg stehen, was für *JMJD1a* und *PON2* bisher nicht bekannt ist. *PPP2CB* könnte über seine Interaktion mit

PPP2A in Zusammenhang mit dem SHH-Signalweg stehen, da zwischen *PPP2A* und diesem ein molekularer Crosstalk vermutet wird [127].

Das Cluster um *ERG*, *SPOCK1*, *EPB41L4B*, *FOXA1* steht im funktionellen Zusammenhang mit dem Androgenrezeptor. *ERG* ist – wie in der Einleitung beschrieben – in circa 50% der Prostatakarzinome hochreguliert, meist aufgrund einer Gentranslokation, die seine Expression unter Androgenkontrolle bringt [22, 128]. *SPOCK1* ist ein testikuläres Proteoglykan, welches in der Seminalflüssigkeit vorhanden ist [129, 130]. *FOXA1* ist ein Transkriptionsfaktor, der unter anderem für die Entwicklung der Leber [131] und der Prostata [132] wesentlich ist. Der deutliche Zusammenhang von *EPB41L4B* und *ERG* wird unten im Detail diskutiert. Wie in der Einleitung beschrieben, steht *ERG* nach Translokation unter Kontrolle des Androgen-Rezeptors. *EPB41L4B* wiederum scheint von *ERG* kontrolliert zu sein [52] und *FOXA1* nimmt selber Einfluss auf den Androgen-Rezeptor [105].

Als weiteres augenscheinliches Cluster ergibt sich eine Zusammenstellung von *JAK1*, *TLR3*, *CARD8*, *MKI67*, *IKBKE* und *OPG*. Mehrere dieser Genprodukte sind in der Signaltransduktion aktiv, doch ist diese Gengruppe insgesamt heterogen. In Betrachtung der einzelnen Gene zeigt sich dies. *TLR3* hat seine Funktion vor allem im Bereich der Immunabwehr [88] und gilt im Prostatakarzinom als Marker für das biochemische Rezidiv und andere klinische Parameter [87]. In unserer Studienpopulation hat sich dies allerdings nicht bestätigt. *CARD8* ist ein Negativregulator der NFκB-Aktivierung und kann daher Apoptose induzieren [133]. Der *CARD8*-Promoter soll durch HOXC6-Protein aktiviert werden [134]. Dieser Effekt konnte in unseren Daten jedoch nicht nachvollzogen werden. *OPG* (Osteoprotegerin) ist ein Zytokin-Rezeptor und hemmt die Osteoklastenaktivität über die Bindung von RANKL [135]. *OPG* wird vor allem in Knochenmetastasen des Prostatakarzinoms verstärkt exprimiert [136]. Das Genprodukt von *MKI67* ist als Ki67 ein breit verwendeter Proliferationsmarker [137]. Im Prostatakarzinom wurde schon relativ früh eine Beziehung seiner Proteinexpression zum krankheitsfreien Überleben gezeigt [138]. Die Ki67-Expression hängt im Prostatakarzinom beispielsweise vom PI3K/Akt-Signalweg ab [139]. Welcher Zusammenhang zwischen Ki67 und den

anderen Genen des Clusters besteht, ist unklar; welchen Einfluss diese auf die Zellproliferation ausüben, ist nur teilweise untersucht.

Bei der Clusteranalyse wird zum Teil auch der Einfluss von *ERG* erkennbar, der in 4.3.2 explizit diskutiert wird. Wie in der Einleitung beschrieben, ist *ERG* in circa 50 % der Fälle im Prostatakarzinom überexprimiert; dabei hängt die Überexpression wesentlich vom Vorhandensein einer Translokation ab. Übereinstimmend damit ist in unseren Daten *ERG* im Prostatakarzinom gegenüber dem Normalgewebe signifikant erhöht, die Erhöhung ist jedoch nicht gleichmäßig verteilt, sondern etwa 50 % aller Tumore exprimieren *ERG* ähnlich niedrig wie die Normalgewebe und die anderen meist sehr viel stärker. Man kann also vermuten, dass die auch in diesen Fällen eine Translokation vorliegt. *ERG* ist aufwändig untersucht im Prostatakarzinom. Es wurde als wichtiger Faktor bei der Invasion benannt [42], wobei in anderen Serien [140] wie bei uns kein direkter Zusammenhang mit den klinischen Parametern erkennbar war. Eine andere Studie hat eine knappe Signifikanz für das Auftreten des biochemischen Rezidivs zeigen können [141]. Interessant wird *ERG* unbestritten dadurch, dass die Translokation im Urinsediment nachgewiesen werden kann und so bei Detektion des Prostatakarzinoms hilfreich sein kann [142], auch wenn der Zusammenhang mit der Prognose strittig ist. Unsere Untersuchung zeigt darüber hinaus ein kohärentes Expressionsmuster von *ERG* mit anderen Genen. Betrachtet man die Ergebnisse aus Kapitel 3.2.1, sind vor allem *HPN* ($p = 0,003$), *SHH* ($p = 0,002$) und *SPOCK* ($p = 0,002$) deutlich an die Expression von *ERG* angepasst.

HPN, kodierend für Hepsin, ist schon länger als durchweg überexprimiert im Prostatakarzinom bekannt [21]. Dabei handelt es sich um eine Serin-Protease wie *TMPRSS2* [143]. Beide Gene liegen auf verschiedenen Chromosomen, aber eine parallele transkriptionelle Regulation liegt nahe. Funktionell könnte Hepsin durch Aktivierung von Wachstumsfaktoren die Invasion und Metastasierung von Prostatakarzinomen unterstützen [144].

Ähnliches gilt für *SHH* [126]. Als Bestandteil einer umfassenden Signalkaskade kann hier eine gegenseitige Beeinflussung möglich sein. Bezogen auf *SPOCK1* ergibt sich aus den Ergebnissen folgendes Bild. *SPOCK1* ist in der Lage den

AKT-Signalweg zu aktivieren und beeinflusst im hepatozellulären Karzinom Apoptose und Metastasierung [145]. Ebenso interagiert *ERG* mit dem AKT-Signalweg und nimmt Einfluss auf den Verlauf des Prostatakarzinoms, welcher sich hier durch widerspiegeln könnte [146].

4.3. Zusammenhänge mit molekularen Subtypen des Prostatakarzinoms

4.3.1 Verhältnis von SPINK1 und ERG

Speziell wurde in dieser Arbeit nach Genen gesucht, deren Expression in molekular definierten Subtypen des Prostatakarzinoms auffällig verändert war. Diese Subtypen waren über die Expression von ERG bzw. SPINK1 definiert (vgl. Abschnitt 1.2.1 und 1.2.2). Aktuelle Studien betrachten *SPINK1*- und *ERG*-positive Tumoren als Subkategorien des Prostatakarzinoms, welche man nunmehr zuverlässig durch immunhistochemische Assays unterscheiden kann [43]. Dabei ist auch festgestellt worden, dass die Tumoren regelhaft keine Koexpression von *SPINK1* und *ERG* aufweisen [147]. Aus dem Diagramm 3.2.6 geht hervor, dass in der hiesigen Patientenkohorte zwar vier Proben auf RNA-Ebene sowohl für *SPINK1* als auch *ERG* positiv sind, doch zeigt der Chi-Quadrat-Test, dass beide Merkmale unabhängig voneinander auftreten. In der Literatur wird ebenfalls vereinzelt von Coexpression berichtet [43]. Weiterhin wird berichtet, dass SPINK1 Überexpression häufig mit Verlust von *PTEN* einhergeht [148]. PTEN löst durch Hemmung des PI3K-Signalwegs einen Zellzyklus-Arrest aus [149]. Der Status von PTEN in der hiesigen Patientenkohorte war zum Zeitpunkt der Analyse nicht bekannt.

4.3.2 Gene im ERG-Subtyp

Besonders auffällig in diesem Subtyp waren die Expressionsmuster von Genen der EPB-Familie. Die EPB41-Proteine sind Bestandteile des kortikalen Zytoskeletts und sind besser als 4.1-Proteine bekannt. Dabei gilt das Protein 4.1B (kodiert vom Gen *EPB41L3*) als Suppressor der Metastasierung [150, 151]. Wie auch unsere Daten belegen, ist Protein 4.1B beziehungsweise die Genexpression von *EPB41L3* im Prostatakarzinom signifikant reduziert, im Einklang mit einer Funktion als Suppressor von Progression und

Metastasierung [151]. *EPB41L4B* kodiert für das Protein *EHM2*. Dieses Gen ist im Prostatakarzinom hochreguliert und könnte in Verbindung stehen mit Progression und Metastasierung [152]. In der hiesigen Gewebeserie ist *EPB41L3* besonders in ERG-positiven Karzinomen vermindert und *EPB41L4B* verstärkt exprimiert. Die anderen Gene der EPB41-Familie zeigen keinen statistischen Zusammenhang mit der *ERG*-Expression. Daher lässt sich ableiten, dass die Expression von *EPB41L3* und *EPB41L4B* durch die *ERG*-Überexpression verändert sein könnte. Dies ist funktionell plausibel, da *ERG* insbesondere für die Invasivität von Prostatakarzinomen verantwortlich gemacht wird [42]. Diesen Effekt könnte es zumindest teilweise durch Herabregulation von *EPB41L3* erzielen. Die Funktion von *EPB41L4B* beziehungsweise seinem Genprodukt EHM2 in der Zelladhäsion [152] passt ebenfalls in diesen Zusammenhang. Insgesamt lässt sich vermuten, dass bestimmte Mitglieder der *EPB41*-Familie als Teil eines von *ERG* initialisierten Programms fungieren, welches für die Eigenschaften *ERG*-positiver Karzinome von Bedeutung ist [52]. Wie die Regulation von *EPB41*-Genen durch ERG erfolgt, ist allerdings bisher unbekannt. Auffällig ist jedoch, dass die ebenfalls mit ERG assoziierten Gene *SPOCK1* und *FBLN1* sich parallel zu *EPB41L4B* bzw. zu *EPB41L3* verhalten. *SPOCK1* ist stark mit *EPB41L4B* korreliert und in *ERG* positiven Tumoren ähnlich überexprimiert. Umgekehrt sind die stark zueinander korrelierten Gene *FBLN1* und *EPB41L3* in *ERG*-positiven Tumoren wesentlich schwächer exprimiert. Dies lässt auf eine Veränderung von Proteinen der Extrazellulärmatrix schließen. Die gleichgerichtete Expression von *SPOCK1* und *EBP41L4B* könnte sich darüber hinaus aus der gemeinsamen Regulation durch Androgene erklären [152, 153].

4.3.3 Gene im SPINK1-Subtyp

Bei *SPINK1* handelt es sich um das kodierende Gen des Serinprotease-Inhibitors Kazal Typ 1. Patienten mit *SPINK1*-positiven Prostatakarzinomen erleiden häufiger ein Rezidiv [49]. Dies gilt ebenfalls für das Urothelkarzinom der Harnblase [154]. Auch vermutet man, dass es die Entstehung des duktaalen Adenokarzinoms des Pankreas über den EGFR-Signalweg beeinflusst [155, 156]. Die Ursache für seine Überexpression in einem Teil der Prostatakarzinome ist unklar. Von den 45 Tumoren unseres Patientenkollektivs

überexprimieren 26,7 % *SPINK1*. Dies liegt über den in der Literatur beschriebenen 10 % [49]; jedoch gibt es keinen Konsens, wie ein Cut-off für die *SPINK1*-Überexpression zu definieren sei. Nur vier Gene verändern sich statistisch signifikant im Verhältnis der *SPINK1*-Expression, nämlich die im Ergebnisteil aufgeführten *IL24*, *LXN*, *SPRY2* und *TNFRSF10C*.

IL24, oder auch Interleukin 24, wird als Tumorsuppressor betrachtet und ist aus diesem Grund über virale Transfektion therapeutisch erprobt worden [157, 158]. Dabei wird der apoptotische Einfluss vor allem auf Tumorzellen ausgeübt, unter anderem im Prostatakarzinom [159]. Ein Zusammenhang mit klinischen Parametern wird bei uns für *IL24* nicht gefunden. Der hier rein statistische Zusammenhang lässt vermuten, dass *IL24* und *SPINK1* in gemeinsamen Signalwegen einzuordnen sind.

LXN ist unter anderem als Tumorsuppressor im malignen Melanom der Haut und im Magenkarzinom untersucht [160, 161]. Aus unseren klinischen Daten ergibt sich – von der mRNA-Expression her – kein Hinweis darauf, dass es sich um ein Markergen für verstärkte Malignität handelt. Allerdings zeigte sich in einer erweiterten Serie von 86 Proben aus unserer Arbeitsgruppe ein Zusammenhang der Hypermethylierung von *LXN* mit der des Nachbargens *RARRES1*, welche hoch-signifikant prognostisch aussagekräftig ist [56]. Funktionell handelt es sich bei beiden Genprodukten um Inhibitoren für spezifische Proteasen [162-164]; dieser mögliche funktionelle Zusammenhang ist jedoch noch nicht experimentell untersucht.

SPRY2 ist ein Feedback-Inhibitor des ERK-Signalweges [165]. Es unterbricht die Signaltransduktion von aktivierten Rezeptor-Tyrosinkinasen und eine Reduzierung seiner Expression kann daher auch zu einer Aktivierung von AKT führen [166]. *SPINK1* wiederum ist in der Lage über den EGF-Rezeptor den AKT-Signalweg zu aktivieren [156]. Da Prostatakarzinome mit einer *SPINK1*-Überexpression eine verminderte *SPRY2*-Expression aufweisen, könnte eine gegenseitige Beeinflussung dieser Signalwege bestehen. Diese Konstellation sollte zu einer Verstärkung der Karzinogenese führen. Besonders zu beachten ist die Beobachtung, dass eine Verminderung von *SPRY2* oder des AKT-Signalweg-Antagonisten *PTEN* zu einer reduzierten Expression des EGF-

Rezeptors führen kann [167]. Dies unterstützt die These der gegenseitigen Beeinflussung von *SPRY2* und *SPINK1*.

TNFRS10C oder auch *DcR1* gehört in den Bereich der Apoptose-Regulation. Das Genprodukt kann die Induktion der Apoptose durch TRAIL als „Decoy“-Rezeptor vermindern und seine verstärkte Expression ist daher prinzipiell mit Karzinogenese vergesellschaftet [168]. Paradoxerweise ist dies im Prostatakarzinom umgekehrt. Vor allem seine epigenetische Modifikation durch erhöhte DNA-Methylierung geht mit einem erhöhten Gleason-Score einher [169]. Im Androgenrezeptor-positivem Prostatakarzinom kann MEKK- Apoptose induzieren [170], die durch *DcR1* inhibiert wird, ebenso wie durch die Aktivierung von PI3K/AKT [171]. Da *SPINK1* [46] ebenfalls zu einer Aktivierung von AKT führt [166], kann vermutet werden, dass hier eine Feedback-Schleife die Apoptose vermindert und dadurch malignitätsfördernd wirkt.

Zusammengenommen haben die Analysen der Genexpression in den „molekularen Subtypen“ des Prostatakarzinoms mehrere Hinweise auf Zusammenhänge ergeben, die eine genauere experimentelle Analyse lohnen dürften.

5. Literaturverzeichnis

1. Haas, G.P., et al., *The worldwide epidemiology of prostate cancer: perspectives from autopsy studies*. Can J Urol, **2008**. 15(1): p. 3866-71.
2. Berger, M.F., et al., *The genomic complexity of primary human prostate cancer*. Nature, **2011**. 470(7333): p. 214-20.
3. Schultz, C., M. Meier, and H.P. Schmid, *Nutrition, dietary supplements and adenocarcinoma of the prostate*. Maturitas, 2011. 70(4): p. 339-42.
4. Bostwick, D.G., et al., *Human prostate cancer risk factors*. Cancer, **2004**. 101(10 Suppl): p. 2371-490.
5. UICC, *TNM – Klassifikation maligner Tumoren*. 7 ed**2010**: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. 315.
6. Sobin LH, Gospodarowicz MK., Wittenkind C, *TNM Classification of Malignant Tumours (Uicc International Union Against Cancer)*, 7th ed**2009**, Oxford: John Wiley & Sons. 310.
7. Humphrey, P.A., *Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate*. Mod Pathol, **2004**. 17(3): p. 292-306.
8. Epstein, J.I., et al., *The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma*. Am J Surg Pathol, **2005**. 29(9): p. 1228-42.
9. Epstein, J.I., *An update of the Gleason grading system*. J Urol, **2010**. 183(2): p. 433-40.
10. Ackermann, R., *Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms*. 2009 Mar **2011**; Available from: http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/043-022-OL-I_S3_Prostatakarzinom_Langfassung_V1-03.pdf.
11. Gomella, L.G., et al., *Screening for prostate cancer: the current evidence and guidelines controversy*. Can J Urol, **2011**. 18(5): p. 5875-83.
12. Hautmann, R. and Petriconi RD., *Urologie: mit 143 Tabellen*. 4., überarb. und aktualisierte Aufl. ed. Springer-Lehrbuch **2010**, Heidelberg: Springer Medizin. XV, S. 551
13. Fizazi, K., et al., *Abiraterone acetate for treatment of metastatic castration-resistant prostate cancer: final overall survival analysis of the*

- COU-AA-301 randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 study.* Lancet Oncol, **2012**. 13(10): p. 983-92.
14. de Bono, J.S., et al., *Prednisone plus cabazitaxel or mitoxantrone for metastatic castration-resistant prostate cancer progressing after docetaxel treatment: a randomised open-label trial.* Lancet, **2010**. 376(9747): p. 1147-54.
 15. Ryan, C.J., et al., *Abiraterone in metastatic prostate cancer without previous chemotherapy.* N Engl J Med, **2013**. 368(2): p. 138-48.
 16. Potter, G.A., et al., *Novel steroidal inhibitors of human cytochrome P45017 alpha (17 alpha-hydroxylase-C17,20-lyase): potential agents for the treatment of prostatic cancer.* J Med Chem, 1995. 38(13): p. 2463-71.
 17. El-Amm, J., et al., *Metastatic castration-resistant prostate cancer: critical review of enzalutamide.* Clin Med Insights Oncol, **2013**. 7: p. 235-45.
 18. Ohl, F., et al., *Gene expression studies in prostate cancer tissue: which reference gene should be selected for normalization?* J Mol Med (Berl), **2005**. 83(12): p. 1014-24.
 19. Sorensen, K.D. and T.F. Orntoft, *Discovery of prostate cancer biomarkers by microarray gene expression profiling.* Expert Rev Mol Diagn, **2010**. 10(1): p. 49-64.
 20. Rubin, M.A., et al., *alpha-Methylacyl coenzyme A racemase as a tissue biomarker for prostate cancer.* JAMA, **2002**. 287(13): p. 1662-70.
 21. Magee, J.A., et al., *Expression profiling reveals hepsin overexpression in prostate cancer.* Cancer Res, **2001**. 61(15): p. 5692-6.
 22. Tomlins, S.A., et al., *Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer.* Science, **2005**. 310(5748): p. 644-8.
 23. Hoffmann, M.J., et al., *Expression changes in EZH2, but not in BMI-1, SIRT1, DNMT1 or DNMT3B are associated with DNA methylation changes in prostate cancer.* Cancer Biol Ther, **2007**. 6(9): p. 1403-12.
 24. Konig, J.J., et al., *Gain and loss of chromosomes 1, 7, 8, 10, 18, and Y in 46 prostate cancers.* Hum Pathol, **1996**. 27(7): p. 720-7.
 25. Porkka, K.P. and T. Visakorpi, *Molecular mechanisms of prostate cancer.* Eur Urol, **2004**. 45(6): p. 683-91.
 26. Baca, S.C., et al., *Punctuated evolution of prostate cancer genomes.* Cell, **2013**. 153(3): p. 666-77.
-

27. Grasso, C.S., et al., *The mutational landscape of lethal castration-resistant prostate cancer*. Nature, **2012**. 487(7406): p. 239-43.
28. MacInnis, R.J., et al., *Population-based estimate of prostate cancer risk for carriers of the HOXB13 missense mutation G84E*. PLoS One, **2013**. 8(2): p. e54727.
29. Stott-Miller, M., et al., *HOXB13 mutations in a population-based, case-control study of prostate cancer*. Prostate, **2013**. 73(6): p. 634-41.
30. Evans, B.A., et al., *Low incidence of androgen receptor gene mutations in human prostatic tumors using single strand conformation polymorphism analysis*. Prostate, **1996**. 28(3): p. 162-71.
31. Hay, C.W. and I.J. McEwan, *The impact of point mutations in the human androgen receptor: classification of mutations on the basis of transcriptional activity*. PLoS One, **2012**. 7(3): p. e32514.
32. Barbieri, C.E. and S.A. Tomlins, *The prostate cancer genome: perspectives and potential*. Urol Oncol, **2014**. 32(1): p. 53 e15-22.
33. Florl, A.R., et al., *Coordinate hypermethylation at specific genes in prostate carcinoma precedes LINE-1 hypomethylation*. Br J Cancer, **2004**. 91(5): p. 985-94.
34. Jeronimo, C., et al., *Epigenetics in prostate cancer: biologic and clinical relevance*. Eur Urol, **2011**. 60(4): p. 753-66.
35. Kron, K., et al., *Discovery of novel hypermethylated genes in prostate cancer using genomic CpG island microarrays*. PLoS One, **2009**. 4(3): p. e4830.
36. Rogers, C.D., J.L. Phillips, and M.E. Bronner, *Elk3 is essential for the progression from progenitor to definitive neural crest cell*. Dev Biol, **2013**. 374(2): p. 255-63.
37. Shin, S.Y., et al., *The ETS family transcription factor ELK-1 regulates induction of the cell cycle-regulatory gene p21(Waf1/Cip1) and the BAX gene in sodium arsenite-exposed human keratinocyte HaCaT cells*. J Biol Chem, **2011**. 286(30): p. 26860-72.
38. Schaefer, J.S., et al., *Transcriptional regulation of p21/CIP1 cell cycle inhibitor by PDEF controls cell proliferation and mammary tumor progression*. J Biol Chem, **2010**. 285(15): p. 11258-69.
39. Pei, H., et al., *Caspase-1 is a direct target gene of ETS1 and plays a role in ETS1-induced apoptosis*. Cancer Res, **2005**. 65(16): p. 7205-13.

40. Hollenhorst, P.C., D.A. Jones, and B.J. Graves, *Expression profiles frame the promoter specificity dilemma of the ETS family of transcription factors*. Nucleic Acids Res, **2004**. 32(18): p. 5693-702.
41. Cai, C., et al., *Reactivation of androgen receptor-regulated TMPRSS2:ERG gene expression in castration-resistant prostate cancer*. Cancer Res, **2009**. 69(15): p. 6027-32.
42. Perner, S., et al., *TMPRSS2-ERG fusion prostate cancer: an early molecular event associated with invasion*. Am J Surg Pathol, **2007**. 31(6): p. 882-8.
43. Bhalla, R., et al., *Novel dual-color immunohistochemical methods for detecting ERG-PTEN and ERG-SPINK1 status in prostate carcinoma*. Mod Pathol, **2013**.
44. Baena, E., et al., *ETV1 directs androgen metabolism and confers aggressive prostate cancer in targeted mice and patients*. Genes Dev, **2013**. 27(6): p. 683-98.
45. Chen, Y., et al., *ETS factors reprogram the androgen receptor cistrome and prime prostate tumorigenesis in response to PTEN loss*. Nat Med, **2013**. 19(8): p. 1023-9.
46. Hornstein, M., et al., *Protein phosphatase and TRAIL receptor genes as new candidate tumor genes on chromosome 8p in prostate cancer*. Cancer Genomics Proteomics, **2008**. 5(2): p. 123-36.
47. Schulz, W.A., et al., *Factor interaction analysis for chromosome 8 and DNA methylation alterations highlights innate immune response suppression and cytoskeletal changes in prostate cancer*. Mol Cancer, **2007**. 6: p. 14.
48. Wlazlinski, A., et al., *Downregulation of several fibulin genes in prostate cancer*. Prostate, **2007**. 67(16): p. 1770-80.
49. Tomlins, S.A., et al., *The role of SPINK1 in ETS rearrangement-negative prostate cancers*. Cancer Cell, **2008**. 13(6): p. 519-28.
50. Ateeq, B., et al., *Therapeutic targeting of SPINK1-positive prostate cancer*. Sci Transl Med, **2011**. 3(72): p. 72ra17.
51. Sieron, P., et al., *DKC1 overexpression associated with prostate cancer progression*. Br J Cancer, **2009**. 101(8): p. 1410-6.

52. Schulz, W.A., et al., *Changes in cortical cytoskeletal and extracellular matrix gene expression in prostate cancer are related to oncogenic ERG deregulation*. BMC Cancer, **2010**. 10: p. 505.
53. Ramachandran, K., et al., *Methylation-mediated repression of GADD45alpha in prostate cancer and its role as a potential therapeutic target*. Cancer Res, **2009**. 69(4): p. 1527-35.
54. Vinarskaja, A., et al., *DNA Methylation and the HOXC6 Paradox in Prostate Cancer*. Cancers (Basel), **2011**. 3(4): p. 3714-25.
55. Vinarskaja, A., et al., *ID4 is frequently downregulated and partially hypermethylated in prostate cancer*. World J Urol, **2011**.
56. Kloth, M., et al., *The SNP rs6441224 influences transcriptional activity and prognostically relevant hypermethylation of RARRES1 in prostate cancer*. Int J Cancer, **2012**. 131(6): p. E897-904.
57. Sahu, B., et al., *Dual role of FoxA1 in androgen receptor binding to chromatin, androgen signalling and prostate cancer*. EMBO J, **2011**. 30(19): p. 3962-76.
58. Ribarska, T., et al., *Epigenetic inactivation of the placentally imprinted tumor suppressor gene TFPI2 in prostate carcinoma*. Cancer Genomics Proteomics, **2010**. 7(2): p. 51-60.
59. Fritzsche, S., et al., *Concomitant down-regulation of SPRY1 and SPRY2 in prostate carcinoma*. Endocr Relat Cancer, **2006**. 13(3): p. 839-49.
60. Ewbank, J.J., et al., *Structural and functional conservation of the Caenorhabditis elegans timing gene clk-1*. Science, **1997**. 275(5302): p. 980-3.
61. Liu, X., et al., *Evolutionary conservation of the clk-1-dependent mechanism of longevity: loss of mclk1 increases cellular fitness and lifespan in mice*. Genes Dev, **2005**. 19(20): p. 2424-34.
62. Grigorieva, I.V., et al., *Gata3-deficient mice develop parathyroid abnormalities due to dysregulation of the parathyroid-specific transcription factor Gcm2*. J Clin Invest, **2010**. 120(6): p. 2144-55.
63. Patient, R.K. and J.D. McGhee, *The GATA family (vertebrates and invertebrates)*. Curr Opin Genet Dev, **2002**. 12(4): p. 416-22.
64. Pandolfi, P.P., et al., *Targeted disruption of the GATA3 gene causes severe abnormalities in the nervous system and in fetal liver haematopoiesis*. Nat Genet, **1995**. 11(1): p. 40-4.

65. Dydensborg, A.B., et al., *GATA3 inhibits breast cancer growth and pulmonary breast cancer metastasis*. *Oncogene*, **2009**. 28(29): p. 2634-42.
66. Perou, C.M., et al., *Molecular portraits of human breast tumours*. *Nature*, **2000**. 406(6797): p. 747-52.
67. Nguyen, A.H., et al., *Gata3 antagonizes cancer progression in Pten-deficient prostates*. *Hum Mol Genet*, **2013**. 22(12): p. 2400-10.
68. Lin, X., et al., *Dysregulation of insulin receptor substrate 2 in beta cells and brain causes obesity and diabetes*. *J Clin Invest*, **2004**. 114(7): p. 908-16.
69. Heni, M., et al., *Insulin receptor isoforms A and B as well as insulin receptor substrates-1 and -2 are differentially expressed in prostate cancer*. *PLoS One*, **2012**. 7(12): p. e50953.
70. Szabolcs, M., et al., *Irs2 inactivation suppresses tumor progression in Pten+/- mice*. *Am J Pathol*, **2009**. 174(1): p. 276-86.
71. Shivapurkar, N., et al., *Aberrant methylation of trail decoy receptor genes is frequent in multiple tumor types*. *Int J Cancer*, **2004**. 109(5): p. 786-92.
72. Cheng, Y., et al., *Genetic and epigenetic inactivation of TNFRSF10C in human prostate cancer*. *Prostate*, **2009**. 69(3): p. 327-35.
73. Vukovic, B., et al., *Correlating breakage-fusion-bridge events with the overall chromosomal instability and in vitro karyotype evolution in prostate cancer*. *Cytogenet Genome Res*, **2007**. 116(1-2): p. 1-11.
74. Schulz, W.A., et al., *Genomewide DNA hypomethylation is associated with alterations on chromosome 8 in prostate carcinoma*. *Genes Chromosomes Cancer*, **2002**. 35(1): p. 58-65.
75. Degli-Esposti, M.A., et al., *Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of the emerging TRAIL receptor family*. *J Exp Med*, **1997**. 186(7): p. 1165-70.
76. Ehrhardt, H., et al., *TRAIL induced survival and proliferation in cancer cells resistant towards TRAIL-induced apoptosis mediated by NF-kappaB*. *Oncogene*, **2003**. 22(25): p. 3842-52.
77. Voelkel-Johnson, C., *TRAIL-mediated signaling in prostate, bladder and renal cancer*. *Nat Rev Urol*, **2011**. 8(8): p. 417-27.

78. Heiss, N.S., et al., *X-linked dyskeratosis congenita is caused by mutations in a highly conserved gene with putative nucleolar functions*. Nat Genet, **1998**. 19(1): p. 32-8.
79. Montanaro, L., et al., *Relationship between dyskerin expression and telomerase activity in human breast cancer*. Cell Oncol, **2008**. 30(6): p. 483-90.
80. Liu, B., et al., *Dyskerin overexpression in human hepatocellular carcinoma is associated with advanced clinical stage and poor patient prognosis*. PLoS One, **2012**. 7(8): p. e43147.
81. Nallar, S.C., et al., *GRIM-1, a novel growth suppressor, inhibits rRNA maturation by suppressing small nucleolar RNAs*. PLoS One, **2011**. 6(9): p. e24082.
82. Ring, H.Z., et al., *Five SWI/SNF-related, matrix-associated, actin-dependent regulator of chromatin (SMARC) genes are dispersed in the human genome*. Genomics, **1998**. 51(1): p. 140-3.
83. Heeboll, S., et al., *SMARCC1 expression is upregulated in prostate cancer and positively correlated with tumour recurrence and dedifferentiation*. Histol Histopathol, **2008**. 23(9): p. 1069-76.
84. Hansen, R.L., et al., *Smarcc1 expression: a significant predictor of disease-specific survival in patients with clinically localized prostate cancer treated with no intention to cure*. Scand J Urol Nephrol, **2011**. 45(2): p. 91-6.
85. Shen, H., et al., *The SWI/SNF ATPase Brm is a gatekeeper of proliferative control in prostate cancer*. Cancer Res, **2008**. 68(24): p. 10154-62.
86. Loe-Mie, Y., et al., *SMARCA2 and other genome-wide supported schizophrenia-associated genes: regulation by REST/NRSF, network organization and primate-specific evolution*. Hum Mol Genet, **2010**. 19(14): p. 2841-57.
87. Gonzalez-Reyes, S., et al., *Study of TLR3, TLR4, and TLR9 in prostate carcinomas and their association with biochemical recurrence*. Cancer Immunol Immunother, **2011**. 60(2): p. 217-26.
88. Guillot, L., et al., *Involvement of toll-like receptor 3 in the immune response of lung epithelial cells to double-stranded RNA and influenza A virus*. J Biol Chem, **2005**. 280(7): p. 5571-80.

89. Harashima, N., et al., *Roles of the PI3K/Akt pathway and autophagy in TLR3 signaling-induced apoptosis and growth arrest of human prostate cancer cells*. Cancer Immunol Immunother, **2012**. 61(5): p. 667-76.
90. Gerhardt, J., et al., *FOXA1 promotes tumor progression in prostate cancer and represents a novel hallmark of castration-resistant prostate cancer*. Am J Pathol, **2012**. 180(2): p. 848-61.
91. Ademuyiwa, F.O., et al., *Expression of Forkhead-box protein A1, a marker of luminal A type breast cancer, parallels low Oncotype DX 21-gene recurrence scores*. Mod Pathol, **2010**. 23(2): p. 270-5.
92. Mehra, R., et al., *Identification of GATA3 as a breast cancer prognostic marker by global gene expression meta-analysis*. Cancer Res, **2005**. 65(24): p. 11259-64.
93. Rizzardi, A.E., et al., *Evaluation of protein biomarkers of prostate cancer aggressiveness*. BMC Cancer, **2014**. 14(1): p. 244.
94. Gerber, D.J., et al., *Evidence for association of schizophrenia with genetic variation in the 8p21.3 gene, PPP3CC, encoding the calcineurin gamma subunit*. Proc Natl Acad Sci U S A, **2003**. 100(15): p. 8993-8.
95. Shi, J., E.S. Gershon, and C. Liu, *Genetic associations with schizophrenia: meta-analyses of 12 candidate genes*. Schizophr Res, **2008**. 104(1-3): p. 96-107.
96. Parra, M., et al., *Molecular and functional characterization of protein 4.1B, a novel member of the protein 4.1 family with high level, focal expression in brain*. J Biol Chem, **2000**. 275(5): p. 3247-55.
97. Azim, A.C., et al., *Isoform cloning, actin binding, and chromosomal localization of human erythroid dematin, a member of the villin superfamily*. J Biol Chem, **1995**. 270(29): p. 17407-13.
98. Schwarzenbach, H., et al., *Cell-free tumor DNA in blood plasma as a marker for circulating tumor cells in prostate cancer*. Clin Cancer Res, **2009**. 15(3): p. 1032-8.
99. Dellinger, T.H., et al., *Expression of the Wnt antagonist Dickkopf-3 is associated with prognostic clinicopathologic characteristics and impairs proliferation and invasion in endometrial cancer*. Gynecol Oncol, **2012**. 126(2): p. 259-67.

100. Yang, Z.R., et al., *Overexpression of Dickkopf-3 induces apoptosis through mitochondrial pathway in human colon cancer*. World J Gastroenterol, **2012**. 18(14): p. 1590-601.
101. Gu, Y.M., et al., *Dickkopf3 overexpression inhibits pancreatic cancer cell growth in vitro*. World J Gastroenterol, **2011**. 17(33): p. 3810-7.
102. Tam, L., et al., *Expression levels of the JAK/STAT pathway in the transition from hormone-sensitive to hormone-refractory prostate cancer*. Br J Cancer, **2007**. 97(3): p. 378-83.
103. Rossi, M.R., et al., *Identification of inactivating mutations in the JAK1, SYNJ2, and CLPTM1 genes in prostate cancer cells using inhibition of nonsense-mediated decay and microarray analysis*. Cancer Genet Cytogenet, **2005**. 161(2): p. 97-103.
104. Dunn, G.P., et al., *IFN unresponsiveness in LNCaP cells due to the lack of JAK1 gene expression*. Cancer Res, **2005**. 65(8): p. 3447-53.
105. Robinson, J.L., et al., *Androgen receptor driven transcription in molecular apocrine breast cancer is mediated by FoxA1*. EMBO J, **2011**. 30(15): p. 3019-27.
106. Imamura, Y., et al., *FOXA1 promotes tumor progression in prostate cancer via the insulin-like growth factor binding protein 3 pathway*. PLoS One, **2012**. 7(8): p. e42456.
107. Figueroa, J.A., et al., *Differential expression of insulin-like growth factor binding proteins in high versus low Gleason score prostate cancer*. J Urol, **1998**. 159(4): p. 1379-83.
108. Jain, R.K., et al., *High-level expression of forkhead-box protein A1 in metastatic prostate cancer*. Histopathology, **2011**. 58(5): p. 766-72.
109. Wang, W., et al., *Diversity and specialization of mammalian SWI/SNF complexes*. Genes Dev, **1996**. 10(17): p. 2117-30.
110. Lickert, H., et al., *Baf60c is essential for function of BAF chromatin remodelling complexes in heart development*. Nature, **2004**. 432(7013): p. 107-12.
111. Flajollet, S., et al., *The core component of the mammalian SWI/SNF complex SMARCD3/BAF60c is a coactivator for the nuclear retinoic acid receptor*. Mol Cell Endocrinol, **2007**. 270(1-2): p. 23-32.

112. Beyer, S., et al., *The histone demethylases JMJD1A and JMJD2B are transcriptional targets of hypoxia-inducible factor HIF*. J Biol Chem, **2008**. 283(52): p. 36542-52.
113. Sar, A., et al., *Identification and characterization of demethylase JMJD1A as a gene upregulated in the human cellular response to hypoxia*. Cell Tissue Res, **2009**. 337(2): p. 223-34.
114. Okada, Y., et al., *Histone demethylase JHDM2A is critical for Tnp1 and Prm1 transcription and spermatogenesis*. Nature, **2007**. 450(7166): p. 119-23.
115. Krieg, A.J., et al., *Regulation of the histone demethylase JMJD1A by hypoxia-inducible factor 1 alpha enhances hypoxic gene expression and tumor growth*. Mol Cell Biol, **2010**. 30(1): p. 344-53.
116. Lee, H.Y., E.G. Yang, and H. Park, *Hypoxia enhances the expression of prostate-specific antigen by modifying the quantity and catalytic activity of Jumonji C domain-containing histone demethylases*. Carcinogenesis, **2013**. 34(12): p. 2706-15.
117. Hammerschmidt, M., A. Brook, and A.P. McMahon, *The world according to hedgehog*. Trends Genet, **1997**. 13(1): p. 14-21.
118. Che, L., et al., *Activation of sonic hedgehog signaling pathway is an independent potential prognosis predictor in human hepatocellular carcinoma patients*. Chin J Cancer Res, **2012**. 24(4): p. 323-31.
119. Kim, T.J., et al., *Hedgehog signaling protein expression and its association with prognostic parameters in prostate cancer: a retrospective study from the view point of new 2010 anatomic stage/prognostic groups*. J Surg Oncol, **2011**. 104(5): p. 472-9.
120. Devarajan, A., et al., *Macrophage paraoxonase 2 regulates calcium homeostasis and cell survival under endoplasmic reticulum stress conditions and is sufficient to prevent the development of aggravated atherosclerosis in paraoxonase 2 deficiency/apoE^{-/-} mice on a Western diet*. Mol Genet Metab, **2012**. 107(3): p. 416-27.
121. Witte, I., et al., *Protectors or Traitors: The Roles of PON2 and PON3 in Atherosclerosis and Cancer*. J Lipids, **2012**. 2012: p. 342806.
122. Ribarska, T., et al., *Specific changes in the expression of imprinted genes in prostate cancer--implications for cancer progression and epigenetic regulation*. Asian J Androl, **2012**. 14(3): p. 436-50.

123. Gu, P., et al., *Generation of Ppp2Ca and Ppp2Cb conditional null alleles in mouse*. *Genesis*, **2012**. 50(5): p. 429-36.
124. Chuang, P.T. and A.P. McMahon, *Vertebrate Hedgehog signalling modulated by induction of a Hedgehog-binding protein*. *Nature*, **1999**. 397(6720): p. 617-21.
125. Olsen, C.L., et al., *Hedgehog-interacting protein is highly expressed in endothelial cells but down-regulated during angiogenesis and in several human tumors*. *BMC Cancer*, **2004**. 4: p. 43.
126. Sheng, T., et al., *Activation of the hedgehog pathway in advanced prostate cancer*. *Mol Cancer*, **2004**. 3: p. 29.
127. Krauss, S., et al., *Protein phosphatase 2A and rapamycin regulate the nuclear localization and activity of the transcription factor GLI3*. *Cancer Res*, **2008**. 68(12): p. 4658-65.
128. Attard, G., et al., *Duplication of the fusion of TMPRSS2 to ERG sequences identifies fatal human prostate cancer*. *Oncogene*, **2008**. 27(3): p. 253-63.
129. Alliel, P.M., et al., *Testican, a multidomain testicular proteoglycan resembling modulators of cell social behaviour*. *Eur J Biochem*, **1993**. 214(1): p. 347-50.
130. Bonnet, F., et al., *Characterization of a human seminal plasma glycosaminoglycan-bearing polypeptide*. *Biochem J*, **1992**. 288 (Pt 2): p. 565-9.
131. Lee, C.S., et al., *The initiation of liver development is dependent on Foxa transcription factors*. *Nature*, **2005**. 435(7044): p. 944-7.
132. Gao, N., et al., *Forkhead box A1 regulates prostate ductal morphogenesis and promotes epithelial cell maturation*. *Development*, **2005**. 132(15): p. 3431-43.
133. Razmara, M., et al., *CARD-8 protein, a new CARD family member that regulates caspase-1 activation and apoptosis*. *J Biol Chem*, **2002**. 277(16): p. 13952-8.
134. McCabe, C.D., et al., *Genome-wide analysis of the homeobox C6 transcriptional network in prostate cancer*. *Cancer Res*, **2008**. 68(6): p. 1988-96.
135. Blair, J.M., Y. Zheng, and C.R. Dunstan, *RANK ligand*. *Int J Biochem Cell Biol*, **2007**. 39(6): p. 1077-81.

136. Brown, J.M., et al., *Osteoprotegerin and rank ligand expression in prostate cancer*. Urology, **2001**. 57(4): p. 611-6.
137. Endl, E., et al., *The expression of Ki-67, MCM3, and p27 defines distinct subsets of proliferating, resting, and differentiated cells*. J Pathol, **2001**. 195(4): p. 457-62.
138. Mashal, R.D., et al., *Expression of cell cycle-regulated proteins in prostate cancer*. Cancer Res, **1996**. 56(18): p. 4159-63.
139. Hammarsten, P., et al., *Phospho-Akt immunoreactivity in prostate cancer: relationship to disease severity and outcome, Ki67 and phosphorylated EGFR expression*. PLoS One, **2012**. 7(10): p. e47994.
140. Rouzier, C., et al., *Detection of the TMPRSS2-ETS fusion gene in prostate carcinomas: retrospective analysis of 55 formalin-fixed and paraffin-embedded samples with clinical data*. Cancer Genet Cytogenet, **2008**. 183(1): p. 21-7.
141. Spencer, E.S., et al., *Prognostic value of ERG oncoprotein in prostate cancer recurrence and cause-specific mortality*. Prostate, **2013**.
142. Leyten, G.H., et al., *Prospective Multicentre Evaluation of PCA3 and TMPRSS2-ERG Gene Fusions as Diagnostic and Prognostic Urinary Biomarkers for Prostate Cancer*. Eur Urol, **2012**.
143. Aimes, R.T., et al., *Endothelial cell serine proteases expressed during vascular morphogenesis and angiogenesis*. Thromb Haemost, **2003**. 89(3): p. 561-72.
144. Owen, K.A., et al., *Pericellular activation of hepatocyte growth factor by the transmembrane serine proteases matriptase and hepsin, but not by the membrane-associated protease uPA*. Biochem J, **2010**. 426(2): p. 219-28.
145. Li, Y., et al., *SPOCK1 is regulated by CHD1L and blocks apoptosis and promotes HCC cell invasiveness and metastasis in mice*. Gastroenterology, **2013**. 144(1): p. 179-191 e4.
146. Zong, Y., et al., *ETS family transcription factors collaborate with alternative signaling pathways to induce carcinoma from adult murine prostate cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, **2009**. 106(30): p. 12465-70.
147. Lippolis, G., et al., *A high-density tissue microarray from patients with clinically localized prostate cancer reveals ERG and TAT1 exclusivity in tumor cells*. Prostate Cancer Prostatic Dis, **2013**.

148. Bismar, T.A., et al., *Interactions and relationships of PTEN, ERG, SPINK1 and AR in castration-resistant prostate cancer*. Histopathology, **2012**. 60(4): p. 645-52.
149. Ramaswamy, S., et al., *Regulation of G1 progression by the PTEN tumor suppressor protein is linked to inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A, **1999**. 96(5): p. 2110-5.
150. Sun, C.X., V.A. Robb, and D.H. Gutmann, *Protein 4.1 tumor suppressors: getting a FERM grip on growth regulation*. J Cell Sci, **2002**. 115(Pt 21): p. 3991-4000.
151. Wong, S.Y., et al., *Protein 4.1B suppresses prostate cancer progression and metastasis*. Proc Natl Acad Sci U S A, **2007**. 104(31): p. 12784-9.
152. Wang, J., et al., *Increased expression of the metastasis-associated gene Ehm2 in prostate cancer*. Prostate, **2006**. 66(15): p. 1641-52.
153. Norris, J.D., et al., *The homeodomain protein HOXB13 regulates the cellular response to androgens*. Mol Cell, 2009. 36(3): p. 405-16.
154. Rink, M., et al., *Loss of SPINK1 expression is associated with unfavorable outcomes in urothelial carcinoma of the bladder after radical cystectomy*. Urol Oncol, **2013**. 31(8): p. 1716-24.
155. Ozaki, N., et al., *Serine protease inhibitor Kazal type 1 and epidermal growth factor receptor are expressed in pancreatic tubular adenocarcinoma, intraductal papillary mucinous neoplasm, and pancreatic intraepithelial neoplasia*. J Hepatobiliary Pancreat Sci, **2013**.
156. Ozaki, N., et al., *Serine protease inhibitor Kazal type 1 promotes proliferation of pancreatic cancer cells through the epidermal growth factor receptor*. Mol Cancer Res, **2009**. 7(9): p. 1572-81.
157. Xu, J., et al., *Conditionally replicative adenovirus-based mda-7/IL-24 expression enhances sensitivity of colon cancer cells to 5-fluorouracil and doxorubicin*. J Gastroenterol, **2013**. 48(2): p. 203-13.
158. Nishikawa, T., et al., *Adenovirus-mediated mda-7 (IL24) gene therapy suppresses angiogenesis and sensitizes NSCLC xenograft tumors to radiation*. Mol Ther, **2004**. 9(6): p. 818-28.
159. Sauane, M., et al., *Melanoma differentiation associated gene-7/interleukin-24 promotes tumor cell-specific apoptosis through both secretory and nonsecretory pathways*. Cancer Res, **2004**. 64(9): p. 2988-93.

160. Muthusamy, V., et al., *The Hematopoietic Stem Cell Regulatory Gene Latexin Has Tumor-Suppressive Properties in Malignant Melanoma*. J Invest Dermatol, **2013**.
161. Li, Y., et al., *Latexin expression is downregulated in human gastric carcinomas and exhibits tumor suppressor potential*. BMC Cancer, **2011**. 11: p. 121.
162. Garcia-Castellanos, R., et al., *Detailed molecular comparison between the inhibition mode of A/B-type carboxypeptidases in the zymogen state and by the endogenous inhibitor latexin*. Cell Mol Life Sci, **2005**. 62(17): p. 1996-2014.
163. Jing, C., et al., *Tazarotene-induced gene 1 (TIG1) expression in prostate carcinomas and its relationship to tumorigenicity*. J Natl Cancer Inst, **2002**. 94(7): p. 482-90.
164. Nagpal, S., et al., *Tazarotene-induced gene 1 (TIG1), a novel retinoic acid receptor-responsive gene in skin*. J Invest Dermatol, **1996**. 106(2): p. 269-74.
165. Garcia-Dominguez, C.A., et al., *Sprouty2 and Spred1-2 proteins inhibit the activation of the ERK pathway elicited by cyclopentenone prostanoids*. PLoS One, **2011**. 6(2): p. e16787.
166. Patel, R., et al., *Sprouty2, PTEN, and PP2A interact to regulate prostate cancer progression*. J Clin Invest, **2013**. 123(3): p. 1157-75.
167. Gao, M., et al., *SPRY2 loss enhances ErbB trafficking and PI3K/AKT signalling to drive human and mouse prostate carcinogenesis*. EMBO Mol Med, **2012**. 4(8): p. 776-90.
168. van Noesel, M.M., et al., *Tumor-specific down-regulation of the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand decoy receptors DcR1 and DcR2 is associated with dense promoter hypermethylation*. Cancer Res, **2002**. 62(7): p. 2157-61.
169. Suzuki, M., et al., *Methylation of apoptosis related genes in the pathogenesis and prognosis of prostate cancer*. Cancer Lett, **2006**. 242(2): p. 222-30.
170. Abreu-Martin, M.T., et al., *Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1 activates androgen receptor-dependent transcription and apoptosis in prostate cancer*. Mol Cell Biol, **1999**. 19(7): p. 5143-54.

171. Bild, A.H., et al., *MEKK1-induced apoptosis requires TRAIL death receptor activation and is inhibited by AKT/PKB through inhibition of MEKK1 cleavage*. *Oncogene*, **2002**. 21(43): p. 6649-56.

6. Anhang

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.

05.04.2016, Marc Ingenwerth