

Aus der Klinik für Urologie und Kinderurologie
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor Univ-Prof. Dr. med. M. Stöckle

Vergleichende Charakterisierung von Genotyp und
Phänotyp an identischen
Prostatakarzinomgewebeproben und die Korrelation zu
klinischen Parametern

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin der Medizinischen Fakultät der UNIVERSITÄT DES
SAARLANDES 2017

vorgelegt von: Marie-Christine Feix-Berscheid
geboren am: 29.12.1983 in Saarbrücken

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Abkürzungsverzeichnis	3
1 Zusammenfassung	5
1.1 Abstract	6
2 Einleitung	7
2.1 Epidemiologie des Prostatakarzinoms	8
2.2 Diagnose	9
2.3 Histologie und Pathologie des Prostatakarzinoms	11
2.3.1 Gleason-Grading	11
2.3.2 TNM-Klassifikation	13
2.4 Therapie	15
2.5 Metastasierung und Prognose	17
2.6 Molekulare Pathogenese des Prostatakarzinoms	18
2.7 Molekularzytogenetische Methoden	21
2.7.1 Komparative genomische Hybridisierung (CGH)	21
2.7.2 Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)	22
2.8 TMPRSS2-ERG Genfusion	22
2.9 Eigene Fragestellung	25
3 Material und Methoden	26
3.1 Untersuchungsmaterial und klinische Verlaufsparemeter	26
3.2 TMA (Tissue Microarray)	28
3.3 Makrodissektion	28
3.3.1 Vorbehandlung der Schnitte	29
3.3.2 DNA-Isolierung	30
3.3.3 DNA-Amplifikation sowie Biotin und Digoxin Markierung	30
3.3.4 Aufreinigung und DNA-Konzentration	33
3.3.5 DotBlot	33
3.4 Chromosomenpräparation von Lymphozyten	34
3.5 Komparative genomische Hybridisierung (CGH)	35
3.5.1 Hybridisierung	36
3.5.2 Stringenzwaschungen und Detektion	37
3.5.3 Bildaufnahme und Auswertung	38
3.6 Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)	39

3.6.1	Sondenmarkierung mittels Nick-Translation.....	40
3.6.2	Lösungen.....	41
3.6.3	Vorbehandlung der Paraffinschnitte.....	42
3.6.4	Denaturierung und Hybridisierung.....	42
3.6.5	Stringenzwaschung und Detektion.....	43
3.6.6	Bildaufnahme und Auswertung.....	43
3.7	Immunhistochemische Färbemethoden.....	44
3.7.1	Immunhistochemische Färbung.....	45
4	Ergebnisse.....	48
4.1	CGH-Ergebnisse des Prostataktomiegewebes.....	50
4.1.1	CGH-Ergebnisse der Normal-Gewebeproben.....	50
4.1.2	CGH-Ergebnisse der Tumor-Gewebeproben.....	56
4.1.3	CGH und klinische Parameter.....	60
4.1.4	CGH-Ergebnisse der Normal- bzw. Tumor-Gewebeproben im Vergleich.....	62
4.2	Immunhistochemische Färbung.....	63
4.2.1	TMPRSS-2-ERG Fusionsstatus und CGH.....	64
4.2.2	TMPRSS-2-ERG Fusionsstatus und klinische Parameter.....	67
4.3	Fluoreszenz in situ Hybridisierung.....	68
5	Diskussion.....	70
5.1	Methodische Aspekte.....	70
5.1.1	CGH.....	70
5.1.2	Metaphasen-CGH und Array-CGH im Vergleich.....	73
5.1.3	Immunhistochemie.....	75
5.2	Bewertung der Ergebnisse.....	76
5.2.1	CGH Ergebnisse.....	76
5.2.2	Ergebnisse der CGH in Korrelation zum Patientenkollektiv.....	82
5.3	Immunhistochemie – TMPRSS-2-ERG.....	83
5.4	Korrelation von CGH-Ergebnissen und Genfusionsstatus.....	85
5.5	Schlussfolgerungen und Ausblick.....	86
6	Verzeichnisse.....	88
6.1	Literaturverzeichnis.....	88
6.2	Abbildungsverzeichnis.....	99
6.3	Tabellenverzeichnis.....	100
	Danksagung.....	101

Abkürzungsverzeichnis

ABC	Avidin-Biotin-Komplex
Abl	Abelson murine leukemia viral oncogene
AP	Alkalische Phosphatase
Aqua dest.	destilliertes Wasser
AR	Androgen Rezeptor
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5 Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
BCR	Breakpoint cluster region
BSA	Rinderserumalbumin
CCD	Charge-coupled-Device
CGH	Comparative genomische Hybridisierung
CML	Chronisch myeloische Leukämie
Cy3	Cyanin 3
DAPI	4,6 Diamino-2-Phenylindol
DIG	Digoxigenin
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DOP	degenerated oligonucleotide primed
DRU	digital rektale Untersuchung
EB Puffer	Elution buffer
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
ER	Östrogenrezeptor
ERG	ETS-related Gene
EtOH	Ethanol
ETS	Erythroblast transformation specific transcription factor
FISH	Fluoreszenz in Situ Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisocyanat
FOXA1	Forkhead box A1
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde
H2O	Wasser
HB	Hybridization buffer
HCL	Salzsäure
HER-2	Human epidermal growth factor 2
ICH	Immunhistochemie
ISH	In Situ Hybridisierung
Kb	Kilobasen-Paare
KCL	Kaliumchlorid
LNRH	Luteinizing hormone releasing

M	hormone
Mb	Molar
MED12	Megabasen-Paare
min	Mediator complex subunit 12
ml	Minute
mm	Milliliter
mM	Millimeter
NBT	Millimolar
ng	Nitro Blue Tetrazolium Chlorid
NTP	Nanogramm
OFA	Nukleosidtriphosphat
p	One for All
PBS	Kurzer Arm des Chromosoms
PCR	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PIN	Polymerasekettenreaktion
PSA	Prostatische intraepitheliale Neoplasie
PTEN	Prostata spezifisches Antigen
PWO	Phosphatase and Tensin homolog
q	Pyrococcus woesei
RNA	Langer Arm des Chromosoms
RNase	Ribonukleinsäure
rpm	Ribonuklease
SA	Umdrehungen pro Minute
sec	Streptavidin
SSC	Sekunde
Taq-Polymerase	Natriumchlorid-Citrat-Puffer
TMPRSS	Thermus aquaticus Polymerase
TRUS	Transmembrane Protease Serine
Vol	Transrektaler Ultraschall
μl	Volumen
μm	Mikroliter
	Mikrometer

1 Zusammenfassung

Prostatakarzinome sind in Deutschland die häufigste Krebserkrankung bei Männern und stehen nach Karzinomen des Darmes und der Lunge an dritter Stelle der krebbedingten Todesfälle.

Ziel jeder Krebstherapie ist es, den einzelnen Patienten möglichst kurativ und schonend behandeln zu können. Dabei ist es von großer Bedeutung, die Erkrankung frühstmöglich zu erkennen. Durch die Einführung von Früherkennungsmethoden konnten Prostatakarzinome in deutlich früheren Stadien diagnostiziert und einer Behandlung zugeführt werden. Hier zeigt sich jedoch auch eine Besonderheit des Prostatakarzinoms. Aufgrund seiner Heterogenität gibt es Tumore, die extrem langsam wachsen, ohne bedeutsame Größenzunahme, Invasivität oder Metastasierung. In diesen Fällen kann ein Zuwarten („active Surveillance“) mit regelmäßigen Kontrollen als primäre Maßnahme ausreichen. Demgegenüber gibt es Tumore, welche bereits in frühen Stadien ein aggressives Wachstum mit Infiltration benachbarter Strukturen oder Metastasen zeigen und todesursächlich sein können. Hier ist eine kurativ intendierte Therapie, wie etwa Operation oder Bestrahlung, eventuell mit adjuvanter Therapie die Methode der Wahl. Jedoch fehlen etablierte Prognoseparameter, die tatsächlich eine individuelle Risikoabschätzung erlauben.

Ziel meiner Arbeit war es, durch molekulargenetische und immunhistochemische Untersuchungen von Prostatektomie-Präparaten und Korrelation mit klinischen Parametern mögliche molekulare prognostische Marker zu identifizieren. Neben der Erfassung der klinischen Verlaufparameter erfolgte mittels komparativer genomischer Hybridisierung eine Untersuchung zum Nachweis genetischer Aberrationen sowie mittels Immunhistochemie und Fluoreszenz in situ Hybridisierung der Nachweis von TMPRSS-2-ERG Genfusionen.

Es ließen sich verschiedene bereits bekannte Veränderungen wie Gewinne auf 8q oder Verluste bei 10q nachweisen, ebenso zeigten sich bisher nicht bis wenig publizierte Veränderungen wie Verluste auf 1p oder 15q.

Interessanterweise fand sich eine hohe Anzahl an Aberrationen auf Seiten der Normalgewebeproben, was auf frühe genomische Veränderungen des Prostatakarzinoms hindeuten könnte. Eine Korrelation zwischen CGH-Veränderungen und klinischen Parametern war nur in geringem Umfang möglich, es

fand sich ein Zusammenhang zwischen Verlusten auf 8p und PSA-Rezidiven, die Veränderung war jedoch mehrheitlich bei rezidivfreien Tumorproben zu finden.

Die im Rahmen meiner Arbeit nachgewiesenen TMPRSS-2-ERG-Genfusionsraten sowie ein Zusammenhang zwischen positivem Fusionsstatus und höherem Staging bestätigen die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen. Aufgrund der kleinen Kohorte waren weitere prognostische Aussagen nicht möglich.

Bei der Gegenüberstellung von CGH-Ergebnissen und Genfusionsraten zeigten sich Zugewinne auf 4q und 13 q sowie Verluste auf 8p und 10q häufiger bei positivem Fusionsstatus.

1.1 Abstract

Carcinoma of the prostate is the most common cancerous disease among men in Germany and is – following colonic and lung cancer – in third place regarding fatalities induced by cancer.

It is the aim of every cancer therapy to treat the patient as curative and gentle as possible. Thereby, it is of great importance to diagnose the disease at the earliest. Thanks to the introduction of methods for an early detection, prostate carcinoma could be diagnosed and treated in significantly earlier stages. However, at this point, there is also a distinctiveness of the prostate carcinoma notable. Due to its heterogeneity, there are tumors that grow extremely slow without any remarkable growth in size, invasiveness or metastatic spread. In these cases, an active surveillance with regular controls could suffice as primary means. In contrast, there are tumors that show aggressive growth in an already early stage combined with an infiltration of adjacent structures or metastases that could lead to fatality. In these cases, a cure-intended therapy – via surgery or radiotherapy – possibly combined with adjuvant therapy is the means of choice. Nevertheless, established parameters of prognosis that allow an individual risk assessment are still missing at the moment.

It was the aim of my thesis to identify possible molecular markers by examining prostatectomy specimen moleculargenetically and immunohistochemically and correlating the results with clinical parameters. Alongside the acquisition of clinical parameters of progression, I also conducted an examination to proof genetic aberrations via genomic hybridization as well as an immunohistochemical and

fluorescence in situ hybridization to proof TMPRSS-2-ERG genetical fusions. As a consequence, it was possible to detect several already known alterations such as gains on 8q or losses on 10q. There were also other hardly or not yet published alterations notable, such as losses on 1p or 15q.

Interestingly, there was a high number of aberrations found in normal tissue compounds. This hints on early-stage genomic alterations of the prostate carcinoma. A correlation of CGH-alterations and clinical parameters was only possible to a small extent. A coherence of losses on 8p and PSA(?)-relapses was notable, however, this alteration could mostly be found in relapse-free tumor compounds.

The rates of TMPRSS-2-ERG gene fusions as well as a correlation between positive state of fusion and higher staging attested in my thesis confirm the findings of other research groups. Indeed, due to the small sample, further prognostic assertions were not possible.

The juxtaposition of CGH-results and gene fusion rates showed gains on 4q and 13q as well as losses on 8p and 10q more often in cases of a positive status of fusion.

2 Einleitung

Das Prostatakarzinom ist mit Abstand der häufigste Tumor des Mannes und nach dem Bronchialkarzinom die häufigste tumorassoziierte Todesursache bei Männern in Deutschland (Robert Koch Institut, 2015).

Trotz der verfügbaren Früherkennungsmethoden und Therapieoptionen stellt die Heterogenität des Prostatakarzinoms ein wesentliches Problem in der Behandlung dar. Ein Teil der Karzinome zeigt ein ausgesprochen aggressives Verhalten mit rascher Metastasierung in Lymphknoten und andere Organe. Andere Karzinome wachsen nur langsam und bleiben lange Zeit insignifikant bzw. werden als Zufallsbefunde im Rahmen von transurethralen Resektionen bei benigner Prostatahyperplasie oder Obduktionen entdeckt. Ein Großteil dieser Tumore verursacht über einen langen Zeitraum hinweg keinerlei Beschwerden. Es ist daher fraglich, ob Therapieregime, die bei aggressiven Verläufen des Prostatakarzinoms einen Benefit bringen, bei Patienten mit insignifikantem (klinisch nicht bedeutsamem) Prostatakarzinom sinnvoll sind, da sie eine nicht unerhebliche Einschränkung für den Patienten im Sinne von Nebenwirkungen und psychischer Belastung darstellen. Aus

diesem Grund ist ein Ziel der Prostatakarzinomforschung, eine frühzeitige Unterscheidung zwischen signifikanten und insignifikanten Karzinomen treffen zu können, um dem jeweiligen Patienten seine für ihn optimale Behandlung zukommen zu lassen. Daher benötigen wir aussagekräftige molekulare Marker, die den Verlauf der Erkrankung vorhersagen können.

2.1 Epidemiologie des Prostatakarzinoms

Im Jahr 2010 war das Prostatakarzinom in den USA mit geschätzten 217.730 Neuerkrankungen mit Abstand die häufigste bösartige Erkrankung des Mannes, was einem Anteil von 28% aller Krebserkrankungen entspricht. Nach dem Bronchialkarzinom mit 86.200 Todesfällen steht diese Tumorerkrankung mit geschätzten 32.050 Todesfällen an zweiter Stelle der tumorassoziierten Mortalitätsstatistik im Jahre 2010 in den USA (Jemal et al., 2010a)

In Deutschland verstarb 2012 ein Viertel der Männer sowie ein Fünftel der Frauen an einer Krebserkrankung, somit sind Tumorerkrankungen nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen die häufigste Todesursache. Prostatakrebs steht mit 12957 von 119.717 tumorassoziierten Todesfällen hinter Bronchialkarzinomen (29173 Todesfälle) und Kolon- bzw. Rektumkarzinomen (13772 Todesfälle) an dritter Stelle (Robert-Koch-Institut, 2015). Diese drei malignen Erkrankungen machen somit knapp die Hälfte aller krebsbedingten Todesursachen in Deutschland aus.

Jenseits des 70. Lebensjahres ist das Prostatakarzinom eine der häufigsten malignen Erkrankungen des Mannes. Die Sterblichkeit steigt linear mit dem Alter an. Anhand epidemiologischer Daten aus Krebsregistern lässt sich eine stark altersabhängige Inzidenz des Prostatakarzinoms erkennen. Ausweislich der Datenbank des National Cancer Institutes der USA "Surveillance Epidemiology and End Results" (SEER) liegt die Inzidenz in der Altersgruppe der 30-34jährigen Männer bei nahezu 0 (Deutsche Gesellschaft für Urologie, 2011) , in der Gruppe zwischen 35 und 44 Jahren bei 0,8/ 100.000 und bei den 65-69 Jährigen bei 857,4/100.000 Männern (Howlader et al., 2011), es zeigt sich also, dass steigendes Alter ein Hauptrisikofaktor für die Entwicklung eines Prostatakarzinoms ist.

Es konnte nachgewiesen werden, dass sich bei einem Drittel aller Männer über 45 Jahren histomorphologisch Karzinomzellen in der Prostata nachweisen lassen

(Dhom et al., 1983; Carter et al., 1993). Weltweit liegt die Häufigkeit von inzidenten Prostatakarzinomen in derselben Größenordnung. Bei der feingeweblichen Untersuchung an Prostata von Männern zwischen 70 und 80 Jahren, die an einer anderen Ursache verstorben waren, ließen sich in 50% der Fälle Karzinomzellen finden (Sheldon et al., 1980). Es scheint so, dass es mit steigendem Alter zur Entwicklung von Karzinomzellen kommt, diese sich aber nicht zwingend als klinisch manifestes Karzinom in Erscheinung treten müssen. Es wird geschätzt, dass neun von zehn histologisch nachweisbaren Prostatakarzinomen zu Lebzeiten nicht diagnostiziert werden (Gittes et al., 1991).

Weltweit steigt die Zahl diagnostizierter Prostatakarzinome ständig an, was im Wesentlichen auf die Weiterentwicklung diagnostischer Tests und Untersuchungsverfahren zur Früherkennung des Prostatakarzinoms zurückzuführen ist.

2.2 Diagnose

Wird von einem Patienten eine Früherkennungsuntersuchung gewünscht, sollte eine Bestimmung des Prostata-spezifischen Antigens (PSA) sowie eine digital rektale Untersuchung, kurz DRU, empfohlen werden (Deutsche Gesellschaft für Urologie, 2011). Die DRU als alleinige Untersuchungsmaßnahme reicht jedoch nicht aus, die Kombination aus DRU und PSA-Wert-Bestimmung erhöht die Sensitivität und Spezifität der Früherkennung (Mistry et al., 2003).

Bei Verdacht auf ein Prostatakarzinom sollte als Primärdiagnostik eine digital-rektale Untersuchung durchgeführt werden. Zusätzlich kann eine transrektale Ultraschalluntersuchung (TRUS) als ergänzende Bildgebung eingesetzt werden (Lavoipierre et al., 1998). Bei karzinomverdächtigem Tastbefund, auffälligem PSA-Anstieg oder PSA-Werten $>4\text{ng/ml}$ sollte eine Biopsie unter transrektal-sonographischer Kontrolle erfolgen (Deutsche Gesellschaft für Urologie, 2011).

Die Einführung der Bestimmung des Prostata-spezifischen Antigens in den 1980er-Jahren hat die Karzinom-Früherkennung revolutioniert, durch Bestimmung des PSA-Wertes kam es zu einer Stadienverschiebung der diagnostizierten Karzinome (Hoedemaeker et al., 2000). PSA wird sowohl von malignen als auch von gesunden Epithelzellen produziert. Ein Anstieg des PSA-Wertes wird mit einer gesteigerten

Proliferation der Prostatazellen in Verbindung gebracht und kann auf ein eventuell vorhandenes Prostatakarzinom hinweisen. Mit Hilfe dieses Antigens kann die Erkrankung auch bei Patienten entdeckt werden, die keinerlei Symptomatik zeigen und bei denen noch kein Tumor zu tasten ist. So können die Tumore in einem früheren Stadium diagnostiziert und behandelt werden, wodurch die Mortalitätsrate in den letzten Jahren gesunken ist (Hankey et al., 1999; Jemal et al., 2010b).

Da das Prostata-spezifische Antigen jedoch ein organ- und kein tumorspezifischer Marker ist, müssen bei einem Anstieg verschiedene Ursachen in Erwägung gezogen werden. Neben einem Prostatakarzinom bedingen folgende Faktoren ein Ansteigen des PSA-Wertes (Börgermann et al., 2006):

- Pharmakologische Behandlung mit Beeinflussung der Gonadotropine oder Sexualhormone beispielsweise durch 5alpha Reduktase-Hemmer (z.B. Finasterid, Dutasterid), LHRH-Analoga oder Antiandrogene).
- Erkrankungen der Prostata, akute/chronische granulomatöse Prostatitis, benigne Prostatahyperplasie, Harnverhalt oder Prostatainfarkt.
- Manipulationen der Prostata wie digital rektale Untersuchung und Prostatastanzbiosie.

In der Publikation von Bill-Axelson und Mitarbeitern von 2014 und einem Follow-up von 18 Jahren, die auch Patienten mit tastbarem Tumor und erhöhtem PSA-Wert einschloss, überlebten über 60% der Patienten ohne Anhalt auf Fernmetastasen (Bill-Axelson et al., 2014). Jährlich versterben in den USA 226/100.000 Männer über 65 Jahren an einem Prostatakarzinom. Obduktionen zeigten, dass bis zu 80% der über 70jährigen Männer ein latentes Prostatakarzinom aufweisen, aber nicht an ihrem Tumor sterben. Es ist daher zu befürchten, dass mit dem Einsatz des PSA-Wertes zunehmend klinisch insignifikante Karzinome diagnostiziert werden (Börgermann et al., 2009; Brawer et al., 1997). Einerseits soll ein Karzinom möglichst früh diagnostiziert werden, da der Tumor möglichst klein und organbegrenzt sein sollte, um eine kurative Therapie zu realisieren. Andererseits zeigte sich in der Studie von Bill-Axelson und Mitarbeitern dass etwa 26% der radikal prostatektomierten und etwa 38% aller konservativ behandelten Patienten nach 18 Jahren eine Metastasierung aufweisen (Bill-Axelson et al., 2014). Dies bedeutet, wie oben bereits erwähnt, dass über 60% der unbehandelten Patienten noch keine systemische Ausbreitung der Erkrankung zeigten, was die These untermauert, dass durch Einsatz des PSA-

Screenings viele insignifikante Karzinome gefunden werden.

Die Entwicklung beziehungsweise Forschung im Bereich der Prostatakarzinom-Früherkennung ist noch lange nicht abgeschlossen. Es bedarf weiterer Methoden, wie zum Beispiel molekularer Marker, um nach Diagnosestellung eine Prognoseabschätzung zu ermöglichen, um dem Patienten eine für ihn optimale Therapie zukommen zu lassen.

2.3 Histologie und Pathologie des Prostatakarzinoms

Makroskopisch zeigen sich derbe, grau-gelbe, relativ scharf begrenzte Karzinomherde, welche sich je nach Stadium auf einen oder beide Organlappen erstrecken. Das Prostatakarzinom hat seinen Ursprung meist in der androgenabhängigen peripheren Zone. Erst dann wächst es in das Zentrum des Organs ein bzw. durchbricht die Kapsel und breitet sich im angrenzenden periprostatiscen Fett- und Bindegewebe aus, bzw. infiltriert die benachbarte Samenblase (Böcker et al., 2008).

Histologisch zeigt das Prostatakarzinom deutliche Unterschiede in Abhängigkeit vom vorliegenden Stadium. Je größer ein Karzinom, desto häufiger lassen sich verschiedene histologische Wachstumsmuster nebeneinander finden. Kleinere Tumore sind meist hochdifferenziert und uniform gebaut. Große Karzinome dagegen sind häufig pluriform und niedrigdifferenziert (Böcker et al., 2008).

2.3.1 Gleason-Grading

Zur histologischen Beurteilung bedient man sich des Gradings nach Gleason (Gleason et al., 1966; Gleason et al. 1992). Hier werden nicht die zytologischen Merkmale der Tumorzellen, sondern das Drüsenmuster beurteilt. Das Gleason-Grading bezieht sich ausschließlich auf unbehandelte und primäre Prostatakarzinome. Neben der TNM-Klassifikation und der Beurteilung der Resektionsflächen zählt der Gleason-Grad zu den drei wichtigsten, statistisch unabhängigen prognostischen Kriterien, die sich klinisch bewährt haben. Es werden fünf Grundmuster, sogenannte Gleason-Pattern, unterschieden:

- Gleason 1 hochdifferenziertes Adenokarzinom, unterscheidet sich nur durch die gestörte Drüsenarchitektur vom normalen Prostatagewebe.
- Gleason 2 etwas kleinere Drüsen, die aber immer noch einen umschriebenen Herd bilden; bis auf kleine Nukleolen keine zytologischen Atypien.
- Gleason 3 mäßig differenziertes Adenokarzinom, welches aus kleinen, sehr unregelmäßig strukturierten Drüsen aufgebaut ist, die das umgebende Gewebe diffus infiltrieren. Deutliche nukleäre Atypien und große Nukleolen.
- Gleason 4 Fusion der kleinen Drüsen und kribriiformes Muster (sogenanntes Drüse-in-Drüse-Muster).
- Gleason 5 anaplastisches Karzinom, dessen Tumorzellen sehr polymorph sind und oft ein basophiles Zytoplasma besitzen; zahlreiche Mitosen (Kühn, 2009, Böcker et al., 2008).

Liegt ein pluriformes Wachstumsmuster vor, wird das Karzinom folgendermaßen bewertet: Die zwei häufigsten Gleason-Pattern werden addiert, hierbei wird das häufigste Muster zuerst genannt, z.B. 3+5=8. Zeigt sich ein histologisch einheitliches Bild wird der vorliegende Grad verdoppelt (z.B. 4+4=8).

2005 und 2014 wurde das Gleason Grading entsprechend dem fortgeschrittenen Forschungsstand modifiziert. Das Grundprinzip der fünf verschiedenen Gleasonpattern wurde beibehalten, es kam jedoch zu einer Verschiebung innerhalb dieser Differenzierungsstufen. Beispielsweise werden kleinere kribriiforme Drüsen einem Gleason 3, statt zuvor 2, zugeordnet, größere kribriiforme einem Gleason 4, statt zuvor 3. Bei Vorliegen eines Grad 7 ist zudem zu unterscheiden, ob es sich hierbei um ein Gleason 3+4 oder 4+3 handelt. Den Besonderheiten der heute üblichen diagnostischen Stanzbiopsie wurden ebenfalls Rechnung getragen. Es wurde vereinbart, dass ein Gleason 1 oder 2 in Stanzbiopsien nicht vergeben werden darf, da die hierzu erforderlichen Kriterien in diesen Biopsien nicht beurteilt werden können. Dies spiegelt sich auch in dem Vorschlag eines neuen Grading Systems wider, welches sich zwar auf die modifizierten Gleason Grade stützt, aber auch gleichzeitig eine prognostische Unterscheidung trifft. Dieses neue Bewertungsschema soll in Verbindung mit dem bisherigen Gleason-Grading eingesetzt werden. Eine Gegenüberstellung der Gleasonmuster ist in Abbildung 1, das aktualisierte Grading- System ist in Tabelle 1 dargestellt. (Epstein et al., 2005; Epstein et al., 2016).

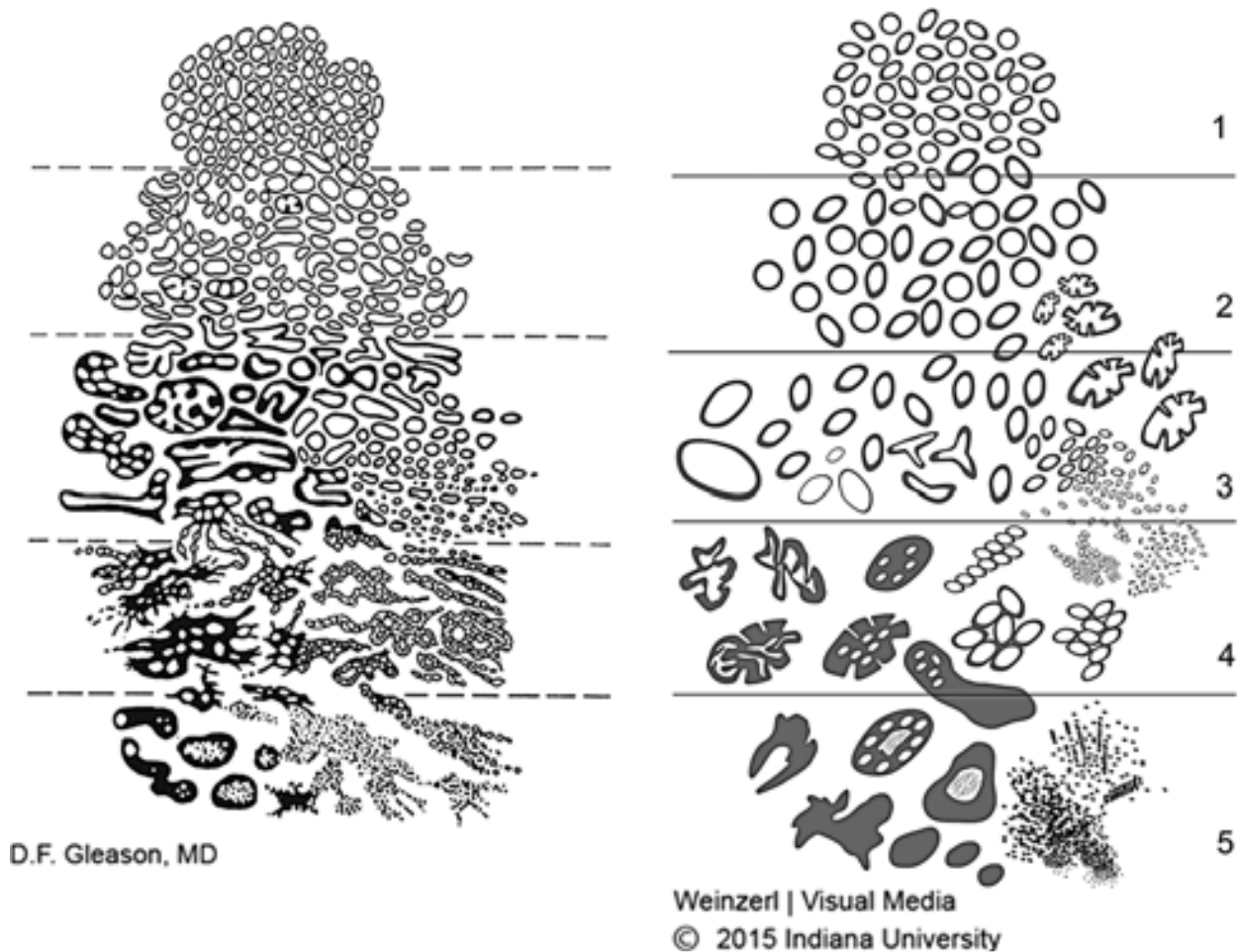


Abb. 1: Gegenüberstellung der schematischen Gleason-Muster: links im Original, rechts das 2015 modifizierte Gleason-Grading-System (Epstein et al., 2016).

Gleason-Score	Prognosegruppe
≤ 6	1
3+4=7	2
4+3=7	3
8	4
9-10	5

Tab.1: Graduierung des Prostatakarzinoms anhand des Gleason Scores (Epstein et al., 2016).

2.3.2 TNM-Klassifikation

Diese Klassifikation (T-Primärtumor, N-regionäre Lymphknotenmetastasierung, M-hämotogene Fernmetastasierung) ist das meistverbreitete Verfahren der Stadieneinteilung von Karzinomen. Die Tumorstadien werden nach Art der

Tumordiagnostik eingeteilt. Palpable Tumoren werden von nicht-palpablen Karzinomen getrennt. Ebenso berücksichtigt dieses System nicht-palpable Tumore, die bei der transurethralen Ultraschalluntersuchung (TRUS) oder durch einen erhöhten PSA-Wert auffallen.

T-Primärtumor	
Tx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für einen Primärtumor
T1	Klinisch nicht erkennbarer Tumor, der weder tastbar noch in bildgebenden Verfahren sichtbar ist
T1a	Tumor als zufälliger histologischer Befund (inzidentelles Karzinom) in 5% oder weniger des resezierten Gewebes
T1b	Tumor als zufälliger histologischer Befund in mehr als 5% des resezierten Gewebes
T1c	Tumor durch Nadelbiopsie diagnostiziert (z.B. wegen erhöhtem PSA)
T2	Tumor auf Prostata begrenzt
T2a	Tumor befällt die Hälfte oder weniger eines Lappens
T2b	Tumor befällt mehr als die Hälfte eines Lappens
T2c	Tumor in beiden Lappen
T3	Extrakapsuläre Tumorausbreitung¹
T3a	Ausbreitung über Pseudokapsel hinaus, ein- oder beidseitig
T3b	Tumor infiltriert Samenblase(n)
T4	Tumor ist fixiert oder infiltriert andere benachbarte Strukturen wie z.B. Rektum und/oder Levatormuskel, Sphincter externus, Blasen Hals und/oder ist an Beckenwand fixiert

¹Die Invasion in den Apex der Prostata oder in die Pseudokapsel (aber nicht darüber hinaus) wird als T2, nicht als T3, klassifiziert.

N-Regionäre Lymphknoten	
Nx	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknoten
N1	Regionäre Lymphknotenmetastasen

Die regionären Lymphknoten sind die Lymphknoten des kleinen Beckens, die größtenteils den Beckenlymphknoten unterhalb der Bifurkation der Aa. iliaca communes entsprechen. Die Seitenlokalisation beeinflusst die N-Klassifikation nicht.

M-Fernmetastasen	
Mx	Das Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen
M1a	Metastase(n) in nicht regionären Lymphknoten
M1b	Knochenmetastasen
M1c	Metastase(n) in anderen Lokalisationen

Tab. 2: Stadieneinteilung nach dem TNM-System der UICC (Wittekind et al., 2010).

2.4 Therapie

Bei der Behandlung des Prostatakarzinoms stehen verschiedene Behandlungsansätze zur Verfügung, welche in kurative bzw. palliative Methoden unterteilt werden können. Die Wahl der Therapie richtet sich nach Alter des Patienten, Tumorstadium, PSA-Wert, Malignität des Tumors und Begleiterkrankungen.

Als kurative Therapieansätze kommen sowohl eine radikale Prostatektomie, Strahlentherapie als auch Active Surveillance in Frage. Im Einzelfall sollte daher jeder Patient mit einem lokal begrenzten, klinisch nicht-metastasierten

Prostatakarzinom individuell über diese Behandlungsoptionen aufgeklärt werden (Deutsche Gesellschaft für Urologie, 2011)

Watchful Waiting bzw. Active Surveillance:

Beiden Therapieansätzen ist gemeinsam, dass zunächst auf sämtliche Behandlung verzichtet und der Patient engmaschig kontrolliert wird. Es wird in regelmäßigen Abständen der PSA-Wert bestimmt, digital-rektale Untersuchungen sowie Kontroll-Biopsien durchgeführt. Unter Watchful Waiting versteht man jedoch eine verzögerte palliative und symptomorientierte Therapie wohingegen eine Active Surveillance darauf abzielt, eine aktive Behandlung bis zum Zeitpunkt einer Tumorprogression bzw. dem Wunsch des Patienten nach aktiver Therapie hinaus zu zögern. Der Vorteil dieser Therapie besteht in der fehlenden Invasivität und den damit verbundenen Risiken. Es besteht jedoch insbesondere bei der Active Surveillance das Risiko, dass eine plötzliche Aggressivitätszunahme des Tumors nicht rechtzeitig erkannt wird. Zudem erfordern diese Therapie-Optionen häufige Arztbesuche.

Radikale Prostatektomie:

Es handelt sich hierbei um einen kurativen Therapieansatz, bei dem die Prostata vollständig entfernt wird. Es kommen dabei folgende Operationsmethoden bzw. -zugänge in Betracht:

- Retropubische radikale Prostatektomie,
- Perineale radikale Prostatektomie,
- Endoskopisch extraperitoneale radikale Prostatektomie,
- Roboter-assistierte transperitoneale radikale Prostatektomie (DaVinci).

Bestrahlung:

Bei dieser Therapieform sind wiederum zwei Behandlungsformen möglich. Zum einen die Brachytherapie, bei der das Tumorgewebe aus kurzer Entfernung bestrahlt wird. Hierbei werden entweder kleine, schwächer radioaktive Teilchen, sogenannte Seeds, über Nadeln in das Prostatagewebe eingebracht und verbleiben dort eine gewisse Zeit. Diese Therapieform wird als „Low-Dose-Rate“ LDR-Brachytherapie bezeichnet. Bei der „High-Dose-Rate“ HDR-Brachytherapie werden stärker strahlende Teilchen in die Prostata eingebracht und nach Beendigung der Therapiesitzung wieder entfernt. In beiden Fällen erfolgt vor der Behandlung die Erstellung eines Therapieplanes und die Behandlung an sich erfolgt unter Ultraschall-

Kontrolle. Zum anderen die perkutane Strahlentherapie, bei der eine externe Bestrahlung erfolgt. Auch hier wird zuvor ein Bestrahlungsplan erstellt.

Nicht kurativ intendierte Therapien sind Watchful Waiting, siehe oben sowie die hormonablativ Therapie. Desweiteren kommen zur Symptombehandlung bzw. -vorbeugung operative, medikamentöse und Bestrahlungsmaßnahmen zum Einsatz. Hier hängt die Wahl der Therapie von verschiedenen Faktoren wie Patientenpräferenz, individuelle Lebenserwartung und hohes Progressionsrisiko der Erkrankung ab, die vom behandelten Arzt sorgfältig bedacht werden sollten.

2.5 Metastasierung und Prognose

Das Prostatakarzinom breitet sich zunächst im Organ selbst aus und wächst später in die umliegenden Organe (Harnblase, Samenblase, Rektum) ein. Die Ausbreitung erfolgt häufig entlang der Nerven der Pseudokapsel der Prostata. Die Metastasierung erfolgt primär lymphogen in die retroperitonealen Lymphknoten sowie hämatogen hauptsächlich über den klappenlosen prävertebralen Venenplexus in Wirbelsäule, Femur und Beckenknochen (Annenmüller et al., 1997; Yökürk E, 2003).

Die ausgeprägte Heterogenität des Prostatakarzinoms stellt Forschung und Behandler vor die Herausforderung, indolente Karzinome von aggressive wachsenden Tumoren zu unterscheiden, um diejenigen Patienten herauszufiltern, die von einer Therapie profitieren. Lange Zeit bediente man sich klinischer Faktoren, um die Prognose eines Patienten und eine mögliche Behandlungsbedürftigkeit abzuschätzen (Martin et al., 2011).

Der Gleason-Score hat den höchsten Vorhersagewert für das Fortschreiten der Erkrankung (Gleason et al., 1974). Im Laufe der Zeit wurden die Gleasonpattern überarbeitet, aktuell wurde noch ein Grading-System mit prognostischer Aussage zur Seite gestellt, um die Aussagekraft des Scores zu verbessern (Epstein et al., 2016).

Sowohl der PSA-Wert als auch dessen Anstieg vor Diagnosestellung galten als mögliche Risikofaktoren für ein schlechtes Outcome nach Behandlung. Dieser Wert zählt zu den Standard-Risikofaktoren bei Diagnosestellung (Martin et al., 2011; D'Amico et al., 2010). Dank des PSA-Screenings ist der PSA-Wert bei

Diagnosestellung gesunken, wodurch jedoch die Sensitivität dieser Messung abgenommen hat (Martin et al., 2011; Shao et al., 2009).

Die Perineuralscheideninfiltration beschreibt den Befall von Nerven durch Tumorzellen, welche auch bei anderen Tumoren beobachtet wurde. Verschiedene Arbeitsgruppen haben die prognostische Aussagekraft der perineuralen Invasion untersucht, mit unterschiedlichen Ergebnissen. Letztlich scheint eine perineurale Invasion die Prognose zu verschlechtern (Martin et al., 2011; Harnden et al., 2006).

Die Kombination aus klinischen und pathologischen Faktoren scheint bei der Prognoseabschätzung ein leistungsfähigeres Werkzeug zu sein, als die klinischen Faktoren für sich genommen. In zahlreichen Studien wurden Risikokategorien, wie die D'Amico Risk Classification oder Nomogramme wie das Kattan-Nomogramm erstellt, die bei der Prognoseabschätzung hilfreich sein können (Martin et al., 2011; D'Amico et al., 2010; Kattan et al., 1998).

Zur Prognoseabschätzung an Prostatektomiepräparaten sollen in der klinischen Praxis drei Parameter beurteilt werden:

- Gleason-Grading,
- TNM-Klassifikation,
- chirurgische Resektionsränder des Karzinoms.

Darüber hinaus gehende Untersuchungen wie Molekularbiologie, Immunhistochemie oder Zytologie werden im Rahmen der Routineversorgung nicht empfohlen (Deutsche Gesellschaft für Urologie, 2011).

2.6 Molekulare Pathogenese des Prostatakarzinoms

Für die Entstehung und Progression von Tumorzellen wird eine Akkumulation genetischer Läsionen verantwortlich gemacht. Diese genetischen Veränderungen bewirken eine Funktionsstörung von Genen, die eine Schlüsselrolle in der Regulation vitaler Zellfunktionen wie z.B. Zellproliferation, Differenzierung oder Apoptose spielen. Bei Prostatakarzinomen treten vor allem zwei somatische Veränderungen auf: eine Aktivierung von Onkogenen bzw. der Funktionsverlust von Tumorsuppressorgenen. Verschiedene Mechanismen können zu diesen Veränderungen führen, es handelt sich hierbei um strukturelle Änderungen wie

Amplifikationen, Deletionen oder Segmenttranslokationen von Chromosomen. Chromosomale Veränderungen können auch durch Genfusionen mit daraus resultierender veränderter Funktion entstehen. (Barbieri et al., 2015).

Durch die vollständige Genomsequenzierung von Prostatakarzinomen verschiedener Arbeitsgruppen fanden sich neben bereits bekannten Aberrationen eine Vielzahl neuer, bisher nicht detektierter chromosomaler Veränderungen, deren Rolle für die Entstehung bzw. Progression des Prostatakarzinoms noch nicht geklärt sind und die es noch eingehender zu erforschen gilt (Berger et al., 2011; Barbieri et al., 2012).

Mit Hilfe der komparativen genomischen Hybridisierung zeigten sich erste Anhaltspunkte für eventuell vorliegende Zugewinne oder Deletionen auf chromosomaler Ebene. Verschiedene Arbeitsgruppen haben mit dieser Methode eine Vielzahl genetischer Aberrationen beim Prostatakarzinom gefunden. Zu den häufigsten Veränderungen zählen Verluste auf den chromosomalen Regionen 6q, 8p, 10q, 13q, 16q, 17p und 18q sowie Gewinne auf 7 und 8q (Abate-Shen et al., 2000; Alers et al., 2000; Alers et al., 2001; Cher et al., 1996; de Marzo et al., 2003; Strohmeyer et al., 2004; Visakorpi et al. 1995; Zitzelsberger et al., 2001).

Das Phosphatase und Tensin homologe Gen (PTEN) zählt zu den am häufigsten veränderten Tumorsuppressorgenen in Karzinomen (Barbieri et al., 2015). Es liegt auf Chromosom 10q23, besteht aus 403 Aminosäuren und spielt bei verschiedenen Signaltransduktionswegen, hauptsächlich dem AKT-Kinase-Weg eine Rolle. PTEN beeinflusst negativ das Zellwachstum und induziert die Apoptose. (Dreher et al., 2003). Durch PTEN-Mutationen werden das Zellwachstum, das Zellüberleben und die Zellproliferation induziert (DiCristofano et al., 2000).

Der Verlust des PHLPP1 Gens (PH domain an Leucin rich repeat Protein) auf 18q21 ist nicht nur bei Prostata Karzinomen sondern auch bei verschiedenen anderen Krebsarten nachgewiesen worden. Diese Veränderungen spielt ebenfalls eine Rolle im AKT-Kinase- Weg (Barbieri et al., 2015).

Die häufigste Genmutation in Karzinomen ist die des p53 Tumorsuppressorgens. Das p53 Protein beeinflusst negativ das Zellwachstum, aktiviert DNA-Reparatur und Apoptose. Die p53-Deletion konnte von verschiedenen Arbeitsgruppen in 25-40% der untersuchten Prostatakarzinom-Fälle nachgewiesen werden. Es ergaben sich zudem Hinweise darauf, dass es sich hierbei nicht um eine Veränderung, die nicht nur in

späteren Karzinomstadien zu finden ist (Barbieri et al. 2012; Barbieri et al., 2015; Grasso et al.; 2012, Taylor et al., 2010; Beltran et al., 2013); Kumar et al., 2011).

Das Retinoblastom Protein (RB1) auf 13q14 ist ein klassisches Tumorsuppressorgen. Der Verlust dieses Gens findet sich in lokal begrenzten Karzinomen relativ selten, er findet sich häufiger in kastrationsresistenten Karzinomen wieder (Barbieri et al., 2015; Grasso et al., 2012; Taylor et al. 2010). Aktuelle Studien weisen darauf hin, dass RB den Androgen Rezeptor Signalweg beeinflusst (Barbieri et al., 2015; Aparicio et al., 2011).

Das MYC-Gen auf 8q24 kodiert den Transkriptionsfaktor c-Myc, welcher den Zellzyklus, Zellüberleben und Tumorgenese aktiviert. Das MYC-Gen ist häufig in epithelialen Tumoren und hämatologischen Erkrankung amplifiziert. Es finden sich auch häufig Amplifikationen beim Prostatakarzinom, wobei es hier oft zu einer Amplifikation des gesamten Armes von Chromosom 8 kommt, was auf mögliche weitere Onkogene in dieser Region hindeutet (Barbieri et al., 2012; Barbieri et al., 2015; Grasso et al., 2012; Taylor et al., 2010; Beltran et al., 2012).

Verschiedene Veränderungen beeinflussen den Androgenrezeptor-Signalweg. Dies besteht entweder durch unmittelbare Veränderungen des Androgenrezeptor-Gens (AR) selbst oder durch Proteine, die die Aktivität des Androgenrezeptors bzw. nachgeschalteter Zielgene beeinflussen.

Das AR-Gen durchlebt verschiedene Veränderungen wie z.B. Genamplifikation oder Punktmutationen, welche zu einer gesteigerten Aktivität in Prostatakarzinomen führen). Diese Veränderungen finden sich hauptsächlich bzw. ausschließlich in metastasierten, kastrationsresistenten Prostatakarzinomen (Linja et al., 2004; Barbieri et al., 2015. Verschiedene Arbeitsgruppen vertreten daher die Hypothese, dass das AR-Gen weniger eine Rolle in der Tumorentstehung spielt sondern vielmehr während der Behandlung als Resistenzmechanismus zum Tragen kommt.

Es wurden auch Gene gefunden, die Proteine kodieren, welche wiederum mit dem Androgenrezeptor interagieren und dessen Aktivität verändern. Es handelt sich hierbei sowohl um Transkriptions Koaktivatoren (NCOA2, EP300), Transkriptions Repressoren (NCOR2) als auch um wechselwirkende Transkriptionsfaktoren und Chromatin regulierende Elemente (Barbieri et al., 2012; Barbieri et al. 2015; Grasso et al., 2012; Taylor et al., 2010).

Mittels Exom-Sequenzierung konnten Barbieri und Mitarbeiter 2012 eine Mutation des SPOP—Gens (speckle type POZ protein), diese Gen liegt auf 17q21.33 (Barbieri et al., 2012 Tumore mit einer SPOP-Mutation wiesen keine gleichzeitige Mutation der ETS-Genfamilie auf, waren jedoch mit einem Verlust von CHD1 auf 5q21.1 sowie FOXO3 und PRDM1 auf 6q21 positiv korreliert. Aus diesem Grund gehen Barbieri und Mitarbeiter davon aus, dass es sich hierbei um einen Subtyp des Prostatakarzinoms handelt.

2.7 Molekularzytogenetische Methoden

2.7.1 Komparative genomische Hybridisierung (CGH)

Mit der Entwicklung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung Mitte der 1980er-Jahre, einer Weiterentwicklung der In-situ-Hybridisierung von Gall und Pardue (1969), etablierte sich in Kombination mit der klassischen Zytogenetik im Laufe der Jahre die molekulare Zytogenetik, die heute in Forschung und Diagnostik eine breite Anwendung findet. Vor allem für die Untersuchung von Tumoren stellen die molekular-zytogenetischen Methoden eine große Hilfe dar (Gall et al., 1969).

Die 1992 entwickelte Methode der komparativen genomischen Hybridisierung (CGH) (Kallioniemi et al., 1992) dient der Detektion chromosomaler Imbalancen und beruht auf einer Kombination aus Fluoreszenzmikroskopie und digitaler Bildanalyse. Diese Methode bietet ein breites Anwendungsspektrum, sie kann zur Diagnosefindung, Subklassifikation, Grading, der letztlichen Prognoseabschätzung und der stadienadaptierten Therapieplanung eingesetzt werden.

Von Vorteil für den Untersuchenden ist die Tatsache, dass die CGH sowohl an Frischmaterial als auch an in Paraffin eingebettetem Gewebe durchgeführt werden kann. Auch die Analyse kleiner Zellzahlen oder Gewebsläsionen stellt kein Problem dar, mittels vorhergehender Mikrodissektion und anschließender PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion) zur DNA-Amplifikation kann die CGH durchgeführt werden.

Mit Hilfe der CGH ist es möglich in nur einem Versuchsansatz komplette Genome auf verschiedene genetische Veränderungen zu untersuchen. Es können dabei jedoch nur Aussagen zu Gewinnen und Deletionen gemacht werden; Aberrationen, bei

denen es nicht zu einem Gewinn oder Verlust kommt, wie zum Beispiel bei der balancierten Translokation, bleiben unentdeckt. So können mittels der CGH-Analyse Mechanismen, die für die Entstehung oder Progression von Tumoren bedeutsam sind, wie zum Beispiel Deletion eines Tumorsuppressorgens oder Zugewinn eines Onkogens, entdeckt werden.

2.7.2 Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)

Die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) ist eine sensitive molekularbiologische Technik, um Nukleinsäuresequenzen wie DNA- und RNA-Sequenzen in Gewebeschnitten, in einzelnen Zellen und Zellkernen oder auf Chromosomen darzustellen. Der Ausdruck in situ ist darauf zurückzuführen, dass die Detektion der Zielsequenz in ihrer natürlichen Umgebung, dem biologischen Präparat, erfolgt (Schwab, 2005).

Die FISH bietet vielfältige Anwendungsmöglichkeiten im Bereich der klinischen Diagnostik und Forschung. Diese Methode wird beispielsweise in der pathologischen Untersuchung des Mammakarzinoms eingesetzt. Hier dient sie der Bestimmung der Amplifikation des HER-2 Onkogens (Pauletti et al., 1996). Hier ist das Ergebnis von besonderem Interesse, da es eine Prognose für den Krankheitsverlauf zulässt und ein Ansprechen auf die Chemotherapie vorhergesagt werden kann (Romond et al., 2005).

Auch in der Prostatakarzinomforschung wird die FISH angewandt. Da man mit dieser Methode Chromosomen bzw. Chromosomensegmente spezifisch detektieren kann, ist es möglich, Chromosomenanomalien wie Deletionen, Amplifikationen oder Translokationen unmittelbar nachzuweisen (Gray et al., 1994; Joos et al., 1994). 2005 konnten Tomlins und Mitarbeiter die TMPRSS2-ERG-Genfusion in Prostatakarzinomen mittels FISH nachweisen (Tomlins et al., 2005).

2.8 TMPRSS2-ERG Genfusion

Lange Zeit ging man davon aus, dass rekurrente Genfusionen hauptsächlich bei hämatologischen Tumoren und Weichteiltumoren zu finden sind. Eines der

bekanntesten Beispiele dürfte die Entdeckung des sogenannten Philadelphia-Chromosoms, der BCR-Abl-Genfusion, bei der chronisch myeloischen Leukämie (CML) sein (Rowley, 1973, de Klein et al., 1982). Hierbei kommt es durch eine Translokation von Teilen der Chromosomen 9 und 22 zu einem transkriptionsfähigen Fusionsgen. Die daraus entstehende Tyrosinkinase bleibt, unbeeinflusst von physiologischen Stimuli, dauerhaft aktiviert, wodurch die Tumorzelle ungehemmt wächst. Durch die genaue Erforschung des Philadelphia-Chromosoms ließen sich prognostische Aussagen treffen und durch den Einsatz von Tyrosinkinasehemmern, in diesem Fall Imatinib Mesylat (Glivec®) ist eine gezielte nebenwirkungsarme Therapie möglich (Schmidt et al., 2009; Fröhling et al., 2008).

Durch die Entdeckung der TMPRSS2-ETS-Genfusion (Tomlins et al., 2005) beim Prostatakarzinom änderte sich das Verständnis über Genfusionen in soliden Tumoren grundlegend. Dieser chromosomalen Veränderung liegt eine Genfusion von TMPRSS2 (Transmembrane Protease Serine 2) und Genen der ETS- (erythroblast transformation-specific transcription factor) Transkriptorenfamilie zugrunde. In etwa 90% der Fälle ist ein bestimmtes Mitglied der ETS-Transkriptionsfaktorenfamilie, das ERG (ETS Related Gene) Fusionspartner von TMPRSS2 (Schmidt et al., 2009).

ETS-Gene gehören einer Gruppe von Transkriptionsfaktoren an, die schon bei Gen-Rearrangements von Leukämien und Weichteiltumoren beschrieben wurden, wohingegen das TMPRSS2-Gen prostataspezifisch und ausgeprägt androgenreguliert ist.

Die Prävalenz der TMPRSS2-ERG-Genfusion variiert, je nach Studiendesign, zwischen 15 und 70% (Tomlins et al., 2009; Braun et al., 2011).

Beide Gene liegen, nur drei Megabasen voneinander entfernt, auf Chromosom 21. Der Genfusion liegen zwei verschiedene Mechanismen zugrunde. Zum einen die häufiger vorkommende homogene Deletion des dazwischenliegenden genetischen Materials (Perner et al. 2006, Hermans et al., 2006), zum anderen durch eine Translokation oder Insertion in dieser Region. Bisher konnte jedoch noch keine biologische Bedeutung für diese zwei verschiedenen Mechanismen herausgearbeitet werden.

Der Vorteil der TMPRSS2-ERG-Genfusion gegenüber dem PSA-Wert besteht darin, dass die TMPRSS2-ERG-Genfusion nicht in normalen Prostatadrüsen, benignen

Prostatahyperplasie oder entzündlichen Vorgängen des Prostataepithels vorkommt. Das bedeutet, dass die TMPRSS2-ERG-Genfusion eine hohe Spezifität bei der Prostatakarzinomdiagnose besitzt (Perner et al., 2007). Des Weiteren konnten unabhängige Studien zeigen, dass ca. 20% der prostatistischen intraepithelialen Neoplasien (PIN) eine Genfusion aufweisen (Cerveira et al., 2006; Mosquera et al., 2008; Perner et al., 2007). Interessanterweise waren nur PIN-Läsionen in unmittelbarer Nähe von ebenfalls TMPRSS2-ERG-positiven Karzinomherden fusionspositiv. Dieses Wissen kann man sich bei der Bewertung histologischer Befunde mit unklarer klinischer Bedeutung, wie eben der PIN, zu Nutze machen. Laxman und Hessels konnten unabhängig voneinander nachweisen, dass der Nachweis des Genfusions-Transkripts mittlerweile auch mit hoher Sensitivität im Urin zu führen ist, was sich zu Gunsten einer verbesserten Früherkennung nutzen ließe (Schmitt et al., 2009; Laxman et al., 2006; Hessels et al., 2003).

Der Goldstandard für den Nachweis dieser Genfusion ist nach wie vor die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (Perner et al., 2007). Um diese Fusion immunhistochemisch nachweisen zu können, bedarf es eines spezifischen Antikörpers, der jedoch lange Zeit nicht verfügbar war. 2010 charakterisierten Park und Mitarbeiter einen monoklonalen Kaninchen anti-ERG Antikörper (Epitomics, Burlingame, USA) und verglichen die Immunhistochemie-Ergebnisse mit denen der Immunfluoreszenz. Es zeigte sich eine hohe Übereinstimmung zwischen den IHC- und den FISH-Ergebnissen. Eine ERG-positive Färbung zeigte sich ausschließlich in Karzinomzellen und PIN-Läsionen, was auch schon durch die Immunfluoreszenz belegt wurde (Park et al., 2010).

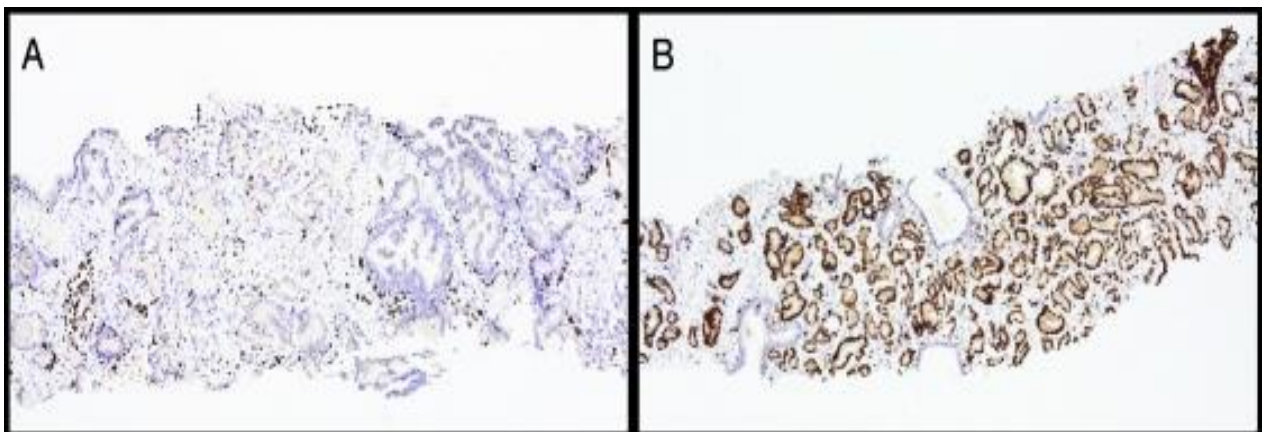


Abb. 2: ERG-Protein Expression an Prostata-Biopsie Präparaten: (A) keine Expression (B) deutliche Expression. Copyright © 2010 Neoplasia Press, Inc. All Rights reserved.

2.9 Eigene Fragestellung

Die Prostatakarzinomforschung wird zurzeit auf breiter Ebene vorangetrieben. Neben dem Ziel, möglichst früh die Diagnose Prostatakarzinom stellen zu können, mit der damit verbundenen Möglichkeit einer kurativen Therapie, stellt die individuelle Prognoseabschätzung einen der zentralen Aspekte dar. Die Möglichkeit, den klinischen Verlauf des einzelnen Patienten abschätzen zu können, optimiert die Behandlungsstrategie und macht diese nicht nur kostengünstiger, sondern auch wesentlich effizienter. Zudem kann das Risiko einer Übertherapie verringert beziehungsweise vermieden werden.

Ziel der Arbeit ist es, die molekularzytogenetischen und immunhistochemischen Ergebnisse mit den klinischen Patientendaten zu korrelieren, um die Patienten in mögliche unterschiedliche Risikogruppen unterteilen zu können. Hierbei sollen folgende Fragestellungen untersucht werden:

1. Lassen sich neben bereits bekannten genetischen Aberrationen des Prostatakarzinoms auch neue, bisher noch nicht beschriebene Veränderungen finden?
2. Sind bei direkter Gegenüberstellung der Ergebnisse von Normal- und Tumorgewebe-CGH Gemeinsamkeiten bzw. Unterschiede darstellbar?
3. Lassen sich Zusammenhänge zwischen bestimmten genetischen Veränderungen und klinischen Prognosefaktoren bzw. dem klinischen Verlauf der Patientengruppe darstellen?
4. Lassen sich Zusammenhänge zwischen dem TMPRSS-2-ERG-Fusionsstatus und klinischen Prognosefaktoren bzw. dem klinischen Verlauf der Patientengruppe darstellen?
5. Lassen sich rekurrente genetische Aberrationen mit dem TMPRSS-2-ERG-Fusionsstatus korrelieren?

3 Material und Methoden

3.1 Untersuchungsmaterial und klinische Verlaufsparemeter

Als Untersuchungsmaterial stand Normal- und Tumorgewebe von 27 Patienten aus der Klinik für Urologie und Kinderurologie, Universitätsklinikum des Saarlandes in Homburg zur Verfügung, aus denen in Bonn unter Leitung von Prof. Dr. Nicolas Wernert (Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Bonn) ein Tissue-Microarray angefertigt wurde, um die Untersuchungen zu optimieren. Pro Fall wurden je vier Zylinder Tumor- bzw. Normalgewebe in einen Paraffinblock eingebettet. Zur weiteren Bearbeitung wurden 10 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt. Da nicht in jedem Anschnitt des Blockes Gewebe im Stanzzyylinder zu finden war, wurden mehrere Schnitte, folglich auch mehrere Objektträger, angefertigt, um möglichst alle Proben untersuchen zu können. In einigen Fällen ließ sich trotz mehrfachen Schneidens kein Gewebezylinder auf den Objektträger übertragen, weshalb letztendlich 20 Normal- und 21 Tumorfälle zur Verfügung standen.

Die immunhistochemische Färbung wurde an 4 µm dicken Gewebeschnitten durchgeführt. Hierzu stellte das Institut für Allgemeine und Spezielle Pathologie des Universitätsklinikum des Saarlandes die Gewebelöcke zur Verfügung.

Von allen Patienten lag eine schriftliche Einverständniserklärung vor.

Von allen 27 Patienten wurden die klinischen Verlaufsparemeter während ihres Krankenhausaufenthaltes festgehalten mit einer Follow-up-Zeit von 10 Jahren. Im Einzelnen wurden folgende Parameter in der Datenbank aufgenommen:

- Alter
- Gleason-Score
- Grading und Staging
- Vorbehandelt ja/nein
- PSA-Wert präoperativ
- PSA-Wert von Juli 2009 bis November 2010
- Im Falle eines PSA-Rezidives: welche Therapie?

Lfd. Nr.	Fallnummer	Alter	Gleason Score	Staging T	N	M	PSA (ng/ml) basal	Bemerkung
1	H03626-05	64	3+4=7	pT2a	pNo		11,18	
2	H04801-05	71	3+4=7	pT2c	pNo		13,1	
3	H10800-04	68	4+3=7	pT3a	pN1	pMX	16 (Feb 2003: 8,3)	neoadjuvante Therapie
4	H14028-04	69	3+4=7	pT2c	pNo	pMX	7,69	
5	H18874-04	75	3+4=7	pT3a	pNo		10,2	TUR Prostata 1983
6	H13540-05	67	4+5=9	pT3a	pNX	pMX	13,44	neoadjuvante Therapie
7	H19518-05	69	4+5=9	pT3a	pNX	pMX	16,4	
8	H16069-04	56	3+3=6	pT2c	pNo	pMX	10,57	
9	H06315-05	65	4+5=9	pT3a	pN1	pMX	10,82	
10	H06620-05	68	5+4=9	pT3b	pN1	pMX	14,74	
11	H15811-05	70	3+4=7	pT3a	pNo	pMX	18 präoperativ: 3,66	neoadjuvante Therapie
12	H03969-05	64	4+3=7	pT3b	pN1	pMX	7,01	
13	H17187-04	66	3+4=7	pT3a	pNo		12,46	
14	H09540-04	61	4+3=7	pT2c	pNo	pMX	5,3	
15	H21496-05	58	3+4=7	pT2a	pNo	pMX	6,2	
16	H11785-04	58	4+4=8	pT3b	pNo	pMX	21,7	
17	H16694-04	63	3+3=6	pT3a	pNo		1,88	neoadjuvante Therapie
18	H11846-05	65	4+3=7	pT3b	pN0	pMX	19 präoperativ 4,2	neoadjuvante Therapie
19	H19019-05	71	3+4=7	pT2c	pNo		4,83	
20	H03149-04	62	4+4=8	pT3a	pNo	pMX	20	
21	H04149-05	74	3+4=7	pT3	pNo		5,8	
22	H06513-05	52	4+4=8	pT3a	pNo	pMX	7,05	
23	H11061-05	70	3+4=7	pT3a	pNo	pMX	7,5	
24	H16184-05	71	4+4=8	pT3b	pN1	pMX	5,49	
25	H22864-04	72	4+5=9	pT3b	pNX	pMX	4,1	Prostata und Urothelkarzinom
26	H02077-05	68	4+5=9	pT3b	pN1	pMX	66,8 präoperativ 2,8	neoadjuvante Therapie
27	H12390-05	66	n. e..	pT3a	pNo		>300 präoperativ 0,66	neoadjuvante Therapie

Tab.3: Übersicht Patientenkollektiv (n.e.: nicht evaluiert).

3.2 TMA (Tissue Microarray)

Die Tissue-Microarray-Methode beruht auf den Ergebnissen von Battiflora und Mitarbeitern, die im Jahre 1986 die Grundlagen für die TMA-Methode bereiteten (Battiflora et al., 1986). Mit Hilfe der sogenannten „Sausage-Technik“ wurden erstmals Gewebeproben verschiedener Präparate in Paraffinblöcke eingebracht (Merseburger et al., 2006). 1998 führten Konnonen und Mitarbeiter dann die Tissue-Microarray-Methode ein, mit der je nach Gewebebeschaffenheit bis zu 1.000 Gewebeproben in einem einzigen Paraffinblock eingebettet und so weiterverarbeitet werden konnten (Konnonen et al., 1998). Die Tissue-Microarray-Technik ist eine Hochdurchflussmethode, die eine zeit- und kostengünstige Untersuchung großer Tumorkollektive auf das Vorliegen von Alterationen auf DNA-, RNA- und Proteinebene am Gewebepreparat ermöglicht. Dadurch ist dieses Verfahren im Vergleich zur herkömmlichen Immunhistochemie einzelner histologischer Schnitte ungleich schneller, effizienter und auch kostengünstiger. Darüber hinaus ist es möglich, die Proteinexpression von Normal- und Tumorgewebe des gleichen Falles zu untersuchen. Durch die große Probenzahl kann relativ schnell eine statistische Validierung der erhobenen Ergebnisse durchgeführt werden.

Die zylindrischen Gewebeproben mit einem Durchmesser von ca. 0,6 mm werden in einen leeren Paraffinblock eingebettet. Im vorliegenden Array wurden vier Gewebezylinder pro Fall eingebettet. Nach dem Zuschneiden der Blöcke und Aufbringen auf einen einzigen Objektträger kann die molekulare Untersuchung durchgeführt werden (Konnonen et al., 1998). Zur weiteren Untersuchung wurden ausgewählte Gewebestücke makrodisseziert.

3.3 Makrodissektion

Ein Problem in der Tumorforschung ist die Tatsache, dass Tumorbiosiematerial oft nicht in ausreichender Menge vorhanden ist. Oftmals stehen nur in Paraffin eingebettete Gewebeproben zur Verfügung. Mittels Makrodissektion lassen sich gezielt spezielle Tumoreareale gewinnen. Die gewonnenen Proben sind aber sehr klein und enthalten nur eine geringe DNA-Konzentration, so dass man für

nachfolgende Untersuchungen eine Amplifikation der isolierten DNA (z.B. mittels DOP-PCR) durchführen muss.

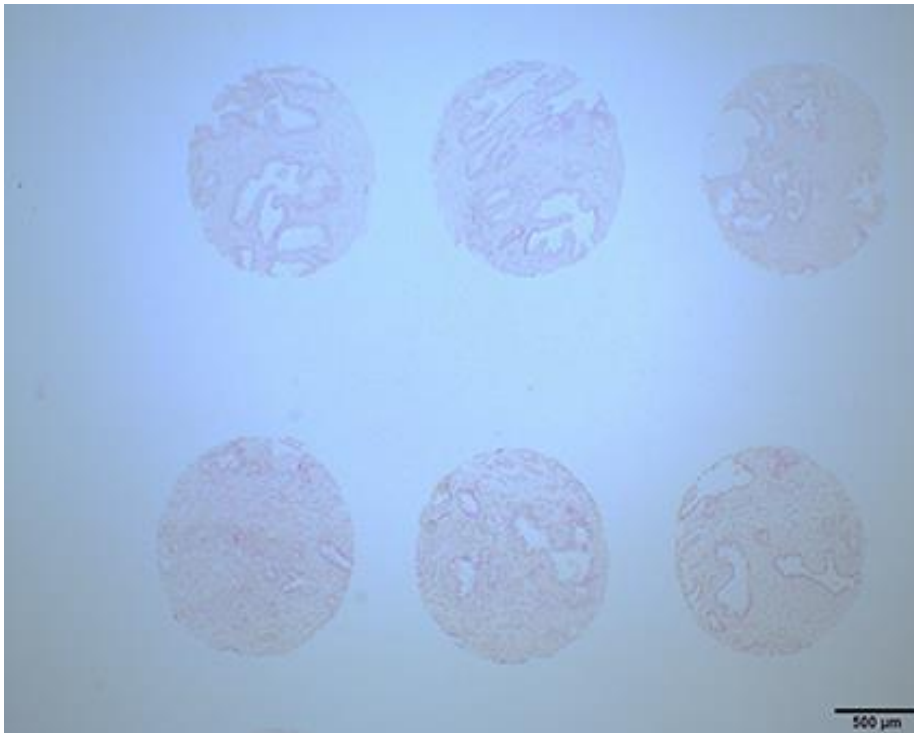


Abb. 3: Ausschnitt Array.

3.3.1 Vorbehandlung der Schnitte

Für die DNA-Isolierung wurden Schnittpräparate der Tissue Microarrays verwendet. Die Schnittdicke betrug 10 µm.

Die Objektträger wurden zehn Minuten in Xylol gestellt, um das Paraffin zu entfernen. Danach wurden sie jeweils zehn Minuten in 100% Ethanol, danach in 70% Ethanol rehydriert. Anschließend wurden sie zweimal kurz in Aqua dest. gewaschen. Die Kerngegenfärbung wurde mittels Hämalaun-Lösung nach Mayer durchgeführt, die Objektträger wurden, nach Filtrieren des Hämalauns, fünf Sekunden in die Lösung gestellt. Anschließend wurden die Objektträger fünf Minuten in 37°C warmem Brunnenwasser gebläut. Nach kurzem Waschen mit Aqua dest. wurden die Objektträger in eine 250 ml Küvette mit 1%PBS/1%Glycerol gestellt, um im Kühlschrank aufbewahrt werden zu können.

3.3.2 DNA-Isolierung

Die entparaffinierten Schnitte wurden aus der PBS-Glyzerin Lösung direkt unter das Mikroskop verbracht und bei zehnfacher Vergrößerung im Durchlicht begutachtet. Nun konnte ich gezielt den gewünschten Gewebezyylinder mit einer Insulinkanüle (STERICAN, 27G, BRAUN, Melsungen) aufnehmen und in ein Probengefäß mit 20 µl Proteinase-K überführen. Die Proben wurden bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gehalten.

Die Eppendorfgefäße wurden über Nacht bei 55°C inkubiert. Nach dem Verdau wurde die Proteinase K durch 15-minütige Inkubation bei 95°C inaktiviert und die isolierte DNA für die nachfolgenden PCR-Untersuchungen eingesetzt.

3.3.3 DNA-Amplifikation sowie Biotin und Digoxin Markierung

Es gibt verschiedene Methoden der DNA-Amplifikation, wie z.B. die DOP-PCR (Degenerated Oligonucleotid Primer) oder die Alu-PCR. Hier wurde eine Linker-Adapter-PCR, basierend auf dem Protokoll von Christoph Klein, durchgeführt (Klein et al., 1999).

Das Prinzip dieser Methode wird in Abbildung 5 dargestellt.

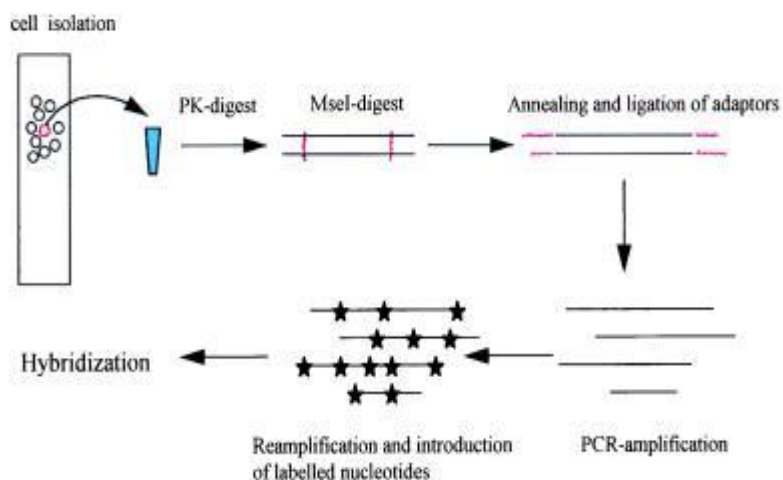


Abb. 4: Prinzip des Christoph Klein Protokolls (modifiziert nach Klein, 1999).

Um eine geeignete Fragmentlänge für die sich anschließende DNA-Hybridisierung zu erhalten, wird diese mittels Restriktionsenzym im Anschluss an die DNA-Isolierung mittels Restriktionsenzym geschnitten, siehe Abbildung 4. Das Enzym Mse1 schneidet die Sequenz TTAA nach dem ersten Thymin mit einem überstehenden Ende und es erfolgt die Ligation der spezifischen Primer. Der Primer LIB1 wird an das 3'-Ende ligiert, der Primer ddMSE11 an das 5'-Ende. Die erste PCR-Reaktion dient der DNA-Amplifikation, die zweite PCR-Reaktion dient der Markierung mit Fluorochromen für die anschließende CGH.

1. Mse-Verdau:

Ansatz A:

- 3 µl H₂O
- 0,5 µl One for all Puffer (OFA)
- 0,5 µl Mse1 (Restriktionsendonuklease)

Es werden 4 µl von Ansatz A zu 1 µl DNA gegeben. Der Verdau erfolgt durch Inkubation bei 37°C für 3h. Eine abschließende Inkubation bei 64°C, 5min, dient der Inaktivierung von Mse1.

2. Preannealing der Adapter

Ansatz B:

- 1,5 µl H₂O
- 0,5 µl OFA
- 0,5 µl LIB1 (5'-AGT GGG ATT CCT GCT GTC AGT-3')
- 0,5 µl ddMse 11 (5'-TAA CTG ACA GCdd-3')

Wenn das Gerät 65°C erreicht hat, werden von Ansatz B 3 µl zugegeben. Ein spezielles Annealing-Programm senkt nun schrittweise die Temperatur, um 1°C/min bis zum Erreichen von 15°C.

3. Ligation

Ansatz C:

- 1 µl 10 mM ATP
- 1 µl T4-DNA-Ligase

Bei Erreichen der 15°C je 2 µl von Ansatz C dazugeben und das PCR-Gerät zum Ligieren über Nacht laufen lassen.

4. Erste PCR-Reaktion zur Amplifikation der DNA-Fragmente

Ansatz D:

- 37 µl H₂O
- 3 µl 10x PCR Puffer
- 2 µl dNTP (10 nM)
- 1 µl Pol-Mix (Polymerase-Mix aus Taq - und Pwo-Polymerase)

40 µl von Ansatz C zum Ligationsansatz geben. Das Gerät wird auf 68°C vorgeheizt, im Anschluss werden die Reaktionsgefäß hereingestellt (hot start).

1 Zyklus	14 Zyklen	8 Zyklen	22 Zyklen	1 Zyklus	
	94°C 40"	94°C 40"	94°C 40"		
68°C 3'	57°C 30"	57°C 30"	65°C 30"	68°C 3'40"	4°C ∞
	68°C 1'30"	68°C 1'45"	68°C 1'53"		

5. Zweite PCR-Reaktion zur Markierung der DNA

Ansatz E:

- 12,17 µl H₂O
- 3 µl LIB1-Primer (100 µM)
- 2 µl 10x PCR Puffer
- 0,88 µl Biotin oder Digoxin
- 0,7 µl 1/8 NTP-Mix
- 0,25 µl Taq-Polymerase

Zu 1 µl aus dem Primär-PCR Ansatz werden 19 µl Ansatz E gegeben und das Label-Programm gestartet.

1 Zyklus	14 Zyklen	9 Zyklen	1 Zyklus	
94°C 2'	94°C 40"	94°C 40"	94°C 40"	
65°C 30"	65°C 30"	65°C 30"	65°C 30"	15°C ∞
72°C 2'	72°C 1'30"	72°C 2'	72°C 5'	

Zur Primerentfernung werden 1 µl Restriktionspuffer R und 1 µl nTru1 (Isozym von Mse 1) zugegeben und bei 65°C 2-3h inkubiert.

3.3.4 Aufreinigung und DNA-Konzentration

Das Aufreinigen erfolgt mit dem QIAquick PCR Purification Kits (QIAGEN, Hilden). Es wurden 5 Teile des PBI Puffers zu 1 Teil der Probe gegeben und durchgemischt. Die Lösung wurde auf eine QIAquick spin Säule gegeben, die in einem Eppendorfgefäß sitzt. Anschließend wurden die Proben 1min bei 11000 g zentrifugiert (Minispin plus, Eppendorf, Hamburg). Der Überstand am Boden des Eppendorfgefäßes wurde verworfen und der Filter wieder aufgesetzt. Anschließend wurden 500 µl PE Puffer in die Säule gegeben und erneut 1min bei 11000 g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde wiederum verworfen. Zum Trocknen wurde die Säule eine weitere Minute zentrifugiert und dann auf ein 1,5 µl Probengefäß überführt. Es wurden 20 µl EB Puffer auf die Membran gegeben und kurz bei Raumtemperatur inkubiert. Durch das abschließende Zentrifugieren für 1min bei 11000 g wurde die DNA von der Säule eluiert. Die Konzentration der aufgereinigten Probe wurde dann durch eine photometrische Bestimmung mittels Nano Drop ermittelt. Idealerweise sollten sich bei dieser Konzentrationsbestimmung Werte zwischen 200-400 µg/l ergeben.

3.3.5 DotBlot

Zur Überprüfung der Einbaueffizienz bzw. Markierungseffizienz wurde ein Dot-Blot angefertigt.

Hierfür werden je 1µl der DNA-Lösung wie folgt verdünnt:

Herstellung einer Verdünnungsreihe 1:10 – 1:100000

- 5 Mal 10 µl 6XSSC vorlegen,
- in den ersten Punkt 1µl DNA-Lösung geben, mischen,
- von Punkt zu Punkt je 1µl übernehmen.

Anschließend werden je 2 µl der Verdünnung auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen und getrocknet. Durch UV-Bestrahlung wird die DNA mit der Membran gekoppelt („cross-linking“). Es wurden 1% Magermilchlösung/6xSSC dazu gegeben und 30min bei 37°C inkubiert. Der Überstand wurde abgekippt und zwei Mal mit TN-Puffer gewaschen. Nach dem Waschen wurden 3 ml TN-Puffer+3 µl SA-AP(Biotin)/3 µl Anti-DIG AP (Digoxin) dazu gegeben und 30min geschüttelt. Der Überstand wurde erneut abgekippt und zwei Mal mit TN-Puffer gewaschen. Anschließend wurden 3 ml DOT-Puffer darauf gegeben und 10min geschüttelt.

Farblösung: je

- 5,7 ml TN-Puffer
- 33 µl NBT (Nitro-Blue Tetrazolium Chlorid)
- 25 µl BCIP (5-Brom-4-Chlor-3'-Indolphosphat)

Der DOT-Puffer wurde abgekippt, im Gegensatz zu den vorhergehenden Schritten wurde nicht erneut mit TN-Puffer gewaschen, die vorbereitete Farblösung wurde darauf gegeben und im Dunkeln 20min inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Färbeergebnis beurteilt. Je mehr Punkte auf der Membran abgebildet waren, desto effizienter war die vorhergehende DNA-Markierung. Waren mindestens drei Punkte einer Verdünnungsreihe sichtbar, kam das PCR-Produkt für eine CGH in Frage.

3.4 Chromosomenpräparation von Lymphozyten

Die Lymphozyten-Kurzzeitkultur dient der Gewinnung von Metaphasepräparaten, die für die CGH eingesetzt werden.

Zunächst wurden einem männlichen Probanden unter sterilen Bedingungen Blut abgenommen, hierzu wurde ein Lithium-Heparin-Röhrchen verwendet. Zu 8 ml Vollblut wurden 0,7 ml PBMax, ein Hämagglutininmedium, das die Leukozytenteilung anregt (Invitrogen, Darmstadt), gegeben und 72h bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Ungefähr zwei Stunden vor dem Ende der Inkubationszeit wurden dem Ansatz 40 µl Colcemid zugegeben. Colcemid ist ein Spindelgift. Es verhindert, dass die Lymphozyten ihre Teilung vollenden können. So wird ein Mitosearrest erreicht. Anschließend wurde die Probe bei 1000 rpm 10min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes und Resuspension mit einem geringen Rest des Überstandes

wurde die Probe durch tropfenweise Zugabe von 0,52% KCL-Lösung einer hypotonen Behandlung unterzogen. Die Hypotoniezeit durfte nicht mehr als 9,5min betragen. Danach wurden die Zellen bei 240 g (Minispin plus, Eppendorf, Hamburg) 10min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zur Fixierung wurde tropfenweise auf -20°C vorgekühlte Fixierungslösung (Methanol:Eisessig-Gemisch, 3:1) zugegeben und die Lösung gut durchmischt. Um eine bessere Fixierung zu erreichen, wurden die Zellen 30min bei 20°C eingefroren, bei 240 g 10min zentrifugiert, der Überstand abgekippt, frische Fixierungslösung langsam zugegeben und erneut bei -20°C eingefroren, diesmal jedoch für 15min. Nach erneutem Zentrifugieren (240 g, 10min) und Abheben des Überstandes wurde noch einmal etwas Fixierungslösung dazu gegeben, um eine Suspension zum Auftropfen zu erhalten.

Die Suspension wurde anschließend auf Objektträger getropft. Um eine bestmögliche Spreitung der Chromosomen und eine möglichst geringe Beeinflussung durch Luftfeuchtigkeit zu erreichen, wurden die Präparate auf einem feuchten Tuch getrocknet. Durch diese Maßnahme trocknet das in der Fixierungslösung enthaltene Methanol langsam ab und die stark hygroskopische Essigsäure begünstigt durch die Umgebungsfeuchte einen optimalen Quellungszustand der Chromosomen. Da an die Chromosomenpräparation für die CGH hohe Qualitätsanforderungen gestellt werden müssen (Karhu et al., 1997), ist eine anschließende mikroskopische Kontrolle der Präparate erforderlich.

Nur Präparate mit einer ausreichenden Anzahl gut gespreiteter Mitosen mit Chromosomen der richtigen Länge (400-550 Banden) kommen für eine CGH in Frage (Kleine, 2005).

3.5 Komparative genomische Hybridisierung (CGH)

Die komparative genomische Hybridisierung beruht auf dem Prinzip der Fluoreszenz in situ Hybridisierung.

Die zuvor extrahierte und zu analysierende genomische DNA stellt die Testprobe dar, die Referenzprobe besteht aus normaler (gesunder) DNA. Beide werden im Verhältnis 1:1 auf Chromosomen einer normalen Metaphase hybridisiert.

Beide Proben konkurrieren nun um die Bindung an ihren spezifischen chromosomalen Locus, wobei im Falle eines vermehrten Vorliegens bestimmter DNA-Sequenzen der Testprobe eine vermehrte Hybridisierung auf dem zugehörigen Chromosomenabschnitt erfolgt, wohingegen sich bei entsprechender Unterrepräsentation von DNA-Sequenzen in der Testprobe eine vermehrte Hybridisierung der DNA-Abschnitte der Referenzprobe einstellt.

Durch vorhergehende Markierung der Proben mit verschiedenen Haptenen, zum Beispiel grün fluoreszierendem FITC-Farbstoff für die Testprobe und rot fluoreszierendem Rhodaminfarbstoff für die Referenzprobe, kann die unterschiedliche Hybridisierungsrate sichtbar gemacht werden. Die Verteilung und Intensität der Fluoreszenzfarbstoffe werden mit Hilfe eines Bildanalyse-Systems für jede Metaphase erfasst. Die Metaphase wird vor der Hybridisierung mit DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindol) gefärbt, nach Karyotypisierung der Metaphasen erhält man für jedes Chromosom zwei entlang der chromosomalen Achse orientierte Fluoreszenzprofile, aus denen ein Fluoreszenzprofil errechnet wird.

Normalerweise, bei gleichen Werten der Fluorochrome, ergibt sich ein Wert von 1. Sind DNA-Sequenzen der Testprobe auf dem Chromosom überrepräsentiert, kommt es zu einer Abweichung des Ratioprofils nach rechts, bei einer Unterrepräsentation entsprechend nach links.

3.5.1 Hybridisierung

Zur Hybridisierung wurden 1 µg Biotin markierter Tumor DNA, 1 µg Digoxin markierte Normal-DNA mit 50X Cot1-DNA (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) in ein 1,5 ml Gefäß pipettiert. Diese Lösung wurde mit 0,1 Vol Natriumacetat (pH 5,5) und 2,5 Vol 100% Ethanol 30 min bei -80°C gefällt. Daraufhin wurde die DNA bei 12000 g und 4°C für 10min zentrifugiert, der Überstand abgekippt, 70% Ethanol hinzugegeben, erneut zentrifugiert, dekantiert und luftgetrocknet. Nach dem Trocknen wurde das Pellet in 2,5 µl deionisiertem Formamid resuspendiert und 15-30 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach Zugabe von 2,5 µl 20%Dextransulfat/4xSSC wurde die DNA erneut 20-30min unter Schütteln gelöst, anschließend bei 75°C 5min denaturiert und 15 min bei 37°C preannealt.

In der Zwischenzeit wurden die wie folgt behandelten Objektträger vorbereitet. Für

die Hybridisierung wurden ausschließlich selbst hergestellte Chromosomen-Metaphasen-Präparate eines gesunden Spenders eingesetzt.

Zunächst wurden die Objektträger 20 min mit 100 µl RNaseA/2xSSC (1:100, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) bei 37°C inkubiert und dreimal 5 min in 2xSSC gewaschen. Anschließend wurden die Präparate in 50 µl 10% Pepsin in 0.01 M HCL bei 37°C zwischen 1 und 2 Minuten eingestellt, um Proteine zu entfernen. Nach kurzem Waschen in 1xPBS wurden die Objektträger 10 min bei Raumtemperatur in 4%Paraformaldehyd/1xPBS nachfixiert, nochmals mit PBS gewaschen, in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 80%, 96% Ethanol) dehydriert und luftgetrocknet.

Durch Inkubation der Objektträger mit 100 µl Denaturierungsmix (70% Formamid/2xSSC) für 90 sec bei 75°C auf einer Heizplatte wurden die Präparate denaturiert. Unmittelbar nach der Denaturierung wurden die Objektträger in einer 4°C kalten aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert. Dieser Schritt verhindert ein Annealing der denaturierten DNA. Nach der aufsteigenden Alkoholreihe wurden die Objektträger luftgetrocknet und bis zur Hybridisierung auf eine 37°C warme Heizplatte gelegt.

Es wurden 5 µl der DNA-Lösung auf die vortemperierten Objektträger gegeben, ein Deckglas aufgelegt und mit Fixogum (Marabu, Tamm) abgedichtet. In einer feuchten Kammer erfolgte die Hybridisierung bei 37°C für drei Tage.

3.5.2 Stringenzwaschungen und Detektion

Bei diesem Arbeitsschritt erfolgt der Nachweis der hybridisierten DNA durch die Kopplung von sekundären Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern bzw. Enzymen an Biotin bzw. Digoxigenin.

Nach dem Entfernen der Deckgläser wurden die Objektträger dreimal 5 min in 50%/Formamid/2xSSC bei 45°C, zweimal 5 min in 2xSSC bei 45°C und 5 min in 0,1xSSC bei Raumtemperatur gewaschen. Anschließend wurden sie für 10 min in TritonX100/4xSSC bei Raumtemperatur gestellt.

Der nachfolgende Blockierungsschritt mit 100µl Blocking Reagenz (5%BSA/4xSSC) wurde für 20 min bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer durchgeführt.

Alle nun folgenden Schritte sollten möglichst dunkel, zum Beispiel mittels Dunkelhut, durchgeführt werden. Die Biotin-markierte Tumor- bzw. Test-DNA wurde mit 100 µl

Streptavidin-FITC/Blocking Reagenz (1:100, Dianova, Hamburg) für 45 min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer detektiert.

Nach den Immunwaschungen (dreimal 5 min bei 37°C in TritonX100/4xSSC), wurde die digoxigenierte Normal- bzw. Kontroll-DNA mit 100 µl Anti-Dig-Cy3/Blocking Reagenz (1:75, Dianova, Hamburg) 30 min bei 37°C in der feuchten Kammer inkubiert und so nachgewiesen. Diesem Schritt schlossen sich erneut drei fünfminütige Immunwaschungen mit TritonX100/4xSSC an, bevor der Objektträger in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert, luftgetrocknet und mit 25 µl DAPI-Antifade (Vector Laboratories, Burlingame, USA) eingedeckt wurde.

3.5.3 Bildaufnahme und Auswertung

Die Metaphasen wurden mit Hilfe eines Olympus BX61 (Hamburg) Auflichtfluoreszenzmikroskopes aufgenommen

Die Digitalisierung der Fluoreszenzbilder erfolgte mittels einer CCD-Kamera (ProgRes MF, Jenoptik, Jena), die mit dem Softwareprogramm ISIS 5.0 der Firma MetaSystems (Altlusheim) gekoppelt war. Die Belichtungszeiten hingen von der individuellen Intensität der Fluoreszenzsignale ab.

Die Auswertung wurde mit Hilfe der ISIS 5.0 – Software durchgeführt. Für jedes der drei eingesetzten Fluorochrome (SA-FITC (Streptavidin-Fluoresceinisocyanat) grün; Rhodamin rot; DAPI (4,6-diamino-2-phenylindol-blau) blau) wurde unter Verwendung der selektiven Filter jeweils ein Schwarz-Weiß-Bild aufgenommen und am Bildschirm in Falschfarbendarstellung mit der Farbe der entsprechenden Fluoreszenz dargestellt.

Nachdem der Bildkontrast normiert wurde, wurden die Chromosomen getrennt, karyotypisiert und begradigt. Um die Chromosomen besser zuordnen zu können, bediente man sich der inversen Darstellung der schwarz-weiß aufgenommenen DAPI-Gegenfärbung. Chromosomen, die nicht eindeutig zuzuordnen oder übereinander gelagert waren, wurden nicht ausgewertet.

In die Auswertung gingen 10-15 Metaphase-Aufnahmen ein. Nach Entfernung nicht auswertbarer Chromosomen berechnete das Programm zunächst das durchschnittliche Verhältnis von Grün (SA-FITC) zu Rot (Rhodamin) einer Metaphase. Hierbei ist zu erwähnen, dass das Verhältnis für jede Metaphase neu

berechnet wird, da versuchsbedingte Artefakte wie zum Beispiel unterschiedliche Signalintensität berücksichtigt werden müssen. Das Verhältnis zwischen Grün und Rot wird für jede Metaphase auf 1 gesetzt.

Nun erfolgte die Auswertung der einzelnen Chromosomen. Entlang der Mittelachse jedes einzelnen Chromosoms wird über seine gesamte Breite für jeden detektierten Bildpunkt (Pixel) ein mittlerer Wert für Rot und Grün ermittelt und das Verhältnis (Ratio) von Rot zu Grün bestimmt. Das Programm ermittelt nun für jedes Chromosom ein so genanntes Mittelprofil, welches mit einer Kurve die Verteilung von Rot zu Grün entlang der Mittelachse des Chromosoms darstellt. Es wird auch eine Längennormierung durchgeführt, da innerhalb einer Metaphasen-Präparation Chromosomen unterschiedlicher Kondensationsgrade vorliegen. Hierzu werden das Zentromer als Fixpunkt genutzt und die p- und q- Arme getrennt voneinander normiert.

Um ein sogenanntes Summenprofil erstellen zu können, werden abschließend für jeden Pixel die Profile aller Chromosomen gemittelt. Der Mittelwert wird neben dem Ideogramm des betreffenden Chromosoms dargestellt. Zur statistischen Absicherung der ermittelten Summenprofile wird entlang des Chromosoms für jeden untersuchten Pixel eine statistische Berechnung durchgeführt und die dreifache Standardabweichung bzw. das Konfidenzintervall von 99% als Sicherheitsgrenzen dargestellt. Die Grenzen werden zur Beurteilung der Mittelprofile herangezogen. Eine Abweichung vom Mittelwert 1 wird erst dann signifikant gewertet, wenn diese die Sicherheitsgrenzen erreicht oder überschreitet.

3.6 Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)

Die FISH ist eine Methode, die es erlaubt, Aussagen über chromosomale Aberrationen eines Tumors unter Beibehaltung der histologischen Struktur des Gewebes zu treffen. Mit Hilfe dieser Technik lassen sich lokal begrenzte Amplifikationen, Deletionen sowie Translokationen nachweisen.

Das Prinzip der FISH beruht auf der Ausbildung von DNA-Doppelsträngen aus DNA-Einzelsträngen durch Hybridisierung. Durch eine spezifische Rekombination eines zur Zielsequenz möglichst homologen DNA-Einzelstranges, der DNA-Sonde, kann die DNA-Zielsequenz detektiert werden. Um eine Hybridisierung, also eine

Ausbildung des Doppelstranges aus Zielsequenz und DNA-Sonde, zu erreichen, müssen beide als Einzelstrang vorliegen, was durch Hitzedenaturierung gelingt. Die Reassoziationskinetik dieses reversiblen Denaturierungsschrittes macht man sich für die Hybridisierung zu Nutze. Bevor sich aus den zwei Einzelsträngen des Chromosoms wieder ein Doppelstrang bildet, hybridisiert die vergleichsweise kurze DNA-Sonde ziemlich schnell mit der Zielsequenz. Um die Hybridisierung einer spezifischen Nukleinsäuresequenz mit einer markierten Sonde sichtbar zu machen, bedient man sich verschiedener Nachweisverfahren.

Es gibt zwei Wege der Sondenmarkierung. Bei der direkten Methode erfolgt die Markierung durch Fluorochrom-konjugierte Nukleotide, welche direkt in die Sondensequenz eingebracht werden (Bauman et al., 1981). Bei der indirekten Methode werden die Sonden mit Hapten-konjugierten Nukleotiden markiert. Da diese Moleküle an sich noch nicht sichtbar sind, müssen sie mit Hilfe von Antikörpergekoppelten Fluorochromen visualisiert werden (Rudkin und Stollar, 1977).

3.6.1 Sondenmarkierung mittels Nick-Translation

Für die FISH wurden zwei verschiedene Sonden gewählt, RP11-24A11, am 3'-Ende des ERG-Gens gelegen und das am 5'-Ende des TMPRSS2-Gens gelegene RP11-35C4 (BACPAC Resource Center, Oakland, USA). Ihre Markierung erfolgte mittels Nick Translation (Rigby et al., 1977), einem Verfahren, mit dem Biotin bzw. Digoxigenin markierte Nukleotide in die DNA eingebaut werden. Das Prinzip der Nick Translation beruht darauf, dass DNase I bei sehr niedriger Enzymkonzentration im Beisein von Magnesium Einzelstrangsnitte, sogenannte *nicks*, an statistisch verteilten Stellen eines DNA-Doppelstranges erzeugt.

Die 3'OH-Enden dieser *nicks* werden von der *Escherichia coli* Polymerase I als Primer für die 5'-3'-DNA Synthese benutzt. Die Synthese erfolgt hierbei komplementär zum intakten Strang (Kelly et al., 1970). Neben der DNA-Synthese verfügt die DNA-Polymerase I über eine 5'-3' Exonuclease Aktivität, wodurch die Nukleotide in Syntheserichtung entfernt werden (Klett et al., 1968). Die so abgebauten Nukleotide werden mit Hilfe der Polymerase-Aktivität durch hapten-markierte Nukleotide ersetzt.

Ansatz Biotin Markierung (BioNick Labelling System, Invitrogen, Darmstadt)

- 1 µg DNA
- 5 dNTP-Mix
- 5 µl Enzym.Mix (Polymerase I und DNase I)
- Mit Aqua dest auf 45 µl auffüllen

Ansatz Digoxigenin Markierung (DIG-Nick Translation Mix, Roche Diagnostics, Mannheim)

- 1 µg DNA
- 4 µg Dig-Kit.Mix (Polymerase I, DNase I, unmarkierte Nukleotide, DIG-11-dUTP)
- Mit Aqua dest auf 20 µl auffüllen.

Beide Ansätze werden gemischt und anzentrifugiert. Die Inkubation erfolgt anschließend bei 15°C für 90min. Um die Reaktion zu stoppen, gibt man zum Biotin-Ansatz 5µl Stop-Puffer, zum Digoxigenin-Ansatz 1 µl 0,5M EDTA und erhitzt dann beide auf 65°C für 10 min.

Zur Überprüfung der Markierungseffizienz wurde im Anschluss ein Dot-Blot durchgeführt (s. Kap. 2.3.5).

3.6.2 Lösungen

Hybridisierungspuffer

- 3,125 ml 4xSSC
- 3,125 ml Formamid
- 0,625 g Dextransulfat

Cot 1 Ansatz:

- 90 µl Cot1-DNA (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)
- 30 µl 3M Natriumacetat (pH 5,5)
- 240 µl 100% EtOH

Mischen, vortexen und bei -80°C über Nacht inkubieren. Am nächsten Tag 15min, bei 4°C und 14000rpm zentrifugieren, lufttrocknen und in 60 µl HB lösen.

3.6.3 Vorbehandlung der Paraffinschnitte

Zum Entparaffinieren wurden die Objektträger zunächst 2h, dann 10min in Xylol eingestellt und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe je 2min rehydriert. Um ein möglichst gutes Färbeergebnis zu erhalten, wurden die Objektträger zur Vorbehandlung 30min bei 92°C in 100mMTris/50mM EDTA inkubiert und anschließend in PBS gewaschen. Um den DNA-Sonden Zugang zu den Zielsequenzen zu gewähren, wurden die Objektträger mit Digest-All-III-Puffer (Invitrogen, Darmstadt), einem Pepsin haltigen Verdau-Puffer, 7,5min bei 37°C inkubiert. Da eine kurze Behandlungsdauer das Eindringen der Sonde ins Probenmaterial verhindert und eine zu starke Behandlung die Zellmorphologie zerstört, ist die Optimierung der Inkubationszeit unerlässlich. Nach anfänglich 12min, wurde sie auf 10min und letztendlich auf 7,5min gesenkt, erst dann war das Ergebnis zufriedenstellend. Nach dem Verdau wurden die Objektträger in PBS gewaschen, in einer aufsteigenden Alkoholreihe je 2min dehydriert und luftgetrocknet.

3.6.4 Denaturierung und Hybridisierung

Die Denaturierung von Hybridisierungs-Mix und Gewebeschnitten erfolgte in einem Schritt. Hierzu wurden 20 µl Hybridisierungs-Mix (10 µl Hybridization Buffer, 1 µl Cot-1 Ansatz und je 5 µl der markierten Sonden) auf den Objektträger gegeben, ein

Deckglas aufgelegt, mit Fixogum (Marabu, Tamm) abgedichtet und für 3min bei 94°C auf eine Heizplatte gelegt. Durch die Hitze werden die Doppelstränge von DNA-Sonde und Zielsequenz voneinander getrennt. Die anschließende Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 37°C in einer feuchten Kammer.

3.6.5 Stringenzwaschung und Detektion

Nach der Hybridisierung wurde die ungebundene DNA, die zu Hintergrundfluoreszenz in den Zellen oder auf dem Objektträger führen würde, durch die Stringenzwaschung von den Gewebeschnitten entfernt. Die Objektträger wurden in 0,5xSSC bei 75°C für 5min und anschließend 3x 10min in PBS-Tween gewaschen. Es folgte ein dreißigminütiger Blockierungsschritt mit 5%BSA/4xSSC bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer. Die Detektion des Biotin- sowie Digoxin-Signals erfolgte in einem Schritt. Hierzu wurden Streptavidin-FITC (Dianova, Hamburg) und anti-Digoxin-Cy3 (Dianova, Hamburg) jeweils im Verhältnis 1:100 mit 5%BSA/4xSSC gemischt, 100 µl auf den Objektträger gegeben und 60min in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Präparate wurden, nach einem 3x zehnmütigen Waschschrift in PBS-Tween, in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert, luftgetrocknet und mit DAPI-Antifade (Vector Laboratories, Burlingame, USA) zur Kerngegenfärbung eingedeckt und mikroskopiert.

3.6.6 Bildaufnahme und Auswertung

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen und Auswertungen wurden an dem Fluoreszenzmikroskop Olympus BX61 (Olympus, Hamburg) durchgeführt. Die fotografische Dokumentation erfolgte mit der digitalen Mikroskop-Kamera ProgResMF (Jenoptik, Jena), die Auswertung mit dem Softwareprogramm ISIS (Metasystems, Altlusheim).

Im Normalfall sollten sich bei der Detektion zwei rote (TMPRSS2) und zwei grüne (ERG) Signale zeigen. Eine Fusion stellt sich als gelbes Signal, als Ergebnis einer Vereinigung zweier einzelner Signale, dar. Der Nachweis der TMPRSS-ERG-Fusion gelingt jedoch nicht so einfach, da diese Gene beide auf Chromosom 21q liegen und ihr Abstand zueinander nur drei Megabasen beträgt. Da die Auflösung der FISH nur begrenzt ist, kann unter Umständen nicht zwischen fehlender Fusion und stattgefundener Fusion unterschieden werden.

Um dieses Problem zu umgehen, wurde zur Darstellung des ERG-Gen-Locus keine Sonde gewählt, die genau in diesem Bereich liegt, sondern eine Sonde, die sich neben dem ERG-Gen, in Richtung des 3'-Endes von Chromosom 21q befindet. Somit dürfte die Distanz groß genug sein, um ein verlässliches Ergebnis zu erhalten.

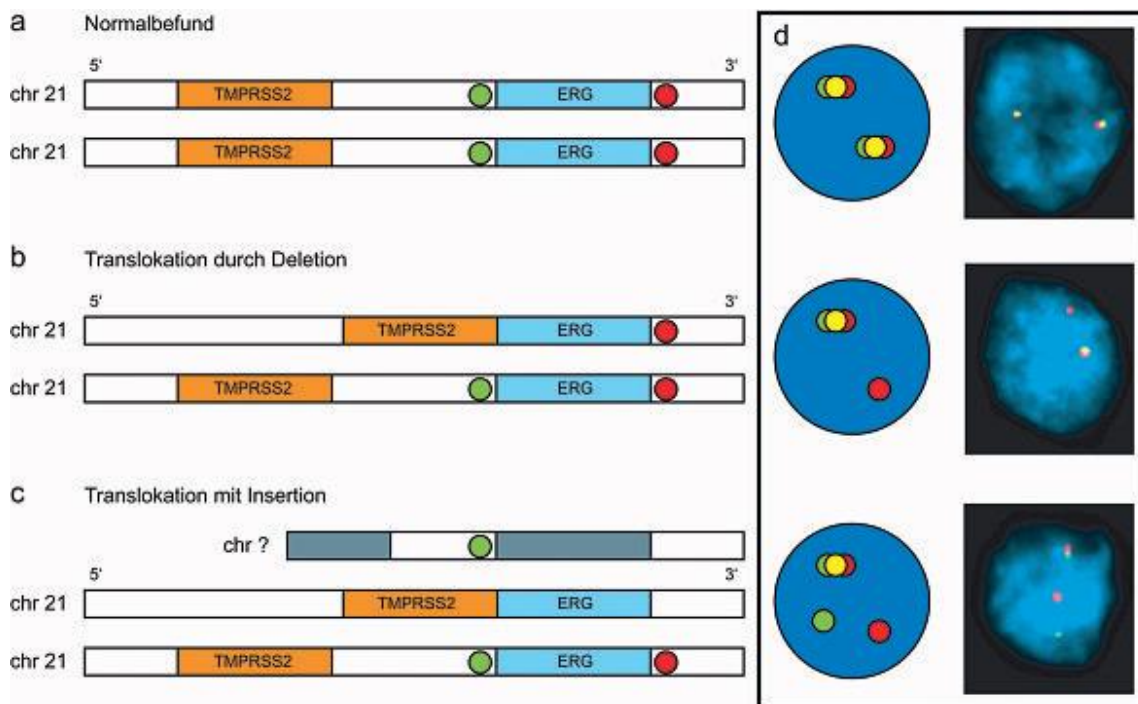


Abb.5: TMPRSS2-ERG Genfusion im Prostatakarzinom (modifiziert nach Mertz et al.,2011)

3.7 Immunhistochemische Färbemethoden

Für die immunhistochemischen Färbungen wurde die ABC (Avidin-Biotin-Complex) Methode verwendet. Das Prinzip beruht auf der hohen Affinität von Avidin (hier Streptavidin) für Biotin. Ein biotinylierter Sekundärantikörper bindet an den zu untersuchenden Primärantikörper. Biotin ist ein wasserlösliches Vitamin, das leicht

an verschiedene Substanzen wie Nukleinsäuren, Lektine oder Immunglobuline binden kann. Mit Hilfe des Biotins kann im nächsten Schritt ein (Strept)Avidin-Biotin-Enzymkomplex indirekt an den Primärantikörper binden. Avidin ist ein Glykoprotein, das vier Bindungsstellen für Biotin besitzt. Im letzten Schritt katalysiert die im Enzymkomplex enthaltene alkalische Phosphatase die Oxidation des löslichen, fast farblosen Farbstoffs Fast Red Chromogen. Das eigentliche Zielantigen wird so indirekt sichtbar gemacht. Positive Immunreaktionen erscheinen in einem bräunlichen Farbton, durch Gegenfärbung mit Hämalaun werden die Zellkerne blau gefärbt. Durch Anwendung eines mehrstufigen Detektionssystems können selbst gering exprimierte Proteinkonzentrationen durch Signalamplifikation sichtbar gemacht werden.

3.7.1 Immunhistochemische Färbung

Die Immunfärbung wurde nach dem FastRed Protokoll für Paraffinschnitte durchgeführt.

Zunächst wurden von den in Paraffin eingebetteten Präparaten ca 3 µm dicke Schnitte angefertigt und diese auf Superfrost Objektträger aufgezogen.

Zur Vorbereitung wurden die Objektträger über Nacht bei 37°C bzw. 10min bei 60°C entparaffiniert. Um unspezifische Hintergrundfärbungen zu vermeiden, ist das Paraffin möglichst vollständig zu entfernen.

Die Entparaffinierung und Rehydrierung der Objektträger erfolgte mittels absteigender Alkoholreihe. Zunächst wurden die Objektträger 3x10min in Xylol bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend je drei Mal in 100% Ethanol und danach jeweils in 80% und 70% Ethanol rehydriert. Die Objektträger müssen hierbei nur jeweils fünf bis sechs Mal durchgezogen werden.

Im Anschluss wurden die Objektträger kurz in Aqua dest gestellt, bevor sie in Citratpuffer in der Mikrowelle 10min gekocht wurden. Dies dient der sogenannten Antigendemaskierung, auch Epitop-Retrieval genannt, da es bei der vorbereitenden Formalinfixierung zu einem Verlust der Immunreaktivität vieler Antigene kommt. Durch diesen Arbeitsschritt wird dieser Verlust zumindest teilweise wieder rückgängig gemacht.

Nach dem Kochen kühlten die Objektträger 45min bei Raumtemperatur ab, wurden im nächsten Schritt mit Aqua dest abgespült und 3x10 min in 1XPBS gewaschen.

Um hydrophobiebedingte Hintergrundfärbungen zu verhindern, wurden die Objektträger 30min bei Raumtemperatur in einer Blockierungslösung inkubiert.

Direkt danach wurden vom jeweiligen Antikörper 100 µl pro Objektträger pipettiert, mit einem Deckglas versehen und bei 4°C in der feuchten Kammer über Nacht inkubiert. Es wurde ein TMRSS-ERG-Antikörper (ERG Rabbit Monoclonal Antibody, Epitomics, Burlingame) in einer Verdünnung von 1:50 verwendet.

Um wieder Raumtemperatur zu erreichen, wurden die Objektträger 30min bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Objektträger wurden 2x3min und 1x15min in 1XPBS gewaschen. Durch sanftes Schütteln kann das Spülen verkürzt werden und unerwünschte Hintergrundfärbungen werden reduziert.

Es wurden je 100 µl des biotinylierten Sekundärantikörpers (Färbekit der Firma DAKO, Hamburg) auf den Objektträger gegeben, ein Deckglas darüber gegeben und 15min in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Die Objektträger wurden erneut 3x3min in 1XPBS gewaschen.

Der dritte Schritt dieser Färbemethode ist das Hinzufügen eines Streptavidin-Alkalische-Phosphatase-Komplexes.

Es wurden je 100 µl auf den Objektträger gegeben, in der feuchten Kammer mit Deckglas 15min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend wieder 3x3min in 1XPBS gewaschen.

Die Färbung erfolgte durch ein Chromogensubstrat. Es wurden je 100 µl in folgendem Mischungsverhältnis auf den Objektträger gegeben:

AP Substratpuffer : Chromogen 1 : Chromogen 2 : Chromogen 3 = 75 : 3 : 3 : 3

Dem Substratpuffer wurde zudem noch ein Tropfen Levamisol zugefügt, um eine Unterdrückung endogener alkalischer Phosphatasereaktivität zu erreichen.

Von der fertigen Lösung wurden je 100µl auf den Objektträger gegeben, um mit Deckglas in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert zu werden. Die Inkubationsdauer ist von der jeweiligen Färbeintensität abhängig.

Nach der Färbung mit dem Chromogensubstrat wurden die Objektträger gründlich in Aqua dest gewaschen, 60sec in Meyer's Hämalaun gegengefärbt, anschließend 10min in Leitungswasser gespült und erneut in Aqua dest gewaschen.

Nun erfolgte eine Dehydrierung mittels aufsteigender Alkoholreihe, hierzu wurden die Objektträger je drei Mal durch 70% Ethanol, 100% Ethanol und Xylol gezogen.

Der letzte Schritt der Immunfärbung war das Eindecken der Objektträger mit Entellan.

4 Ergebnisse

Die Patienten waren zum Zeitpunkt der Prostatektomie zwischen 52 und 75 Jahre alt, das Durchschnittsalter betrug 66 Jahre, der Median 67 Jahre. Der Serum PSA-Wert vor Operation bzw. vor Beginn einer präoperativen Hormontherapie betrug im Mittel 20,87 ng/ml (Median 11 ng/ml), bei Werten zwischen 4,1 und >300 ng/ml. Bei 26 Patienten konnte der Gleason-Score bestimmt werden, es lagen Werte zwischen 6 und 9 vor. 6 Patienten wiesen im postoperativen Staging einen Befall regionärer Lymphknoten (N1) auf. In 25 Fällen war es möglich, die klinischen Verlaufsparemeter nachzuverfolgen, der mittlere Beobachtungszeitraum lag bei 52,4 Monaten, lediglich bei zwei Patienten konnten keine weiteren Informationen gewonnen werden. In insgesamt sieben Fällen kam es zu einer Tumorprogression, wobei es sich in sechs Fällen um PSA-Rezidiv und in einem Fall um ein Lokalrezidiv handelte. Ein Patient verstarb tumorbedingt.

Lfd. Nr.	Fallnummer	PSA (ng/ml) bei Diagnose	PSA 1 Nachfrage 07/09	PSA 2 Nachfrage 11/10	Neoadjuvante Hormontherapie	Rezidiv bis zum letzten Nachsorgezeitpunkt
1	H03626-05	11,18	06/09 <0,03			nein
2	H04801-05	13,1	08/09 <0,05	10/10 0,005		nein
3	H10800-04	16 (Feb 2003: 8,3)	04/07 0,681			ja
4	H14028-04	7,69				
5	H18874-04	10,2		08/10 <0,03		nein
6	H13540-05	13,44	10/09 0,435		ja	ja
7	H19518-05	16,4	04/08 0,16			nein
8	H16069-04	10,57	04/09 <0,05	06/10 <0,05		nein
9	H06315-05	10,82		10/10 <0,03		nein
10	H06620-05	14,74	04/09 1,4 07/09 0,15	10/10 0,89		ja
11	H15811-05	02/05: 18; 09/05: 3,66	06/09 0,05	09/10 0,06	ja	ja
12	H03969-05	7,01		10/10 <0,01	nein	ja, Wert 10/10 nach PSA-Rezidiv und Androgenblockade
13	H17187-04	12,46				
14	H09540-04	5,3	02/09 <0,02	11/10 <0,02	nein	nein
15	H21496-05	6,1	05/09 <0,01	09/10 <0,1	nein	nein
16	H11785-04	21,7	09/06: 2,0, Kontrolle 09/06: 3,0		ja	ja
17	H16694-04	1,88	03/07 0,09	09/10 <0,04	ja	nein
18	H11846-05	4,2 (12/04: 19)	02/09 <0,05		ja	nein
19	H19019-05	4,83	06/06 <0,01		nein	nein
20	H03149-04	um 20	07/09 <0,03	07/10 <0,03	nein	ja, Lokalrezidiv
21	H04149-05	5,8	07/09 <0,1	10/10 <0,1	nein	nein
22	H06513-05	7,05		03/10 <0,03	nein	nein
23	H11061-05	7,5	08/06 <0,05		nein	nein
24	H16184-05	5,49		02/10 <0,03	nein	nein
25	H22864-04	4,1	05/10 <0,03	11/10 <0,03	nein	nein
26	H02077-05	2,8 (08/04: 66,8)	08/06 20,56	12/06 tumorbedingt verstorben	ja	ja

Tab. 4: Klinische Parameter Patientenkollektiv (Rezidiv= jede Therapie nach OP, bei PSA-Rezidiv PSA \geq 0,2 ng/ml).

4.1 CGH-Ergebnisse des Prostataktomiegewebes

Es standen 22 Fälle mit histologischem Prostatanormalgewebe und 21 Gewebeproben mit histologischem Tumornachweis zur Verfügung. In 17 Fällen lagen korrespondierende Paare von Normal- und Tumorgewebe vor. An insgesamt 20 Normalgewebeproben konnte eine CGH durchgeführt werden, wobei sich in 14 Fällen Imbalanzen fanden. Bei den Tumorgewebeproben gelang in 21 Fällen eine CGH, in 18 Fällen fanden sich Aberrationen.

Da die CGH sowohl an Normal- als auch an Tumor-Proben der verschiedenen Fälle durchgeführt wurde, möchte ich im Folgenden die Ergebnisse getrennt voneinander darstellen.

4.1.1 CGH-Ergebnisse der Normal-Gewebeproben

Insgesamt wurden in 13 (65%) der 20 Fälle zwei oder mehr Aberrationen entdeckt, in Fall 4 (enh 19) und 14 (dim 9) nur jeweils eine einzige. In elf Fällen (55%) fanden sich Verluste sowie in 13 Fällen (65%) Gewinne an einer oder mehreren Stellen des Chromosoms. Lediglich sechs Fälle (30%) zeigten keinerlei chromosomale Veränderungen. Zwei Fälle (10%) hatten ausschließlich DNA-Verluste, neun (45%) zusätzlich DNA-Gewinne und vier Fälle (20%) ausschließlich DNA-Gewinne. Alle Chromosomen (bis auf das X- und Y- Chromosom) waren von diesen Imbalanzen betroffen. DNA-Verluste wurden häufiger gefunden als DNA-Gewinne.

Die untersuchten Normalgewebe-Proben zeigten verschiedene Aberrationen. Die häufigsten Verluste fanden sich auf den Chromosomen 1p (40%, n=8), 20 (35%, n=7), 2p (30%, n=6) und 17 (30%, n=6), seltener auf den Chromosomen 8p, 9q, 15q, 22q (jeweils 25%, n=5), 10q, 12q, 14q, 16p (jeweils 20%, n=4) und 1q (15%, n=3). Des Weiteren wurden Verluste auf 6p, 11q, 13q, 19p, 19q, 19 und 22 (jeweils 10%, n=2) sowie 9p, 16, 17p, 18q und 21q (jeweils 5%, n=1) detektiert. Die häufigsten Gewinne betrafen die Chromosomen 4q (55%, n=11), 13q (40%, n=8), 5q (30%, n=6) und 6q (30%, n=6). Auf Chromosom 2q, 4p und 12q wurden in drei Fällen (15%) Gewinne festgestellt. Weitere Gewinne fanden sich auf 7q und 8q (je 10%, n=2) und auf 5p, 6p sowie 19 (jeweils 5%, n=1d).

Die meisten gefundenen minimal überlappenden Bereiche chromosomaler Deletionen betrafen die Regionen 1p36.1p36.3 (40%, n=8), 22q12.2.q13.3 (35%, n=7) und 2p23p25.3 (30%, n=6). Im Rahmen der detektierten Gewinne umfassten die minimal überlappenden Bereiche am häufigsten 4q26q27 (55%, n=11), 13q21.2q22 (40%, n=8) und 5q21q23.1 (30%, n=6).

Bei den Chromosomen 17, 19, 20 und 22 umfassten die Verluste überwiegend ganze Chromosomen oder Chromosomenarme.

lfd. Nr	Fallnummer	Verlust	Gewinn	Bemerkung
1	H03626-05	1p32.3p36.3; 8p21.3p23.3; 9q32q34.3; 10q25.2q26.3; 16p12p13.3; 17; 18q21.1q23; 20	2q22q33; 4p14q34; 5p13.2q23.3 6p12q22.3; 8q11.21q22.1; 12q14q21.3	
2	H04801-05			kein Normalgewebe
3	H10800-04		19	
4	H14028-04	2p23p25.3; 11q23q25	4q25q28; 13q14.3q22	
5	H18874-04			keine Normal- PCR
6	H13540-05	1p33p36.3; 2p23p25.3; 6p22.3p25; 8p21.3p23.3; 9q; 10q22.3q26.3; 12q23q24.33; 14q32.1q32.3; 15q21.2p26.3; 17; 20; 21q22.1q22.3; 22q	4q26q28; 6q12q16.q; 13q21.1q31	
7	H19518-05		5q21q23.1; 13q21.1q22	kein Tumorgewebe
8	H16069-04			
9	H06315-05	1p36.1p36.3	4q12q33; 5q14q23.1; 6q12q16.2 ;8q21.2q22.1	
10	H06620-05			kein Gewebe
11	H15811-05			CGH nicht auswertbar
12	H03969-05	1p31.3p36.3; 1q32.1q44; 2p21p25.3; 8p21.2p23.3; 9q31q34.3; 10q23.3q26.3; 12q23q24.33; 14q22q32.3; 15q24q26.3; 16; 17; 19p13.2p13.3; 19q;20;22q	4p14q33; 5q14q23.2; 12q21.1q21.3	
13	H17187-04	9p24q22.3		
14	H09540-04			kein Gewebe
15	H21496-05	1p32p36.3; 2p23p25.3; 8p22p23.3; 12q23p24.33; 13q33q34; 14q32.1q32.3; 17; 20; 22	2q32.1q33; 4q13.1q28; 13q21.1q22	
16	H11785-04			kein Normalgewebe
17	H16694-04			kein Gewebe
18	H11846-05	16p; 19; 22q		
19	H19019-05			
20	H03149-04			Kein Tumorgewebe
21	H04149-05		4q13.1q33; 6q16.1q22.3; 7q21.2q32; 13q14.1q31	Kein Tumorgewebe
22	H06513-05	1p32.1p36.3; 1q31q44; 2p23p25.3; 6p12p25; 13q32q34; 14q31q32.3; 15q23q26; 17; 19; 20; 22	4q24q28	

23	H11061-05			
24	H16184-05		4q22q27; 13q14.3q31	
25	H22864-04			
26	H02077-05	1p34.1p36.3; 15q23q26; 16p; 17p; 19p; 20; 22q	4q; 5q21q23.1; 6q12q23.1; 13q21.2q31	
27	H12390-05	1p22p36p3; 1q32.3q42.2; 2p23p25.3; ;8p22p23.3; 9q32q34.3; 10q23.1q26.3; 11q23.3q25; 12q23q24.33; 15q21.3q26.3; 16p12p13.3; 17; 18q12.1q23 19q; 20; 22q12.2q13.3	2q23q34; 3q25.2q27; 4p15.2q34; 5q14q32.3; 6q12q24; 7q21.1q31.3; 12q14q21.3; 13q14.1q32	

Tab. 5: Übersicht aller Aberrationen an Normalgewebe.

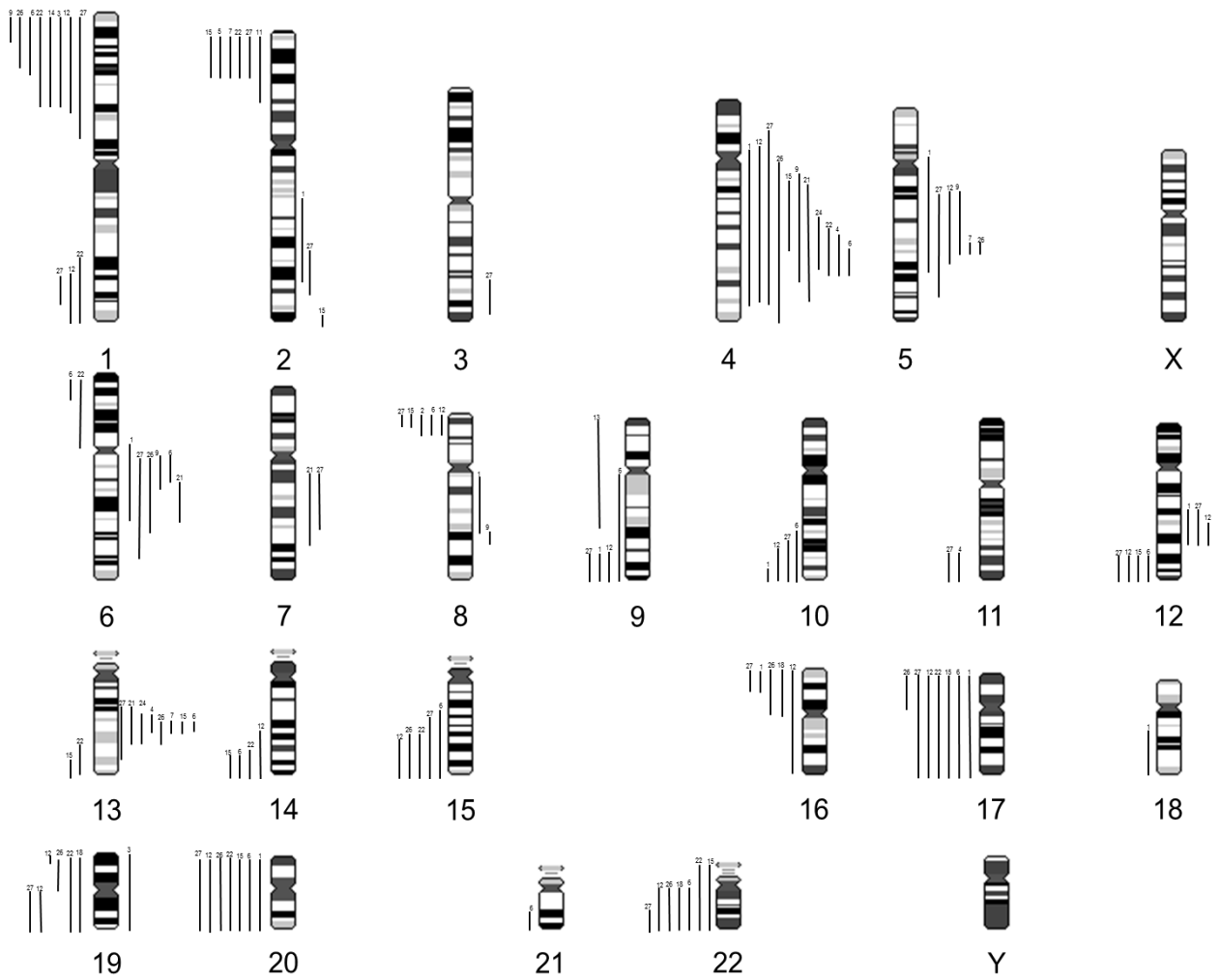


Abb. 6: Übersicht der CGH Ergebnisse am Karyogramm, Normalgewebe (links Verluste, rechts Gewinne)

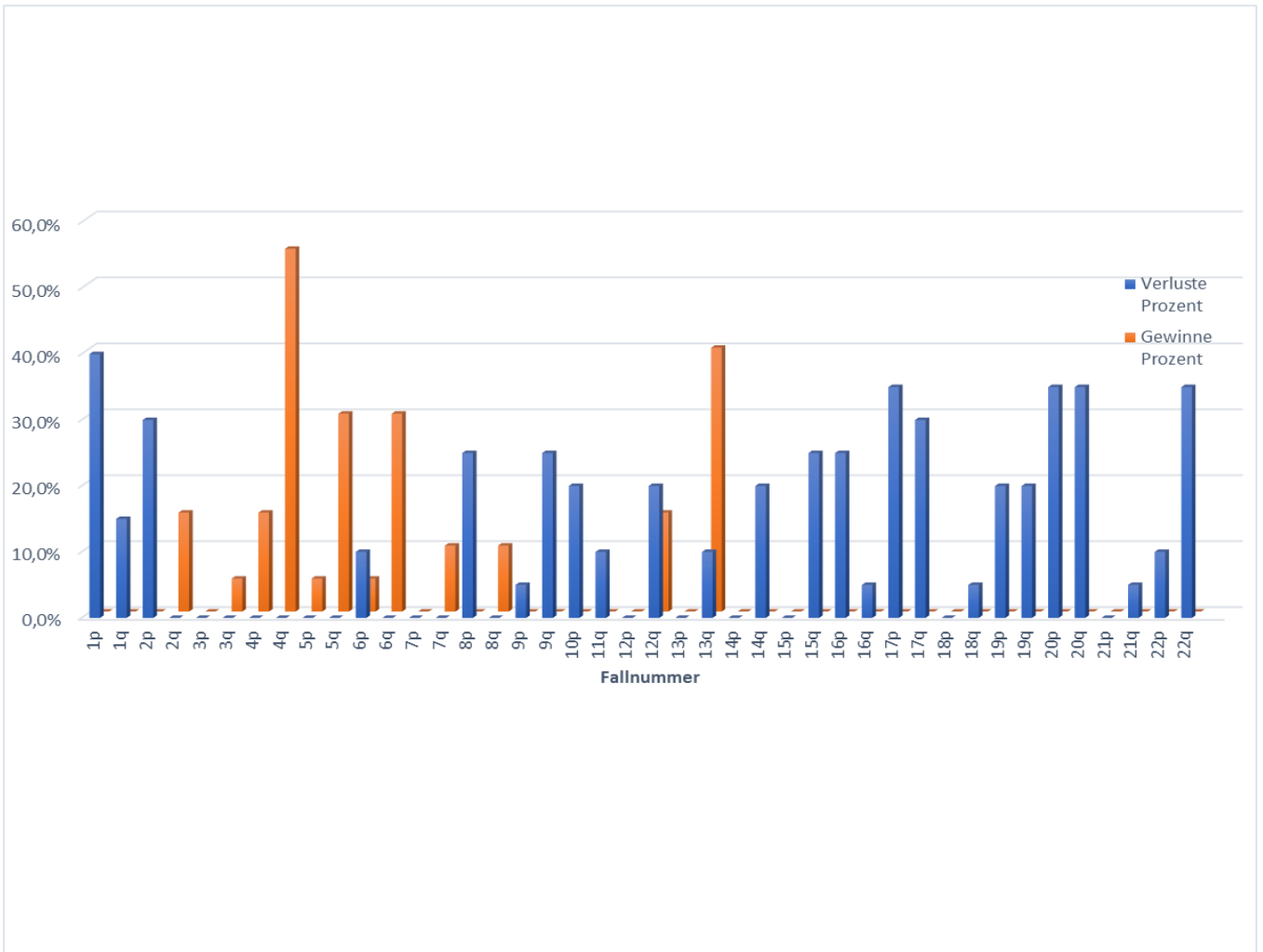


Abb. 7: Häufigkeit der Aberrationen an Normalgewebeproben in Prozent (alle untersuchten Normalgewebeproben).

4.1.2 CGH-Ergebnisse der Tumor-Gewebeproben

Auf Seiten der Tumorproben wiesen 14 (66,7%) Proben mindestens zwei oder mehr Veränderungen auf, jeweils ein einziger Verlust zeigte sich bei Fall 4 (8p), 6 (10q), 14 (8p), 26 (12q). Deletionen fanden sich in 17 (81%), Zugewinne in 13 (61,9%) der 21 Fälle. Drei Tumore (14,3%) zeigten keine Aberrationen. Reine DNA-Verluste lagen in fünf Fällen vor (23,8%), in zwölf Fällen (57,1%) lagen sowohl Gewinne als auch Verluste vor und ein Fall (4,8%) hatte nur einen DNA-Gewinn. Bis auf Chromosom 3 und 21 (*sowie X- und Y-Chromosom*) fanden sich an allen Chromosomen Veränderungen. Auch hier wurden mehr Verluste als Gewinne festgestellt.

Die Bearbeitung der einzelnen Tumore ergab verschiedene Veränderungen. Auf den Chromosomen 8p (57,1%, n=12), 10q (52,4%, n=11) und 1p (33,3%, n=7) zeigten sich die meisten Verluste, seltener kam es auf den Chromosomen 11q (23,8%, n=5), 15q (23,8%, n=5), 12q, 16, 17, 20 (jeweils 19%, n=4), sowie auf 9q, 14q und 22q (jeweils 14,3%, n=3) zu Deletionen. Des Weiteren waren die Chromosomen 1q, 2p, 6p, 13q, 18q (jeweils 9,5%, n=2) und 2, 5q, 6q, 9p, 10, 11p und 16p (jeweils 4,8%, n=1) betroffen. Gewinne wurden vornehmlich auf den Chromosomen 4q (52,4%, n=11), 13q (38,1%, n=8), 2q (28,6%, n=6) und 8q (23,8%, n=5) detektiert. Seltener kam es auf den Chromosomen 5q und 12q (je 19%, n=4), 4p, 5p und 6q (jeweils 14,3%, n=3) zu Gewinnen. In zwei Fällen fanden sich Zugewinne auf Chromosom 7q (9,5%). Auf Chromosom 7 und 19p gab es je einen Gewinn (4,8%).

Die am häufigsten in den verschiedenen Tumoren gefundenen minimal überlappenden Areale mit Verlusten umfassten die Regionen 8p23.1p23.3 (57,1%, n=12), 10q26.1q26.3 (52,4%, n=11) und 1p36.1p36.3 (33,3%, n=7). Die Bereiche chromosomaler Zugewinne fanden sich vornehmlich in den Bereichen 4q26 (52,4%, n=11) und 13q21.2q22 (38,1%, n=8).

Verluste auf den Chromosomen 16, 17, 18 und 20 betrafen vorwiegend das ganze Chromosom bzw. ganze Chromosomenarme.

Lfd. Nr.	Fallnummer	CGH Verlust	CGH Gewinn	Bemerkung
1	H03626-05	8p23.1p23.3; 15q24q26.3	13q14.2q22; 19p	
2	H04801-05		4q13.1q31.3; 13q21.2q31	Kein Normalgewebe
3	H10800-04	8p22p23.3		
4	H14028-04			
5	H18874-04	10q25.3q26.3;		Keine Normal-PCR
6	H13540-05	1p31.3p36.3; 1q32.1q44; 5q31.1q35.3; 6p21.2p25; 6q25.2q27; 8p12p23.3; 9q; 10; 11p14p15.5; 11q22.3q25; 14q22q32.3; 15q14q26.3; 16p; 16q13q24; 17; 18q12.1q23; 19; 20; 22q		
7	H19518-05			Kein Tumorgewebe
8	H16069-04	8p22p23.3; 10q25q26.3	4q26q32; 13q14q31	
9	H06315-05	1p33p36.3; 1q32.2q44; 10q25.3q26.3; 13q12.2q13; 15q22.3q26.3; 16q22q24;20	2q32.1q33; 4q; 5q14q22; 8q21.1q21.3; 12q14q22; 13q21.2q32	
10	H06620-05			Kein Gewebe
11	H15811-05	2p23p25.3; 8p21.2p23.3; 9p23p24; 13q32q34	7q21.1q31.1	Keine Normalgewebe CGH
12	H03969-05	1p34.2p36.3;8p23.1p23.3;10q26.1q26.3;11q 23q25;15q22.3q26.3;17	2q23q33; 4q12q32; 5p13.1p13.3; 5q14q23.2; 7q31.1q31.3; 13q21.2q31	
13	H17187-04	8p22p23.3		
14	H09540-04			Kein Gewebe
15	H21496-05	1p33p36.3; 10q26.1q26.3; 11q23q25; 12q24.1q24.33; 14q31q32.3; 16; 17; 22q12.1q13.3	2q31q32.1; 4p15.1q32; 5q21q22; 6q12q24	
16	H11785-04	8p22p23.3; 10q25.3q26.3; 11q23.3q25; 12q24.1q24.33	2q32.2q33; 4q22q28	Kein Normalgewebe
17	H16694-04			Kein Gewebe
18	H11846-05	8p22p23.3 ;9q34.1p34.3; 10q26.1q26.3	4q22q26; 8q21.1q21.3	
19	H19019-05			
20	H03149-04			Kein Tumorgewebe
21	H04149-05			Kein Tumorgewebe
22	H06513-05	1p36.1p36.3; 8p22p23.3; 9q34.1q34.3; 10q24.3q26.3; 16	2q23q33; 4q21.3q31.3; 6q12q23.3; 7; 8q12q24.1; 12q21.2; 13q14.1q32	
23	H11061-05			

24	H16184-05	1p34.3p36.3; 2p21p25.3; 6p23p25; 8p22p23.3; 10q26.3q25.3; 12q24.1q24.33; 14q31q32.3; 15q23q26.3; 16; 17; 19q; 20	2q24.1q32.3; 4p15.2q34; 5p14q23.3; 6q12q24; 8q13q21.3; 8q22.3; 12q15q21.3; 13q14.1q31
25	H22864-04	12q23q24.31	
26	H02077-05	1p36.1p36.3; 10q26.1q26.3; 11q23q25; 16p; 17p12p13	4q24q28; 12q21.1q21.3; 13q14.3q31
27	H12390-05	8p; 10q26.1q26.3; 18q12.1q23; 20; 22q12.1q13.2	4p12p15.1; 4q13.1q31.3; 5p12p15.1; 8q12q24.1

Tab. 6: Übersicht aller Aberrationen an Tumorproben.

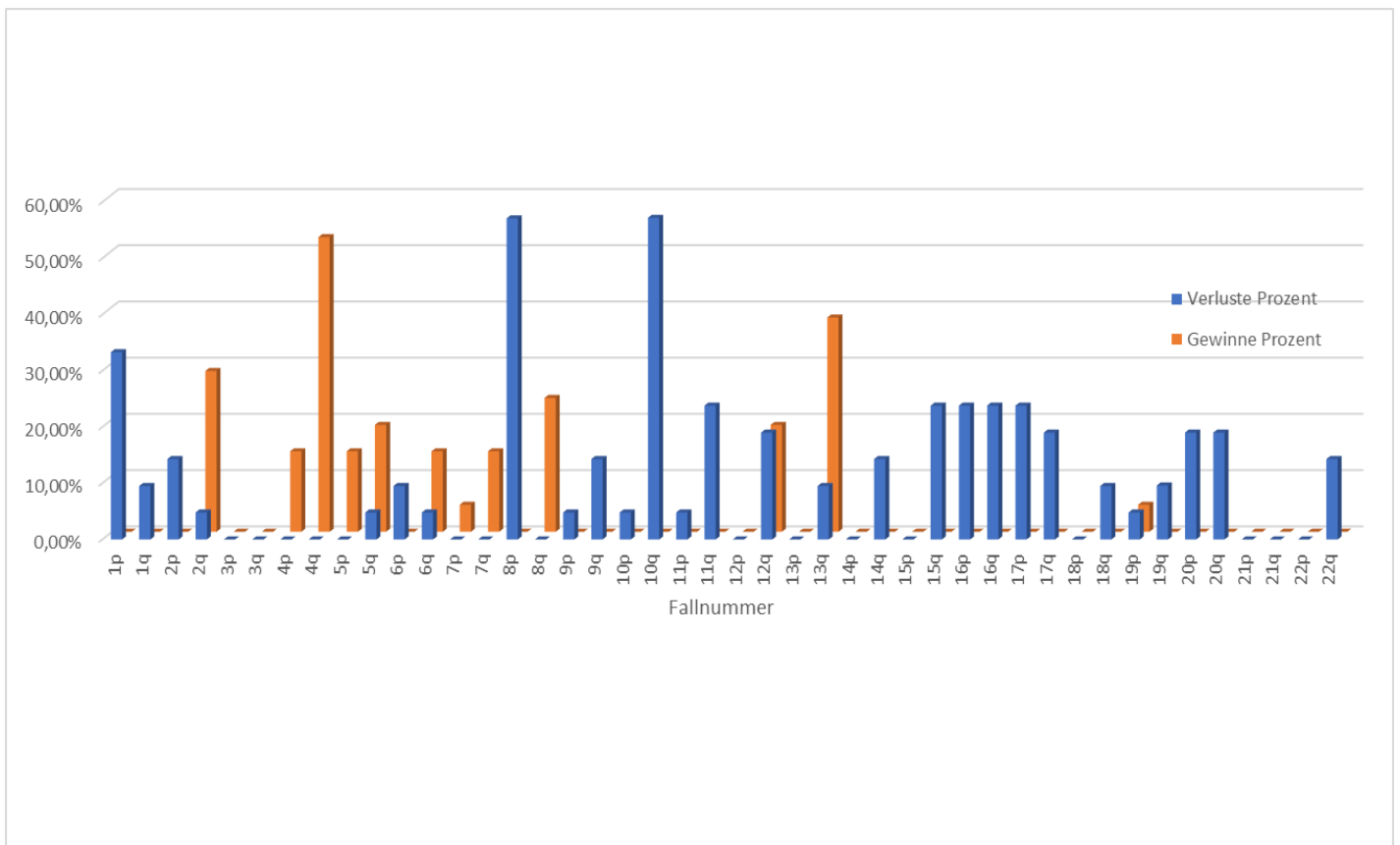


Abb. 8: Häufigkeit der Aberrationen an Tumorgewebeproben in Prozent.

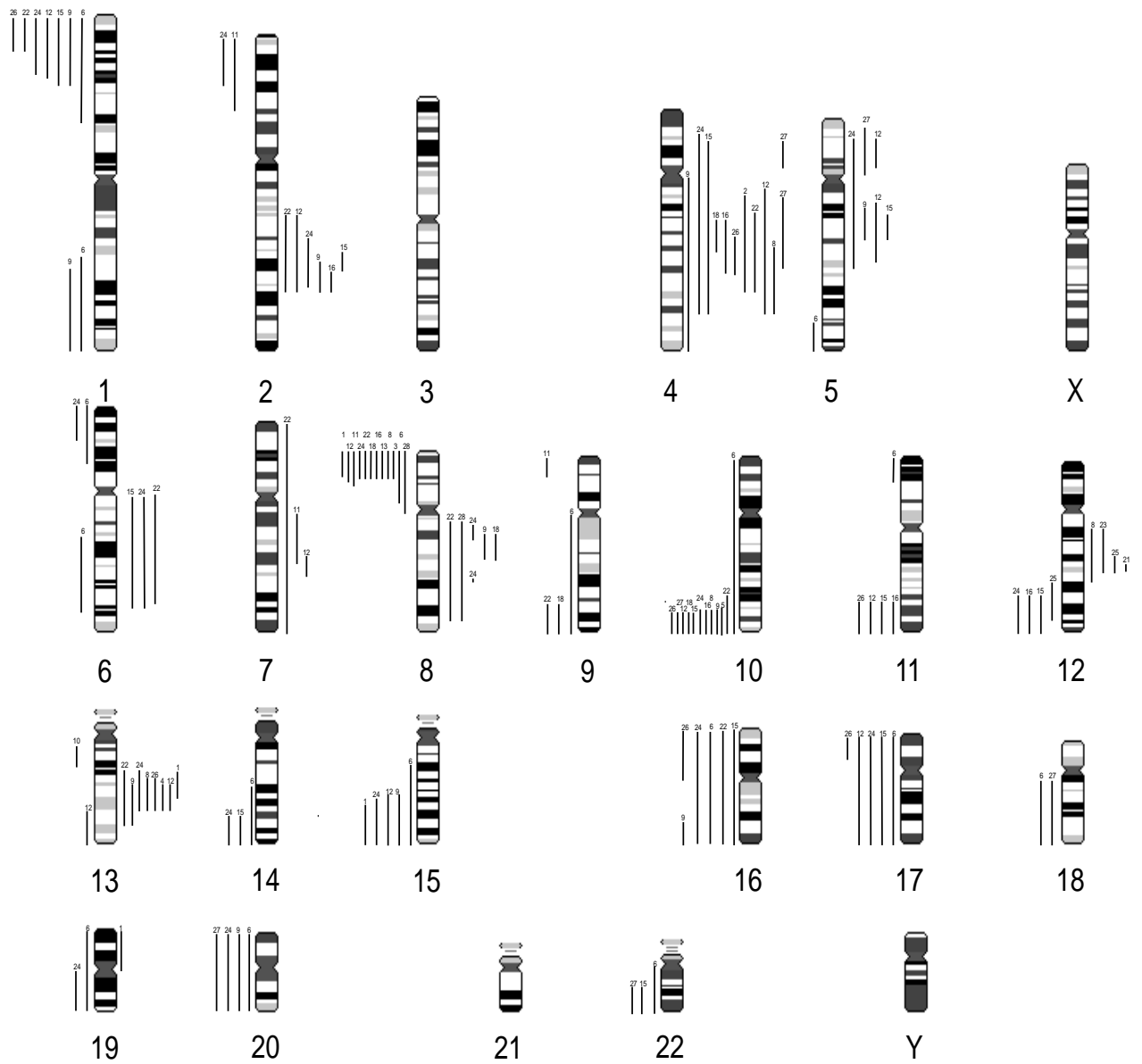


Abb.9: Übersicht der CGH Ergebnisse am Karyogramm, Tumorproben

4.1.3 CGH und klinische Parameter

Bei isolierter Betrachtung der Fälle mit N1-Situation im postoperativen Staging lagen insgesamt 6 Fälle vor, wovon sich bei 5 Proben Aberrationen nachweisen ließen, in einem Fall lag kein Gewebe für eine Untersuchung vor. Die Zahl der Aberrationen insgesamt lag zwischen einer einzelnen Veränderung und 20 Veränderungen pro Fall, im Schnitt betrug sie 10,8 Veränderungen. Im direkten Vergleich fanden sich mehr Verluste als Gewinne. Dies bezieht sich sowohl auf die Gesamtzahl (n=31, durchschnittlich 6,2 pro Fall) als auch bei Betrachtung der einzelnen Fälle mit 12 Verlusten in einer Probe. Auf Seiten der Gewinne ließen sich insgesamt 23 Aberrationen nachweisen, dies sind durchschnittlich 4,6 pro Fall, mit maximal 8 Veränderungen. Mindestens zwei Verluste fanden sich auf den folgenden Chromosomenabschnitten: 10q, 1p (80%, n=4), 8p, 11q, 15q, 17p (40%, n=2). Auf Chromosom 16 fanden sich in zwei Fällen zwar auch Veränderungen, es lagen jedoch keine überschneidenden Areale vor. Auf Seiten der Gewinne wiesen die folgenden Abschnitte mindestens zwei Aberrationen auf: 4q (80%, n=4), 13q, 2q (60%, n=3), 8q, 5p, 5q, 12q (40%, n=2). Die Veränderungen werden in Tab.7 nochmals gesondert aufgeführt.

lfd. Nummer	Summe (Verlust/Gewinn)	Verluste	Gewinne
3	1 (1/0)	8p22p23.3	-
9	13 (7/6)	1p33p36.3; 1q32.2q44; 10q25.3q26.3; 13q12.2q13; 15q22.3q26.3; 16q22q24;20	2q32.1q33; 4q; 5q14q22; 8q21.1q21.3; 12q14q22; 13q21.2q32
10	0	-	-
12	12 (6/6)	1p34.2p36.3;8p23.1p23.3;10q26. 1q26.3;11q23q25;15q22.3q26.3; 17	2q23q33; 4q12q32; 5p13.1p13.3; 5q14q32.2; 7q31.1q31.3; 13q21.2q31
24	20 (12/8)	1p34.3p36.3; 2p21p25.3; 6p23p25; 8p22p23.3; 10q26.3q25.3; 12q24.1q24.33;	2q24.1q32.3; 4p15.2q34; 5p14q23.3; 6q12q24; 8q13q21.3; 8q22.3;
26	8 (5/3)	1p36.1p36.3; 10q26.1q26.3; 11q23q25; 16p; 17p12p13	4q24q28; 12q21.1q21.3; 13q14.3q31

Tab. 7: Fälle mit N1-Situation und CGH-Ergebnisse-

Drei der N1-Fälle fanden sich auch in der Gruppe mit Rezidiv im Nachbeobachtungszeitraum. Insgesamt traten im Beobachtungszeitraum 6 Rezidive vor, wovon in 4 Fällen eine CGH durchgeführt werden konnte. Hier lag die Anzahl der Gesamtveränderungen bei 44 (1 bis 20 Veränderungen pro Fall) mit 8,8 Aberrationen im Durchschnitt. In zwei Fällen war eine CGH wegen fehlender Gewebeproben nicht möglich, es handelt sich hierbei um denselben Fall wie in der Gruppe mit N1-Staging. Auf Seiten der Verluste zeigten sich insgesamt 35 Veränderungen (1-20 pro Fall, 7 im Durchschnitt), unter den Gewinnen waren es 9 (0-6 pro Fall, 1,8 im Durchschnitt). Ein Verlust bei 8p lagen in allen vier Fällen vor (100%), 10q, 11q (50%, n=2), die weiteren Veränderungen lagen jeweils ein Mal vor. Zugewinne fanden sich auf 4q, 2q, 7q je zwei Mal (50%), die weiteren Veränderungen je ein Mal. Tabelle 8 zeigt die Veränderungen der Fälle mit Rezidiv.

lfd. Nummer	Summe (Verlust/Gewinn)	Verluste	Gewinne
3	1 (1/0)	8p22p23.3	-
6	19 /19/0)	1p31.3p36.3; 1q32.1q44; 5q31.1q35.3; 6p21.2p25; 6q25.2q27; 8p12p23.3; 9q, 10; 11p14p15.5; 11q22.3q25; 14q22q32.3; 14q14q26.3; 16p, 16q13q24; 17; 18q12.1q23; 19; 20; 22q	-
10	0	-	0
11	5 (4/1)	2p23p25.3; 8p21.2p23.3; 9p23p24; 13q32q34	7q21.1q31.1
12	12 (6/6)	1p34.2p36.3;8p23.1p23.3;10q26.1q26.3;11q23q 25;15q22.3q26.3;17	2q23q33; 4q12q32; 5p13.1p13.3; 5q14q32.2; 7q31.1q31.3; 13q21.2q31
16	6 (4/2)	8p22p23.3; 10q25.3q26.3; 11q23.3q25; 12q24.1q24.33	2q32.2q33; 4q22q28
20	0	-	-

Tab. 8: Fälle mit Rezidiv und CGH-Ergebnisse.

4.1.4 CGH-Ergebnisse der Normal- bzw. Tumor-Gewebeproben im Vergleich

Zur besseren Vergleichbarkeit wurden hier nur die Fälle ausgewertet, bei denen eine CGH von Normal- als auch Tumorgewebe durchgeführt werden konnte. Dies war in 17 von 27 bearbeiteten Fällen möglich.

Von diesen 17 Fällen fanden sich an 13 Normalgewebeproben sowie an 14 Tumorgewebeproben genetische Aberrationen. Bei genauerer Betrachtung zeigte sich, dass in 12 der 17 Fälle sowohl Veränderungen des Normalgewebes als auch des Tumorgewebes vorlagen, in einem Fall zeigten sich die Veränderungen nur am Normalgewebe, in 2 Fällen nur am Tumorgewebe. In 2 Fällen ließen sich weder an Normal- noch an Tumorgewebe Aberrationen nachweisen. Zur besseren Veranschaulichung wurde die Anzahl an Aberrationen in einer Tabelle zusammengefasst.

	Gewinne		Verluste	
	Normalgewebe	Tumorgewebe	Normalgewebe	Tumorgewebe
Minimal	1	1	1	1
Maximal	8	8	15	19
Durchschnitt	2,8	3,4	6,3	6,6

Tab. 9: Gegenüberstellung der Aberrationen von Normal- und Tumorgewebe.

In 8 Fällen fanden sich Veränderungen an jeweils korrespondierenden Chromosomenabschnitten von Normal- und Tumorgewebe. In allen 8 Fällen fanden sich diese Überschneidungen bei Verlusten, 5 der Fälle zeigten zusätzliche Überschneidungen auf Seiten der Amplifikationen. In der Mehrzahl handelte es sich hierbei um partielle Überschneidungen, vollständige Übereinstimmungen fanden sich in 5 Fällen, in 4 Fällen handelte es sich um Verluste, in einem Fall lagen auf beiden Seiten je eine komplette Überschneidung vor.

4.2 Immunhistochemische Färbung

Um die CGH-Untersuchungen zu ergänzen, wurden zusätzlich immunhistochemische Färbungen an den Gewebeproben durchgeführt. Zum Nachweis der TMPRSS2-ERG-Genfusion wurde ein entsprechender Antikörper, ERG Rabbit Monoclonal Antibody (Epitomics, Burlingame, USA) gewählt. Da es leider nicht möglich war, die Färbungen an den Tissue Microarrays durchzuführen, mussten alternativ Schnitte der jeweiligen Prostatapräparate angefertigt werden. Dank der Mitarbeit des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums des Saarlandes (Homburg/Saar) konnten für fast alle Fälle geeignete Tumorpräparate bereitgestellt werden. Lediglich in zwei Fällen lag kein geeignetes Material vor.

Es wurden insgesamt 25 Fälle untersucht. Von jedem Fall wurden sechs Schnitte à 5 µm angefertigt. Die Färbung wurde mit Hilfe eines ABC-Detektionssystem angefertigt.

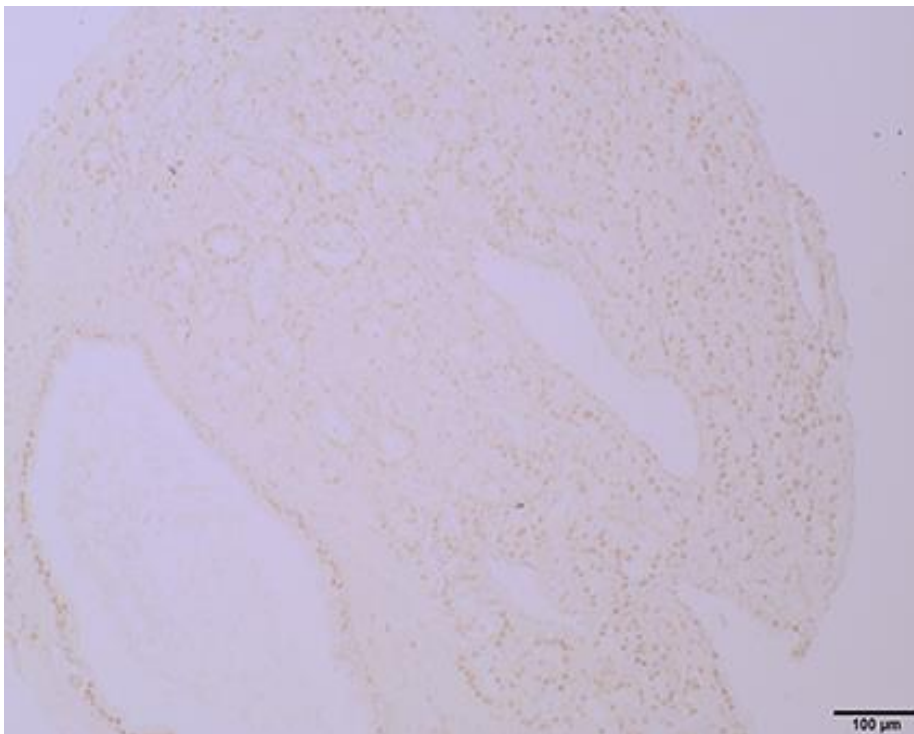


Abb. 10: TMPRS-2-ERG-positive Probe.

Die Präparate wurden von zwei unabhängigen Personen begutachtet. Die Einteilung erfolgte in positiv, negativ oder fokal positiv. In 16 der 25 Fälle fiel das Ergebnis

positiv aus, darunter zwei fokal positive Fälle, welche durch eine Fish bestätigt werden konnten (64%) und in neun Fällen negativ (36%)

4.2.1 Tmprss-2-ERG Fusionsstatus und CGH

Um die Ergebnisse besser vergleichen zu können, wurden nur CGH-Proben mit Aberrationen im Tumorgewebe sowie Fälle mit eindeutigem Tmprss-2-ERG Fusionsstatus ausgewählt. Es standen schließlich 16 Proben zur Verfügung, ein möglicher Zusammenhang zwischen rekurrenten CGH-Ergebnissen und Tmprss-2-ERG Fusionsstatus ist in Tabelle 10 dargestellt.

Lfd. Nr.	Fallnummer	CGH Verluste	CGH Gewinne	Fusionsstatus
1	H03626-05	8p23.1p23.3; 15q24q26.3	13q14.2q22; 19p	++
2	H04801-05		4q13.1q31.3; 13q21.2q31	+
3	H10800-04	8p22p23.3		fehlt
4	H14028-04			++
5	H18874-04	10q25.3q26.3;		-
6	H13540-05	1p31.3p36.3; 1q32.1q44; 5q31.1q35.3; 6p21.2p25; 6q25.2q27; 8p12p23.3; 9q; 10; 11p14p15.5; 11q22.3q25; 14q22q32.3; 15q14q26.3; 16p; 16q13q24; 17; 18q12.1q23; 19; 20; 22q		-
7	H19518-05			-
8	H16069-04	8p22p23.3; 10q25q26.3	4q26q32; 13q14q31	++
9	H06315-05	1p33p36.3; 1q32.2q44; 10q25.3q26.3; 13q12.2q13; 15q22.3q26.3; 16q22q24;20	2q32.1q33; 4q; 5q14q22; 8q21.1q21.3; 12q14q22; 13q21.2q32	-
10	H06620-05			++
11	H15811-05	2p23p25.3; 8p21.2p23.3; 9p23p24; 13q32q34	7q21.1q31.1	+
12	H03969-05	1p34.2p36.3;8p23.1p23.3;10q26.1q26. 3;11q23q25;15q22.3q26.3;17	2q23q33; 4q12q32; 5p13.1p13.3; 5q14q32.2; 7q31.1q31.3; 13q21.2q31	++
13	H17187-04	8p22p23.3		++
14	H09540-04			-
15	H21496-05	1p33p36.3; 10q26.1q26.3; 11q23q25; 12q24.1q24.33; 14q31q32.3; 16; 17; 22q12.1q13.3	2q31q32.1; 4p15.1q32; 5q21q22; 6q12q24	-
16	H11785-04	8p22p23.3; 10q25.3q26.3; 11q23.3q25; 12q24.1q24.33	2q32.2q33; 4q22q28	++
17	H16694-04			++
18	H11846-05	8p22p23.3 ;9q34.1p34.3; 10q26.1q26.3	4q22q26; 8q21.1q21.3	++
19	H19019-05			++
20	H03149-04			++
21	H04149-05			-
22	H06513-05	1p36.1p36.3; 8p22p23.3; 9q34.1q34.3; 10q24.3q26.3; 16	2q23q33; 4q21.3q31.3; 6q12q23.3; 7; 8q12q24.1; 12q21.2; 13q14.1q32	++
23	H11061-05			-
24	H16184-05	1p34.3p36.3; 2p21p25.3; 6p23p25; 8p22p23.3; 10q26.3q25.3; 12q24.1q24.33; 14q31q32.3; 15q23q26.3; 16; 17; 19q; 20	2q24.1q32.3; 4p15.2q34; 5p14q23.3; 6q12q24; 8q13q21.3; 8q22.3; 12q15q21.3; 13q14.1q31	-
25	H22864-04	12q23q24.31		fehlt
26	H02077-05	1p36.1p36.3; 10q26.1q26.3; 11q23q25; 16p; 17p12p13	4q24q28; 12q21.1q21.3; 13q14.3q31	++
27	H12390-05	8p; 10q26.1q26.3; 18q12.1q23; 20; 22q12.1q13.2	4p12p15.1; 4q13.1q31.3; 5p12p15.1; 8q12q24.1	++

Tab. 10: Übersicht CGH-Ergebnisse und TMRSS-2-ERG Fusionsstatus (++ positiv, + fokal positiv, - negativ).

Bei genauerer Betrachtung der am häufigsten vorkommenden CGH-Veränderungen fällt auf, dass auf Seiten der Zugewinne, bis auf den Zugewinn bei 2q, die Mehrzahl der Fälle einen positiven Fusionsstatus aufweist. Es ergaben sich hierbei Häufigkeiten zwischen 60 und 86%. Auf Seiten der Deletionen wiesen 3 der 5 häufigsten Veränderungen auch einen mehrheitlich positiven Fusionsstatus auf (8p, 10q, 11q), in einem Fall fiel das Ergebnis ausgeglichen aus (1p). Lediglich in einem Fall waren im Verhältnis weniger Fusionen nachzuweisen (15q).

Aberration	Gesamt	TMPRSS-2-ERG Genfusion	
		Positiv	Negativ
<i>Zugewinn</i>			
4q	10	8	2
13q	7	6	1
8q	5	3	2
2q	6	3	3
<i>Verlust</i>			
8p	11	9	2
10q	12	7	5
1p	6	3	3
11q	5	3	2
15q	5	2	3

Tab. 11: Übersicht häufige Aberrationen und Genfusionsstatus.

4.2.2 TMPRSS-2-ERG Fusionsstatus und klinische Parameter

Von 24 Proben mit vorliegendem Gleasonwert konnte in 15 Fällen ein positiver Fusionsstatus nachgewiesen werden. Nach Aufgliederung in Werte größer, kleiner, bzw. gleich 7 finden 2 positive Ergebnisse mit Gleason kleiner 7, 5 Fälle mit Gleason größer 7 und 8 Fälle mit Gleason 7.

Es lagen 25 Proben mit postoperativem Staging vor, wovon 16 eine Genfusion aufwiesen. Insgesamt betrachtet lag keine Gewebeprobe mit pT1 vor, von 7 pT2 Proben waren 5 positiv. Unter 18 pT3 Tumoren waren 15 positiv.

In 3 von 22 Fällen lag kein präoperativer PSA-Wert vor. Von den Proben mit vorliegendem Wert wiesen 13 Werte einen positiven Fusionsstatus auf. Nach Aufsplitten der PSA-Werte waren bei 8 Werten mit PSA zwischen 4 und 10 3 positiv. Von 12 Fällen mit PSA 10-25 zeigten 8 eine Genfusion. Bei zwei Fällen betrug der präoperative PSA-Wert mehr als 50, in beiden Fällen lag eine Genfusion vor.

		TMPRSS-2-ERG Genfusion	
klin. Parameter	Gesamt	Negativ	Positiv
	25	9	16
<i>Gleason Score</i>	24	9	15
<7		0	2 (13,3%)
7		5 (56%)	8(53,3%)
>7		4 (44%)	5(33,3%)
			Anm.: 1 Gleason Score nicht vorhanden
<i>Staging</i>	25	9	16
pT1		0	0
pT2		2(22,2%)	5 (31,3%)
pT3		7 (77,8%)	11 (68,7%)
<i>PSA basal</i>	22	9	13
≤ 4		0	0
>4-10		5 (55,6%)	3 (23,1%)
>10-25		4 (44,4%)	8 (61,5%)
>25-50		0	0
>50		0	2 (15,4%)
			An.: 3 PSA-Werte nicht vorhanden

Tab. 12: Übersicht TMPRSS-2-ERG Fusionsstatus und klinische Parameter.

4.3 Fluoreszenz in situ Hybridisierung

Wie in Kapitel 4.2 schon beschrieben, zeigten zwei der 25 Fälle, H04801-05 und H15811-05, eine fokal positive Färbung. Um diese Ergebnisse besser einordnen zu können, wurde eine FISH durchgeführt, die als Goldstandard für den Nachweis einer TMPRSS2-ERG-Genfusion gilt (Perner et al., 2007).

In beiden Fällen ließen sich Fusionen nachweisen, was das fokal positive Ergebnis der Immunhistochemie bestätigt.

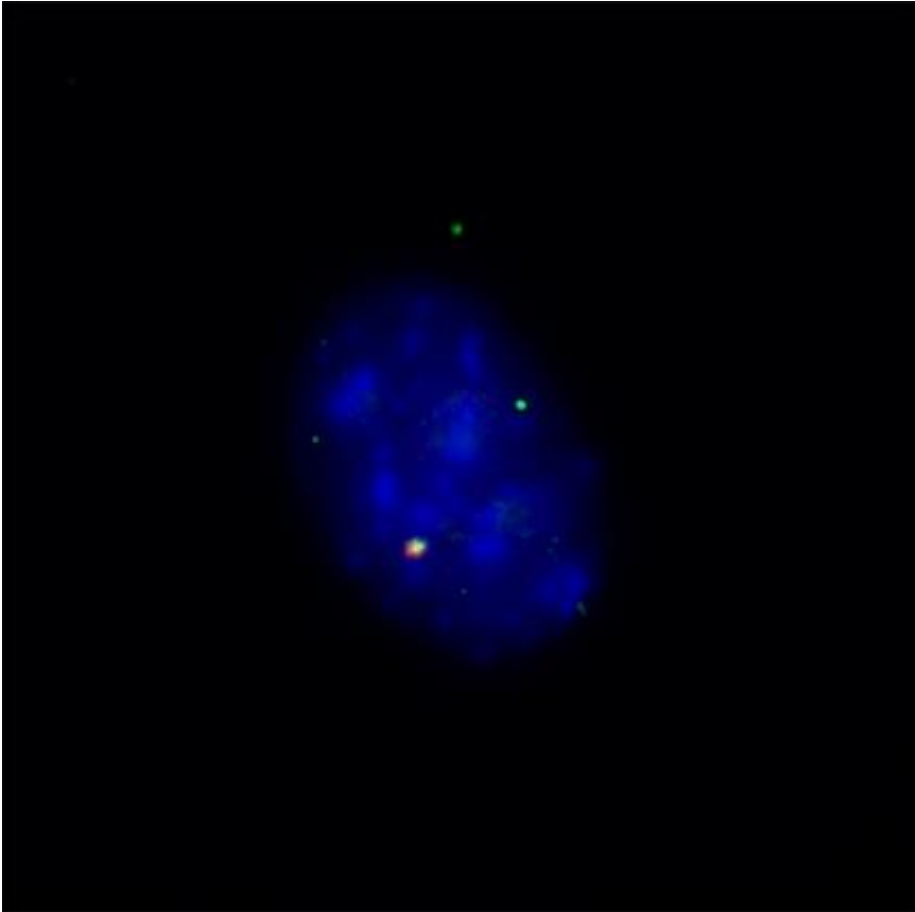


Abb. 11: Aufnahme einer Genfusion.

5 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war, genetische Veränderungen von Prostatakarzinomen mit bekannten klinischen Parametern bzw. dem klinischen Verlauf abzugleichen, um mögliche Korrelationen feststellen zu können. Zu diesem Zweck wurden Prostatektomiepräparate sowie entsprechendes Normalgewebe einer Patientengruppe molekularzytogenetisch und immunhistochemisch untersucht. Die Ergebnisse wurden wiederum mit den klinischen Verlaufsparemtern der Patientengruppe sowie bekannten klinischen Parametern abgeglichen.

5.1 Methodische Aspekte

5.1.1 CGH

Die komparative genomische Hybridisierung ist eine äußerst zeitintensive Methode mit diversen kritischen Momenten. So stellt beispielsweise die Herstellung der Metaphasen-Präparate eines der größten Probleme dar. Auch bei Anwendung eines standardisierten Präparationsprotokolles (s. Kapitel 2.4) können bei Weitem nicht alle Chromosomenpräparate für eine CGH eingesetzt werden. Für die von Präparation zu Präparation teilweise sehr schwankende Qualität ist eine Reihe von verschiedenen Faktoren verantwortlich.

Neben der Hypotoniebehandlung und der Zusammensetzung des Fixativs spielen auch schwer beeinflussbare äußere Faktoren wie Raumtemperatur und Luftfeuchtigkeit eine wichtige Rolle. Die der Präparation zugrunde liegenden molekularen Vorgänge sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Die Ursachen dürften jedoch bei Reaktionen liegen, die maßgeblich an den Trocknungs- und Spreitungsprozessen der Metaphasen beteiligt sind. So ist z.B. bekannt, dass das richtige Fixativ-Verhältnis von Methanol und Eisessig den Trocknungsverlauf entscheidend beeinflusst (Hliscs et al., 1997).

Aufgrund der schwankenden Qualität ist vor der Durchführung einer CGH eine Kontrolle unabdingbar. Es können jedoch auch trotz vorhergehender

Qualitätskontrolle mangelhafte Ergebnisse vorliegen. In den meisten Fällen äußert sich das in einer inhomogenen Hybridisierung oder einer unvollständigen DAPI-Gegenfärbung. Gelegentlich umschließt eine Zytoplasmahülle die Metaphasen, wodurch die Hybridisierungsprobe das Chromosom nicht erreichen kann. Zeigen sich solche Zytoplasmahüllen bereits eindeutig im Phasenkontrast, so sind sie nicht für eine CGH einsetzbar und sollten verworfen werden. Unter Umständen sind Zytoplasmahüllen auch im Phasenkontrast nicht sichtbar. Um diese Schwierigkeit zu umgehen, muss ein Pepsin-Verdau durchgeführt werden. Im Falle einer ungleichmäßigen Hybridisierung liegt die Ursache meist in einem ungenügenden Protein-Verdau. Die Zytoplasmahüllen wurden nicht komplett verdaut, sie wurden lediglich durchlöchert. Die Hybridisierungsprobe gelangt zwar durch diese Löcher zur DNA, eine vollständige, gleichmäßige Hybridisierung gelingt so jedoch nicht.

Nicht nur der unvollständige Proteinverdau, auch zu starker Verdau beeinflusst das CGH-Ergebnis negativ. Durch den übermäßigen Verdau kann das Chromatingerüst so stark geschädigt werden, dass die Chromosomen die spätere Denaturierung nicht überstehen.

Die Denaturierung spielt auch bei dem zweiten großen Problem, der ungenügenden DAPI-Gegenfärbung, eine Rolle. Die Chromosomen laufen bei einer Über-Denaturierung regelrecht auseinander und lassen sich kaum bis gar nicht mehr anfärben, was eine Zuordnung unmöglich macht. Je nach Grad der Denaturierung ist die Struktur völlig zerstört. Die Chromosomen sind unscharf begrenzt, zeigen eine aufgedunsene, flockige Chromatinstruktur und im schlimmsten Fall nur noch leere Chromosomen-Hüllen ohne Chromatinhalt.

Diese Problematik ist bereits lange Zeit bekannt und war oftmals Gegenstand von Diskussionen über eine notwendige Qualitätskontrolle der CGH (Kallioniemi et al., 1994).

Karhu und Mitarbeiter entwickelten 1997 eine Methode, um die Qualität der Vorbehandlung beurteilen zu können. Hier wurden die Präparate geprüft, indem man nach der Denaturierung die Chromosomen mit DAPI gegenfärbte und unter dem Fluoreszenzmikroskop begutachtete (Karhu et al., 1997). War die Färbung nicht zufriedenstellend, sollte die gesamte Charge verworfen werden. Die Qualitätsbestimmung der Denaturierung lässt natürlich keine Schlüsse auf die der Hybridisierung zu. Aus diesem Grund sollte pro Charge an Metaphasepräparaten auch eine Probehybridisierung erfolgen, um deren Qualität zu überprüfen.

Die Auswertung einer CGH ist erst nach einer präzisen Zuordnung der Chromosomen möglich. Bei ungenügender Hybridisierungsqualität gelingt diese Zuordnung nur sehr schwer. Vor allem bei Chromosomen der C- und F-Gruppe zeigte sich dieses Problem. Konnten Chromosomen nicht eindeutig klassifiziert werden, etwa weil sie gekrümmt oder übereinander gelagert vorlagen, wurden sie vor der Auswertung gelöscht.

In der Literatur werden die Sicherheitsgrenzen zur Bewertung der Mittelwerte unterschiedlich angegeben. Wählt man eine Sicherheitsgrenze näher am Mittelwert von 1,0, resultiert daraus eine höhere Sensitivität bei geringerer Sicherheit der Aussage. Im umgekehrten Fall, also bei weiteren Grenzen, werden weniger Veränderungen detektiert, die dafür aber mit größerer Sicherheit signifikant sind. Kallioniemi und Mitarbeiter wählten bei den ersten CGH-Versuchen feste Sicherheitsgrenzen von 0,75 und 1,25 (Kallioniemi et al., 1992). Dies bedeutet, dass eine Aberration noch detektiert werden kann, wenn in 50% der Zellen des untersuchten Gewebes eine Kopie des betroffenen Chromosomenabschnittes fehlt oder vermehrt vorliegt. Bei guter Hybridisierungsqualität können die Sicherheitsgrenzen auf 0,85 und 1,15 eingeeengt werden (Kallioniemi et al., 1994). Dieser Wert wird mittlerweile als Standard angesehen. Bei der Wahl festgelegter Sicherheitsgrenzen wird jedoch außer Acht gelassen, dass die Hybridisierungsqualität zwischen den einzelnen Versuchen deutlich variieren kann. Sogar auf demselben Objektträger kann die Qualität von Areal zu Areal unterschiedlich sein. Um diesen Umständen Rechnung tragen zu können, schlugen du Manoir und Mitarbeiter vor, Sicherheitsgrenzen zu verwenden, die aus statistischen Berechnungen der Hybridisierungsergebnisse hervorgehen (du Manoir et al., 1995).

Mit der von uns verwendeten Software ISIS ist es möglich, Sicherheitsschranken zwischen 95%- und 99%-Konfidenzintervall bzw. den ein- und dreifachen Sicherheitsabweichung einzustellen. Bei der Auswertung einer CGH können versuchsbedingte Schwankungen berücksichtigt werden.

Mit der ISIS-Software lässt sich für jeden einzelnen Pixel entlang der Chromosomenachse mit dem jeweils eingestellten Sicherheitsintervall ein Mittelwert errechnen. Die Entscheidung zwischen dem 95%- und dem 99%-Konfidenzintervall beeinflusst Sensitivität und Spezifität der Ergebnisse. Eine höhere Schranke senkt die Sensitivität der Ergebnisse, im Gegenzug sind die detektierten Aberrationen

spezifischer. Du Manoir und Mitarbeiter wählten in ihrer Untersuchung ein Konfidenzintervall von 95% (Du Manoir et al., 1993). In den darauf folgenden Jahren ist man jedoch dazu übergegangen, eine Grenze von 99% zu verwenden (Altura et al., 1997; Kokkola et al., 1997; Knuutila et al., 1998; Monni et al., 1998; Sattler et al., 1999).

Im Laufe der Zeit stellte sich heraus, dass einige Chromosomenabschnitte bei der Beurteilung nur eingeschränkt berücksichtigt werden können. Insbesondere die großen, Zentromer-nahen Bereiche auf den Chromosomen 1q, 9q, 16q sowie das komplette Y-Chromosom weisen einen unterschiedlich hohen Gehalt an Heterochromatin auf, welcher von Individuum zu Individuum sehr verschieden ist und so zu deutlich differierenden Ergebnissen führen kann.

5.1.2 Metaphasen-CGH und Array-CGH im Vergleich

Die Grundlagen der komparativen genomischen Hybridisierung wurden bereits in den Kapiteln 1.5.2. bzw. 2.5.3. erläutert. Mit Hilfe der Metaphasen-CGH ist es möglich, Tumorgenome global auf genetische Imbalancen hin zu untersuchen. Diese Methode weist aber auch Schwachstellen auf. Die Auflösung der Metaphasen-CGH wird durch die optische Auflösung des Mikroskops und den stark kondensierten Zustand der Metaphasen auf ca. 10-30 Mb limitiert. Darüber hinaus erschwert die nicht-lineare Kondensierung der Chromosomen die genauere Lokalisierung spezifischer Aberrationen. (Fuhrmann, 2008).

Durch die Einführung der Array-CGH 1997 durch Solinas-Toldo und Mitarbeiter konnten diese Schwachstellen behoben werden (Solinas-Toldo et al., 1997). Bei dieser Methode werden statt der herkömmlichen Metaphasen kurze definierte Fragmente menschlicher DNA als Hybridisierungsplattform verwendet und das Verhältnis der Fluoreszenzsignale der Test- und Referenz-DNA entsprechend der Metaphasen-CGH bestimmt. Der Ausdruck „Array“ bezieht sich hierbei auf die gleichmäßige, rasterförmige Anordnung der DNA-Fragmente.

Mittels Array-CGH lässt sich eine Auflösung von bis zu 140 kb erreichen, die Mehrheit der publizierten Studien bewegt sich im Bereich von 1 – 2 Mb (van Beers et al., 2006).

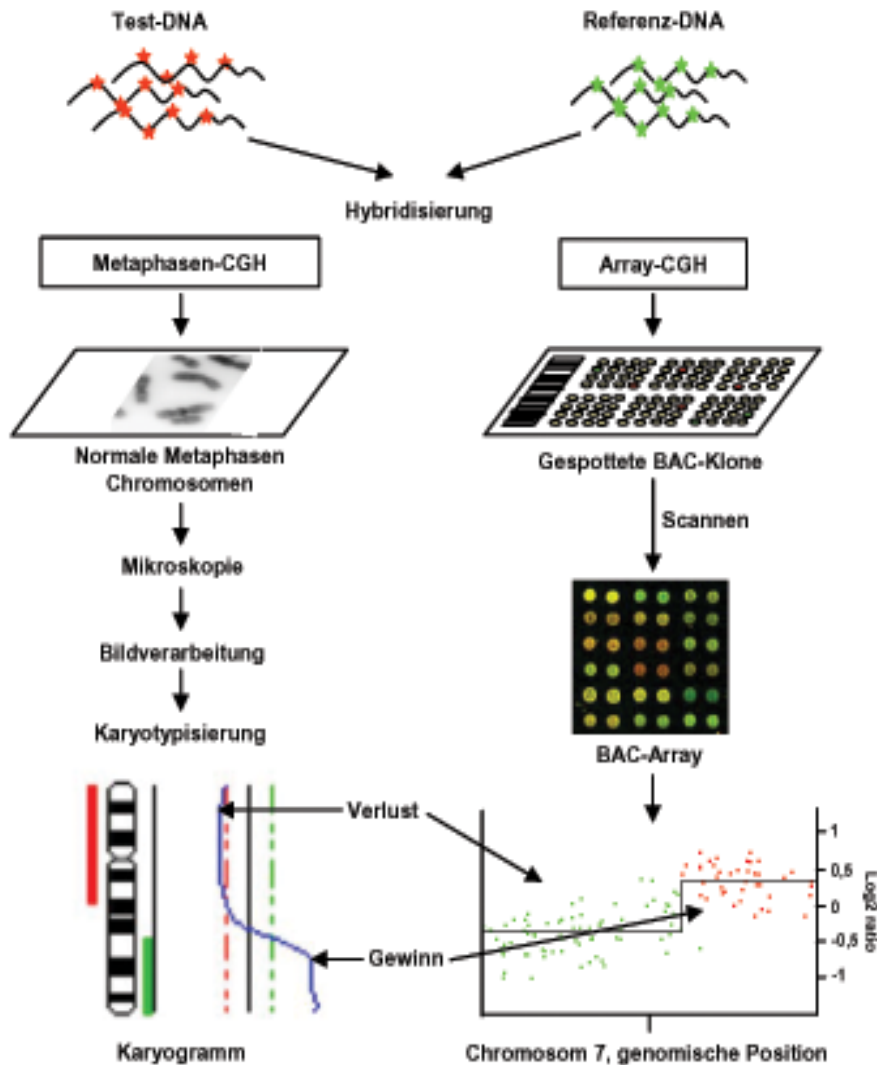


Abb. 12: Vergleich Metaphasen-CGH und Array-CGH (modifiziert nach Fuhrmann, 2008).

Mit dieser neuen Methode ergaben sich jedoch auch neue Probleme. So gibt es beispielsweise keinen Konsensus hinsichtlich der Auswertung der Array-CGH, wodurch ein objektiver Vergleich zwischen unterschiedlichen Hybridisierungsplattformen und Analysetools erschwert wird bzw. nicht möglich ist. Im Gegensatz zu Prostatakarzinom-Zelllinien, welche unter stabilen Bedingungen kultiviert werden, sind klinische Proben häufig mit nicht-neoplastischen Zellen, hauptsächlich Stroma-Zellen, kontaminiert, was sich negativ auf die Sensitivität und Spezifität bei der Auswertung auswirken kann (Ribeiro et al., 2006).

5.1.3 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie stellt eine bewährte diagnostische, prognostische und prädiktive Methode in der Pathologie dar.

Bei einem komplexen Vorgang wie der immunhistochemischen Färbung kann eine Vielzahl von Ursachen zu falsch negativen bzw. falsch positiven Ergebnissen oder unerwünschten Hintergrundfärbungen führen. Prinzipiell ist bei immunhistochemischen Versuchen genau darauf zu achten, dass ein bewährtes Versuchsprotokoll entsprechend eingehalten wird, da sich hier durch Flüchtigkeitsfehler wie variierende Inkubationszeiten, pH-Werte oder wechselnde Pufferlösungen frappierend unterschiedliche Ergebnisse zeigen.

Ein wesentlicher Bestandteil der Immunhistochemie stellt die Fixierung, in den vorliegenden Versuchen mittels Formalin, dar. Durch Koagulation bzw. chemische Quervernetzung der Proteine untereinander wird eine Konformationsänderung in der Proteinstruktur und so eine Stabilisierung des Gewebes erreicht. Ist die Fixierung zu kurz, kommt es nicht zur oben genannten Vernetzung, bei Vorbehandlung der Schnitte, bspw. durch Hitze, sind die Proben leicht zu beschädigen oder schwimmen leichter ab. Wirkt das Fixativ zu lange ein wird die Quervernetzung zu stark und Antikörper können nicht oder nur schwer an spezifische Antigene binden. Ähnlich bei zu heißer Fixierung: Hier kommt es zu einer zu schnellen und zu starken Vernetzung, wodurch die Reaktion letztlich schwach ausfällt oder ganz fehlt.

Die Reliabilität der Ergebnisse variiert nicht nur zwischen verschiedenen Laboren, auch innerhalb eines Labors kann es aufgrund minimaler Änderung des Versuchsablaufs zu unterschiedlichen Ergebnissen kommen. Es wurden daher von Arbeitsgruppen bereits Empfehlungen und Leitlinien zur Durchführung immunhistochemischer Methoden entwickelt, um derartige Probleme zumindest einzudämmen.

5.2 Bewertung der Ergebnisse

5.2.1 CGH Ergebnisse

1991 beschrieben Kallioniemi und Mitarbeiter erstmals die Methode der komparativen genomischen Hybridisierung, (Kallioniemi et al., 1992). Über 1200 publizierte Studien an unterschiedlichen Tumortypen wurden bis dato veröffentlicht. Einen Überblick bietet die Datenbank www.progenetix.de (Baudis&Cleary, 2001). In der vorliegenden Studie wurde die CGH an 21 tumorhaltigen und 20 Normalgewebe-haltigen Arealen durchgeführt.

5.2.1.1 Tumorgewebeproben

Nachfolgend werden die häufigsten Veränderungen beschrieben.

Gewinn 8q

Ein Gewinn auf Chromosom 8q wurde in der vorliegenden Studie in 23,8% der untersuchten Fälle nachgewiesen. Andere CGH-Publikationen zeigten 8q-Gewinne zwischen 29,6% und 47,8% (Alers et al., 2000; Ribeiro et al., 2006b; Teixeira et al., 2004; El Gedailly et al., 2001; El Gammal et al., 2010).

Der Gewinn auf Chromosom 8q erstreckt sich häufig über den ganzen Chromosomenarm (Sauter et al., 1998; Visakorpi et al., 1995; Alers et al., 2000). In der vorliegenden Untersuchung zeigten zwei von fünf Fälle (40%) einen solchen Zugewinn.

8q-Gewinne sind sowohl beim Prostatakarzinom als auch bei anderen Tumoren häufig mit einer Deletion auf 8p kombiniert (Sauter et al, 1998; Visakorpi et a., 1995; Alers et al, 2000; El Gammal et al., 2010). Bei fünf Fällen, die im Rahmen meiner Studie einen 8q-Gewinn aufwiesen, ein Fall sogar mit zwei kleineren Fragmenten, traten in vier Fällen gleichzeitige 8p-Verluste auf. Möglicherweise führen 8q-Gewinne für sich genommen noch nicht zu einer Störung der Zellfunktion, erst in Kombination mit einer 8p-Deletion, durch die Entstehung eines Isochromosoms 8q, wird dies möglich (Sauter et al., 1998).

Ein mögliches Zielgen dieses Zugewinns könnte das c-myc Onkogen sein. Es liegt

auf 8q24 und spielt möglicherweise eine wichtige Rolle in der Tumorentstehung und Progression. Ein Zugewinn in dieser Region korreliert mit Lymphknotenmetastasen (Alers et al., 2000) und einer schlechten Prognose (Alers et al., 2000; Gurel et al., 2008). Zwei meiner fünf Tumorproben mit 8q-Gewinn wiesen Lymphknotenmetastasen auf.

Darüberhinaus zeigte sich, dass das c-myc Onkogen in schlecht differenzierten Prostatakarzinomen überexprimiert ist (Visakorpi et al., 1995; Flemming et al., 1986). Erstaunlicherweise lag in meiner Studie, ähnlich wie bei Sattler und Mitarbeitern, der minimal überlappende Bereich auf 8q21.1-21.3 (Sattler et al., 1999). Cher und Mitarbeiter konnten von ähnlichen Ergebnissen berichten und vermuten, dass weiter proximal ein weiteres wichtiges Onkogen liegt (Cher et al., 1996). Die Tatsache, dass häufig der ganze Arm des Chromosoms 8 betroffen ist, deutet darauf hin, dass andere Onkogene entweder in Kombination oder anstatt c-myc beteiligt sind (Visakorpi et al., 1995).

Ein weiteres mögliches Kandidatengenen könnte das auf 8q24.2 lokalisierte Prostate Stem Cell Antigen, kurz PSCA, sein (Alers et al., 2000). Reiter und Mitarbeiter fanden heraus, dass dieses Gen in der Mehrzahl der Prostatakarzinom-Fälle überexprimiert ist (Reiter et al., 1998).

Auch wenn die genauen Onkogene auf Chromosom 8, die möglicherweise für die Tumorentstehung und/oder Progression bedeutsam sind, noch nicht endgültig bekannt sind, könnten dem Zugewinn auf 8q bereits verschiedene Eigenschaften hinsichtlich Prognose und Erkrankungsstand zugeschrieben werden.

So wird berichtet, dass Gewinne auf Chromosom 8 mit einem fortgeschrittenen, bzw. hohen Tumorstaging und -grading assoziiert sind (El Gammal et al., 2010; van Dekken et al., 2003), was sich auch in meinen Ergebnissen widerspiegelt. Von fünf Fällen mit 8q-Gewinn konnten bei der feingeweblichen Untersuchung drei Tumore dem Stadium pT3a und zwei Tumore pT3b zugeordnet werden. Der Gleason-Score bestätigt dies noch mit je einem Fall mit Gleason 7 bzw. 9 und zwei Fällen mit Gleason 8.

Unter anderem deshalb betrachten Alers und Mitarbeiter den Gewinn auf Chromosom 8q als Biomarker für eine fortgeschrittene Erkrankung (Alers et al., 2000).

Es konnte gezeigt werden, dass Prostatakarzinompatienten, mit einem 8q-Gewinn eine schlechtere Prognose (Alers et al., 2000; van Dekken et al., 2003, El Gammal et al., 2010) sowie ein kürzeres progressionsfreies Überleben haben (Steiner et al.,

2002).

Regionen, in denen Deletionen zu finden sind, stehen im Verdacht, mindestens ein rezessives Onkogen zu tragen. Viele der häufig deletierten Regionen beinhalten bekannte oder potentielle Tumorsuppressorgene (Cher et al., 1996).

Verlust 8p

Laut Alers und Mitarbeitern ist die Deletion auf dem kurzen Arm von Chromosom 8 womöglich die häufigste Aberration in Prostatakarzinomen (Alers et al., 2000). Im Rahmen meiner Untersuchungen lag diese Veränderung in 57% der Fälle vor. Studien, die Tumorphysen mittels CGH untersuchten, fanden 8p-Verluste zwischen 17,6% und 32% bei primären Prostatakarzinomen (Visakorpi et al., 1995; Fu et al., 2000; Wolter et al., 2002; Ribeiro et al., 2006b; El Gammal et al., 2010) sowie zwischen 48% und 73% bei fortgeschrittenen Tumoren (Alers et al., 2000; Matsuda et al., 2004; Ribeiro et al., 2006b; Teixeira et al., 2004; El Gammal et al., 2010). Sauter und Mitarbeiter gaben sogar Werte zwischen 60% und 80% an (Sauter et al., 1998). Hiervon abweichend beobachteten Sattler und Mitarbeiter lediglich bei 13% einen Verlust auf Chromosom 8p (Sattler et al., 1999).

In der vorliegenden Studie lag die Region der minimalen Überschneidung bei 8p22-pter was sich mit den Ergebnissen von Alers und Mitarbeitern deckt, die jedoch zusätzlich eine Region bei 8p12-p25 beschrieben (Alers et al., 2000).

Da zwischen einer chromosomalen Deletion und einer Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen eine enge Beziehung besteht, kann man davon ausgehen, dass an häufig deletierten Chromosomenabschnitten Tumorsuppressorgene zu finden sind (Sauter et al., 1998). Sauter und Mitarbeiter gehen von mindestens zwei verschiedenen Genloci aus, ein Kandidatengen zwischen 8p22 und 8p21.3 und das zweite zwischen 8p21 und 8p11.2 (Sauter et al., 1998; Suzuki et al., 1995). Die auf dem kurzen Arm von Chromosom 8 gelegenen Gene sind wohl für verschiedene Tumorentitäten von Bedeutung (Sauter et al., 1998). Nicht nur Sauter nennt 8p22 als möglichen Genlocus eines Tumorsuppressorgens, auch Sattler und Bova berichteten davon (Sattler et al., 1999; Bova et al., 1993). Das FEZ1 Gen, dessen Expression auch in anderen Tumoren verändert ist, wäre ein potentielles Kandidatengen auf 8p22 (Alers et al., 200; Ishii et al., 1999). Auch Macoska und Mitarbeiter beschrieben 8p22 als möglichen Genlocus, neben zwei anderen weiter proximal gelegenen Genorten und gehen davon aus, dass die dort vermuteten Tumorsuppressorgene möglicherweise unabhängig voneinander verloren gehen (Macoska et al., 199).

Als weiteres Kandidatengen wird NKX3.1 auf 8p12-p21 gehandelt (Alers et al., 2000; Brothman et al., 1999; He et al., 1997; Macoska et al., 1994).

Der Verlust auf 8p wird als frühe Aberration angesehen. 2001 beobachteten Alers und Mitarbeiter diese Veränderung bei Untersuchungen an frühen Karzinomen (Alers et al., 2001). Darüber hinaus wurde die 8p-Deletion bereits in PIN-Läsionen (Prostatische Intraepitheliale Neoplasie) detektiert, dies deutet auf eine putative Beteiligung eines Gens auf Chromosom 8p bei der Tumorentstehung hin (Sauter et al., 1998).

Verlust 10q

Ein Informationsverlust auf dem langen Arm von Chromosom 10 kommt in diversen malignen Tumoren vor, wie z.B. Gliomen, Harnblasenkarzinomen und malignen Melanomen (Sauter et al., 1998). Diese Aberration gehört zu den meist publizierten Veränderungen (Visakorpi et al., 1995).

Hinsichtlich des Auftretens dieser Veränderung finden sich in der Literatur unterschiedliche Angaben: In der Publikation von Karan und Mitarbeiterin werden Werte zwischen 18% und 50% angegeben (Karan et al., 2003). Abate-Shen und Mitarbeiter nennen sogar Werte von 50% bis 80% (Abate-Shen et al., 2000). Letztere Angabe lässt sich auch mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie in Einklang bringen; in 52% der untersuchten Tumore kam es zu einer Deletion von 10q, die minimal überlappende Region lag auf 10q26.1-q26.3. Die 10q Deletion scheint ein spätes Ereignis in der Tumorprogression zu sein, da sie häufiger in Karzinomen als in PIN-Läsionen auftritt (Abate-Shen et al., 2000).

Untersuchungen ergaben, dass auf 10q zwei potentielle Tumorsuppressorgene liegen, das MXI1 Gen und PTEN (Eagle et al., 1995; Li et al., 1997; Sauter et al., 1998). MXI1, von Alers und Mitarbeitern auf 10q24-q25 eingegrenzt, steht im Verdacht, die Aktivität von c-Myc (siehe Zugewinn 8q) zu hemmen. Eine Abnahme der MXI1-Aktivität führt wohl zur Aktivierung des Protoonkogens c-Myc (Alers et al., 2000; Eagle et al., 1995; Cher et al., 1996; Sauter et al., 1998).

Das zweite Kandidatengen, PTEN, liegt auf 10q23, einer Region, die auch in anderen Malignomen wie Mammakarzinomen, Glioblastomen oder Endometriumkarzinomen deletiert ist (Abate-Shen et al., 2000). Doch nicht nur Karzinome, auch drei autosomal dominant vererbte Erkrankungen, das Cowden Syndrom, das Lhermitte-Duclos Syndrom und das Bannanyan-Zonana Syndrom weisen diese Veränderung auf (Liaw et al., 1997; Abate-Shen et al., 2000). PTEN kodiert für eine

Phospholipid-Phosphatase, deren Substrat PIP3 ist. Durch einen PTEN-Verlust kommt es zu einer Aktivierung der PBB/AKT-Kinase Aktivität, was wiederum zu einer verminderten Zelltod-Sensitivität führt (Sun et al., 1999; Karan et al., 2003). Etwa 5-27% der primären Karzinome und 30-60% der metastasierten Prostatakarzinomen weisen einen Verlust von PTEN auf (Karan et al., 2003). Ein PTEN-Verlust bei primären Prostata-Karzinomen ist mit einem hohen Gleason-Score und einem fortgeschrittenen Tumorstadium assoziiert (DeMarzo et al., 2003; McMenamin et al., 1999). Interessanterweise lag keiner der in der vorliegenden Arbeit detektierten 10q-Verluste auf 10q23d.

Laut Alers und Mitarbeitern ist ein 10q-Verlust mit Metastasen assoziiert (Alers et al., 2000). Meine Untersuchungen ergaben, dass in 31% der Fälle mit 10q-Verlust bei Prostataektomie ein Lymphknotenbefall vorlag und zwei der 10q-Verlustfälle (15%) entwickelten im Beobachtungszeitraum ein PSA-Rezidiv.

Verlust 1p

Über die Deletion von 1p wurde bisher wenig publiziert. Lediglich Sattler und Mitarbeiter konnten in ihrer Studie von einem Verlust auf 1p34-pter in 50% der Fälle berichten. Im Rahmen meiner Untersuchungen ergab sich eine minimal überlappende Region bei 1p36.1p36.3. Insgesamt trat diese Aberration in sieben Tumorproben auf (33,3%). Bei anderen Tumoren wie Leberkarzinomen, Neuroblastomen, Mammakarzinomen oder malignen Melanomen wird diese Veränderung regelmäßig publiziert. Speziell in kindlichen Neuroblastomen wurde diese Deletion mit einer schlechten Prognose assoziiert (Sattler et al., 1999).

Verlust 15q

Diese Aberration zeigte sich in der vorliegenden Studie in 23,8% der Fälle. Die 15q-Deletion gehört zu einer Reihe von Aberrationen, die zwar häufiger vorkommen, denen aber noch keine potentiellen Tumorsuppressorgene zugeordnet werden konnten. Ein häufiger Verlust spricht jedoch dafür, dass in diesen Regionen Tumorsuppressorgene liegen (Sattler et al., 1999).

5.2.1.2 Normalgewebeproben und Gegenüberstellung der Ergebnisse

Erstaunlicherweise fanden sich auch Veränderungen innerhalb der Normalgewebeproben. Bei direkter Gegenüberstellung der CGH-Ergebnisse von Normal- und Tumorgewebeproben zeigten sich in 12 Fällen Veränderungen sowohl an Normal- als auch an Tumorgewebe. In zwei Fällen fanden sich Aberrationen nur am Tumorgewebe, wohingegen in einem Fall Veränderungen nur am Normalgewebe festzustellen waren. Die relativ hohe Anzahl an Aberrationen auf Seiten der Normalgewebeproben erscheint recht ungewöhnlich. Mögliche Ursache könnten zum einen frühe genomische Veränderungen bei noch phänotypischem Normalbefund sein. Eine zweite mögliche Ursache könnte in der Probengewinnung in Form von Stanzzyklindern liegen. Ein zunächst tumorfreies Areal kann in der Tiefe bereits Tumordrüsen enthalten und so die entsprechenden genetischen Aberrationen in der CGH zeigen. Es wurden auch nicht immer die obersten Schichten des eingebetteten Materials untersucht. Je nach Qualität des Schnittes mussten auch mehrere Schnitte verworfen werden, woraus ein „Höhenunterschied“ resultierte und ein zunächst tumorfreier Zylinder nach mehreren Schnitten in der Tiefe auch Tumordrüsen aufweisen kann.

Überschneidungen auf Seiten der Deletionen finden sich in 6 von 12 Fällen bei 1p (minimal 1p36.1p36.3) sowie in 4 von 12 Fällen bei 8p (minimal 8p23.1p23.3). Diese Häufigkeiten spiegeln auch das Vorkommen dieser Aberrationen im gesamten Kollektiv wider. Wie bereits ausgeführt, wurde der Verlust auf 8p von Alers und Kollegen als frühe Veränderung sowie von Sauter als Gen beschrieben, welches schon in PIN-Läsionen gefunden wurde und möglicherweise an der Tumorentstehung beteiligt sein könnte. Da sich diese Veränderung sowohl in Tumor- als auch in Normalgewebe nachweisen ließ, könnte dies die Rolle von 8p als frühe bzw. die Tumorentstehung fördernde Veränderung unterstreichen.

5.2.2 Ergebnisse der CGH in Korrelation zum Patientenkollektiv

Die prognostische Bedeutung der CGH wurde bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht. Wie bereits erwähnt, wurden bestimmte molekularzytogenetische Veränderungen wie etwa ein Zugewinn bei 8q mit einer schlechteren Prognose bzw. einem kürzeren progressionsfreien Überleben assoziiert (Alers et al., 2000; van Dekken et al., 2003, El Gammal et al., 2010; Steiner et al., 2002).

Definiert man nun einen Wiederanstieg des PSA-Wertes als Rezidiv der Karzinomkrankung, so kam es in dem hier vorliegenden Patientenkollektiv in 6 Fällen zu einem PSA-Rezidiv. Vergleicht man diese sechs Fälle untereinander, so finden sich in allen fünf erfolgreich untersuchten Fällen Verluste auf 8p, was auf eine mögliche Beteiligung von Tumorsuppressorgenen im Bereich dieser Veränderungen an der Entstehung von Rezidiven hindeuten könnte. Im direkten Vergleich mit den rezidivfreien Fällen zeigt sich jedoch, dass von den 12 verbleibenden Fällen mit detektierten Veränderungen 7 ebenfalls einen Verlust bei 8p aufweisen. Interessanterweise fanden sich unter den Proben mit PSA-Rezidiv keine Zugewinne bei 8q, einer Region, der eine schlechtere Prognose bereits zugeschrieben wird.

Fasst man die Definition eines Rezidives etwas weiter, indem man neben dem PSA-Wiederanstieg auch jede Therapie nach Operation einschließt, so findet sich in der Patientengruppe zudem ein Lokalrezidiv. Auch in diesem Fall konnte keine CGH erfolgreich durchgeführt werden, sodass hierzu nicht weiter eingegangen werden kann.

Im Kollektiv fand sich ein Fall eines tumorspezifischen Todes, hier zeigte sich, neben anderen genetischen Veränderungen, ein Zugewinn auf 4q, wobei hier anzumerken ist, dass dieser Proband auch zur Gruppe der PSA-Rezidive zählt, was wiederum auf eine mögliche prognostische Relevanz dieser Veränderung hindeuten könnte.

Als weitere interessante Veränderung fand sich ein Verlust bei 10p, welcher laut Alers und Mitarbeitern mit Metastasen assoziiert ist (Alers et al., 2000). Im hier vorliegenden Fall zeigte sich in der postoperativen pathologisch-feingeweblichen Untersuchung ein Lymphknotenbefall, was die Ergebnisse von Alers bestätigt.

5.3 Immunhistochemie – TMPRSS-2-ERG

Seit Tomlins 2005 erstmals den Zusammenhang zwischen der TMPRSS-2-ERG Genfusion und Prostatakarzinomen beschrieb, haben verschiedenste Studien die klinische Bedeutung für Diagnose, Therapie und Prognose dieser Entdeckung untersucht (Tomlins et al., 2005).

Immunhistochemisch ließen sich in 64% der untersuchten Fälle (16/25) TMPRSS-2-ERG Genfusionen nachweisen, hierzu wurden auch die fokal positiven Ergebnisse, welche durch FISH bestätigt wurden, gezählt.

Dieses Ergebnis liegt höher als bei Demichelis (15%) bzw. Attard (30%) , es ist hier jedoch anzumerken, dass hier watchful waiting Kohorten untersucht wurden (Demichelis et al., 2007; Attard et al., 2008). Untersuchungen an Präparaten nach radikaler Prostatektomie ergaben höhere Häufigkeiten, wie etwa bei Perner mit 42% oder Nam mit 49% (Perner et al., 2006; Nam et al., 2007a). Patienten der verschiedenen Kohorten wiesen unterschiedliche klinische Vorbefunde auf, was sich entsprechend in Staging und Grading niederschlägt. In der watchful-waiting Kohorte von Demichelis mit ausschließlich T1-Tumoren fanden sich entsprechend weniger Genfusionen als bei Perner mit Prostatektomie-Präparaten und einem pathologischen Staging von pT2 und höher (42%) (Demichelis et al., 2007; Perner et al., 2006). Des Weiteren können unterschiedliche Detektionstechniken (FISH versus RT-PCR versus HC), neue potentielle Fusionsprodukte und genetische Unterschiede zwischen populationsbasierten Kohorten für diese Unterschiede verantwortlich sein (Nam et al., 2007b).

Untersuchungen hinsichtlich eines Zusammenhangs zwischen TMPRSS-2-ERG Genfusion und klinischen Parametern wie PSA bei Diagnosestellung, Staging und Grading kamen zu unterschiedlichen Ergebnissen. Perner stellte einen signifikanten Zusammenhang zwischen Genfusion und Tumor-Staging bei Diagnosestellung her, die Fusion wurde in Tumorproben mit höherem Staging häufiger gefunden (Perner et al. 2006). Andere Autoren konnten keinerlei Zusammenhänge finden (Nam et al., 2007a). Im Rahmen meiner Untersuchungen konnten die Ergebnisse von Perner et al. bestätigt werden, auch hier fanden sich Genfusion eher bei Tumorproben mit höherem Staging.

Einige Arbeitsgruppen konnten einen Zusammenhang zwischen positivem Genfusionsstatus und höheren Gleason Scores (>7) darstellen (Demichelis et al.,

2007). Im Rahmen meiner Untersuchungen zeigten sich zwar keine bemerkenswerten Unterschiede zwischen TMPRSS-2-ERG positiven und negativen Proben hinsichtlich des Gleason Scores, interessanterweise fanden sich die zwei Tumore mit dem niedrigsten Grading (Gleason Score 6) auf Seiten der TMPRSS positiven Proben.

Verschiedene Arbeitsgruppen haben sich mit der prognostischen Aussagekraft der TMPRSS-2-ERG Genfusion befasst. Abhängig vom primären Endpunkt kamen sie zu unterschiedlichen Ergebnissen. Einige kamen zu dem Schluss, dass Patienten mit positiver Genfusion ein signifikant höheres Risiko haben ein PSA-Rezidiv zu bekommen als Patienten ohne die Genfusion (Nam et al., 2007a). In einer weiteren Studie kamen Nam und Mitarbeiter sowie Barwick zu ähnlichen Ergebnissen (Barwick et al., 2010; Nam et al., 2007b; Brigati et al., 1983). Andere Arbeitsgruppen untersuchten den Zusammenhang zwischen Genfusionsstatus und tumorspezifischem Tod. Attard und Demichelis konnten zeigen, dass eine positive Genfusion mit einem kürzeren karzinomspezifischen Überleben korrelieren (Attard et al. 2008; Demichelis et al., 2007). Neuere Publikationen konnten jedoch die prognostische Aussagekraft der Genfusion nicht bestätigen. Die Häufigkeit der Genfusion von etwa 50% bei prostatektomierten Patienten konnte, ebenso wie die Assoziation zwischen positivem Fusionsstatus und höherem Tumor-Staging, verifiziert werden, eine prognostische Aussagekraft ergab sich hingegen nicht (Minner et al., 2011; Pettersson et al., 2012).

In meinem Patientenkollektiv traten in einem mittleren Beobachtungszeitraum von 52,4 Monaten unter 25 Probanden mit immunohistochemischem Ergebnis insgesamt fünf PSA-Rezidive, ein Lokalrezidiv sowie ein Fall von tumorspezifischem Tod auf. Nach Unterteilung der Kohorte in TMPRSS-2-ERG positive bzw. negative Fälle zeigte sich, dass sich die oben genannten Faktoren ausschließlich unter den TMPRSS-2-ERG positiven Fällen fanden. Von 16 positiven TMPRSS-2-ERG Fällen erlitten fünf Patienten ein PSA-Rezidiv (in einem Fall lag kein Probenmaterial zur Prüfung des Fusionsstatus vor), ein Patient ein Lokalrezidiv sowie ein Patient verstarb aufgrund des Prostatakarzinoms. Da es sich bei meinen Untersuchungen jedoch um eine kleine Kohorte mit relativ kurzem Follow-Up handelt, ist nicht absehbar, ob der Zusammenhang von anderen Faktoren unabhängig war, um dies sicherstellen zu können, müsste das Studiendesign hinsichtlich Kohortengröße und Follow-up entsprechend verändert werden.

Steurer und Mitarbeiter sowie Weischenfeldt und Mitarbeiter konnten einen Zusammenhang zwischen früh auftretenden PCA (early-onset prostate cancer, EO-PCA) und androgenabhängigen Aberrationen, insbesondere TMPRSS-2-ERG Genfusionen nachweisen. Patienten, bei denen in einem Alter von jünger als 50 Jahren ein klinisch manifestes PCA nachgewiesen werden konnte, zeigten im Verhältnis zur Summe der gefunden Aberrationen einen höheren Anteil an androgenabhängigen Veränderungen als ältere Patienten. Demgegenüber fanden sich in der Gruppe der älteren Patienten eine Akkumulation von Deletionen. Ein Zusammenhang zwischen Patientenalter, Fusionsstatus und Tumorwachstum bzw. Klinischem Verlauf ließ sich jedoch nicht nachweisen (Steurer et al., 2014; Weischenfeldt et al., 2013).

Im hier vorliegenden Patientenkollektiv fand sich kein Patient, der zum Zeitpunkt der Prostatektomie jünger war als 50 Jahre, ein Patient war 52 Jahre alt, welcher jedoch einen positiven Fusionsstatus aufwies. Bei Vergleich der TMPRSS-2-ERG positiven und negativen Fälle zeigt sich, dass die Gruppe mit Genfusion ein leicht jüngeres Durchschnittsalter aufweist (64,6 Jahre) als die Gruppe ohne Genfusion (67,8 Jahre).

5.4 Korrelation von CGH-Ergebnissen und Genfusionsstatus

Es zeigt sich, dass einige der durch CGH detektierten rekurrenten Veränderungen mit einem positiven Fusionsstatus korrelieren. Dies trifft bei den Zugewinnen insbesondere für 4q und 13q sowie bei den Deletionen für 8p und 10q zu. Interessanterweise war die Deletion auf 10q auch bei allen TMPRSS-2-ERG negativen Proben zu finden. Diese Feststellung findet sich auch bei Weischenfeldt und Mitarbeitern sowie Steurer und Mitarbeitern (Weischenfeldt et al., 2013; Steurer et al., 2014). Bei der ersten Publikation fand sich eine Zunahme an PTEN (10q) Deletionen im Kollektiv ohne Genfusion, wohingegen Steurer und Mitarbeiter häufiger PTEN-Verluste bei älteren Patienten mit Genfusion feststellten.

Insgesamt lag das Durchschnittsalter der Patienten mit 10q-Deletion in der Gruppe der Patienten mit Genfusion (61,2 Jahre) unter dem der Patienten ohne Genfusion (67,2 Jahre), was wiederum den Arbeiten von Steurer bzw. Weischenfeldt hinsichtlich nachgewiesener Genfusion und jüngeren Alter entspricht.

5.5 Schlussfolgerungen und Ausblick

Im Rahmen meiner Untersuchungen konnte ich bereits bekannte chromosomale Veränderungen wie ein Zugewinn auf 8q sowie Verluste bei 8p und 10q ebenfalls finden. Weitere Veränderungen, welche insbesondere im Zusammenhang mit dem Prostatakarzinom noch nicht so häufig detektiert wurden, bzw. deren Rolle noch nicht geklärt ist, konkret Verluste auf 1p und 15q, konnte ich ebenfalls nachweisen.

Im direkten Vergleich der CGH-Ergebnisse von Normal- und Tumorgewebe zeigte sich eine erstaunliche hohe Zahl an Veränderungen auf Seiten der Normalgewebeproben, was zum einen auf frühe genomische Veränderungen und zum anderen auf methodische Aspekte meiner Untersuchungen zurückzuführen sein kann. Es fanden sich mehrheitlich Verluste, hier insbesondere bei 1p und 8p, was die Häufigkeitsverteilung der Veränderungen der Tumorproben widerspiegelt sowie in geringerem Maße Gewinne auf 4q, 5q und 13q.

Bei Gegenüberstellung von CGH-Ergebnissen und klinischen Parametern war zwar ein Verlust auf 8p bei allen Fällen mit PSA-Rezidiv und erfolgreicher CGH nachweisbar, er lag aber auch in 7 von 12 rezidivfreien Proben vor. Weiterhin fand sich keine Korrelation zwischen genetischen Veränderungen und klinischen Parametern.

Meine Ergebnisse konnten die Fusionsrate bei Prostatektomiepräparaten sowie den Zusammenhang zwischen positivem Fusionsstatus und höherem Staging bestätigen. Ebenso zeigte sich ein Zusammenhang zwischen negativem Fusionsstatus und höherem Patientenalter. Aufgrund kleiner Kohortengröße und relativ kurzem Follow-Up konnten keine Aussagen hinsichtlich der prognostischen Aussagekraft der Fusion in meinem Patientenkollektiv getroffen werden.

Im direkten Vergleich von CGH-Ergebnissen und Fusionsstatus zeigte sich, dass Zugewinne auf 4q und 13q sowie Verluste auf 8p und 10q häufig bei Proben mit nachgewiesener Genfusion auftraten.

In großen internationalen Krebsforschungsprojekten (*Genome Cancer Atlas (GCA)* und *International Cancer Genome (ICGC)*) wurden mittels *Next-Generation-Sequenzierung (NGS)* große Fallzahlen aller bedeutenden Tumortypen, unter anderem des Prostatakarzinoms, genomisch analysiert.

Die so erhaltenen Daten werden durch Informationen zu Genexpression, Genkopienzahl sowie chromosomale und epigenetische Veränderungen ergänzt, wodurch ein umfassender Einblick in die molekulare Entstehung und Progression des Prostatakarzinoms ermöglicht wird. Durch diese Informationen erhofft man sich einen umfassenden Einblick in die Entstehung sowie die Progression des Prostatakarzinoms zu erhalten. Anhand dieser Erkenntnisse könnten mögliche Kandidatengene zur verbesserten Prognoseabschätzung sowie optimierte Therapieansätze der verschiedenen Erkrankungsstadien ermittelt werden. Abeshouse und Mitarbeiter konnten etwa bestätigen, dass das Prostatakarzinom ein sehr heterogener Tumor ist, 26% der untersuchten Tumore konnten nicht eindeutig einem molekularen Subtyp zugeordnet werden. Insgesamt konnte die Arbeitsgruppe sieben molekulare Subtypen definieren, mit deren Hilfe die Mehrzahl der untersuchten Tumore charakterisiert werden könnten. Zudem wurden genetische Veränderungen entschlüsselt, die als potentielle Therapieziele in Fragen kommen könnten (Abeshouse et al., 2015).

Dank der in den letzten Jahren rasant voran geschrittenen Sequenzierungstechnik ist es mittlerweile möglich, eine Routine-Genomsequenzierung innerhalb von 3-4 Tagen mit verhältnismäßig geringem finanziellen Aufwand durchzuführen, was sich gerade bei dem Prostatakarzinom, bei dem zur Diagnosestellung Gewebeproben in Form von Stanzzyllindern gewonnen werden, als Routineuntersuchung anbieten würde.

Desweiteren wird zurzeit daran gearbeitet frei im Blut zirkulierende Tumor-DNA zu sequenzieren, wodurch eine molekulare Charakterisierung des Prostatakarzinoms und eventueller Metastasen auch ohne Gewebebiopsien möglich sein wird (Schlomm T, 2014).

6 Verzeichnisse

6.1 Literaturverzeichnis

- Abate-Shen C, Shen MM (2000) Molecular genetics of prostate cancer. *Genes dev* 14:2410-2434.
- Abeshouse, Adam et al. (2015) The Molecular Taxonomy of Primary Prostate Cancer. *Cell*, Volume 163, Issue 4, 1011-1025.
- Alers JC, Rochat J et al. (2000) Identification of genetic markers for prostatic cancer progression. *Lab Invest* 80(6):931-942.
- Alers JC, Krijtenburg PJ et al. (2001) Molecular cytogenetic analysis of prostatic adenocarcinomas from screening studies : early cancers may contain aggressive genetic features. *Am J Pathol* 158 (2): 399-406.
- Altura RA, Maris JM et al. (1997) Novel regions of chromosomal loss in familial neuroblastoma by comparative genomic hybridization. *Genes Genomic Cancer* 19(3):176-184.
- Annenmüller W, Delling G et al. (1997) Prostatakarzinom. Remmele W (Hrsg) *Pathologie*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York,: 47-83.
- Aparicio A, Den RB et al. (2011) Time to stratify? The retinoblastoma protein in castrate-resistant prostate cancer. *Nat Rev Urol* 8(10):562-8.
- Attard G, Clark J, et al. (2008) Duplication of the fusion of TMPRSS2 to ERG sequences identifies fatal human prostate cancer. *Oncogene* 27:253.
- Barbieri CE, Baca SC et al. (2012) Exome sequencing identifies recurrent SPOP, FOXA1 and MED12 mutations in prostate cancer. *Nat Genet* 44(6):685-689.
- Barbieri CE, Bangma CH et al. (2015) The Mutational Landscape of Prostate Cancer. *Eur Urol* 64(4):567-576.
- Barwick BG, Abramowitz M et al. (2010) Prostate cancer genes associated with TMPRSS2-ERG gene fusion and prognostic of biochemical recurrence in multiple cohorts. *Br J Cancer* 102: 570-576.
- Battiflora H (1986) The multtumor (sausage) tissue block: novel method for immunohistochemical antibody testing. *Lab Invest* 55: 244-248.
- Baudis M, Cleary ML (2001) Progenetix.net: an online repository for molecular cytogenetic aberration data. *Bioinformatics* 17(12):1228-1229.

- Baumann JGJ, Wiegant J et al. (1981) Cytochemical Hybridization with Fluorochrome-Labelled RNA. III. Increased Sensitivity by the Use of Anti-Fluorescein Antibodies. *Histochemistry* 73:181-193.
- Beltran H, Yelensky R et al. (2013) Targeted Next-Generation Sequencing of Advanced Prostate Cancer Identifies Potential Therapeutic Targets and Disease Heterogeneity. *Eur Urol* 63(5):920-6.
- Berger MF, Lawrence MS et al. (2011) The genomic complexity of primary human prostate cancer. *Nature* 470(7333): 214-220.
- Bill-Axelsson A, Holmberg L et al. (2014) Radical prostatectomy or Watchful Waiting in Early prostate cancer. *N Engl J Med* 370:932-942.
- Böcker W, Denk H et al. (2008) *Pathologie*. Urban & Fischer Verlag, München Jena.
- Börgermann C, Rübber H (2009) Früherkennung des Prostatakarzinoms. *dt. Ärzteblatt* 37/103: 2399-2405.
- Bova GS, Carter BS et al. (1993) Homozygous deletion and frequent allelic loss of chromosome 8p22 loci in human prostate cancer. *Cancer Res* 53:3869-3873.
- Braun M, Scheble VJ et al. (2011) Relevance of cohort design für studying the frequency of the ERG rearrangement in prostate cancer. *Histopathology* 58:1028-1036.
- Brawer MK, Chetner MP (1997) Ultrasonography and biopsy of the prostate. In: Walsh PC, Retik A, Stamey TA, Vaughan EJ (eds) *Campbell's Urology*. Saunders, Philadelphia, pp 2506-2518.
- Brigati DJ, Myerson D et al. (1983) Detection of Viral Genomes in Cultured Cells and Paraffin Embedded Tissue Sections Using Biotin-Labeled Hybridization Probes. *Virology* 126:32-50.
- Brothman AR, Maxwell TM et al. (1999) Chromosomal clues to the development of prostate tumors (Review). *Prostate* 38:303-312.
- Carter BS, Bova GS, et al. (1993) Hereditary prostate cancer: epidemiologic and clinical features. *J Urol* 150(3):635-638.
- Cerveira N, Ribeiro FR et al. (2006) TMPRSS2-ERG gene fusion causing ERG overexpression precedes chromosome copy number changes in prostate carcinomas and paired HGPIN lesions. *Neoplasia* 8(10):826-832.
- Cher ML, Bova GS et al. (1996) Genetic alterations in untreated metastases and androgen-independent prostate cancer detected by comparative genomic hybridization and allelotyping. *Cancer Res* 56:3091-3102.

- D'Amico AV, Whittington R et al. (1998) Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer. *JAMA* 28:969-74.
- De Klein A, Van Kessel AG et al. (1982) A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myeloid leukaemia. *Nature* 300:765-767.
- DeMarzo AM, Nelson WG et al. (2003) Pathological and molecular aspects of prostate cancer. *Lancet* 361:955-964.
- Demichelis F, Fall K et al. (2007) TMPRSS2:ERG gene fusion associated with lethal prostate cancer in a watchful waiting cohort. *Oncogene* 26:5692.
- Deutsche Gesellschaft für Urologie e.V. (2011) Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms.
- Dhom G (1983) Epidemiologic aspects of latent and clinically manifest carcinoma of the prostate. *J Cancer Res Clin Oncol* 106(3):210-218.
- Du Manoir S, Speicher MR et al. (1993) Detection of complete and partial chromosome gain and losses by comparative genomic in situ hybridization. *Hum Genet* 90:590-610.
- Du Manoir S, Schröck E et al. (1995) Quantitative analysis of comparative genomic hybridization. *Cytometry* 19:27-41.
- Eagle LR, Yin X et al. (1995) Mutation of the MXI1 gene in prostate cancer. *Nat Genet* 9:249-255.
- El Gammal AT, Brüchmann Met al. (2010) Chromosome 8p Deletions and 8q Gains are Associated with Tumor Progression and Poor Prognosis in Prostate Cancer. *Clin Cancer Res* January 1 2010 (16) (1) 56-64
- El Gedaily, A., Bubendorf, L., et al. (2001), Discovery of new DNA amplification loci in prostate cancer by comparative genomic hybridization*. *Prostate*, 46: 184–190.
- Epstein JI, Allsbrook WC et al. (2005) The 2005 international society of urological pathology (ISUP) consensus conference on gleason grading of prostatic carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2005, 29: 1228-1242.
- Epstein, J.I., et al. (2016) The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2016, 40(2):244-252.
- Flemming WH, Hamel A et al. (1986) Expression of the c-myc protooncogene in human prostatic carcinoma an benign hyperplasia. *Cancer Res* 46:1535-1538.

- Fröhling S, Döhner H (2008) Chromosomal abnormalities in cancer. *N Eng J Med* 359:722-734.
- Fu W, Bubendorf L et al. (2000) Genetic changes in clinically organ-confined prostate cancer by comparative genomic hybridization. *Urology* 56(5): 880-5.
- Fuhrmann C (2008) Entwicklung der Array-CGH zur hochauflösenden, genomweiten Untersuchung von DNA-Veränderungen einzelner Tumorzellen. Dissertation, LMU München: Fakultät für Biologie.
- Gall JG, Pardue ML (1969) Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc Acad Sci U.S.A.* 63:378-383.
- Gittes RF (1991) Carcinoma of the prostate. *N Engl J Med* 324(4):236-245.
- Gleason DF (1966) Classification of Prostatic carcinomas. *Cancer Chemother. Rep.* 50:125-128.
- Gleason DF, Mellinger GT (1974) Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *J Urol* 111:58-64.
- Gleason DF (1992) Histologic grading of prostate cancer: a perspective. *Hum Pathol* 23 273-279.
- Grasso CS, Wu YM (2012) The mutational landscape of lethal castration-resistance prostate cancer. *Nature* 487(7406):239-43.
- Gray JW, Pinkel D et al. (1994) Fluorescence in situ hybridization in cancer and radiation biology. *Radiat Res* 137:275-289.
- Gurel B, Iwata T et al. (2008) Nuclear MYC protein overexpression is an early alteration in human prostate carcinogenesis. *Mod Pathol* 21(9):1156-57.
- Hankey BF, Feuer EJ et al. (1999) Cancer surveillance series: Interpreting trends in prostate cancer – evidence of the effects of screening in recent prostate cancer incidence, mortality, and survival rates. *J Natl Cancer Inst* 91(12):1017-1024.
- Harnden P, Shelley MD et al. (2006) The prognostic significance of perineural invasion in prostatic cancer biopsies: a systematic review. *Cancer* 109:13-24.
- Hautmann R, Huland H, (2006) *Urologie*. 3.Auflage, Springer Medizin Verlag, Heidelberg.
- He WW, Sciavolino PJ et al. (1997) A novel human prostate-specific, androgen-regulated homeobox gene (NKX3.1) that maps to 8p21, a region frequently deleted in prostate cancer. *Genomics* 43:69-77.

- Hermans KG, van Marion R et al. (2006) TMPRSS2:ERG fusion by translocation or interstitial deletion is highly relevant in androgen-dependent prostate cancer, but is bypassed in late-stage androgen receptor-negative prostate cancer. *Cancer Res* 66:10658-10663.
- Hessels D, Klein Gunnewiek JM et al. (2003) DD3(PCA3)-based molecular urine analysis for the diagnosis of prostate cancer. *Eur Urol* 44:8-16.
- Hliscs R, Mühling P et al. (1997) The spreading of metaphases is a slow process which leads to a stretching of chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 76:167-171.
- Hoedemaeker RF, Rietbergen JBW et al. (2000) Histopathological prostate cancer characteristics at radical prostatectomy after population based screening. *J Urol* 164(2):411-415.
- Howlander N, Noone AM et al. (2011) SEER Cancer Statistics Review, 1975-2008, National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2008/, based on November 2010 SEER data submission, posted to the SEER web site, 2011.
- Ishii H, Baffa R et al. (1999) The FEZ1 gene at chromosome 8p22 encodes a leucine-zipper protein, and its expression is altered in multiple human tumors. *Proc Natl Acad Sci*
- Jemal A, Center M et al. (2010a) Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 19(8):1893-1907.
- Jemal A, Siegel R et al. (2010b) Cancer Statistics,2010. *CA Cancer J Clin* 60:277-300.
- Joos S, Fink TM et al. (1994) Mapping and chromosome analysis: the potential of fluorescence in situ hybridization. *J Biotechnol* 35:135-153.
- Kallioniemi A, Kallioniemi OP et al. (1992) Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis in solid tumors. *Science* 258/1992:818-821.
- Kallioniemi OP, Kallioniemi A et al. (1994) Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 10:231-243.
- Karan D, Lin MF et al. (2003) Current status of the molecular genetics of human prostatic adenocarcinomas. *Int J Cancer* 103:285-293.
- Karhu R, Kähkönen M et al. (1997) Quality control of CGH, impact of metaphase chromosomes and the dynamic range of hybridization. *Cytometry* 28:198-205.

- Kattan MW, Eastham JA et al. (1998) A preoperative nomogram for disease recurrence following radical prostatectomy for prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 90:766-71.
- Kelly RB, Cozzarelli NR et al. (1970) Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleic Acid XXXII. Replication of duplex deoxyribonucleic acid by Polymerase at a single strand break *J Biol Chem* 245:39-45.
- Klein C, Schmidt-Kittler O et al. (1999) Comparative genomic hybridization, loss of heterozygosity, and DNA sequence analysis of single cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:4494-4499.
- Kleine AK (2005) Analyse genetischer Aberrationen testikulären Keimzelltumoren mit Hilfe der Comparativen genomischen Hybridisierung (CGH), Münster
- Klett RP, Cerami A et al. (1968) Exonuclease VI, a new nuclease activity associated with E.coli DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 60(3):943-950.
- Knuutila S, Bjorkqvist AM et al. (1998) DNA copy number amplifications in human neoplasms: review of comparative genomic hybridization studies. *Am J Pathol* 152:1107-1123.
- Kokkola A, Monni O et al. (1997) 17q12-21 amplicon, a novel recurrent genetic change in intestinal type of gastric carcinoma: a comparative genomic hybridization study. *Genes Chromosomes Cancer* 20(1):38-43.
- Kononen J, Bubendorf L et al. (1998) Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 4:844-847.
- Kühn D (2009) Mikrosatelliteninstabilitäten und Defekte in den Spindelcheckpointgenen Bub1b und MAD2 als mögliche prädiktive Marker für das Prostatakarzinom. Julius-Maximilian Universität, Würzburg.
- Kumar A, White TA et al. (2011) Exome sequencing identifies a spectrum of mutation frequencies in advanced and lethal prostate cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 108(41):17087-92.
- Lavoipierre AM, Snow RM et al. (1998) Prostatic cancer: role of color Doppler imaging in transrectal sonography to detect prostatic cancer. *AJR Am J Roentgenol* 171(1):205-210.
- Laxman B, Tomlins SA et al. (2006) Noninvasive detection of TMPRSS2:ERG fusion transcripts in the urine of men with prostate cancer. *Neoplasia* 8:885-888.
- Li Y, Yen C et al. (1997) PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 275:1943-1947.

- Liaw D, Marsh DJ et al. (1997) Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome. *Nat Genet* 16:64-67.
- Linja MJ, Visakorpi T (2004) Alterations of androgen receptor in prostate cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 92(4):255-64.
- Macoska JA, Trybus TM et al. (1994) Fluorescence in situ hybridization analysis of 8p allelic loss and chromosome 8 instability in human prostate cancer. *Cancer Res* 54:3824-3830.
- Martin NE, Mucci LA et al. (2011) Prognostic Determinants in Prostate Cancer. *Cancer J* 17(6):429-437.
- Matsuda K, Matsuyama H et al. (2004) DNA sequence copy number aberrations in prostate cancers: a comparison of comparative genomic hybridization data between Japan and European countries. *Cancer Genet Cytogenet* 15;152(2):119-23.
- McMenamin ME, Soung P et al. (1999) Loss of PTEN expression in paraffin-embedded primary prostate cancer correlates with high Gleason score and advanced stage. *Cancer Res.* 59(17): 4291-6.
- Merseburger AS, Hennenlotter J et al. (2006) Anwendung von Tissue-Microarrays für die Diagnose, Prognose und Therapieentscheidung beim Nierenzellkarzinom. *Urologe*, 45:323-327.
- Mertz KD, Rubin MA et al. (2011) Die TMPRSS2-ERG-Genfusion im Prostatakarzinom. *Schweiz Med Forum* 11(1-2):18-19.
- Minner, S, Enodien, M. et al. (2011). ERG status is unrelated to PSA recurrence in radically operated prostate cancer in the absence of antihormonal therapy. *Clin. Cancer Res.* 15(17), 5878-5888
- Mistry K, Cable G (2003) Meta-Analysis of prostate-specific antigen and digital rectal examination as screening tests for prostate carcinoma. *J Am Board Fam Pract* 16(2):95-101.
- Monni O, Oinonem R et al. (1998): Gain of 3q and Deletion of 11q22 Are Frequent Aberrations in Mantle Cell Lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer*, 21:298-307.
- Mosquera JM, Perner S et al. (2008) Characterization of TMPRSS2-ERG fusion high-grad prostatic intraepithelial neoplasia and potential clinical implications. *Clin Cancer Res* 14(11):3380-3385.

- Nam RK, Sugar L et al. (2007a) Expression of the TMPRSS2:ERG fusion gene predicts cancer recurrence after surgery for localized prostate cancer. *Br J Cancer* 97:1690-1695.
- Nam RK, Sugar L et al. (2007b) Expression of TMPRSS2-ERG Gene Fusion in Prostate Cancer Cells is an Important Prognostic Factor for Cancer Progression. *CANCER BIOL THER* 6:1, 40-45.
- Park K, Tomlins SA et al. (2010) Antibody-Based Detection of ERG Rearrangement-Positive Prostate Cancer. *Neoplasia* 12(7):590-598.
- Pauletti G, Godolphin W et al. (1996) Detection and quantitation of HER-2/neu gene amplification in human breast cancer archival material using fluorescence in situ hybridization. *Oncogene* 13:63-72.
- Perner S, Demichelis F et al. (2006) TMPRSS2:ERG fusion-associated deletions provide insight into the heterogeneity of prostate cancer. *Cancer Res* 66:8337-8341.
- Perner S, Schmidt FH et al. (2007) Die TMPRSS2-ETS-Genfusion beim Prostatakarzinom. *Urologe* 46:754-760.
- Pettersson, A., Graff et al. (2012). The TMPRSS2:ERG rearrangement, ERG expression, and prostate cancer outcomes: a cohort study and meta-analysis. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 21(9), 1497-1509.
- Reiter RE, Gu Z et al. (1998) Prostate stem cell antigen: A cell surface marker overexpressed in prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:1735-1740.
- Ribeiro FR, Henrique H et al. (2006a) Comparison of chromosomal and array-based comparative genomic hybridization for the detection of genomic imbalances in primary prostate carcinomas. *Mol Cancer* 5:33.
- Ribeiro FR, Jerónimo C, et al. (2006b) 8q Gain Is an Independent Predictor of Poor Survival in Diagnostic Needle Biopsies from Prostate Cancer Suspects. *Clin Cancer Res* July 1 2006 (12) (13) 3961-3970
- Rigby PW, Dieckmann M et al. (1977) Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J Mol Biol* 113:237-251.
- Robert Koch Institut (RKI), Gesellschaft für epidemiologische Krebsregister in Deutschland (GEKI). (2015) Krebs in Deutschland 2003-2004. Häufigkeiten und Trends. 6th ed. Berlin.
- Romond EH., Perez EA et al. (2005) Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 353:1673-1684.

- Rowley JD (1973) A New Consistent Chromosomal Abnormality in Chronic Myelogenous Leukaemia identified by Quinacrine Fluorescence and Giemsa Staining. *Nature* 243:290-293.
- Rudkin GT, Stollar BD (1977) High resolution detection of DNA-RNA hybrids in situ by indirect immunofluorescence. *Nature* 265:472-473.
- Sattler HP, Rohde V et al. (1999) Comparative genomic Hybridization reveals DNA copy number gains to frequently occur in human prostate cancer. *The Prostate* 39(2):79-86.
- Sauter G, Bubendorf L et al. (1998) Zytogenetische Veränderungen des Prostatakarzinoms. *Der Pathologe* 19:63-68.
- Schlomm T (2014) Routine-Gensequenzierung beim Prostatakarzinom – Konsequenzen für die Therapie. *Spectrum Urologie* 2:10-12.
- Schmidt F, Scheble V (2009) Eine häufige Genfusion im Prostatakarzinom. *Deut Med Wochenschr* 134:1483-1486.
- Schwab K (2005) Etablierung der sequentiellen-multilokus-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung: eine Methode zur Darstellung koinzidenter Onkogen-Amplifikationen und numerischer chromosomaler Aneuploidien an Gewebeschnitten am Beispiel des Barrett Karzinoms. Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg
- Shao YH, Demissie K et al. (2009) Contemporary risk profile of prostate cancer in the United States. *J Natl Cancer Inst* 101:1280-3.
- Sheldon CA, Williams RD et al. (1980) Incidental carcinoma of the prostate: a review of the literature and critical reappraisal of classification. *J Urol* 124(5):626-631.
- Shibata A, Whittemore AS et al. (1997) Serum Levels of Prostatic-Specific Antigen Among Japanese-American and Native Japanese Men. *J Natl Cancer Inst* 89/22:1716-1720.
- Small EJ (1999) Advances in prostate cancer. *Curr Opin Oncol* 11:226-235.
- Solinas-Toldo S, Lampel S et al. (1997) Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer* 20:399-407.
- Steiner T, Junker K et al. (2002) Genetische Veränderungen an primären Prostatakarzinombiopsien in Korrelation zum klinischen Verlauf. *J Urol Urogynäkol* 2:7-11.

- Steurer S, Mayer PS et al. (2014) TMPRSS2-ERG Fusions Are Strongly Linked to Young Patient Age in Low-grade Prostate Cancer. *Eur Urol* 66(6): 978-981.
- Strohmeyer DM, Berger AP et al. (2004) Genetic Aberrations in Prostate Carcinoma Detected by Comparative Genomic Hybridization and Microsatellite Analysis: Association With Progression and Angiogenesis. *The Prostate* 59:43-58.
- Sun H, Lesche R et al. (1999) PTEN modulates cell cycle progression and cell survival by regulating phosphatidylinositol 3,4,5,-triphosphate and Akt/protein kinase B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:6199-6204.
- Suzuki H, Emi M et al. (1995) Localization of a tumor suppressor gene associated with progression of human prostate cancer within a 1.2 Mb region of 8p22-p21.3. *Genes Chromosomes Cancer* 13:168-174.
- Taylor BS, Schultz N et al. (2010) Integrative genomic profiling of human prostate cancer. *Cancer Cell* 18(1):11-22.
- Teixeira MR, Ribeiro FR (2004) Genomic analysis of prostate carcinoma specimens obtained via ultrasound-guided needle biopsy may be of use in preoperative decision-making. *Cancer*, 101: 1786–1793.
- Tomlins SA, Rhodes DR et al. (2005) Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science* 310/2005:644-648.
- Tomlins SA, Bjartell A et al. (2009) ETS gene fusions in prostate cancer: from discovery to daily clinical practice. *Eur Urol* 56(2):275-286.
- Van Beers EH, Nederlof PM (2006) Array-CGH and breast cancer. *Breast Cancer Research* 8:210
- Van Dekken H, Alers JC et al. (2003) Genetic evaluation of localized prostate cancer in a cohort of forty patients: gain of distal 8q discriminates between progressors and nonprogressors. *Lab Invest* 83(6):789.
- Visakorpi T, Kallioniemi AH et al. (1995) Genetic changes in primary and recurrent prostate cancer by comparative genomic hybridization. *Cancer Res* 55:342-347.
- Weischenfeldt J, Ronald S et al. (2013) Integrative Genomic Analyses Reveal an Androgen-Driven Somatic Alteration Landscape in Early-Onset Prostate Cancer. *Cancer Cell* 23(2):159-170.
- Wittekind C, Meyer HJ (2010) TNM: Klassifikation maligner Tumoren. Wiley-VCH Verlag. 7.Auflage
- Wolter H, Gottfried HW (2002) Genetic changes in stage pT2N0 prostate cancer studied by comparative genomic hybridization. *BJU Int.* 89(3):310-6.

Yökürk E (2003) Bedeutung der Lokalisation der Prostatistischen Intraepithelialen Neoplasie (PIN) bei transrektal-sonografisch gesteuerten Folgebiopsien der Prostata. Westfälische-Wilhelms-Universität Münster.

Zitzelsberger H, Engert D et al. (2001) Chromosomal changes during development and progression of prostate adenocarcinomas. Br J Cancer 84(2):202-208.

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Gegenüberstellung der schematischen Gleason Muster.

Abbildung 2: ERG-Protein Expression an Prostata-Biopsie Präparaten.

Abbildung 3: Ausschnitt Array.

Abbildung 4: Prinzip des Christoph Klein Protokolls.

Abbildung 5: TMPRSS-2-ERG Genfusion im Prostatakarzinom.

Abbildung 6: Übersicht der CGH-Ergebnisse am Karyogramm, Normalgewebe.

Abbildung 7: Häufigkeit der Aberrationen an Normalgewebeproben in Prozent.

Abbildung 8: Häufigkeit der Aberrationen an Tumorgewebeproben in Prozent.

Abbildung 9: Übersicht der CGH-Ergebnisse am Karyogramm, Tumorgewebe.

Abbildung 10: TMPRSS-2-ERG-positive Probe.

Abbildung 11: Aufnahme einer Genfusion.

Abbildung 12: Vergleich Metaphasen-CGH und Array-CGH.

6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Graduierung des Prostatakarzinoms anhand des Gleason Scores.

Tabelle 2: Stadieneinteilung nach TNM-System der UICC.

Tabelle 3: Übersicht Patientenkollektiv.

Tabelle 4: Klinische Parameter Patientenkollektiv.

Tabelle 5: Übersicht aller Aberrationen an Normalgewebe.

Tabelle 6: Übersicht aller Aberrationen an Tumorgewebe.

Tabelle 7: Fälle mit N1-Situation und CGH-Ergebnisse.

Tabelle 8: Fälle mit Rezidiv und CGH-Ergebnisse.

Tabelle 9: Gegenüberstellung der Aberrationen von Normal- und Tumorgewebe.

Tabelle 10: Übersicht CGH-Ergebnisse und TMPRSS-2-ERG Fusionsstatus.

Tabelle 11: Übersicht häufige Aberrationen und Genfusionsstatus.

Tabelle 12: Übersicht TMPRSS-2-ERG Fusionsstatus und klinische Parameter.

Danksagung

Ich möchte mich bei all Jenen bedanken, die mich im Laufe der langen Jahre unterstützt, motiviert und angetrieben haben, diese Arbeit anzufertigen.

Besonderer Dank geht an Frau Prof. Dr. Kerstin Junker und Herr PD Dr. Jörn Kamradt, die mir bei unerwarteten und nicht unerheblichen Problemen engagiert und selbstlos mit Rat und Tat zur Seite standen.

Danke meiner Familie. Einfach, weil es euch gibt.