

Aus dem Department Pathologie und Forensische Medizin
der Universität Tübingen
Abteilung Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. Falko Fend

***ERG* rearrangement in small cell
prostate and lung cancer**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Veit Julian Scheble

aus

Ellwangen

2010

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: PD Dr. S. Perner
2. Berichterstatter: Professor Dr. J. Bauer

meinen Eltern Quintus und Roswitha gewidmet

Inhaltsverzeichnis:

	Seite
Titelseite	1
Widmung	3
<i>ERG</i> rearrangement in small cell prostate and lung cancer	
Manuskripttitel und Autoren	6
Abstract	7
Introduction	8
Materials and Methods	9
Results	11
Discussion	12
Acknowledgements	14
References	15
Figure Legends	18
Zusammenfassung	19
Einleitung	19
Material und Methoden	20
Ergebnisse	21
Schlussfolgerung	21
Abbildung 1	25
Abbildung 2	26
Tabelle 1	27
Erklärung	28
Danksagung	29
Curriculum vitae	30

ERG rearrangement in small cell prostate and lung cancer

Histopathology, in press

Veit J. Scheble^{1*}, Martin Braun^{1*}, Theresia Wilbertz¹, Ann-Cathrin Stiedl¹, Karen Petersen¹, David Schilling², Markus Reischl⁵, Gerhard Seitz⁴, Falko Fend¹, Glen Kristiansen³, Sven Perner¹

Institute of Pathology¹, Department of Urology²; Comprehensive Cancer Center, University Hospital Tuebingen, Tuebingen, Germany

³Institute of Surgical Pathology; University Hospital Zurich, Zurich, Switzerland

⁴Department of Pathology; Klinikum of the Sozialstiftung Bamberg, Bamberg, Germany

⁵Institute for Applied Informatics, Research Center Karlsruhe

* These authors contributed equally to this work

Corresponding author:

Sven Perner, MD

Institute of Pathology

University Hospital Tuebingen

Liebermeisterstr. 8

D-72076 Tuebingen

sven.perner@medizin.uni-tuebingen.de

phone: +49 7071 29 84926

fax: +49 7071 29 2258

Running title: *ERG* rearrangement in small cell cancers

Key words: *ERG* rearrangement, prostate cancer, lung cancer, small cell cancer

Abstract:

Aims: Small cell prostate cancer is a rare but aggressive disease. Currently, its histogenetic origin is unclear and its distinction from metastatic small cell lung cancer is challenging. The aim of our study was to determine whether the *ERG* rearrangement commonly observed in acinar prostate cancer can distinguish small cell prostate cancer from small cell lung cancer samples.

Methods and Results: We assessed 15 small cell prostate cancers and 22 small cell lung cancers for *ERG* rearrangement using FISH. Commonly used and novel immunohistochemical markers (i.e. AR, CANT1, GOLPH2, PSA, PSMA, CD56, EMA, TTF1, ChromograninA, Synaptophysin and Ki-67) were further studied.

ERG rearrangement occurs in 86% small cell prostate cancers but in none of the small cell lung cancers and is the best marker to differentiate between both tumours ($p < 0.0001$).

Conclusions: The *ERG* rearrangement is commonly observed in small cell prostate cancer supporting the hypothesis that *ERG* rearrangement occurs in aggressive prostate cancers. Furthermore, the *ERG* rearrangement is the most significant marker to differentiate between small cell prostate cancer and small cell lung cancer. Moreover, our data suggest that small cell prostate cancer is not a tumour entity on its own but a dedifferentiated variant of common acinar prostate cancer.

Introduction:

Small cell cancer of the prostate is a rare entity. The most important differential diagnosis is small cell cancer of other primary sites. Within those, small cell lung cancer is the most relevant one given the identical morphology of small cell lung cancer and small cell prostate cancer.

In prostate cancer (PCa) a small cell growth pattern arises in up to 2% of all prostate neoplasias [1]. Only a few reports have been published on the molecular and immunohistochemical characterisation of SCPC [2], [3], [4], [5], [6], [7], [8] after the first description of this entity in 1977 by Wenk et al. [9]. Clinical knowledge is more or less restricted to the fact that small cell prostate cancer is an aggressive disease with poor prognosis even if detected in a localized stage. It is also known to exhibit a different response to chemotherapy compared to the conventional acinar type of PCa [1], [10]. Furthermore, this subtype shows a different behaviour in target organs during the metastasising stage and also differs in the time span until distant metastasis arises [11] [12].

In today's diagnostic settings it is a challenge to differentiate between small cell cancers deriving from the prostate and those of other origin, e.g. pulmonary. Both small cell lung cancer (SCLC) and small cell prostate cancer (SCPC) have a controversially discussed histogenetic origin. The primary origin of tumour, the prognosis and the metastatic behaviour of small cell cancers are still rudimentarily elucidated questions.

Conclusive markers – either immunohistochemical, molecular or genetic patterns – would be very helpful for this distinction. Recently, Hansel et al. performed transcriptome profiling and *TP53* sequencing of simultaneously occurring small cell and acinar PCa to determine the relationship between these subtypes [2]. The authors identified 99 genes to be greater than 10-fold differentially expressed between SCPC and acinar PCa. Through sequencing further evidence for a common clonal origin for both cancer types was determined. Recently, the *ERG* rearrangement was identified as a common recurrent chromosomal aberration in acinar PCa. Moreover, recent studies suggested that the *ERG* rearrangement is an early clonal event associated with invasion, metastatic spread, cancer aggressiveness and tumour specific death [13], [14]. This molecular alteration was described in a NCI-H660 cell line which was established from a metastatic site of an extrapulmonary small cell carcinoma arising from the prostate [15]. The objective of

our study was to examine whether the *ERG* rearrangement is a better marker compared to the commonly used and recently described novel IHC markers to distinguish between SCPC and SCLC. Additionally we aimed to use *ERG* rearrangement detection in order to improve our understanding of the histogenetic origin of SCPC.

Materials and methods:

We studied tissue samples from a cohort of 15 patients diagnosed with SCPC and from a cohort of 22 patients diagnosed with SCLC. Five out of 15 SCPC samples were detected in needle biopsies, nine were found in transurethral resections and one was found in prostatectomy material. Out of the 22 SCLC samples, each was identified in lung biopsy material. SCPC samples were taken from the Departments of Pathology of the University Hospital of Tuebingen and Zurich and the Hospital of Bamberg. All SCLC patients were diagnosed at the University Hospital of Tuebingen. The samples studied clinically excluded metastasising forms of small cell cancers of other origin. Clinical characteristics, such as outcome, prior hormonal or radiation therapy, were available for only a small subset of cases and thus not further considered.

Tissue micro array construction

Formalin-fixed paraffin-embedded SCPC and SCLC specimen were cut in 4 µm thick sections, mounted on slides and stained with hematoxylin and eosin. Subsequently, the small cell cancer region was marked by a pathologist (S.P.). Three cores, each 0.6 mm in diameter, were taken from the corresponding donor block and placed into a TMA recipient block using a semiautomatic tissue arrayer (Beecher, Sun Prairie, USA). 4 µm thick tissue sections were placed onto superfrost slides.

Due to the small sample size six SCPC and seven SCLC samples were processed independently.

***ERG* break-apart FISH assay**

A fluorescence in-situ hybridization (FISH) assay was used to detect the *ERG* rearrangement at the chromosomal level on formalin-fixed paraffin-embedded specimen. Hence, we performed a split-signal-approach, with two probes spanning the *ERG* locus as described earlier [16], [17]. In short, we used BAC clones RP11-24A11 for centromeric labelling with biotin and RP11-372O17 for telomeric labelling with digoxigenin. This FISH assay allows for *ERG* rearrangement status (i.e. rearrangement versus no rearrangement of *ERG*) assessment. The assay is also capable of differentiating between two different mechanisms of *ERG* rearrangement [17]. The evaluation of the tests was done independently by two pathologists (V.S, S.P.). At least 100 nuclei per case were evaluated.

Immunohistochemistry

Sections mounted on superfrost slides were deparaffinised. Immunohistochemistry was conducted with the Ventana Benchmark automated staining system (Ventana Medical Systems, Tucson, USA) using Ventana reagents. For immunohistochemical stainings, the following clones and primary antibodies were used: TTF1 antibody (clone 8G7G3/1, Zytomed, dilution 1:100), PSA antibody (clone 35H9, Novovastra, dilution 1:50), antibody (clone 5B10, Aknova, dilution 1:1000), androgen receptor antibody (clone MAR441, Dako, dilution 1:200), CD56 antibody (clone 123C3, Dako, dilution 1:50), CANT1 antibody (clone 2D3, Abnova Corporation, dilution 1:300), PSMA antibody (clone 3E6, Dako, dilution 1:100) and EMA antibody (clone E29, Dako, dilution 1:200). Dilution was performed using a Ventana diluent. For androgen receptor immunohistochemistry proteolytic induced epitope retrieval (PIER) method was used. Heat induced epitope retrieval (HIER) was performed for all other immunohistochemical stainings. Primary antibody detection was performed using the iView™ DAB detection kit (Ventana, Tucson, USA). Slides were washed in phosphate-buffered saline and H₂O. Slides were counterstained with hematoxylin afterwards.

Statistics:

In order to assess whether the *ERG* rearrangement status and IHC expression is significantly different in SCPC and SCLC we performed the Chi-square test.

Results:

14/15 SCPC samples were assessable for *ERG* rearrangement status. 12 samples (86%) showed an *ERG* rearrangement (8 cases were positive for a rearrangement through insertion, 4 cases were positive for a rearrangement through deletion) (**Fig.1**). 3 cases (25%) showed multiple FISH signals of the *ERG* locus indicating polyploidy. All 22 SCLC samples were negative for *ERG* rearrangement (**Fig.2**). As TTF1 is a not fully understood marker for the diagnosis of SCPC [3] but is commonly used for diagnosing SCLC [18], [19], TTF1 staining was performed for both SCPC and SCLC samples (Fig.1&2). TTF1 (Thyroid Transcription Factor 1) was expressed in 13 out of 22 SCLC samples (59%) whereas only one of the SCPC samples demonstrated an intermediate TTF1 expression (7%). Since GOLPH2-staining (Golgi Phosphoprotein 2) showed positive expression for 13/14 SCPC samples, we sought to interrogate GOLPH2 as a differentiating marker. However, 16/22 (73%) SCLC samples were also positive for GOLPH2 (Table 1).

A positive IHC marker panel for the diagnosis of PCa revealed expression of PSA (Prostate Specific Antigen) in 6/15 (40%), AR (Androgen Receptor) in 7/15 (47%), PSMA (Prostate Specific Membrane Antigen) and CANT1 (Calcium Activated Nucleotidase 1) in 4/15 each (27%) of the SCPC samples. In contrast, none of the SCLC samples expressed PSA, AR, PSMA or CANT1.

A selection of commonly used positive IHC markers for the diagnosis of SCLC showed expression of CD56 in 18/22 (82%) and EMA (Epithelial Membrane Antigen) in 14/22 (64%) of the SCLC samples. Each of these markers was positive in 3/10 SCPC cases (30%).

Additionally we assessed both SCLC and SCPC for the neuroendocrine markers Synaptophysin and Chromogranin A, as well as the proliferation marker Ki-67. Synaptophysin was expressed in 14/15 (93%) SCLC and 5/10 SCPC (50%) and Chromogranin A showed expression in 3/15 SCLC (20%) and 3/10 SCPC (30%). Ki-67 expression was graded in low (<10% positive nuclei), intermediate (10-50%

positive nuclei) and high level (>50% positive nuclei). According to this classification, SCLC showed low proliferation in 5/15 (33%), intermediate proliferation in 2/15 (13%) and high proliferation in 8/15 (53%). SCPC displayed low proliferation in 2/10 (20%), intermediate proliferation in 4/10 (40%) and high proliferation in 4/10 (40%). **Table 1** summarises the results and illustrates which markers are significantly different in SCPC and SCLC.

Within our observations *ERG* rearrangement is highly sensitive and specific for SCPC whereas TTF1 expression is a specific but moderately sensitive marker for SCLC. PSA and PSMA lack sensitivity, EMA and CD56 showed less specificity compared to the *ERG* rearrangement status and TTF1 expression.

Discussion:

The *ERG* gene rearrangement was recently discovered in prostate cancer and can be found in approximately 50% of prostate cancers [20], [21], [22], [23], [24], [17], [25], [26], [27], [28], [29]. Given all pitfalls and difficulties in diagnosis and classification of small cell prostate cancer there is limited data on the molecular pathology of small cell cancers. Recently Han et al. examined histologic variants of PCa for *TMPRSS2* and *ETS* rearrangements. Within this assessment 5 out of 7 cases were harbouring *ERG* rearrangements in SCPC, all of which deriving from a rearrangement through interstitial deletion [30]. We performed an *ERG* break-apart FISH assay and IHC staining to interrogate whether the *ERG* rearrangement or an immunohistochemical panel is powerful in discrimination between SCPC and SCLC. In our study 12 of the 14 SCPC samples assessed were positive for *ERG* rearrangement (Fig.1). In agreement with Han et al. [30] we found that in SCPC the *ERG* rearrangement occurs more frequently than described for acinar PCa. This is of further interest regarding the ongoing debate whether prostate cancer with gene rearrangement is associated with poor prognosis [13]. Considering the association of rapid progression and bad outcome with SCPC and its high frequency of *ERG* rearrangement, this supports the hypothesis that there is a strong relationship between PCa harbouring *ERG* rearrangement and a worse clinical outcome.

Attard et al. discovered that the PCa with *ERG* rearrangement via interstitial deletion is an aggressive subtype of this disease [31]. This group also reported a copy number gain of *ERG* being associated with a more aggressive behaviour of the

tumour. Although we could confirm the existence of this alteration in SCPC we would have expected a high frequency of cases with a copy number gain of *ERG* since SCPC is an aggressive variant of PCa. *ERG* copy number gain probably does not play a major role in the pathogenesis of SCPC.

It is still poorly understood and controversially discussed if SCPC is an independent tumour entity or just the phenotype of a dedifferentiated acinar PCa [2], [3], [4], [5], [6], [7], [8]. The *ERG* rearrangement has not been observed in any cancer of epithelial origin but PCa (unpublished data). The high frequency of this alteration in SCPC would support the hypothesis that SCPC develops during the course of progression of conventional acinar PCa and thus can be seen as a dedifferentiated phenotype. As a terminal aggressive state of disease, SCPC and its precursor – acinar PCa – share one cell of origin but SCPC is not derived from a neuroendocrine cell. This relation is further illustrated by **Figure 1**. In **Figure 1** a TUR-P prostate cancer sample harbours both acinar PCa and SCPC, probably one transitioning into the other, with both phenotypes being *ERG* rearranged. The overall high *ERG* rearrangement frequency in this terminal status of disease reflects an association between *ERG* rearrangement and adverse clinical course.

Based on these findings, the common usage of “small cell cancer” and “poorly differentiated neuroendocrine carcinoma” as synonymous nomenclature should be reassessed. Wang and Epstein in 2008 [3] reported that up to 100% of acinar PCa express a “neuroendocrine” pattern. In our study we found that Synaptophysin and Chromogranin A are expressed in 5/10 and 3/10 SCPC samples respectively. In this context we suggest that SCPC should not be classified as a “neuroendocrine” entity related to SCLC. In fact it is more reasonable to adapt nomenclature to pathogenesis and hence to assign SCPC to PCa but not to tumours of the neuroendocrine system.

A further aspect of our study was to investigate the potential of *ERG* rearrangement status assessment in the differential diagnosis of metastasised small cell cancers. Until now, there is no available marker combination for a clear distinction of SCPC and SCLC. Suggested marker panels for SCLC include CD56, EMA and TTF1 with positivity in 85% up to 96% of cases. For SCPC the most significant markers to be used are TTF1 and PSA with positivity in 53% and 17% of cases respectively. In

addition, we assessed GOLPH2 and CANT1, two recently identified markers for prostate cancer [32], [33], [34], [35], as well as AR and PSMA [36].

We found relevant distinctive expression patterns for SCPC and SCLC for PSA, AR, PSMA, CANT1, CD56 and EMA, all of them of minor significance due to a lack of sensitivity. As GOLPH2 was expressed in 13/14 (93%) of SCPC and 16/22 (73%) of SCLC it is not helpful to delineate both. TTF1 showed expression in 1/15 (7%) of SCPC samples and 13/22 (59%) of SCLC samples. Unlike our observations, Wang and Epstein discouraged the use of TTF1 for distinction between SCPC and SCLC as they observed TTF1 expression in 23/44 of the SCPC cases [3]. Earlier studies reported positive expression of TTF1 in 15/18 cases [4], 4/4 cases [18] but also 0/3 cases [19], [3]. The controversial results of the different studies may most probably be due to the small number of cases in all cohorts assessed. Further studies investigating larger numbers of cases are needed to elucidate this issue.

Hence our IHC studies revealed that SCPC shows a greater similarity in expression pattern to acinar PCa than to SCLC. Interestingly enough, the *ERG* rearrangement is the best marker to differentiate between the two entities.

In summary, this is the largest SCPC cohort interrogated for *ERG* rearrangement. The high frequency of *ERG* rearrangement in the clinically aggressive SCPC samples provides further evidence that this gene alteration is related to an adverse clinical course. Furthermore, we provide additional evidence that SCPC is a dedifferentiated form of acinar PCa and not a histogenetic entity of neuroendocrine origin.

Our findings underline the clinical relevance of *ERG* rearrangement assessment to distinguish between SCPC and SCLC in the setting of metastases of unknown primaries. Within these cases an early localisation of the primary lesion might help to ameliorate the prognosis of these aggressive diseases.

Acknowledgements:

This work was supported by a grant of the German Research Foundation (Deutsche Forschungsgemeinschaft, DFG, *Emmy-Noether* Programme, PE1179/2-1) and the University Hospital of Tuebingen (*Fortuene* Programme, No. 1809-1-0) to S.P.

We are grateful to Roopika Menon for editorial assistance.

References:

1. Stein, M.E., et al., *Small cell (neuroendocrine) carcinoma of the prostate: etiology, diagnosis, prognosis, and therapeutic implications--a retrospective study of 30 patients from the rare cancer network*. Am J Med Sci, 2008. **336**(6): p. 478-88.
2. Hansel, D.E., et al., *Shared TP53 gene mutation in morphologically and phenotypically distinct concurrent primary small cell neuroendocrine carcinoma and adenocarcinoma of the prostate*. Prostate, 2009. **69**(6): p. 603-9.
3. Wang, W. and J.I. Epstein, *Small cell carcinoma of the prostate. A morphologic and immunohistochemical study of 95 cases*. Am J Surg Pathol, 2008. **32**(1): p. 65-71.
4. Yao, J.L., et al., *Small cell carcinoma of the prostate: an immunohistochemical study*. Am J Surg Pathol, 2006. **30**(6): p. 705-12.
5. Hagood, P.G., et al., *Small cell carcinoma of the prostate*. Cancer, 1991. **67**(4): p. 1046-50.
6. Christopher, M.E., et al., *Small cell carcinoma of the genitourinary tract: an immunohistochemical, electron microscopic and clinicopathological study*. J Urol, 1991. **146**(2): p. 382-8.
7. Oesterling, J.E., C.G. Hauzeur, and G.M. Farrow, *Small cell anaplastic carcinoma of the prostate: a clinical, pathological and immunohistological study of 27 patients*. J Urol, 1992. **147**(3 Pt 2): p. 804-7.
8. Schron, D.S., T. Gipson, and G. Mendelsohn, *The histogenesis of small cell carcinoma of the prostate. An immunohistochemical study*. Cancer, 1984. **53**(11): p. 2478-80.
9. Wenk, R.E., et al., *Ectopic ACTH, prostatic oat cell carcinoma, and marked hypernatremia*. Cancer, 1977. **40**(2): p. 773-8.
10. Spiess, P.E., et al., *Treatment outcomes of small cell carcinoma of the prostate: a single-center study*. Cancer, 2007. **110**(8): p. 1729-37.
11. Yildirim, Y., et al., *Prostate small cell carcinoma and skin metastases: a rare entity*. Med Princ Pract, 2008. **17**(3): p. 250-2.
12. Xiao, W.L., et al., *Submandibular area metastasis from prostate small cell carcinoma with neuroendocrine differentiation*. J Craniofac Surg, 2007. **18**(5): p. 1155-7.
13. Tomlins, S.A., et al., *ETS Gene Fusions in Prostate Cancer: From Discovery to Daily Clinical Practice*. Eur Urol, 2009.
14. Schmidt, F., et al., *[Frequent gene fusion in prostate cancer: clinical applications in diagnosis, prognosis and therapy]*. Dtsch Med Wochenschr, 2009. **134**(28-29): p. 1483-6.
15. Mertz, K.D., et al., *Molecular characterization of TMPRSS2-ERG gene fusion in the NCI-H660 prostate cancer cell line: a new perspective for an old model*. Neoplasia, 2007. **9**(3): p. 200-6.

16. Tomlins, S.A., et al., *Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer*. Science, 2005. **310**(5748): p. 644-8.
17. Perner, S., et al., *TMPRSS2:ERG Fusion-Associated Deletions Provide Insight into the Heterogeneity of Prostate Cancer*. Cancer Res, 2006. **66**(17): p. 8337-41.
18. Agoff, S.N., et al., *Thyroid transcription factor-1 is expressed in extrapulmonary small cell carcinomas but not in other extrapulmonary neuroendocrine tumors*. Mod Pathol, 2000. **13**(3): p. 238-42.
19. Ordonez, N.G., *Value of thyroid transcription factor-1 immunostaining in distinguishing small cell lung carcinomas from other small cell carcinomas*. Am J Surg Pathol, 2000. **24**(9): p. 1217-23.
20. Iljin, K., et al., *TMPRSS2 Fusions with Oncogenic ETS Factors in Prostate Cancer Involve Unbalanced Genomic Rearrangements and Are Associated with HDAC1 and Epigenetic Reprogramming*. Cancer Res, 2006. **66**(21): p. 10242-6.
21. Mehra, R., et al., *Comprehensive assessment of TMPRSS2 and ETS family gene aberrations in clinically localized prostate cancer*. Mod Pathol, 2007. **20**(5): p. 538-44.
22. Cerveira, N., et al., *TMPRSS2-ERG gene fusion causing ERG overexpression precedes chromosome copy number changes in prostate carcinomas and paired HGPIN lesions*. Neoplasia, 2006. **8**(10): p. 826-32.
23. Clark, J., et al., *Genome-wide screening for complete genetic loss in prostate cancer by comparative hybridization onto cDNA microarrays*. Oncogene, 2003. **22**(8): p. 1247-52.
24. Nam, R.K., et al., *Expression of the TMPRSS2:ERG fusion gene predicts cancer recurrence after surgery for localised prostate cancer*. Br J Cancer, 2007. **97**(12): p. 1690-5.
25. Perner, S., et al., *TMPRSS2-ERG fusion prostate cancer: an early molecular event associated with invasion*. Am J Surg Pathol, 2007. **31**(6): p. 882-8.
26. Soller, M.J., et al., *Confirmation of the high frequency of the TMPRSS2/ERG fusion gene in prostate cancer*. Genes Chromosomes Cancer, 2006. **45**(7): p. 717-9.
27. Wang, J., et al., *Expression of Variant TMPRSS2/ERG Fusion Messenger RNAs Is Associated with Aggressive Prostate Cancer*. Cancer Res, 2006. **66**(17): p. 8347-51.
28. Yoshimoto, M., et al., *Three-Color FISH Analysis of TMPRSS2/ERG Fusions in Prostate Cancer Indicates That Genomic Microdeletion of Chromosome 21 Is Associated with Rearrangement*. Neoplasia, 2006. **8**(6): p. 465-9.
29. Mosquera, J.M., et al., *Prevalence of TMPRSS2-ERG fusion prostate cancer among men undergoing prostate biopsy in the United States*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(14): p. 4706-11.

30. Han, B., et al., *Characterization of ETS gene aberrations in select histologic variants of prostate carcinoma*. Mod Pathol, 2009.
31. Attard, G., et al., *Duplication of the fusion of TMPRSS2 to ERG sequences identifies fatal human prostate cancer*. Oncogene, 2008. **27**(3): p. 253-63.
32. Laxman, B., et al., *A first-generation multiplex biomarker analysis of urine for the early detection of prostate cancer*. Cancer Res, 2008. **68**(3): p. 645-9.
33. Kristiansen, G., et al., *Expression profiling of microdissected matched prostate cancer samples reveals CD166/MEMD and CD24 as new prognostic markers for patient survival*. J Pathol, 2005. **205**(3): p. 359-76.
34. Kristiansen, G., et al., *GOLPH2 protein expression as a novel tissue biomarker for prostate cancer: implications for tissue-based diagnostics*. Br J Cancer, 2008. **99**(6): p. 939-48.
35. Hermans, K.G., et al., *Two unique novel prostate-specific and androgen-regulated fusion partners of ETV4 in prostate cancer*. Cancer Res, 2008. **68**(9): p. 3094-8.
36. Perner, S., et al., *Prostate-specific membrane antigen expression as a predictor of prostate cancer progression*. Hum Pathol, 2007. **38**(5): p. 696-701.

Figure 1: Small Cell Prostate Cancer (SCPC)

a) TUR-P prostate cancer sample at low power magnification harbouring acinar PCa (lower region) transitioning into SCPC (upper region), H&E staining **b)** SCPC region in a) at 20x objective magnification, H&E staining **c)** FISH image for *ERG* rearrangement from SCPC region harbouring *ERG* rearrangement **d)** TTF1 immunohistochemistry of SCPC region at 20x objective magnification, showing no TTF1 expression **e)** Acinar PCa region in a) at 10x objective magnification, H&E staining **f)** FISH image for *ERG* rearrangement from acinar PCa region harbouring *ERG* rearrangement **g)** TTF1 immunohistochemistry of acinar PCa region at 10x objective magnification showing no TTF1 expression.

Figure 2: Small Cell Lung Cancer (SCLC):

a) SCLC at low power magnification, H&E staining. **b)** SCLC region in a) at 20x objective magnification, H&E staining. In lower right corner bronchus epithelium is visible **c)** FISH image for *ERG* rearrangement from SCLC region harbouring no *ERG* rearrangement **d)** TTF1 immunohistochemistry of SCLC region at 20x objective magnification showing a strong expression of TTF1.

Zusammenfassung:

Einleitung:

Kleinzellige Karzinome der Prostata sind, insbesondere gemessen am hohen Vorkommen von azinären Adenokarzinomen der Prostata, eine sehr seltene Erkrankung. Wichtigste Differentialdiagnose des kleinzelligen Prostatakarzinoms sind kleinzellige Karzinome anderer Herkunft, dabei spielt das kleinzellige Lungenkarzinom als häufigste Entität die wichtigste Rolle.

Kleinzellige Prostatakarzinome zeichnen sich durch aggressives Wachstum, frühe Metastasierung und dementsprechend eine schlechte Prognose aus. Bis heute wurden nur sehr wenige Arbeiten zur molekularen und immunhistochemischen Charakterisierung dieser Neoplasie veröffentlicht [1], [2], [3], [4], [5], [6], [7], [8], [9].

In diagnostischer Hinsicht ist insbesondere die Unterscheidung zwischen kleinzelligen Prostatakarzinomen (small cell prostate cancer, SCPC) und kleinzelligen Lungenkarzinomen (small cell lung cancer, SCLC) von Bedeutung. Entstehung, Prognose und metastatisches Verhalten dieser beiden Tumore sind noch immer unvollständig erforscht, doch es existieren unterschiedliche Therapieansätze für beide Krankheiten [10], [11], [12].

Eine Definition zuverlässiger Marker zur Unterscheidung von SCPC und SCLC ist ein wegweisender Schritt zur sichereren Diagnostik und gezielteren Therapie. Dafür kommen sowohl immunhistochemische, als auch molekulare und genetische Marker in Frage.

Hauptaugenmerk legen wir auf das *ERG* Gen-rearrangement, eine Veränderung, die kürzlich in azinären Prostatakarzinomen beschrieben wurde und dabei eine Häufigkeit von 42-70 % zeigt. Hierbei kommt es zur Fusion eines Wachstumsfaktors und eines androgenregulierten Promotors. Bis heute konnte diese Alteration ausschließlich im Prostatakarzinom nachgewiesen werden und gilt somit als organ- und karzinomspezifische Veränderung [13], [14].

Ziel unserer Studie ist es, zu untersuchen, ob das *ERG* rearrangement ein besserer Marker zur Unterscheidung zwischen SCPC und SCLC ist, als herkömmliche und aktuell beschriebene immunhistochemische (IHC) Marker.

Die hier vorgelegte Studie befindet sich derzeit bei der Fachzeitschrift *Histopathology* im Druck.

Bei der Durchführung der Studie halfen mir die auf Seite 6 aufgezählten Personen. Martin Braun ist Medizinstudent und Doktorand in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Perner. Er soll selbständig eine auf dieser Arbeit aufbauende Studie durchführen und war bei dieser Studie durchweg mitbeteiligt, um in die Laborabläufe und in wissenschaftliches Arbeiten eingelernt zu werden. Theresia Wilbertz und Ann-Cathrin Stiedl sind ebenfalls Medizinstudentinnen und Doktorandinnen im Labor von PD Dr. Perner. Sie arbeiteten parallel im selben Labor an einer anderen Studie und halfen mit, die FISH-Durchführung zu optimieren und geeignete Labormaterialien zu identifizieren und zusammenzutragen. Karen Petersen arbeitet als MTA und stand mit ihren weitreichenden Erfahrungen mit der FISH-Technik zur Seite. Dr. David Schilling ist Oberarzt in der Urologie am UKT und half bei der Auswahl der Fälle sowie bei der Konzeption der Studie. Dr. Markus Reischl arbeitet am Institut für Angewandte Informatik am Forschungszentrum Karlsruhe und half bei der Berechnung der Signifikanzwerte für die untersuchten immunhistochemischen Marker. Prof. Dr. Gerhard Seitz und Prof. Dr. Glen Kristiansen unterstützten mich durch Zusendung von Untersuchungsmaterial dieser seltenen Fälle und bei der Auswahl der untersuchten immunhistochemischen Marker. Prof. Dr. Falko Fend gab wertvolle Hinweise zur Anfertigung des Manuskripts, insbesondere nach ersten Überarbeitungsvorschlägen durch die Fachzeitschrift Histopathology. PD Dr. Sven Perner als mein Doktorvater war ständiger Betreuer und Ideengeber des Projekts.

Material und Methoden:

Wir untersuchten eine Kohorte von 15 SCPC und 22 SCLC auf ihren *ERG* rearrangement Status mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) und auf ihr Expressionsprofil für gängige und neu beschriebene IHC Marker. En detail wählten wir die Prostatakarzinommarker Androgenrezeptor (AR), Calcium Activated Nucleotidase 1 (CANT1), Golgi Phosphoprotein 2 (GOLPH2), Prostata Spezifisches Antigen (PSA), Prostate Specific Membrane Antigen (PSMA), die Lungenkarzinommarker CD56, Epithelial Membrane Antigen (EMA), Thyroid Transcription Factor 1 (TTF1), und die neuroendokrinen Marker Chromogranin A und Synaptophysin sowie den Proliferationsmarker Ki-67.

Ergebnisse:

Wir konnten das *ERG* rearrangement in 86% der SCPC Fälle nachweisen, während es in keinem einzigen SCLC Fall vorkam (s. **Abb. 1&2**). Die prostatagerichteten Marker AR, CANT1, PSA und PSMA waren in einigen SCPC Fällen positiv, jedoch in allen SCLC Proben negativ, während GOLPH2 eine positive Expression in der Mehrheit beider Entitäten zeigte und keinerlei diskriminierende Funktion hat. CD56, EMA und TTF1 zeigten in den meisten SCPC Fällen ein negatives Reaktionsmuster und wurden von den meisten SCLC Fällen exprimiert, die neuroendokrinen Marker Synaptophysin und Chromogranin A zeigten keinen signifikanten Unterschied in ihrer Reaktion gegen SCPC und SCLC (s. **Tabelle 1**).

Schlussfolgerung:

Das *ERG* rearrangement wurde erst kürzlich erstmals im Prostatakarzinom beschrieben und kann dort in ungefähr 50% der Fälle beobachtet werden [20], [21], [22], [23], [24], [17], [25], [26], [27], [28], [29]. Angesichts aller Schwierigkeiten, die kleinzellige Prostatakarzinome im Hinblick auf Diagnostik und Klassifizierung bieten, überrascht es wenig, dass nur wenige Daten über die Molekularpathologie dieser Erkrankung vorliegen. Vor kurzem publizierten Han et al. eine Arbeit, in der sie verschiedene histologische Varianten des Prostatakarzinoms auf das Vorliegen eines *ERG* rearrangements untersuchten. In dieser Studie zeigten fünf von sieben untersuchten SCPC ein *ERG* rearrangement, alle waren durch eine interstitielle Deletion verursacht [30].

Wir untersuchten mittels eines FISH assays und immunhistochemischer Verfahren, ob das *ERG* rearrangement oder ein immunhistochemisches Markerpanel eine sichere Unterscheidung zwischen SCPC und SCLC ermöglicht. In unserer Studie zeigten 13 von 14 auswertbaren SCPC Proben ein *ERG* rearrangement (s. **Abb. 1**). Davon wiesen fünf eine interstitielle Deletion auf und acht ein *ERG* rearrangement, das durch eine Deletion verursacht wurde. In Übereinstimmung mit Han et al. [30] wiesen auch wir eine wesentlich größere Häufigkeit des *ERG* rearrangements in SCPC nach, als es den Literaturangaben über das gewöhnliche azinäres Prostatakarzinom entspricht. Diese Beobachtung ist vor allem dahingehend interessant, der Zusammenhang zwischen *ERG* rearrangement und infauster Prognose bis heute kontrovers diskutiert wird [13]. In Anbetracht einer Assoziation

von schneller Tumorprogression und infauster Prognose beim SCPC einerseits und andererseits der Akkumulation von Tumoren mit *ERG* rearrangement schließen wir uns der These an, dass es eine Abhängigkeit zwischen PCa mit *ERG* rearrangement und einem ungünstigen Verlauf der Krankheit gibt.

Attard et al. beschrieben erstmals, dass es sich beim PCa mit *ERG* rearrangement via interstitielle Deletion um einen aggressiven Subtypen des PCa handelt [31]. Aus dieser Arbeitsgruppe stammt auch die Beobachtung, dass eine Amplifikation von *ERG* mit einem aggressiveren Tumorwachstum vergesellschaftet ist. Obzwar wir die Existenz dieser *ERG* Amplifikation in einem von 14 SCPC Fällen bestätigen konnten, hätten wir ein häufigeres Auftreten erwartet, davon ausgehend, dass das SCPC eine aggressive Wachstumsvariante des konventionellen PCa ist. Daher halten wir fest, dass eine *ERG* Amplifikation mutmaßlich keine zentrale Rolle in der Pathogenese kleinzelliger Prostatakarzinome spielt.

Über die korrekte Einordnung des SCPC als eigenständige Tumorentität oder als dedifferenzierten Phänotyp des azinären PCa wird noch immer lebhaft diskutiert [2], [3], [4], [5], [6], [7], [8]. Das *ERG* rearrangement konnte bis dato in keinem weiteren epithelialen Tumor nachgewiesen werden (Scheble et al.. Manuskript eingereicht). Die hohe Prävalenz des *ERG* rearrangements im SCPC spricht daher für die These, dass sich das SCPC im Verlauf eines azinären PCa entwickelt und als dedifferenzierte Wuchsform gelten kann. Somit entstehen das SCPC als Endstadium einer Krankheit und seine Vorläuferläsion – das azinäre PCa – aus ein und derselben Ursprungszelle. Die Zuordnung zu neuroendokrinen Zellen ist damit nicht weiter haltbar – auch angesichts der von Wang und Epstein berichteten hochfrequenten Expression eines so genannten "neuroendokrinen" Profils in azinären Prostatakarzinomen [3]. So genannte "neuroendokrine" Profile eignen sich nicht zur Abgrenzung von PCa gleich welcher Wuchsform vom neuroendokrinen System. Daher halten wir die Bezeichnung "neuroendokrin" im Zusammenhang mit PCa für obsolet.

Als einen weiteren Aspekt der Studie untersuchten wir, ob die Bestimmung des *ERG* rearrangement Status' bei der Differentialdiagnose metastasierter kleinzelliger Karzinome hilfreich sein kann. Eine "Immunoquery"-Recherche (<https://immunoquery.pathiq.com>), eine der unter Pathologen gebräuchlichsten

Online-Plattform zur Identifizierung differentialdiagnostisch tauglicher immunhistochemischer Marker, ergab für die Unterscheidung von SCPC und SCLC keine Marker. Eine Positivliste für SCLC beinhaltet CD56, EMA und TTF mit positiver Reaktion in 85% bis 96% der Fälle. Die am besten geeigneten Marker für SCPC sind demnach TTF1 und PSA mit positiver Reaktion in 53% bzw. 17%. Zusätzlich untersuchten wir mit GOLPH2 und CANT1 zwei erst kürzlich beschriebene Prostatakarzinommarker [32], [33], [34], [35] sowie den Androgenrezeptor und PSMA [36].

Bei den untersuchten SCPC konnten wir eine PSA Expression in 6/15 (40%) AR in 7/15 (47%), PSMA und CANT1 in 4/15 (27%) der Fälle nachweisen. Dagegen zeigte sich eine Expression von CD56 in 18/22 (82%) und von EMA in 14/22 (64%) der SCLC Proben. Da GOLPH2 in 13/14 (93%) der SCPC und 16/22 (73%) der SCLC Proben exprimiert wurde, bietet es keine Möglichkeit, die beiden Entitäten zu unterscheiden. TTF1 wurde in 1/15 (7%) SCPC und 13/22 (59%) SCLC Proben exprimiert.

Entgegen unseren Beobachtungen raten Wang und Epstein von der Verwendung von TTF1 als Differenzierungsmarker ab, da sie eine Expression dieses Markers in 23/44 Fällen zeigten [3]. Frühere Studien ergaben eine TTF1-Expression in 15/18 Fällen [4], 4/4 Fällen [18] aber auch 0/3 Fällen [19], [3]. Hier sollten weitere Studien für Aufklärung der gegensätzlichen Ergebnisse sorgen.

In der Synopsis ergeben unsere Untersuchungen, dass das SCPC in seinem Expressionsprofil eine weitaus größere Ähnlichkeit mit dem herkömmlichen azinären PCa hat als mit dem SCLC. Interessant ist hier, dass das *ERG* rearrangement in 12/14 SCPC Fällen, jedoch in keinem der 22 SCLC Fälle nachgewiesen werden konnte und so den besten Marker zur Differenzierung zwischen den beiden kleinzelligen Karzinomwuchsformen darstellt.

Zusammenfassend haben wir die bis dato größte SCPC Kohorte auf den *ERG* rearrangement Status hin untersucht. Die hohe Prävalenz des *ERG* rearrangement in den prognostisch infausten SCPC Fällen weist darauf hin, dass diese genetische Alteration mit einer aggressiven klinischen Verlauf assoziiert ist. Weiterhin beweisen wir, dass das SCPC eine dedifferenzierte Wuchsform des azinären PCa ist und keinerlei Verbindung zu einer neuroendokrinen Ursprungszelle hat.

Unsere Beobachtungen unterstreichen die klinische Relevanz des *ERG* rearrangements für die Differenzierung zwischen SCPC und SCLC, insbesondere beim Nachweis von Metastasen mit unbekannter Primärläsion. Gerade bei diesen Fällen kann eine rechtzeitige Lokalisierung des Primärherdes die katastrophale Prognose der Patienten erheblich verbessern.

Figure 1

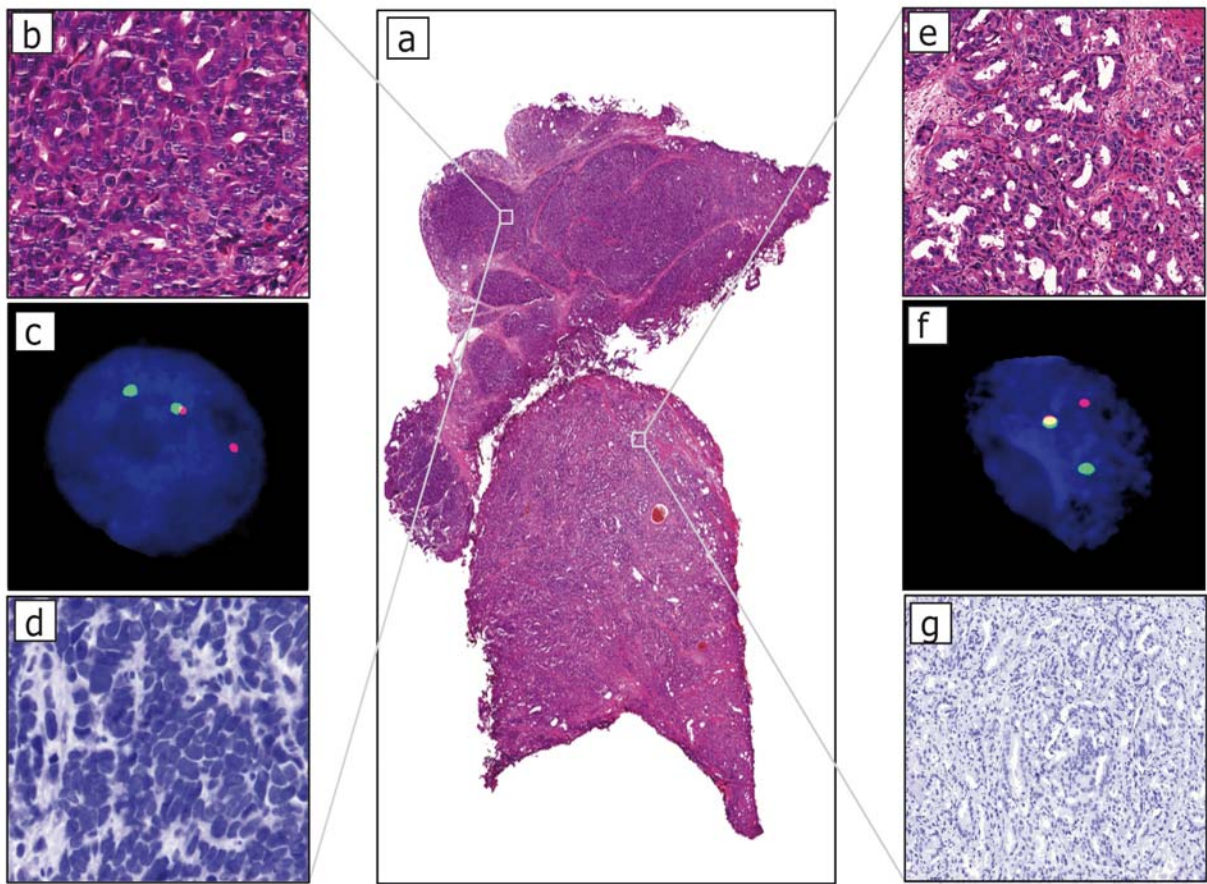


Abbildung 1

Figure 2

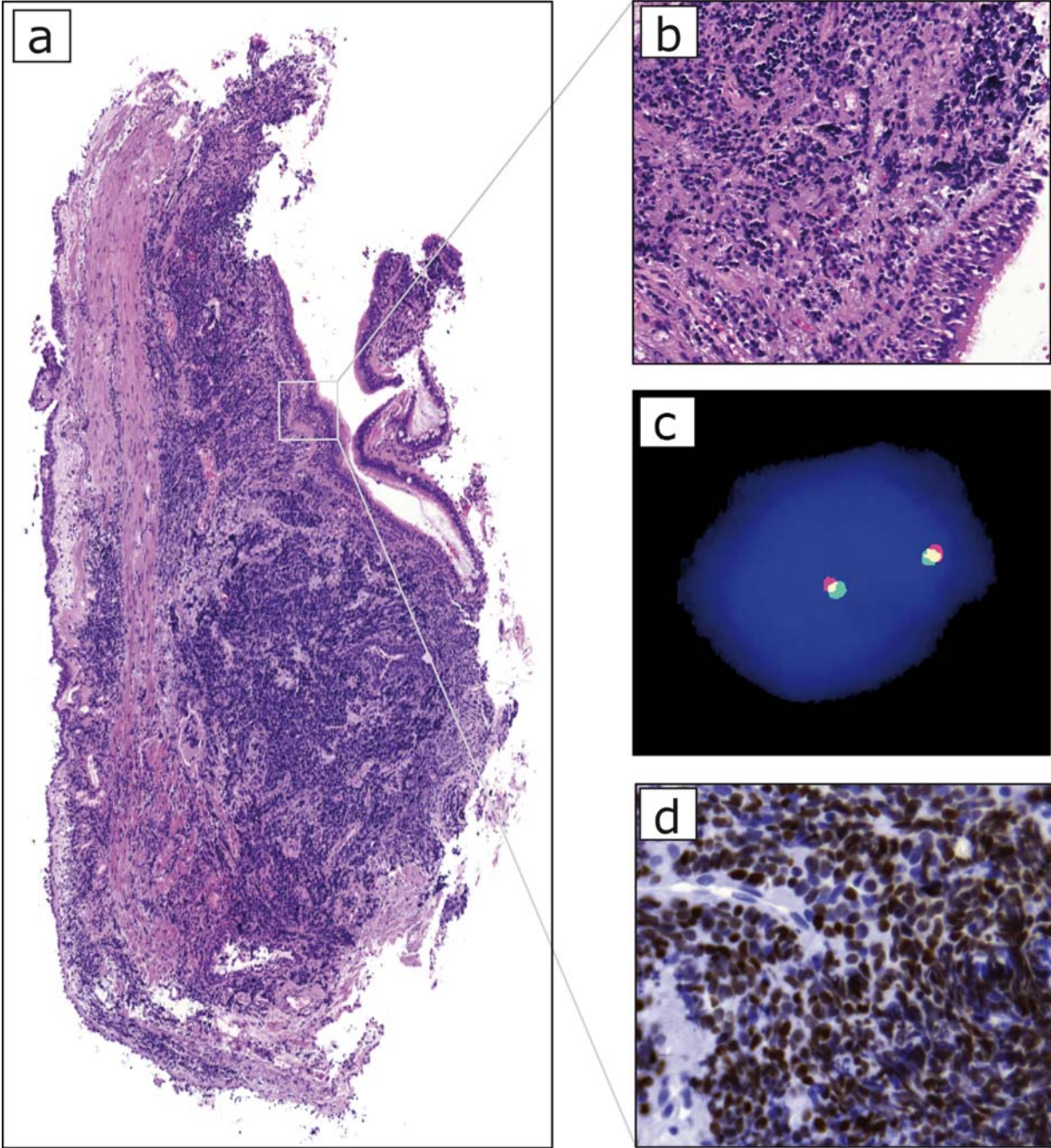


Abbildung 2

Table 1

	small cell prostate cancer	small cell lung cancer	p-value
	positive		
<i>ERG</i> rearrangement	12/14 (86%)	0/22 (0%)	<0.0001
AR	7/15 (47%)	0/22 (0%)	0.0004
CANT1	4/15 (27%)	0/22 (0%)	0.0103
CD56	3/10 (30%)	18/22 (82%)	0.0042
Chromogranine A	3/10 (30%)	3/22 (14%)	0.2717
EMA	3/10 (30%)	14/22 (64%)	0.0772
GOLPH2	13/14 (93%)	16/22 (73%)	0.1369
PSA	6/15 (40%)	0/22 (0%)	0.0012
PSMA	4/15 (27%)	0/15 (0%)	0.0317
Synaptophysine	5/10 (50%)	14/15 (93%)	0.0129
TTF 1	1/14 (7%)	13/22 (59%)	0.0018
Ki-67 <10 %	2 (20%)	5 (33%)	0.3041
10-50 %	4 (40%)	2 (13%)	
>50%	4 (40%)	8 (54%)	

TTF1: Thyroid Transcription Factor 1

GOLPH2: Golgi Phosphoprotein 2

PSA: Prostate Specific Antigen

AR: Androgen Receptor

PSMA: Prostate Specific Membrane Antigen

CANT1: Calcium Activated Nucleotidase 1

EMA: Epithelial Membrane Antigen

p-values indicate the significance level of each marker to differentiate between the two tumour types

Due to the small amount of material available in some cases we could not perform each study on each sample.

Tabelle 1

Ich erkläre hiermit, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen zur Promotion eingereichte Arbeit mit dem Titel:

ERG rearrangement in small cell prostate and lung cancer

selbständig ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Ich versichere an Eides statt, dass diese Angaben wahr sind und dass ich nichts verschwiegen habe. Mir ist bekannt, dass die falsche Abgabe einer Versicherung an Eides statt mit einer Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit einer Geldstrafe bestraft wird.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

1. Martin Braun¹
2. Theresia Wilbertz¹
3. Ann-Cathrin Stiedl¹
4. Karen Petersen¹
5. David Schilling²
6. Markus Reischl⁵
7. Gerhard Seitz⁴
8. Falko Fend¹
9. Glen Kristiansen³
10. Sven Perner¹

¹Institut für Pathologie, ²Klinik für Urologie; Comprehensive Cancer Center, Universitätsklinikum Tübingen

³Institut für Klinische Pathologie, Universitätsspital Zürich, Zürich, Schweiz

⁴Institut für Pathologie; Klinikum der Sozialstiftung Bamberg, Bamberg

⁵Institut für Angewandte Informatik; Forschungszentrum Karlsruhe

Danksagung:

Mein besonderer Dank gilt meinem wissenschaftlichen Zieh- und Doktorvater PD Dr. Sven Perner, der mir neben einer Stelle als Assistenzarzt am Institut für Pathologie des UKT einen umfassenden Einblick und hervorragende Startbedingungen in das wissenschaftliche Arbeiten ermöglicht hat. Weiterhin möchte ich den Co-Autoren des veröffentlichten Manuskriptes Martin Braun, Theresia Wilbertz, Ann-Cathrin Stiedl, Karen Petersen, Dr. David Schilling, Dr. Markus Reischl, Prof. Dr. Gerhard Seitz, Prof. Dr. Falko Fend, Prof. Dr. Glen Kristiansen für Ihre tatkräftige Unterstützung danken.

Danken möchte ich Herrn Prof. Dr. Falko Fend dafür, dass er mir eine Stelle als Assistenzarzt angeboten und ein fruchtbares Umfeld für wissenschaftliches Arbeiten zur Verfügung gestellt hat.

Weiterhin möchte ich meiner Schwester Amelie Scheble für Ihre Hilfe bei der Verfassung des Manuskriptes in englischer Sprache danken – manche missverständliche Formulierung hielt ihrem aufmerksamen Blick nicht stand.

Besonderer Dank gebührt meinen Eltern dafür, dass sie mir ermöglicht haben, einen Weg einzuschlagen, der mich nun nach Tübingen und zur Anfertigung dieser Arbeit geführt hat. Die vielen sanften und die wenigen weniger sanften (Denk-)Anstöße waren retrospektiv wohl nicht umsonst.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Frau Maria und meinem Sohn Janis danken, die so manche Stunde auf meine Anwesenheit verzichten mussten und dies mit Geduld und Verständnis akzeptierten.

Curriculum vitae

Persönliche Daten

Veit Julian Scheble
Geburtsdatum: 08. Dezember 1980
Familie: verheiratet, 1 Sohn

Aktuelle Tätigkeit

Assistenzarzt und wissenschaftlicher Mitarbeiter,
Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Tübingen

Ausbildung

Staatsexamen und Approbation zum Arzt	21.05.2008
Medizinstudium, Universität Jena	10/2001-05/2008
Allgemeine Hochschulreife, Hariolf-Gymnasium Ellwangen	2000

Zertifikate

Medizindidaktische Qualifikation I des Kompetenzzentrums für Hochschuldidaktik in
Medizin, Baden-Württemberg

Außercurriculare Tätigkeiten

Vizepräsident der Bundesvertretung der Medizinstudierenden in Deutschland 2006
Gewähltes Mitglied der Präsidialkommission "Neue Ärztliche Approbationsordnung"
des Medizinischen Fakultätentages 2006-2007
Gewähltes Mitglied des Rates der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-
Universität Jena 2004-2007

Mitgliedschaften

Landesärztekammer Südwürttemberg
Unterwegs gegen Krebs e.V.

Publikationen

ERG rearrangement in small cell prostate and lung cancer.
Scheble V, Braun M, Wilbertz T, Stiedl A, Petersen K, Schilling D, Reischl M, Seitz
G, Fend F, Kristiansen G, Perner S
Histopathology, 2010, in press

SOX2 is an amplified lineage-survival oncogene in lung and esophageal squamous cell carcinomas.

Bass AJ, Watanabe H, Mermel CH, Yu S, Perner S, Verhaak RG, Kim SY, Wardwell L, Tamayo P, Gat-Viks I, Ramos AH, Woo MS, Weir BA, Getz G, Beroukheim R, O'Kelly M, Dutt A, Rozenblatt-Rosen O, Dziunycz P, Komisarof J, Chirieac LR, Lafargue CJ, **Scheble V**, Wilbertz T, Ma C, Rao S, Nakagawa H, Stairs DB, Lin L, Giordano TJ, Wagner P, Minna JD, Gazdar AF, Zhu CQ, Brose MS, Cecconello I, Jr UR, Marie SK, Dahl O, Shivdasani RA, Tsao MS, Rubin MA, Wong KK, Regev A, Hahn WC, Beer DG, Rustgi AK, Meyerson M.

Nat Genet. 2009 Nov;41(11):1238-42.

Frequent gene fusion in prostate cancer: clinical applications in diagnosis, prognosis and therapy

Schmidt F, **Scheble V**, Mertz K, Perner S, Rubin MA.

Dtsch Med Wochenschr. 2009 Jul;134(28-29):1483-6.

Clinical impact of nucleophosmin mutations and Flt3 internal tandem duplications in patients older than 60 yr with acute myeloid leukaemia.

Scholl S, Theuer C, **Scheble V**, Kunert C, Heller A, Mügge LO, Fricke HJ, Höffken K, Wedding U.

Eur J Haematol. 2008 Mar;80(3):208-15