Aus dem Institut für Pathologie und Neuropathologie

der Universität Tübingen

Abteilung Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. F. Fend

Die Häufigkeit der TMPRSS2-ERG Genfusion in Lokalrezidiven und Fernmetastasen von kastrationsresistenten Prostatakarzinomen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Gregor Heinrich Scharf

aus

Ulm

2013

Dekan:	Professor Dr. I. B. Autenrieth
1. Berichterstatter:	Professor Dr. S. Perner
2. Berichterstatter:	Professor Dr. C. Schwentner

Diese Arbeit ist meinen Eltern und meinen Geschwistern gewidmet, die mich immer unterstützten.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis 4
Abkürzungsverzeichnis 5
Einleitung 6
Material und Methoden 18
Ergebnisse 31
Diskussion 35
Zusammenfassung 41
Literaturverzeichnis 43
Abbildungsverzeichnis 50
Tabellenverzeichnis 51
Veröffentlichungen 52
Erklärung zum Eigenanteil 53
Danksagung 54
Curriculum vitae 55

Abkürzungsverzeichnis

AR	Androgenrezeptor
AS	Active Surveillance (dt.: Aktives Überwachen)
CRPC	Castration resistant prostate cancer (dt.: kastrationsresistentes Prostatakarzinom)
DRU	Digitale rektale Untersuchung
ERG	avian v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog
ETS	erythroblast transformation specific
FISH	Fluroreszenz in-situ Hybridisierung
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
TMA	Tissue Microarray
TMPRSS2	transmembrane protease serine 2
VACURG	Veterans Administration Cooperative Urological Research Group
UICC	Union internationale contre le cancer (dt.: Internationale Vereinigung gegen Krebs)

Einleitung

Epidemiologie des Prostatakarzinoms

Das Prostatakarzinom ist laut den Daten des Robert Koch-Instituts und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. bei Männern in Deutschland die häufigste Krebserkrankung und die dritthäufigste krebsbedingte Todesursache nach dem Bronchialkarzinom und dem Kolonkarzinom. Die altersstandardisierte Inzidenzrate betrug im Jahr 2008 in Deutschland 110,9 je 100.000 Einwohner, die altersstandardisierte Mortalitätsrate 20,6 je 100.000 Einwohner[1]. Für das Auftreten eines Prostatakarzinoms sind in der Literatur unterschiedliche Risikofaktoren beschrieben, neben Umweltfaktoren kommt insbesondere der genetischen oder familiären Belastung eine Bedeutung zu. Bei Erkrankung des Vaters oder eines Bruders an einem Prostatakarzinom verdoppelt sich das Risiko des Patienten auch zu erkranken[2,3]. Diese genetische Disposition lässt sich auch in unterschiedlichen ethnischen Gruppen nachweisen. Die Inzidenz des Prostatakarzinoms ist bei Asiaten am niedrigsten und bei Afroamerikanern am höchsten[4]. Die Bedeutung von Umweltfaktoren zeigt sich, wenn Asiaten in die Vereinigten Staaten auswandern und sich das Erkrankungsrisiko durch diesen Wechsel deutlich erhöht, bzw. dem US- Amerikanischen Niveau anpasst. Das Prostatakarzinom hat ein mittleres Erkrankungsalter von 70 Jahren[1].

Diagnostik des Prostatakarzinoms

Die Prostata (dt.: Vorsteherdrüse) ist eine akzessorische Geschlechtsdrüse des Mannes. Sie liegt subperitoneal unter der Harnblase und umschließt die Urethra. Dorsal grenzt sie an das Rektum, was die rektale Tastuntersuchung der Prostata erlaubt.

Die Prostata besteht aus etwa 30-50 exokrinen tubuloalveolären Einzeldrüsen, die ihr Sekret bei der Ejakulation in die Harnröhre abgeben. Dort vermischt sich das Sekret mit den Spermien.

Das Prostatasekret ist leicht sauer enthält unter anderem Spermin, Phosphatase, Zink und Citrat. Das Polyamin Spermin wirkt stabilisierend auf die DNA der Spermien und verlängert so ihre Überlebenszeit.

Klinisch manifestiert sich das Prostatakarzinom fast ausschließlich in einem fortgeschrittenen Stadium und geht oft mit einer für den Patienten geringen Beschwerdesymptomatik einher. Klinische Frühsymptome sind selten, erst wenn der Tumor die Prostatakapsel penetriert hat, können obstruktive Miktionsbeschwerden und/oder eine Hämaturie Hinweise auf die Tumorerkrankung geben.

Die alterskorrigierte Erkrankungsrate steigt seit 1999 an. Dies ist vor allem auf die zunehmende Inanspruchnahme der Screeninguntersuchungen zurückzuführen. In der aktuellen Version der interdisziplinären Leitlinie „Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms“ der Deutschen Gesellschaft für Urologie wird empfohlen, eine Screeninguntersuchung bei interessierten Männern ab 40 Jahren mit einer Lebenserwartung von über 10 Jahren durchzuführen. Die besten Resultate beim Screening wurden bei der Bestimmung des PSA (Prostata-spezifisches Antigen)-Wertes in Kombination mit einer digital-rektalen Untersuchung (DRU) erzielt[5].

Zeigt sich dabei ein erhöhter PSA-Wert > 4 ng/ml oder ein karzinomverdächtiger Tastbefund[6], sollte eine Prostatabiopsie durchgeführt werden. Dazu werden in der Regel 12 Stanzbiopsien transrektal unter sonografischer Kontrolle entnommen[7] und anschließend histologisch untersucht.

Staging und Grading des Prostatakarzinoms

Anhand des 1950 von der UICC eingeführten TNM-Systems werden maligne Tumoren in unterschiedliche Stadien eingeteilt. Die Abkürzung TNM steht für **T**umor, **N**odes (= Lymphknoten) und **M**etastasen. Dies sind die wichtigsten Kategorien der TNM-Klassifikation. Die nachfolgende Tabelle gibt einen

Überblick über die Stadieneinteilung (= Staging) des Prostatakarzinoms nach der TNM-Klassifikation:

Stadium	Beschreibung
T1	Zufällig gefundener Tumor, der klinisch nicht erkennbar ist
T1a	5% des entnommenen Gewebes oder weniger sind befallen
T1b	Mehr als 5% des entnommenen Gewebes sind befallen
T1c	Tumornachweis durch Nadelbiopsie
T2	Tumorgewebe auf Prostata begrenzt
T2a	Tumorbefall von weniger als der Hälfte eines Lappens
T2b	Tumorbefall von mehr als der Hälfte eines Lappens
T2c	Tumorbefall von beiden Lappen
T3	Tumor durchbricht die Prostatakapsel
T3a	Ausbreitung über die Prostatakapsel hinaus ohne Befall der Samenblasen
T3b	Ausbreitung über die Prostatakapsel hinaus mit Befall der Samenblasen
T4	Tumorbefall von Nachbarstrukturen und/oder fixierter Tumor
N0	Keine Metastasierung in regionäre Lymphknoten
N1	Metastasierung in regionäre Lymphknoten
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen
M1a	Fernmetastasen in nicht regionären Lymphknoten
M1b	Fernmetastasen im Knochen
M1c	Metastasen in anderen Organen

Tabelle 1: TNM-Klassifikation des Prostatakarzinoms nach [8]

Die histologische Beurteilung (= Grading) von Tumorgewebe erfolgt üblicherweise ebenfalls nach einer von der UICC eingeführten Einteilung[8]:

- Grad 1 (G1): Gut differenziertes Tumorgewebe
- Grad 2 (G2): Mäßig differenziertes Tumorgewebe
- Grad 3 (G3): Schlecht differenziertes Tumorgewebe
- Grad 4 (G4): Anaplastisches Tumorgewebe (Das Tumorgewebe weist keine Ähnlichkeit mehr zu dem normalen Gewebe auf.)

Bei Prostatakarzinomen hat sich diese histopathologische Einteilung jedoch nicht durchgesetzt. Diese erhalten zur histologischen Beurteilung einen Gleason-Score[9] bzw. dessen überarbeitete Version[10].

Der Gleason-Score wurde in den Jahren 1960-1975 von dem amerikanischen Pathologen Donald F. Gleason und Mitgliedern der „Veterans Administration Cooperative Urological Research Group“ (VACURG) entwickelt[11]. Entscheidend für den Gleason-Score ist die histologische Ähnlichkeit des Tumorgewebes mit der normalen Prostatadrüsenarchitektur bei relativ niedrigen Vergrößerungen. Anhand dieser Ähnlichkeit werden 5 Differenzierungsgrade unterteilt (Abb. 1), wobei Grad 1 dem normalen Prostatagewebe am meisten ähnelt und Grad 5 am stärksten entdifferenziert ist. Anschließend wird das am häufigsten vorkommende Muster mit dem am zweithäufigsten vorkommenden Muster addiert und so der Gleason-Score berechnet. So bedeutet beispielsweise ein Gleason-Score von „(3 + 4) = 7“, dass das am häufigsten vorkommende Muster der Drüsenarchitektur Grad 3 nach Gleason entspricht und das am zweithäufigsten vorkommende Grad 4. Kommt nur ein Muster vor, wird diese Zahl verdoppelt.

Der Gleason-Score korreliert gut mit der zu erwartenden Mortalität: Nach Albertsen et al.[12] liegt die Wahrscheinlichkeit, an einem Prostatakarzinom innerhalb von 15 Jahren nach der Erstdiagnose zu versterben, bei einem Gleason-Score von 2 - 4 bei 4% - 7%, während die Wahrscheinlichkeit bei einem Gleason-Score zwischen 8 und 10 bei 60% - 87% liegt.

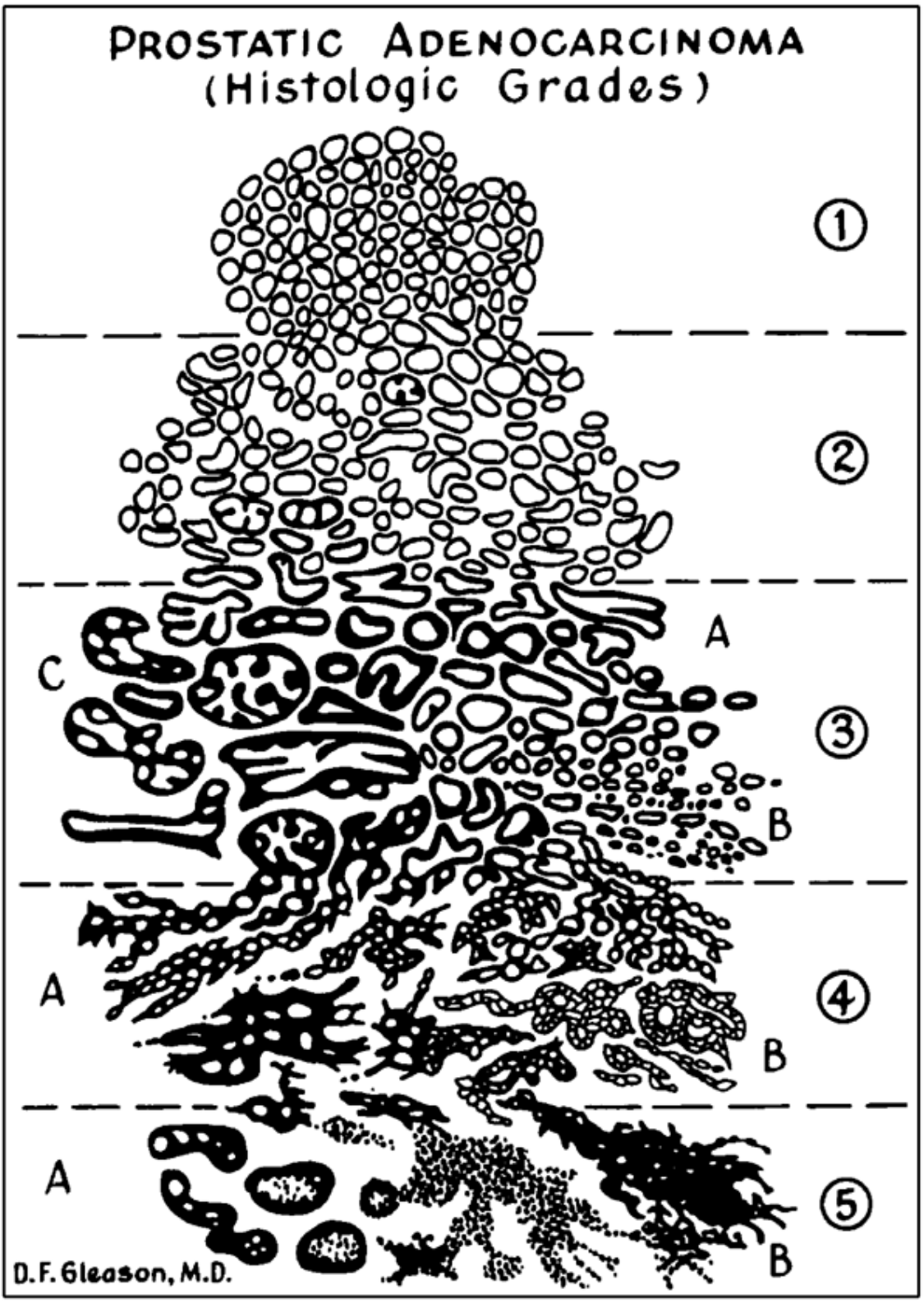

Abbildung 1: Einteilung der Differenzierungsgrade von Prostatakarzinomen nach Gleason[9,11]

Entscheidend für die Prognose eines Prostatakarzinoms sind also der Gleason-Score, die TNM-Kategorie und der PSA-Wert. Anhand dieser Risikofaktoren lässt sich das lokalisierte Prostatakarzinom in drei Risikogruppen einteilen[13]:

- Niedriges Risiko: T-Stadium ≤ 2a und Gleason-Score ≤ 6 und PSA ≤ 10 ng/ml
- Mittleres Risiko: T-Stadium 2b, Gleason-Score 7 oder PSA 10 – 20 ng/ml
- Hohes Risiko: T-Stadium 2c, Gleason-Score ≥ 8 oder PSA > 20 ng/ml.

Therapie des Prostatakarzinoms

1. Therapie des lokalisierten Prostatakarzinoms

Bei der Therapie des Prostatakarzinoms stehen je nach Krankheitsstadium (lokalisiert oder metastasiert) und Risikogruppe eine Vielzahl von Therapieoptionen zur Verfügung. Da zufällig entdeckte Prostatakarzinome oft weder die Lebenserwartung, noch die Lebensqualität des Patienten einzuschränken drohen[14,15], muss eine Übertherapie vermieden werden, da durch diese weitere – und vermeidbare – Risiken auf den Patienten zukommen.

Die erste Wahl bei der Therapie eines lokalisierten Prostatakarzinoms stellt die radikale Prostatektomie dar[16,17]. Bei der Operation stehen unterschiedliche operative Zugangswege zur Verfügung, zu den am häufigsten angewandten zählen der retropubische offene Zugang, der perineale Zugang und der laparoskopische transperitoneale Zugang. Diese unterscheiden sich im Hinblick auf die perioperative Mortalität[18], sowie die relevanten Komplikationen wie Inkontinenz und Impotenz[19] nicht wesentlich. Vorteil dieser Methode ist, dass durch die vollständige Entfernung der Prostata auch das lokalisierte Prostatakarzinom vollständig entfernt wird und somit der Patient geheilt werden kann. Nachteile sind die o.g. Risiken durch die Operation und die Beschränkung auf operationsfähige Patienten. Bei einem Prostatakarzinom mit mittlerem oder hohen Risikoprofil sollte zusätzlich eine pelvine Lymphadenektomie erfolgen,

um Lymphknotenmetastasen frühzeitig zu entdecken und eine entsprechende Therapie einleiten zu können[20].

Eine alternative Therapie stellt die perkutane Strahlentherapie dar. Dabei wirkt mittels eines Linearbeschleunigers ionisierende Strahlung auf das Prostatagewebe ein und verursacht einerseits eine Schädigung der DNA, die das weitere Tumorwachstum verhindert und andererseits die Bildung von freien Radikalen, die ihrerseits toxisch auf das umgebende Gewebe wirken. Die Studienlage zur Wirksamkeit der perkutanen Strahlentherapie ist nicht eindeutig. Während einige Studien der radikalen Prostatektomie das bessere Outcome bei lokalisierten Prostatakarzinomen mit niedrigem Risiko bescheinigen[16,17], zeigt eine umfangreiche Studie, dass die Verfahren radikale Prostatektomie, perkutane Strahlentherapie und Brachytherapie gleichwertig sind[21]. Andere Studien wiederum bescheinigen der perkutanen Strahlentherapie die besseren Ergebnisse bei lokalisierten Prostatakarzinomen mit hohem Risiko[22,23].

Eine weitere Therapiealternative für lokalisierte Prostatakarzinome ist die sog. Brachytherapie (griech. brachys = kurz, nah). Dies ist auch eine Form der Strahlentherapie, jedoch werden hierbei radioaktive „Seeds“, die meist aus Jod-125 oder Palladium-103 bestehen[24], direkt in die Prostata eingebracht und verbleiben lebenslang im Körper. So wird der Tumor direkt aus kürzester Entfernung bestrahlt. Dadurch treten die für die radikale Prostatektomie typischen Nebenwirkungen wie Inkontinenz und / oder Impotenz deutlich seltener auf. Auch die für die perkutane Strahlentherapie typischen gastrointestinalen Nebenwirkungen wie persistierende Diarrhoe treten bei der Brachytherapie seltener auf[13]. Allerdings kommt es häufiger zu urogenitalen Nebenwirkungen wie Hämaturie oder Zystitis[25]. Bei der Therapie von lokalisierten Prostatakarzinomen mit niedrigem Risikoprofil weißt die Brachytherapie vergleichbare Ergebnisse mit der radikalen Prostatektomie[26,27] und der perkutanen Strahlentherapie auf[28]. Bei Patienten mit Prostatakarzinomen mit mittlerem oder hohem Risiko schnitt die

Brachytherapie schlechter ab als die radikale Prostatektomie oder die perkutane Strahlentherapie[29].

Die sog. Active Surveillance (AS)-Strategie ist eine sinnvolle Alternative zu den etablierten Verfahren wie der radikalen Prostatektomie, der perkutanen Strahlentherapie oder der Brachytherapie bei lokalisierten Prostatakarzinomen mit geringem Risiko[30].

Bei der AS wird ein klinisch insignifikantes Prostatakarzinom regelmäßig im Verlauf kontrolliert (mittels PSA-Bestimmung, DRU und der Entnahme von Biopsien), um eine Tumorprogression oder den Patientenwunsch nach einer alternativen Therapie zum frühestmöglichen Zeitpunkt festzustellen. Wird eine Tumorprogression entdeckt, beispielsweise durch einen Anstieg des Gleason-Scores auf 4+3, durch eine Verkürzung der PSA-Verdopplungszeit auf unter 3 Jahre oder durch einen klinischen Progress[31], sollte die Indikation zu einer der oben genannten sekundären Therapien gestellt werden.

2. Therapie des metastasierten/rezidivierten Prostatakarzinoms

Nach der Therapie eines lokalisierten Prostatakarzinoms erfolgt im Rahmen der Tumornachsorge die regelmäßige Kontrolle des PSA-Werts. Steigt dieser in zwei Messungen nach alleiniger Strahlentherapie um mehr als 2 ng/ml über den zuvor erreichten Tiefstwert[32] bzw. um mehr als 0,2 ng/ml nach radikaler Prostatektomie[33], muss von einem Rezidiv des Prostatakarzinoms ausgegangen werden.

Handelt es sich hierbei um ein reines Lokalrezidiv, kann nach primärer Strahlentherapie eine sog. Salvage-Prostatektomie[34] oder nach primärer radikaler Prostatektomie eine sog. Salvage-Strahlentherapie[35] durchgeführt werden. Dies entspricht einem letzten kurativen Therapieversuch nach Versagen der Erstlinientherapie.

Liegen Fernmetastasen vor, ist eine kurative Therapie nicht mehr möglich. Als palliative Therapie verbleibt die Hormonablation/Androgendeprivation. Da das Wachstum von Prostatakarzinomen androgenabhängig erfolgt, kann das Fortschreiten der Erkrankung durch einen Androgenentzug deutlich verlangsamt werden. Dazu stehen zwei Alternativen zur Verfügung, die chirurgische Kastration mittels bilateraler Orchiektomie und die chemische Kastration mittels GnRH-Analoga wie Buserelin oder Goserelin[36]. Während beide Methoden die gleiche Wirksamkeit zeigen[37], wird die chemische Kastration aufgrund ihrer Reversibilität und der besseren Akzeptanz häufiger eingesetzt. Die hormonablative Therapie des Prostatakarzinoms ist mit einem längeren progressionsfreien Überleben verbunden, eine Verlängerung des Gesamtüberlebens ist jedoch fraglich[38]. Nahezu alle Prostatakarzinome unter hormonablativer Therapie sprechen zu Beginn gut auf die Therapie an. Nach durchschnittlich ca. zwei Jahren[39] kommt es jedoch unter adäquater Therapie zu einem Progress der Erkrankung. Das Prostatakarzinom wird kastrationsresistent, das Wachstum erfolgt nun androgenunabhängig. In diesem Krankheitsstadium beträgt das mittlere Überleben ca. ein Jahr[39].

3. Therapie des kastrationsresistenten Prostatakarzinoms

Im Stadium der Kastrationsresistenz kann eine palliative Chemotherapie die Überlebenszeit um einige Monate verlängern. Dazu stehen unterschiedliche Substanzen zur Verfügung, die Wirksamkeit der verschiedenen Therapieschemata ist aktuell Gegenstand der Forschung. So konnten Tannock et al. (2006) in einer Studie zeigen, dass die Gabe von Docetaxel + Prednison die mittlere Überlebenszeit gegenüber der Therapie mit Mitoxantron + Prednison um 2,4 Monate verlängert[40]. Bei einer Vielzahl von anderen Chemotherapeutika wie Vinorelbin, Doxorubicin oder Cyclophosphamid konnte bislang kein positiver Einfluss auf das Gesamtüberleben nachgewiesen werden[41].

Genetik des Prostatakarzinoms

Die klinische Beobachtung, dass es genetische Dispositionen des Prostatakarzinoms gibt, die ein aggressives biologisches Verhalten begünstigen, hat die Suche nach Genmutationen im Tumorgewebe initiiert. Tomlins et al. Entdeckten im Jahr 2005 die häufigste genetische Alteration im lokalisierten Prostatakarzinom, die Genfusion zwischen der Androgen-abhängigen Serin-Protease TMPRSS2 und dem Transkriptionsfaktor ERG[42,43]. ERG gehört zur Gruppe der „erythroblast transformation specific“ (ETS) Transkriptionsfaktoren. Diese beeinflussen die Regulation unterschiedlicher zellulärer Prozesse, wie der Zellproliferation, der Differenzierung, oder der Apoptose[44].

In dem entstehenden onkogenen Fusionsgen wird nun ERG androgenabhängig aktiviert. Diese Entdeckung stellte auch insofern eine Überraschung dar, da bis zu diesem Zeitpunkt davon ausgegangen wurde, dass rekurrente Genfusionen vor allem in Lymphomen und Sarkomen, nicht jedoch in Karzinomen eine bedeutende Rolle spielen[45].

Beide Gene liegen nur etwa drei Megabasenpaare voneinander entfernt auf Chromosom 21. Bei der Untersuchung der Genfusion mittels Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung konnten zwei unterschiedliche Muster des TMPRSS2-ERG-Rearrangements beobachtet werden. Zum einen kam es zu einer Genfusion via Translokation, bei der die zwischen TMPRSS2 und ERG liegenden DNA-Abschnitte auf ein anderes Chromosom transloziert wurden. Noch häufiger tritt allerdings eine Genfusion via Deletion auf, bei der die dazwischenliegenden DNA-Abschnitte verloren gehen[46].

Seit der Entdeckung dieser Genfusion wurden die Möglichkeiten, klinisch Nutzen aus dieser Entdeckung zu ziehen, intensiv beforscht[47-49]. Scheble et al. konnten zeigen, dass die TMPRSS2-ERG Genfusion spezifisch für das Prostatakarzinom ist und bei keinem anderen Karzinom auftritt[50].

Während die TMPRSS2-ERG Genfusion die einzige Genalteration ist, die regelmäßig im lokalisierten Stadium des Prostatakarzinoms auftritt, wurde im

kastrationsresistenten Prostatakarzinom, dem am weitesten fortgeschrittenen Krankheitsstadium, eine weitere häufig auftretende Genmutation entdeckt, die Amplifikation des Androgenrezeptor(AR)-Gens[51-53].

AR zählt zu den Steroidrezeptoren, diese befinden sich intrazellulär. Im Ruhezustand ist AR an sog. „Heat Shock“ Proteine gebunden, die die Bindung an DNA verhindern. Wenn nun Androgene an den Rezeptor binden, ändert diese seine Struktur, löst sich vom Heat Shock Protein und wird phosphoryliert. Dies ermöglicht die Bindung des Hormon-Rezeptor-Komplexex mit seiner DNA-Bindedomäne an eine spezifische Nukleotidsequenz der DNA, dem sog. „Androgen-Response Element“[54]. Anschließend binden Ko-Aktivatoren oder Ko-Repressoren an den Rezeptor und erleichtern, beziehungsweise erschweren die Transkription unterschiedlicher Gene. Prostatazellen und hormon-sensitive Prostatakarzinomzellen benötigen Androgene zum Überleben. Deshalb sprechen Prostatakarzinome zunächst auf eine Androgendeprivation an. Früher oder später kommt es jedoch zur Kastrationsresistenz und das Prostatakarzinom wächst unabhängig. Der genaue Mechanismus der Kastrationsresistenz ist bislang nicht geklärt, jedoch diskutieren Feldman & Feldman[51] unterschiedliche Mechanismen, die zur Kastrationsresistenz führen können:

1. Androgen-Hypersensivität: Erhöhung der Androgen-Sensitivität der PCa-Zellen, z. B. via AR-Amplifikation.

2. Unspezifische Aktivierung von AR: Mutationen im AR-Gen erlauben die Aktivierung des Rezeptors durch mehrere Liganden.

3. Ligandenunabhängige Aktivierung von AR: AR wird unabhängig von der Ligandenbindung phosphoryliert und dadurch aktiviert.

4. AR Bypass: PCa-Zellen erhalten ihr Wachstum über alternative Proteine aufrecht oder blockieren das Apoptose-Signal bei Androgenmangel.

5. Selektion von androgenunabhängigen Zellen: Durch die Kastration wird eine Gruppe von PCa-Zellen selektiert, die von Beginn an androgenunabhängig waren.

Weil bisher nur wenige Studien über die TMPRSS2-ERG Genfusion in kastrationsresistenten Prostatakarzinomen durchgeführt wurden[55-60], war es Ziel unserer Studie, die Häufigkeit des TMPRSS2-ERG Genfusion in kastrationsresistenten Prostatakarzinomen zu bestimmen mit einem besonderen Augenmerk auf den Vergleich der Häufigkeiten zwischen lokal wiederauftretenden Prostatakarzinomen und Fernmetastasen von Prostatakarzinomen. Außerdem untersuchten wir einen potentiellen Zusammenhang zwischen der AR Amplifikation und der TMPRSS2-ERG Genfusion.

Material und Methoden

Für diese Studie wurden Gewebeproben von Lokalrezidiven und von Fernmetastasen von Prostatakarzinomen aus den Archiven der pathologischen Institute des Universitätsklinikums Tübingen und des Universitätsspitals Basel, Schweiz verwendet. Alle verfügbaren Proben aus den Jahren 1994 bis 2009 wurden in die Untersuchung einbezogen. Klinische Daten zu den Patienten standen nicht zur Verfügung.

Diese Studie wurde von der Ethikkommission des Universitätsklinikums Tübingen genehmigt.

Kohorten

Wir untersuchten Gewebeproben von 134 Patienten mit der Diagnose Prostatakarzinom (84 Proben stammten von lokal wiederaufgetretenen Prostatakarzinomen und 55 Proben stammten von Fernmetastasen). 39 Patienten wurden am Universitätsklinikum Tübingen operiert, 95 am Universitätsspital Basel, Schweiz. Anschließend wurden die Proben in zwei Sub-Kohorten aufgeteilt, die eine bestand aus 84 Proben von lokal wiederaufgetretenen Prostatakarzinomen, die andere aus 55 Proben von Fernmetastasen von Prostatakarzinomen. In der Sub-Kohorte der Fernmetastasen stammten 42 Proben von Knochenmetastasen, 9 Proben von ZNS-Metastasen und 4 Proben von anderen Fernmetastasen (Abb. 2). In fünf Fällen waren sowohl Proben von Lokalrezidiven als auch von Fernmetastasen verfügbar, diese Proben wurden jeweils den einzelnen Subkohorten zugeordnet, aufgrund der kleinen Anzahl dieser Fälle wurden sie jedoch nicht separat ausgewertet.

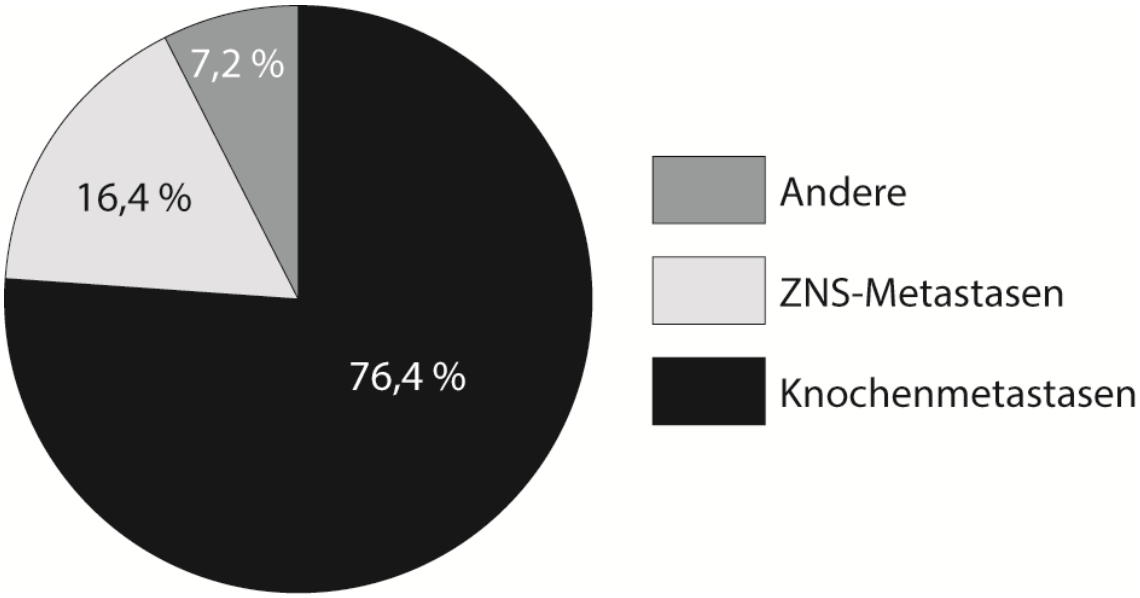

Abbildung 2: Gewebeherkunft der Fernmetastasen

Vor dem Auftreten der Lokalrezidive hatten alle Patienten eine Hormonablation erhalten. Diese erfolgte entweder operativ (Orchiektomie), chemisch (Steroide) oder mit einer Kombination beider Verfahren. Bei den Patienten mit isolierten Fernmetastasen fehlten die Angaben zur Vorbehandlung. Dennoch kann beim Auftreten von Fernmetastasen von einer suffizienten Vorbehandlung ausgegangen werden.
Die technische Aufarbeitung der Präparate erfolgte in den jeweiligen pathologischen Instituten in den nachfolgend beschriebenen Techniken.

Tissue Microarrays

Tübingen Kohorte:

Zunächst wurde das elektronische Archiv des pathologischen Instituts der Universität Tübingen nach Präparaten von Prostatakarzinomen und deren Metastasen durchsucht. Die gefunden Präparate wurden anhand der klinischen Angaben in die Gruppen „Lokalrezidive“ und „Fernmetastasen“ eingeteilt. Von allen Patienten wurden die zuvor in Formalin fixierten und in Paraffin

eingebetteten Präparate und die dazugehörigen Hämatoxylin-Eosin(HE)-gefärbten histologischen Schnitte aus dem Archiv des pathologischen Instituts gesammelt. Das Prostatakarzinom-Gewebe wurde auf den Objektträgern von zwei unterschiedlichen Beobachtern (G.S. und V.J.S.) farbig markiert, um das jeweilige korrespondierende Gewebe im Paraffinblock identifizieren zu können (Abb. 3). Sofern gesundes Prostatagewebe in den Blöcken sicher vorhanden war, wurden fakultativ Proben als Negativkontrolle entnommen.

Die Planung der Tissue Microarrays (TMAs) wurde mithilfe der Software „TMADesigner“ (Alphelys, Plaisir, Frankreich) durchgeführt. Schließlich wurden die TMAs mit dem semiautomatischen „Tissue Array Instrument“ der Firma Beecher Instruments, Sun Prairie, WI, USA erstellt. Dazu wurde aus dem „Spenderblock“, der das Prostatagewebe enthielt, das zuvor markierte Gewebe per Stanze mit einem Durchmesser von 0,6 mm (bis zu drei Stanzen, falls verfügbar) entnommen, die später in einen leeren Paraffinblock, den sogenannten „Empfängerblock“ eingebracht wurden. Schließlich wurden 3 µm Schnitte von den Empfängerblöcken angefertigt und auf „Superfrost“-Objektträger aufgetragen.

Bei multifokalen Prostatakarzinomen wurde jeder Fokus separat ausgewertet.

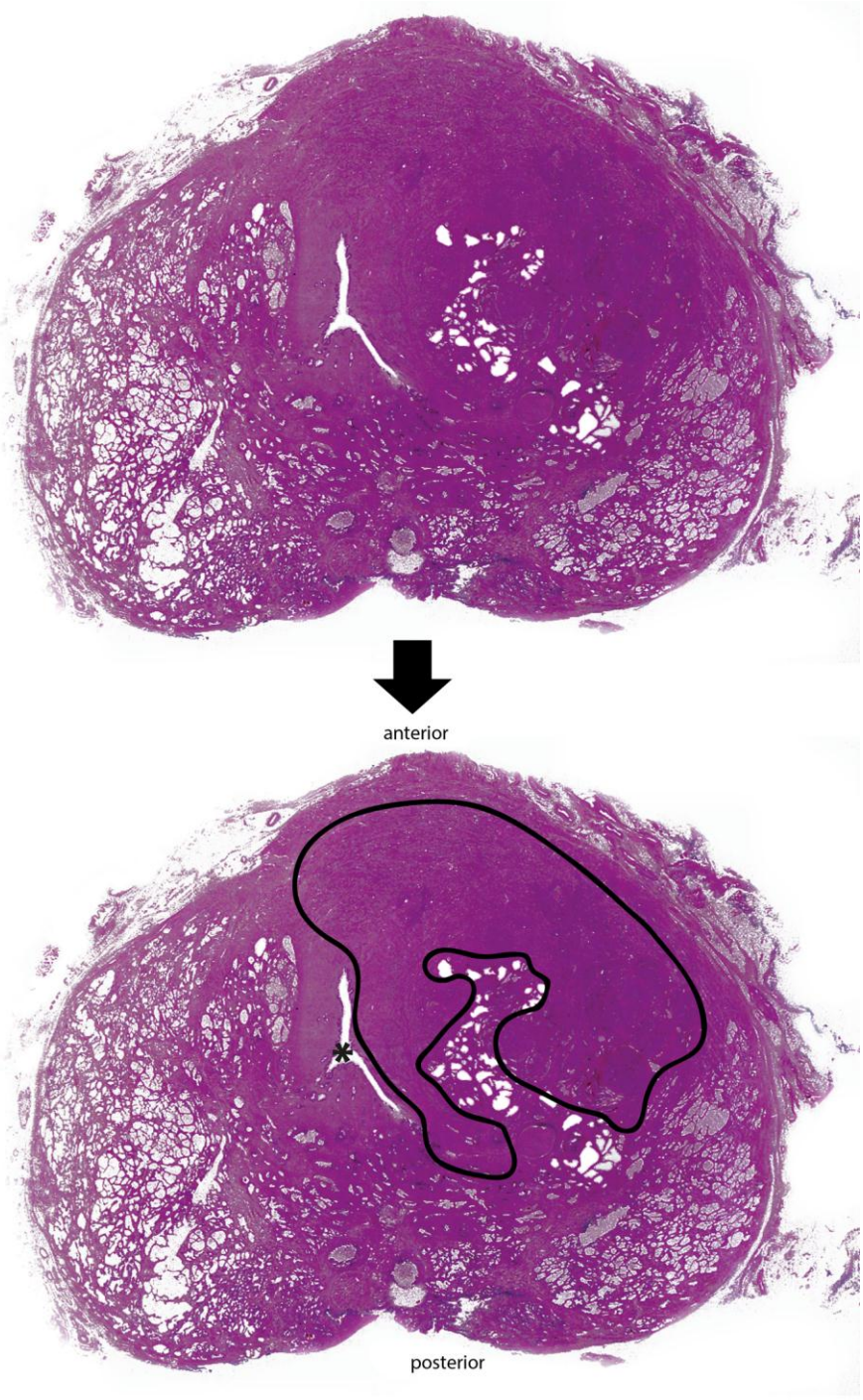

Abbildung 3 oben: HE-gefärbter Paraffin-Schnitt einer Prostata mit PCa. Unten: Markierung des Tumorgewebes. * markiert die Urethra.

Basel Kohorte:

In der Kohorte des Universitätsspitals Basel wurden überwiegend Gewebeproben von palliativen transurethralen Resektionen der Prostata (TUR-P) verwendet. Die Kastrationsresistenz wurde definiert durch das Auftreten von Lokalrezidiven trotz Androgenentzugs. Wenn möglich, wurden drei zufällige Proben von TUR-P Material ausgewählt und dabei TUR-P Gewebe mit Hitzeartefakten oder mechanischen Artefakten vermieden. Im Gegensatz zur Tübinger Kohorte war die Multifokalität des Prostatakarzinoms aufgrund der TUR-P Technik in diesen Fällen nicht mehr bestimmbar. Bei Gewebeproben von Fernmetastasen wurde analog zur Tübingen Kohorte von einer suffizienten Vorbehandlung ausgegangen.

Die Tissue Microarrays (TMAs) wurden wie schon zuvor beschrieben in analoger Technik konstruiert[61]. Tumorgewebe wurde auf H&E gefärbten Objektträgern markiert und zwei bis drei Stanzen pro Fall mit einem Durchmesser von 0,6 mm wurden entnommen. Anschließend wurden von den TMA-Blöcken mehrere Schnitte angefertigt.

Bei beiden Kohorten verwendeten wir drei Stanzen pro Fall, wenn genügend Gewebe zur Verfügung stand. Proben, die aufgrund einer unzureichenden Färbung oder zu geringer Anteile von Prostatakarzinomgewebe nicht auswertbar waren, wurden vor der statistischen Evaluation ausgeschlossen.

Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Die Anfänge der in-situ-Hybridisierung liegen im Jahr 1969. Die Erkenntnis, dass sich RNA-Moleküle an komplementäre DNA-Sequenzen anlagern, ermöglichte die ersten Versuche der in-situ-Hybridisierung. Zunächst wurde eine Zielsequenz festgelegt, die dargestellt werden sollte, anschließend wurde eine dazu komplementäre Sonde erstellt, die mit einem Marker versehen wurde, um den zusammengelagerten Komplex sichtbar zu machen.

Die in-situ Hybridisierung macht sich die Eigenschaft von DNA zu Nutze, dass sich die Doppelstränge unter hohen Temperaturen auftrennen (Denaturierung) und beim Absinken der Temperatur wieder zusammenlagern (Hybridisierung). Dies ermöglicht das Einbringen von Sonden, die die gewünschte Region darstellen.

In den ersten Jahren der in-situ-Hybridisierung handelte es sich bei diesen Markern um Radio-Isotope. Diese belichteten einen aufgelegten fotografischen Film und machten so den Ziel-Sonden-Komplex sichtbar. Nachteile dieser Methode waren die radioaktive Strahlung, der hohe Zeitaufwand sowie die relativ geringe Ortsauflösung.

Der Ersatz der Radio-Isotope durch fluoreszierende Farbstoffe (Fluorochrome) führte schließlich zum Durchbruch des Verfahrens und erlaubte die breite Anwendung. Mit der Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung (FISH) war es nun möglich, mehrere Ziel-Sonden-Komplexe auf einmal sichtbar zu machen, da mehrere Fluorochrome mit unterschiedlichen Farben zur Verfügung standen. Außerdem konnten die hybridisierten Proben unter dem Mikroskop ausgewertet werden, was eine wesentlich höhere Auflösung ermöglichte[62].

Fluoreszenz ist das Ausstrahlen von Licht (Emission) nach Anregung eines Stoffes. Dabei strahlen die einzelnen Fluorochrome das Licht einer bestimmten Wellenlänge aus, jedoch werden sie auch nur von Licht einer gewissen Wellenlänge angeregt. Dies erlaubt den Einsatz von Filtern im FISH-Mikroskop, der nur die gewünschten Wellenlängen passieren lässt. So erscheint der Rest des Präparates dunkel, während die Fluorochrome in ihrer jeweiligen Farbe leuchten. Abbildung 4 zeigt schematisch den Aufbau eines FISH-Auflichtmikroskops.

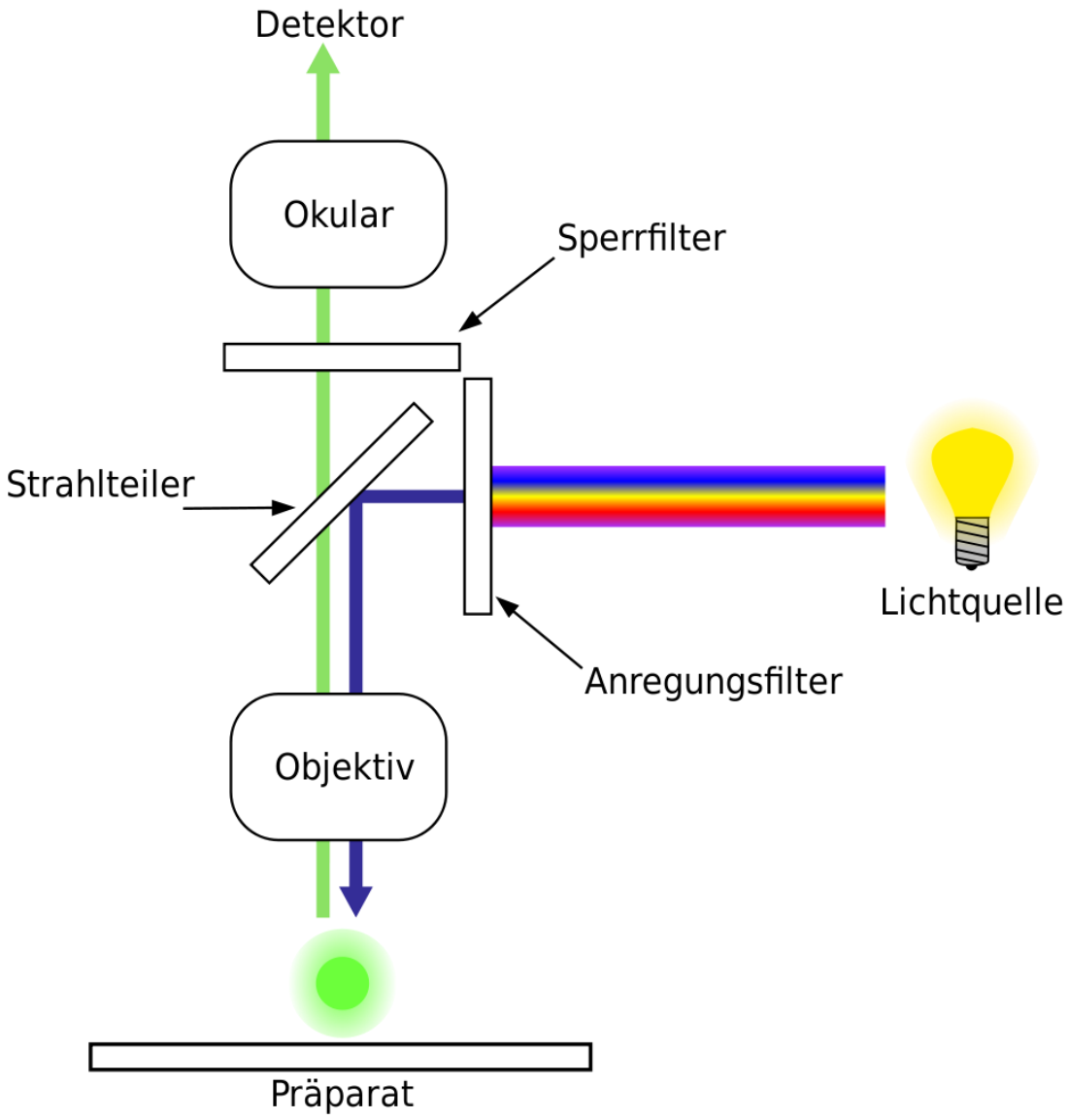

Abbildung 4: Funktionsweise eines FISH-Auflichtmikroskops. Der Anregungsfilter lässt nur Licht mit der benötigten Wellenlänge zur Anregung des Fluorochroms passieren. Strahlteiler und Sperrfilter lassen nur das emittierte Licht passieren.

Quelle: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Fluoreszenzmikroskopie_2008-09-28.svg, Autor: Krzysztof Blachnicki, modifiziert von Henry Mühlpfordt. Lizenz: creative commons by sa.

Grundsätzlich wird zwischen der direkten und der indirekten FISH-Färbung unterschieden: Bei der direkten FISH ist die DNA-Sonde direkt mit einem Fluorochrom markiert. Die indirekte FISH nutzt Haptene wie Biotin oder Digoxigenin. Diese sind an die DNA-Sonde gebunden und werden dann in

einem zweiten Schritt von einem Antikörper, der mit einem Fluorochrom versehen wurde, gebunden und so markiert.

FISH-Protokoll

Nach folgender Methode wurden die TMA-Schnitte mithilfe der FiSH-Sonden angefärbt:

Lösungen:

1. 20x SSC (saline sodium citrate): 3 M Natriumchlorid (NaCl), 0.3 M Natriumcitrat ($Na_3C_6H_5O_7$)

2. 2x SSC: 0.3 M Natriumchlorid (NaCl), 0.03 M Natriumcitrat ($Na_3C_6H_5O_7$)

3. 1x PBS (phosphate buffered saline): 1.06 mM KH_2PO_4, 155.17 mM NaCl, 2.97 mM Na_2HPO_4-$7H_2O$

Vorbehandlung:

1. Aging der Schnitte (1 Stunde bei 60°C): Durch das Aging werden Wasser und Fixiermittel entfernt, Proteine denaturiert und die Adhäsion des Materials auf dem Objektträger verstärkt. Ohne das Aging würden die Chromosomen bei der Denaturierung verformt, zu starkes Aging verschlechtert die Hybridisierung.

2. Deparaffinisierung (3x 10 min. Xylol): Das Lösungsmittel Xylol löst und entfernt das Paraffin.

3. Dehydratisierung (2x 2 min. 100% EtOH): Durch den 100% Alkohol wird schonend Wasser aus dem Präparat entfernt.

4. Lufttrocknen bei Raumtemperatur

5. Pufferung (15 min. in Tris-EDTA bei 92,8°C), Anschließend waschen in PBS-Lösung. PBS ist eine Pufferlösung und hat den osmotischen Druck des menschlichen Organismus (isoton).

6. Enzymverdau mit Digest-All 3 Pepsin-Lösung (12min. bei 37°C), Anschließend waschen in PBS-Lösung

7. Dehydratisierung (je 2 min. in aufsteigender EtOH-Reihe 70%, 85%, 95%, 100%)
8. Lufttrocknen bei Raumtemperatur.

Vorbereitung der Sonde:

1. Denaturieren (5 min. bei 73°C): Durch das Denaturieren wird die DNA in Einzelstränge aufgebrochen und ermöglicht die Bindung der Sonden an die DNA.

Hybridisierung:

1. 20 µl der Sonde werden auf einen Objektträger gegeben und mit einem 22x22 mm Deckglas abgedeckt.

2. Die Kanten des Deckglases werden mittels Kunststoffkleber verschlossen, um die Konzentration der Probe aufrecht zu erhalten.

3. Hybridisierung (3 min. bei 94°C, dann ca. 10h bei 37°C): Bei Temperaturerniedrigung lagern sich die zuvor aufgespaltenen DNA-Doppelstränge wieder aneinander. Dies ermöglicht der zuvor zugegebenen Sonde die Anlagerung an die DNA.

Post-Hybridisierung:

1. Eintauchen der Objektträger in 2x SSC-Puffer, bis sich das Deckglas löst

2. Waschen in 2x SSC-Puffer (6 min. bei 75°C)

Detektion:

1. Spülen der Objektträger in 0,5x SSC-Puffer (3x 2 min. bei Raumtemperatur)

2. Blocken unspezifischer Bindungsstellen mittels CAS-Block (10 min.).
   Dies erhöht die Sensitivität der FISH, indem unspezifische Bindungsstellen abgesättigt werden, bevor die Fluorochrome zugegeben werden.
3. Bindung der Fluoreszenz-markierten Antikörper (1h)

4. Erneutes Spülen der Objektträger in 0,5x SSC-Puffer (3x 2 min.)

5. Anfärben der Zellkerne mittels DAPI: 4‘.6-Diamidin-2-phenylindol färbt als Fluoreszenz-Farbstoff unspezifisch DNA blau an und wird zur Markierung der Zellkerne eingesetzt. Dies erleichtert die Erkennung von unspezifischen Färbungen außerhalb von Zellkernen.

FISH Sonden

Wir verwendeten FITC als grünen Farbstoff und Alexa Fluor-594 (Invitrogen, Paisley, UK) als roten Fluoreszenz-Farbstoff. Die Absorptions- bzw. Emissionspektren lagen bei 495 nm / 521 nm für FITC und 590 nm / 617 nm für Alexa Fluor-594.

Der TMRPSS2-ERG Status wurde mithilfe von FISH-Mikroskopie bestimmt. Dazu wurde ein Translokationsassay angewendet. ERG wurde am 5'-Ende mit einer grünen Sonde und am 3'-Ende mit einer roten Sonde markiert. Bei einem genetischen Normalbefund überlagern sich beide Sonden auf beiden Chromosomen 21 und erscheinen unter dem FISH-Mikroskop gelb (Abb. 4A). Kommt es zu einem Rearrangement durch Translokation, stellt sich die grüne 3'-Sonde separiert von der roten 5'-Sonde dar. Die 3'- und 5'-Sonden in Kolokalisation auf dem zweiten Chromosom 21 erscheinen weiterhin gelb (Abb. 4B). Im Falle einer Rearrangements via Deletion kann die grüne 3'-Sonde nicht binden. Unter dem FISH-Mikroskop zeigt sich die rote 5'-Sonde und die kolokalisierten 3'- und 5'- Sonden auf dem zweiten Chromosom 21 erscheinen weiter gelb (Abb. 4C).

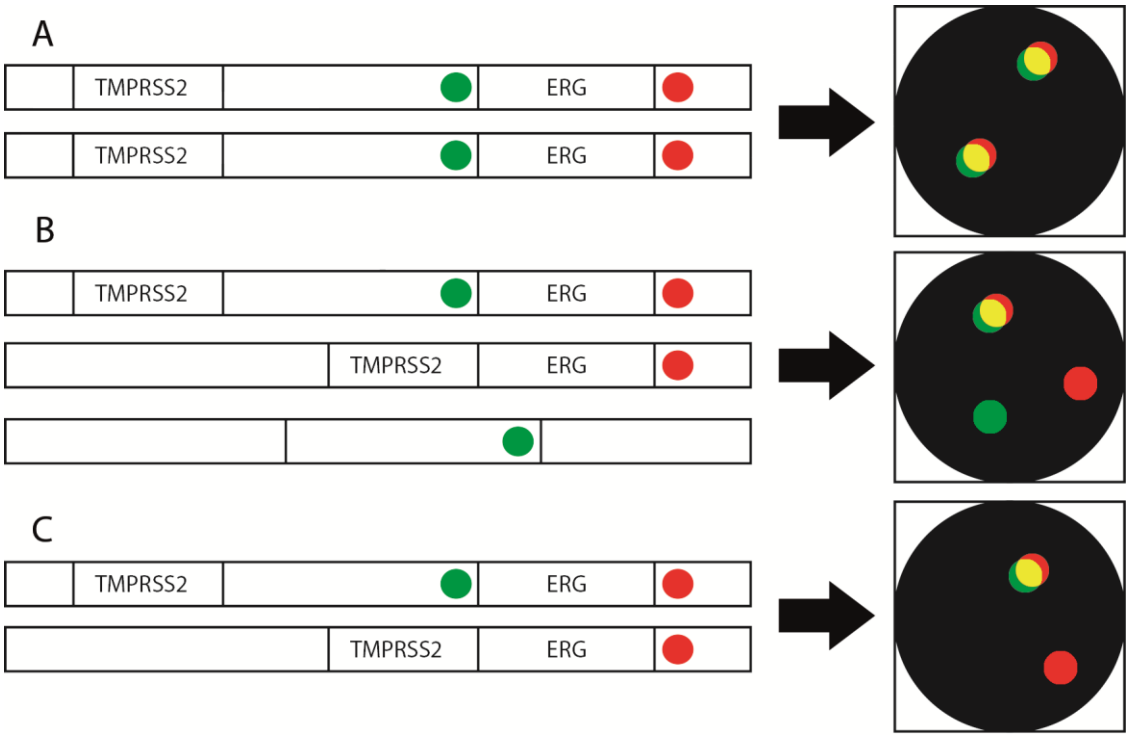

Abbildung 5: Schematische Darstellung des ERG Translokations-Assay. (A) Normaler ERG-Status, (B) ERG Rearrangement via Translokation, (C) ERG Rearrangement via Deletion.

Zur Bestimmung des Amplifikationsstatus des Androgen Rezeptors führten wir einen Amplifikationsassay mit einer roten Ziel-Sonde (RP11-479J1, Invitrogen, Paisley, UK) und einer grünen Referenz-Sonde, die an eine stabile Region von Chromosom X bindet (RP11-308F2, Invitrogen, Paisley, UK), durch.

Der Amplifikationsstatus wurde semiquantitativ untersucht, indem die Anzahl roter Signale (AR Zielregion) mit der Anzahl zugehöriger grüner Signale (Referenzregion) verglichen wurde. Ein rot/grün Verhältnis von 2:1 bis zu 5:1 wurde als geringgradige Amplifikation (low-level amplification) definiert, rot/grün Verhältnisse von über 5:1 als hochgradige Amplifikation (high-level amplification.

Alle TMA Objektträger wurden mit einem 63-fach Ölimmersionsobjektiv an einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Jena, Deutschland), das mit passenden Filtern, einer Kamera und mit der FISH-Software Metafer 4 (Metasystems, Altlussheim, Deutschland) ausgestattet war, untersucht. Die Auswertung erfolgte von zwei voneinander unabhängigen, erfahrenen Beobachtern (V.J.S. und G.S.). Pro Fall wurden mindestens 100 Zellkerne berücksichtigt.

Damit wurde jede auswertbare Probe dichotom als positiv oder negativ jeweils für den TMPRSS2-ERG-Status und den AR-Status klassifiziert. War die Mehrheit der bis zu drei Proben positiv, wurde der Patient als positiv für die jeweilige Genalteration bewertet. War die Mehrheit negativ, wurde der Patient als negativ bewertet.

Statistische Auswertung

Die Häufigkeit der Patienten mit den Genalterationen von TMPRSS2-ERG und AR wurde in Abhängigkeit von der Gewebeherkunft ausgewertet und die 95%-Konfidenzintervalle berechnet.

Die Signifikanz der Unterschiede des TMPRSS2-ERG Status und des AR Amplifikationsstatus zwischen den Lokalrezidiven und den Fernmetastasen von Prostatakarzinomen wurde mit dem χ^2-Test bestimmt. Mithilfe des χ^2-Vierfelder-Tests wird überprüft, ob zwei dichotome Merkmale stochastisch voneinander unabhängig sind. Anschließend wurde die Zusammenhangsstärke mit dem Cramèrs V-Test berechnet. Cramèrs V ist ein χ^2-basiertes richtungsloses

Zusammenhangsmaß, das Werte zwischen 0 und 1 annehmen kann. 0 bedeutet, dass zwischen den beiden Variablen kein Zusammenhang besteht, bei einem Wert von 1 bestünde ein perfekter Zusammenhang.

Ergebnisse

Lokalrezidive:

Bei den 84 Proben der Lokalrezidive fanden wir TMPRSS2-ERG Genfusionen in 45% (38/84) (95%-Konfidenzintervall: 34-56%) der Fälle. Darunter waren 13 Fälle (34%) mit einer Genfusion bedingt durch Translokation und 25 Fälle (66%), bei denen die Genfusion durch eine Deletion verursacht wurde (Abb. 5 oben). Eine Androgenrezeptor Amplifikation fanden wir bei den Lokalrezidiven in einer Häufigkeit von 45% (38/84) (95%-Konfidenzintervall: 34-56%) (Abb. 5 unten).

Fernmetastasen:

Von den 55 metastasierten PCa-Proben fanden wir TMPRSS2-ERG Genfusionen mit einer Häufigkeit von 25% (14/55) (95%-Konfidenzintervall: 14-39%). Davon waren 6 (43%) Genfusionen von einer Translokation und 8 (57%) von einer Deletion verursacht (Abb. 5 oben). Anschließend bestimmten wir den Androgenrezeptor-Status und fanden Amplifikationen bei 19/55 (35%) (95%-Konfidenzintervall: 22-48%) Fällen (Abb. 5 unten).

Bei 5 Fällen waren sowohl Proben vom Lokalrezidiv, als auch von Fernmetastasen verfügbar. Innerhalb dieser Fälle fanden wir bezüglich des TMRPSS2-ERG-Status intrafokale Homogenität. Alle Proben zeigten einen normalen ERG-Status ohne Genfusion bei Lokalrezidiven und auch Fernmetastasen. Der Androgenrezeptor-Status war in einem Fall heterogen: Während das Lokalrezidiv für AR normal war, fanden wir bei der Fernmetastase eine Amplifikation. In 3 Fällen war der AR-Status normal in Lokalrezidiv und Fernmetastase und in einem Fall waren beide Proben amplifiziert.

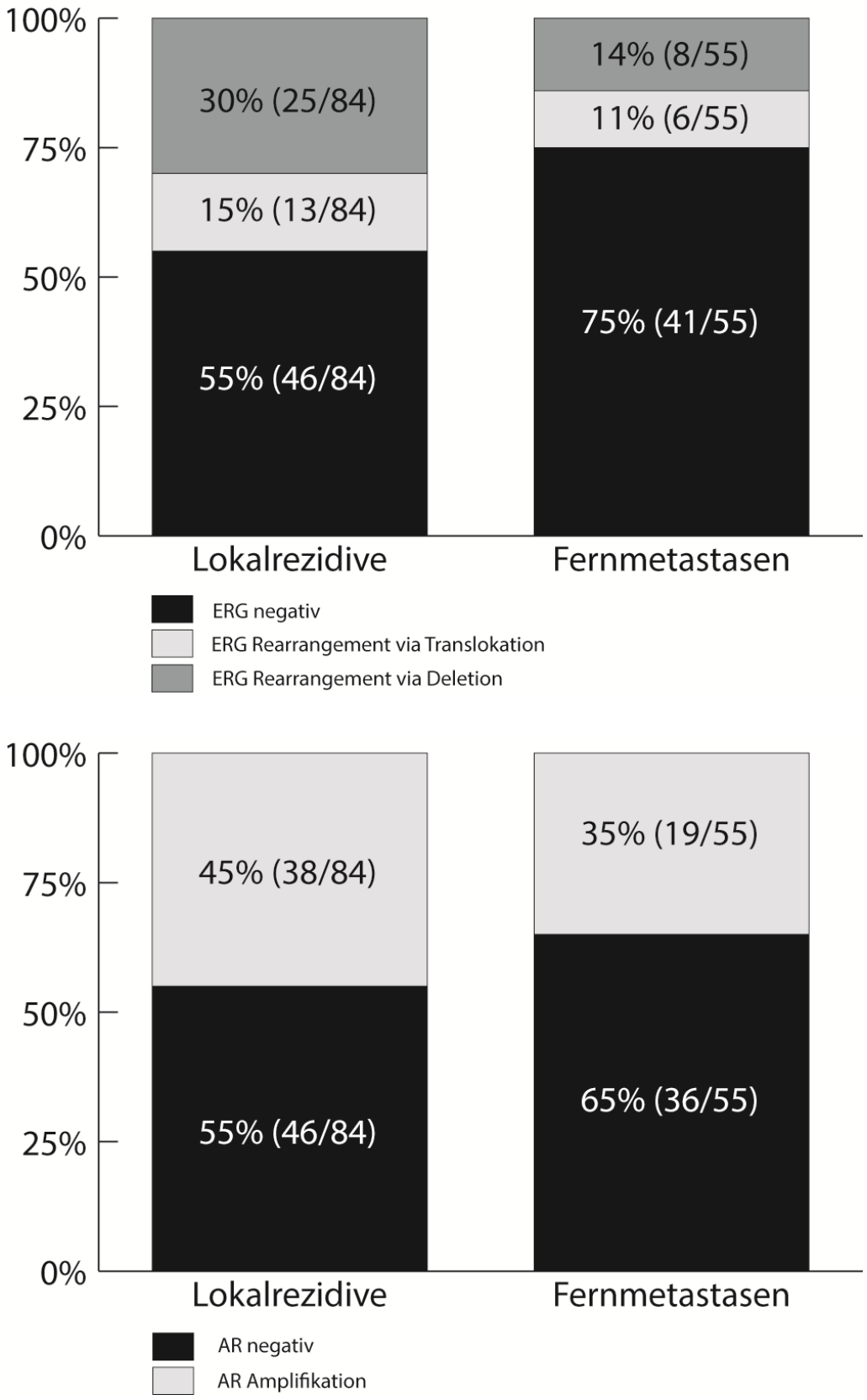

Abbildung 6 oben und unten: Die prozentuale Verteilung der TMPRSS2-ERG Genfusion und der AR Amplifikation in Lokalrezidiven und Fernmetastasen von Prostatakarzinomen.

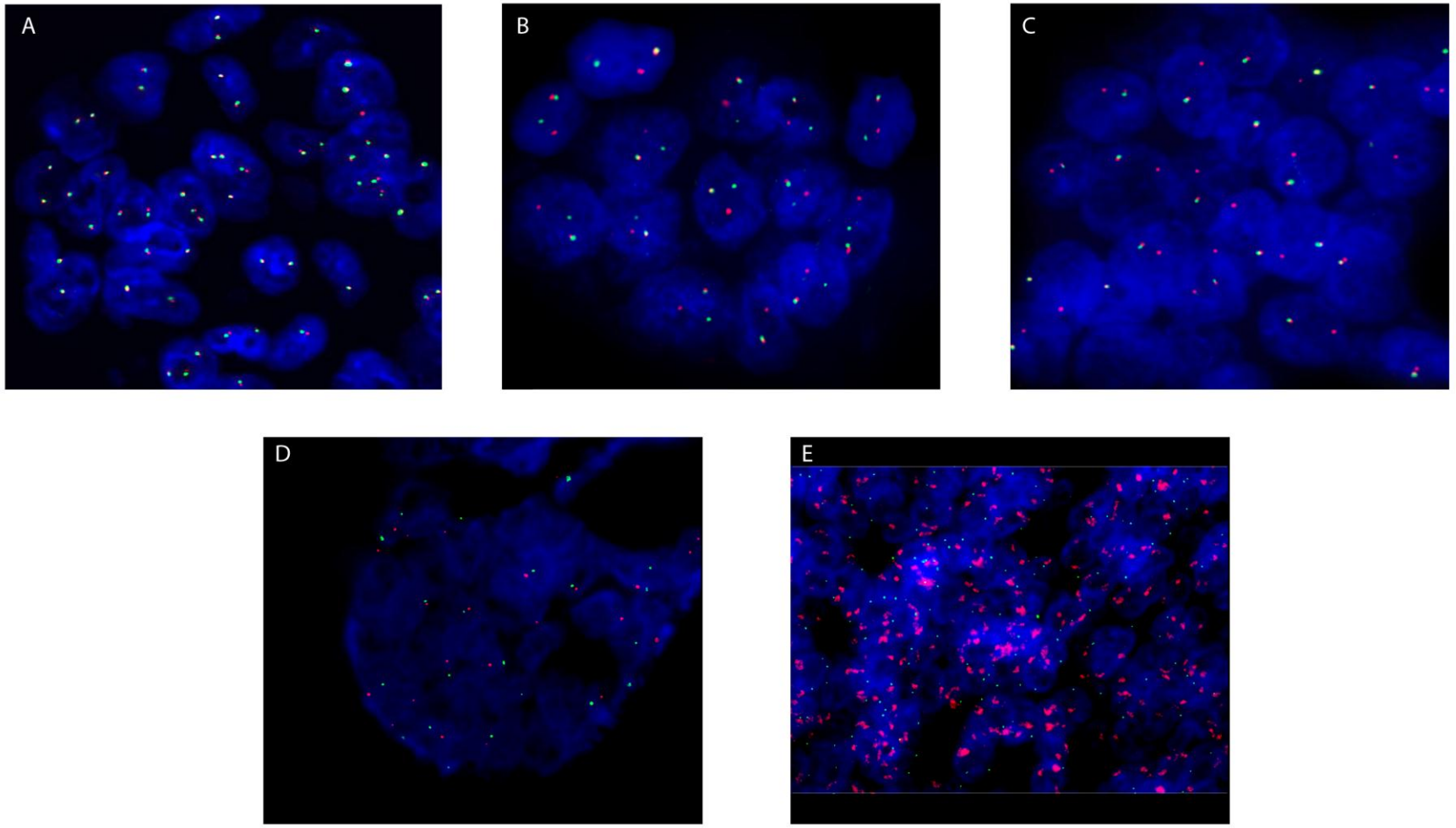

Abbildung 7: FISH-Bilder. (A) Normaler ERG-Status, (B) ERG Rearrangement via Translokation, (C) ERG Rearrangement via Deletion. (D) Normaler AR-Status, (E) AR Amplifikation

Die statistische Auswertung mithilfe des χ^2-Tests zeigte, dass die Häufigkeit der TMPRSS2-ERG Genfusion in Fernmetastasen von Prostatakarzinomen signifikant niedriger ist als in Lokalrezidiven von Prostatakarzinomen ($p=0.018$). Bezüglich des AR-Status konnten wir keinen signifikanten Unterschied in der Häufigkeit zwischen Fernmetastasen und Lokalrezidiven feststellen ($p=0.21$).

Anschließend bestimmten wir die Effektgröße, indem wir Cramèrs V berechneten; dieses beträgt 0.2.

Diskussion

Ziel unserer Studie war es, die Häufigkeit der TMPRSS2-ERG Genfusion in kastrationsresistenten Prostatakarzinomen zu bestimmen und deren Häufigkeit in Lokalrezidiven und Fernmetastasen von Prostatakarzinomen zu vergleichen. Ferner sollte ein Zusammenhang zwischen der AR Amplifikation und der TMPRSS2-ERG Genfusion überprüft werden. Die Untersuchung erfolgte retrospektiv an Operationspräparaten der Jahre 1994-2009 aus den pathologischen Instituten des Universitätsklinikums Tübingen und des Universitätsspitals Basel, Schweiz.

Die Ergebnisse zeigen eine deutlich höhere Rate von TMPRSS2-ERG Genfusionen in Lokalrezidiven im Vergleich zu Fernmetastasen, während im AR-Status keine signifikanten Unterschiede vorliegen.

Die Häufigkeit der TMPRSS2-ERG Genfusion wurde bisher in vielen unterschiedlichen Arbeiten bestimmt. Sie variiert stark (15-80%), in Abhängigkeit von der Auswahl der zu untersuchenden Kohorte[43,63,64] und dem histologischen Subtyp des Prostatakarzinoms[65,66]. Wesentlichen Einfluss haben zum Beispiel das Stadium der Erkrankung, die Herkunft des Gewebes, sowie die ethnische Herkunft der Patienten. In unserer Untersuchung wurde ein homogen definiertes Patientengut ausgewertet. Die Gewebeproben stammen von jeweils fortgeschrittenen metastasierten oder lokal rezidivierenden kastrationsresistenten Prostatakarzinomen.

In der Literatur untersuchen einige Studien auch die Häufigkeit der TMPRSS2-ERG Genfusion bei kastrationsresistenten Prostatakarzinomen. Die Untersuchung von Cai et al. (2009)[55] beschreibt eine Häufigkeit von 37,9% für das Auftreten der TMPRSS2-ERG Genfusion. Die Autoren untersuchten jedoch Prostatakarzinom-Zelllinien, die Mäusen implantiert worden waren, so dass eine Unterscheidung von Lokalrezidiven und Fernmetastasen nicht möglich war. Außerdem verwendeten sie zur Analyse mit Real-Time PCR eine andere

Methode, die die Vergleichbarkeit erschwert. Han et al. (2009)[56] und Mehra et al. (2008)[58] beschreiben in ihren Untersuchungen mit 34,9% bzw. 37,0% eine vergleichbare Häufigkeit, machen aber keine genauen Angaben über die Zusammensetzung der untersuchten Proben und über die Herkunft des Gewebes. Insbesondere wird in den oben genannten Studien nicht zwischen Lokalrezidiven und Fernmetastasen unterschieden. Diese werden in einer Gruppe zusammengefasst. Damit sind diese Ergebnisse nur bedingt vergleichbar mit unserer Untersuchung.

Verschiedene Studien begrenzen sich auf die Untersuchung von Lokalrezidiven, sie finden Häufigkeiten von 34,6% bis 37,9%, vergleichen diese Ergebnisse aber nicht mit dem Auftreten der Alterationen in Fernmetastasen.
Die Häufigkeit der TMPRSS2-ERG Genfusion im CRPC bleibt also im Vergleich von Lokalrezidiven und Fernmetastasen des Prostatakarzinoms unklar.

In der vorliegenden Arbeit konnte bei der Evaluation zweier unabhängiger CPRC Kohorten, von denen eine aus Lokalrezidiven und die andere aus Fernmetastasen von Prostatakarzinomen bestand, erstmals ein Unterschied in der Häufigkeit der TMPRSS2-ERG Genfusion zwischen Lokalrezidiven und Fernmetastasen festgestellt werden. Die Unterschiede der Häufigkeit der Genfusion zwischen unserer Studie und den zuvor erwähnten Studien sind dadurch verursacht, dass wir einerseits die gleichen experimentellen Rahmenbedingungen bei der Untersuchung von Lokalrezidiven und Fernmetastasen hatten, und andererseits durch eine eindeutige Definition der Kohorten. In allen zuvor genannten Arbeiten wurde die Häufigkeit der TMPRSS2-ERG Genfusion entweder in Lokalrezidiven oder in Fernmetastasen bestimmt, aber nie direkt verglichen. Weiterhin bleibt es teilweise unklar, ob Lokalrezidive oder Fernmetastasen untersucht wurden.

Andererseits passt die Häufigkeit der AR Amplifikation in unseren Kohorten (sowohl Lokalrezidive als auch Fernmetastasen) gut zu den Häufigkeiten, die in früheren Studien beschrieben wurden[53,67-69]. Als Ursache der starken

Zunahme der AR Amplifikation im CRPC wird vermutet, dass durch die Kastration ein selektiver Druck ausgeübt wird, der das Wachstum von Prostatakarzinomen mit einer AR Amplifikation begünstigt. Legt man diese Hypothese zugrunde, kann davon ausgegangen werden, dass sich Lokalrezidive und Fernmetastasen, die beide Stadien des CRPC darstellen, in der Veränderung ihrer AR Amplifikation gleich verhalten. Das würde auch unsere Beobachtung einer gleichen Häufigkeit von AR Amplifikationen in Lokalrezidiven und Fernmetastasen erklären. Ferner wird verständlich, dass auch Studien mit heterogenem Gewebematerial bei der Häufigkeit der AR Amplifikation ähnliche Werte beschreiben.

Frühere Studien berichten, dass die TMPRSS2-ERG Genfusion ein frühes und klonales Ereignis während der Progression des Tumors ist[70,71]. Unsere Ergebnisse zeigen jedoch, dass die Genfusion in dem am weitesten fortgeschrittenen Krankheitsstadium, der Fernmetastase, seltener auftritt, als in Lokalrezidiven.

Aufgrund unseres Studiendesigns können wir derzeit über die Ursache der Unterschiede nur spekulieren: Eine plausible Erklärung wäre, dass die Androgen-Sensitivität in der Prostataregion höher ist, als in anderen Regionen und deshalb die androgenabhängige Protease TMPRSS2 in der Prostata und im umliegenden Lymphgewebe aktiver ist als in entfernten Organen. Dadurch könnte eine negative Auswahl der androgenabhängigen Prostatakarzinome mit der TMPRSS2-ERG Genfusion in einigen Fernmetastasen auftreten.

Eine andere mögliche Erklärung ist, dass die TMPRSS2-ERG Genfusion zwar invasives Wachstum verstärkt, aber keinen Einfluss auf die Metastasierung hat. So könnten lokale Mikrometastasen von TMPRSS2-ERG positiven Prostatakarzinomen gehäuft Lokalrezidive auslösen, jedoch seltener Fernmetastasen verursachen.

Diese Thesen würden auch erklären, warum sich bei der Häufigkeit der AR Amplifikation mit den Literaturdaten eine Übereinstimmung ergibt, während wir in den Fernmetastasen eine niedrigere Rate der TMPRSS2-ERG Genfusion fanden.

Kritisch zu würdigen sind weitere Einflussfaktoren, die aus unserem Studiendesign resultieren. In beiden Kohorten können unterschiedliche Behandlungsstrategien verfolgt worden sein. Die klinischen Daten zur Hormonablation lagen uns nicht vor. Da beide Verfahren (operative und chemische Kastration) klinisch in ihrer Wirksamkeit vergleichbar sind[21], erscheint eine Auswirkung des gewählten Behandlungsverfahrens auf die Amplifikation von AR und die Fusion von TMPRSS2-ERG unwahrscheinlich.

Durch die Verwendung von TUR-P Material in der Baseler Kohorte war eine Zuordnung des Tumorgewebes zu einzelnen Foci nicht möglich. So konnte die Multifokalität nicht berücksichtigt werden. Auch dadurch könnte die Genauigkeit unserer Daten eingeschränkt sein. Allerdings ist es naheliegend, in einer palliativen Situation den schonendsten Eingriff vorzunehmen, so dass anderes Material nicht zur Verfügung stand.

In unserer Studie konnten auch Umweltfaktoren, beziehungsweise unterschiedliche Lebensweisen nicht berücksichtigt werden. Dies gilt in gleicher Weise für ethnische Unterschiede, die nicht dokumentiert wurden. Die geographische Nähe und die vergleichbaren soziokulturellen Bedingungen beider Standorte machen relevante Unterschiede beider Kollektive jedoch unwahrscheinlich.

Die von uns erstmals gemachte Beobachtung, dass die TMPRSS2-ERG Genfusion in Fernmetastasen von Prostatakarzinomen seltener auftritt, als in Lokalrezidiven, könnte klinische Auswirkungen haben, beispielsweise könnte sie der Stratifizierung von Prognose und Therapie dienen. Voraussetzung hierfür wären weitere klinische Studien, in denen prospektiv die

Krankheitsverläufe in Abhängigkeit von der TMPRSS2-ERG Genfusion kontrolliert werden. Eine solche Regressionsanalyse müsste die anderen, bereits beschriebenen Einflussfaktoren mit erfassen.

Weiterhin ist bislang noch nicht geklärt, ob das Vorliegen einer TMPRSS2-ERG Genfusion Auswirkungen auf das Wachstumsverhalten eines Prostatakarzinoms hat. So konnten einige Studien zeigen, dass die TMPRSS2-ERG Genfusion ein aggressives Wachstum von Prostatakarzinomen begünstigt[72,73], während andere Studien keinen Zusammenhang zwischen dem Vorliegen der Genfusion und der Aggressivität des Prostatakarzinoms feststellen konnten[74,75]. Die bislang größte zu dieser Fragestellung durchgeführte Kohortenstudie von Pettersson et al.[76] zeigte ebenfalls keinen Zusammenhang zwischen der Genfusion und dem tödlichen Verlauf des Prostatakarzinoms. Allerdings war das Vorliegen der TMPRSS2-ERG Genfusion mit einem fortgeschritteneren T-Stadium assoziiert. Die Autoren vermuten, dass die Genfusion das lokale Tumorwachstum beeinflusst, nicht jedoch die Metastasierung. Unsere Ergebnisse lassen sich mit dieser These ebenfalls gut vereinbaren.

Sollte sich diese These bewahrheiten, wäre eine klinische Auswirkung der TMPRSS2-ERG Genfusion durchaus vorstellbar. Möglicherweise würden dann ERG positive Patienten im lokalisierten Stadium von einer radikalen Prostatektomie mehr profitieren, als von einer Strahlentherapie. Zu dieser Fragestellung könnte eine prospektive Kohortenstudie durchgeführt werden, bei der bei Patienten mit lokalisiertem Prostatakarzinom zunächst der ERG Status bestimmt wird. Anschließend werden die Patienten in die unterschiedlichen Therapiezweige wie radikale Prostatektomie und perkutane Strahlentherapie aufgeteilt und nachbeobachtet, wie oft in den unterschiedlichen Kohorten Rezidive auftreten. Allerdings würde eine solche Studie eine hohe Teilnehmerzahl und eine lange Studiendauer benötigen.

In der vorliegenden Studie wurden Lokalrezidive und Fernmetastasen von Prostatakarzinomen im Hinblick auf ihren TMPRSS2-ERG- und auf ihren AR-Status untersucht. Während in Bezug auf den AR-Status keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Subkohorten bestanden, fand sich die TMPRSS2-ERG Genfusion signifikant häufiger in Lokalrezidiven. Dies ist die erste Studie, die diese beiden Ausprägungen des fortgeschrittenen Prostatakarzinoms vergleicht. Unsere überraschenden Ergebnisse könnten zukünftig zur klinischen Entscheidungsfindung dienen.

Zusammenfassung

Die Häufigkeit der TMPRSS2-ERG Genfusion bei kastrationsresistenten Prostatakarzinomen ist bislang in nur wenigen Studien untersucht worden. Insbesondere im Hinblick auf mögliche Unterschiede zwischen Lokalrezidiven und Fernmetastasen von Prostatakarzinomen liegen nur wenige Daten vor. Die bisher durchgeführten Studien unterscheiden nicht klar zwischen Lokalrezidiven und Fernmetastasen.

Ziel unserer Studie war es also, die Häufigkeit der TMPRSS2-ERG Genfusion in einer klar definierten Kohorte von kastrationsresistenten Prostatakarzinomen zu untersuchen und zu prüfen, ob Unterschiede im ERG-Status zwischen Lokalrezidiven und Fernmetastasen vorlagen.

Dazu untersuchten wir Proben von insgesamt 134 Patienten (39 stammten vom Universitätsklinikum Tübingen, 95 vom Universitätsspital Basel, Schweiz) mittels FiSH-Mikroskopie auf ihren TMPRSS2-ERG- und ihren Androgenrezeptor-Status. Die Proben wurden in zwei Subkohorten aufgeteilt: Die Subkohorte der Lokalrezidive bestand aus 84 Proben, die Subkohorte der Fernmetastasen aus 55 Proben.

Anschließend wurde mit Hilfe des χ^2-Tests untersucht, ob signifikante Unterschiede im ERG-Status zwischen beiden Subkohorten vorlagen. Durch die Berechnung von Cramèrs V bestimmten wir die Stärke des Zusammenhangs.

Wir konnten zeigen, dass die Häufigkeit der TMPRSS2-ERG Genfusion in Lokalrezidiven 45% (38/84) und in Fernmetastasen 25% (14/55) beträgt. Die Häufigkeit der AR-Amplifikation betrug 45% (38/84) beziehungsweise 35% (19/55). Die Unterschiede im ERG-Status zwischen Lokalrezidiven und Fernmetastasen waren signifikant ($p = 0.018$), während bezüglich des AR-Status keine signifikanten Unterschiede bestanden ($p = 0.21$). Cramèrs V betrug 0.2

Dies ist die erste Studie, die signifikante Unterschiede in den Häufigkeiten der TMPRSS2-ERG Genfusion bei Lokalrezidiven und bei Fernmetastasen von kastrationsresistenten Prostatakarzinomen aufzeigt. Im Gegensatz zu früher durchgeführten Studien untersuchten wir eine homogene, klar definierte Kohorte. Da die Häufigkeit der AR-Amplifikation unserer Kohorte den berichteten Häufigkeiten früherer Studien an vergleichbaren Kohorten ähnelt, konnten wir zeigen, dass unsere Ergebnisse insgesamt mit früheren Studien vergleichbar sind.

Über mögliche Ursachen für die unterschiedlichen Häufigkeiten der TMPRSS2-ERG Genfusion in Lokalrezidiven und Fernmetastasen können wir nur spekulieren.

Möglicherweise ist die Androgen-Sensitivität im Bereich der Prostata höher als in anderen Regionen des Körpers. Dadurch wäre auch die androgenabhängige Protease TMPRSS2 in dieser Region aktiver, während sie in Fernmetastasen weniger aktiv wäre. So könnte eine negative Selektion von androgenabhängigen Prostatakarzinomen mit der TMPRSS2-ERG Genfusion in Fernmetastasen auftreten.

Eine andere mögliche Erklärung ist, dass die TMPRSS2-ERG Genfusion lokales invasives Wachstum begünstigt, nicht jedoch die Fernmetastasierung. Dadurch würden TMPRSS2-ERG positive Prostatakarzinomen vor allem im Bereich der Prostata rezidivieren und weniger in anderen Regionen des Körpers.

Literaturverzeichnis

1. Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.) (2012) Krebs in Deutschland 2007/2008. Berlin.

2. Steinberg GD, Carter BS, Beaty TH, Childs B, Walsh PC (1990) Family history and the risk of prostate cancer. Prostate 17: 337-347.

3. Johns LE, Houlston RS (2003) A systematic review and meta-analysis of familial prostate cancer risk. BJU Int 91: 789-794.

4. Hoffman RM, Gilliland FD, Eley JW, Harlan LC, Stephenson RA, et al. (2001) Racial and ethnic differences in advanced-stage prostate cancer: the Prostate Cancer Outcomes Study. J Natl Cancer Inst 93: 388-395.

5. 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: 95-101.

6. Harris R, Lohr KN (2002) Screening for prostate cancer: an update of the evidence for the U.S. Preventive Services Task Force. Ann Intern Med 137: 917-929.

7. Eichler K, Hempel S, Wilby J, Myers L, Bachmann LM, et al. (2006) Diagnostic value of systematic biopsy methods in the investigation of prostate cancer: a systematic review. J Urol 175: 1605-1612.

8. Wittekind, Christian (Hrsg.) (2010) TNM-Klassifikation maligner Tumoren. Wiley-Blackwell. 7. Auflage. XIX, 295 S. Weinheim.

9. Gleason DF (1977) The Veteran's Administration Cooperative Urologic Research Group: histologic grading and clinical staging of prostatic carcinoma. In: Tannenbaum M, editor. Urologic pathology: The Prostate. Philadelphia: Lea & Febiger. pp. XII, 419 S. : Ill. u. graph. Darst.

10. Epstein JI, Allsbrook WC, Jr., Amin MB, Egevad LL (2005) The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. Am J Surg Pathol 29: 1228-1242.

11. Humphrey PA (2004) Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate. Mod Pathol 17: 292-306.

12. Albertsen PC, Hanley JA, Gleason DF, Barry MJ (1998) Competing risk analysis of men aged 55 to 74 years at diagnosis managed conservatively for clinically localized prostate cancer. JAMA 280: 975-980.

13. Thompson I, Thrasher JB, Aus G, Burnett AL, Canby-Hagino ED, et al. (2007) Guideline for the management of clinically localized prostate cancer: 2007 update. J Urol 177: 2106-2131.

14. Sakr WA, Haas GP, Cassin BF, Pontes JE, Crissman JD (1993) The frequency of carcinoma and intraepithelial neoplasia of the prostate in young male patients. J Urol 150: 379-385.

15. Lu-Yao GL, Yao SL (1997) Population-based study of long-term survival in patients with clinically localised prostate cancer. Lancet 349: 906-910.

16. Cooperberg MR, Vickers AJ, Broering JM, Carroll PR (2010) Comparative risk-adjusted mortality outcomes after primary surgery, radiotherapy, or androgen-deprivation therapy for localized prostate cancer. Cancer 116: 5226-5234.

17. Abdollah F, Sun M, Thuret R, Jeldres C, Tian Z, et al. (2011) A competing-risks analysis of survival after alternative treatment modalities for prostate cancer patients: 1988-2006. Eur Urol 59: 88-95.

18. Michl U, Graefen M, Noldus J, Eggert T, Huland H (2003) [Functional results of various surgical techniques for radical prostatectomy]. Urologe A 42: 1196-1202.

19. Ficarra V, Novara G, Artibani W, Cestari A, Galfano A, et al. (2009) Retropubic, laparoscopic, and robot-assisted radical prostatectomy: a systematic review and cumulative analysis of comparative studies. Eur Urol 55: 1037-1063.

20. Heidenreich A, Varga Z, Von Knobloch R (2002) Extended pelvic lymphadenectomy in patients undergoing radical prostatectomy: high incidence of lymph node metastasis. J Urol 167: 1681-1686.

21. Kupelian PA, Potters L, Khuntia D, Ciezki JP, Reddy CA, et al. (2004) Radical prostatectomy, external beam radiotherapy <72 Gy, external beam radiotherapy > or =72 Gy, permanent seed implantation, or combined seeds/external beam radiotherapy for stage T1-T2 prostate cancer. Int J Radiat Oncol Biol Phys 58: 25-33.

22. Arcangeli G, Strigari L, Arcangeli S, Petrongari MG, Saracino B, et al. (2009) Retrospective comparison of external beam radiotherapy and radical prostatectomy in high-risk, clinically localized prostate cancer. Int J Radiat Oncol Biol Phys 75: 975-982.

23. Takizawa I, Hara N, Nishiyama T, Kaneko M, Hoshii T, et al. (2009) Oncological results, functional outcomes and health-related quality-of-life in men who received a radical prostatectomy or external beam radiation therapy for localized prostate cancer: a study on long-term patient outcome with risk stratification. Asian J Androl 11: 283-290.

24. Salembier C, Lavagnini P, Nickers P, Mangili P, Rijnders A, et al. (2007) Tumour and target volumes in permanent prostate brachytherapy: a supplement to the ESTRO/EAU/EORTC recommendations on prostate brachytherapy. Radiother Oncol 83: 3-10.

25. Storey MR, Landgren RC, Cottone JL, Stallings JW, Logan CW, et al. (1999) Transperineal 125iodine implantation for treatment of clinically localized prostate cancer: 5-year tumor control and morbidity. Int J Radiat Oncol Biol Phys 43: 565-570.

26. D'Amico A V, Tempany CM, Schultz D, Cormack RA, Hurwitz M, et al. (2003) Comparing PSA outcome after radical prostatectomy or magnetic resonance imaging-guided partial prostatic irradiation in select patients with clinically localized adenocarcinoma of the prostate. Urology 62: 1063-1067.

27. Sharkey J, Cantor A, Solc Z, Huff W, Chovnick SD, et al. (2005) 103Pd brachytherapy versus radical prostatectomy in patients with clinically localized prostate cancer: a 12-year experience from a single group practice. Brachytherapy 4: 34-44.

28. Beyer DC, Brachman DG (2000) Failure free survival following brachytherapy alone for prostate cancer: comparison with external beam radiotherapy. Radiother Oncol 57: 263-267.

29. D'Amico AV, Whittington R, Malkowicz SB, Schultz D, Blank K, et al. (1998) Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer. JAMA 280: 969-974.

30. Klotz L (2005) Active surveillance for prostate cancer: for whom? J Clin Oncol 23: 8165-8169.

31. Klotz L, Zhang L, Lam A, Nam R, Mamedov A, et al. (2010) Clinical results of long-term follow-up of a large, active surveillance cohort with localized prostate cancer. J Clin Oncol 28: 126-131.

32. Roach M, 3rd, Hanks G, Thames H, Jr., Schellhammer P, Shipley WU, et al. (2006) Defining biochemical failure following radiotherapy with or without hormonal therapy in men with clinically localized prostate cancer:

recommendations of the RTOG-ASTRO Phoenix Consensus Conference. Int J Radiat Oncol Biol Phys 65: 965-974.

33. Freedland SJ, Sutter ME, Dorey F, Aronson WJ (2003) Defining the ideal cutpoint for determining PSA recurrence after radical prostatectomy. Prostate-specific antigen. Urology 61: 365-369.

34. Nguyen PL, D'Amico AV, Lee AK, Suh WW (2007) Patient selection, cancer control, and complications after salvage local therapy for postradiation prostate-specific antigen failure: a systematic review of the literature. Cancer 110: 1417-1428.

35. Jereczek-Fossa BA, Orecchia R (2007) Evidence-based radiation oncology: definitive, adjuvant and salvage radiotherapy for non-metastatic prostate cancer. Radiother Oncol 84: 197-215.

36. Loblaw DA, Mendelson DS, Talcott JA, Virgo KS, Somerfield MR, et al. (2004) American Society of Clinical Oncology recommendations for the initial hormonal management of androgen-sensitive metastatic, recurrent, or progressive prostate cancer. J Clin Oncol 22: 2927-2941.

37. Loblaw DA, Virgo KS, Nam R, Somerfield MR, Ben-Josef E, et al. (2007) Initial hormonal management of androgen-sensitive metastatic, recurrent, or progressive prostate cancer: 2006 update of an American Society of Clinical Oncology practice guideline. J Clin Oncol 25: 1596-1605.

38. Nair B, Wilt T, MacDonald R, Rutks I (2002) Early versus deferred androgen suppression in the treatment of advanced prostatic cancer. Cochrane Database Syst Rev: CD003506.

39. Roudier MP, True LD, Higano CS, Vesselle H, Ellis W, et al. (2003) Phenotypic heterogeneity of end-stage prostate carcinoma metastatic to bone. Hum Pathol 34: 646-653.

40. Tannock IF, de Wit R, Berry WR, Horti J, Pluzanska A, et al. (2004) Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. N Engl J Med 351: 1502-1512.

41. Winquist E, Waldron T, Berry S, Ernst DS, Hotte S, et al. (2006) Non-hormonal systemic therapy in men with hormone-refractory prostate cancer and metastases: a systematic review from the Cancer Care Ontario Program in Evidence-based Care's Genitourinary Cancer Disease Site Group. BMC Cancer 6: 112.

42. Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, Dhanasekaran SM, Mehra R, et al. (2005) Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. Science 310: 644-648.

43. Mosquera JM, Mehra R, Regan MM, Perner S, Genega EM, et al. (2009) Prevalence of TMPRSS2-ERG fusion prostate cancer among men undergoing prostate biopsy in the United States. Clinical Cancer Research 15: 4706-4711.
44. Clark JP, Cooper CS (2009) ETS gene fusions in prostate cancer. Nat Rev Urol 6: 429-439.

45. Perner S (2010) [Dangerous liaisons in prostate cancer. Clinical and biological implications of recurrent gene fusions]. Pathologe 31 Suppl 2: 121-125.

46. Perner S, Demichelis F, Beroukhim R, Schmidt FH, Mosquera JM, et al. (2006) TMPRSS2:ERG fusion-associated deletions provide insight into the heterogeneity of prostate cancer. Cancer Res 66: 8337-8341.

47. Salami SS, Schmidt F, Laxman B, Regan MM, Rickman DS, et al. (2011) Combining urinary detection of TMPRSS2:ERG and PCA3 with serum PSA to predict diagnosis of prostate cancer. Urol Oncol.

48. He H, Magi-Galluzzi C, Li J, Carver P, Falzarano S, et al. (2011) The diagnostic utility of novel immunohistochemical marker ERG in the workup of prostate biopsies with "atypical glands suspicious for cancer". Am J Surg Pathol 35: 608-614.

49. Rice KR, Chen Y, Ali A, Whitman EJ, Blase A, et al. (2010) Evaluation of the ETS-related gene mRNA in urine for the detection of prostate cancer. Clin Cancer Res 16: 1572-1576.

50. Scheble VJ, Braun M, Beroukhim R, Mermel CH, Ruiz C, et al. (2010) ERG rearrangement is specific to prostate cancer and does not occur in any other common tumor. Mod Pathol 23: 1061-1067.

51. Feldman BJ, Feldman D (2001) The development of androgen-independent prostate cancer. Nature Reviews Cancer 1: 34-45.

52. Bubendorf L, Kononen J, Koivisto P, Schraml P, Moch H, et al. (1999) Survey of gene amplifications during prostate cancer progression by high-throughout fluorescence in situ hybridization on tissue microarrays. Cancer Res 59: 803-806.

53. Visakorpi T, Hyytinen E, Koivisto P, Tanner M, Keinanen R, et al. (1995) In vivo amplification of the androgen receptor gene and progression of human prostate cancer. Nat Genet 9: 401-406.

54. Brinkmann AO, Blok LJ, de Ruiter PE, Doesburg P, Steketee K, et al. (1999) Mechanisms of androgen receptor activation and function. J Steroid Biochem Mol Biol 69: 307-313.

55. Cai C, Wang H, Xu Y, Chen S, Balk SP (2009) Reactivation of androgen receptor-regulated TMPRSS2:ERG gene expression in castration-resistant prostate cancer. Cancer Res 69: 6027-6032.

56. Han B, Mehra R, Lonigro RJ, Wang L, Suleman K, et al. (2009) Fluorescence in situ hybridization study shows association of PTEN deletion with ERG rearrangement during prostate cancer progression. Mod Pathol 22: 1083-1093.

57. Leinonen KA, Tolonen TT, Bracken H, Stenman UH, Tammela TL, et al. (2010) Association of SPINK1 expression and TMPRSS2:ERG fusion with prognosis in endocrine-treated prostate cancer. Clin Cancer Res 16: 2845-2851.

58. Mehra R, Tomlins SA, Yu J, Cao X, Wang L, et al. (2008) Characterization of TMPRSS2-ETS gene aberrations in androgen-independent metastatic prostate cancer. Cancer Res 68: 3584-3590.

59. Rickman DS, Chen YB, Banerjee S, Pan Y, Yu J, et al. (2010) ERG cooperates with androgen receptor in regulating trefoil factor 3 in prostate cancer disease progression. Neoplasia 12: 1031-1040.

60. Saramaki OR, Harjula AE, Martikainen PM, Vessella RL, Tammela TL, et al. (2008) TMPRSS2:ERG fusion identifies a subgroup of prostate cancers with a favorable prognosis. Clin Cancer Res 14: 3395-3400.

61. Ruiz C, Holz DR, Oeggerli M, Schneider S, Gonzales IM, et al. (2011) Amplification and overexpression of vinculin are associated with increased tumour cell proliferation and progression in advanced prostate cancer. J Pathol 223: 543-552.

62. van der Ploeg M (2000) Cytochemical nucleic acid research during the twentieth century. Eur J Histochem 44: 7-42.

63. Braun M, Scheble V, Menon R, Scharf G, Wilbertz T, et al. (2011) Relevance of cohort design for studying the frequency of the ERG rearrangement in prostate cancer. Histopathology in press.

64. Tomlins SA, Bjartell A, Chinnaiyan AM, Jenster G, Nam RK, et al. (2009) ETS gene fusions in prostate cancer: from discovery to daily clinical practice. Eur Urol 56: 275-286.

65. Guo CC, Dancer JY, Wang Y, Aparicio A, Navone NM, et al. (2011) TMPRSS2-ERG gene fusion in small cell carcinoma of the prostate. Hum Pathol 42: 11-17.

66. Scheble VJ, Braun M, Wilbertz T, Stiedl AC, Petersen K, et al. (2010) ERG rearrangement in small cell prostatic and lung cancer. Histopathology 56: 937-943.

67. Brown RS, Edwards J, Dogan A, Payne H, Harland SJ, et al. (2002) Amplification of the androgen receptor gene in bone metastases from hormone-refractory prostate cancer. J Pathol 198: 237-244.

68. Linja MJ, Savinainen KJ, Saramaki OR, Tammela TL, Vessella RL, et al. (2001) Amplification and overexpression of androgen receptor gene in hormone-refractory prostate cancer. Cancer Res 61: 3550-3555.

69. Koivisto PA, Helin HJ (1999) Androgen receptor gene amplification increases tissue PSA protein expression in hormone-refractory prostate carcinoma. J Pathol 189: 219-223.

70. Perner S, Mosquera JM, Demichelis F, Hofer MD, Paris PL, et al. (2007) TMPRSS2-ERG fusion prostate cancer: an early molecular event associated with invasion. Am J Surg Pathol 31: 882-888.

71. Perner S, Svensson MA, Hossain RR, Day JR, Groskopf J, et al. (2010) ERG rearrangement metastasis patterns in locally advanced prostate cancer. Urology 75: 762-767.

72. Demichelis F, Fall K, Perner S, Andren O, Schmidt F, et al. (2007) TMPRSS2:ERG gene fusion associated with lethal prostate cancer in a watchful waiting cohort. Oncogene 26: 4596-4599.

73. Nam RK, Sugar L, Yang W, Srivastava S, Klotz LH, et al. (2007) Expression of the TMPRSS2:ERG fusion gene predicts cancer recurrence after surgery for localised prostate cancer. Br J Cancer 97: 1690-1695.

74. Gopalan A, Leversha MA, Satagopan JM, Zhou Q, Al-Ahmadie HA, et al. (2009) TMPRSS2-ERG gene fusion is not associated with outcome in patients treated by prostatectomy. Cancer Res 69: 1400-1406.

75. Lee K, Chae JY, Kwak C, Ku JH, Moon KC (2010) TMPRSS2-ERG gene fusion and clinicopathologic characteristics of Korean prostate cancer patients. Urology 76: 1268 e1267-1213.

76. Pettersson A, Graff RE, Bauer SR, Pitt MJ, Lis RT, et al. (2012) The TMPRSS2:ERG rearrangement, ERG expression, and prostate cancer outcomes: a cohort study and meta-analysis. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 21: 1497-1509.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Einteilung der Differenzierungsgrade von Prostatakarzinomen nach Gleason[9,11] 10

Abbildung 2: Gewebeherkunft der Fernmetastasen 19

Abbildung 3 oben: H&E-gefärbter Paraffin-Schnitt einer Prostata mit PCa. Unten: Markierung des Tumorgewebes. * markiert die Urethra..... 21

Abbildung 4: Funktionsweise eines FISH-Auflichtmikroskops. Der Anregungsfilter lässt nur Licht mit der benötigten Wellenlänge zur Anregung des Fluorochroms passieren. Strahlteiler und Sperrfilter lassen nur das emittierte Licht passieren. 24

Abbildung 5: Schematische Darstellung des ERG Translokations-Assay. (A) Normaler ERG-Status, (B) ERG Rearrangement via Translokation, (C) ERG Rearrangement via Deletion. 28

Abbildung 6 oben und unten: Die prozentuale Verteilung der TMPRSS2-ERG Genfusion und der AR Amplifikation in Lokalrezidiven und Fernmetastasen von Prostatakarzinomen. 32

Abbildung 7: FISH-Bilder. (A) Normaler ERG-Status, (B) ERG Rearrangement via Translokation, (C) ERG Rearrangement via Deletion. (D) Normaler AR-Status, (E) AR Amplifikation 33

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: TNM-Klassifikation des Prostatakarzinoms nach [8]..... 8

Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in der folgenden Publikation veröffentlicht:

Scheble VJ, **Scharf G**, Braun M, Ruiz C, Stürm S, Petersen K, Beschorner R, Bachmann A, Zellweger T, Fend F, Kristiansen G, Bubendorf L, Wernert N, Shaikhibrahim Z, Perner S. – „ERG rearrangement in local recurrences compared to distant metastases of castration resistant prostate cancer." – Virchows Arch. 2012 Aug; 461(2): 157-62.

Erklärung zum Eigenanteil

Gregor Scharf: Unter wissenschaftlicher Leitung von Prof. Dr. med. Sven Perner und Dr. med. Veit Scheble erfolgte die Planung der Studie, die Rekrutierung der Proben aus dem Archiv, die Sichtung der H&E-Schnitte, die Erstellung der Tübinger TMAs, die FISH-Färbung der Tübinger TMAs, die Auswertung der Tübinger TMAs und die statistische Auswertung.

Karen Petersen und Christine Beschorner: Technische Unterstützung bei der Erstellung der TMAs und der FISH-Färbung.

Dr. med. Martin Braun: Bereitstellung der Fotos in Abbildungen 3 und 6.

AG Bubendorf (Leitung Prof. Dr. med Lukas Bubendorf) mit Dr. med. Christian Ruiz, Institut für Pathologie, Universitätsspital Basel, Schweiz: Erstellung und Auswertung der Baseler TMAs.

Danksagung

An erster Stelle gebührt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Sven Perner großer Dank für die Überlassung des Themas und die hervorragende wissenschaftliche Betreuung. Bei Fragen und Problemen stand er mir stets mit fundiertem Fachwissen unterstützend zur Seite und förderte und forderte mein wissenschaftliches Arbeiten und Denken durch sein Engagement. Ich bin Herrn Prof. Dr. med. Sven Perner außerordentlich dankbar, dass er diese Dissertation ermöglichte und so mein wissenschaftliches Interesse weckte.

Herrn Dr. med. Veit Scheble möchte ich für die Betreuung meiner Arbeit danken, er war kompetenter Ansprechpartner und trotz klinischer und wissenschaftlicher Belastung immer hilfsbereit.

Außerdem gilt mein Dank den Doktoranden der AG Perner, auch sie hatten immer ein offenes Ohr bei Fragen und Problemen jedweder Art.

Besonderer Dank geht auch an Karen Petersen und Christine Beschorner, die mich bei der Erstellung der TMAs und der FISH-Färbung mit Rat und Tat unterstützten.

Herzlichen Dank auch Herrn Dr. med. Christian Ruiz und der AG Bubendorf für das zur Verfügung stellen der Daten aus Basel.

Weiterhin möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Falko Fend danken, der als Leiter des Instituts für Pathologie am Universitätsklinikum Tübingen diese Dissertationsschrift und die dazu notwendigen Untersuchungen ermöglicht hat.

Zuletzt möchte ich meiner Familie und meinen Freunden für die bedingungslose Unterstützung danken.

Curriculum vitae

- **Zur Person**
  - Gregor Heinrich Scharf
  - Geboren am 18.01.1986 in Ulm
  - ledig

- **Beruflicher Werdegang**
  - Seit 07/2012 Assistenzarzt in Weiterbildung am Institut für Röntgendiagnostik des Universitätsklinikums Regensburg

- **Wissenschaftlicher Werdegang**
  - 17.08.2012 – 10.02.2013 Doktorand am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Tübingen

- **Ausbildung**
  - 22.06.2012 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
  - 27.03.2008 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
  - 2006-2012 Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
  - 2001-2005 Johann-Sebastian-Bach-Gymnasium Mannheim Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (Note 1,7)
  - 1996-2001 Hans und Sophie Scholl-Gymnasium Ulm
  - 1992-1996 Meinloh-Grundschule Ulm-Söflingen

- **Publikationen**
  - Braun M, Scheble VJ, Menon R, **Scharf G**, Wilbertz T, Petersen K, Beschorner C, Reischl M, Kuefer R, Schilling D, Stenzl A, Kristiansen G, Rubin MA, Fend F, Perner S., Relevance of cohort design for studying the frequency of the ERG rearrangement in prostate cancer., Histopathology 2011

- Scheble VJ, **Scharf G**, Braun M, Ruiz C, Stürm S, Petersen K, Bachmann A, Zellweger T, Fend F, Kristiansen G, Bubendorf L, Wernert N, Shaikhibrahim Z, Perner S., ERG rearrangement in local recurrences compared to distant metastases of castration-resistant prostate cancer., Virchows Archive 2012

- **Praktika / Seminare**
  - 2009 Famulatur am Universitätsklinikum Tübingen (Pathologie)
  - 2009 Famulatur am Universitätsklinikum Mannheim (Hals-Nasen-Ohrenheilkunde)
  - 2008 Famulatur am Universitätsklinikum Mannheim (Orthopädie/Unfallchirurgie)

- **Sprachkenntnisse**
  - Deutsch – Muttersprache
  - Englisch – Fließend in Wort und Schrift
  - Französisch – Grundkenntnisse