

Aus dem Institut für Pathologie
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. Sven Perner

***TRIM24* als prognostischer Biomarker im
Prostatakarzinom in Korrelation mit *AR*, *Ki-67* und *ERG***

Inauguraldissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Universität zu Lübeck

- Aus der Sektion Medizin –

vorgelegt von

Doris Roth

aus Weißenburg i. Bay.

Lübeck 2020

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Sven Perner

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Ingo Kausch-Blecken von Schmeling

Tag der mündlichen Prüfung: 15.09.2022

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 15.09.2022

-Promotionskommission der Sektion Medizin-

Für unsere Patienten

Und

Gegen den Krebs

Abkürzungsverzeichnis:

AR	=	Androgenrezeptor
BRD7	=	Bromodomain containing 7
CRPC	=	Castration resistant prostate cancer
DNA	=	Desoxyribunucleic acid
ERG	=	ETS-related gene
FISH	=	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
GG	=	Grade Group
HE	=	Hämatoxylin Eosin
IHC	=	Immunhistochemie
JÜR	=	Jahres-Überlebensrate
Ki-67	=	Kiel-67
PCa	=	Prostatakarzinom
p-TUR-P	=	palliative Transurethrale Resektion der Prostata
RA	=	retinoid acid
RKI	=	Robert Koch-Institut
RNA	=	Ribonucleic acid
ROI	=	region of interest
RPE	=	radikale Prostatektomie
SPOP	=	speckle-type POZ protein
tif-1-alpha	=	transcription intermediary factor 1-alpha
TMA	=	tissue microarray
TMPRSS2	=	transmembrane protease serine 2
TRIM24	=	tripartite motif protein 24

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	5
1 EINLEITUNG	9
1.1 Epidemiologische Daten des Prostatakarzinoms	9
1.1.1 Inzidenz und Mortalität des Prostatakarzinoms in Deutschland	9
1.1.2 Inzidenz und Mortalität global	10
1.2 Prostatakarzinom - Klinik.....	10
1.2.1 Risikofaktoren.....	10
1.2.2 Früherkennung	10
1.2.3 Pathologie.....	11
1.2.4 Stadieneinteilung des Prostatakarzinoms	11
1.2.5 Symptome	12
1.2.6 Diagnostik an Stanzbiopsien und Grading nach dem Gleason Score	13
1.2.7 Therapieprinzipien.....	14
1.3 Die <i>TRIM</i> -Proteine:	14
1.3.1 Definition und Aufbau	14
1.3.2 Mechanismus der Ubiquitinierung.....	15
1.3.3 Funktionelle Rolle der <i>TRIM</i> -Proteine	16
1.3.4 Charakterisierung einzelner <i>TRIM</i> -Proteine	17
1.4 <i>TRIM24</i> :	17
1.4.1 <i>TRIM24</i> allgemein: Begriff, Lokalisation, Funktion.....	17
1.4.2 Onkogenwirkung von <i>TRIM24</i>	18
1.4.3 Tumorsupprimierende Wirkung von <i>TRIM24</i>	18
1.4.4 Rolle von <i>TRIM24</i> bei Multikomplexbildung, Retinsäure und Leber.....	18
1.4.5 <i>TRIM24</i> und <i>p53</i>	19
1.5 <i>AR</i>	20
1.5.1 <i>AR</i> Definition und Funktion	20

1.5.2	AR in Interaktion mit <i>TRIM24</i>	20
1.6	Ki-67.....	21
1.7	ERG	22
1.8	Ziele	24
1.9	Fragestellung	25
2	MATERIAL UND METHODEN	26
2.1	<i>In silico</i> -Analyse zur Detektion relevanter <i>TRIM</i> -Proteine im Prostatakarzinom.....	26
2.2	Gewebe.....	26
2.3	Kohorten.....	27
2.4	TMA-Technik.....	28
2.5	IHC-Färbemethode	29
2.5.1	Verwendete Antikörper.....	30
2.6	Semiautomatische Bildanalyse mittels <i>Definiens</i>	31
2.7	Analyse der Prostatastanzbiopsien durch visuelle Auswertung	31
2.8	Statistische Auswertungen.....	32
3	ERGEBNISTEIL	34
3.1	<i>In silico</i> Analysen	34
3.1.1	<i>In silico</i> Analyse von <i>TRIM24</i>	34
3.2	<i>TRIM24</i> -Expression in Primärtumoren aus Prostatektomien, benignem Prostatagewebe sowie Lymphknoten- und Fernmetastasen.....	36
3.2.1	Progressionsanalyse von <i>TRIM24</i>	36
3.2.2	Überlebensanalyse von <i>TRIM24</i>	37
3.2.3	Univariate Cox-Regressionsanalyse von <i>TRIM24</i>	38
3.2.4	Multivariate Cox-Regressionsanalyse von <i>TRIM24</i>	39
3.2.5	Korrelationsanalyse von <i>TRIM24</i> anhand von Kreuztabellen	39
3.3	AR	40
3.3.1	Progressionsanalyse von AR	41
3.3.2	Überlebensanalyse von AR	41

3.3.3	Korrelationsanalyse von <i>AR</i>	43
3.4	<i>Ki-67</i>	43
3.4.1	Progressionsanalyse von <i>Ki-67</i>	44
3.4.2	Überlebensanalyse von <i>Ki-67</i>	44
3.4.3	Korrelationsanalyse von <i>Ki-67</i>	47
3.5	<i>ERG</i>	48
3.5.1	Progressionsanalyse von <i>ERG</i>	48
3.5.2	Überlebensanalyse von <i>ERG</i>	49
3.5.3	Korrelationsanalyse von <i>ERG</i> anhand von Kreuztabellen	49
3.6	Korrelation der Marker <i>TRIM24</i> , <i>AR</i> , <i>Ki-67</i> und <i>ERG</i> untereinander.....	50
3.7	Auswertung von <i>TRIM24</i> auf Prostatastanzbiopsien	51
3.7.1	Überlebensanalysen von <i>TRIM24</i> auf Prostatastanzbiopsien.....	51
3.7.2	Korrelationsanalysen von <i>TRIM24</i> auf Prostatastanzbiopsien.....	52
3.7.3	Cox-Regressionsanalyse von <i>TRIM24</i> auf Prostatastanzbiopsien	52
3.7.4	Kreuztabellen zwischen den Grade Groups auf Stanzbiopsien und RPE.....	55
3.8	<i>TRIM24</i> auf Primärtumoren aus RPE in Korrelation mit <i>AR</i> , <i>Ki-67</i> und <i>ERG</i>	56
4	DISKUSSION:	57
4.1	Biomarker als diagnostische Parameter.....	57
4.1.1	Bisherige Therapiekonzepte	57
4.1.2	Notwendigkeit eines prognostischen Tools	57
4.1.3	Bisherige Prognosemarker als Therapieentscheidungsgrundlagen	57
4.1.4	Diskussion über <i>TRIM24</i> als Prognosemarker anhand unserer Ergebnisse	58
4.1.5	<i>AR</i> in Korrelation mit <i>TRIM24</i>	59
4.1.6	<i>Ki-67</i> als Proliferationsmarker	60
4.1.7	<i>ERG</i> -Fusionsgen im Prostatakarzinom.....	61
4.1.8	Korrelationen zwischen verschiedenen Biomarkern.....	62
4.2	Technische Limitationen.....	63
4.2.1	TMA	63

4.2.2	Antikörper.....	63
4.2.3	IHC	64
4.2.4	Follow-up Daten	65
4.2.5	<i>Definiens</i>	65
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	67
6	ANHANG	68
6.1	TNM-Klassifikation des Prostatakarzinoms	68
7	DANKSAGUNG	70
8	LEBENS LAUF	71
9	LITERATURVERZEICHNIS	72
10	ABBILDUNGSNACHWEISE	80

1 EINLEITUNG

1.1 Epidemiologische Daten des Prostatakarzinoms

1.1.1 Inzidenz und Mortalität des Prostatakarzinoms in Deutschland

Um einen Überblick zu schaffen, sei die Häufigkeit und Mortalität maligner Prostatatumore zunächst einmal in den epidemiologischen Hintergrund eingeordnet. Die aktuellen Daten des Robert-Koch-Institutes, welches das deutsche epidemiologische Krebsregister führt, stammen aus dem Jahr 2016. Dort wird die Inzidenz für Prostatakarzinome mit 22,7% als die häufigste Krebsneuerkrankung bei Männern angegeben. Gefolgt wird der Spitzenreiter von Lungenkarzinomen mit 13,9% und den dritten Platz belegen Darmkarzinome mit 12,5%.

Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2016
(ohne nicht-melanotischen Hautkrebs)

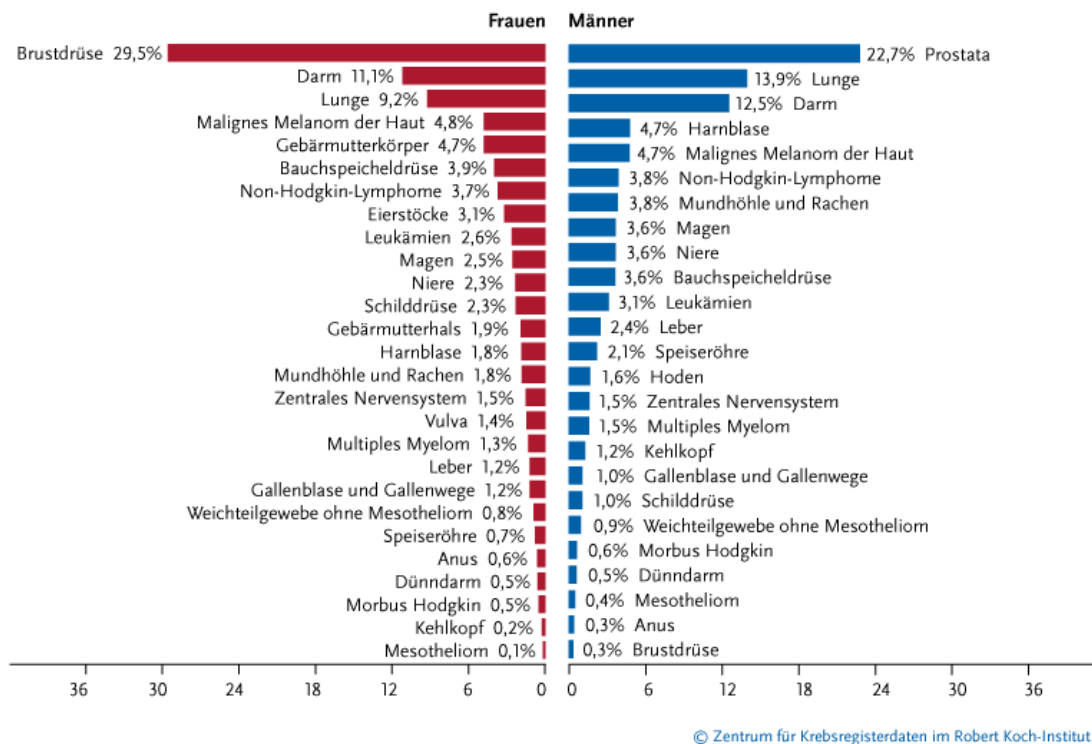


Abb. 1: Diagramm über Krebsneuerkrankungen, Robert Koch-Institut 2016

Die Rangliste der Krebsmortalität wird hingegen nicht vom Prostatakarzinom angeführt, sondern von Lungenkarzinomen mit 23,5%, danach von Prostatakarzinomen mit 11,6%, dicht gefolgt von Darmkarzinomen mit 10,8%. „Vor allem aufgrund der demografischen Entwicklung ist zwischen 2015 und 2030 in Deutschland mit einem Anstieg der Krebsneuerkrankungen um rund 23% zu

rechnen“ (Robert Koch-Institut und Gesellschaft Der Epidemiologischen Krebsregister In Deutschland E.V. 2019). Im Vergleich der 5- bzw. 10-Jahres Überlebensraten (5- bzw. 10-JÜR) schneidet das Prostatakarzinom mit jeweils knapp 90% (5-JÜR 89% und 10-JÜR 88%) deutlich besser ab, als beispielsweise Lungenkarzinome bei Männern mit einer 5-JÜR von 15% und einer 10-JÜR von 11% (Robert Koch-Institut und Gesellschaft Der Epidemiologischen Krebsregister In Deutschland E.V. 2019).

1.1.2 Inzidenz und Mortalität global

Im globalen Malignomvergleich unter männlichen Patienten von 2018 führen Lungenkarzinome sowohl die Liste der Inzidenz mit 40,4% als auch der Mortalität mit 34,1% an. Demgegenüber steht das Prostatakarzinom mit einer Inzidenz von 37,5% und einer Mortalität von 8,0% in Nationen mit hohem Entwicklungsstandard. Damit wird das Prostatakarzinom als fünft häufigste Krebstodesursache unter Männern im Jahr 2018 geschätzt (Bray et al. 2018).

1.2 Prostatakarzinom - Klinik

1.2.1 Risikofaktoren

Das Risiko für die Entstehung eines Prostatakarzinoms steigt in erster Linie mit zunehmendem Lebensalter. Zudem spielt der Lebensraum eine signifikante Rolle. Es wird ein Nord-Süd-Gefälle beobachtet, indem mehr Nordamerikaner und Nordeuropäer als Südeuropäer erkranken. Afroamerikanische Männer sind laut Datenlage ebenfalls häufiger betroffen, Asiaten eher seltener (Robert Koch-Institut und Gesellschaft Der Epidemiologischen Krebsregister In Deutschland E.V. 2019). Dazu gibt es eine familiäre Häufung von Prostatakarzinomen. Ist ein Verwandter ersten Grades betroffen, so verdoppelt bis verdreifacht sich das eigene Risiko zu erkranken (Gasser 2015).

1.2.2 Früherkennung

Die großen Unterschiede in der Überlebenserwartung beispielhaft zwischen Prostata- und Lungenkarzinomen lassen sich folgendermaßen deuten: Ein Lungenkarzinom wird oft erst im Spätstadium bemerkt, weil es keine spezifischen Frühwarnsymptome erkennen lässt und keine Früherkennungsdiagnostik dafür etabliert ist. Im Kontrast dazu wurde eine Screening-Untersuchung für das Prostatakarzinom eingeführt, welche bei normalem Risikoprofil des Patienten ab

dem 45. Lebensjahr empfohlen wird und laut einem Zitat der S3-Leitlinie Prostatakarzinom (Version 6.1, Juli 2021, Langfassung S.37) folgende Punkte beinhaltet: "Das gesetzliche Früherkennungsprogramm in Deutschland beinhaltet derzeit für Männer ab dem Alter von 45 Jahren einmal jährlich die Frage nach Beschwerden oder anderen gesundheitlichen Veränderungen, die Untersuchung der äußeren Geschlechtsorgane sowie die Tastuntersuchung der Prostata und der Lymphknoten" (AWMF 2021). Der PSA-Test im Blut ist nicht Bestandteil der gesetzlichen Früherkennung (DEGAM), da die Nutzen-Schaden-Bilanz anhand etlicher Studien kontrovers diskutiert wird. Das PSA ist zwar organ-, aber nicht karzinomspezifisch (Gasser 2015), es kann auch erhöht sein bei mechanischer Reizung der Prostata, Entzündungen oder gutartiger Prostatavergrößerung.

1.2.3 Pathologie

Histologisch liegen meist Adenokarzinome der Prostata vor, welche ihren Ursprung in den Drüsenepithelien haben. Weitere mögliche Unterformen sind kleinzellige Prostatakarzinome, duktale Prostatakarzinome oder auch muzinöse Adenokarzinome oder Plattenepithelkarzinome (Schmelz et al. 2006). In seltenen Fällen äußern sich Tumoren in der Prostata als Sarkome, welche vom mesenchymalen Gewebe ausgehen (Gasser 2015).

1.2.4 Stadieneinteilung des Prostatakarzinoms

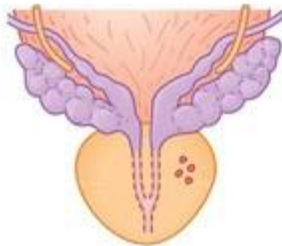
Die Kanzerogenese des Prostatakarzinoms wird anhand der TNM-Klassifikation (siehe Anhang 1) in Stadien von T1 bis T4 eingeteilt (siehe Abb. 2), je nach Ausprägung des Tumorwachstums. Stadium T1 trifft auf einen indolenten, nicht tastbaren Tumor zu. Bei Stadium T2 ist der Tumor tastbar und kann klinische Beschwerden verursachen. Ein Tumor, der die Prostatakapsel durchbrochen und eventuell die Samenblasen befallen hat, wird mit Stadium T3 bezeichnet. Im Stadium T4 hat sich der Tumor regional auf Nachbarstrukturen ausgebreitet.

Des Weiteren beschreibt der N-Status mit N0/ N1, dass kein/ ein Befall der regionalen Lymphknoten vorliegt.

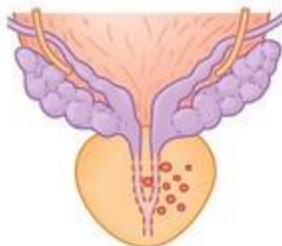
M0 besagt, dass keine Fernmetastasen nachweisbar sind, wobei M1 das Gegenteil bedeutet.

T1 **inzidentelles Karzinom**
(nicht tastbar, nicht sichtbar)

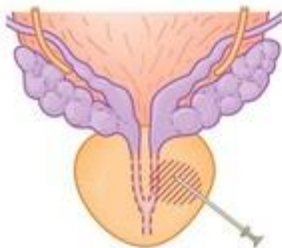
T1a $\leq 5\%$ des resezierten Gewebes



T1b $> 5\%$ des resezierten Gewebes



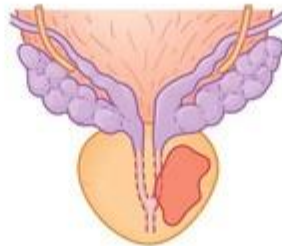
T1c Tumor durch Biopsie diagnostiziert, z. B. bei erhöhtem PSA



T4 **Tumor ist fixiert und/oder infiltriert**
z. B. Blasenhals, Sphincter externus, Rektum, Levator-muskulatur etc.

T2 **Tumor begrenzt auf Prostata**

T2a Tumor befällt einen Lappen



T2b Tumor befällt beide Lappen



T3 **Tumor durchbricht die Prostatakapsel**
(Invasion in Apex oder in die Prostatakapsel – aber nicht darüber hinaus – wird als T2 klassifiziert)

T3a einseitige extrakapsuläre Ausbreitung



T3b beidseitige extrakapsuläre Ausbreitung



T3c Tumor infiltriert die Samenblase(n)

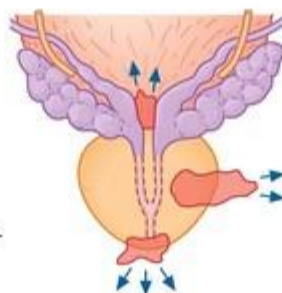
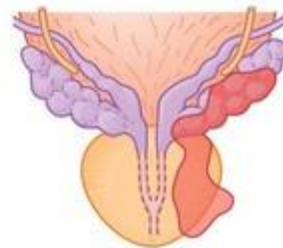


Abb. 2: Stadieneinteilung des Prostatakarzinoms T1 bis T4. Nach Kwasny P, Schulze H., aus Taschenlehrbuch Urologie, Thieme 2008.

1.2.5 Symptome

Wie bei vielen anderen Krebserkrankungen auch, gibt es beim Prostatakarzinom keine spezifischen Frühsymptome. In fortgeschrittenen Tumorstadien können

urologische Beschwerden wie Miktionsstörungen bis hin zu Harnstauungsniere durch die Größe des Tumors, der die Urethra komprimiert, Impotenz durch Invasion der kavernösen Gefäße, oder auch Schmerzen wie z.B. Rückenschmerzen durch ossäre Metastasen in der Wirbelsäule auftreten (Michel et al. 2016) (Gasser 2015). Zudem werden zirka 10% der Prostatakarzinome inzidentell bei vermuteter benigner Prostatahyperplasie, welche durch eine TUR-P abgetragen wird, entdeckt (Gasser 2015).

1.2.6 Diagnostik an Stanzbiopsien und Grading nach dem Gleason Score

Bisher werden bei einem Verdacht auf ein Prostatakarzinom 10 bis 12 Stanzbiopsien perineal oder transrektal aus verschiedenen Regionen der Prostata ultraschallgesteuert entnommen und gegebenenfalls durch MRT-gesteuerte, gezielte Biopsien ergänzt (AWMF 2021). Das histologische Grading erfolgt anhand des Gleason Scores (AWMF 2021). Hierbei werden die morphologischen Muster der Drüsenarchitektur zur Einteilung des Differenzierungsgrades beurteilt (Böcker et al. 2012). Es wird ein primäres und ein sekundäres Muster ermittelt, nach den Mustern 3 bis 5 eingeteilt und als Summe angegeben. Das primäre Muster ist das Häufigste im Tumor vorkommende, das Sekundäre ist in Stanzbiopsien das „am schlechtesten differenzierte Muster“ und in Prostatektomien das zweithäufigste Muster (Schlomm und Sauter 2016). Dabei beschreibt das Muster 3 ein Drüsenwachstum, das gut differenzierte Karzinome widerspiegelt, während das Muster 5 wenig differenzierte Karzinome beschreibt, die morphologisch stark vom benignen Prostatagewebe abweichen und einen höheren Malignitätsgrad bedeuten (Schlomm und Sauter 2016). Die Beurteilung des Gleason Scores hängt stark vom Untersucher ab und unterliegt einer teils erheblichen Interobservervariabilität (Schlomm und Sauter 2016). Um die Graduierung des Prostatakarzinoms zu vereinfachen und zu verbessern, wurde die Graduierung 2014 von der ISUP (International Society of Urological Pathology) modifiziert und 2016 von der WHO aktualisiert (Epstein et al. 2016)/ WHO 2016 (Humphrey et al. 2016). In der Überarbeitung des Gleason Scores wurden nicht nur die Grade und die dazugehörigen histologischen Muster angepasst, sondern ebenfalls ein neues Graduierungssystem vorgeschlagen. Die sogenannte „Grade Group“ unterteilt gleiche Summenzahlen des Gleason Scores in prognostisch aussagekräftigere Gruppen und schafft somit eine deutlichere und

vereinfachte Einordnung der prognostischen Gruppen. Die Umbenennung soll folgendermaßen stattfinden:

- Gleason 3 + 3 = 6 zu *Prognostic Grade Group I*,
- Gleason 3 + 4 = 7 zu *Prognostic Grade Group II*,
- Gleason 4 + 3 = 7 zu *Prognostic Grade Group III*,
- Gleason 8 zu *Prognostic Grade Group IV* und
- Gleason 9 – 10 zu *Prognostic Grade Group V*. (Schlomm und Sauter 2016)

1.2.7 Therapieprinzipien

Grundsätzlich steht beim frühen Prostatakarzinom einerseits eine radikale Therapie mit operativer Prostatektomie, Bestrahlung und andererseits eine konservative, abwartende Therapie, die sogenannte Active Surveillance zur Auswahl (Schmelz et al. 2006). Letztgenannte Therapie kann man bei einem langsam wachsenden Prostatatumor verantworten, da man oft Zeit hat, bis sich ein aggressiver Verlauf entwickelt, der ein invasives Vorgehen erfordert.

Für fortgeschrittene Tumorstadien mit Fernmetastasen wird eine Hormontherapie, gegebenenfalls in Kombination mit anderen gegen den Androgenrezeptor-Signalweg gerichtete Substanzen und/oder einer Chemotherapie eingesetzt. Bei lokal fortgeschrittenen Tumoren oder Lokalrezidiven kann das Tumolvolumen mit einer dann palliativ intendierten TUR-P verkleinert und so Symptome wie Miktionsbeschwerden verbessert werden. Ebenso gibt es das Therapiekonzept des Watchful Waiting für Patienten mit geringer Lebenserwartung und hoher Komorbidität, also dem Abwarten und Behandeln bei Beschwerden, ähnlich der Active Surveillance (Jocham 2007).

1.3 Die *TRIM*-Proteine:

1.3.1 Definition und Aufbau

TRIM steht für *Tripartite Motif Protein* und beschreibt eine "Familie" von derzeit über 80 bekannten Proteinen, welche als gemeinsames Merkmal aus folgenden drei Elementen aufgebaut sind: Einer RING-finger Domäne, ein oder zwei B-box Domänen, sowie einer damit verbundenen Coiled-Coil Region in der

aminoterminalen Region. Die Coiled-Coil Region entspricht einer Superhelix, also einer doppelt gewendelten Molekülstruktur. An der C-terminalen Domäne findet die Proteinbindung statt.

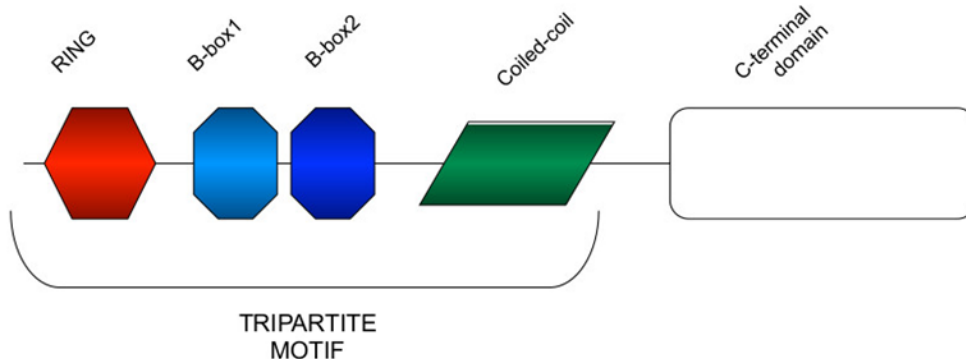


Abb. 3: Aufbau der TRIM-Proteine , (About TRIM-NET | TRIM-NET) 2019

Die RING-Finger-Domäne ist Zink-Finger ähnlich und enthält ein Cystein-Histidin-Cystein-Aminosäuremotiv, welches zwei Zinkkationen bindet. Viele Proteine mit RING-Finger-Domäne nehmen eine Schlüsselrolle in der Ubiquitinierung ein (Hatakeyama 2011). Der Mechanismus der Ubiquitinierung besteht aus post-translationalen Modifikationen, welche als Marker für Degradation von Zielproteinen durch das Proteasom, Regulation von Protein-Protein Interaktionen, sowie Enzymaktivierung fungieren (Heinrich et al. 2014).

1.3.2 Mechanismus der Ubiquitinierung

Ein Zielprotein, welches fehlgefaltet oder degeneriert ist, wird mit Ubiquitin, einem kleinen Protein bestehend aus 76 Aminosäuren „markiert“. Dadurch kann es von einer Untereinheit des Proteasoms (multikatalytische Protease= Proteinabbauapparat im Zellkern und Zytoplasma) erkannt werden. Im Proteasom werden Peptidbindungen des Zielproteins unter ATP-Verbrauch zu einzelnen Aminosäuren gespalten, dabei wird Ubiquitin nicht verbraucht, sondern recycelt.

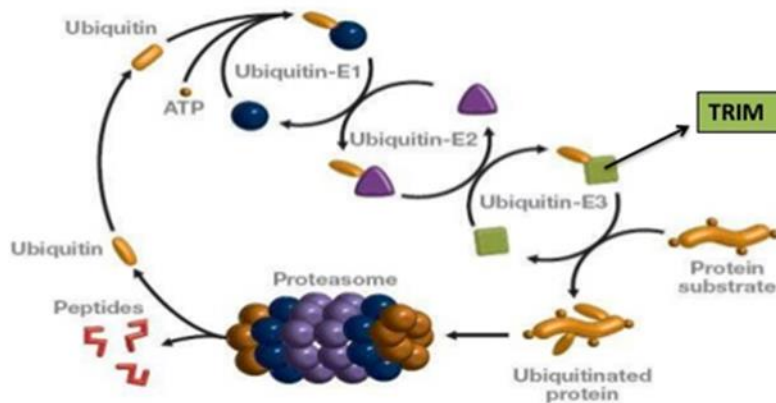


Abb. 4:
Ubiquitinierungs-
askade, aus: B-
box proteins in
plants bbx family
of plant
transcription
factors, Patidar
2014

An der Ubiquitinierung sind mindestens drei Enzyme beteiligt:

E1: Ubiquitin aktivierendes Enzym: es adenyliert die Carboxylgruppe des Ubiquitin mit ATP und verbindet ein C-terminales Glycin von Ubiquitin mit der sulfhydryl-funktionellen Gruppe eines Cysteins von E1.

E2: Ubiquitin konjugierendes Enzym: es besitzt eine kernkatalytische Domäne, die erforderlich ist für die Konjugation durch den Transfer von E1 und bildet eine Thioesterbindung mit Ubiquitin.

E3: Gerüstprotein: es vermittelt die Interaktion zwischen E2 und dem Substrat. Und wahrscheinlich ist E3 am meisten für die Substraterkennung verantwortlich.

1.3.3 Funktionelle Rolle der *TRIM*-Proteine

TRIM-Proteine sind beteiligt an Zellregulierungsprozessen wie Differenzierung, Proliferationshemmung und Zellwachstum. Ihre prognostizierte Lokalisation befindet sich intrazellulär in Stamm- und Progenitorzellen. Weitere Funktionen von *TRIM*-Proteinen sind intrazelluläre Signalübertragung, Zellentwicklung, Apoptose, Qualitätskontrolle von Proteinen, angeborene Immunität und Autophagie. (Hatakeyama 2011), (Hatakeyama 2017).

Im Falle der Dysregulation von *TRIM*-Proteinen, wie zum Beispiel Überexpression oder Unterdrückung, können gravierende Folgen, wie Zelldegeneration und Karzinogenese entstehen (Hatakeyama 2011).

1.3.4 Charakterisierung einzelner *TRIM*-Proteine

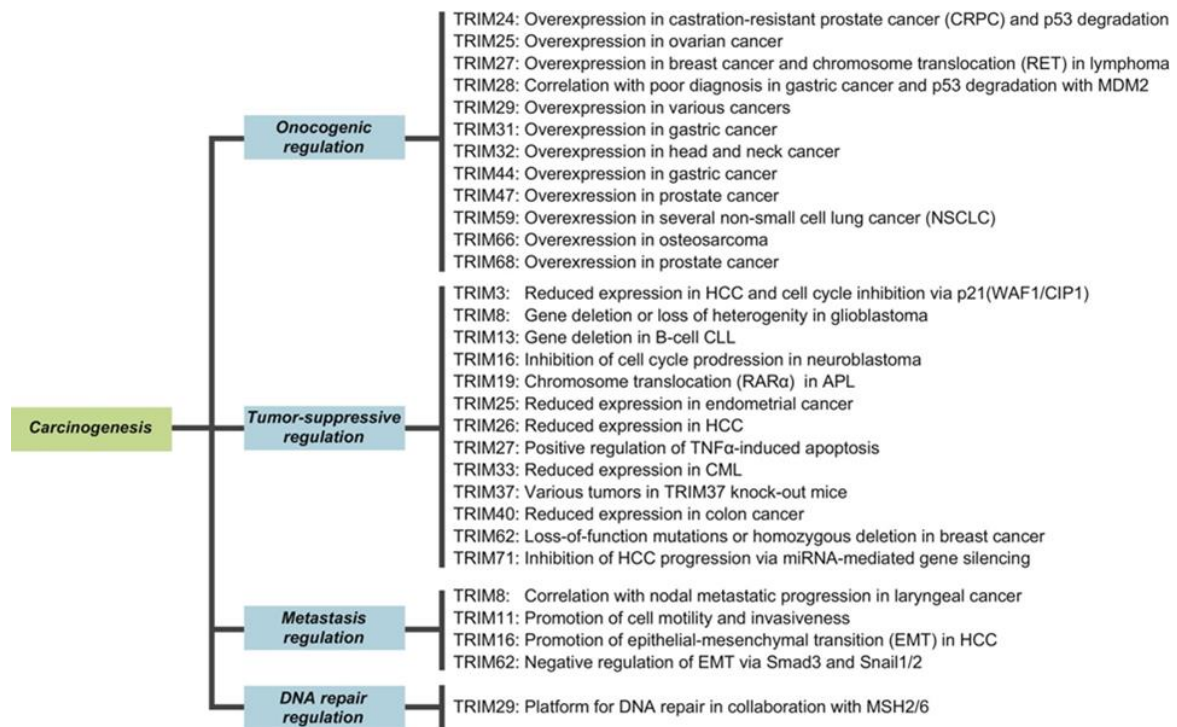


Abb. 5: Charakterisierung von TRIM- Proteinen, (Hatakeyama 2017)

Diese Graphik charakterisiert Mitglieder der *TRIM*- Proteinfamilie, welche an der Karzinogenese beteiligt sind. Sie werden in der Darstellung je nach Funktion verschiedenen Gruppen zugeordnet. Dazu gehören die Regulation der Krebsentstehung als Onkogene, als Tumorsuppressor, in der Metastasierung sowie in der DNA-Reparatur. Über den Einfluss von *TRIM24* ist beispielsweise eine Überexpression im kastrationsresistenten Prostatakarzinom und eine Degradation von p53 bekannt.

1.4 *TRIM24*:

1.4.1 *TRIM24* allgemein: Begriff, Lokalisation, Funktion

In unserem Forschungsvorhaben haben wir die Expression von *TRIM24* untersucht, welches sich auf Chromosom 7q33-q34 befindet (Database). *TRIM24* hat im Rahmen der Kanzerogenese ein heterogenes Verhaltensmuster. Es ist in unterschiedlichen Entitäten verschieden stark exprimiert und diesbezüglich erfüllt es auch heterogene Funktionen. Sogar innerhalb einer Entität kann es stadienadaptiert divers ausgeprägt sein. So konnte *TRIM24* einerseits als Tumorsuppressor,

andererseits als Onkogen, identifiziert werden, worauf im Folgenden genauer eingegangen wird. Früher wurde *TRIM24* auch *tif-1-alpha* genannt. Die Bezeichnung *tif-1-alpha* geht auf den englischen Begriff „*transcription intermediary factor 1-alpha*“ zurück, was auf Deutsch so viel wie „*Transkriptionszwischenfaktor 1-alpha*“ bedeutet.

1.4.2 Onkogenwirkung von *TRIM24*

TRIM24 konnte nicht nur im Prostatakarzinom (Groner et al. 2016), sondern bereits in zahlreichen Krebsentitäten als Onkogen identifiziert werden, beispielsweise im Mammakarzinom (Chambon et al. 2011), in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs (Cui et al. 2013), im Magenkarzinom (Fang et al. 2017), im Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (Li et al. 2012), im Zervixkarzinom (Lin et al. 2017), im Glioblastom (Lv et al. 2017), im Kolonkarzinom (Wang et al. 2017a) und im Blasenkarzinom (Xue et al. 2015). Zudem wurde herausgefunden, dass *TRIM24* durch die Interaktion mit dem ihm vorgeschalteten *TRIM28* stabilisiert wird und eine Überregulierung beider Proteine im aggressiven Prostatakarzinom mit schlechterer klinischer Prognose einhergeht (Fong et al. 2018).

1.4.3 Tumorsupprimierende Wirkung von *TRIM24*

Im Gegensatz zu Forschungsbeiträgen, in denen *TRIM24* als Onkogen wirkt, wird in einer Studie von Ou et al. *TRIM24* neben *p53* als Tumorsuppressor beschrieben. Hierbei wurden Oligomerisierungsprozesse durch Adenovirus-Onkoproteine erforscht und herausgefunden, dass das Protein *E4-ORF3* ein Kernpolymer bildet und dabei Tumorsuppressoren wie *p53* und *TRIM24* inaktiviert (Ou et al. 2012).

Ein weiteres Beispiel für die tumorsupprimierende Wirkung wird im Ösophaguskarzinom beschrieben. Dort ist eine verringerte *TRIM24* Expression mit Lymphknotenmetastasen, pathologischen TNM-Stadien und Rezidiven/ Metastasen assoziiert. Hochreguliertes *TRIM24*-Protein korreliert hier positiv mit längerem Gesamtüberleben und krankheitsfreiem Überleben und ist ein unabhängiger Prädiktor für eine gute Prognose (Chi et al. 2016).

1.4.4 Rolle von *TRIM24* bei Multikomplexbildung, Retinsäure und Leber

Des Weiteren gibt es zahlreiche Forschungsbeiträge über die Rolle von *TRIM24* im Hepatozellulären Karzinom. *TRIM24* beziehungsweise *tif-1-alpha* kann mit *tif-1-beta* (*TRIM28*) und *tif-1-gamma* (*TRIM33*) einen Multikomplex bilden und so Funktionen im

Zellzyklus wahrnehmen (Herquel et al. 2011). Diese Komplexbildung spielt im Hepatozellulären Karzinom eine bedeutende Rolle. Dabei interagiert jedes der genannten *TRIM*-Proteine mit unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren. Wenn *TRIM24* im Mausmodell mit dem ligandierten Retinsäure-Rezeptor interagiert, unterdrückt es seine Transkriptionsaktivität (Khetchoumian et al. 2007). Wird *TRIM24* inaktiviert, so wird das Retinsäure-Signal in Hepatozyten im Mausmodell dysreguliert und es entsteht ein Leberzellkarzinom (Khetchoumian et al. 2007). Diese Ergebnisse legen seine Funktion eines Tumorsuppressors im Mausmodell nahe.

Als Kontroverse dazu wird *TRIM24* im humanen Lebermodell eine onkogene Wirkung zugeschrieben (Zhu et al. 2018), (Liu et al. 2014).

1.4.5 *TRIM24* und *p53*

Eine funktionelle Interaktion zwischen *TRIM24* und *p53* wird bereits in vielen Publikationen gezeigt. Als *p53* wird ein 53 kDa schweres Protein bezeichnet, welches als wichtiger Transkriptionsfaktor im Zellzyklus fungiert und als Tumorsuppressor gilt. „Das Protein wird häufig auch als >Wächter des Genoms< bezeichnet, da es bei einer Schädigung der DNA den Zellzyklus arretieren kann und so DNA-Reparatursystemen die Gelegenheit gibt, diese Schäden zu beheben“ (Heinrich et al. 2014). Das geschieht durch Zellzyklusarrest, proteasomalen Abbau und Apoptose. Zudem können bei ca. 50% der menschlichen Tumoren *p53*-Mutationen nachgewiesen werden (Heinrich et al. 2014). Unter anderem wird ein Anstieg der endogenen *p53*-Proteinspiegel durch die *shRNA*-vermittelte Unterdrückung von *TRIM24* beobachtet. Außerdem wird der Abbau von *p53* infolge von Ubiquitinierung durch *TRIM24* gefördert, weshalb *TRIM24* eine E3-Ubiquitin-Ligasefunktion für *p53* zugeschrieben wird (Allton et al. 2009).

Dazu gibt es mehrere Forschungsbeiträge, die die Herunterregulierung des Tumorsuppressors *p53* durch *TRIM24* zeigen, und somit *TRIM24* ebenfalls als Onkogen darstellen, unter anderem in menschlichen Brustkrebszellen (Allton et al. 2009). Bekräftigt wird diese Annahme dadurch, dass eine Depletion von *TRIM24* eine *p53*-abhängige Apoptose in von Tumoren abgeleiteten Zellen im Maus- und Stammzellmodell induziert (Jain und Barton 2009).

1.5 AR

1.5.1 AR Definition und Funktion

Der Androgenrezeptor (AR) gehört zu den Steroidrezeptoren und nutzt als Substrate Testosteron beziehungsweise den Metaboliten der 5-alpha-Reduktase Dihydrotestosteron (Wilson und French 1976).

Er wird durch das AR-Gen kodiert, welches sich auf dem X-Chromosom am Genlocus Xq11-12 befindet (The Universal Protein Resource 2019). Nach Aktivierung durch oben genannte Steroidhormone reguliert er als Transkriptionsfaktor die Entwicklung und Funktionserhaltung der männlichen Geschlechtsorgane. Der Androgenrezeptor hat dabei Einfluss auf das Wachstum der Prostata, die Spermatogenese und auch das pathologische Wachstum von Prostatatumoren (Askew et al. 2007).

Im Jahr 1941 wurde von Huggins and Hodges herausgefunden, dass durch Orchiectomie eine Tumorregression zu beobachten ist. Da der Hoden der Produktionsort der AR-Aktivatoren Testosteron und Dihydrotestosteron ist, wird durch diesen Eingriff der AR-Signalweg unterbrochen. Der Rückgang des Tumorwachstums lässt demnach darauf schließen, dass der AR-Signalweg eine große Bedeutung in der Karzinogenese der Prostata innehat (Huggins und Hodges 2002).

Es wurde im Verlauf der Forschungen eine medikamentöse Androgendeprivationstherapie entwickelt, die denselben Effekt wie die Orchiectomie hat, nämlich den Entzug der androgenen Hormone. Der gewünschte Effekt bleibt jedoch im Mittel nur 14-20 Monate bestehen, danach entwickelt die Mehrheit der Patienten einen sogenannten kastrationsresistenten Tumor (CRPC = Castration resistant prostate cancer) (Sharifi et al. 2005). Das CRPC kann sich äußern durch ein Tumorrezidiv bzw. einen -progress, gemessen an einem PSA-Anstieg, einem lokalen Tumorwachstum oder neu auftretenden Metastasen.

1.5.2 AR in Interaktion mit *TRIM24*

Von besonderem Interesse für unser Vorhaben ist, dass *TRIM24* bereits als wichtiger Koaktivator des AR im PCa erkannt wurde:

In einer Forschungsarbeit von Groner et. al. 2016 wurde ergründet, dass *TRIM24* in der Interaktion mit dem *AR* vor allem im CRPC eine Rolle zu spielen scheint. Einerseits verstärkt *TRIM24* die Transkriptionsaktivität von *AR*, so kommt es durch Anwesenheit von *TRIM24* auch in hormoneprimierten Zellmodellen zur erhöhten *AR*-Funktion, wodurch erst ein CRPC entstehen kann. Andererseits sind Gene, welche durch *AR* und *TRIM24* koaktiviert werden, signifikant hochreguliert im CRPC. Dazu wurde herausgefunden, dass die *TRIM24*-Expression mit Fortschreiten des Stadiums des Prostatakarzinoms ansteigt. Es konnten signifikant positive Korrelationen zwischen dem *TRIM24*-Spiegel mit dem Gleason-Score, der Tumorgroße und den *Ki67*-positiven Kernen beobachtet werden. Auch wird vermutet, dass sowohl die *TRIM24*-Expression als auch die *AR*- bzw. *TRIM24*-Gensignatur Rezidive voraussagen kann.

Außerdem wurden *SPOP*-Mutationen als Stabilisatoren von *TRIM24* im PCa identifiziert, wobei *TRIM24* befähigt ist, die Tumorzellproliferation unter niedrigen Androgenspiegeln zu fördern. Im Rahmen dessen haben CRPC-Zellanalysen gezeigt, dass die *TRIM24*-Bromodomäne und das *AR*-interacting motif essentiell sind, um die Proliferation von Tumorzellen zu verstärken (Groner et al. 2016).

In Zellmodellversuchen von Kikuchi et. al. 2009 wurde ebenfalls die Interaktion von *TRIM24* mit *AR* festgestellt, und die Steigerung der *AR*-Transkriptionsaktivität durch *TRIM24*. Zusätzlich kooperiert *TRIM24* mit *TIP60*, einer Histon-Acetyltransferase, welche als Koaktivator von *AR* fungiert, woraus nochmals Signalverstärkung resultiert. Im Kontrast dazu interagiert *TRIM24* auch mit *BRD7* (*Bromodomain containing 7*), wodurch die *AR*-vermittelte Transkriptionsaktivität unterdrückt wird (Kikuchi et al. 2009).

1.6 *Ki-67*

Ki-67 ist die Abkürzung für Kiel-67 und beschreibt ein Protein, welches in Kiel im Jahre 1983 isoliert wurde durch Immunisierung von Mäusen mit Zellkernen der Hodgkin-Lymphomzelllinie L428 (Geldes et al. 1983). Die Zahl 67 bedeutet in diesem Fall nicht die atomare Masseneinheit, wie beim oben genannten *p53*, sondern 67 war die Position des Klons in einer 96 well Platte einer Versuchsreihe von insgesamt 164 Antikörperklonen (Geldes et al. 1983).

Funktionell wird *Ki-67* die Aufgabe eines Proliferationsmarkers zugeschrieben, da das Protein nur in aktiven Phasen des Zellzyklus, wie G1, S, G2, Mitose, durch IHC-

Antikörperbindung nachgewiesen werden kann, nicht aber in ruhenden Zellen, wie dem G0 Stadium (Gerdes et al. 1984).

Ki-67 wird als Zellproliferationsmarker durch Indexbestimmung, d.h. in wieviel Prozent der Gewebezellen gerade Zellteilung stattfindet, beschrieben. In verschiedenen Tumorentitäten wie z.B. dem Mammakarzinom (Kirn et al. 2015) und auch dem Prostatakarzinom (Verma et al. 2015) (Madani et al. 2011) konnten, im Vergleich zu gesundem Gewebe, signifikante Überexpressionen des Proteins nachgewiesen werden. Die kontrastäre *Ki-67*-Indexverteilung im Tumorgewebe, im Vergleich zum Normalgewebe, entspricht auch den „hallmarks of cancer“ (La Rojo de Vega et al. 2018) (Abbildung). Dazu gehören eine anhaltende proliferative Signalgebung und Unempfindlichkeit gegenüber Antiwachstumsfaktoren (La Rojo de Vega et al. 2018), Figure 4) welche die viel höhere Zellteilungs- und somit Wachstumsrate im Tumorgewebe verdeutlichen.

Verma et al. fanden heraus, dass *Ki-67* in Prostatakarzinomen hochreguliert ist und positiv mit dem Gleason-Grade korreliert (Verma et al. 2015). Gleiche Ergebnisse lieferten Sulik et al. (Sulik et al. 2011).

Ebenfalls wurde erforscht, dass *Ki-67* ein Prognosefaktor im Prostatakarzinom ist. Pascale et al. fanden heraus, dass die *Ki-67*-Expression einen unabhängigen Prognosefaktor für das Gesamtüberleben bei Patienten mit Prostatakarzinom darstellt, indem *Ki-67* die Vorhersage des Outcomes auf der Grundlage klinisch-pathologischer Standardparameter verbessern kann (Pascale et al. 2016).

1.7 *ERG*

Das *ERG*-Gen gehört zur Familie der *ETS*-Gene und kodiert für das *ERG*-Protein (Reddy et al. 1987). Funktionell inhibiert *ERG* die Expression des Androgenrezeptors, wobei der *AR*-Signalweg gestört wird (Yu et al. 2010). Weiterhin werden Translokationen des *ERG*-Gens beobachtet, sowie eine Gen-Fusion von *TMPRSS2* und *ERG*, welche die Expression des *ERG*-Proteins verstärkt (Tomlins et al. 2005).

Die Abkürzung „*TMPRSS2:ERG*“ bzw. „*T2E*“ kommt von *transmembrane protease serine 2 (TMPRSS2):v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog (ERG)* (Wang et al. 2017b) und beschreibt eine Fusion der Gene *TMPRSS2* und *ERG* auf Chromosom 21 (Teoh et al. 2015). Die Entdeckung der *TMPRSS2:ERG*-Fusion im

Prostatakarzinom war 2007 eine einschlagende wissenschaftliche Erkenntnis, welche zahlreiche aufwendige Studien entfachte. 2007 wurde Folgendes erkannt: "Wenn wir die hohe Inzidenz von PCA und die hohe Häufigkeit dieser Genfusion berücksichtigen, ist *TMPRSS2:ERG* die häufigste genetische Aberration, die bisher bei malignen Erkrankungen des Menschen beschrieben wurde." (Perner et al. 2007).

Gemäß dieser Studie von Perner et al. 2007, in welcher genannte Genfusion durch Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) nachgewiesen wurde, kam es zu folgenden Ergebnissen: Die FISH-Methode wurde einerseits an benignem Prostatagewebe angewandt, im Einzelnen benigne Prostatahyperplasie, proliferativ entzündliche Atrophie, sowie benignes Prostatagewebe, und andererseits an malignem Gewebe, spezieller lokalisiertes Prostatakarzinom, hormonnaive und hormonrefraktäre Metastasen, sowie hochgradige intraepitheliale Prostataläsionen. Hierbei kam es lediglich bei tumorösem Gewebe zur Genfusion, mit einem Anteil von 19% bis 48,5%, je nach Stadium (Perner et al. 2007).

Ebenfalls durch FISH wurde in einer weiteren Forschungsarbeit herausgefunden, dass ungefähr die Hälfte aller Prostatektomien *ERG*-Umlagerungen aufwies. Lokalisiert waren die *ERG*-Umlagerungen häufiger in der peripheren Zone der Prostata, als in der Transitions- beziehungsweise Übergangszone (Braun et al. 2011).

In einer Untersuchung von Tsourlakis et al. wurden *TMPRSS2:ERG*-Fusionen in Prostatakarzinomen durch IHC sowohl auf Gewebeschnitten, als auch auf Patientenebene erforscht. Bei geringer Tumorgöße im Frühstadium waren 30% homogen *ERG*-positiv und 1,7% heterogen *ERG*-positiv. Es war zu beobachten, dass mit zunehmender Tumorgöße auch der heterogene *ERG*-Status bis zu 39% anstieg. Weitere Versuche auf Patientenebene zeigten, dass die *ERG*-Expression in Frühkarzinomen höher war, in Bezug auf homo- und heterogene Ausprägung, als bei älteren Patienten (Tsourlakis et al. 2016).

Da Studien zur prognostischen Bedeutung von *ERG* kein eindeutiges Bild zeigen, hat sich *ERG* bisher nicht als Prognosemarker im Prostatakarzinom etabliert.

1.8 Ziele

1. Anwendung einer *in silico*-Analyse aller humaner *TRIM*-Proteine bei verschiedenen Krebsentitäten, um für das Prostatakarzinom relevante Kandidaten zu detektieren.
2. Kohortenaufstellung und Tissue Microarray (TMA)-Herstellung.
Eine Kohorte sollte dabei aus Gewebeproben von Primärtumoren aus Stanzbiopsien, pTUR-Ps und radikalen Prostatektomien mit Einschluss von befallenen Lymphknoten von Patienten der Alb Fils Kliniken-Klinik am Eichert in Göppingen bestehen. Eine weitere Kohorte sollte metastatisches Gewebe aus Lymphknoten und Fernmetastasen von Patienten des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck beinhalten. Zur weiteren experimentellen Analyse der Gewebeproben sollten TMAs hergestellt werden.
3. Unser drittes Ziel war die Charakterisierung der *TRIM24*-Proteinexpression auf Prostatakarzinomgeweben mittels Immunhistochemie. Dabei wollten wir unsere Beobachtungen mit dem ersten Ziel, der *in silico*-Analyse, validieren. Weitere Analyseschritte waren der Vergleich der Proteinexpression von Krebsgewebe mit gutartigem Gewebe und Primärtumoren mit metastasierten Tumoren. Wir wollten Informationen darüber erhalten, ob unterschiedliche Expressionsstärken eine Stratifizierung der Karzinomstadien ermöglichen. Im Rahmen unserer Untersuchung wurde die Expression auf entsprechenden Geweben, genauer gesagt Stanzbiopsien, Prostatektomie resektaten von Primärtumoren, palliativen TUR-Ps, Lymphknotenmetastasen und Fernmetastasen gegenübergestellt. So sollte gezeigt werden, ob sich in den Geweben unterschiedliche Expressionsprofile ergeben. Unser letzter Punkt war die Bestimmung von bekannten, das Prostatakarzinom charakterisierenden Biomarkern einschließlich dem *AR* (Androgenrezeptor), der *ERG*-Expression als Surrogatmarker einer *TMPRSS2-ERG*-Fusion (Transmembranprotease, Serin 2) und dem *Ki-67*-Index (Kiel-67-Protein, ein Proliferationsmarker). Korrelationsanalysen sollten dann den Zusammenhang zwischen *TRIM24* und den o.g. Biomarkern aufzeigen.

1.9 Fragestellung

Ist *TRIM24* ein prognostischer Biomarker für das Prostatakarzinom und erlaubt eine *TRIM24*-Bestimmung eine Risikostratifizierung von Patienten? Sind entsprechende *TRIM24*-Proteinexpressionsstärken assoziiert mit unterschiedlichen Progressionsstadien des Prostatakarzinoms? Lässt sich *TRIM24* mit bereits etablierten Biomarkern wie *AR*, *Ki-67* und *ERG* im Prostatakarzinom korrelieren?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 *In silico*-Analyse zur Detektion relevanter *TRIM*-Proteine im Prostatakarzinom

Durch Studieren von Literatur über den aktuellen Forschungsstand des Prostatakarzinoms vor Beginn der Doktorarbeit, haben wir festgestellt, dass *TRIM24* häufig in Zusammenhang mit Karzinomen vorkommt. Um eine genetische Charakterisierung von *TRIM24* in verschiedenen Tumorentitäten zu untersuchen, führten wir eine *in silico*-Analyse durch.

Der Begriff *in silico*-Analyse steht in einfachen Worten für eine computergestützte Datenanalyse von Daten, die in eine digitale Datenbank eingepflegt wurden. Der Begriff „silico“ rührt dabei vom chemischen Element Silicium her, welches ein Baustein in Chips zur Datenspeicherung bei Computern ist (Schappert 2017).

In unserem Fall nutzen wir eine Datenbank, welche die genetischen Daten von zahlreichen Studien, die im Labor stattgefunden haben, beherbergt. Dazu haben wir Daten von cBioportal for Cancer Genomics, einer umfassenden Online-Datenbank für klinisch-pathologische Krebsdaten, bezogen. Hier werden kostenfrei Daten auf Gewebe- und Protein-, DNA- und RNA-Ebene zur Verfügung gestellt. Wir wählten Studien aus, welche für uns relevante Krebsentitäten, vor allem solide Tumore, auf genetischer Ebene untersuchten. So schlossen wir Studien von mehr als 30 Krebsentitäten, z.B. das Prostatakarzinom (mehrere Studien), Ovarialkarzinom, Lungenkarzinom etc. in die Analyse ein. Als nächstes wählten wir das Gen aus, über welches wir Informationen aus diesen Studien haben wollten. In unserem Fall *TRIM24*. Man kann durch solche Analysen feststellen, welche Art von genetischer Alteration vorliegt, z.B. Deletion, Amplifikation oder anderweitige Mutationen und zu welchem Anteil.

2.2 Gewebe

Folgende Gewebsarten wurden in unserem Projekt untersucht: Einerseits Primärtumore, welche mittels RPE, also kurativ intendierter radikaler Prostatektomie operativ entfernt wurden, diese werden in der Arbeit als „Primärtumoren aus RPE“ bezeichnet. Andererseits pTUR-Ps, das sind lokal fortgeschrittene oder rezidivierende Tumore, die durch transurethrale Prostataresektion im palliativen Setting zur

Symptomverbesserung gewonnen wurden. Nicht zu verwechseln mit TUR-Ps, welche anders als bei Verdacht auf ein Prostatakarzinom, zur Gewebereduktion bei gutartigen Veränderungen, wie z.B. der Benigen Prostatahyperplasie, Anwendung finden. Außerdem verwendeten wir Prostatastanzbiopsien, die zum Zeitpunkt der Erstdiagnose zur histologischen Diagnosesicherung entnommen wurden. Des Weiteren wurden Lymphknotenmetastasen und Fernmetastasen eingeschlossen. Zusätzlich untersuchten wir auch benignes, also karzinomfreies Prostatagewebe zum Vergleich. Die Unterscheidung der jeweiligen Prostatagewebe spiegelt sich auch in den für unsere Analysen gebildeten Gruppen wider. All das verwendete Gewebe lag in Form von Paraffinblöcken vor.

2.3 Kohorten

Für unser Experiment verwendeten wir zwei unabhängige Kohorten, davon eine mit Patienten aus den Alb Fils Kliniken, Standort Klinik am Eichert Göppingen sowie eine Kohorte mit Patienten des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck. Die Patienten wurden im Zeitraum von 1996 bis 2015 in der jeweiligen Klinik behandelt.

Die Göppinger Kohorte beinhaltete 650 Prostatagewebeproben von insgesamt 296 Patienten. Davon entsprechen 46 Proben gutartigen Prostatadrüsen, 518 primären Prostatakarzinomen aus Prostatektomien, 26 p-TUR-P und 30 Lymphknotenmetastasen. Für 256 der 296 Patienten waren Follow-up Daten verfügbar, welche in die Überlebensanalysen einbezogen werden konnten.

Die Überlebensdaten und klinisch-pathologische Patientendaten wurden retrospektiv in der Abteilung für Urologie, Klinik am Eichert Göppingen, erhoben und für unsere Untersuchungen berücksichtigt.

Darüber hinaus verwendeten wir 30 Fernmetastasen der Lübecker Kohorte, um alle möglichen Tumorstadien des Prostatakarzinoms in unsere Studie einbeziehen zu können.

Die übrigen Biomarker neben *TRIM24* (*AR*, *Ki-67*, *ERG*-Status) untersuchten wir nur auf den Primärtumoren gewonnen durch RPE, weil wir in unserer Studie vor allem die Progression voraussagen wollten. Hierfür wurde ein repräsentatives, zufällig ausgewähltes Subset an Primärtumoren aus RPE der Göppinger Kohorte, ohne Kenntnis der klinisch-pathologischen Daten bei Auswahl, herangezogen. Nur an

Primärtumoren weisen klassische Prognosemarker wie *Ki-67* eine prognostische Relevanz auf, da hier der Krankheitsverlauf der Patienten sehr heterogen ist. Auch die *TMPRSS2:ERG*-Translokation, in dieser Studie untersucht durch den Surrogatmarker *ERG*, ist nur für das primäre Prostatakarzinom biologisch relevant. Diese Information dient zur Erklärung der unterschiedlichen Fallzahlen für die jeweiligen Analysen.

Zusätzlich untersuchten wir *TRIM24* auf Prostatastanzbiopsien von 246 Patienten aus den Alb Fils Kliniken, Standort Klinik am Eichert Göppingen. Im Durchschnitt gehören aktuell 12 Stanzbiopsien zur Diagnostik des Prostatakarzinoms. Hierbei wählten wir bei jedem Patienten die Biopsie mit der höchsten Grade Group für unsere Versuche aus. Wenn die Grade Groups auf mehreren Stanzbiopsien eines Patienten übereinstimmten, nahmen wir diejenigen mit dem größten Tumolvolumen. Die IHC-Methode war für 224 Patienten anwendbar, auf 22 Objektträgern waren aufgrund der Dünne der Stanzbiopsien nach Anfertigen der Gewebeschnitte keine Karzinomanteile mehr abgebildet.

Ein positives Ethikvotum der universitätsinternen Ethikkommission der Universität zu Lübeck lag für die Durchführung unserer experimentellen, retrospektiven Studie vor.

2.4 TMA-Technik

Die Abkürzung TMA steht für tissue microarray und bedeutet so viel wie Gewebe-Mikroanordnung und beschreibt ein praktisches Hochdurchsatz-Screening Verfahren, womit zahlreiche Gewebeproben auf einem einzigen Objektträger aufgebracht werden. Bei dieser Methode haben wir auf jeden Objektträger von bis zu 60 Patienten jeweils drei verschiedene Gewebeproben aufgetragen, somit werden auf einem TMA 180 Proben repräsentiert. Diese Technik ermöglicht Analysen der Proben auf Ebene der Immunhistochemie, der FISH (Fluoreszenz in situ Hybridisierung), RNA in situ Hybridisierung, wobei sowohl solide Tumoren als auch Zelllinien, hämatologische Gewebe sowie Xenotransplantate als Gewebequelle fungieren können (Simon R and Sauter G, 2002).

Technisch benötigt man für die TMA-Stanzung die gewünschten Gewebeblöcke mit passenden HE-Schnitten, auf welchen wir unter dem Mikroskop den entsprechenden Gewebsabschnitt (je nach Fragestellung) markiert haben. Als nächstes wird deckungsgleich zum markierten Objektträger in den Paraffinblock mit dem Stanzapparat hinein gestanzt und eine ca. 0,6 mm durchmessende Gewebestanze

entnommen. Diese Stanze wird mithilfe des Stanzapparates in einen neuen Paraffinblock, in ein zuvor gestanztes ebenfalls 0,6 mm starkes Loch eingefügt, und parallel dazu in einer digitalen TMA-Maske am Computer die aufgetragene Probennummer des Blockes dokumentiert. Dies ist wichtig, damit die Proben nachher den Fällen zugeordnet werden können. Wichtig ist dabei darauf zu achten, dass alle Stanzen sich auf einem gleich hohen Niveau im Paraffinblock befinden, so dass beim nachfolgenden Schneiden des entstandenen TMA-Blockes lückenlos alle Proben erfasst werden. Unter Umständen sind nicht alle gestanzten Proben gleich lang, da von manchen Blöcken schon viele Schnitte angefertigt worden sind und nicht mehr so viel Restgewebe übrig ist. In diesem Fall muss man das vorgestanzte Loch im TMA mit einer Paraffinstanze auffüllen, und danach die Gewebestanze daraufsetzen, bis sie das Oberflächenniveau der anderen Stanzen erreicht. Es kann auch nötig sein, die TMA Oberfläche insgesamt zu glätten, indem man einen über dem Bunsenbrenner erhitzten Objektträger vorsichtig über die Paraffinoberfläche zieht, dadurch schmilzt das Wachs leicht und man kann gleichzeitig glätten und die Stanzen im TMA fixieren.

Sobald der TMA fertig gestanzt und abgekühlt ist, kann man 4 Mikrometer dicke Gewebeschnitte davon anfertigen, auf Superfrost Objektträger aufbringen und diese zur weiteren Analyse zum Beispiel immunhistochemisch färben. Siehe auch TMA Konstruktion nach Scheble et al. (Scheble et al. 2010).

Die TMAs für dieses Projekt wurden vornehmlich mithilfe von Medizinisch-technischen Assistenten bzw. Medizinisch-technischen Laboratoriumsassistenten hergestellt.

2.5 IHC-Färbemethode

Nach der Herstellung unserer TMAs untersuchten wir die Proteinexpression mittels Immunhistochemie, welche auf einer indirekten Antigen-Antikörper-Reaktion basiert. Hierbei verwendeten wir Antikörper als Ready-to-Use Produkte. Unsere Biomarker lagen jeweils als Primärantikörper vor, welche spezifisch gegen die uns interessierenden Antigene bzw. Epitope gerichtet waren. Diese Primärantikörper wurden durch einen Sekundärantikörper in der IHC sichtbar gemacht. Diesen Vorgang nennt man indirekte Antigen-Antikörper-Reaktion. Es bindet der Primärantikörper an das entsprechende Antigen, wobei in einer zweiten Reaktion der sekundäre Antikörper an den Primärantikörper bindet. Der Sekundärantikörper ist mit einem Konjugat

gekoppelt (Kramer). Das Konjugat ist häufig eine Peroxidase, welche enzymatisch ein Substrat umsetzt, wodurch ein detektierbares Signal ausgesendet wird (Kramer).

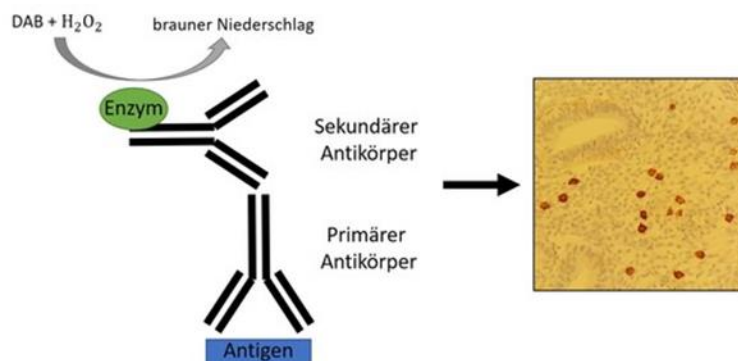


Abb. 6: Antikörpermachweis mittels indirekter Methode, (Medizinische Genetik) 2019: Umsetzung der DAB-Substratlösung durch die an den sekundären Antikörper gebundene Peroxidase zu einem braunen Niederschlag

In unserem Fall war das Signal eine braune Farbreaktion, wobei die Stärke der Braunfärbung die Stärke der Proteinexpression widerspiegelte.

2.5.1 Verwendete Antikörper

Zur *TRIM24*-Detektion verwendeten wir den *TRIM24 Rabbit Polyclonal Antibody* (14208-1-AP) vom Hersteller ProteintechAntikörper. Für den *AR*-Nachweis wendeten wir den *anti-Androgen Receptor monoclonal rabbit* (SP107, Ventana Antibodies) Antikörper an. *Ki-67* wiesen wir mit dem *Ki-67 monoclonal rabbit* (30-9, Ventana Antibodies) Antikörper der Firma Ventana nach. Für *ERG* benutzten wir den *ERG monoclonal rabbit* (EPR3864, Ventana Antibodies) Antikörper. Laut Chaux et al 2011 kann zur Detektion der *TMPRSS2:ERG* Genfusion stellvertretend die *ERG*-Expression immunhistochemisch ermittelt werden (Chaux et al. 2011).

Unsere IHC- Färbung haben wir mittels der *Ventana Discovery automated staining system* (Ventana Medical System) Maschine durchgeführt. Dazu wurden unsere auf dem Objektträger aufgetragenen Gewebeschnitte bei Raumtemperatur mit dem jeweiligen Antikörper inkubiert. Anschließend wurde der Primärantikörper mit dem *ultraView Universal DAB Detection Kit* (Ventana Medical System) detektiert. Objektträger, auf denen die Antikörperfärbung nicht funktioniert hat, weil zum Beispiel zu wenig oder kein Gewebe mehr auf dem geschnittenen TMA-Block vorhanden war, wurden von den weiteren Analysen ausgeschlossen.

2.6 Semiautomatische Bildanalyse mittels *Definiens*

Anschließend scannten wir die gefärbten Objektträger mit dem *VENTANA iScan HT Slide Scanner* der Firma Roche digital ein und überführten die TMA-Scans auf einen Computer, auf dem die Software *Definiens Tissue Studio 2.1* der Firma Definiens Inc. München, installiert ist. *Definiens* ist ein semiautomatisches Programm zur digitalen Auswertung von histologischen Präparaten, welches folgendermaßen funktioniert: Man legt einen *Workspace* für die gescannten TMAs an, indem man diese nacheinander in das Softwareprogramm transferiert. Danach hat man die Möglichkeit ein „Gittergerüst“ genau nach Format des TMAs einzurichten, bei dem für jede TMA-Stanze ein Feld vorgesehen ist. Es ist wichtig, dass die Proben vollständig im jeweiligen Feld abgebildet sind und die Gitterbegrenzungen dementsprechend angepasst werden, da nur so optimal der nächste Schritt, nämlich das Einzirkeln der ROI stattfinden kann. ROI bedeutet *region of interest*, das beschreibt den Focus auf der Probe, in dem die zu untersuchenden Zellen enthalten sind. In unserem Fall waren das einmal Tumorzellen und einmal benigne Drüsenzellen. Um die ROI zu detektieren, muss man jede Probe auf dem TMA einzeln betrachten und mit der Computermouse um die gesuchten Zellen einen Kreis zeichnen. Tumorzellen sollten nicht mit anderen Gewebsbestandteilen, zum Beispiel ähnlich aussehenden Histiozyten, welche ebenfalls angefärbt sein können, verwechselt werden, da das die Ergebnisse verfälschen kann. Wenn in allen 60 Feldern des TMAs die entsprechenden ROI eingezirkelt sind, kann man als nächstes eine *Solution* in der Software einrichten, wodurch die Expressionsstärke von dem Programm gemessen wird. In der *Solution* kann man individuell einen *Threshold* und *Cut Offs* definieren, ab welchem Färbegrad beziehungsweise welcher Expressionsstärke die gezielten Zellen als positiv erkannt werden. Nach der Analyse resultieren absolute Zahlenwerte, welche die Expressionsstärke quantitativ widerspiegeln. Je stärker die Proteinexpression ist, die durch die indirekte Antigen-Antikörper-Reaktion detektierbar gemacht wird, desto größer ist die absolute Zahl.

2.7 Analyse der Prostatastanziopsien durch visuelle Auswertung

Um unsere Färbungen von *TRIM24* auf oben genannten Geweben zu validieren, führten wir ebenfalls IHC-Färbungen mit demselben Antikörper auf Prostatastanziopsien durch. Wir wählten diese Art von Gewebe aus, weil die

Primärdiagnostik und prätherapeutische Risikoabschätzung des Prostatakarzinoms auf sogenannten Prostatastanzen erfolgt.

Anders als die oben genannten Gewebeproben führten wir die Expressionsanalyse der Prostatastanziobiopsien nicht mit Hilfe der semiautomatischen *Definiens* Software, sondern per visueller Auswertung durch. Die visuelle Auswertung beschreibt die Methode, bei der gefärbte Gewebeobjektträger unter dem Mikroskop mit dem menschlichen Auge beurteilt werden. Wir nutzten dazu eine zehnfache Vergrößerung für die Übersicht und Tumorsuche und eine 20- bis 40-fache Vergrößerung für die genauere Expressionsanalyse. Hierbei teilten wir unsere Proben nach Augenmaß in folgende Gruppen je nach Expressionsstärken ein: keine, schwache, mittelstarke und starke Expression. Diese Methode führten wir ebenfalls mit Hilfe zweier unabhängiger Pathologen durch. Diese Auswerte-Methode wurde an dieser Stelle ausgewählt, um die in der routinemäßigen Gewebsanalyse im Rahmen der Krankenversorgung verwendete Expressionsanalyse entsprechend anzuwenden.

2.8 Statistische Auswertungen

Unsere statistischen Analysen nahmen wir mit Hilfe der Statistik- und Analysesoftware *SPSS Statistics*, Version 22 der Firma IBM vor.

Zunächst führten wir Progressionsanalysen aller untersuchter Biomarker durch, indem wir Mittelwerte der Expressionsstärken in den unterschiedlichen Gewebegruppen bildeten und verglichen. Mithilfe von T-Tests wurde jeweils die statistische Signifikanz geprüft. Um das biochemisch rezidiv-freie Überleben darzustellen, nutzen wir die Kaplan-Meier-Analysen. Die Signifikanz der kumulativen Überlebensanalyse, dargestellt als Kaplan-Meier-Kurven, überprüften wir durch einen Log-rank-Test. Um die Stärke eines eventuellen Zusammenhangs zwischen zwei Merkmalen zu beurteilen, führten wir Korrelationsanalysen mittels Kreuztabellen (Chi-Quadrat) durch. Weiterführend verwendeten wir die multivariate Cox-Regressionsanalyse, um genauer zu beschreiben, wie sich die positiv korrelierenden Merkmale zueinander verändern. Durch diesen Test wollten wir ermitteln, ob unsere untersuchten Biomarker unabhängig von bereits etablierten Prognoseparametern (wie zum Beispiel der Grade Group oder dem TNM-Stadium) sind. Um die Assoziation zwischen der Stärke der Proteinexpression auf RPE-Geweben und dem biochemischen Wiederauftreten des

Prostatakarzinoms postoperativ, gemessen am PSA-Anstieg, zu untersuchen, wandten wir die univariate Cox-Analyse an.

Wir führten den exakten Test nach Fischer durch, um die Assoziation zwischen verschiedenen Expressionsgruppen und der Grade Groups zu untersuchen.

Für die ganze Arbeit wurde als Ereignis der Überlebenszeit das Auftreten eines biochemischen Rezidivs nach kurativ intendierter Prostatektomie des Prostatakarzinoms definiert. Die 1-/5-/10-Jahres-rezidivfreie-Überlebensrate (JÜR), wurde definiert durch die Zeit in Monaten, in der die Patienten nach operativer Tumorentfernung kein durch PSA-Wert-Anstieg nachweisbares Tumorrezidiv erlitten haben.

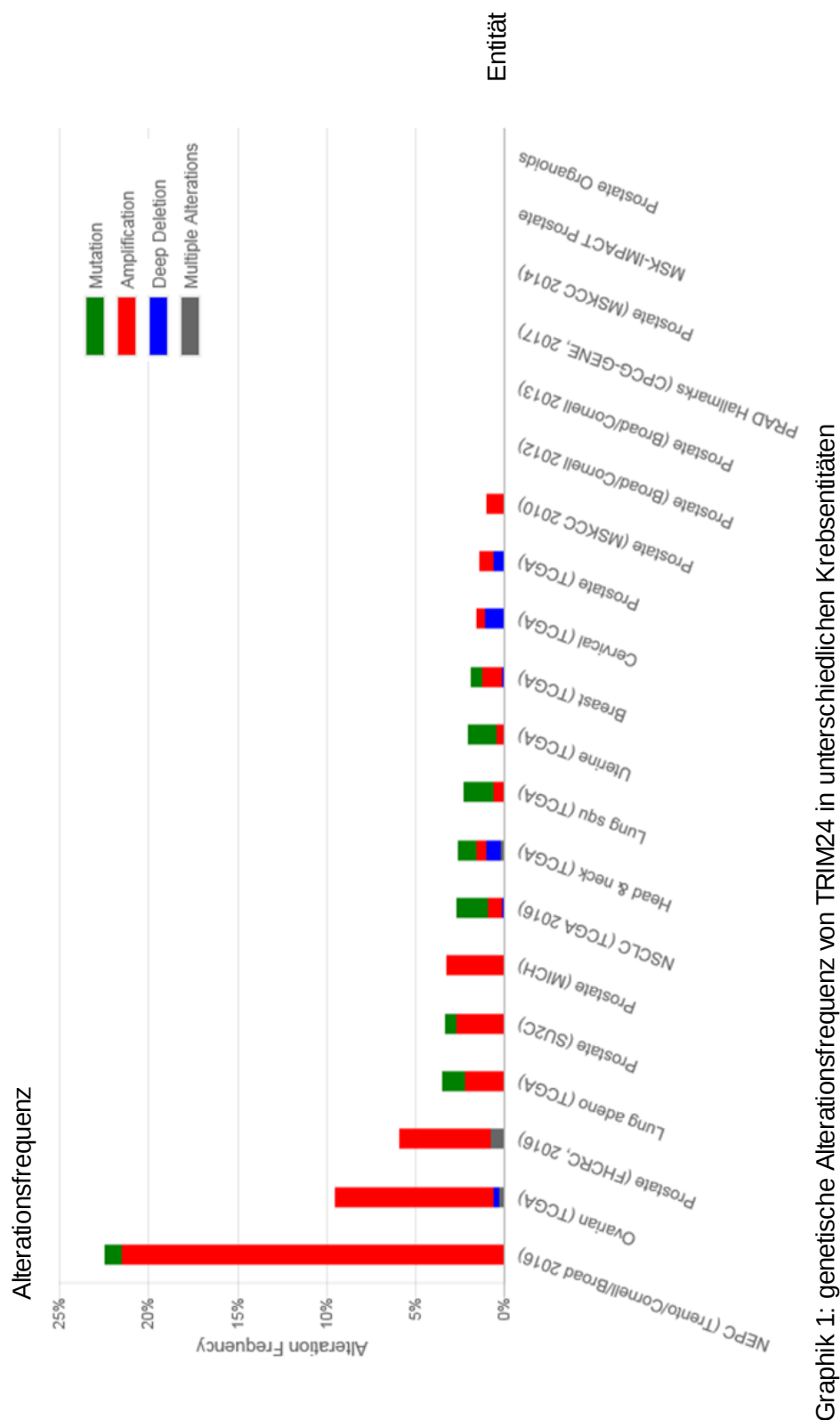
Außerdem wurde für alle Analysen das statistische Signifikanzniveau anhand eines p-Wertes $< 0,05$ festgelegt.

Die jeweiligen Gruppenunterteilungen für die einzelnen Analysen werden jeweils an den entsprechenden Stellen selbst beschrieben, um ein lückenloses Folgen des Zusammenhangs zu gewährleisten. Des Weiteren haben wir für unsere Analysen gängige Einteilungsverfahren wie die Grade Group, den TNM-Status, Auftreten von Rezidiven und Kastrationsresistenz berücksichtigt.

3 ERGEBNISTEIL

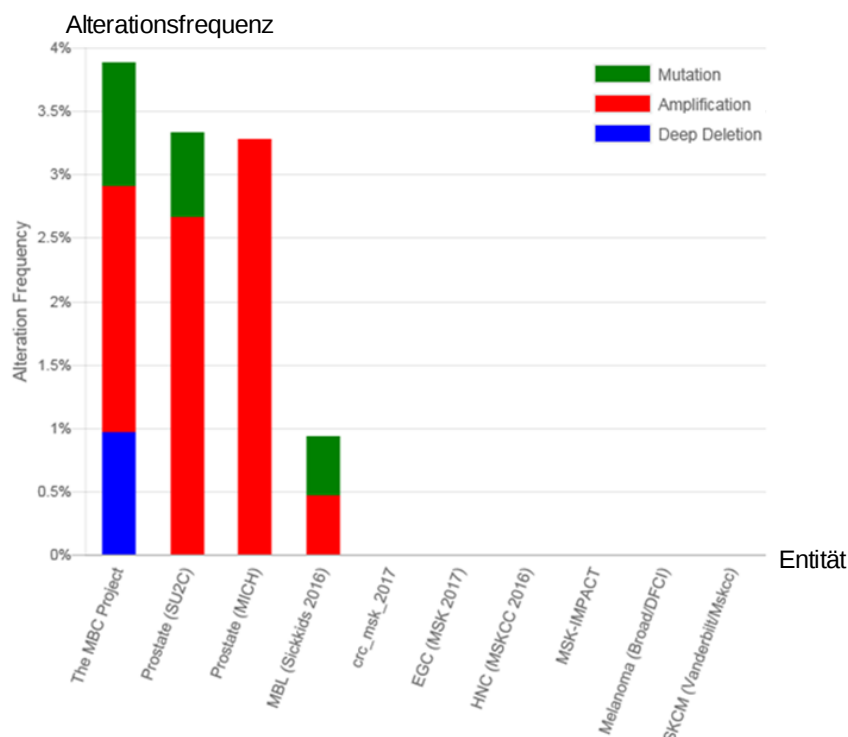
3.1 *In silico* Analysen

3.1.1 *In silico* Analyse von *TRIM24*



Unsere *in silico*-Analyse der humanen *TRIM24*-DNA und -RNA in der Online Datenbank cBioPortal ergab, dass insbesondere Mutationen von *TRIM24* im Prostatakarzinom vorkommen. In den untersuchten Studien (siehe Graphik 1) liegen für *TRIM24* im Prostatakarzinom etwas mehr Amplifikationen (bis zu 5%) als Mutationen (bis ca. 1%) und Deletionen (bis ca. 0,8%) vor. Zahlreiche andere Entitäten, in denen *TRIM24* mutiert ist, werden ebenfalls dargestellt. Hierzu gehören unter anderen Ovarialkarzinome, Lungenkarzinome und Mammakarzinome, bei denen Mutationsraten von bis zu 9,5% festgestellt wurden. Im neuroendokrinen Prostatakarzinom (NEPC = Neuroendokrine Prostate Cancer) werden sogar Alterationsfrequenzen von ca. 22,5% gezeigt.

In der Analyse von Studien mit metastatischem Gewebe spielt *TRIM24* ebenfalls eine Rolle im Prostatakarzinom. Hierbei ist *TRIM24* in bis zu 3,3% der Fälle amplifiziert beziehungsweise anderweitig mutiert (Graphik 2).



Graphik 2: genetische Alterationsfrequenz von *TRIM24* in Metastasengewebe

3.2 *TRIM24*-Expression in Primärtumoren aus Prostatektomien, benignem Prostatagewebe sowie Lymphknoten- und Fernmetastasen

3.2.1 Progressionsanalyse von *TRIM24*

Zunächst einmal ordneten wir das Gewebe von insgesamt 649 Patienten wie folgt: n=46 benigne Prostatadrüsen, n=517 Primärtumore aus Prostatektomien, n=30 p-TUR-P, n=26 Lymphknotenmetastasen und n=30 Fernmetastasen. Die Gewebearten wurden bewusst in aufsteigender Reihenfolge mit zunehmender Aggressivität in Bezug auf das Prostatakarzinom angeordnet.

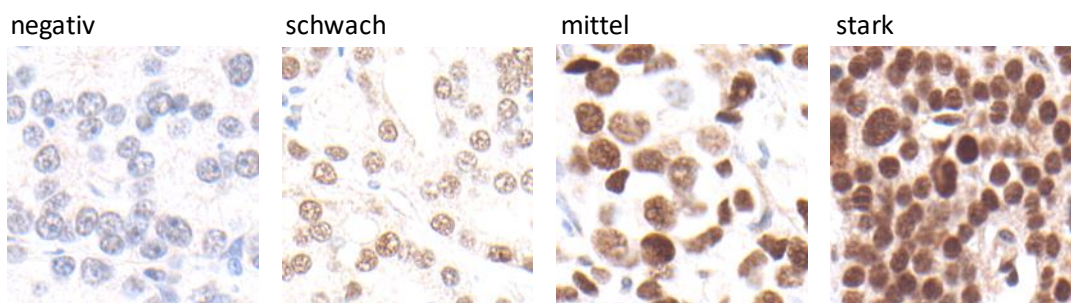


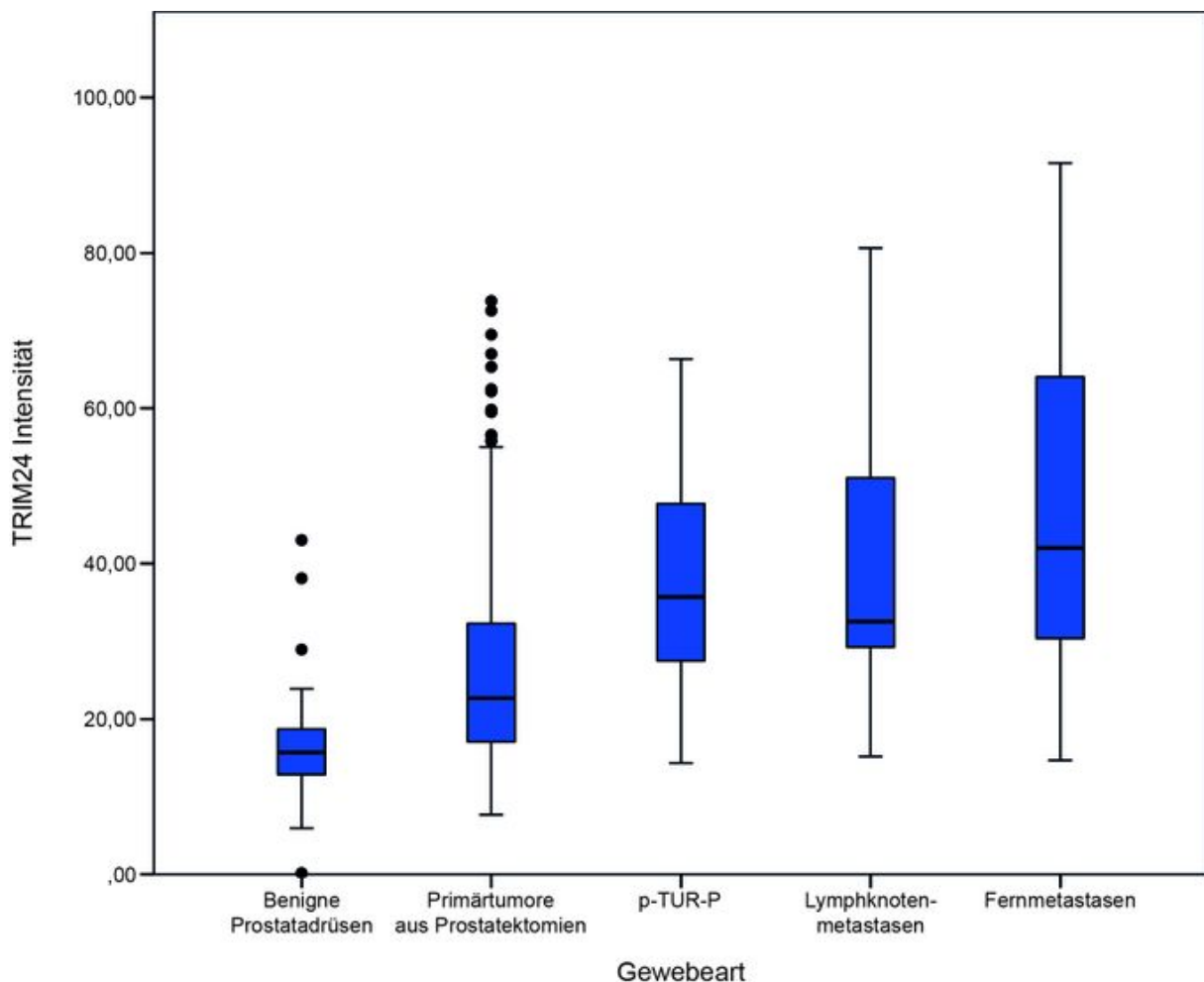
Bild 1: *TRIM24*-Expression

Wie man der Graphik 3 entnehmen kann, kann ein kontinuierlicher Expressionsanstieg beobachtet werden. Das heißt, die *TRIM24*-Expression steigt mit zunehmender Tumoraggressivität. Während der Mittelwert der *TRIM24*-Expression in benignen Gewebeproben 16,10 beträgt, ist bei den Primärtumoren aus Prostatektomien ein Mittelwert von 26,11 bei den p-TUR-P von 37,59 die Lymphknotenmetastasen von 40,45, wobei die Fernmetastasen den größten Wert, nämlich 45,96 aufweisen. Die Mittelwerte wurden mit einem Konfidenzintervall von 95% ermittelt.

Der ANOVA-Test zur Varianzanalyse zwischen den Gruppen ergibt einen p-Wert von $<0,001$, was auf höchste Signifikanz hindeutet.

Als nächstes führten wir T-Tests für jeweils zwei Populationsmittelwerte durch, um zu untersuchen, ob sich die Mittelwerte in den jeweiligen Gewebsarten unterscheiden. Hierbei stellten wir die Primärtumore aus RPE jeweils einmal den benignen Prostatadrüsen, den p-TUR-P, den Lymphknotenmetastasen sowie den Fernmetastasen gegenüber. Bei einem angenommenen alpha-Wert von 0,05 sind die Ergebnisse aller unserer Gruppen mit p-Werten $< 0,001$ höchst signifikant.

Das heißt, dass anhand der Daten gezeigt werden konnte, dass die Patienten mit Primärtumoren aus RPE geringere *TRIM24*-Expressionswerte aufweisen als Patienten mit p-TUR-P, Lymphknotenmetastasen, Fernmetastasen und benignem Prostatagewebe. Insgesamt zeigt uns diese Auswertung, dass die *TRIM24*-Expression mit zunehmender Progression des Prostatakarzinoms zunimmt.



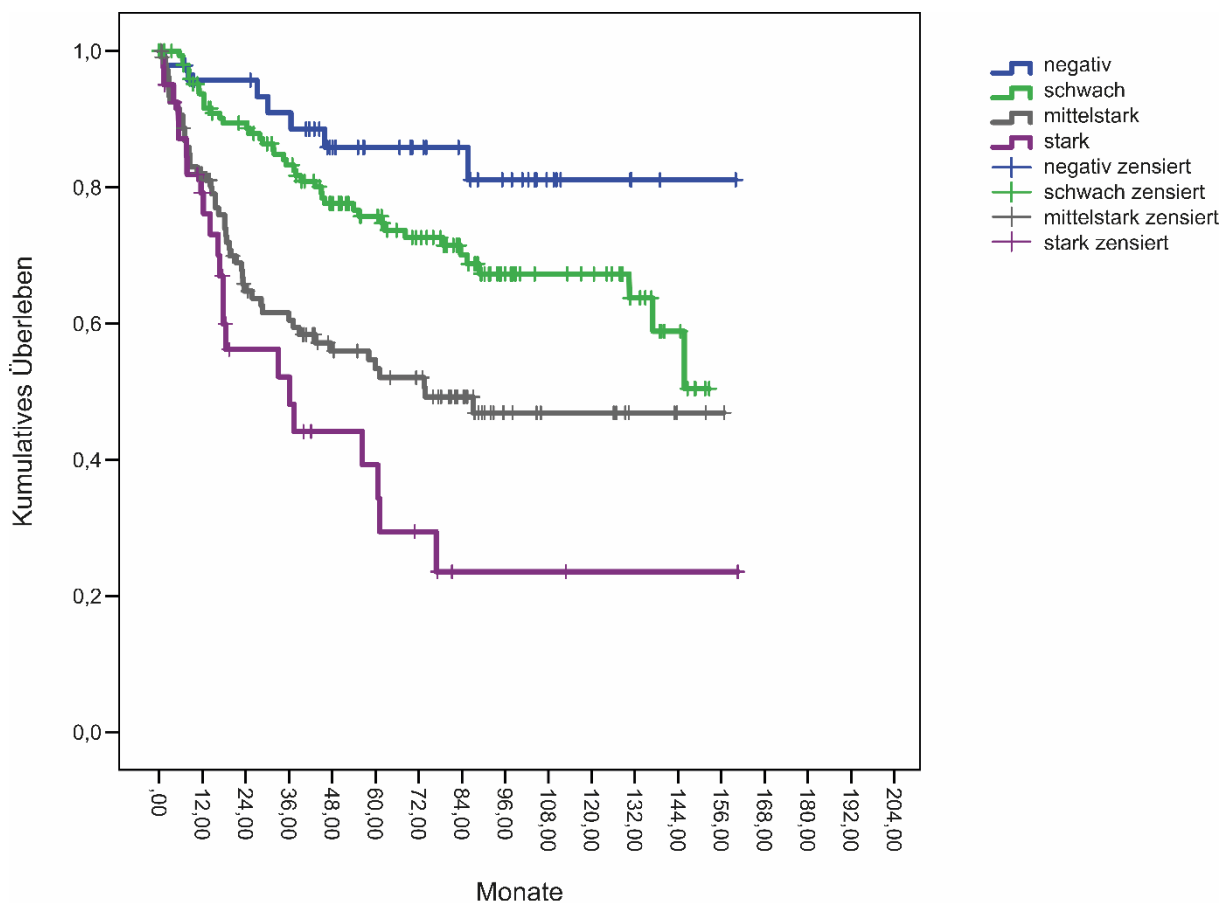
Graphik 3: Boxplot Expressionsanalyse von *TRIM24*

3.2.2 Überlebensanalyse von *TRIM24*

Der Test auf Gleichheit der Überlebensverteilungen für verschiedene Stufen der durchschnittlichen *TRIM24*-Expression pro Patienten, zeigt einen Chi-Quadrat Wert von 39,466 mit 3 Freiheitsgraden und einen p-Wert von $< 0,001$, was einer sehr hohen Signifikanz entspricht.

Die Kaplan-Meier-Analyse zur Übersicht des Überlebens, ergibt Folgendes:

Patienten der Gruppe ohne *TRIM24*-Expression, haben eine 1-JÜR von 96%, eine 5-JÜR von 86% und eine 10-JÜR von 81%. Bei schwacher Expression war die 1-JÜR ca. 93%, die 5-JÜR ca. 75% und die 10-JÜR ca. 67%. Werte für Gewebe mit mittelstarker *TRIM24*-Expression zeigten 82%, 53% und 47% jeweils für die 1-/5-/ und 10-JÜR. Schließlich betrug bei Tumoren mit starker Expression die 1-/5-/10-JÜR jeweils ca. 79%, ca. 34% und ca. 24%. Dies bedeutet, dass mit Ansteigen der *TRIM24*-Expression die Überlebensrate sinkt.



Graphik 4: Kaplan-Meier-Überlebenskurve von *TRIM24*

3.2.3 Univariate Cox-Regressionsanalyse von *TRIM24*

Mit der univariaten Cox-Regression analysierten wir die Zeit des biochemisch rezidivfreien Überlebens für verschiedenstarke *TRIM24*-Expressionen. Wir teilten die Gruppen ein in: n=47 keine *TRIM24*-Expression, n=151 leichte, n=109 mittelstarke und n=40 starke *TRIM24*-Expression. Der Omnibustest für dieses Modell zeigte einen Chi-Quadrat-Wert von 36,112 mit 3 Freiheitsgraden und einem p-Wert von < 0,001.

Unsere ermittelten Regressionskoeffizienten (0,664, 1,405 und 1,922) hatten jeweils positive Vorzeichen, was darauf schließen lässt, dass höhere *TRIM24*-Expression mit einem höheren Risiko des Auftretens eines Rezidivs assoziiert ist.

Unsere Werte der Hazard Ratio sind ansteigend, das heißt je höher die *TRIM24*-Expression, desto wahrscheinlicher wird das Ereignis des biochemischen Rezidivs eintreten. Und zwar ist das Risiko bei leichter (p-Wert 0,104) *TRIM24*-Expression 1,94-fach, bei mittlerer 4,08-fach und bei starker *TRIM24*-Expression 6,84-fach höher als ohne *TRIM24*-Expression. Dabei sind die p-Werte für den Vergleich der mittelstarken (p-Wert 0,001) und der starken (p-Wert < 0,001) Expression jeweils zur fehlenden Expression signifikant.

3.2.4 Multivariate Cox-Regressionsanalyse von *TRIM24*

Die multivariate Cox-Regressionsanalyse führten wir unter Berücksichtigung der *TRIM24*-Expression entsprechend der Gruppeneinteilung der univariaten Cox-Analyse durch. Diesmal sollte aufgezeigt werden, ob *TRIM24* statistisch unabhängig von bereits etablierten Parametern wie der Grade Group ist, und somit einen Zugewinn in der Diagnostik und Prognosestellung bedeuten könnte. Dabei konnten wir n=44 ohne *TRIM24*-Expression, n=142 mit leichter, n=106 mit mittelstarker und n=40 mit starker Expression. In die multivariate Analyse wurden die weiteren Parameter Grade Group am radikalen Prostatektomie-Präparat, T-Status und der präoperative PSA-Wert eingeschlossen.

Der Omnibustest der Modellkoeffizienten ergab einen Chi-Quadrat-Wert von 133,495 mit 6 Freiheitsgraden und einem p-Wert von < 0,001.

So lässt eine höhere Grade Group das Risiko 1,63-fach ansteigen, ein Rezidiv zu bekommen im Vergleich zur negativen *TRIM24*-Expression (p-Wert < 0,001). Ebenso erhöht ein höherer T-Status das Risiko um 1,83 (p-Wert < 0,001). Der Einfluss des PSA-Wertes war nicht signifikant (p-Wert 0,151).

3.2.5 Korrelationsanalyse von *TRIM24* anhand von Kreuztabellen

Korrelationsanalysen mittels Kreuztabellen zwischen der Grade Group, dem T-Stadium, sowie dem N-Stadium jeweils mit der entsprechenden *TRIM24*-Expression ergaben die im Folgenden beschreibenden Resultate, wobei alle statistisch signifikant waren:

Wir verglichen Grade Group 1 bis 5 mit den negativen, leicht, mittelstark und stark exprimierenden Gewebeproben, analog zur obigen Überlebensanalyse. Hierbei befindet sich der Hauptteil der Patienten mit keiner beziehungsweise schwacher *TRIM24*-Expression in der Grade Group 1 (also der am wenigsten aggressiven Tumoren), in Zahlen 43,4% bzw. 41,3%. Die Patienten mit mittelstarker sowie starker Expressionsstärke sind zum Großteil in Grade Group 2, genauer 36,2% bzw. 38,1% vertreten. Keiner der Fälle mit fehlender *TRIM24*-Expression befand sich in Grade Group 5, von Fällen mit schwacher Expression lediglich 1,3%. Dahingegen waren 12,1% der Patienten mit mittelstarker und 11,9% mit starker Expression der Grade Group 5 zuzuordnen. Eine höhere *TRIM24*-Expression entsprach also einer höheren Grade Group.

Bei der Kreuztabelle von *TRIM24* und dem T-Stadium, wobei wir T2 bis T5 betrachteten, befanden sich 78,7% der *TRIM24*-negativen Patienten in Stadium T2 und 0% in Stadium T5. Bei Geweben mit leichter Expression ist die Verteilung mit 73,3% Stadium T2 und 0,7% mit Stadium T5 ähnlich, wobei hier jeweils mehr Fälle dem Stadium T3 und T4 zugeordnet werden als bei den negativen Gewebeproben. Bei den mittelstark und stark Exprimierenden befinden sich nur noch knapp über die Hälfte der Fälle im Stadium T2, nämlich 56,3% bzw. 54,8%. Dafür sind höhere Fallzahlen in T3 und T4 zu beobachten, bei mittelstarker Expression 18,8% und 23,2% und bei starker Expression 16,7% und 28,6%. Auch das deutet auf eine Verschiebung der Patienten mit höherer *TRIM24*-Expression in höhere T-Stadien und somit aggressivere Tumore hin.

Die Assoziation zwischen *TRIM24* und dem N-Stadium, also regionären Lymphknotenmetastasen, zeigt, dass bei negativer *TRIM24*-Expression lediglich in 4% der Patienten befallene Lymphknoten diagnostiziert wurden, bei leichter Expression ein Anstieg auf 5,7% zu verzeichnen ist, gefolgt von mittelstarker Expression mit 17,5%. Schließlich bei starker Expression waren die Lymphknoten zu 14,3% befallen.

Auch hier waren stärkere *TRIM24*-Expressionen eher mit positivem Lymphknotenbefall assoziiert als Schwächere.

3.3 AR

Im Rahmen der Auswertung von AR mittels der Definiens Software wurde die Expressionsstärke auf ein Maximum von 100 definiert und anhand dessen die

Einteilung in schwach, mittelstark, stark und sehr stark vorgenommen: Schwache Expression lag mit Werten von 0 bis 20 in 36 Fällen, mittelstarke Expression mit Werten zwischen 20,1 und 70 in 257 Fällen, starke Expression in 34 Fällen mit Werten von 70,1 bis 90 und sehr starke Expression in 21 Fällen mit Werten von 90,1 bis 100 vor.

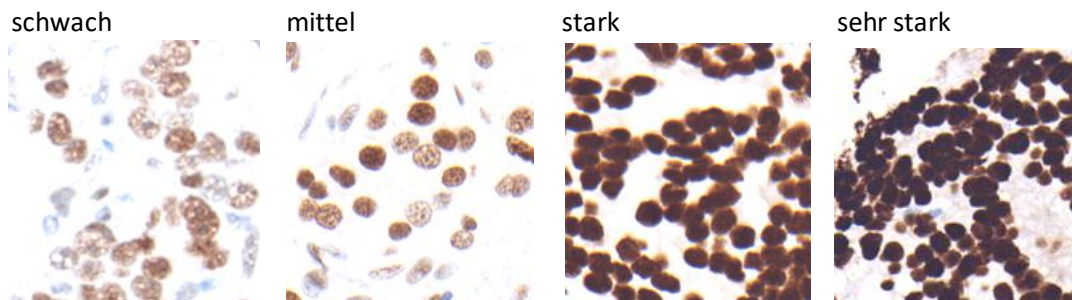


Bild 2: AR-Expression

3.3.1 Progressionsanalyse von AR

In der Progressionsanalyse von *AR* wollten wir prüfen, wie sich die Expressionsstärke mit Fortschreiten des Tumors verändert. Dazu untersuchten wir n=18 Patienten mit benignen Drüsen, n=221 Patienten mit Primärtumoren aus RPE, n=31 Patienten mit p-TUR-P, n=25 Patienten mit Lymphknotenmetastasen und schließlich n=22 Patienten mit Fernmetastasen. Die Mittelwerte dieser Gruppen betrugen für benigne Drüsen 33,45, für Primärtumore aus RPE 45,45, für p-TUR-P 62,07, für Lymphknotenmetastasen 38,17 und für Fernmetastasen 36,18. Die stärkste *AR*-Expression ist demnach bei den Patienten mit p-TUR-P Gewebeproben vertreten. Das Signifikanzniveau wird hier bei einem p-Wert von $< 0,001$ angenommen.

Zur Progressionsanalyse von *AR* lässt sich also sagen, dass mit Fortschreiten des Prostatakarzinoms eine stärkere *AR*-Expression zu verzeichnen ist. Dies zeigte sich in unseren Ergebnissen außer in den Lymphknoten- und Fernmetastasen, da bei diesen beiden Gruppen die mittlere *AR*-Expressionsstärke nicht signifikant unterschiedlich war.

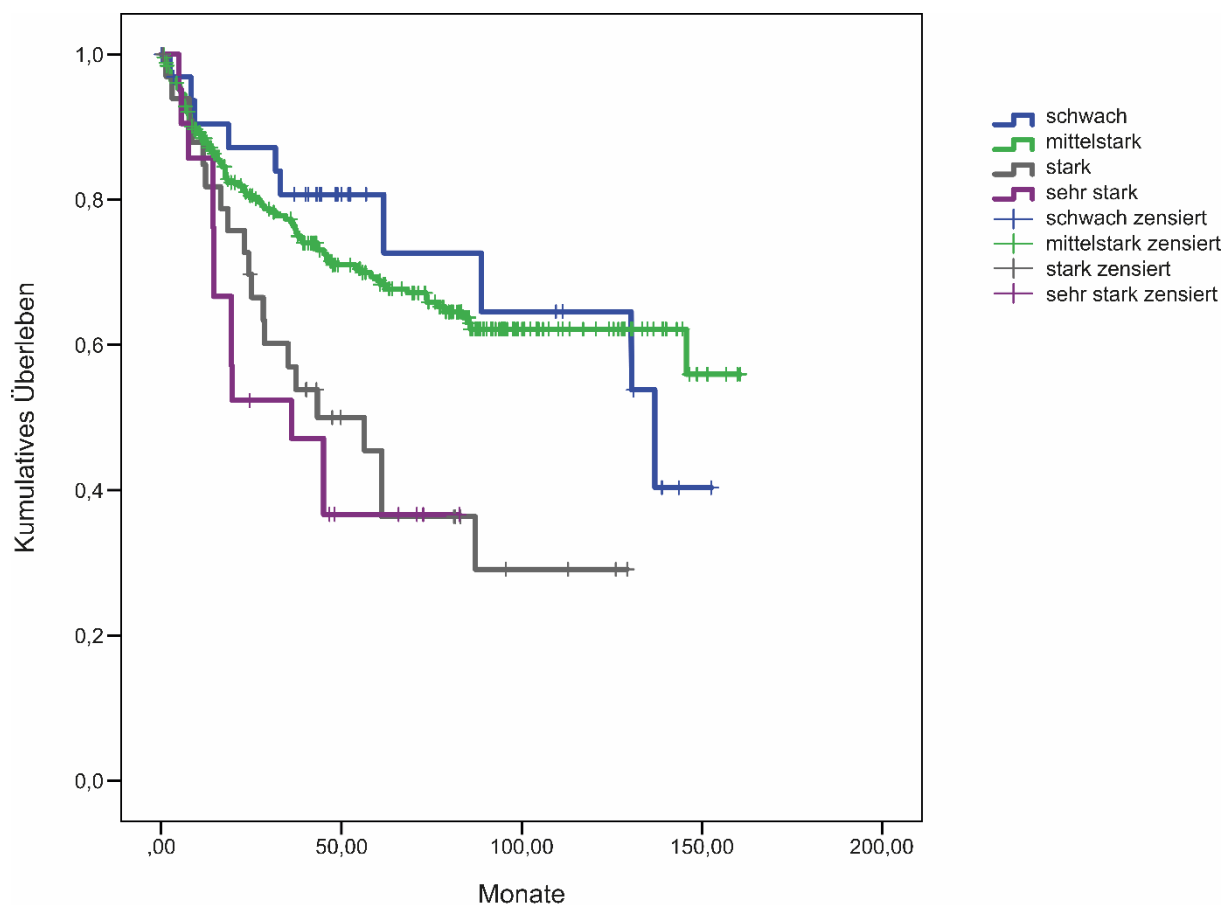
3.3.2 Überlebensanalyse von AR

Wie in der Kaplan-Meier-Kurve dargestellt, heben sich die stark und sehr stark *AR*-exprimierenden Fälle deutlich von den schwachen und mittelstarken Fällen ab. In Zahlen zeigten die schwach Exprimierenden Überlebensraten für 1, 5 und 10 Jahre von jeweils ca. 90%, ca. 81% und ca. 65%. Bei mittelstarker Expression waren es

jeweils ca. 88%, ca. 69% und ca. 62%. Die stark exprimierenden Fälle hatten jeweils ca. 85%, ca. 46% und ca. 29% Überlebensraten für 1, 5 und 10 Jahre. Schließlich liegen für starke AR-Expression Prozentangaben von ca. 86% für die 1-JÜR und ca. 37% für die 5-JÜR vor, für die 10-JÜR liegen uns in dieser Gruppe keine Daten vor.

Der log rank Test mit einem Chi-Quadrat-Wert von 18,929 und drei Freiheitsgraden und einem p-Wert von $< 0,001$, lässt höchste Signifikanz der Kaplan-Meier-Kurve vermuten.

Die Cox-Regressionsanalyse mit einem Chi-Quadrat-Wert von 15,333 und drei Freiheitsgraden sowie einem p-Wert von 0,002 deutet auf Signifikanz hin. Hiernach haben Patienten mit mittelstarker AR-Expression ein 1,072-fach (p-Wert 0,836), mit starker Expression ein 0,028-fach und mit sehr starker Expression ein 2,782-fach (p-Wert = 0,015) erhöhtes Risiko eines biochemischen Rezidivs als Patienten mit schwacher Expression.



Graphik 5: Kaplan-Meier-Überlebenskurve von AR

3.3.3 Korrelationsanalyse von AR

In einer multivariaten Cox-Analyse mit Bezug auf GG, T- und N-Stadium, ergab sich ein Chi-Quadrat-Wert von 142,928 mit sechs Freiheitsgraden und einem p-Wert $< 0,001$. Die AR-Expression zeigte Unabhängigkeit gegenüber der GG (p-Wert $< 0,001$) und des T-Stadiums (p-Wert $< 0,001$). Im Hinblick auf das N-Stadium bestand keine Signifikanz (p-Wert = 0,247).

Nach unseren Ergebnissen wäre der Hauptteil aller vier AR-Expressionsgruppen jeweils in GG2 angesiedelt, und der Anteil der einzelnen Gruppen würde von schwacher Expression bis hin zu sehr starker Expression in GG5 kontinuierlich gesteigert sein. Da allerdings keine Signifikanz (p-Wert = 0,185) hinsichtlich der Korrelation mit der GG besteht, wird hier nicht näher auf Prozentwerte eingegangen.

In allen vier Gruppen, befindet sich die Mehrheit der Gewebeproben im Stadium T2, bei schwacher Expression sind das 63,6%, bei mittelstarker Expression 70,5%, bei starker 50,0% und schließlich bei sehr starker Expression 42,9%. Im T3-Stadium waren es 15,2%, 13,6%, 29,4% und 19,0% jeweils für schwache, mittelstarke, starke und sehr starke Expression in aufsteigender Reihenfolge. Die meisten Vertreter des T3-Stadiums haben starke bzw. sehr starke AR-Expressionswerte. Im T4 Stadium haben die schwachen und mittelstarken Fälle ähnliche Prozentwerte wie im T3 Stadium. Es fällt auf, dass 20,6% der starken und 38,1% der sehr starken AR-Exprimierenden den größten Teil an den T3 Tumoren ausmachen. 6,1% der Schwachen und 0,4% der Mittelstarken sind im T5 Stadium vertreten. Von den Patienten mit starken und sehr starken AR-Expressionswerten gibt es keine Gewebeproben, die dem T5 Stadium entsprechen, was möglicherweise an der geringen Fallzahl in den genannten Gruppen liegt.

In der Analyse des N-Status sind laut unserer Statistik 8,1% der schwach Exprimierenden mit positivem Lymphknotenbefall, 11,0% der Mittelstarken, 5,9% der Starken und 9,5% der sehr Starken. Hierbei sei nochmal erwähnt, dass diese Ergebnisse in Hinblick auf einen p-Wert von 0,785 nicht statistisch signifikant sind.

3.4 Ki-67

Den Proliferationsindex Ki-67 haben wir mit der *Definiens* Software nicht als absolute Zahl in Form der Expressionsstärke, sondern als Index errechnet. Index bedeutet,

wieviel Prozent der Tumorzellen *Ki-67* exprimieren, von allen Tumorzellen. Beziehungsweise auch von normalen Gewebezellen, in benignem Gewebe.

3.4.1 Progressionsanalyse von *Ki-67*

Bei dieser Analyse untersuchten wir ebenfalls 5 Gruppen mit unterschiedlichem Gewebe:

Der Mittelwert des *Ki-67*-Index betrug 13 für benigne Drüsen mit $n=18$, bei den Primärtumoren aus RPE mit $n=221$ war er 17, bei den p-TUR-P mit $n=32$ 40, bei den Lymphknotenmetastasen mit $n=26$ 30 und bei den Fernmetastasen mit $n=21$ war er 22. Im ANOVA-Test ergab sich dafür eine Signifikanz von $< 0,001$.

3.4.2 Überlebensanalyse von *Ki-67*

Die Überlebensanalysen von *Ki-67* führten wir einmal anhand des Medians und einmal anhand des Mittelwertes durch. Wir legten anhand optischer Auswertungen der Expressionsstärke folgende Grenzwerte für die jeweilige Gruppenzuordnung fest:

Bei Betrachtung des Medians von 12,63 nahmen wir diesen als Grenzwert. Zur *Ki-67*-negativen Gruppe eins zählten wir $n=170$ Patienten, die unterhalb des Medians lagen, mit Indexwerten bis 12,6. Alle Indices ab 12,7, also oberhalb des Medians, wurden der *Ki-67*-positiven Gruppe zwei mit $n=171$ zugeordnet.

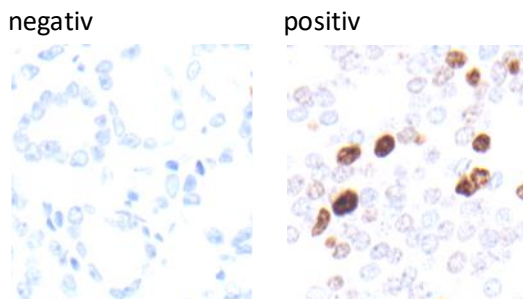


Bild 3: *Ki-67*-Index

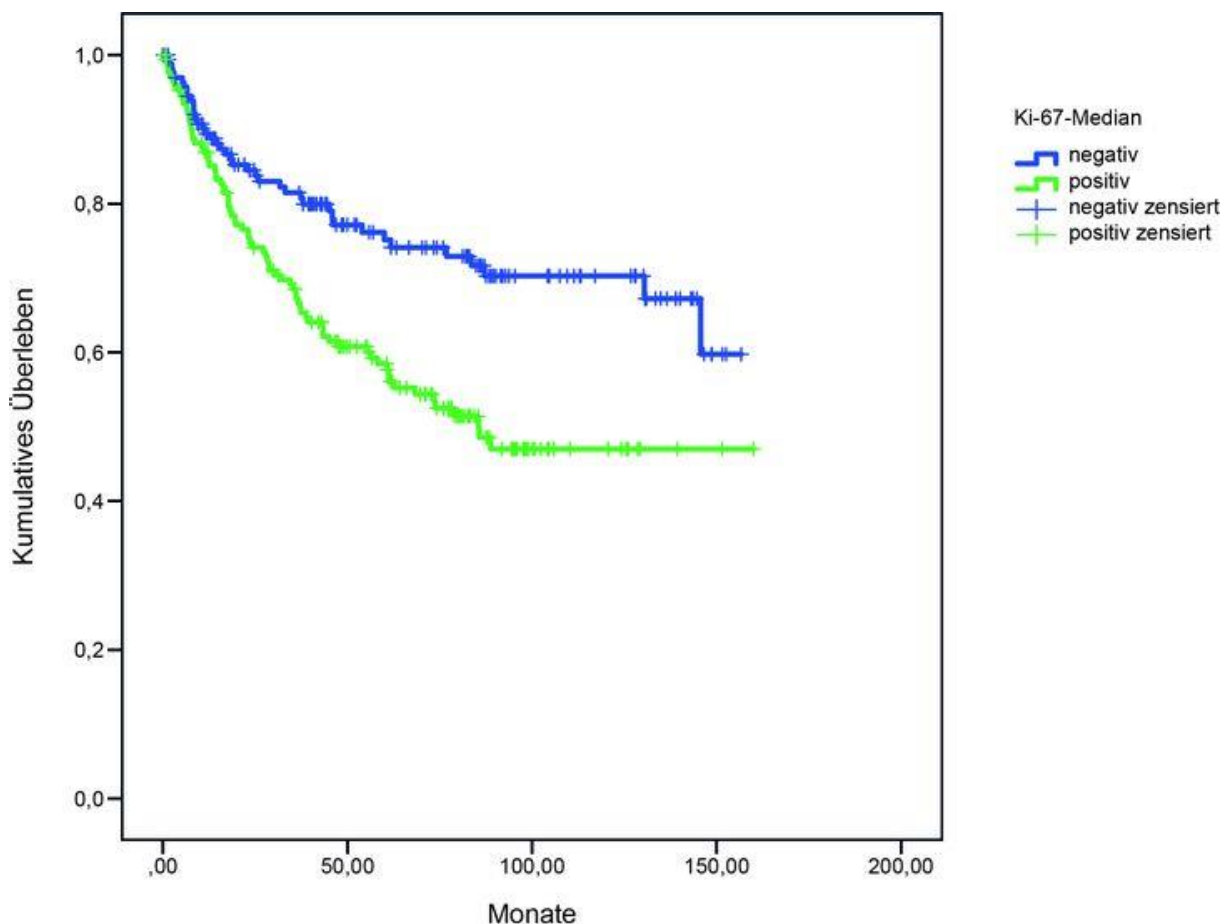
Bezüglich des Mittelwertes der *Ki-67*-Expression von 20,16 galten Patienten mit einem Index von 0 bis 20,1 als *Ki-67*-negativ und Patienten mit einem Index von 20,2 bis 100 als *Ki-67*-positiv.

Ergebnisse für den *Ki-67*-Index anhand des Medians:

Die 1-JÜR für Gruppe eins beträgt ca. 89%, die 5-JÜR ca. 75% und die 10-JÜR ca. 70%. Für die Gruppe zwei haben wir Ergebnisse von ca. 87%, ca. 59% und ca. 47% für die 1-/5-/ und 10-JÜR. Gruppe eins hat einen geschätzten Mittelwert von 118

Monaten und Gruppe zwei von 93 Monaten. Man sieht einen Abwärtstrend mit geringeren Überlebensraten für die Gruppe zwei. Das würde bedeuten, dass Patienten mit einem positiven *Ki-67*-Proliferationsindex eine kürzere Überlebensdauer bis zum Eintreten eines biochemischen Rezidiv-Tumors aufweisen. Die Ergebnisse für die Kaplan-Meier-Kurve sind laut log rank Test mit einem Chi-Quadrat-Wert von 12,138 mit einem Freiheitsgrad und einem p-Wert $< 0,001$ signifikant.

Der Omnibustest der Cox-Regressionsanalyse ergab einen Chi-Quadrat-Wert von 12,342 mit einem Freiheitsgrad und einem p-Wert $< 0,001$. Mit steigendem *Ki-67*-Median war das Risiko 1,945-fach höher, ein biochemisches Rezidiv des Prostatakarzinoms zu bekommen.

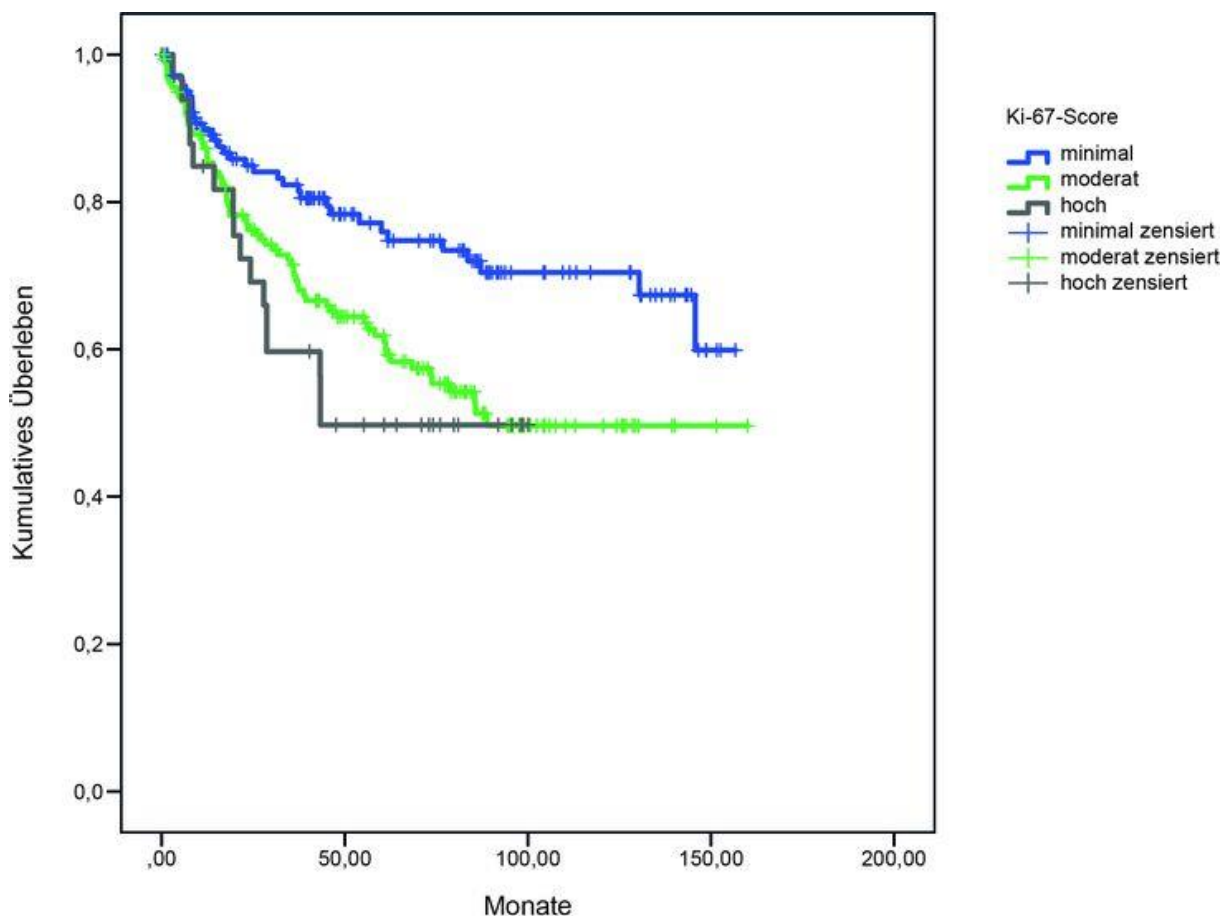


Graphik 6: Kaplan-Meier-Überlebenskurve des Ki-67-Medians

Ergebnisse für den *Ki-67*-Score:

Anschließend unterschieden wir drei Gruppen bezüglich des Proliferationsindex und bildeten verschiedene *Ki-67*-Scores. 148 Vertreter mit Werten unter 10 wurden der Gruppe mit minimaler *Ki-67*-Expression zugeordnet, 160 Fälle mit Werten zwischen 10 und 50 der Gruppe mit moderater Expression und 33 Proben mit Indices über 50 der Gruppe mit hoher Expression. Auch bei dieser Analyse bestand Signifikanz mit einem p-Wert von 0,005.

Die minimal Exprimierenden wiesen eine 1-JÜR von ca. 90% auf, eine 5-JÜR von ca. 76% und eine 10-JÜR von ca. 70%. Bei den moderat Exprimierenden betrug die 1-JÜR ca. 87%, die 5-JÜR ca. 62% und die 10-JÜR ca. 50%. Für die hoch Exprimierenden wurden Prozentwerte von ca. 85%, ca. 50% für die 1-beziehungsweise 5-JÜR abgebildet. Für die 10-JÜR lagen uns in dieser Gruppe keine weiteren Daten vor. Es wird auch hier ein Abwärtstrend des Überlebens mit höherer *Ki-67*-Expression deutlich.



Graphik 7: Kaplan-Meier-Überlebenskurve des *Ki-67*-Scores

Die Mittelwerte des Überlebens betrugen 118 Monate, 97 Monate und 61 Monate jeweils für die Gruppen mit minimaler, moderater und hoher Expression in dieser Reihenfolge.

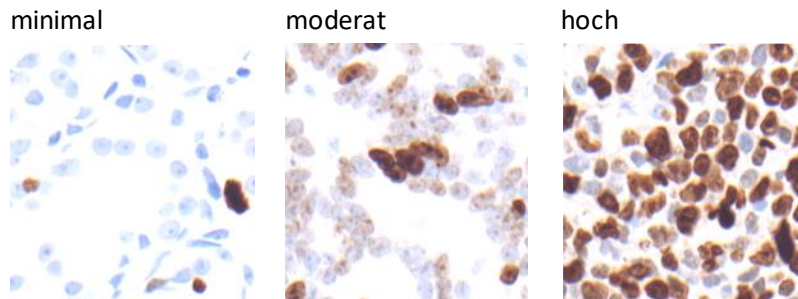


Bild 4: Ki-67-Score

Die Cox-Regressionsanalyse von *Ki-67* der drei Gruppen ergab im Omnibustest einen Chi-Quadrat-Wert von 10,898 mit zwei Freiheitsgraden und einem signifikanten p-Wert von 0,004. Das Risiko ein biochemisches Rezidiv zu bekommen war bei den moderat Expressierenden (p-Wert 0,004) 1,816-fach höher und bei den hoch Expressierenden (p-Wert 0,009) 2,217-fach höher als bei den minimal Expressierenden.

Die Cox-Regression anhand von GG, T-Status und N-Status, ergab keine Signifikanz für den N-Status (p-Wert 0,266). Für GG und T-Status waren die p-Werte je < 0,001, was darauf schließen lässt, dass *Ki-67* ein von diesen Parametern unabhängiger Prognosemarker ist.

3.4.3 Korrelationsanalyse von *Ki-67*

Die Korrelation zwischen unseren drei Subgruppen des *Ki-67*-Scores und der GG zeigte keine Signifikanz, p-Wert 0,109. Sie zeigte Signifikanz angesichts des T-Status mit einem p-Wert von 0,025. Die Korrelation mit dem N-Status hatte einen Pearson-Chi-Quadrat-Wert von 2,027 mit einem Freiheitsgrad und einen p-Wert von 0,154 und der exakte Test nach Fisher eine zweiseitige Signifikanz von 0,164. Insgesamt deuten diese Ergebnisse auf nicht signifikant hin.

In der Kreuztabelle zwischen *Ki-67* und der GG fällt auf, dass Patienten der minimalen Gruppe tendenziell niedrigeren GGs entsprechen, als Patienten der moderaten Gruppe mit höherem *Ki-67*-Proliferationsindex.

Laut unseren Analysen sind 73,8% der minimal Expressierenden mit negativem *Ki-67*-Index dem T-Stadium T1 zuzuordnen. Im Kontrast dazu sind nur 59,1% der moderat

Exprimierenden dem T1 Stadium zugehörig. 20,5% der moderaten Gruppe befinden sich demnach im T3 Stadium, wobei es nur 13,1% der *Ki-67*-negativen Patienten sind. Insgesamt entsprechen laut unseren Ergebnissen Gewebeproben mit höherem Proliferationsindex auch höheren T-Stadien.

Die Korrelation mit dem N-Status ergab, dass *Ki-67*-negative Proben zu 92,2% einen negativen N-Status haben, wobei es bei den *Ki-67*-positiven nur 87,6% sind. Im Umkehrschluss haben 12,4% der *Ki-67*-positiven Patienten einen positiven Lymphknotenbefall, im Gegensatz zu den 7,8% der *Ki-67*-negativen.

Die Korrelationsanalysen der drei Subgruppen mit unterschiedlich starker *Ki-67*-Expression, zeigen jeweils keine Signifikanz bei der GG (p-Wert 0,385), dem T-Status (p-Wert 0,393) und dem N-Status (p-Wert 0,476).

3.5 *ERG*

3.5.1 Progressionsanalyse von *ERG*

Die Progressionsanalyse von *ERG* werteten wir anhand einer Kreuztabelle aus, wobei das Gewebe in 5 Gruppen eingeteilt wurde. Hierbei hatten wir n=17 Patienten mit benignem Gewebe, n=219 Patienten mit Primärtumoren aus RPE, n=31 Patienten mit p-TUR-P, n=25 Patienten mit Lymphknotenmetastasen und n=21 Patienten mit Fernmetastasen.

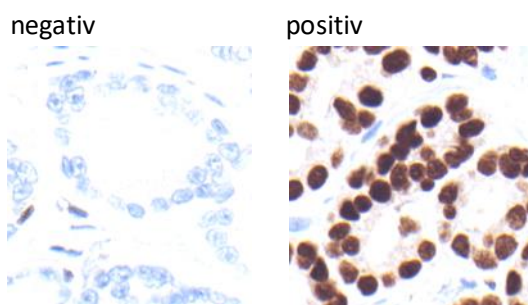


Bild 5: *ERG*-Status

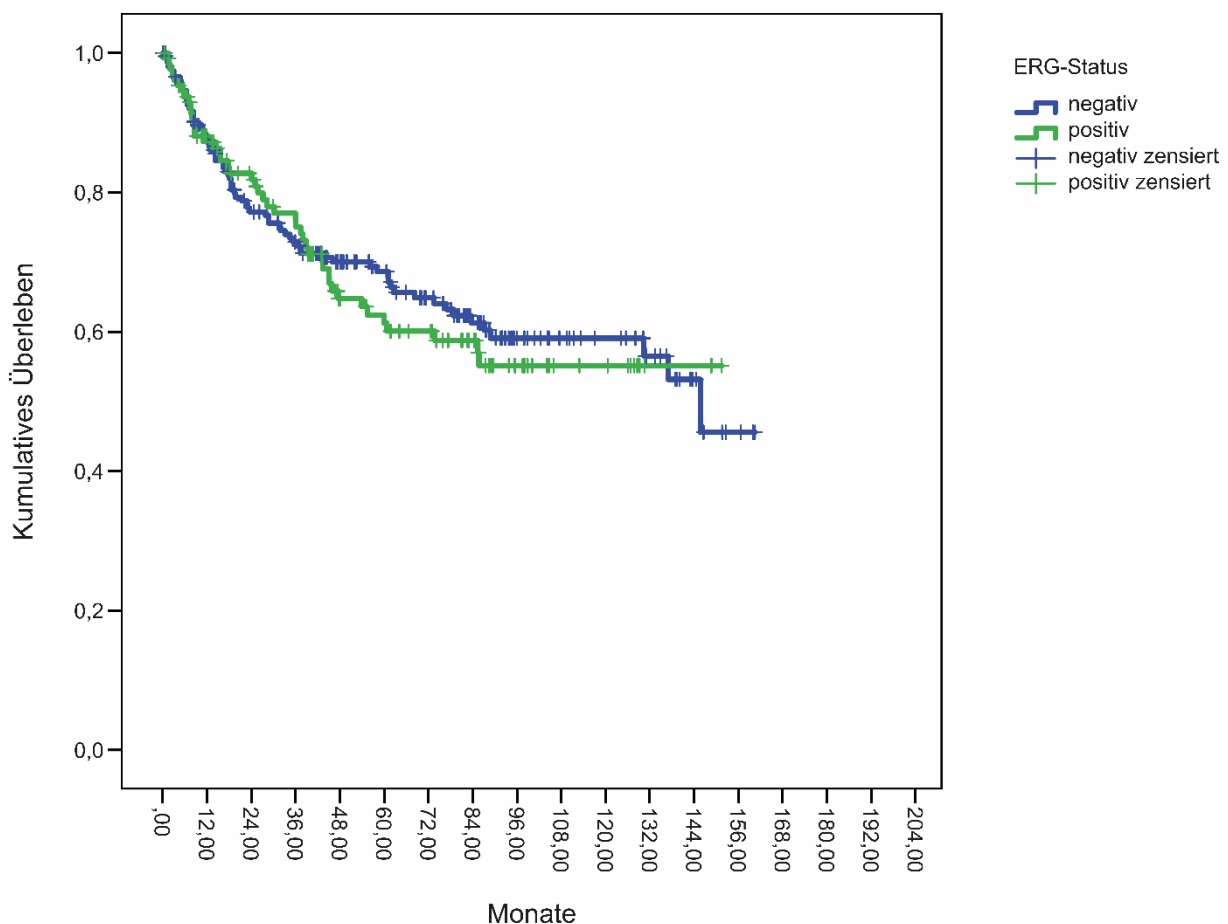
Es kam heraus, dass 100% der Patienten mit benignem Gewebe einen negativen *ERG*-Status hatten. In der Gruppe mit den Primärtumoren aus RPE waren 34,2% der Patienten *ERG* positiv. Von den p-TUR-P Fällen hatten 38,7% einen positiven *ERG*-Status. 64,0% der Patienten mit Lymphknotenmetastasen hatten einen positiven *ERG*-Status und schließlich 14,3% der Patienten mit Fernmetastasen. Mit einem Pearson-Chi-Quadrat-Wert von 22,775, vier Freiheitsgraden und einem p-Wert von $< 0,001$, gilt diese Analyse als signifikant. Insgesamt lässt sich beobachten, dass es im benignen

Gewebe praktisch keine *ERG*-Expression gibt. Dahingegen lässt sich eine stetige Expressionszunahme mit Progression des Tumors beobachten. Lediglich in den Fernmetastasen kommt es in unseren Ergebnissen zu einer Expressionsabnahme.

3.5.2 Überlebensanalyse von *ERG*

Der log rank Test der Kaplan-Meier-Kurve ergab einen Chi-Quadrat-Wert von 0,13 mit einem Freiheitsgrad und einem p-Wert von 0,718. Laut diesen Daten sind unsere Ergebnisse für die *ERG*-Expression als nicht signifikant einzuschätzen.

Auch die Ergebnisse unserer Cox-Regression für den Biomarker *ERG* sind mit einem Chi-Quadrat-Wert von 0,129 sowie einem Freiheitsgrad und einem p-Wert von 0,719 als nicht signifikant einzustufen.



Graphik 8: Kaplan-Meier-Überlebenskurve von *ERG*

3.5.3 Korrelationsanalyse von *ERG* anhand von Kreuztabellen

In den Kreuztabellen korrelierten wir *ERG* analog zu *TRIM24* einmal mit der Grade Group, mit dem T-Status, sowie dem N-Status. Hierbei erreichten unsere Ergebnisse

Signifikanzniveau in Bezug auf die Grade Group, bei einem Pearson-Chi-Quadrat-Wert von 19,987, vier Freiheitsgraden und einem p- Wert von $< 0,001$.

Die *ERG*-negativen Fälle sind zu 34,1% der Grade Group 1, zu 35,0% der GG2, zu 12,1% der GG3, zu 11,7% der GG4 und schließlich zu 7,2% der GG5 zugeordnet. Die Mehrzahl befindet sich also hier in den niedrigen, wenig aggressiven Gruppen.

Anders sieht die Verteilung bei positiver *ERG*-Expression aus, hier gehören 25,9% zu GG1, 42,4% zu GG2, 24,5% zu GG3, 2,9% zu GG4 und 4,3% zu GG5. Es ist deutlich, dass mehr Fälle vor allem in der GG2 und der GG3 angesiedelt sind. Jedoch sind gleichzeitig auch weniger der *ERG*-positiven als der *ERG*-negativen Patienten, den GGs 4 und 5 zugehörig.

Anschließend untersuchten wir den Zusammenhang zwischen den T-Stadien T2, T3, T4, T5 und *ERG*-Status positiv oder negativ. Die Korrelation zwischen *ERG* und dem T-Stadium weist einen ähnlichen Trend auf wie oben genannte Korrelation zwischen *ERG* und der GG, außer in Bezug auf die GG4, hier sind mehr Fälle mit *ERG*-positiver als mit *ERG*-negativer Expression beheimatet. Da es zwischen dieser Korrelation aufgrund eines Chi-Quadrat-Wert von 1,395 mit drei Freiheitsgraden und einem p- Wert von 0,707 jedoch keine Signifikanz gibt, wird an dieser Stelle auf Prozentangaben verzichtet.

Zuletzt erreicht die Korrelation zwischen *ERG* und dem N-Status (0= kein Lymphknotenbefall, 1= Lymphknotenbefall) ebenfalls das Signifikanzlevel nicht, der Pearson-Chi-Quadrat beträgt 1,870 mit einem Freiheitsgrad und einem p- Wert von 0,171. Laut unserem Ergebnis weisen 8,1% der *ERG*-negativen Gewebeproben Lymphknotenbefall auf und auch 12,6% der *ERG*-positiven.

3.6 Korrelation der Marker *TRIM24*, *AR*, *Ki-67* und *ERG* untereinander

Zum Abschluss der statistischen Analysen von *TRIM24*, *AR*, *Ki-67* und *ERG* wollten wir diese Marker untereinander korrelieren, um mögliche Zusammenhänge beurteilen zu können.

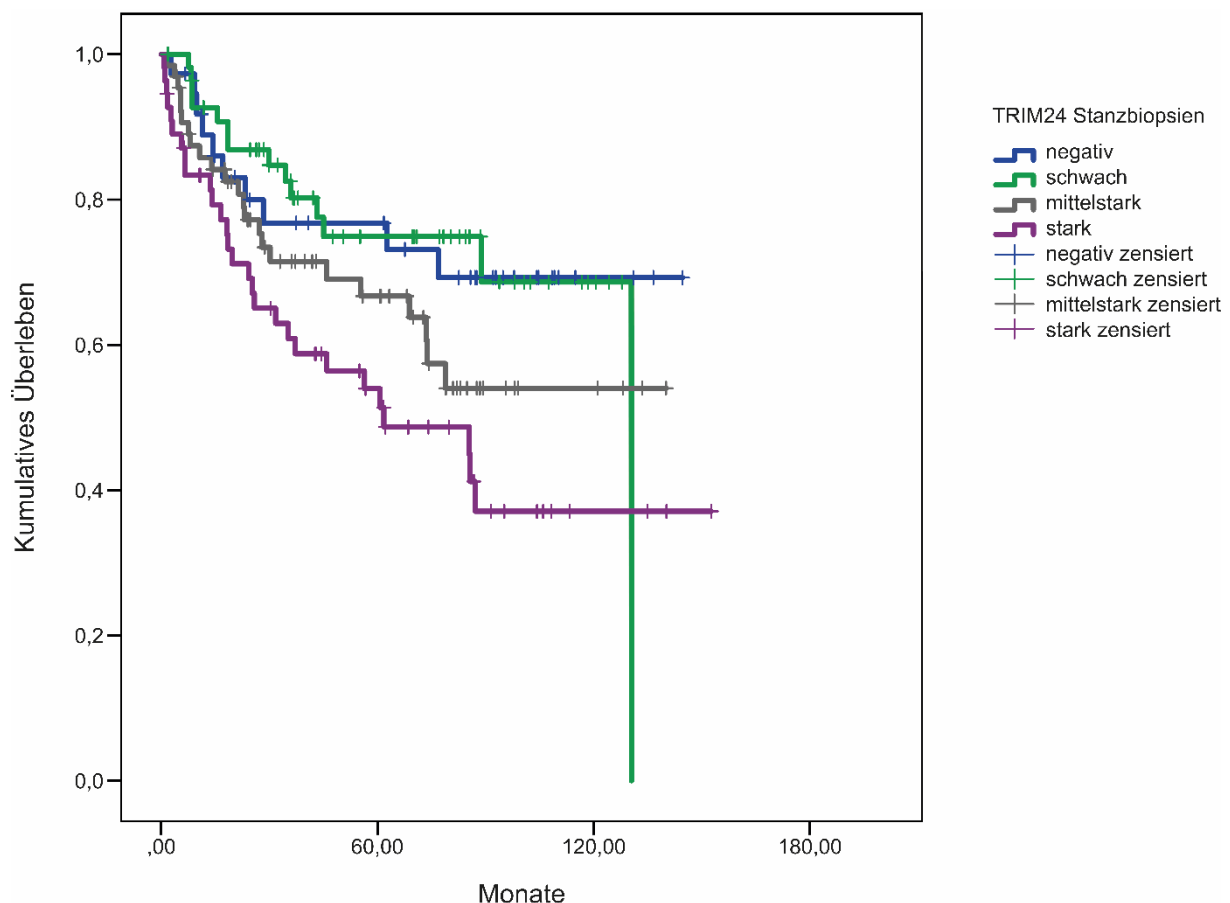
TRIM24 korrelierte höchst signifikant mit *AR* und *Ki-67* bei jeweils p-Werten $< 0,001$. Die Pearson-Korrelation zwischen *AR* und *Ki-67* war ebenfalls mit einem p-Wert 0,001 höchst signifikant.

Für die Korrelationen mit dem *ERG*-Status führten wir T-Tests für unabhängige Stichproben durch. Die Mittelwerte für Patienten mit negativem *ERG*-Status betrugen für *TRIM24* 25,84, für *AR* 39,72, und 20,22 für den *Ki-67*-Index. Im Vergleich dazu betrugen die Mittelwerte für Patienten mit positivem *ERG*-Status für *TRIM24* 28,41, für *AR* 56,88 und für den *Ki-67*-Index 24,58. Zusammenfassend hatten Patienten mit positivem *ERG*-Status höhere Expressionsstärken von *TRIM24*, *AR* oder *Ki-67*.

3.7 Auswertung von *TRIM24* auf Prostatastanzbiopsien

3.7.1 Überlebensanalysen von *TRIM24* auf Prostatastanzbiopsien

Wir werteten 214 Stanzbiopsien aus, von denen n=37 ohne *TRIM24*-Expression, n=57 mit schwacher Expression, n=65 mit mittelstarker Expression und n=55 mit starker Expression untersucht wurden.



Graphik 9: Kaplan-Meier-Überlebenskurve von *TRIM24* auf Stanzbiopsien

Die Kaplan-Meier-Analysen lassen folgende Aussagen zum Überleben zu:

Die Gruppe mit negativer Expression hat eine 1-JÜR von ca. 89%, eine 5-JÜR von ca. 77% und eine 10-JÜR von ca. 69%. Des Weiteren weisen die schwach Expressierenden

1-/5- und 10-JÜR von jeweils ca. 93%, ca. 75% und ca. 69% auf. Die 1-/5- und 10-JÜR der Fälle mit mittelstarker Expression betragen jeweils ca. 86%, ca. 67% und ca. 54%. Bei den starken *TRIM24*-Expressionen haben wir ca. 83%, ca. 51% und ca. 37% für die 1-/5- und 10-JÜR ermittelt. Die Mittelwerte für die Überlebenszeit betragen für fehlende *TRIM24*-Expression ca. 109 Monate, für schwache Expression ca. 101 Monate, für Mittelstarke ca. 92 Monate und für starke *TRIM24*-Expression schließlich ca. 79 Monate.

Es lässt sich daraufhin eine Abnahme der Überlebensdauer bei Anstieg der *TRIM24* Expressionsstärke vermuten. Diese Ergebnisse gelten anhand des log rank Testes mit einem p-Wert von 0,015 als signifikant.

3.7.2 Korrelationsanalysen von *TRIM24* auf Prostatastanzbiopsien

Als nächstes haben wir Kreuztabellen von der Grade Group und *TRIM24*-Expression angefertigt.

Bei der Korrelation mit der GG ergab der Pearson-Chi-Quadrat einen Wert von 31,200 mit 12 Freiheitsgraden und einem p-Wert von 0,002.

Den größten Teil der GG1 machten dabei die Vertreter mit schwacher *TRIM24*-Expression aus, das sind 34,7%. Nachfolgend mit 27,6% waren die mittelstarken Fälle in GG1 vertreten. Gefolgt von den *TRIM24*-negativen Patienten mit 24,5% und schließlich denen mit starker *TRIM24*-Expression zu 13,3%.

Im Gegensatz dazu sahen die Anteile in GG5 folgendermaßen aus: 47,1% machte die Gruppe mit starker *TRIM24*-Expression als größte Fraktion aus. Die mittelstark Exprimierenden folgten mit 23,5%, die Negativen mit 17,6% und letztlich die Gruppe mit leichter Expressionsstärke mit 11,8%.

Diese Ergebnisse zeigen, dass Patienten, welche stärkere *TRIM24*-Expressionen auf den Prostatastanzbiopsien aufwiesen, auch einer höheren Grade Group und somit eines fortgeschrittenen Tumors zuzuordnen sind.

3.7.3 Cox-Regressionsanalyse von *TRIM24* auf Prostatastanzbiopsien

Als nächstes führten wir eine Cox-Regressionsanalyse von *TRIM24* auf den Prostatastanzen, der GG und dem präoperativen PSA-Wert durch. Hierbei ergab der Omnibustest einen Chi-Quadrat-Wert von 46,334 mit drei Freiheitsgraden und einem p-Wert von $< 0,001$, was auf höchste Signifikanz schließen lässt. Ein steigender

TRIM24-Expressionswert hatte ein 1,191-fach (p-Wert 0,176), eine höhere GG ein 1,593-fach (p-Wert < 0,001) und ein höherer präoperativer PSA-Wert ein 1,041-fach (p-Wert < 0,001) gesteigertes Risiko eines biochemischen Rezidivs vorauszusagen. Dabei erreichten die GG und der präoperative PSA-Wert Signifikanzniveau, was darauf hindeutet, dass die *TRIM24*-Expression unabhängig von diesen Parametern ist.

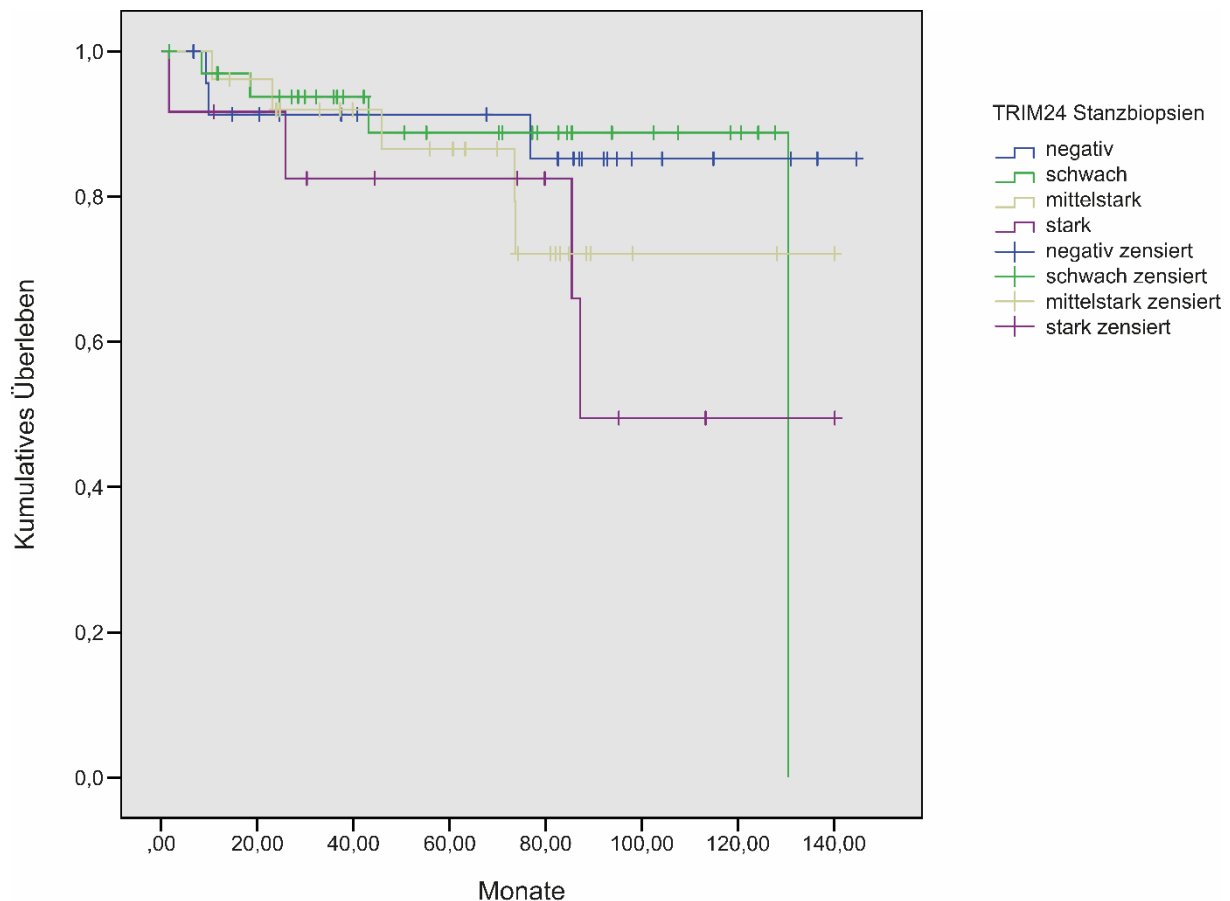
In der nächsten Cox-Regressionsanalyse prüften wir, ob die höheren Gruppen der *TRIM24*-Expression sowie eine höhere GG und ein höherer präoperativer PSA-Wert ein gesteigertes Risiko für ein biochemisches Rezidiv beherbergen als eine fehlende *TRIM24*-Expression. Hierbei zeigten die p-Werte aller *TRIM24*-Gruppen keine Signifikanz. Die p-Werte der GG und des PSA-Wertes waren < 0,001 und somit höchst signifikant.

Als nächstes schlossen wir alle 5 GGs einzeln in die Analyse ein. Dieser Test ergab einen Chi-Quadrat-Wert von 54,880 mit acht Freiheitsgraden und einem p-Wert von < 0,001. Es konnte gezeigt werden, dass GG1 ein 3,902-fach, GG2 ein 3,024-fach, GG3 ein 6,058-fach und GG4 ein 7,370-fach höheres Risiko für kürzeres rezidiv-freies Überleben in sich tragen als Fälle der GG0 (p-Wert für alle GGs < 0,001; außer für GG2 p-Wert 0,015).

Daraufhin fertigten wir Kaplan-Meier-Analysen nur von GG1 und der *TRIM24*-Expression an. Dazu untersuchten wir n=24 Patienten mit fehlender *TRIM24*-Expression, n=34 mit schwacher, n=26 mit mittelstarker und n=12 mit starker *TRIM24*-Expression. Insgesamt hatten wir hierfür Daten von 96 Patienten.

Die 1-JÜR in der Gruppe ohne Expression betrug ca. 91%, die 5-JÜR ca. 85% und die 10-JÜR ca. 85%. Bei den schwach Exprimierenden waren die 1-/5- und 10-JÜR jeweils ca. 97%, ca. 89% und ca. 0,0%. In der Gruppe der mittelstarken Fälle waren es ca. 96%, ca. 87% und ca. 72% für die 1-/5- und 10-JÜR. Schließlich ergaben sich für starke Expressionsstärken Werte von ca. 92%, 83% und 50% für die 1-/5- und 10-JÜR.

Der log rank Test ergab hierbei einen Chi-Quadrat-Wert von 2,731 mit drei Freiheitsgraden und einem nicht signifikanten p-Wert von 0,435.

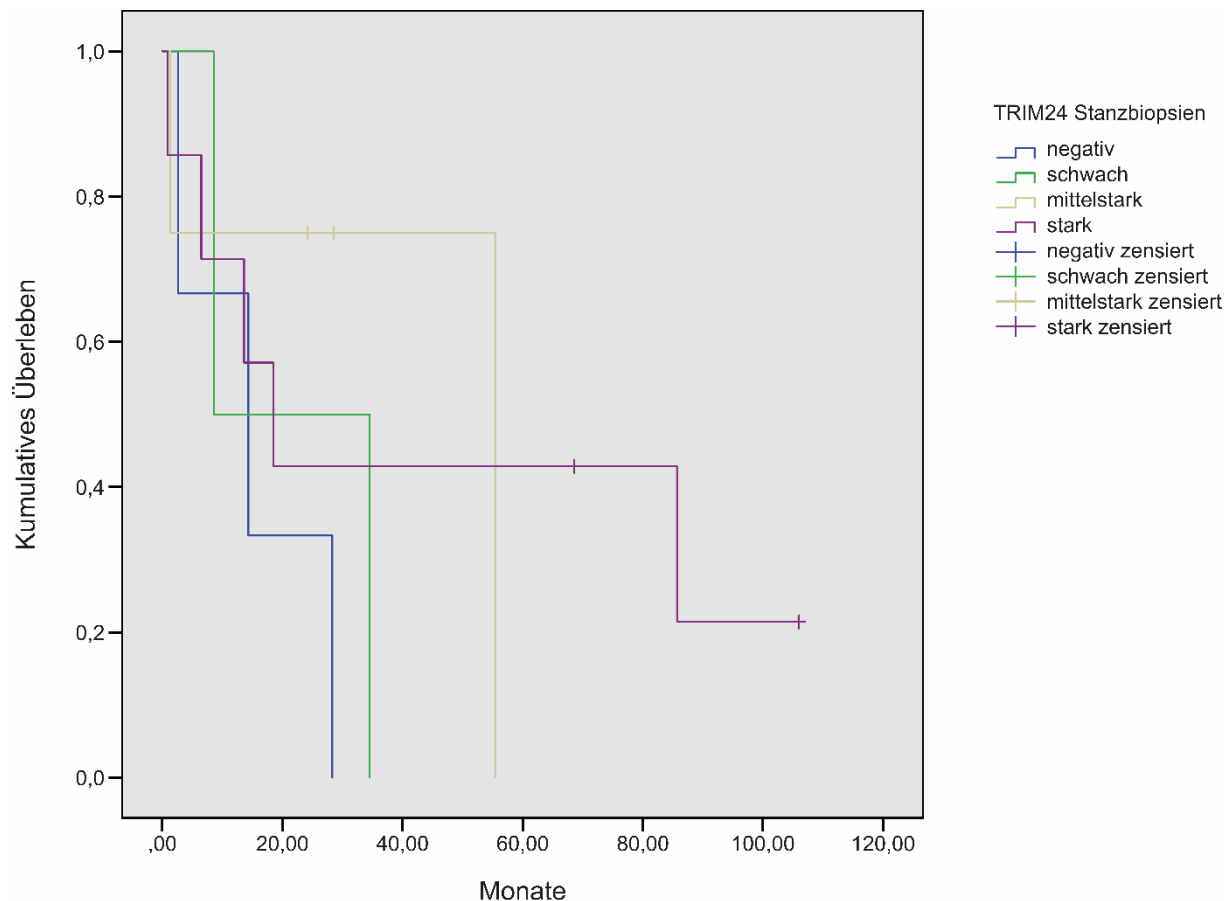


Graphik 10: Kaplan-Meier-Überlebenskurve von TRIM24 auf Stanzbiopsien der Grade Group 1

Anschließend wiederholten wir die Analyse mit GG5 statt GG1. Hierbei konnten wir nur auf einen kleinen Datensatz von insgesamt 16 Patienten zurückgreifen, die sich folgendermaßen aufteilten: n=3 Patienten mit fehlender *TRIM24*-Expression, n=2 Patienten mit schwacher Expression, n=4 Patienten mit mittelstarker Expression und n=7 Patienten mit starker Expression.

Aufgrund der geringen und unvollständigen Daten lassen sich Überlebensraten für Patienten der GG5 einfacher in Monaten beschreiben:

Die Überlebensraten für *TRIM24*-negative Patienten betrugen für 2,6 Monate ca. 67%, für 14,3 Monate ca. 33% und für 28,3 Monate ca. 0,0%. Für schwache Expression ergaben sich Raten von ca. 50% für 8,5 Monate und für 35 Monate 0,0%. Die mittelstark Expressierenden folgten mit ca. 75% bei 1,4 Monaten Überlebenszeit und 0,0% für 55 Monate. Und starke *TRIM24*-Werte wiesen Raten von ca. 71% für 6,5 Monate, für 18,5 Monate ca. 43% und für 86 Monate ca. 21% auf.



Graphik 11: Kaplan-Meier-Überlebenskurve von TRIM24 auf Stanzbiopsien der Grade Group 5

Der log rank Test für diese Analyse von Patienten der GG5 ergab einen Chi-Quadrat-Wert von 2,278 mit drei Freiheitsgraden und einem p-Wert von 0,517. Das deutet darauf hin, dass durch unsere geringe Patientenanzahl für diesen Test keine Signifikanz erreicht werden kann. Wären unsere Ergebnisse signifikant, würde das laut Diagramm auf ein längeres Überleben von Patienten mit stärkerer *TRIM24*-Expression innerhalb der GG5 hindeuten.

3.7.4 Kreuztabellen zwischen den Grade Groups auf Stanzbiopsien und RPE

Wir wollten vor allem noch wissen, wie sich die Korrelation zwischen den Grade Groups auf den Stanzbiopsien und den Grade Groups auf den RPE verhält. Wir konnten für diese Analyse von 209 Patienten auswerten, von welchen sowohl Stanzbiopsien als auch Primärtumore gewonnen durch RPE vorlagen. Dazu erhielten wir folgende Ergebnisse:

Der Pearson-Chi-Quadrat-Wert betrug hierbei 89,989 mit 16 Freiheitsgraden und einem p-Wert von $< 0,001$.

Stanzbiopsien der GG1 waren zu 83,6% auch in der GG1 der RPE enthalten. Die restlichen Stanzbiopsien in GG1 waren in absteigender Reihenfolge in den übrigen GGs 2 bis 5 der RPE enthalten (44,4%, 22,6%, 20,0% und 8,3%).

Die Stanzbiopsien der GG2 waren zu 28,9% hauptsächlich der GG2 der RPE zuzuordnen.

Anders verhielt es sich mit dem Stanzgewebe aus GG3, hier entsprach der größte Teil, nämlich 26,7% der GG4 der RPE und der zweitgrößte Teil mit 12,9% der GG3 der RPE. GG4 der Stanzbiopsien korrelierte zu 20,0% mit GG4 der RPE, zu 25,0% mit GG5 und zu 22,6% mit GG3 der RPE. Insgesamt liegen die Prozentwerte nahe beieinander im Bereich um GG4. Bei GG5 der Stanzbiopsien hob sich die Mehrheit mit 41,7% in Korrelation zu GG5 der RPE hervor. Die restlichen Werte weisen einen kontinuierlichen Abwärtstrend in Richtung kleinere GG auf: Davon 20,0% in GG4, 19,4% in GG3 und deutlich geringere Werte von 1,1% in GG2 und 0,0% für GG1.

3.8 *TRIM24* auf Primärtumoren aus RPE in Korrelation mit *AR*, *Ki-67* und *ERG*

Bei den Korrelationsanalysen zwischen *TRIM24* und *AR*, *Ki-67* und *ERG* auf den Primärtumoren aus RPE fanden wir Folgendes heraus: Die Korrelation von *TRIM24* und *AR* und auch zwischen *TRIM24* und *Ki-67* ergab jeweils einen signifikanten p-Wert von $< 0,001$. Ebenfalls die Korrelation von *AR* und *Ki-67* war mit einem p-Wert von $< 0,001$ höchst signifikant.

Um den Zusammenhang zwischen *TRIM24* und *ERG* zu prüfen, führten wir einen T-Test für unabhängige Stichproben durch. Der T-Test für die Mittelwertgleichheit ergab einen nicht signifikanten p-Wert von 0,123, woraus wir schlussfolgerten, dass es keinen Unterschied zwischen den Mittelwerten der *TRIM24*-Expression bei Patienten mit negativem beziehungsweise positivem *ERG*-Status gibt. Laut diesen Daten hat eine höhere *TRIM24*-Expression keinen Effekt auf einen höheren *ERG*-Expressionswert beziehungsweise *ERG*-Status.

4 DISKUSSION:

4.1 Biomarker als diagnostische Parameter

4.1.1 Bisherige Therapiekonzepte

Für das Prostatakarzinom als häufigste Karzinomentität des Mannes in westlichen Staaten gibt es grundsätzlich zwei verschiedene Behandlungskonzepte: Einerseits ein kuratives Vorgehen mit Radiatio oder der gleichzustellenden radikalen Prostatektomie, bei welcher dem Patienten in der Regel die Prostata sowie die anhängenden Samenblasen und eventuell die regionären Lymphknoten entfernt werden. Diese Prozedur birgt, vor allem bei indolent wachsenden, nicht aggressiven Tumoren, ein vermeidbares Nebenwirkungsprofil. Zu den OP-Komplikationen gehören demnach die lebenslange Inkontinenz und Impotenz, außerdem eine retrograde Ejakulation und somit mögliche Infertilität. Nebenwirkungen wie Inkontinenz und Impotenz können auch durch eine Bestrahlung ausgelöst werden, außerdem lokale Reizungen oder Entzündungen an Haut, Darm und Harnblase mit einhergehenden Funktionsbeschwerden. Um diese radikalen Eingriffe Patienten mit einem langsam wachsenden, nicht metastasierenden Prostatakarzinom zu ersparen, gibt es daneben noch die konservative, abwartende Therapie. Diese umfasst die „Active Surveillance“ beziehungsweise im palliativen Setting das „Watchful waiting“, Therapiekonzepte, bei denen die regelmäßige Kontrolle im Vordergrund steht. Hierbei ist ein operatives Eingreifen erst im Verlauf oder gar nicht, je nach Tumorverhalten, vorgesehen (Schmelz et al. 2006).

4.1.2 Notwendigkeit eines prognostischen Tools

Um jedem Patienten die geeignete Therapie zukommen zu lassen, ist ein prognostisches Tool notwendig, welches im Rahmen der Primärdiagnostik den jeweiligen Verlauf des Prostatakarzinoms vorhersagen kann. Ideal wäre es, den Patienten vor unnötiger Invasivität zu schützen aber gleichzeitig kein indolent erscheinendes, jedoch aggressives Tumorwachstum zu verpassen. Da die Erstdiagnose bei Verdacht auf ein Prostatakarzinom an Stanzbiopsien vorgenommen wird, ist es essentiell, dass prädiktive Biomarker auch an diesem Gewebe angewendet werden können.

4.1.3 Bisherige Prognosemarker als Therapieentscheidungsgrundlagen

Einer der stärksten Prognosemarker ist bisher der Gleason Score, welcher auf

histomorphologischen Parametern des Karzinoms basiert. Weitere Prognosemarker sind die TNM-Klassifikation sowie die chirurgischen Resektionsränder des Tumors nach radikaler Prostatektomie (nicht tumorfreie Resektionsränder sprechen für einen Residualtumor nach OP) (AWMF 2021). Bisher werden jedoch routinemäßig keine molekularen Analysen oder Immunhistochemische Marker zur Prognoseabschätzung des Prostatakarzinoms angewendet (AWMF 2021).

4.1.4 Diskussion über *TRIM24* als Prognosemarker anhand unserer Ergebnisse

Um unsere Ergebnisse in den wissenschaftlichen Kontext einzuordnen, wird im Folgenden die Relevanz von *TRIM24* als Prognosemarker in unterschiedlichen Stadien des Prostatakarzinoms erörtert. Darüber hinaus soll seine prognostische Aussagekraft in Hinsicht auf den jeweiligen Verlauf eines neudiagnostizierten PCAs diskutiert, und mit international veröffentlichten Forschungsergebnissen verglichen werden.

Unsere *in silico* Analyse zeigt folgende Entitäten-übergreifenden Auffälligkeiten von *TRIM24*: Es sind häufig Amplifikationen, aber auch tiefe Deletionen und andere Mutationen seines Genortes auf Chromosom 7 zu beobachten. Diese Analyse und weitere Studien identifizieren *TRIM24* als häufig verändertes Gen verschiedenster Karzinomarten, wobei es sowohl als Tumorsuppressor (Chi et al. 2016), als auch als Onkogen auftritt (Fong et al. 2018).

Durch diese Forschungsarbeit konnten wir belegen, dass *TRIM24* im Prostatakarzinom signifikant hochreguliert ist im Vergleich zu benignem Prostatagewebe. Darüber hinaus konnten wir feststellen, dass höhere Proteinexpressionen mit höhergradigen Tumorstadien einhergehen. Die geringste Expressionsstärke zeigten gutartige Prostataadrüsen, wobei Primärtumore höhere *TRIM24*-Proteinlevel aufwiesen und Prostatakarzinom-Metastasen die Höchsten.

Außerdem war das biochemisch rezidiv-freie Überleben, definiert als postoperativer Serum-PSA-Anstieg, bei Patienten mit stärkerer *TRIM24*-Expression signifikant verkürzt. Durch multivariate Analysen konnte zusätzlich gezeigt werden, dass mit steigender *TRIM24*-Expression die rezidiv-freie Überlebenszeit reduziert ist. Demnach war die *TRIM24*-Expression außerdem unabhängig von anderen Prognosemarkern. Durch unsere Überlebensanalysen lassen sich die Risiken von

Patienten, postoperativ einen Rezidiv-Tumor zu erleiden, anhand der *TRIM24*-Expressionsstärke abschätzen.

Bei Betrachtung der Proteinexpression auf den Prostatastanzbiopsien erwies sich *TRIM24* als ein signifikanter Prognosemarker. Auch hier sank die Überlebensrate für Patienten mit ansteigendem *TRIM24*-Proteinlevel stufenweise. Zusätzlich war *TRIM24* mit der Grade Group auf Stanzbiopsien assoziiert, was bedeutet, dass höhere Expressionsstärken höheren GGs zugehörig waren.

Die Korrelation von *TRIM24* mit anderen klinisch-pathologischen Daten, wie der GG, dem T-Stadium, dem N-Stadium und dem präoperativem PSA-Wert zeigte Folgendes: Bei höherer Proteinexpression lag auch eine höhere GG vor. Die T-Stadien waren ebenfalls mit der *TRIM24*-Expression assoziiert, indem höhere Expressionen in T3 und T4, also in Tumoren mit extraprostatischem Wachstum (siehe Anhang TNM-Stadien), nachgewiesen werden konnten. Gleiches galt für den N-Status, denn ein positiver Lymphknotenbefall korrelierte demnach mit höheren *TRIM24*-Leveln. Lediglich die Korrelation zwischen *TRIM24* und dem präoperativen PSA-Wert zeigte keine statistische Signifikanz.

Deutlich wird auch noch einmal die Assoziation zwischen einer zunehmend stärkeren *TRIM24*-Expression und den damit einhergehenden kürzeren Überlebensraten. Diesen Zusammenhang konnten wir sowohl auf Präparaten von radikalen Prostatektomien als auch auf Prostatastanzbiopsien nachweisen.

Wir konnten also durch unsere Arbeit folgende Antworten auf unsere Fragestellungen aufzeigen: Einmal, dass höhere *TRIM24*-Proteinexpressionsstärken mit unterschiedlichen Progressionsstadien des Prostatakarzinoms assoziiert sind, es wird ein gleichgerichteter Anstieg beobachtet. Darüber hinaus lassen unsere Experimente auf den prognostischen Prostatastanzbiopsien darauf schließen, dass *TRIM24* als Prognosemarker im Prostatakarzinom Aussagekraft hat und eine Risikostratifizierung von Patienten ermöglichen kann.

4.1.5 AR in Korrelation mit *TRIM24*

In unserer Progressionsanalyse des Androgenrezeptors *AR* konnten wir nachweisen, dass mit zunehmendem Karzinomprogress die *AR*-Expression

ansteigt. Sowohl in den Primärtumoren aus RPE als auch in den p-TUR-Ps zeigte sich diesbezüglich statistische Signifikanz. In der Überlebensanalyse zeichneten sich die stark und sehr stark *AR*-exprimierenden Gewebeproben deutlich durch verringertes Überleben im Vergleich zu den schwach und mittelstark Exprimierenden ab. In den Korrelationsanalysen konnten wir nachweisen, dass *AR* unabhängig von der GG und dem T-Stadium ist, und somit einen zusätzlichen Parameter darstellt. Zudem waren höhere *AR*-Expressionen deutlich den höheren T-Stadien zuzuordnen, was nochmals die höhere Expression des Androgenrezeptors in Tumorprogress unterstreicht und *AR* als Baustein der Kanzerogenese im Prostatakarzinom vermuten lässt.

Durch unsere Analysen über den *AR* konnten wir ebenfalls signifikante Ergebnisse in Korrelation mit *TRIM24* aufzeigen. Anhand unserer immunhistochemischen Methoden unter der Verwendung des monoklonalen anti-Androgenrezeptor Antikörpers, lassen sich nur absolute Angaben über das Expressionsmuster von *AR* und seine Korrelationsanalysen machen. Nicht aber die Untergliederung von Mutationen oder etwa Splicevarianten von *AR* sind dadurch untersucht worden. Unsere Ergebnisse bezüglich der Korrelation zwischen *AR* und *TRIM24* decken sich mit denen der Literatur (Groner et al. 2016). Ebenfalls sei hier nochmals auf den Bezug von *TRIM24* als Kofaktor des *AR*-Signalweges hingewiesen. Eine Korrelation bedeutet, dass *TRIM24* bei hoher *AR*-Expression im Prostatakarzinom koexprimiert ist, indem *TRIM24* die Transkriptionsaktivität von *AR* durch Dihydrotestosteron in Prostatakarzinomzellen erhöht (Kikuchi et al. 2009).

4.1.6 *Ki-67* als Proliferationsmarker

Ki-67 ist als durchweg verlässlicher prognostischer Marker unter anderem beim Prostatakarzinom (Aaltomaa et al. 1997) und beim Mammakarzinom (Bouzubar et al. 1989) identifiziert worden. Auch durch unsere Ergebnisse konnten wir seine Korrelation mit hochgradigen, aggressiven Tumorverläufen zeigen und auch eine Übereinstimmung mit verkürzter biochemisch rezidiv-freier Überlebenszeit. Die Wahl des *Cut Offs* bei der Auswertung und Interpretation von *Ki-67* stellt in der Literatur dauerhaft ein Diskussionsthema dar, beispielsweise wurde in einer Studie über Mammakarzinome ein *Cut Off* von 14% für *Ki-67* festgelegt (Kirn et al. 2015).

Deshalb führten wir unsere statistischen Analysen zweifach durch: Einmal mit dem

Median von 12,63 als *Cut Off*, wobei wir jeweils die Werte darunter als *Ki-67*-negativ und die Werte darüber als *Ki-67*-positiv definierten.

Der Mittelwert der *Ki-67*-Expression betrug 20,16. Wir bildeten im Folgenden drei Gruppen zur Analyse des *Ki-67*-Scores, mit minimaler (*Cut Off* 0 bis 10), moderater (*Cut Off* 10,1 bis 50) und hoher (*Cut Off* 50,1 bis 100) *Ki-67*-Expression.

Trotz zahlreicher Studien über verschiedenste Krebsentitäten, hat sich *Ki-67* nicht oft durchgesetzt in der Routinediagnostik von Primärtumoren. Eine Ausnahme stellt das Hodenkarzinom dar, wo *Ki-67* als Standardprognosemarker in den Leitlinien verankert ist (AWMF 2020). Als Grund dafür wird unter anderem die große Variabilität in der Anwendung von *Ki-67* zwischen verschiedenen Laboren diskutiert, da standardisierte Regelungen zur Bestimmung des *Cut Off* Wertes fehlen (Kirn et al. 2015). Des Weiteren kann man nicht einen Standard *Cut Off* für alle Krebsentitäten gleichermaßen definieren, sondern müsste gewebespezifisch differenzieren. Letztlich stellten sich unsere gewählten Grenzwerte für das Prostatakarzinom in den Überlebensanalysen als statistisch signifikant heraus.

Unsere Ergebnisse der multivariaten Cox-Regressionsanalyse stellen *Ki-67* als einen von Grade Group und T-Stadium unabhängigen Prognosemarker dar. *TRIM24* korrelierte in unseren Analysen höchst signifikant mit *Ki-67*, was die prognostische Relevanz von *TRIM24* im Tumorprogress nochmals untermauert.

4.1.7 *ERG*-Fusionsgen im Prostatakarzinom

Unsere Ergebnisse bezüglich der Proteinexpression von *ERG*, welche wir als Surrogatmarker der *TMPRSS2:ERG*-Fusion heranzogen haben (Chaux et al. 2011), zeigten in den Überlebensanalysen keine statistische Signifikanz. In den Korrelationsanalysen erreichte *ERG* nur in Bezug auf die GG Signifikanz, nicht in Bezug auf T- oder N-Stadium. In unserer Progressionsanalyse waren 100% der Patienten mit benignem Gewebe *ERG*-negativ und von den Tumorpatienten waren die Gruppe mit Lymphknotenmetastasen am häufigsten *ERG*-positiv, bei uns in 64,0%. Insgesamt decken sich unsere Resultate mit der Literatur, dort wird ebenfalls beschrieben, dass das *ERG*-Fusionsgen auf Chromosom 21 zwar mit bis zu 48,5% Mutationsrate die häufigste Translokation im Prostatakarzinom ist (Perner et al. 2007), aber die klinische Signifikanz unklar bleibt (Ullman et al. 2018).

Ein Grund dafür könnte sein, dass es einige verschiedene Arten von Fusionsgenen gibt, in welche *ERG* eingebunden ist. Dies betrifft einerseits die Entstehung von Tumoren, aber andererseits auch unterschiedliche Mutationen, die zu *ERG*-Fusionsgenen führen (Mehra et al. 2008).

Beispielsweise konnte in einer Studie von Xu et al. zwar keine Korrelation zwischen dem *TMPRSS2:ERG* Fusionsgen und dem Gleason Score gezeigt werden, jedoch zwischen dem *ERG*-Status, einem jüngeren Patientenalter und niedrigeren PSA-Werten bei der Erstdiagnose (Xu et al. 2014).

Weiter gibt es eine Forschungsarbeit, in welcher zwar hohe *ERG*-Genfusionen in Prostatakarzinom, nämlich 53% gefunden wurden, jedoch wiederum keine Korrelation zwischen dem *ERG*-Status und klinisch-pathologischen Daten (Esgueva et al. 2010).

Diese Ergebnisse sollen zeigen, dass es nach Entdeckung der im Prostatakarzinom häufigen *TMPRSS2:ERG*-Fusion zwar eine Welle an Studien gegeben hat, um diesen Zusammenhang genauer zu erforschen. Letztlich die genauen Hintergründe sowie die wissenschaftliche klinische Relevanz ist bis heute unklar geblieben. Weitere Aufschlüsse dieses Sachverhalts konnten wir auch durch unsere Experimente nicht liefern.

4.1.8 Korrelationen zwischen verschiedenen Biomarkern

Durch Korrelationsanalysen zwischen der *TRIM24*-Expression und sowohl dem *AR*- als auch dem *Ki-67*-Status konnten wir signifikante positive Assoziationen darlegen. Die *TRIM24*-Expressionsstärke steigt hierbei sowohl mit erhöhter *AR*-Expression als auch mit erhöhter *Ki-67*-Expression, gemessen am positiven *Ki-67*-Index. Da *TRIM24* darüber hinaus signifikant unabhängig von anderen Prognosemarkern, wie der Grade Group und dem T- und N-Stadium war, stellt es einen zusätzlichen Nutzen zu diesen bereits etablierten Parametern dar. Die Grade Group wurde dabei von der International Society of Urological Pathology (ISUP) vorgeschlagen und ist eine neue WHO-Klassifikation (Schlomm und Sauter). Sie stellt eine Neu-Definition der Einteilung der morphologischen Kriterien des Prostatakarzinoms in insgesamt 5 *Grade Groups* dar.

4.2 Technische Limitationen

Zur Interpretierbarkeit unserer Ergebnisse lassen sich nachfolgende Limitationen durch unsere technischen Methoden diskutieren. Da die Schritte unserer Gewebepvorbereitung und Färbung teilweise von Hand und teilweise maschinell und semiautomatisch durchgeführt wurden, lassen sich gewisse Schwankungen nicht ausschließen.

4.2.1 TMA

Auch bei der Herstellung und Verwendung eines TMAs, kann es durch Gewebeverlust zum Ausschluss einzelner Patientenproben kommen, die Auswertbarkeit bleibt dabei jedoch gut. Die ersten Schnitte, die von einem TMA angefertigt werden, werden mit der Standardfärbung HE gefärbt. Auf den HE gefärbten Schnitten sind normalerweise alle 60 Gewebeproben des TMAs repräsentiert, da oberflächlich meist genug Tumor vorhanden ist. Je öfter der TMA-Block geschnitten wird, desto wahrscheinlicher ist in der Tiefe nicht mehr auf allen 60 Positionen Gewebe übrig. An manchen Stellen befindet sich nur noch Paraffinwachs, an anderen Stellen zwar Prostatagewebe, aber eventuell nur Bindegewebe ohne Drüsenzellen. Diese einzelnen Proben können nicht ausgewertet werden. Da wir von jedem Patienten in der Regel drei benachbarte Proben auf dem TMA abgebildet haben (technisches Triplikat), werden in solchen Fällen die vorhandenen Gewebeproben herangezogen. Da wir ohnehin für unsere Analysen immer mit dem Mittelwert des jeweiligen Patienten gearbeitet haben, hat ein Gewebeverlust keine gravierenden Auswirkungen auf das Endergebnis. Fehlen von einem Patienten alle drei Proben auf dem TMA, muss er aus der Analyse ausgeschlossen werden.

4.2.2 Antikörper

Auch kann die Antigen-Antikörper-Reaktion von bestimmten Antikörpern im untersuchten Gewebe nicht richtig funktionieren. Je nachdem, welches Antigen man detektieren möchte, kommt dies zum Beispiel nukleär, membranös, cytoplasmatisch, oder auch ubiquitär in der Zelle vor. So kann zum Beispiel ein bestimmter Antikörper nur membranös, cytoplasmatisch oder nukleär am Antigen binden. Der Bindeort des Antikörpers sollte dadurch bedingt sein, wo das Protein in der Zelle lokalisiert ist und nicht vom Antikörper oder Färbeprotokoll abhängen.

Zudem ist zu beachten, dass verschiedene Antikörper von diversen Herstellern an unterschiedliche Epitope des Antigens binden können. Deshalb ist es wichtig, beim Vergleich von eigenen Ergebnissen mit bereits publizierten Ergebnissen, auch die verwendeten Antikörper miteinander zu vergleichen, um nicht zu falschen Schlüssen zu kommen.

4.2.3 IHC

Ein weiterer Punkt, welcher limitierenden Einfluss auf unsere Ergebnisse haben könnte, ist die Tatsache, dass wir Tumorgewebe aus den Jahren 1996 bis 2015 untersucht haben. Dies entspricht einer Zeitspanne von 20 Jahren. Die Gewebe wurden alle gleich gelagert: Eingebettet in Paraffinwachs, bei Raumtemperatur, geschützt in Kartons sortiert. Aus diesen Gewebelöcken werden nach Bedarf und je nach Gewebeart unterschiedliche Präparate angefertigt: Aus Prostatektomien wird ein TMA angefertigt, bei Stanzbiopsien ein whole slide, also ein ganzer Schnitt. Hierbei kann es insbesondere auf den whole slides der Stenzen auch vorkommen, dass kein Gewebe, beziehungsweise kein Tumorgewebe auf dem dünnen Schnitt abgebildet ist. Es gibt einige Publikationen dazu, dass unterschiedlich altes Gewebe eventuell ein unterschiedliches Reaktionsmuster in der IHC zeigt (Libard et al. 2019). So könnte es sein, dass ältere konservierte Gewebeproben eine trögere oder abgeschwächte Antikörperbindungsreaktion eingehen. Dies würde sich wiederum auf ein schwächeres Expressionsmuster auswirken, welches sich dann durch die Software in geringere Zahlenwerte umrechnen lässt und somit unsere Ergebniskurven beeinflussen könnte.

Es kann auch vorkommen, dass in der IHC durch den Färbeautomaten keine gleichmäßig verteilte Färbung über den gesamten TMA stattgefunden hat. Bei uns gab es zum Beispiel den Fall, dass auf einem Objektträger zentral eine stärkere und peripher eine deutlich blässere Braunfärbung zu sehen war. Um gleiche experimentelle Bedingungen zu schaffen, haben wir deshalb alle gefärbten Objektträger vor ihrer weiteren Auswertung kritisch begutachtet. Bei ungleichmäßiger Färbung haben wir diese Objektträger verworfen und die IHC für diese Proben ist auf einem neuen Objektträger wiederholt worden.

Auch ist aufgefallen, dass es teilweise Unterschiede bei der IHC von TMAs gab, von denen Leerschnitte gelagert wurden. Wurden diese Leerschnitte nicht direkt nach

ihrem Anfertigen mit IHC-gefärbt, sondern erst eine Weile aufbewahrt, so zeigten diese teilweise trügere Expressionsstärken als frisch geschnittene und am selben Tag gefärbte Objektträger. Wenn es hier sichtbare Unterschiede gab, wurden die Arbeitsschritte des Schneidens und Färbens wiederholt, um vergleichbare Grundlagen zu schaffen.

4.2.4 Follow-up Daten

Für unsere Analysen war ebenfalls wichtig, möglichst Patienten mit klinischen Follow-up Daten zu finden. Zum Beispiel wollten wir überprüfen, ob man anhand der *TRIM24*-Expression die Entwicklung eines kastrationsresistenten Karzinoms, gemessen durch den postoperativen PSA-Anstieg, voraussagen kann. Auch dazu gibt es Einschränkungen, und zwar einmal, dass solche Daten praktisch nie vollständig sein können, weil Patienten verziehen, andernorts weiterbehandelt werden, versterben oder aus anderen Gründen unvollständige Daten vorliegen. Da es sich bei unserer Studie um eine retrospektive Auswertung handelt, konnten wir fehlende Daten auch nicht erfragen. Solche Patienten mit unvollständigen klinischen Daten, sind in den Graphiken im Ergebnisteil als zensiert markiert.

4.2.5 Definiens

Mit dem Softwareprogramm *Definiens* zur Auswertung der absoluten Expressionsstärke beziehungsweise im Fall von *Ki-67* zur Ermittlung des Positiv-Index, ergaben sich folgende Aspekte: Es können fälschlicherweise auch andere Zellen mit dem jeweiligen Antikörper durch die Immunhistochemie angefärbt worden sein. So erscheinen zum Beispiel Histiozyten, Immunzellen etwa bei Lymphknoteninfiltration im Rahmen eines Entzündungsprozesses, ähnlich wie gefärbte Tumorzellkerne. Bei genauerer Betrachtung, oder auch durch stärkere Vergrößerung des mikroskopischen Bildes am Computer, lassen sich die Zellen morphologisch voneinander unterscheiden.

Die Grundlage des *Definiens*-Programms ist nämlich die digitale Markierung des Tumorgebietes, der sogenannten *region of interest* (ROI). Auf dem eingescannten immunhistochemischen Gewebeschnitt, wird die ROI mit der Computermouse per Hand eingezirkelt. Nur die so eingegrenzten Zellen werden vom Programm ausgewertet. Deswegen ist eine gewissenhafte Markierung des ROI, welche die durchschnittliche Expression der einzelnen Gewebeprobe widerspiegelt,

unerlässlich. So kann es auch vorkommen, dass auf einer Probe unterschiedlich stark gefärbte Drüsen abgebildet sind. In diesem Fall müssen mehrere ROIs von allen Expressionsstärken dieser Probe angefertigt werden, um der Heterogenität gerecht zu werden. Auch kann es sein, dass auf einer Probe sowohl malignes als auch benignes Gewebe abgebildet ist. In diesem Fall haben wir nur die malignen Zellen eingezirkelt. Die benignen Zellen haben wir nur auf Proben, welche laut TMA-Datenblatt als „Benigne“ gekennzeichnet wurden, markiert, um auswertbare Ergebnisse zu bekommen. Sonst würde in so einer Gewebeprobe ein gemeinsamer Mittelwert aus der Expression in benignen und malignen Zellen errechnet werden.

Die Angabe der Färbungsstärke erfolgt in absoluten Zahlen durch den Computer. Diese werden errechnet anhand einer Solution, welche je nach Fragestellung modifiziert werden kann. Wir haben die gleiche eigens angepasste Solution für die nukleäre Expression aller vier untersuchten Marker gewählt, um eine Vergleichbarkeit herzustellen.

Einen Teil unserer Ergebnisse konnten wir bereits im März 2019 publizieren im *Journal Urologic Oncology* (Offermann et al. 2019).

5 ZUSAMMENFASSUNG

Das Prostatakarzinom stellt die häufigste Karzinomart unter Männern in Deutschland dar. Zur Behandlung des Patienten wählt man zwischen der abwartenden Therapie und der kurativen, radikalen wenn möglich nervenschonenden OP mit Lymphadenektomie versus Radiatio. Bei der Entscheidung für die richtige Behandlungsart ist die Prognoseabschätzung essenziell. Trotz zahlreicher Studien gibt es allerdings noch keine zuverlässigen Prognosemarker. Durch ungenaue Vorhersagen werden viele Patienten entweder zu spät behandelt oder unnötigerweise den hohen Risiken und Nebenwirkungen einer sofortigen Therapie ausgesetzt.

In unseren Experimenten haben wir prognoserelevante Biomarker untersucht, welche für Progression, Rezidivverhalten, CRPC, Lymphknoten- und Fernmetastasenbildung prädiktiv sein könnten. Dabei haben wir uns auf den Transkriptionsfaktor *TRIM24* aus der TRIM-Protein-Familie fokussiert, der bereits als Onkogen im Prostatakarzinom erforscht worden ist.

Auf benignen Prostatadrüsen, Primärtumoren aus RPE, p-TUR-P, Lymphknotenmetastasen und Fernmetastasen von 690 Patienten detektierten wir *TRIM24* mittels IHC und maßen die jeweilige Expressionsstärke mit einer Computersoftware. Zur Evaluierung unserer Ergebnisse verglichen wir diese Kohorte mit einer Vergleichskohorte, welche nur Prostatagewebsstanzen beinhaltete. Um *TRIM24* mit bereits etablierten Biomarkern zu korrelieren, führten wir weitere IHC-Färbungen mit *AR*, *ERG* und dem Proliferationsindex *Ki-67* durch.

Unsere Ergebnisse wiesen für *TRIM24* eine signifikante prognostische Relevanz für das Prostatakarzinom auf. Des Weiteren ergaben sich positive Korrelationen mit *AR* und *Ki-67*. Unsere Ergebnisse für den *ERG*-Status waren nicht signifikant.

Insgesamt konnten wir zeigen, dass *TRIM24* prognostisch unabhängig von etablierten Parametern wie der Grade Group ist und somit einen diagnostischen Zusatznutzen verspricht.

Dies war die erste experimentelle Studie, die die Proteinexpression von *TRIM24* auf Prostatastanzbiopsien, auf welchen die Erstdiagnose festgelegt wird, untersuchte.

6 ANHANG

6.1 TNM-Klassifikation des Prostatakarzinoms

Tumorausdehnung

TX Primärtumor kann nicht beurteilt werden

T0 Kein Hinweis auf einen Primärtumor

T1 Klinisch unauffälliger, nicht tastbarer Tumor

T1a Zufälliger Nachweis eines Tumors in der histologischen Untersuchung operativ entfernten Prostatagewebes, höchstens 5% des Gewebes betroffen

T1b Zufälliger Nachweis eines Tumors in der histologischen Untersuchung operativ entfernten Prostatagewebes, mehr als 5% des Gewebes betroffen

T1c Tumornachweis durch Nadelbiopsie, die z.B. aufgrund eines erhöhten PSA-Werts durchgeführt wurde

T2 Tastbarer Tumor, der auf die Prostata beschränkt ist

T2a Maximal die Hälfte eines Prostatalappens betroffen

T2b Mehr als die Hälfte eines Prostatalappens betroffen, der andere Lappen ist nicht betroffen

T2c Beide Prostatalappen betroffen

T3 Ausdehnung des Tumors über die Prostatakapsel hinaus*
*Ausbreitung eines Tumors bis in die Prostataspitze oder in die Prostatakapsel (aber nicht darüber hinaus) wird nicht als T3-, sondern als T2-Tumor gewertet.

	Tumorausbreitung ein- oder beidseitig
T3a	über Prostatakapsel hinaus, Samenblasen tumorfrei
T3b	Ausbreitung bis in die Samenblase(n)
T4	Tumor ist fixiert oder hat sich auf benachbarte Strukturen (außer der Samenblase) wie Schließmuskeln, Rektum und/oder Beckenboden ausgebreitet
Lymphknotenmetastasen (N)	
NX	Regionale Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionalen Lymphknotenmetastasen nachweisbar
N1	Regionale Lymphknotenmetastasen nachweisbar
Fernmetastasen (M)	
M0	keine Fernmetastasen nachweisbar
M1	Fernmetastasen nachweisbar
M1a	Nichtregionale Lymphknoten betroffen
M1b	Knochenmetastasen nachweisbar
M1c	Andere Organe betroffen

Anhang 1: TNM-Klassifikation, (Miller und Gschwend)

7 DANKSAGUNG

Danke sagen möchte ich als allererstes Herrn Prof. Sven Perner, der mir das Thema überlassen hat und mich als Mitglied in seinem Pernerlab aufgenommen hat. Er stand stets mit Rat und Tat zur Seite. Er war sehr ehrgeizig und fasziniert bei allem, was die Forschung betrifft und gab seinen Eifer auch an seine Mitarbeiter weiter. Er unterstützte uns Doktoranden, förderte unser wissenschaftliches Denken, und half dazu, dass man vorankam. Fasziniert hat er mich durch seinen unkonventionellen Charakter, und seine direkte Art, Dinge anzusprechen und vor allem anzupacken.

Als nächstes möchte ich insbesondere Dr. med. Anne Offermann, meiner Betreuerin, danken. Ich habe gemerkt, dass ich ihr gar nicht immer folgen konnte, wenn sie mir versucht hat geduldig Dinge über unsere Forschung zu erklären. Manche Dinge sind mir erst beim Schreiben meiner Doktorarbeit jetzt am Ende klargeworden. Anne war stets bereit, bei allen Belangen zu Helfen und hatte immer ein offenes Ohr für uns Doktoranden, obwohl sie selbst sehr viel zu tun hat. Ich möchte mich herzlich bei dir bedanken Anne, dass du mich und meine Doktorarbeit begleitet und so gut unterstützt hast.

Danken möchte ich auch von Herzen Wenzel, Eva und Michelle, unseren wunderbaren MTA- und LTA-Mitarbeitern. Ohne euch hätte ich das alles definitiv nicht geschafft. Ihr seid das A und O in so einem Projekt. Es war immer witzig mit euch, ich habe mich richtig gut aufgehoben gefühlt bei euch im Arbeitszimmer und in dieser persönlichen Atmosphäre habe ich euch schnell ins Herz geschlossen. Und einen riesengroßen Applaus an eure hervorragenden technischen Leistungen! Danke für Alles!

Vielen Dank auch an alle anderen Doktoranden in der Pathologie, meine lieben Weggefährten, mit denen ich immer in die Mensa gehen konnte und mich austauschen konnte.

Natürlich möchte ich mich auch bei meiner Familie und meinen Lieben bedanken. Danke, dass ihr wirklich immer für mich da seid, immer hinter mir steht und ich mich immer auf euch verlassen kann. So groß wie der Dank sein müsste, der euch gebührt, kann ich das gar nicht in Worte fassen. ♥

8 LEBENS LAUF

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Doris Roth
Geburtsort Weißenburg i. Bay.

Forschung

**08/2017-
10/2019** Doktorarbeit am Institut für Pathologie, Universitätsklinikum
Schleswig- Holstein, Campus Lübeck

Publikationen

12/2018 Expression of Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA) on
Biopsies Is an Independent Risk Stratifier of Prostate Cancer Patients
at Time of Initial Diagnosis,
Frontiers in Oncology, 2018 December

07/2019 Increased mediator complex subunit CDK19 expression associates
with aggressive prostate cancer,
International Journal of Cancer, 2019 July

09/2019 TRIM24 as an independent prognostic biomarker for prostate cancer,
Urologic Oncology, 2019 September

9 LITERATURVERZEICHNIS

Aaltomaa, S.; Lipponen, P.; Vesalainen, S.; Ala-Opas, M.; Eskelinen, M.; Syrjänen, K. (1997): Value of Ki-67 immunolabelling as a prognostic factor in prostate cancer. In: *European urology* 32 (4), S. 410–415.

Allton, Kendra; Jain, Abhinav K.; Herz, Hans-Martin; Tsai, Wen-Wei; Jung, Sung Yun; Qin, Jun et al. (2009): Trim24 targets endogenous p53 for degradation. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (28), S. 11612–11616. DOI: 10.1073/pnas.0813177106.

Askew, Emily B.; Gampe, Robert T.; Stanley, Thomas B.; Faggart, Jonathan L.; Wilson, Elizabeth M. (2007): Modulation of androgen receptor activation function 2 by testosterone and dihydrotestosterone. In: *The Journal of biological chemistry* 282 (35), S. 25801–25816. DOI: 10.1074/jbc.M703268200.

AWMF (2020): S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge der Keimzelltumoren des Hodens. Langversion 1.1 – Februar 2020. AWMF-Registernummer: 043/049OL. Hg. v. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e. V. Online verfügbar unter https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/043-049OLI_S3_Keimzelltumoren-Hoden-Diagnostik-Therapie-Nachsorge_2020-03.pdf.

AWMF (2021): S3-Leitlinie Prostatakarzinom. Version 6.1 - Juli 2021, Langfassung. AWMF-Registernummer: 043/022OL. Hg. v. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e. V.

Böcker, Werner; Denk, Helmut; Heitz, Philipp U.; Moch, Holger (2012): Repetitorium Pathologie. 2. Aufl. s.l.: Urban Fischer Verlag - Lehrbücher. Online verfügbar unter <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&scope=site&db=nlebk&db=nlabk&AN=807984>.

Bouzubar, N.; Walker, K. J.; Griffiths, K.; Ellis, I. O.; Elston, C. W.; Robertson, J. F. et al. (1989): Ki67 immunostaining in primary breast cancer: pathological and clinical associations. In: *British Journal of Cancer* 59 (6), S. 943–947.

Braun, Martin; Scheble, Veit J.; Menon, Roopika; Scharf, Gregor; Wilbertz, Theresia; Petersen, Karen et al. (2011): Relevance of cohort design for studying the frequency of the ERG rearrangement in prostate cancer. In: *Histopathology* 58 (7), S. 1028–1036. DOI: 10.1111/j.1365-2559.2011.03862.x.

Bray, Freddie; Ferlay, Jacques; Soerjomataram, Isabelle; Siegel, Rebecca L.; Torre, Lindsey A.; Jemal, Ahmedin (2018): Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. In: *CA: a cancer journal for clinicians* 68 (6), S. 394–424. DOI: 10.3322/caac.21492.

Chambon, Monique; Orsetti, Béatrice; Berthe, Marie-Laurence; Bascoul-Mollevi, Caroline; Rodriguez, Carmen; Duong, Vanessa et al. (2011): Prognostic significance of TRIM24/TIF-1 α gene expression in breast cancer. In: *The American journal of pathology* 178 (4), S. 1461–1469. DOI: 10.1016/j.ajpath.2010.12.026.

Chaux, Alcides; Albadine, Roula; Toubaji, Antoun; Hicks, Jessica; Meeker, Alan; Platz, Elizabeth A. et al. (2011): Immunohistochemistry for ERG expression as a surrogate for TMPRSS2-ERG fusion detection in prostatic adenocarcinomas. In: *The American journal of surgical pathology* 35 (7), S. 1014–1020. DOI: 10.1097/PAS.0b013e31821e8761.

Chi, Jun; Yang, Qing; Xie, Xiao-Feng; Yang, Xian-Zi; Zhang, Mei-Yin; Wang, Hui-Yun; Xu, Guo-Liang (2016): Clinical significance and prognostic value of TRIM24 expression in esophageal squamous cell carcinoma. In: *Aging* 8 (9), S. 2204–2221. DOI: 10.18632/aging.101037.

Cui, Zhibin; Cao, Wei; Li, Jiang; Song, Xiaomeng; Mao, Li; Chen, Wantao (2013): TRIM24 overexpression is common in locally advanced head and neck squamous cell carcinoma and correlates with aggressive malignant phenotypes. In: *PloS one* 8 (5), e63887. DOI: 10.1371/journal.pone.0063887.

Database, GeneCards Human Gene: TRIM24 Gene - GeneCards | TIF1A Protein | TIF1A Antibody. Online verfügbar unter <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TRIM24>, zuletzt geprüft am 18.10.2019.

DEGAM: Hausärztliche Beratung zu PSA-Screening DEGAM-Praxisempfehlung 2018. Hg. v. Deutsche Gesellschaft für Allgemeinmedizin und Familienmedizin e. V. Online verfügbar unter https://www.degam.de/files/Inhalte/Leitlinien-Inhalte/Dokumente/DEGAM-Praxisempfehlungen/PSA%20Screening/DEGAM%20PE_Hausaertztliche%20Beratung%20PSA-Screening_15-4-2018.pdf, zuletzt geprüft am 01.10.2021.

Epstein, Jonathan I.; Egevad, Lars; Amin, Mahul B.; Delahunt, Brett; Srigley, John R.; Humphrey, Peter A. (2016): The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma: Definition of Grading Patterns and Proposal for a New Grading System. In: *The American journal of surgical pathology* 40 (2), S. 244–252. DOI: 10.1097/PAS.0000000000000530.

- Esgueva, Raquel; Perner, Sven; J LaFargue, Christopher; Scheble, Veit; Stephan, Carsten; Lein, Michael et al. (2010): Prevalence of TMPRSS2-ERG and SLC45A3-ERG gene fusions in a large prostatectomy cohort. In: *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 23 (4), S. 539–546. DOI: 10.1038/modpathol.2009.193.
- Fang, Ziling; Deng, Jun; Zhang, Ling; Xiang, Xiaojun; Yu, Feng; Chen, Jun et al. (2017): TRIM24 promotes the aggression of gastric cancer via the Wnt/ β -catenin signaling pathway. In: *Oncology letters* 13 (3), S. 1797–1806. DOI: 10.3892/ol.2017.5604.
- Fong, Ka-Wing; Zhao, Jonathan C.; Song, Bing; Zheng, Bin; Yu, Jindan (2018): TRIM28 protects TRIM24 from SPOP-mediated degradation and promotes prostate cancer progression. In: *Nature communications* 9 (1), S. 5007. DOI: 10.1038/s41467-018-07475-5.
- Gasser, Thomas (2015): Basiswissen Urologie. 6., überarb. Auflage. Berlin: Springer (Springer-Lehrbuch). Online verfügbar unter http://ebooks.ciando.com/book/index.cfm/bok_id/1868165.
- Gerdes, J.; Lemke, H.; Baisch, H.; Wacker, H. H.; Schwab, U.; Stein, H. (1984): Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 133 (4), S. 1710–1715.
- Gerdes, J.; Schwab, U.; Lemke, H.; Stein, H. (1983): Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. In: *International journal of cancer* 31 (1), S. 13–20. DOI: 10.1002/ijc.2910310104.
- Groner, Anna C.; Cato, Laura; Tribolet-Hardy, Jonas de; Bernasocchi, Tiziano; Janouskova, Hana; Melchers, Diana et al. (2016): TRIM24 is an oncogenic transcriptional activator in prostate cancer. In: *Cancer cell* 29 (6), S. 846–858. DOI: 10.1016/j.ccell.2016.04.012.
- Hatakeyama, Shigetsugu (2011): TRIM proteins and cancer. In: *Nature reviews. Cancer* 11 (11), S. 792–804. DOI: 10.1038/nrc3139.
- Hatakeyama, Shigetsugu (2017): TRIM Family Proteins: Roles in Autophagy, Immunity, and Carcinogenesis. In: *Trends in biochemical sciences* 42 (4), S. 297–311. DOI: 10.1016/j.tibs.2017.01.002.
- Heinrich, Peter C.; Müller, Matthias; Graeve, Lutz; Löffler, Georg (2014): Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. 9., vollst. überarb. Aufl. Berlin: Springer (Springer-Lehrbuch). Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-17972-3>.

- Herquel, Benjamin; Ouararhni, Khalid; Khetchoumian, Konstantin; Ignat, Mihaela; Teletin, Marius; Mark, Manuel et al. (2011): Transcription cofactors TRIM24, TRIM28, and TRIM33 associate to form regulatory complexes that suppress murine hepatocellular carcinoma. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (20), S. 8212–8217. DOI: 10.1073/pnas.1101544108.
- Huggins, Charles; Hodges, Clarence V. (2002): Studies on prostatic cancer: I. The effect of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. 1941. In: *The Journal of urology* 168 (1), S. 9–12. DOI: 10.1016/s0022-5347(05)64820-3.
- Humphrey, Peter A.; Moch, Holger; Cubilla, Antonio L.; Ulbright, Thomas M.; Reuter, Victor E. (2016): The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part B: Prostate and Bladder Tumours. In: *European urology* 70 (1), S. 106–119. DOI: 10.1016/j.eururo.2016.02.028.
- Jain, Abhinav K.; Barton, Michelle Craig (2009): Regulation of p53: TRIM24 enters the RING. In: *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 8 (22), S. 3668–3674. DOI: 10.4161/cc.8.22.9979.
- Jocham, Dieter (Hg.) (2007): [Spezielle Urologie. Tumoren, Blasenentleerungsstörungen im Erwachsenenalter, Blasenentleerungsstörungen im Kindesalter, Harnableitung, Gynäkologische Urologie, Andrologie, Nierentransplantation, Notfälle. 3., überarb. und erw. Aufl. Stuttgart, New York: Thieme (Praxis der Urologie, in zwei Bänden / hrsg. von Dieter Jocham; Kurt Miller ; Bd. 2).
- Khetchoumian, Konstantin; Teletin, Marius; Tisserand, Johan; Mark, Manuel; Herquel, Benjamin; Ignat, Mihaela et al. (2007): Loss of Trim24 (Tif1alpha) gene function confers oncogenic activity to retinoic acid receptor alpha. In: *Nature genetics* 39 (12), S. 1500–1506. DOI: 10.1038/ng.2007.15.
- Kikuchi, Misato; Okumura, Fumihiko; Tsukiyama, Tadasuke; Watanabe, Masashi; Miyajima, Naoto; Tanaka, Junji et al. (2009): TRIM24 mediates ligand-dependent activation of androgen receptor and is repressed by a bromodomain-containing protein, BRD7, in prostate cancer cells. In: *Biochimica et biophysica acta* 1793 (12), S. 1828–1836. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2009.11.001.
- Kirn, V.; Enninga, I.; Thangarajah, F.; Clement, L.; Richters, L.; Malter, W. et al. (2015): Der Proliferationsmarker Ki-67 und seine prognostische Bedeutung: Retrospektive Analyse von Mammakarzinom-Patientinnen an der Unifrauenklinik Köln. In: *Geburtshilfe Frauenheilkd* 75 (08). DOI: 10.1055/s-0035-1560011.

Kramer, D. K.: Sekundäre Antikörper. Hg. v. antibodies-online GmbH. Online verfügbar unter <https://www.antikoerper-online.de/resources/16/674/sekundaere-antikoerper/>., zuletzt geprüft am 24.09.2019.

La Rojo de Vega, Montserrat; Chapman, Eli; Zhang, Donna D. (2018): NRF2 and the Hallmarks of Cancer. In: *Cancer cell* 34 (1), S. 21–43. DOI: 10.1016/j.ccell.2018.03.022.

Li, Haiying; Sun, Liangliang; Tang, Zhongping; Fu, Lin; Xu, Ying; Li, Zixuan et al. (2012): Overexpression of TRIM24 correlates with tumor progression in non-small cell lung cancer. In: *PloS one* 7 (5), e37657. DOI: 10.1371/journal.pone.0037657.

Libard, Sylwia; Cerjan, Dijana; Alafuzoff, Irina (2019): Characteristics of the tissue section that influence the staining outcome in immunohistochemistry. In: *Histochemistry and cell biology* 151 (1), S. 91–96. DOI: 10.1007/s00418-018-1742-1.

Lin, Li; Zhao, Weihua; Sun, Bo; Wang, Xinyu; Liu, Qiao (2017): Overexpression of TRIM24 is correlated with the progression of human cervical cancer. In: *American Journal of Translational Research* 9 (2), S. 620–628.

Liu, Xiao; Huang, Yu; Yang, Dinghua; Li, Xianghong; Liang, Jiankun; Lin, Liang et al. (2014): Overexpression of TRIM24 is associated with the onset and progress of human hepatocellular carcinoma. In: *PloS one* 9 (1), e85462. DOI: 10.1371/journal.pone.0085462.

Lv, Deguan; Li, Yanxin; Zhang, Weiwei; Alvarez, Angel A.; Song, Lina; Tang, Jianming et al. (2017): TRIM24 is an oncogenic transcriptional co-activator of STAT3 in glioblastoma. In: *Nature communications* 8 (1), S. 1454. DOI: 10.1038/s41467-017-01731-w.

Madani, Seyed Hamid; Ameli, Somayeh; Khazaei, Sedigheh; Kanani, Malek; Izadi, Babak (2011): Frequency of Ki-67 (MIB-1) and P53 expressions among patients with prostate cancer. In: *Indian journal of pathology & microbiology* 54 (4), S. 688–691. DOI: 10.4103/0377-4929.91492.

Mehra, Rohit; Tomlins, Scott A.; Yu, Jianjun; Cao, Xuhong; Wang, Lei; Menon, Anjana et al. (2008): Characterization of TMPRSS2-ETS gene aberrations in androgen-independent metastatic prostate cancer. In: *Cancer research* 68 (10), S. 3584–3590. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6154.

Michel, Maurice Stephan; Thüroff, Joachim W.; Janetschek, Günther; Wirth, Manfred P. (2016): Die Urologie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg (Springer Reference Medizin). Online verfügbar unter <http://gbv.ebib.com/patron/FullRecord.aspx?p=4723662>.

Miller, Kurt; Gschwend, Jürgen: Klassifikation des Krankheitsstadiums. Hg. v. Deutsche Krebsgesellschaft e. V. Online verfügbar unter <https://www.krebsgesellschaft.de/onko-internetportal/basis-informationen-krebs/krebsarten/prostatakrebs/klassifikation-des-krankheitsstadiums.html>, zuletzt geprüft am 23.09.2019.

Offermann, Anne; Roth, Doris; Hupe, Marie Christine; Hohensteiner, Silke; Becker, Finn; Joerg, Vincent et al. (2019): TRIM24 as an independent prognostic biomarker for prostate cancer. In: *Urologic oncology* 37 (9), 576.e1-576.e10. DOI: 10.1016/j.urolonc.2019.05.006.

Ou, Horng D.; Kwiatkowski, Witek; Deerinck, Thomas J.; Noske, Andrew; Blain, Katie Y.; Land, Hannah S. et al. (2012): A structural basis for the assembly and functions of a viral polymer that inactivates multiple tumor suppressors. In: *Cell* 151 (2), S. 304–319. DOI: 10.1016/j.cell.2012.08.035.

Pascale, Mariarosa; Aversa, Cinzia; Barbazza, Renzo; Marongiu, Barbara; Siracusano, Salvatore; Stoffel, Flavio et al. (2016): The proliferation marker Ki67, but not neuroendocrine expression, is an independent factor in the prediction of prognosis of primary prostate cancer patients. In: *Radiology and oncology* 50 (3), S. 313–320. DOI: 10.1515/raon-2016-0033.

Perner, Sven; Mosquera, Juan-Miguel; Demichelis, Francesca; Hofer, Matthias D.; Paris, Pamela L.; Simko, Jeff et al. (2007): TMPRSS2-ERG fusion prostate cancer: an early molecular event associated with invasion. In: *The American journal of surgical pathology* 31 (6), S. 882–888. DOI: 10.1097/01.pas.0000213424.38503.aa.

Reddy, E. S.; Rao, V. N.; Papas, T. S. (1987): The erg gene: a human gene related to the ets oncogene. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84 (17), S. 6131–6135. DOI: 10.1073/pnas.84.17.6131.

Robert Koch-Institut; Gesellschaft Der Epidemiologischen Krebsregister In Deutschland E.V. (2019): Krebs in Deutschland 2015/2016. Hg. v. Robert Koch-Institut.

Schappert, Simone (2017): In-silico-Revolution durch KIT-Spin-off. Online verfügbar unter <http://www.kit-gruendernews.de/in-silico-revolution-in-der-biotechnologie/>, zuletzt aktualisiert am 09.03.2017+00:00, zuletzt geprüft am 30.06.2020.

Scheble, Veit J.; Braun, Martin; Beroukhim, Rameen; Mermel, Craig H.; Ruiz, Christian; Wilbertz, Theresia et al. (2010): ERG rearrangement is specific to prostate cancer and does not occur in any other common tumor. In: *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 23 (8), S. 1061–1067. DOI: 10.1038/modpathol.2010.87.

Schlomm, Thorsten; Sauter, Guido (2016): Beurteilung des Prostatakarzinoms: Gleason-Score - Status 2016. SUPPLEMENT: Perspektiven der Urologie. In: *Deutsches Aerzteblatt Online*. Online verfügbar unter <https://www.aerzteblatt.de/archiv/181220/Beurteilung-des-Prostatakarzinoms-Gleason-Score-Status-2016>, zuletzt geprüft am 26.09.2019.

Schmelz, Hans U.; Sparwasser, Christoph; Weidner, Wolfgang (2006): Facharztwissen Urologie. Differenzierte Diagnostik und Therapie. Berlin, Heidelberg: Springer Medizin Verlag Heidelberg. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1007/3-540-32986-2>.

Sharifi, Nima; Gulley, James L.; Dahut, William L. (2005): Androgen deprivation therapy for prostate cancer. In: *JAMA* 294 (2), S. 238–244. DOI: 10.1001/jama.294.2.238.

Sulik, Marian; Maruszak, Klaudia; Puchalska, Joanna; Misiukiewicz-Poć, Magdalena (2011): Expression of Ki-67 as a proliferation marker in prostate cancer. In: *Polish Annals of Medicine* 18 (1), S. 12–19. DOI: 10.1016/S1230-8013(11)70019-4.

Teoh, Jeremy Yuen Chun; Tsu, James Hok Leung; Yuen, Steffi Kar Kei; Chan, Samson Yun Sang; Chiu, Peter Ka Fung; Lee, Wai-Man et al. (2015): Prognostic significance of time to prostate-specific antigen (PSA) nadir and its relationship to survival beyond time to PSA nadir for prostate cancer patients with bone metastases after primary androgen deprivation therapy. In: *Annals of surgical oncology* 22 (4), S. 1385–1391. DOI: 10.1245/s10434-014-4105-8.

The Universal Protein Resource (2019): AR - Androgen receptor - homo sapiens (human) - AR gene & protein. Hg. v. The Universal Protein Resource. Online verfügbar unter <https://www.uniprot.org/uniprot/P10275>, zuletzt aktualisiert am 23.09.2019.

Tomlins, Scott A.; Rhodes, Daniel R.; Perner, Sven; Dhanasekaran, Saravana M.; Mehra, Rohit; Sun, Xiao-Wei et al. (2005): Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. In: *Science (New York, N.Y.)* 310 (5748), S. 644–648. DOI: 10.1126/science.1117679.

Tsourlakis, Maria-Christina; Stender, Annegret; Quaas, Alexander; Kluth, Martina; Wittmer, Corinna; Haese, Alexander et al. (2016): Heterogeneity of ERG expression in prostate cancer: a large section mapping study of entire prostatectomy specimens from 125 patients. In: *BMC Cancer* 16. DOI: 10.1186/s12885-016-2674-6.

Ullman, David; Dorn, David; Rais-Bahrami, Soroush; Gordetsky, Jennifer (2018): Clinical Utility and Biologic Implications of Phosphatase and Tensin Homolog (PTEN) and ETS-related Gene (ERG) in Prostate Cancer. In: *Urology* 113, S. 59–70. DOI: 10.1016/j.urology.2017.11.022.

- Verma, Renuka; Gupta, Veena; Singh, Jagjeet; Verma, Monica; Gupta, Gopal; Gupta, Sumiti et al. (2015): Significance of p53 and ki-67 expression in prostate cancer. In: *Urology annals* 7 (4), S. 488–493. DOI: 10.4103/0974-7796.158507.
- Wang, Feng-Qin; Han, Yan; Yao, WenJuan; Yu, Jing (2017a): Prognostic relevance of tripartite motif containing 24 expression in colorectal cancer. In: *Pathology, research and practice* 213 (10), S. 1271–1275. DOI: 10.1016/j.prp.2017.08.008.
- Wang, Zhu; Wang, Yuliang; Zhang, Jianwen; Hu, Qiyi; Zhi, Fan; Zhang, Shengping et al. (2017b): Significance of the TMPRSS2:ERG gene fusion in prostate cancer. In: *Molecular medicine reports* 16 (4), S. 5450–5458. DOI: 10.3892/mmr.2017.7281.
- Wilson, E. M.; French, F. S. (1976): Binding properties of androgen receptors. Evidence for identical receptors in rat testis, epididymis, and prostate. In: *The Journal of biological chemistry* 251 (18), S. 5620–5629.
- Xu, Bin; Chevarie-Davis, Myriam; Chevalier, Simone; Scarlata, Eleanora; Zeizafoun, Nebras; Dragomir, Alice et al. (2014): The prognostic role of ERG immunopositivity in prostatic acinar adenocarcinoma: a study including 454 cases and review of the literature. In: *Human pathology* 45 (3), S. 488–497. DOI: 10.1016/j.humpath.2013.10.012.
- Xue, Dongwei; Zhang, Xiuwei; Zhang, Xilin; Liu, Jia; Li, Ning; Liu, Chunlai et al. (2015): Clinical significance and biological roles of TRIM24 in human bladder carcinoma. In: *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 36 (9), S. 6849–6855. DOI: 10.1007/s13277-015-3393-3.
- Yu, Jindan; Yu, Jianjun; Mani, Ram-Shankar; Cao, Qi; Brenner, Chad J.; Cao, Xuhong et al. (2010): An integrated network of androgen receptor, polycomb, and TMPRSS2-ERG gene fusions in prostate cancer progression. In: *Cancer cell* 17 (5), S. 443–454. DOI: 10.1016/j.ccr.2010.03.018.
- Zhu, Yefan; Zhao, Liang; Shi, Keqing; Huang, Zitao; Chen, Bicheng (2018): TRIM24 promotes hepatocellular carcinoma progression via AMPK signaling. In: *Experimental cell research* 367 (2), S. 274–281. DOI: 10.1016/j.yexcr.2018.04.006.

10 Abbildungsnachweise

Abbildung 1: Diagramm über Krebsneuerkrankungen, Robert Koch-Institut; Gesellschaft Der Epidemiologischen Krebsregister In Deutschland E.V. (2019): Krebs in Deutschland 2015/2016. Hg. v. Robert Koch-Institut.

Abbildung 2: Stadieneinteilung des Prostatakarzinoms T1 bis T4. Sökeland, Jürgen; Rübben, Herbert; Schulze†, Harald (2008): Taschenlehrbuch Urologie. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.

Abbildung 3: Aufbau der TRIM-Proteine, TRIM-NET PROJECT: About TRIM-NET. Hg. v. TRIM-NET PROJECT. Online verfügbar unter <http://www.trimnet.eu/about>, zuletzt geprüft am 18.10.2019.

Abbildung 4: Ubiquitinierungskaskade, Patidar, O. P.: B-box proteins in plants bbx family of plant transcription factors. Hg. v. LinkedIn Corporation © 2019. Online verfügbar unter https://www.slideshare.net/omprakashpatidar/bbox-proteins-in-plants-bbx-family-of-plant-transcription-factors?qid=fef7850f-c8d7-4476-8ba5-d5e669f6d839&v=&b=&from_search=1, zuletzt geprüft am 18.10.2019.

Abbildung 5: Charakterisierung von TRIM-Proteinen, Hatakeyama, Shigetsugu (2017): TRIM Family Proteins: Roles in Autophagy, Immunity, and Carcinogenesis. In: *Trends in biochemical sciences* 42 (4), S. 297–311. DOI: 10.1016/j.tibs.2017.01.002.

Abbildung 6: Antikörpernachweis mittels indirekter Methode, Dr. Klein, Dr. Rost und Kollegen: Medizinische Genetik: Immunhistochemische Untersuchungen. Hg. v. Zentrum für Humangenetik und Laboratoriumsdiagnostik MVZ Martinsried GmbH. Online verfügbar unter <https://www.medizinische-genetik.de/index.php?id=17305>, zuletzt geprüft am 24.09.2019.

Anhang 1:

Miller, Kurt; Gschwend, Jürgen: Klassifikation des Krankheitsstadiums. Hg. v. Deutsche Krebsgesellschaft e. V. Online verfügbar unter <https://www.krebsgesellschaft.de/onko-internetportal/basis-informationen-krebs/krebsarten/prostatakrebs/klassifikation-des-krankheitsstadiums.html>, zuletzt geprüft am 23.09.2019.