

A Prominent Couple

Citation for published version (APA):

Ratz, L. (2017). *A Prominent Couple: the TMPRSS2:ERG Gene Fusion in Aggressive Prostate Cancer*. Datawyse / Universitaire Pers Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20171215lr>

Document status and date:

Published: 01/01/2017

DOI:

[10.26481/dis.20171215lr](https://doi.org/10.26481/dis.20171215lr)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

SUMMARY

The **general introduction** illustrates the challenges of prostate cancer (PCa) research and states the aims of my doctoral thesis. PCa is the most prevalent non-cutaneous malignancy accounting for 15% of the cancers diagnosed in men. It is the second leading cause of cancer-related death in men in Western countries. Family history and increasing age are the most important risk factors, with a 10-years risk of 5.50% to develop PCa for men aged 70 years. PCa frequently shows an indolent clinical course with a 2.5-3% lifetime risk of dying from PCa. Since clinicopathologic criteria are insufficient to efficiently distinguish between slow growing and progressive tumors, there is uncertainty about the individual risk of aggressive disease. Identifying biomarkers that predict clinically aggressive disease is a current challenge for PCa research. Those markers could be valuable to reduce overtreatment of insignificant disease on the one hand and select patients that are at risk of progressive disease and need aggressive treatment on the other hand. PCa is usually suspected based on elevated PSA value and abnormal result from digital rectal examination (DRE), but PSA level is not a direct surrogate for tumor stage. Definitive diagnosis requires histopathological evaluation of prostate biopsy cores that are classified according to the Gleason grading system. The dilemma with the Gleason score is that it does not reflect the diversity of genetic aberrations. Therefore, patients with with the same histological pattern can develop heterogeneous clinical outcomes.

My work aimed to identify novel molecular mechanisms of aggressive PCa. The focus was on the molecular and cellular consequences of ERG overexpression upon *TMPRSS2:ERG* (T/E) variant expression.

Chapter 1 provides a detailed overview about the distinct genetic and molecular aberrations that impacts the heterogeneity of PCa. The majority of prostate cancers are adenocarcinomas arising from multifocal hyperplasia of luminal secretory cells. These cells display continuous histomorphological aberrations ranging from low-grade dysplasia to 'carcinoma in situ', collectively described as prostatic intraepithelial neoplasia (PIN). PCa is characterized by a complex pathology with multiple histological foci that can harbor diverse genetic and molecular alterations. The spectrum of genomic aberrations, including point mutations, copy number alterations, structural rearrangements and DNA methylation changes, reflect distinct molecular subtypes. Major signaling pathways that are most commonly altered in PCa, including androgen receptor (AR), PTEN-PI3K/AKT, Ras/Raf/MEK/ERK and the retinoblastoma protein (pRB) signaling, are increasingly affected in metastatic tumors. Further in metastatic PCa, a large portion of the genome can be affected by deletions suggesting increased genomic instability with disease progression.

Androgens play a central role in PCa development and progression to metastatic disease. Blocking of the AR signaling pathway by androgen deprivation therapy (ADT) belongs to the initial treatment options of advanced-stage PCa. However, most cancers will relapse and progress to castration-resistant prostate cancer (CRPC). Neuroendo-

crine (NE) differentiation is a highly aggressive disease manifestation distinguished from adenocarcinoma by NE marker expression and unresponsiveness to hormone therapy.

Long-term androgen receptor signaling can induce DNA double-strand breaks driving the generation of chromosomal rearrangements. In PCa, gene fusions involving the ETS-transcription factors have been described. The *TMPRSS2:ERG* (T/E) gene fusion is the most prevalent genomic alteration in PCa present in approximately 50% of all PCa cases. This gene fusion, resulting from the fusion of the transcription factor ERG to the androgen responsive gene *TMPRSS2*, leads to upregulation of ERG protein and activation of downstream target genes. The expression of fusion mRNAs from distinct T/E variants is associated with clinicopathological parameters. However, the underlying molecular processes resulting from expression of T/E gene fusion variants remain unclear.

In **chapter 2**, the molecular alterations and functional implications caused by the T/E gene fusion were analysed. Using a doxycycline (Dox)-inducible overexpression LNCaP cell model (LNCaP-T/E), we showed that the TGF- β /BMP as well as the WNT/ β -catenin signaling pathways are important regulators of T/E-mediated epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in PCa cells. Induction of T/E expression resulted in augmented secretion of TGF- β 1 and - β 2, and increased expression of *ALK1*, a member of the TGF- β receptor family. *ALK1* inhibition in T/E expressing cells blocked p38 phosphorylation and reduced the expression of the TGF- β target genes *VIM*, *MMP1*, *CDH2*, and *SNAI2*. Induction of T/E expression further resulted in increased cellular migratory and invasive potential. We suggest that *ALK1*-mediated TGF- β signaling is a novel oncogenic mechanism in T/E positive PCa and provide a rational basis for *ALK1*-blocking agents in T/E positive PCa. The soluble recombinant *ALK1*-Fc fusion protein dalantercept is currently evaluated in various malignancies. It was shown to have antitumor activity in diverse refractory solid tumors in phase 1 (NCT00996957, NCT02024087) or phase 2 trials (NCT01642082, NCT01727336, NCT01720173) as discussed in **chapter 5**.

Further in **chapter 2**, we confirmed that WNT/ β -catenin signaling and EMT in T/E expressing cells is mediated by the Frizzled receptor FZD4. Inhibition of FZD4 led to reduced phosphorylation of p38. Strikingly, we observed upregulation of *miR-503* exclusively in T/E variant VI overexpressing cells. Overexpression of *miR-503* was able to repress *SMAD7*, a known negative regulator of TGF- β and WNT/ β -catenin signaling. *MiR-503*-mediated repression of *SMAD7* therefore appears to be a way to escape the inhibitory effect of *SMAD7* on TGF- β and WNT/ β -catenin signaling. Inhibition of FZD4-mediated signaling is currently not addressed in clinical trials. However, support for the feasibility of FZD4-targeted therapy is provided from the testing of selective Frizzled signaling pathway inhibitors against FZD7 (vantictumab) and FZD8 (ipafriccept) in ongoing clinical trials in HER2-negative breast cancer (NCT01973309), pancreatic cancer (NCT02005315), non-small cell lung cancer (NCT01957007), and ovarian cancer (NCT02092363).

We explored the epigenetic alterations induced by the T/E gene fusion in **chapter 3**. Upon T/E overexpression, we found a global hypomethylation profile. Those differen-

tially methylated CpG sites were mostly located in gene bodies. An integrative analysis on epigenetic and gene expression changes in LNCaP-T/E cells demonstrated that T/E overexpression drives upregulation of *FZD4* and *HLA-DMB* that could be correlated with loss of DNA methylation. However, the relation of DNA hypomethylation and mRNA upregulation, as well as the mechanistic exploration of the T/E-induced epigenetic changes remain unclear from the present analysis. In addition to the discussion in **chapter 2**, the correlation between *FZD4* hypomethylation and mRNA upregulation, although preliminary, represents a basis for future research on the 'druggability' in T/E fusion-positive tumors.

In **chapter 4**, we identified the transcription factor *INSM1* as a regulator of neuroendocrine (NE) differentiation in prostate cancer cell lines. Neuroendocrine prostate cancer (NEPC) is a highly aggressive variant of advanced PCa, often occurring with conventional adenocarcinoma. A correlation between *INSM1* and the T/E gene fusion was observed in patient samples and cell lines. In cell culture experiments, ERG induced the expression of *INSM1* and the NE markers *TUBB3*, *SCG3*, *ASCL1*. These data indicate that the T/E gene fusion could be associated with NEPC. The tissue-restricted expression pattern and established role in neuronal and endocrine tissues of *INSM1* could be of advantage in the histological detection of NE differentiation in PCa and targeted therapy of NEPC. Re-expression of *INSM1* in NE tumors gained attention regarding its role in suicide gene therapy as tumor-specific treatment in small cell lung cancer and neuroblastoma. *INSM1* promoter constructs have further been proposed as diagnostic and disease monitoring tool for NE tumors *in vivo*. In addition to previous studies showing shared gene signatures between different NE tumors, the present study highlighted remarkable similarities in genetic and molecular aberrations between NEPC and well-known models of NE tumors, such as the Reelin signaling pathway, in **chapter 4**. This suggests that insights into the mechanisms of NEPC can be derived from the molecular mechanisms of known NE cancers and the suicide gene therapy could find application as targeted strategy for NEPC.

In conclusion, novel markers for refined risk stratification of progressive disease outcome and prediction of treatment response are needed. Several tissue-based multigene expression assays for the prediction of aggressive PCa are available for clinical application. Their routine implementation is currently hampered by intrinsic challenges of PCa research, such as heterogeneity, multifocality, and a small sample volume in prostate biopsy. Genetic instability increases the complexity of somatic genomic alterations leading to a specific combination of driver mutations in a tumor. However, molecular pathology is an emerging field in PCa as a growing number of targets with known correlation to tumor biology are recognized, such as *AR* splice variants. Further, differentiation markers of neuroendocrine manifestation, such as *INSM1* or *L1CAM*, may predict poor responsiveness to ADT. Current studies on novel molecular targets are discussed in **chapter 5**. Individual genetic aberrations could be interrogated by next generation sequencing and may find application for a personalized approach in clinical practice. Molecular and genetic analysis of biopsy cores is currently not included in the PCa guidelines. In future, it may complement the diagnosis of PCa as it has already been im-

plemented in other tumor entities, such as breast cancer, melanoma and, most recently, lung cancer. Simultaneously, a broader spectrum of therapeutic targets in addition to ADT is required to improve the clinical management of metastatic PCa. The functional and mechanistic evaluation of genetic markers, as presented in this doctoral thesis, is the basis for the development of novel drug targets and treatment strategies, and could guide the emphasis of future research.

Nederlandse samenvatting

NEDERLANDSE SAMENVATTING

De **algemene introductie** schetst de uitdagingen van prostaatkankeronderzoek en licht de doelen van mijn proefschrift toe. Prostaatkanker is de meest voorkomende niet-cutane maligniteit en maakt 15% van alle kankervormen in mannen uit. Het is tevens de één na belangrijkste doodsoorzaak door kanker in mannen in de Westerse wereld. Een positieve familiegeschiedenis en toenemende leeftijd zijn de belangrijkste risicofactoren, het 10-jaarsrisico voor mannen van 70 jaar om prostaatkanker te ontwikkelen is 5.50%. Prostaatkanker vertoont vaak een langzaam groeiend beloop met een 2.5-3% leeftijdsrisico om eraan te overlijden. De klinisch-pathologische criteria volstaan echter niet om tussen langzaam groeiende en progressief verlopende tumoren te onderscheiden, zodat er onzekerheid bestaat ten opzichte van het individuele risico op een agressief groeiende tumor. Eén van de uitdagingen voor het prostaatkankeronderzoek is de identificatie van biomarkers die een agressief ziekteverloop kunnen voorspellen. Met behulp van deze markers zou enerzijds overbehandeling van klinisch niet-relevante tumoren voorkomen worden. Anderzijds zouden patiënten geselecteerd kunnen worden die een verhoogd risico op ziekteprogressie hebben en een agressieve behandeling nodig hebben. De verdenking op prostaatkanker ontstaat op basis van een verhoogde PSA waarde en een afwijkend resultaat tijdens digitaal rectaal onderzoek. De hoogte van de PSA waarde is echter geen directe marker voor het tumorstadium. De definitieve diagnose vereist histopathologisch onderzoek van biopsiecoupes van de prostaat die volgens het Gleason score-systeem geëvalueerd worden. De heterogeniteit van de genetische en moleculaire afwijkingen bij prostaatkanker heeft tot gevolg dat patiënten met dezelfde Gleason score een zeer uiteenlopend klinisch beloop kunnen ontwikkelen.

Het doel van dit proefschrift was het identificeren van nieuwe moleculaire mechanismen van het agressieve prostaatcarcinoom. De focus werd gelegd op de moleculaire en cellulaire gevolgen van de ERG overexpressie in *TMPRSS2:ERG* (T/E) varianten.

Hoofdstuk 1 geeft een gedetailleerd overzicht over de diverse genetische en moleculaire afwijkingen die van invloed zijn op de heterogeniteit van prostaatkanker. De meeste prostaatkankers zijn adenocarcinomen, die door multifocale hyperplasie van luminale secretoire cellen ontstaan. Deze cellen vertonen continue histomorfologische veranderingen, die van laaggradige dysplasie tot 'carcinoma in situ' rijken, samengevat als prostaat intra-epitheliale neoplasie (PIN). Prostaatkanker wordt gekenmerkt door een complexe pathologie met multipele histologische foci, die uiting zijn van een combinatie van diverse genetische en moleculaire afwijkingen. Het spectrum van genomische afwijkingen, zoals puntmutaties, copynumbervariatie, structurele rearrangements en DNA methyleringsveranderingen, spiegelt verschillende moleculaire subtypen weer. Signaalroutes die het vaakst afwijken, zijn de androgen receptor, PTEN-PI3K/Akt, Ras/Raf/MEK/ERK en het retinoblastoom protein (pRB). Deze routes zijn tevens vaker aangedaan in gemetastaseerde prostaatkanker. Verder zijn in het gemetastaseerde prostaatcarcinoom grote genomische gebieden gedeleteerd, wat op een verhoogde genetische instabiliteit in gevorderde prostaatkanker duidt.

Androgenen spelen een centrale rol bij de ontwikkeling van prostaatkanker en progressie tot gemetastaseerde ziekte. Androgeen-deprivatie therapie (ADT) is de primaire behandeling van gevorderde prostaatkanker. Vaak treedt er onder deze behandeling echter een ziekterecidief en progressief beloop op. Neuroendocriene (NE) differentiatie is een zeer agressieve vorm van prostaatkanker, die onderscheiden wordt door expressie van NE markers en ongevoeligheid voor ADT. Langdurige blootstelling aan geactiveerde androgeen signaaltransductie kan leiden tot DNA dubbelstrengsbreuken, waardoor chromosomale rearrangements kunnen ontstaan. In prostaatkanker zijn genfusies van de ETS-transcriptiefactoren beschreven. De *TMPRSS2:ERG* (T/E) genfusie is de meest voorkomende genomische afwijking in prostaatkanker, aanwezig in rond 50% van alle prostaattumoren. Deze genfusie ontstaat door fusie van het transcriptiefactor *ERG* met het androgeen-sensitieve gen *TMPRSS2* en leidt tot opregulatie van het ERG proteïne gevolgd door activatie van target genen. De expressie van fusie mRNAs van verschillende T/E varianten is geassocieerd met klinisch-pathologische parameters. De moleculaire veranderingen ten gevolge van expressie van T/E genfusie-varianten zijn echter nog onvoldoende bekend.

In **hoofdstuk 2** werden de moleculaire veranderingen en functionele gevolgen door expressie van de T/E genfusie onderzocht. Gebruikmakend van een doxycycline (Dox)-induceerbaar overexpressie LNCaP cel model (LNCaP-T/E) werd aangetoond dat de TGF- β /BMP en de WNT/ β -catenin signaleringsroutes belangrijke regulatoren van de T/E-gemedieerde epitheliale-tot-mesenchymale transitie (EMT) in prostaatkankercellen zijn. Inductie van T/E expressie resulteerde in een versterkte secretie van TGF- β 1 en - β 2, als een verhoogde expressie van *ALK1*, een receptor uit de TGF- β familie. Inhibitie van *ALK1* in T/E expresserende cellen leidde tot verminderde p38 fosforylering en verminderde expressie van de TGF- β target genen *VIM*, *MMP1*, *CDH2* en *SNAI2*. T/E expressie leidde ook tot een versterkte migratie en invasie van de cellen. *ALK1*-gemedieerde TGF- β signalering is een nieuw oncogeen mechanisme in T/E positieve prostaatkanker en kan een basis zijn voor het testen van *ALK1*-blokkerende middelen in T/E positieve tumoren. Het oplosbare recombinante *ALK1*-Fc fusie eiwit dalantercept wordt momenteel onderzocht in diverse kankersoorten. In fase 1 (NCT00996957, NCT02024087) en fase 2 studies (NCT01642082, NCT01727336, NCT01720173) werd aangetoond dat dit middel anti-tumor activiteit in moeilijk behandelbare solide tumoren heeft, zoals besproken in **hoofdstuk 5**.

We laten verder in **hoofdstuk 2** zien dat de WNT/ β -catenin signalering in T/E expresserende cellen gemedieerd wordt door de Frizzled receptor FZD4. Remming van FZD4 leidde eveneens tot verminderde fosforylering van p38. Opvallend was verder dat het microRNA *miR-503* enkel in T/E variant VI expresserende cellen verhoogd was. Overexpressie van *miR-503* verminderde de expressie van *SMAD7*, een negatieve regulator van TGF- β en WNT/ β -catenin signalering. *MIR-503*-gemedieerde repressie van *SMAD7* kan een 'escape' route zijn om aan de remmende effecten van *SMAD7* op TGF- β en WNT/ β -catenin te ontsnappen. Therapeutische inhibitie van FZD4-gemedieerde signalering wordt momenteel niet getest in klinische studies. Aanleiding voor de haalbaarheid van een FZD4-gerichte therapie geven lopende studies die de selectieve Frizzled inhibitoren

tegen FZD7 (vantictumab) en FZD8 (ipafricept) aan in HER2-negatieve borstkanker (NCT01973309), pancreaskanker (NCT02005315), niet-kleincellig longkanker (NCT01957007), en eierstokkanker (NCT02092363) onderzoeken.

In **hoofdstuk 3** werden de epigenetische veranderingen ten gevolge van de T/E genfusie onderzocht. Door T/E overexpressie werd er een globale hypomethylering geobserveerd. De differentieel gemethyleerde CpG sites werden meestal in genlichamen gevonden. Een integratieve analyse van de epigenetische en genexpressie veranderingen in LNCaP-T/E cellen liet zien dat T/E overexpressie tot opregulatie van *FZD4* en *HLA-DMB* leidde, die zou kunnen samenhangen met een verlies van DNA methylering. Er werd niet onderzocht of er een directe relatie tussen DNA methylering en mRNA opregulatie bestaat en wat de onderliggende mechanismen van de T/E-geïnduceerde epigenetische veranderingen zijn. Dit geeft aanleiding voor toekomstig onderzoek en zou kunnen bijdragen aan de behandelingsopties in T/E positieve tumoren.

In **hoofdstuk 4** werd het transcriptiefactor *INSM1* gevonden als regulator van een neuro-endocrien (NE) differentiatie in prostaatkanker cellijnen. Neuro-endocrien prostaatkanker (NEPC) is een zeer agressieve vorm van gevorderde prostaatkanker, die vaak met gewone adenocarcinomen optreedt. Zowel in patiënten monsters als in cellijnen werd er een correlatie tussen *INSM1* en *ERG* expressie gezien. In cellcultuur experimenten leidde de overexpressie van *ERG* tot een verhoogde expressie van *INSM1* en van de NE markers *TUBB3*, *SCG3* en *ASCL1*. Deze resultaten laten vermoeden dat de T/E genfusie geassocieerd is met NEPC. De weefsel-specifieke expressie van *INSM1* in neuronaal en endocrien weefsel zou van voordeel kunnen zijn bij de histologische detectie van NE differentiatie in prostaatkanker en gerichte behandeling van NEPC. Her-expressie van *INSM1* in NE tumoren heeft aandacht gekregen voor zijn functie bij de 'suicide' genterapie als tumor-specifieke behandeling in kleincellig longkanker en neuroblastoom. *INSM1* promotor constructen werden voorgesteld als diagnostisch en ziektemonitoring tool voor NE tumoren in vivo. In de literatuur staat omschreven dat verschillende NE tumoren gelijkenissen in gensignaturen vertonen. De analyse in **hoofdstuk 4** benadrukt eveneens opvallende overeenkomsten in de genetische en moleculaire afwijkingen van NEPC met bekende NE tumormodellen, zoals de Reelin signaleringsroute. Inzichten in de mechanismen van NEPC kunnen derhalve mogelijk afgeleid worden van de moleculaire mechanismen in andere NE tumoren. Verder geeft dit aanleiding voor de 'suicide' genterapie als een potentiële strategie voor een gerichte therapie in NEPC.

Afsluitend geldt voor prostaatkanker dat nieuwe markers nodig zijn voor een verbeterde risicobeoordeling van een progressief ziekteverloop en predictie van de behandelingsrespons. Diverse weefsel-gebaseerde multigen expressie assays voor de predictie van agressieve prostaatkanker zijn beschikbaar voor de klinische toepassing. Echter wordt de implementatie ervan bemoeilijkt door de intrinsieke uitdagingen van prostaatkankeronderzoek, zoals heterogeniteit, multifocaliteit en beperkt monstervolume uit de prostaatbiopsie. Genetische instabiliteit verhoogt de complexiteit van somatische genomische afwijkingen die een specifieke combinatie van 'driver' mutaties in een tu-

mor veroorzaken. De moleculaire pathologie is echter een snelgroeiend onderzoeksgebied en een toenemend aantal aan 'targets' wordt bekend die samenhangen met de tumorbiologie, zoals bijvoorbeeld *AR* splice varianten. Bovendien zouden differentiatie markers die duiden op een NE manifestatie, zoals *INSM1* of *L1CAM*, een ongevoeligheid op ADT kunnen voorspellen. Recente studies naar nieuwe moleculaire 'targets' worden besproken in **hoofdstuk 5**.

De individuele genetische afwijkingen van een tumor kunnen geïdentificeerd worden door 'next generation sequencing' dat toegepast zou kunnen worden in een gepersonaliseerd aanpak in de kliniek. Een moleculaire en genetische analyse van biopsiemonsters is tegenwoordig niet opgenomen in de richtlijnen voor prostaatkanker. In toekomst zouden deze analyses echter een aanvulling bieden op de standaardbehandeling van prostaatkanker, zoals het reeds toegepast wordt in andere tumorvormen, namelijk borstkanker, melanoom en laatstelijk longkanker. Ook is er een breder spectrum van therapeutische 'targets' nodig als aanvulling op ADT om het klinische beleid van gemetastaseerde prostaatkanker te verbeteren. De functionele en mechanistische analyse van genetische markers, zoals het in dit proefschrift uitgewerkt werd, stelt de basis voor de ontwikkeling van nieuwe drug targets en behandel mogelijkheden en opent de deur voor toekomstig onderzoek.

Deutsche Zusammenfassung

DEUTSCHE ZUSAMMENFASSUNG

Die **allgemeine Einführung** schildert die Schwierigkeiten der Prostatakrebsforschung und erläutert die Zielsetzungen meiner Doktorarbeit. Prostatakrebs ist die häufigste nicht-kutane Krebserkrankung, die 15% aller Krebsdiagnosen des Mannes ausmacht. Er ist außerdem die zweithäufigste krebsbedingte Todesursache unter Männern in westlichen Ländern. Eine familiäre Vorbelastung, sowie zunehmendes Alter sind die wichtigsten Risikofaktoren. Das 10-Jahres-Risiko für 70-jährige Männer an Prostatakrebs zu erkranken liegt bei 5,50%. Die meisten Prostatakrebskrankungen zeigen keine Tendenz zu einem aggressiven Verlauf und es besteht ein 2,5-3% Lebenszeitrisiko an Prostatakrebs zu versterben. Allerdings sind die klinisch-pathologischen Kriterien unzureichend für eine genaue Differenzierung zwischen langsam wachsenden und progredient verlaufenden Tumoren. Daher besteht eine Unsicherheit bezüglich des individuellen Risikos für eine aggressiv wachsende Krebsform. Eine der Herausforderungen in der aktuellen Prostatakrebsforschung liegt in der Identifizierung von Markern, die einen aggressiven Krankheitsverlauf prognostizieren können. Mithilfe dieser Marker könnten einerseits Übertherapie der klinisch nicht-relevanten Formen reduziert und andererseits Patienten mit einem erhöhten Risiko für einen trotz lokaler Therapie progredienten Krankheitsverlauf identifiziert und behandelt werden. Der Verdacht auf Prostatakrebs entsteht aufgrund eines erhöhten PSA Wertes sowie eines auffälligen digital-rektalen Untersuchungsergebnisses. Die Höhe des PSA Wertes korreliert jedoch nicht direkt mit dem Tumorstadium. Zur Diagnosesicherung ist eine feingewebliche Untersuchung der Drüsenmorphologie an Stanzbiopsien erforderlich. Diese werden nach dem Gleason Scoring-System eingeteilt. Die Heterogenität der molekularbiologischen Veränderungen im Prostatakrebs führt jedoch dazu, dass Patienten mit der gleichen Gleason-Score einen sehr variablen klinischen Verlauf entwickeln können.

Das Ziel meiner Arbeit war es, neue Erkenntnisse zu gewinnen über die molekularen Mechanismen, die zu aggressiven Prostatakrebskrankungen führen. Der Schwerpunkt meiner Arbeit lag dabei auf der Untersuchung der molekularen und zellulären Veränderungen, die aus der Überexpression von ERG in *TMPRSS2:ERG* (T/E) Varianten resultieren.

Kapitel 1 liefert eine detaillierte Übersicht über die verschiedenen genetischen und molekularbiologischen Veränderungen, die zur Heterogenität des Prostatakrebses beitragen. Die überwiegende Mehrheit aller Prostatakrebskrankungen sind Adenokarzinome, die durch multifokales Wachstum luminaler sekretorischer Zellen entstehen. Diese Zellen weisen kontinuierliche histomorphologische Veränderungen auf, die von niedriggradiger Dysplasie bis hin zu einem 'carcinoma in situ' reichen und zusammenfassend als intraepitheliale Prostataneoplasie (PIN) bezeichnet werden. Prostatakrebs ist gekennzeichnet von einer komplexen Pathologie mit mehreren histologischen Fokus-zen, die Ausdruck einer Mischung von mehreren genetischen und molekularbiologischen Veränderungen sind. Das Spektrum der genomischen Aberrationen, wie z.B. Punktmutationen, Kopienzahlvariationen, strukturelles Rearrangement und DNA Methylierungsveränderungen, spiegelt unterschiedliche molekulare Subtypen wider. Die am

häufigsten veränderten Signalwege sind die Signaltransduktion über Androgene, PTEN-PI3K/Akt, Ras/Raf/MEK/ERK und das Retinoblastom Protein (pRB). Diese sind vertärkt betroffen in metastasiertem Prostatakrebs. Auch sind im metastasierten Prostatakrebs große Genomabschnitte von Deletionen betroffen, was eine erhöhte genetische Instabilität in fortgeschrittenem Prostatakrebs vermuten lässt.

Androgene nehmen eine zentrale Rolle in der Entstehung und dem Fortschreiten von Prostatakrebs ein. Die hormonablative Behandlung gehört daher zu den primären Therapieoptionen des fortgeschrittenen Prostatakarzinom. Häufig tritt darunter jedoch ein Krankheitsrückfall und progressiver Verlauf hin zum kastrationsresistenten Prostatakrebs ein. Der neuroendokrine Prostatakrebs (NEPC) ist eine sehr aggressive Form des Prostatakrebses, die sich durch die Expression von neuroendokrinen (NE) Markern und fehlendem Ansprechen auf hormonablative Therapie vom Adenokarzinom unterscheidet.

Langfristig aktivierte Signaltransduktion über den Androgenrezeptor können zu Doppelstrangbrüchen der DNA führen und somit chromosomales „rearrangement“ hervorrufen. Im Prostatakrebs wurden Genfusionen der ETS-Transkriptionsfaktoren beschrieben. Die T/E Genfusion ist die häufigste Genomveränderung im Prostatakrebs mit einer Prävalenz von 50% aller Tumore. Diese Genfusion resultiert aus der Fusion des Transkriptionsfaktors *ERG* mit dem androgensensiblen Gen *TMPRSS2* und begünstigt die Hochregulierung des ERG Proteins mit anschließender Aktivierung der ERG-Zielgene. Die Expression von Fusions-mRNA Molekülen von unterschiedlichen T/E Varianten ist assoziiert mit klinisch-pathologischen Parametern. Die molekularen Veränderungen, die als Folge der Expression von T/E Genfusionsvarianten auftreten, sind jedoch nicht ausreichend bekannt.

In **Kapitel 2** wurden die molekularen Veränderungen und funktionellen Auswirkungen der T/E Genfusion untersucht. Unter Verwendung eines Doxycyclin (Dox)-induzierbarem Überexpressionsmodell in LNCaP Zellen (LNCaP-T/E) konnte belegt werden, dass der TGF- β /BMP sowie der WNT/ β -catenin Signalweg wichtige Regulatoren der T/E-vermittelten Epithelial-zu-Mesenchymal-Transition (EMT) in Prostatakrebszellen sind. Die Induktion der T/E Expression führte zur verstärkten Sekretion von TGF- β 1 und -2 sowie erhöhter Expression von *ALK1*, einem Rezeptor der TGF- β Familie. *ALK1* Hemmung in T/E exprimierenden Zellen blockierte die p38 Phosphorylierung und verringerte die Expression der TGF- β Zielgene *VIM*, *MMP1*, *CDH2* und *SNAI2*. T/E-Induktion führte auch zur verstärkten Zellmigration- und Invasion. Diese Ergebnisse deuten auf die *ALK1*-vermittelte TGF- β Signaltransduktion als onkogener Mechanismus in T/E positiven Prostatatumoren hin. Außerdem liefern diese Daten eine Grundlage für die Testung von *ALK1*-Inhibitoren bei der Behandlung von T/E positiven Prostatatumoren. Das lösliche rekombinante *ALK1*-Fc Fusionsprotein Dalantercept wird zurzeit in verschiedenen Krebsarten getestet und zeigte bereits Antitumorwirkung in unterschiedlichen Therapieresistenten soliden Tumoren in Phase 1 (NCT00996957, NCT02024087) und Phase 2 Studien (NCT01642082, NCT01727336, NCT01720173), beschrieben in **Kapitel 5**. Des Weiteren konnten wir in **Kapitel 2** erhärten, dass der WNT/ β -catenin Signalweg in T/E exprimierenden Zellen über den Frizzled Rezeptor *FZD4* vermittelt wird. Die *FZD4*-

Inhibition hatte eine Reduktion der p38 Phosphorylierung zur Folge. Interessanterweise wurde eine Hochregulierung der microRNA *miR-503* ausschließlich in T/E Variant VI exprimierenden Zellen gefunden. Eine Überexpression der *miR-503* führte zur Reduktion von *SMAD7*, da als negativer Regulator der TGF- β und WNT/ β -catenin Signalwege bekannt ist. Die *miR-503*-vermittelte Reduzierung von *SMAD7* könnten ein 'escape' Mechanismus sein, der hemmenden Wirkung von *SMAD7* auf TGF- β und WNT/ β -catenin zu entkommen. Eine therapeutische Hemmung des FZD4-vermittelten Signalweges ist zurzeit nicht Gegenstand von klinischen Studien. Unterstützende Belege zur Möglichkeit einer FZD4-gezielten Therapie können abgeleitet werden von Studien, welche die selektiven Inhibitoren gegen FZD7 (Vantictumab) und FZD8 (Ipafriccept) an HER2-negativen Brusttumoren (NCT01973309), Bauchspeicheldrüsenkrebs (NCT02005315), nicht-kleinzelligem Lungenkrebs (NCT01957007), und Eierstockkrebs (NCT02092363) testen.

In **Kapitel 3** wurde eine Analyse der epigenetischen Veränderungen als Folge der T/E Genfusion durchgeführt. Durch Überexpression der T/E Varianten zeigte sich ein globales Hypomethylierungsmuster. Die differentiell methylierten CpG-Orte befanden sich überwiegend in Gen-Körper Regionen. Eine integrative Analyse der epigenetischen und Genexpressionsveränderungen in LNCaP-T/E Zellen wies auf eine T/E-induzierte Hochregulierung von *FZD4* und *HLA-DMB*, die mit einem Verlust von DNA Methylierung einhergehen könnte. Ein direkter Zusammenhang zwischen DNA Hypomethylierung und mRNA Hochregulierung sowie eine Bestimmung der zugrundeliegenden Mechanismen der T/E-vermittelten epigenetischen Veränderungen konnte in der vorliegenden Analyse nicht erbracht werden. In Ergänzung zu den in **Kapitel 2** aufgeführten Diskussionspunkten könnte ein Zusammenhang zwischen der *FZD4* Hypomethylierung und mRNA Hochregulierung eine Basis sein für weitere Analysen zu der „druggability“ von T/E fusionspositiven Tumoren.

In **Kapitel 4** wurde der Transkriptionsfaktor *INSM1* als Regulator einer neuroendokrine (NE) Differenzierung in Prostatakrebszelllinien identifiziert. Der neuroendokrine Prostatakrebs (NEPC) ist ein hochaggressives Karzinom, welcher oft in Kombination mit dem klassischen Adenokarzinom auftritt. In Patientenproben und in Zelllinien konnte ein Zusammenhang zwischen *INSM1* und der T/E Genfusion beobachtet werden. Experimentell führte die T/E Überexpression zur Hochregulierung von *INSM1* sowie zur verstärkten Expression von den NE Markern *TUBB3*, *SCG3*, *ASCL1*. Dies deutete daraufhin, dass die T/E Genfusion mit NEPC assoziiert sein könnte. Die gewebespezifische Expression und etablierte Funktion von *INSM1* in neuronalem und endokrinem Gewebe könnten von Vorteil sein bei der histologischen Diagnose von neuroendokrinem Prostatakrebs und als spezifisches 'target' in der gezielten Therapie des NEPC. Die Re-Expression von *INSM1* in NE Tumoren erhielt Aufmerksamkeit in der 'suicide' Gentherapie als tumorspezifische Behandlung des kleinzelligen Lungenkrebses und Neuroblastoms. *INSM1* Promoter-Konstrukte könnten potentiell Anwendung finden in der Diagnose und Verlaufskontrolle von NE Tumoren *in vivo*. In Ergänzung zu vorangegangenen Studien, die auf beachtliche Ähnlichkeiten der Gensignaturen verschiedener NE Tumore hinweisen, zeigte auch die vorliegende Arbeit, insbesondere **Kapitel 4**, Übereinstim-

mungen in den genetischen und molekularbiologischen Veränderungen zwischen NEPC und bekannten NE Tumormodellen, wie zum Beispiel die Reelin Signaltransduktion. Dies lässt vermuten, dass weitere Erkenntnisse über die Mechanismen des NEPC abgeleitet werden könnten von den molekularpathologischen Mechanismen anderer NE Tumore und dass die ‚suicide‘ Gentherapie eine potentielle Strategie der gezielten Therapie im NEPC sein könnte.

Abschließend gilt für Prostatakreberkrankungen, dass Marker für die verfeinerte Risikoabschätzung eines progredienten Tumorverlaufs benötigt werden. Verschiedene gewebsbasierte Multi-Genexpressionstests für die Einschätzung des aggressiven Prostatakrebses stehen bereits zur Verfügung. Ihre standardisierte Anwendung wird allerdings erschwert von den bekannten Herausforderungen der Prostatakrebsforschung, wie Heterogenität, Multifokalität und das eingeschränkte Probenvolumen aus der Stanzbiopsie. Die genetische Instabilität im Prostatakrebs erhöht die Komplexität der somatisch genomischen Aberrationen, welche zu spezifischen Kombinationen von ‚driver‘ Mutationen in einem Tumor führen. Die molekulare Pathologie ist jedoch ein schnell wachsendes Forschungsfeld, immer mehr ‚targets‘ werden entdeckt, die mit einer aggressiven Tumorbiologie korrelieren, wie zum Beispiel *AR* Spleißvarianten und Differenzierungsmarker einer neuroendokrinen Manifestation (zum Beispiel *INSM1* oder *L1CAM*). Letztere könnten zum Beispiel eine Einschätzung des Therapieansprechens auf eine hormonablative Behandlung ermöglichen. Aktuelle Studien zu neuen molekularen ‚targets‘ werden in **Kapitel 5** besprochen. Individuelle genetische Veränderungen können durch next generation sequencing erhoben werden und Anwendung finden für einen personalisierten Ansatz in der klinischen Praxis. Die molekularbiologische und genetische Klassifizierung am Biopsiematerial ist aktuell kein Bestandteil der Prostatakrebsrichtlinien. Sie könnte in Zukunft jedoch Einfluss haben auf die Standardtherapie des Prostatakrebses, wie es bereits am Beispiel des Brustkrebses, Melanoms und kürzlich auch des Lungenkrebses umgesetzt wurde. Gleichzeitig ist ein breiteres Spektrum an therapeutischen ‚targets‘ (in Ergänzung zur hormonablativen Therapie) dringend notwendig, damit die Behandlungsmaßnahmen für metastasierten Prostatakrebskrankungen verbessert werden. Die funktionelle und mechanistische Untersuchung von genetischen Markern, wie in der vorliegenden Promotionsarbeit erarbeitet wurde, ist die Basis für die Entwicklung von neuen Diagnoseverfahren und könnte die Ausrichtung zukünftiger Forschungsvorhaben beeinflussen.