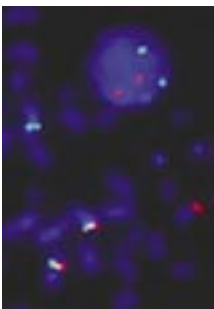


Fusionsgene

Neue prognostische Marker und therapeutische Angriffsziele beim Prostatakarzinom?



Mit der Entdeckung rekurrenter Genfusionen eines Androgen-regulierten 5'-Gens mit einem Gen aus der *ETS*-Familie beim Prostatakarzinom, scheint ein bedeutender Mechanismus für die Überexpression von onkogen wirkenden *ETS*-Transkriptionsfaktoren gefunden zu sein. Hiervon werden bedeutende neue Einsichten in die Biologie dieser Tumorentität sowie Einflüsse auf den klinischen Umgang mit der Krankheit erwartet. Eine Reihe von Daten zeigt, dass durch Fusionsgene offenbar bestimmte molekulare Subtypen charakterisiert werden. Ferner mehren sich Indizien dafür, dass Genfusionen beim Prostatakarzinom einen charakteristischen klinischen Verlauf definieren, und ihr Nachweis somit als diagnostischer Test und Biomarker mit prognostischer Relevanz eingesetzt werden kann. Zudem besteht die Hoffnung, Genfusionen könnten sich für zielgerichtete Therapien als nützlich erweisen.

Das gestiegene Bewusstsein der Männer für Prostatakrebs in Verbindung mit der zunehmenden Anwendung des Prostata-spezifischen Antigen (PSA)-Tests hat dazu geführt, dass Prostatakrebs heute immer häufiger in einem frühen Stadium entdeckt wird. Unentdeckt verliefen solche Tumoren zu einem beträchtlichen Anteil nicht letal. Andererseits ist die Mortalitätsrate beim Prostatakarzinom noch immer sehr hoch. Prostatakrebs ist die zweithäufigste tumorbedingte Todesursache beim Mann. Um Überbehandlungen zu vermeiden, aggressive Tumoren aber adäquat zu behandeln, fehlt es bislang an Möglichkeiten, verlässliche Aussagen über den Verlauf der Krankheit im Einzelfall machen

zu können. Die Forschung sucht daher unablässig nach klinisch relevanten Biomarkern, anhand derer der Verlauf einer Prostatakrebskrankung vorhersehbar ist.

Genfusionen sind ein häufiges Ereignis bei hämatologischen (Philadelphia-Chromosom) und mesenchymalen malignen Krankheiten. Ihr Vorkommen in Karzinomen war bis vor kurzem hingegen weitgehend unbekannt. Das hat sich seit ca. drei Jahren mit der Entdeckung zahlreicher rekurrenter genomischer Rearrangements in Prostatakarzinomen grundlegend geändert. An diesen Umlagerungen sind jeweils *ETS*-Gene beteiligt. Diese Gene kodieren für eine Gruppe von onkogen wirkenden Transkriptionsfaktoren. Als Partner in Genfusionen wurde hiervon

zunächst entweder *ERG* (Estrogen-reguliertes Gen), *ETV1* oder *ETV4* identifiziert [Reviews 1-3].

Entdeckung der *TMPRSS2:ETS*-Genfusion beim Prostatakarzinom

Erst vor drei Jahren erschien der erste Bericht über rekurrente genomische Rearrangements beim Prostatakarzinom, die zur Fusion des 5'-nicht-translatierten Endes von *TMPRSS2* mit einem Gen aus der *ETS*-Familie führen [4]. Ihre Entdeckung gelang mithilfe des COPA (Cancer Outlier Profile Analysis)-Algorithmus. Die Methode wurde entwickelt, um Gene zu identifizieren, die nur in einer Untergruppe von Karzinomen in hohem Maße exprimiert werden.

Das *TMPRSS2*-Gen kodiert für eine Serin-Protease und wird prostataspezifisch stark Androgen-abhängig exprimiert. Eine niedrige intraprostatiche Konzentration an Dihydrotestosteron (DHT), wie sie unter einer Androgen-deprivationstherapie vorliegt, reicht aus, um eine *ETS*-Überexpression zu verursachen.

Häufigster Fusionspartner für *TMPRSS2* aus der Gruppe der *ETS*-Gene ist *ERG*. Beide Gene sind auf dem langen Arm von Chromosom 21 (21q22.2-3) lokalisiert. Als häufigster Fusionsmechanismus gilt die Deletion des kurzen Abschnitts zwischen den beiden Genen.

Bei Vorliegen einer *TMPRSS2:ETS*-Genfusion im Prostatakarzinom reicht eine niedrige intraprostatiche Konzentration an Dihydrotestosteron, wie sie unter einer Androgen-deprivationstherapie vorliegt, aus, um eine *ETS*-Überexpression und damit die Überproduktion eines onkogenen Transkriptionsfaktors zu bewirken.

TMPRSS2:ERG-Fusionen kommen bei ca. jedem zweiten Prostatakarzinom vor. Dieser hohe Anteil ergibt sich aus den gemittelten Ergebnissen von mehr als zwei Dutzend Studien mit insgesamt etwa 1 500 analysierten Fällen von lokalisiertem Prostatakrebs. Er kann je nach untersuchtem Krankengut in weiten Grenzen variieren. Angesichts der hohen Prävalenz von Prostatakrebs ist die *TMPRSS2:ERG*-Genfusion aber in jedem Fall eine der häufigsten somatischen, genetischen Alterationen im Zusammenhang mit malignen Krankheiten.

Die *TMPRSS2:ERG*-Fusion kommt häufig in Verbindung mit morphologischen Merkmalen eines ag-

gressiven Prostatakarzinoms vor. Hierzu zählen bläulich getönter Schleim, siebförmige Wachstumsmuster, Makronukleoli, intraduktale Tumorausbreitung sowie Charakteristika von Siegelringzellen. Nur 24 % der Tumoren, die keines dieser Merkmale aufweisen, enthalten die *TMPRSS2:ERG*-Fusion [5].

Rajput et al. (2007) entdeckten *TMPRSS2:ERG*-Fusionen vorwiegend in mäßig bis schlecht differenzierten Tumoren. Keine Genfusionen fanden sich dagegen in hyperplastischen Prostatae [6].

Nachweis von *TMPRSS2-ETS*-Genfusionen beim Prostatakarzinom

Die *TMPRSS2:ETS*-Genfusion kann im Prostatagewebe, in zirkulierenden Prostatakrebszellen und in Urinproben nach Prostatamassage nachgewiesen werden. Für den Nachweis eignen sich zwei Techniken, die auf unterschiedlichen Ebenen agieren:

- Auf genomischer Ebene dient die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)-zur Entdeckung chromosomaler Veränderungen.
- Auf Transkriptomebene dienen Polymerase-Kettenreaktion (PCR)-basierte Assays zur Entdeckung und Quantifizierung von Fusions-transkripten.

Die Gene für *ETV1* und *ETV4* liegen jeweils auf einem anderen Chromosom als *TMPRSS2*. Die FISH-Signale für jedes Gen beider Allele liegen im Zellkern räumlich getrennt voneinander. Durch unterschiedlich farbliche (grün, rot) Markierung von *TMPRSS2* und *ETV1* bzw. *ETV4* lassen sich die Genpaare in Zellen ohne Genfusion (Wildtyp) deutlich unterscheiden. Beim Auftreten eines Signals aus zwei eng beieinanderliegenden Markierungen (grün und rot), dessen Überschneidung gelb erscheint, kann auf eine heterozygote Fusion geschlossen werden (**Abb. 1a**).

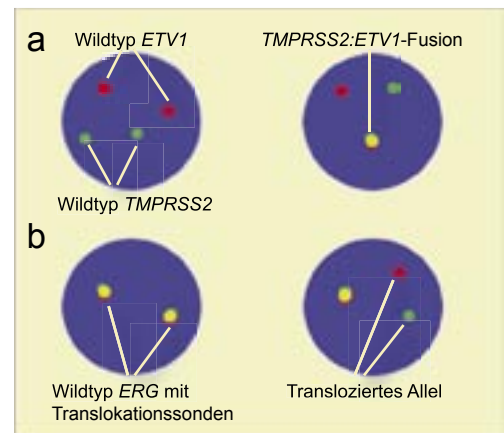


Abb. 1a, b: Assays zur Detektion von Fusionsgenen zwischen *TMPRSS2* und *ETS*-Genen mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung. **a)** Beispiel für *ETV1* bzw. *ETV4*. **b)** Beispiel für *ERG*.

Um mit FISH eine *TMPRSS2:ERG*-Genfusion entdecken zu können, werden Translokationsassays (break-apart assays) angewandt. Denn die beiden Gene liegen auf Chromosom 21 zu eng beieinander, als dass die Fusion mittels eines Fusionsassays einwandfrei unterschieden werden könnte. Aus einer Translokation wird in diesem Fall auf eine Fusion zwischen *TMPRSS2* und *ERG* geschlossen (**Abb. 1b**).

Entdeckung weiterer 5'- und 3'-Fusionspartner

Tomlins et al. (2007) berichteten über weitere 5'-Fusionspartner von *ETV1*: *SLC45A3*, *HERV-K_22q11.23*, *C15ORF21*, *HNRPA2B1* [7]. Diese sind auf unterschiedliche Weise Androgen-reguliert (Androgen-induziert, Androgen-supprimiert, Androgen-insensitiv).

Zunächst waren nur Fusionsgene mit *ETV1* und den neuen 5'-Partnern bekannt. Jüngst wurde auch *ETV5* als Fusionspartner von *TMPRSS2* und *SLC45A3* identifiziert. Damit ist neben *ETV1* und *ETV4* das dritte und letzte Mitglied aus der PEA3-Unterfamilie von *ETS*-Genen an Genfusionen in Prostatakarzinomen beteiligt [8].

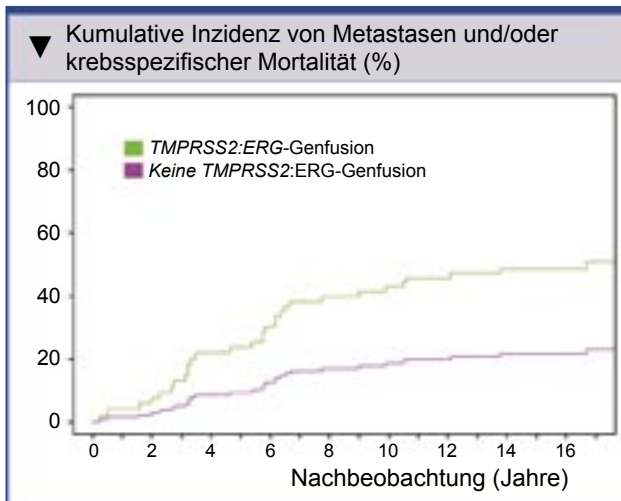


Abb. 2: *TMPRSS2:ERG* ist bestimmender Faktor für die kumulative Inzidenz der Metastasierung und Prostatakrebs-spezifischen Mortalität (nach Demichelis F, et al. 2007).

Bislang waren stets nur Transkripte der Fusionsgene identifiziert worden. Mit DDX5-ETV4 wurde erstmals ein Gesamtfusionsprotein identifiziert [9].

Haben Fusionsgene eine Rolle in der Ätiologie von Prostatakrebs?

Genfusionen kommen in den meisten Prostatakarzinomen vor, so dass mit ihrer Entdeckung sogleich über

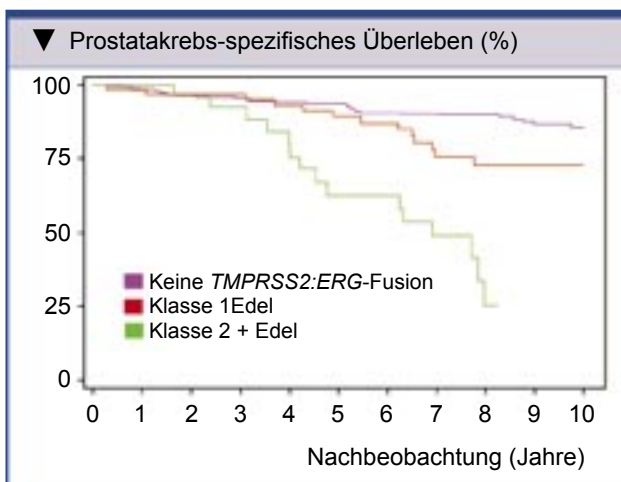


Abb. 3: Kaplan-Meier-Analyse zum Vergleich des Prostatakrebs-assoziierten Überlebens bei Patienten mit einem Prostatakarzinom ohne *TMPRSS2:ERG*-Fusion sowie mit einer 1Edel- oder einer 2 + Edel-Mutation (siehe Erklärung im Text) (nach Attard G, et al. 2007).

ihre mögliche Rolle bei der Tumorigenese spekuliert wurde. Es wird hypothetisiert, dass die 5'-nicht-translatierte Region von *TMPRSS2*, die die Elemente für die prostataspezifische Expression der kodierten Serin-Protease enthält, in *TMPRSS2:ETS*-positiven Prostatakrebszellen die Überexpression von ETS-Transkriptionsfaktoren vorantreibt.

Perner et al. (2007) analysierten Gewebeproben von Patienten mit benigner Prostataerkrankung, Prostatakrebs-Vorstufen, klinisch lokalisierten Prostatakarzinomen, sowie Hormona-naive und Hormon-refraktäre Metastasen. In ca. jedem zweiten lokalisiertem Prostatakarzinom (48,5 %) sowie in 30 % der Hormon-naiven und 33 % der Hormon-refraktären Metastasen wurde die *TMPRSS2:ERG*-Fusion nachgewiesen. Keine Genfusionen wurden in den Gewebeproben bei benigner Prostataerkrankung vorgefunden. Aber in 19 % der prostatistischen intraepithelialen Neoplasien (PIN) mit hohem Tumorgrad waren *TMPRSS2:ERG*-Fusionen nachweisbar (allerdings nur vermischt mit Krebsherden, die das gleiche *ERG*-Rearrangement aufwiesen). Offenbar führen genetische Schäden zu deregulierter Proliferation und dem Erscheinungsbild von PIN, während *TMPRSS2:ERG*-Fusionen ein frühes Ereignis in der Entwicklung eines invasiven Adenokarzinoms der Prostata sind [10].

TMPRSS2:ERG-Genfusion ein prognostischer Faktor für Progression

In einer Reihe von Studien wurde bereits untersucht, ob bzw. inwieweit sich *TMPRSS2:ERG* eignet, Aussagen über den Krankheitsverlauf machen zu können. Die Ergebnisse sind nicht frei von Widersprüchen. Doch mehrheitlich wurde das Vorkommen des Fusionsgens mit einer schlechteren Prognose in Zusammenhang gebracht als das Fehlen des Fusionsgens.

Nam et al. (2007) untersuchten bei 26 Patienten mit einem klinisch lokalisierten Prostatakarzinom gleichen histologischen Grades (Gleason Score 7) das Auftreten eines biochemischen Rezidivs nach radikaler Prostatektomie. In elf der Fälle (42,3 %) wurde das *TMPRSS2:ERG*-Fusionsgen nachgewiesen. Bei diesen Patienten war die 5-Jahres-Rezidivrate signifikant höher als bei den Patienten ohne die Genfusion (79,5 versus 37,5 %) [11].

Ergebnisse von Demichelis et al. (2007) lassen erkennen, dass die *TMPRSS2:ERG*-Fusion beim Prostatakarzinom zur Entwicklung eines ag-

Eine Reihe von Indizien spricht dafür, dass Genfusionen beim Prostatakarzinom als wertvolle Biomarker eingesetzt werden können, anhand derer ein charakteristischer klinischer Verlauf der Krankheit prognostiziert werden kann.

gressiven Phänotyps beiträgt. Zugleich wird die kritische Rolle von *ERG* als ein Onkogen bei Prostatakrebs beleuchtet. In einer Kohorte von Prostatakrebs-Patienten unter aktiver Überwachung (Watchful Waiting) war die kumulative Inzidenz von Metastasierung und/oder krebsspezifischer Mortalität in Fällen mit nachgewiesener *TMPRSS2:ERG*-Fusion signifikant höher (Abb. 2) [12].

Attard et al. (2008) identifizierten eine neue Kategorie von Prostatakarzinomen, die sich durch eine Duplikation der Fusion von *TMPRSS2* mit *ERG*-Sequenzen in Verbindung mit interstitiellen Deletionen von Sequenzen 5' von *ERG* auszeichnet. Diese als 2 + Edel bezeichnete *ERG*-Modifikation wird durch zwei oder mehr solitäre 3'-*ERG*-Kopien pro Zelle in FISH-Analysen definiert. Ihr Auftre-

ten bei 6,6 % der untersuchten Fälle war mit einer wesentlich ungünstigeren Prognose behaftet als bei Vorliegen nur einer 3'-*ERG*-Kopie (1Edel) pro Zelle (**Abb. 3**) [13].

Es existieren bereits Tests, um Genfusionen in Prostatabiopsien oder Urinproben nachweisen zu können. Inwieweit ihrer Entdeckung prognostische Bedeutung zukommt, muss noch in umfangreichen weiteren Untersuchungen erforscht werden. *jfs* ◀

Literatur:

[1] Kumar-Sinha C, Tomlins SA, Chinnaiyan AM, 2008. Recurrent gene fusion in prostate cancer. *Nature Reviews Cancer* 8:497-511.
 [2] Morris DS, Tomlins SA, Montie JE, Chinnaiyan AM, 2008. The discovery and appli-

cation of gene fusion in prostate cancer. *BJU Int* 102:276-282.

[3] Perner S, Schmidt FH, Hofer MD, et al. 2007. Die *TMPRSS2-ETS*-Genfusion beim Prostatakarzinom. *Urologe* 46:754-760.

[4] Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, et al. 2005. Recurrent fusion of *TMPRSS2* and *ETS* transcription factor genes in prostate cancer. *Science* 310:644-648.

[5] Mosquera J-M, Perner S, Demichelis F, et al. 2007. Morphological features of *TMPRSS2-ERG* gene fusion prostate cancer. *J Pathol* 212: 91-101.

[6] Rajput AB, Miller MA, De Luca A, et al. 2007. Frequency of the *TMPRSS2:ERG* gene fusion is increased in moderate to poorly differentiated prostate cancers. *J Clin Pathol* 60: 1238-1243.

[7] Tomlins SA, Laxman B, Dhanasekaran SM, et al. (2007). Distinct classes of chromosomal rearrangements create oncogenic *ETS* gene fusions in prostate cancer. *Nature* 448: 595-599.

[8] Helgeson BE, Tomlins SA, Shah N, et al. 2008. Characterization of *TMPRSS2:ETV5*

and *SLC45A3:ETV5* gene fusion in prostate cancer. *Cancer Res* 68:73-80.

[9] Han B, Mehra R, Dhanasekaran SM, et al. 2008. A fluorescence *in situ* Hybridization screen for E26 transformation-specific aberrations: identification of *DDX5-ETV4* fusion protein in prostate cancer. *Cancer Res* 68:7629-7637.

[10] Perner S, Mosquera J-M, Demichelis F, et al. 2007. *TMPRSS2-ERG* fusion prostate cancer: an early molecular event associated with invasion. *Am J Surg Pathol* 31:882-888.

[11] Nam RK, Sugar L, Wang Z, et al. 2007. Expression of *TMPRSS2:ERG* gene fusion in prostate cancer cells is an important prognostic factor for cancer progression. *Cancer Biol Ther* 6:40-45.

[12] Demichelis F, Fall K, Perner S, et al. 2007. *TMPRSS2:ERG* gene fusion associated with lethal prostate cancer in a watchful waiting cohort. *Oncogene* 26:4596-4599.

[13] Attard G, Clark J, Ambroisine L, et al. 2008. Duplication of *TMPRSS2* to *ERG* sequences identifies fatal human prostate cancer. *Oncogene* 27:253-263.

Nachweis des *TMPRSS2:ERG*-Fusionsgens in zirkulierenden Prostatakrebszellen

Fusionsgene entstehen durch Gen-Translokation in Krebszellen. Sie können als Marker genutzt werden, um Krebszellen bei minimal residuierender Krankheit nachzuweisen. In einer aktuellen Studie wurde geprüft, ob das *TMPRSS2:ERG*-Fusionsgen in zirkulierenden Tumorzellen von Prostatakrebspatienten nachzuweisen ist, und ob es gegebenenfalls geeignet ist, die Tumormetastasierung zu markieren (Mao X, et al. 2008):

Zahlreiche verschiedene Kombinationen von *TMPRSS2*- und *ERG*-Gensequenzen wurden identifiziert. Von diesen kodieren einige für verkürzte *ERG*-Proteine oder ein *TMPRSS2:ERG*-Fusionsprotein. Ferner scheinen unterschiedliche Fusionen unabhängig voneinander in verschiedenen Regionen der Prostata zu entstehen (Clark J, et al. 2007).

Für die Analysen standen 27 Proben von Biopsien aus Prostataektomien und 15 Proben aus dem peripheren Blut von Patienten mit fortgeschrittenem Prostatakrebs (PSA >40 ng/ml) zur Verfügung. In den Biopsieproben und den zirkulierenden Krebszellen sollten *TMPRSS2:ERG*- und *TMPRSS2:ETV1*-Transkripte mit Hil-

fe von Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) aufgespürt werden. Mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) wurde die genomische Trunkation von *ERG* analysiert.

Nachweis genomischer Trunkation des *ERG*-Gens in zirkulierenden Tumorzellen

Von den Biopsieproben waren 12 (44 %) positiv auf das *TMPRSS2:ERG*-Fusionsgen. In sieben Fällen wurde mehr als eine Form der Fusionsgen-Transkripte nachgewiesen. Das *TMPRSS2:ETV1*-Fusionsgen konnte in keiner der Proben entdeckt werden.

Für Analysen zum Nachweis genomischer Trunkation des *ERG*-Gens (sie entsteht als Ergebnis der *TMPRSS2:ERG*-Fusion) standen isolierte zirkulierende Tumorzellen von zehn der 15 Blutproben zur Verfügung. In sechs der zehn Proben wurde genomische Trunkation von *ERG* entdeckt.

TMPRSS2-ERG-Transkripte konnten in keiner der Proben von zirkulierenden Tumorzellen nachgewiesen werden.

FAZIT: Der Nachweis genomischer Trunkation beim *ERG*-Gen als Ergebnis der *TMPRSS2-ERG*-Fusion könnte helfen, zirkulierende Krebszellen zu entdecken und das Potenzial der Metastasierung von Prostatakrebs zu kontrollieren.

→ Falls solche Fusionsgene – insbesondere das häufig auftretende *TMPRSS2:ERG* – bei der Progression und der Metastasierung von Prostatakrebs eine Rolle spielen, wären sie wertvolle Marker unter anderem auch zur Therapiestratifizierung. *jfs* ◀

Mao X, Shaw G, James SY, et al. 2008. Detection of *TMPRSS2:ERG* fusion gene in circulating prostate cancer cells. *Asian J Androl* 10: 467-473.

Clark J, Merson S, Jhavar S, et al. 2007. Diversity of *TMPRSS2-ERG* fusion transcripts in the human prostate. *Oncogene* 26:2667-2673.