

**Aus dem Institut für Pathologie und Neuropathologie der  
Universität Tübingen  
Abteilung Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie  
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. F. Fend**

***ERG* rearrangement is specific to prostate cancer and does  
not occur in any other common tumor**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**Martin Braun**

**aus**

**Erfurt**

**2012**

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. S. Perner

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. Christian Schwentner

3. Berichterstatter: Professor Dr. B. Wullich

meinen Eltern Sabine und Volker gewidmet



## Inhaltsverzeichnis:

	Seite
Titelseite	1
Widmung	3
Deutsche Zusammenfassung	6
Einleitung	6
Wissenschaftliche Fragestellung	7
Erklärung gemäß §6(2) der Promotionsordnung	7
Material und Methoden	9
Ergebnisse	10
Diskussion	11
Schlussfolgerungen	12
ERG rearrangement is specific to prostate cancer and Does not occur in any other common tumor	
Manuskripttitel und Autoren	13
Acknowledgements	14
Abstract	15
Running Title & Keywords	16
Introduction	17
Materials and Methods	18
Results	21
Discussion	23
References	26
Figure Legend	29
Tabelle 1	30
Figure 1	33
Danksagung	34

## Deutsche Zusammenfassung

**Deutscher Titel:** "Das *ERG*-Rearrangement ist spezifisch für das Prostatakarzinom und kommt nicht in anderen epithelialen Tumoren vor."

### Einleitung

Das Prostatakarzinom stellt mit vielen Tausend Neuerkrankungen pro Jahr in der westlichen Welt nicht nur die häufigste Krebserkrankung dar, sondern auch einen der bedeutenden Brennpunkte der modernen Tumorforschung. Wie auch in vielen anderen Tumorentitäten spielen bei der Onkogenese und Progression des Prostatakarzinoms genetische Veränderungen eine wichtige Rolle. Die Entdeckung und Erforschung von tumorspezifischen, molekulargenetischen Veränderung ist dabei von unschätzbarem Wert, um die molekulare und klinische Dynamik der Tumorgenese sowie der Tumorprogression besser zu verstehen. Insbesondere von Gen-Translokationen aber glaubte man bisher, dass sie – abgesehen von sporadischen Vorkommen in epithelialen Tumoren der Brust, Schilddrüsen oder Niere - ausschließlich in hämatologischen und mesenchymalen Neoplasien auftreten [1-3]. Mit dem *ERG* Rearrangement, einer Genfusionen zwischen einem ETS-Gen (i.e. *ERG*, *ETV1*, *ETV4* und *ETV5*) und einem androgenregulierten 5' Partner (i.e. *TMPRSS2*, *SLC45* und *NDRG1*) wurde eine sehr häufige Genalteration im Prostatakarzinom gefunden: in etwa der Hälfte aller Prostatatakarzinome findet man *ERG*-Rearrangements [4-7]. Am häufigsten ist dabei die Fusion zwischen dem ETS-Gen *ERG* und dem androgenregulierten Gen *TMPRSS2*. Es gibt auch andere Tumorentitäten, bei denen ETS-Gene mit Partnern fusionieren, so z.B. bei der AML oder dem Ewing's Sarkoma, allerdings nur sehr sporadisch [8]. Angesichts der Häufigkeit dieser Genalteration im Prostatakarzinom beschäftigen sich aktuell viele wissenschaftliche Arbeiten mit der klinischen Bedeutung des *ERG*-Rearrangements, so etwa mit der Nutzung der *TMPRSS2:ERG* Genfusion als Prostatakarzinom-Biomarker.

## **Wissenschaftliche Fragestellung**

Es ist bisher vermutet aber noch nicht gezeigt worden, dass das *ERG* Rearrangement, abgesehen vom sporadischen Vorkommen in anderen, seltenen Tumoren (Ewing's Sarkoma, AML), nicht auch noch in anderen, häufigen epithelialen und nicht-epithelialen Tumorentitäten auftritt. Wir untersuchten daher eine große Auswahl verschiedenster epithelialer Tumoren auf das Vorkommen des *ERG*-Rearrangements. Zusätzlich analysierten wir einen öffentlich verfügbaren, hochauflösenden SNP-Datensatz auf somatische copy-number gains and losses hin, insbesondere auf die distinkte Deletion zwischen *TMPRSS2* und *ERG* [9]. Ziel der Arbeit war es festzustellen, ob die Mechanismen, welche im Prostatakarzinom zu einem *ERG*-Rearrangement führen, sowie die distinkte Deletion auf Chromosom 21 zwischen *TMPRSS2* und *ERG*, prostatakarzinom-spezifische Ereignisse darstellen. Insbesondere für das bessere molekulare Verständnis von *ERG*-Rearrangements in Prostatakarzinomen und für eine zukünftige klinische Anwendung – ob nun diagnostischer, prediktiver oder therapeutischer Art – ist es von großer Bedeutung, eine etwaige Spezifität nachzuweisen oder auszuschließen. Ergebnisse dieser Arbeit haben schon in der nahen Zukunft das Potential, speziell eine diagnostische Nutzung des *ERG*-Rearrangements im Prostatakarzinom zu konkretisieren. Die hier vorgelegte Studie befindet sich derzeit bei der Fachzeitschrift *Modern Pathology* im Druck.

## **Erklärung nach §6(2) der Promotionsordnung**

Bei der Durchführung der Studie halfen mir die auf Seite 13 genannten Personen. Veit Scheble ist Assistenzarzt in der Pathologie und stand mir während der Bearbeitung der Arbeit stets zur Seite. So half er mir bei der Erstellung des Manuskripts und bei der Einarbeitung in die verschiedenen Labortechniken (v.a. FISH-Mikroskopie). Dr. Rameen Beroukhim und Dr. Craig Mermel sind Postdocs im Brigham and Women's Hospital. Sie stellten uns die Rohdaten des von ihnen erstellten SNP-Datensatz zur Verfügung. Prof. Dr. Matthew Meyerson, Professor für Pathologie am Brigham and Women's Hospital half bei der Auswertung des SNP-Datensatzes. Ann-Cathrin Stiedl und Theresia Wilbertz sind medizinische

Doktoranden in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Sven Perner. Sie unterstützten mich bei den FISH-Experimenten und leisteten einen nicht unerheblichen Beitrag zur Optimierung der FISH-Färbungen. Insbesondere Karen Petersen, welche als MTA arbeitet, half bei der Identifizierung wichtiger Laborgeräte und trug mit ihrer langjährigen Laborerfahrung dem erfolgreichen Ablauf der Experimente bei. Dr. David Schilling, Oberarzt in der Urologie des UKT und Prof. Dr. Rainer Kuefer, Professor in der Urologie des Universitätsklinikum Ulm, unterstützen mich bei der Erstellung des Studienkonzepts und standen bei urologischen Fragestellung zur Seite. Prof. Dr. Lukas Bubendorf, Professor der Pathologie in Basel, und Dr. Christian Ruiz unterstützten das Projekt, indem sie uns ihre Multitumor TMAs zur Verfügung stellte. Dr. Markus Reischl, welcher im Institut für Angewandte Informatik am Forschungszentrum Karlsruhe als Bioinformatiker arbeitet, war Ansprechpartner bei statistischen Fragestellungen, wie etwa der benötigten Fallzahl für die FISH-Experimente und Signifikanzwerten hinsichtlich der Spezifität. Prof. Dr. Falko Fend gab wertvolle Hinweise zur Anfertigung des Manuskripts, insbesondere nach ersten Überarbeitungsvorschlägen durch die Fachzeitschrift *Modern Pathology*. Prof. Dr. Mark Rubin, Professor für Pathologie in Weill Cornell Medical College und Experte auf dem Gebiet des *ERG*-Rearrangements, half bei unklaren Formulierungen im Manuskript und war zusammen mit PD Dr. Sven Perner maßgeblich an der Ideengebung der Arbeits beteiligt. PD Dr. Sven Perner als mein Doktorvater war ständiger Betreuer und Ideengeber des Projekts. Er stellte außerdem die für die Experimente benötigten Räumlichkeiten und Gerätschaften zur Verfügung.

Ich erstellte das Manuskript dieser wissenschaftlichen Arbeit, inklusive Figure und der Tabelle, selbstständig, wurde im Zuge dessen, etwa bei unklaren Formulierungen, insbesondere von Veit Scheble, Prof. Dr. Falko Fend, Prof. Dr. Mark Rubin und PD Dr. Sven Perner unterstützt. Darüber hinaus war ich für die Durchführung und Auswertung der vielen FISH-Experimente verantwortlich. Die Konstruktion und Weiterverarbeitung der Prostatakarzinom-TMAs führte ich nach einer Einlernungsphase durch die MTA Karen Petersen eigenhändig durch. Die Auswertung der Rohdaten des SNP-Datensatzes bezüglich der Fragestellung dieser Arbeit führte ich gemeinsam mit Prof. Dr. Meyerson durch. Bei der Einlernung in die Morphologie von Tumoren (v.a. epitheliale Neoplasien), welche ich zur selbstständigen Identifizierung der Tumorareale und Auswertung der FISH-Experimente benötigte, half PD Dr. Sven Perner.



## Material und Methoden

Wir untersuchten mithilfe eines *ERG* break-apart FISH Assays insgesamt 2942 Tumorgewebe von 54 verschiedenen Tumorentitäten (u.a. Brust-, Lungen-, Kolon-, Magen- oder Blasenkarzinome) auf das Auftreten des *ERG* Rearrangements hin. Der FISH break-apart Assay ist – wie bereits beschrieben [4,6,10] - in der Lage, ein *ERG* Rearrangement im Zielgewebe festzustellen. Außerdem ermöglicht der FISH break-apart Assay eine Aussage, durch welchen der beiden möglichen Mechanismen das *ERG*-Rearrangement entstanden ist (i.e. *ERG* Rearrangement durch eine Deletion, oder *ERG*-Rearrangement durch eine Insertion von genetischem Material). Es wurden insgesamt sechs „Multi-Tumor“ Tissue-Microarrays (TMA) konstruiert, auf welchen wir die FISH-Experimente durchführten. Zur Kalibrierung der Ergebnisse konstruierten wir zusätzlich einen TMA mit 109 Tumorgewebsproben von Prostatakarzinompatienten, die sich nach einem PSA-Test einer Prostatextomie unterzogen haben. Das Tumoreal wurde vor der TMA-Konstruktion auf korrespondierenden H&E-Schnitten identifiziert. Von jedem Prostatektomiegewebe wurden anschließend zwei Tumorgewebsstanzen zur TMA-Konstruktion verwendet. Zur Validierung der FISH-Experimente mit einer anderen Methode untersuchten wir einen öffentlich verfügbaren hochauflösenden SNP-Datensatz (single nucleotide polymorphism array) auf somatische copy-number gains und losses. Wir untersuchten, ob die distinkte Deletion auf Chromosom 21q zwischen *TMPRSS2* und *ERG*, beschrieben als häufigste Form des *ERG* Rearrangements, spezifisch für das Prostatakarzinom ist. Der SNP-Datensatz umfasst die copy number gains und losses von insgesamt 3131 Tumoren 26 verschiedener Tumorentitäten (u.a. Prostatakarzinome). Jede der 26 verschiedenen Tumorentitäten war mit mindestens 20 (maximal bis zu 763) Tumorgewebsproben vertreten. Um die Signalintensitäten des Datensatzes mit Normalgewebe zu vergleichen, wurden zuvor 1480 benigne Gewebsproben auf ihren somatischen copy number Status hin untersucht. Die Rohdaten des SNP-Datensatzes wurden von einem der Co-Autoren dieser Arbeit, Berouhkim et al., in Nature publiziert.

## Ergebnisse

Zur Kalibrierung der Frequenz des *ERG*-Rearrangements in den verschiedenen, von uns untersuchten Tumorgeweben erfassten wir die Frequenz des *ERG*-Rearrangements in einer Prostatektomiekohorte. In 54/109 (49,5%) Fällen der Prostatektomiekohorte fanden wir ein *ERG*-Rearrangement. Davon zeigten 40/54 (74,1%) Fälle ein *ERG*-Rearrangement durch eine Deletion während in 14/54 (25,9%) Fällen das *ERG*-Rearrangement durch eine Insertion entstand. Diese Frequenz bestätigt die Ergebnisse bisheriger wissenschaftlicher Arbeiten, bei denen das *ERG*-Rearrangement in etwa der Hälfte aller Prostatakarzinome zu finden war.

Bei der FISH-Untersuchung der sechs Multitumor TMAs konnten wir in keiner der 2942 epithelialen und nicht-epithelialen Tumorgewebsproben ein *ERG*-Rearrangement feststellen. Die Ergebnisse der FISH-Untersuchungen sind in **Table 1** dargestellt.

Bei der Analyse der Rohdaten des SNP-Datensatzes stellten wir fest, dass ausschließlich im Prostatakarzinom die oben beschriebene Deletion auf 21q22.2-3 zwischen *TMPRSS2* und *ERG* auftritt. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Deletion auf 21q22.2-3, resultierend in der *TMPRSS2:ERG* Genfusion, ein Prostatakarzinom-spezifisches Ereignis darstellt (siehe **Figure 1**). Zahlreiche, aber unspezifische gains und losses in der Region 21q22.2-3 wurden bei der Analyse des SNP-Datensatzes auch in anderen Tumorentitäten festgestellt, beschränkten sich aber in jedem Fall nicht nur auf die distinkte Region zwischen *TMPRSS2* und *ERG*, sondern umfassten gleichzeitig noch andere, benachbarte Genloci. Korrespondierend aber unabhängig zu diesen Ergebnissen stellten wir auch auf den Multitumor TMAs in den jeweiligen Tumorentitäten entsprechende copy number losses und gains fest, d.h. homo- oder heterozygote FISH-Signalverluste oder FISH-Signalvervielfältigungen. Diese Ereignisse ließen sich jedoch klar von einem *ERG*-Rearrangement abgrenzen: FISH-Signale, welche ein *ERG*-Rearrangement (durch Deletion oder Insertion) zeigten, fanden wir ausschließlich im Prostatakarzinomgewebe.

## Diskussion

Es ist von großer Bedeutung für die translationale und klinische Tumorforschung, dass tumorspezifische, molekulare Veränderungen gut charakterisiert werden, um aus diesem Wissen heraus z.B. Biomarker zu entwickeln, welche prädiktiv, prognostisch, oder sogar therapeutisch („targeted therapy“) genutzt werden können. Insbesondere in Hinblick auf das Prostatakarzinom wird dem *ERG*-Rearrangement dabei eine Schlüsselrolle zugeschrieben. Zahlreiche Studien beschäftigten sich bisher mit der klinischen Bedeutung dieser Genalteration. Eine mögliche Korrelation mit dem Krankheitsverlauf oder eine etwaige therapeutische Nutzung ist aber bisher kontrovers diskutiert, auch wenn es vielversprechende Studien gibt, welche insbesondere die prognostische und diagnostische Bedeutung des *ERG*-Rearrangements im Prostatakarzinom konkretisieren.

Mit der Untersuchung von insgesamt 2294 Tumorgewebsproben verschiedenster Tumorentitäten sind wir die Ersten, welche zeigen können, dass das *ERG*-Rearrangement abgesehen vom Prostatakarzinom nicht noch in anderen häufigen epithelialen und nicht-epithelialen Tumorentitäten vorkommt. Vor allem die große Häufigkeit (ca. 50%) dieser Genalteration im Prostatakarzinom unterstreicht eine mögliche Bedeutung bei der Onkogenese oder Progression der Krankheit. Obwohl das Auftreten von Genrearrangements mit ETS-Genen in anderen, aber seltenen Tumorentitäten wie etwa der AML oder dem Ewings-Sarkom (i.e. *EWS:ERG* und *FUS:ERG*) in einzelnen Fällen beobachtet wurde, unterstützen die Ergebnisse unserer Arbeit die Hypothese, dass die oben beschriebenen Mechanismen (i.e. *ERG*-Rearrangement durch Deletion, oder *ERG*-Rearrangement durch eine Insertion) und Formen (i.e. *TMPRSS2:ERG*, *SLC45A3:ERG*, and *NDRG1:ERG*) des *ERG*-Rearrangements spezifisch für das Prostatakarzinom sind. Für eine mögliche Nutzung des *ERG*-Rearrangements als Prostatakarzinom-Biomarker oder der Entwicklung einer „targeted therapy“ sind diese Erkenntnisse von großer Bedeutung. Durch die Analyse eines SNP-Datensatzes konnten wir die Resultate der FISH-Untersuchungen zusätzlich mit einer anderen Methode validieren. Ausschließlich im Prostatakarzinom fanden wir eine distinkte Deletion auf dem Chromosom 21 (21q22.3-3), welche in einer *TMPRSS2:ERG* Genfusion resultiert.

Der Grund für tumorspezifische Genalterationen, wie etwa dem *ERG*-Rearrangement, ist bisher allerdings nur unzureichend verstanden, obwohl sich viele

wissenschaftliche Arbeiten mit der Thematik beschäftigen. Einige von diesen liefern interessante Erklärungsmöglichkeiten. In einer Studie von Mani et al. konnte etwa gezeigt werden, dass in androgensensitiven Prostatakarzinomzellreihen nach radioaktiver Bestrahlung (stellvertretend für genverändernden Zellstress) *TMPRSS2:ERG* Genfusionen gehäuft auftreten. Da das Prostatakarzinom den einzigen bekannten androgensensitiven Tumor darstellt, können Ergebnisse dieser Studie dabei helfen, die tumorspezifischen, teils interchromosomalen Geninteraktionen (z.B. *ERG*-Rearrangement durch Insertion) besser nachzuvollziehen. Allerdings ist das Erfassen von chromosomalen Interaktionen bisher nur schwer möglich. Lieberman-Aiden et al. haben zuletzt eine Methode beschrieben, mit der es möglich ist, chromosomale Interaktionen zu visualisieren. Mithilfe dieser Technik könnte es in Zukunft möglich sein, die Entstehung und Dynamik tumorspezifischer Genveränderung besser zu charakterisieren.

## **Schlussfolgerungen**

Zusammenfassend sind wir die Ersten, welche eine Vielzahl verschiedenster Tumorentitäten auf das *ERG*-Rearrangement hin untersuchten. Wir fanden heraus, dass die Mechanismen, welche z.B. zur *TMPRSS2:ERG* Genfusion führen, prostatakarzinom-spezifische Ereignisse darstellen. Ein mögliches, vereinzelter Auftreten von *ERG*-Rearrangements in den untersuchten, vom Prostatakarzinom abgrenzbaren Tumorentitäten ist möglich, aufgrund der hohen untersuchten Fallzahl aber praktisch ausgeschlossen. Erkenntnisse aus dieser Studie haben das Potential, die molekularen Eigenheiten des Prostatakarzinoms besser zu verstehen und bieten eine wichtige Grundlage für die zukünftige klinische Anwendung des *ERG*-Rearrangements. Das *ERG*-Rearrangement ist zudem, aufgrund seiner hohen Spezifität, ein aussichtsreicher Kandidat für moderne therapeutische Verfahren, wie z.B. „Targeted Drugs“. Auch für diagnostische Zwecke, z.B. bei Metastasen unklarer Genese hat das *ERG*-Rearrangement das Potential, sich als hochspezifischer histologischer Differenzierungsmarker zu etablieren. Mit einem jüngst vorgestelltem Test, der das *ERG*-Rearrangement Test im Urin eines Patienten nachweist, gibt es bereits konkrete Konzepte für eine künftige diagnostische Anwendung. Sein etwaiges Potential als therapeutisches Werkzeug in der Behandlung des Prostatakarzinoms muss allerdings noch weiter beleuchtet werden

**ERG rearrangement is specific to prostate cancer and does not occur in any other common tumor**

Veit J. Scheble<sup>1\*</sup>, Martin Braun<sup>1\*</sup>, Rameen Beroukhim<sup>9,10</sup>, Craig H. Mermel<sup>8,9</sup>, Christian Ruiz<sup>3</sup>, Theresia Wilbertz<sup>1</sup>, Ann-Cathrin Stiedl<sup>1</sup>, Karen Petersen<sup>1</sup>, Markus Reischl<sup>6</sup>, Rainer Kuefer<sup>7</sup>, David Schilling<sup>2</sup>, Falko Fend<sup>1</sup>, Glen Kristiansen<sup>4</sup>, Matthew Meyerson<sup>8,11</sup>, Mark A. Rubin<sup>5</sup>, Lukas Bubendorf<sup>3</sup>, Sven Perner<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Pathology and <sup>2</sup>Department of Urology; Comprehensive Cancer Center, University Hospital of Tuebingen, Tuebingen, Germany

<sup>3</sup>Department of Pathology; University Hospital Basel, Basel, Switzerland

<sup>4</sup>Institute of Surgical Pathology; University Hospital Zurich, Zurich, Switzerland

<sup>5</sup>Department of Pathology and Laboratory Medicine, Weill Cornell Medical College, New York, NY

<sup>6</sup>Institute for Applied Informatics, Research Center Karlsruhe

<sup>7</sup>Department of Urology, University Hospital of Ulm, Ulm, Germany

<sup>8</sup>Cancer Program, Medical and Population Genetics Group, The Broad Institute of M.I.T. and Harvard, Cambridge, MA

<sup>9</sup>Departments of Medical Oncology, Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA  
Departments of Medicine<sup>10</sup> and Pathology<sup>11</sup>, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA

\*These authors contributed equally to this study

Corresponding author:

Sven Perner, MD

Institute of Pathology

University Hospital Tuebingen

Liebermeisterstr. 8

D-72076 Tuebingen

[sven.perner@medizin.uni-tuebingen.de](mailto:sven.perner@medizin.uni-tuebingen.de)

Phone: +49 7071 29 84926

Fax: +49 7071 29 2258

**Acknowledgements:**

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

**Conflict of Interest**

The Brigham and Women's Hospital and the University of Michigan have filed a patent on ETS gene rearrangements in prostate cancer, on which S.P. and M.A.R. are co-inventors and the diagnostic field of use has been licensed to GenProbe Inc. GenProbe has not played a role in the design and conduct of the study, nor in the collection, analysis or interpretation of the data and no involvement in the preparation, review or approval of the manuscript.

**Abstract:**

Identification of specific somatic gene alterations is crucial for the insight into the development, progression, and clinical behavior of individual cancer types. The recently discovered recurrent *ERG* rearrangement in prostate cancer might represent a prostate cancer specific alteration that has not been systematically assessed in tumors other than prostate cancer. Aim of this study was to assess, whether the *ERG* rearrangement and the distinct deletion site between *TMPRSS2* and *ERG*, both predominantly resulting in a *TMPRSS2-ERG* fusion, occurs in tumors other than prostate cancer. We assessed 54 different tumor types (2942 samples in total) for their *ERG* rearrangement status by FISH. To calibrate, we analyzed 285 prostate cancer samples for the *ERG* rearrangement frequency. Additionally, we interrogated a high-resolution SNP data set across 3131 cancer specimens (26 tumor types) for copy number alterations. None of the 54 different tumor types assessed by FISH harbored an *ERG* rearrangement, whereas the prostate cancer samples revealed an *ERG* rearrangement in 49.5% of cases. Furthermore, within the 26 tumor types assessed for copy number alterations by SNP, the distinct deletion site between *TMPRSS2* and *ERG* (21q22.2-3) was detectable exclusively in prostate cancer. Although Ewing's sarcoma and AML have known rearrangements rarely involving *ERG*, we hypothesize that the *ERG* rearrangement as well as the distinct deletion site on 21q22.2-3 between *TMPRSS2* and *ERG*, are prostate cancer specific genomic alterations. These observations provide further insight into the oncogenesis of prostate cancer and might be critical for the development of *ERG* rearrangement assessment as a clinical tool.

**Running title:** *ERG* rearrangement in epithelial cancers

**Key words:** *ERG* rearrangement, prostate cancer, carcinoma



## **Introduction:**

Like other cancers, prostate cancer is driven by the acquisition of somatic genetic alterations resulting in oncogenesis. Among these, recurrent gene translocations have been supposed to be specific for hematological and mesenchymal malignancies (sarcomas) until recently.<sup>1</sup> Translocations have only been observed in rare subtypes of common epithelial malignancies (carcinomas) such as breast, thyroid, and renal.<sup>2, 3</sup> The recent discovery that the majority of prostate cancers harbor recurrent gene rearrangements suggests that translocations may occur more commonly than previously assumed in epithelial cancers.<sup>4</sup> The nature of recurrent gene rearrangements in prostate cancer involves androgen regulated 5' partners (e.g., *TMPRSS2*, *SLC45A3*, and *NDRG1*) and ETS genes (e.g., *ETV1*, *ETV4*, and *ETV5*), most commonly resulting in the *TMPRSS2-ERG* fusion.<sup>5</sup> Within this distinct subgroup of prostate cancer, the *TMPRSS2-ERG* fusion occurs through a deletion of the genomic material spanning from *TMPRSS2* to *ERG* in the majority of these cases.<sup>6, 7</sup> It is intriguing to note that ETS genes previously have been detected in translocations in Ewing's sarcoma, AML and breast cancer. In these tumors the most frequent ETS genes involved differ from prostate cancer. For example, in Ewing's sarcoma, the ETS gene *FLI1* is fused to *EWS* most commonly, while *EWS-ERG* fusions occur rarely.<sup>8</sup> Given the high frequency of prostate cancers harboring *ERG* rearrangement, we undertook a large survey of common tumors in order to exclude the possibility that any of these harbor the *ERG* rearrangement. Additionally, to identify prostate cancer specific somatic copy number alterations, we interrogated a recently published and publicly available high-resolution data set of somatic copy number alterations across 3131 cancer specimens, derived from 26 different histological types.<sup>9</sup>

## **Materials and methods:**

### Samples:

We assessed 54 different tumor types (2942 tumor samples in total) for their *ERG* rearrangement status using an *ERG* break-apart FISH assay as previously described.<sup>4,6, 10</sup> This assay can differentiate between the structural *ERG* rearrangement (i.e., *ERG* rearrangement through insertion) and the distinct deletion on 21q22.2-3 associated with the *ERG* rearrangement (i.e., *ERG* rearrangement through deletion), both most commonly resulting in a fusion with *TMPRSS2*.<sup>6</sup> 2261 cases were assessable. These included 131 breast carcinomas, 36 colon carcinomas, 111 colon adenomas, 120 non-small cell lung carcinomas, 32 small cell lung cancers, 94 urinary bladder carcinomas, 85 kidney carcinomas, 77 thyroid carcinomas, 74 ovarian carcinomas, 68 endometrial carcinomas, 63 Non-Hodgkin Lymphomas, 60 malignant melanomas, 59 basal cell carcinomas, 58 hepatocellular carcinomas, 48 stomach carcinomas, 45 seminomas, 44 Schwann cell tumors, 44 non-seminomatous testicular carcinomas, 42 uterine leiomyomata, 41 pleomorphic adenomas of the salivary glands, 41 leiomyosarcomas, 40 oral cavity carcinomas, 40 meningiomas, 40 astrocytomas, 38 renal oncocytomas, 38 glioblastomas, 37 pancreatic carcinomas, 36 esophagus carcinomas, 36 Hodgkin-lymphomas, 34 parathyroideal adenomas, 34 thymomas, 33 gallbladder carcinomas, 33 nevi, 33 carcinoid tumors, 32 neurofibromas, 31 laryngeal carcinomas, 29 thyroid adenomas, 29 malignant fibrous histiocytoomas, 27 hemangiomas, 25 squamous cell skin cancers, 25 salivary gland cylindromas, 24 benign histiocytoomas, 21 pheochromocytoomas, 21 tendon sheath giant cell tumours, 21 liposarcomas, 19 mesotheliomas, 19 vulvar carcinomas, 19 oligodendrogliomas, 18 salivary gland adenolymphomas, 15 duodenal carcinomas, 13 benign skin tumours (NOS), 12

adrenal adenomas, 8 Kaposi's sarcomas and 8 paragangliomas. All patients were diagnosed at the University Hospital of Basel, Switzerland. Of these samples, six tissue micro arrays were constructed with one core per case with a diameter of 0.6 mm.

To calibrate the frequency of *ERG* rearrangement prostate cancer, we assessed a well-defined cohort using a break-apart FISH assay. The cohort contains tumor material from 109 consecutive partially PSA-screened patients who underwent prostatectomy. Two cores were taken from the index tumor focus from the peripheral zone of each patient sample. Patients were treated at the University Hospital of Tuebingen.

#### Tissue micro array construction:

Formalin-fixed paraffin-embedded prostate cancer specimen were cut in 4 µm thick sections, mounted on slides and stained with hematoxylin and eosin. Subsequently, the cancer region was marked. The cores, each 0.6 mm in diameter, were taken from the corresponding donor block and placed into a tissue micro array recipient block using a semiautomatic tissue arrayer (Beecher Instruments, Sun Prairie, WI, USA). 4 µm thick tissue sections were placed onto superfrost slides.

#### Fluorescence in-situ hybridization:

We used a fluorescence in-situ hybridization (FISH) assay to detect the *ERG* rearrangement at the chromosomal level on formalin-fixed paraffin-embedded specimen. Hence, we performed a split-signal-approach, with two probes spanning the *ERG* locus as described earlier.<sup>4, 6</sup> Deparaffinized sections were pre-treated with a 100 mM Tris and 50 mM EDTA solution at 92.8C° for 15 min. and digested with Digest-All III (dilution 1:2) at 37°C for 22 min.; *ERG* FISH probes were denatured at

73°C for 5 min. and immediately placed on ice. Subsequently, the tissue sections and *ERG* FISH probes were co-denatured at 94°C for 3 min. and hybridised overnight at 37°C. We used BAC clones RP11-24A11 for centromeric labelling with biotin and RP11-372O17 for telomeric labelling with digoxigenin. Posthybridisation washing was done with 2x SSC at 75°C for 7 min., and the fluorescence detection was carried out using streptavidin-Alexa-594 conjugates (dilution 1:200) and anti-digoxigenin-FITC (dilution 1:200). Slides were then counterstained with 4',6-Diamidin-2' phenylindoldihydrochlorid (DAPI) and mounted.

The samples were analysed under an 63x oil immersion objective using a fluorescence microscope (Zeiss, Jena, Germany) equipped with appropriate filters, a charge-coupled device camera and the FISH imaging and capturing software Metafer 4 (Metasystems, Altlussheim, Germany). All cases were independently assessed by three experienced evaluators (M.B., V.S., and S.P.) At least 100 nuclei per case were evaluated.

This FISH assay allows for *ERG* rearrangement status (i.e. rearrangement versus no rearrangement of *ERG*) assessment. The assay is also capable of differentiating between two different mechanisms of *ERG* rearrangement.<sup>6</sup> These two mechanisms are *ERG* rearrangement through insertion and *ERG* rearrangement through deletion of DNA between *TMPRSS2* and *ERG* loci (interstitial deletion). A nucleus without an *ERG* rearrangement demonstrates two pairs of juxtaposed red and green signals (mostly forming 2 yellow signals). A nucleus with an *ERG* rearrangement through insertion shows the split of a signal pair resulting in a single red and single green signal for the rearranged *ERG* allele and a still juxtaposed (yellow) signal pair for the non-rearranged *ERG* allele in each nucleus. A nucleus with an *ERG* rearrangement through deletion shows one juxtaposed red-green signal pair (yellow) for the non-rearranged allele and a single red signal for the allele involved in the rearrangement.

### Analysis of somatic copy number alterations:

Beroukhim et al. published a publicly available high-resolution SNP data set of somatic copy number profiles across 3131 cancer specimens.<sup>9</sup> We obtained average copy-number profiles from 26 cancer types, including prostate cancer, each represented from at least 20 and up to 734 cancer specimens. Seventeen cancer types are represented by at least 40 specimens. 2,520 profiles were obtained from tissue specimens and 611 were obtained from cancer cell lines or short-term cultures. All copy number estimates were obtained using a single nucleotide polymorphism (SNP) array (Affymetrix 250K Sty). Signal intensities from each cancer specimen were compared to SNP data obtained from 1480 specimens of normal tissue to identify regions of somatically generated copy number alterations. The raw data of this study were obtained from [www.broadinstitute.org/tumorscape](http://www.broadinstitute.org/tumorscape).

### **Results:**

By assessing 2942 tumor samples of 54 different common tumors for their *ERG*-rearrangement status using our *ERG* break-apart FISH assay, we could demonstrate that none of the 2261 assessable epithelial and non-epithelial tumors other than prostate cancer harbored a rearrangement of the *ERG* locus. For a detailed breakdown of the individual tumor entities assessed for the *ERG* rearrangement see **Table 1**.

For calibration of the *ERG* rearrangement frequency we assessed a well-defined prostate cancer cohort by the same *ERG* break-apart FISH assay. We observed a frequency of the *ERG* rearrangement in 54/109 (49.5%) of cases in the partially PSA-screened prostatectomy cohort. Of these, 40/54 (74.1%) harbored the *ERG*

rearrangement through deletion, whereas 14/54 (25.9%) harbored the *ERG* rearrangement through insertion.

The *ERG* break-apart FISH assay is capable of differentiating between the structural *ERG* rearrangement (i.e. *ERG* rearrangement through insertion) and the distinct numerical 21q22.2-3 alteration associated with the *ERG* rearrangement (i.e. *ERG* rearrangement through deletion). As indicated above, the *ERG* rearrangement through deletion is the prevalent mechanism in our prostate cancer cohort (i.e. 40 cases with *ERG* rearrangement through deletion versus 14 cases with *ERG* rearrangement through insertion). To determine if the distinct deletion site between *TMPRSS2* and *ERG* is specific to prostate cancer, we examined copy-number profiles from 3,131 cancers across multiple cancer types.<sup>9</sup> Interestingly, we only observed the distinct deletion site between *TMPRSS2* and *ERG* in prostate cancer but in none of the other interrogated tumor types. A summary of these data can be seen in **Figure 1**, which displays the average copy-number profiles on chromosome 21q for each of the 26 cancer types represented by at least 20 specimens.

In independent tumor samples, a significant subset of tumor entities was both assessed for the *ERG* rearrangement status by the break-apart FISH assay and for copy number alterations by SNP analysis. As expected, we found losses and gains of the FISH signals at different levels in subsets of the tumors highly corresponding to the copy number assessments by SNP analysis (data not shown). To emphasize, FISH signal patterns specific to *ERG* rearrangement through deletion or *ERG* rearrangement through insertion only appeared in prostate cancer samples.

## **Discussion:**

Important implications for the diagnosis, prediction, prognosis, and development of therapeutic targets in cancers can be obtained from systemic efforts to identify somatic genetic alterations. Of these, cancer type specific alterations are most promising. Surprisingly, the recurrent *ERG* gene rearrangement was recently discovered in the majority of prostate cancers.<sup>5, 6, 11-22</sup> By assessing 2295 samples comprising a broad spectrum of tumor entities, we were the first to prove that the *ERG* rearrangement does not occur in other common epithelial and non-epithelial tumors. Although Ewing's sarcoma and AML have known rearrangements sporadically involving *ERG* (i.e. *EWS-ERG* and *FUS-ERG*, respectively), the current finding supports the hypothesis that the mentioned mechanisms of *ERG* rearrangement are specific to prostate cancer. These findings are essential for the application of *ERG* rearrangement as a clinical marker and might have further implications for the development of targeted therapies. In addition, by interrogating the Beroukhim data set of somatic copy number profiles across 3131 cancer specimens, we found that the distinct deletion site on 21q22.2-3 spanning from *TMPRSS2* to *ERG* is a copy number alteration specific to prostate cancer and is not shared by other human cancers.<sup>9</sup> Furthermore, we could verify that the distinct numerical 21q22.2-3 alteration associated with the *ERG* rearrangement (i.e. *ERG* rearrangement through deletion) is the prevalent mechanism resulting in the *TMPRSS2-ERG* gene fusion in prostate cancer.<sup>6, 7</sup> It is of particular interest that this specific deletion most frequently results in the *TMPRSS2-ERG* fusion. Beroukhim et al. compared the significant somatic copy number alterations in each of the individual cancer types to the remaining samples and found that the majority of somatic copy number alterations is shared by different cancers. This indicates that the major

genomic alterations on 21q22.2-3, i.e. the *ERG* rearrangement and the distinct deletion site spanning from *TMPRSS2* to *ERG*, both resulting in the *TMPRSS2-ERG* gene fusion, are specific to prostate cancer. Of note, in our previous study, we could identify significantly down-regulated genes with tumor suppressor potential located in the area of the distinct deletion site on 21q22.2-3.<sup>6</sup> The additional loss of these genes might have important biological and clinical effects specific to prostate cancer.

Until now, the reason for the occurrence of cancer type specific gene fusions is largely unknown. Recently, Mani et al. could provide evidence that androgen stimulation causes a physical approximation of *TMPRSS2* and *ERG* in androgen sensitive prostate cancer cell lines. Subsequent irradiation - representing a DNA-double-strand-breaking event - resulted in accumulated *TMPRSS2-ERG* fusions. Since prostate cancer is the only androgen sensitive malignancy, these findings could help to better understand why the *TMPRSS2-ERG* gene fusion is a prostate cancer specific genomic alteration.<sup>23</sup> In this context it is worth mentioning that complex interactions between chromosomes and folding patterns represent a broad field that is poorly elucidated. Lieberman-Aiden et al. described a method that allows identification and visualisation of chromatin interactions across a whole genome. Using this technique, complex relationships between chromatin structure, gene activity, and the functional state of the cell might be assessed in cancers with specific genomic alterations. Thus new aspects of the genesis of genomic alterations might be provided.<sup>24</sup>

In summary, we were the first to assess a large collection of common epithelial and non-epithelial tumors and found that the distinct genomic alterations on 21q22.2-3, i.e. the *ERG* rearrangement and the deletion site spanning from *TMPRSS2* to *ERG*, both resulting in the *TMPRSS2-ERG* gene fusion, are specific to prostate cancer and do not occur in any other common tumor. Despite the broad spectrum of tumors and



the large number of cases for each tumor entity we evaluated, a sporadic appearance of the *ERG* rearrangement in rare tumors not assessed by us or in an extremely low frequency in the assessed tumor entities can not be excluded.

We believe that a genetic alteration which is specific to malignant cells might be targeted by modern therapies. In recent studies by Wang et al. and Sun et al., a knockdown of TMPRSS-ERG in fusion positive cells has been shown to inhibit tumor growth in xenograft assays.<sup>25, 26</sup> Additionally, since the *ERG* rearrangement is assumed to drive prostate cancer development through downstream target genes, downstream genes might be promising candidates for new therapeutic strategies.<sup>5</sup>

Furthermore, the *ERG* rearrangement might gain relevance in diagnostic utilization as this alteration can be detected in urine samples and biopsies. Confirming prostate cancer by the detection of the prostate cancer-specific *ERG* rearrangement can be helpful in malignancies of unknown primary like bone metastasis or small cell cancers of unclear origin.<sup>27</sup> In these cases, early therapy can dramatically slow down the progress of the disease. The diagnostic step forward is already concrete, therapeutic impact in terms of rational therapy has to be investigated.

## References:

1. Mitelman F, Johansson B, Mertens F. The impact of translocations and gene fusions on cancer causation. *Nat Rev Cancer* 2007; 7(4):233-45.
2. Teixeira MR. Recurrent fusion oncogenes in carcinomas. *Crit Rev Oncog* 2006; 12(3-4):257-71.
3. Letessier A, Ginestier C, Charafe-Jauffret E, *et al.* ETV6 gene rearrangements in invasive breast carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2005; 44(1):103-8.
4. Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, *et al.* Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science* 2005; 310(5748):644-8.
5. Tomlins SA, Bjartell A, Chinnaiyan AM, *et al.* ETS gene fusions in prostate cancer: from discovery to daily clinical practice. *Eur Urol* 2009; 56(2):275-86.
6. Perner S, Demichelis F, Beroukhim R, *et al.* TMPRSS2:ERG fusion-associated deletions provide insight into the heterogeneity of prostate cancer. *Cancer Res* 2006; 66(17):8337-41.
7. Liu W, Chang B, Sauvageot J, *et al.* Comprehensive assessment of DNA copy number alterations in human prostate cancers using Affymetrix 100K SNP mapping array. *Genes Chromosomes Cancer* 2006; 45(11):1018-32.
8. Burchill SA. Molecular abnormalities in Ewing's sarcoma. *Expert Rev Anticancer Ther* 2008; 8(10):1675-87.
9. Beroukhim R, Mermel CH, Porter D, *et al.* The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature* 463(7283):899-905.
10. Perner S, Wagner PL, Demichelis F, *et al.* EML4-ALK fusion lung cancer: a rare acquired event. *Neoplasia* 2008; 10(3):298-302.
11. Clark J, Attard G, Jhavar S, *et al.* Complex patterns of ETS gene alteration arise during cancer development in the human prostate. *Oncogene* 2008; 27(14):1993-2003.
12. Kumar-Sinha C, Tomlins SA, Chinnaiyan AM. Recurrent gene fusions in prostate cancer. *Nat Rev Cancer* 2008; 8(7):497-511.
13. Iljin K, Wolf M, Edgren H, *et al.* TMPRSS2 fusions with oncogenic ETS factors in prostate cancer involve unbalanced genomic rearrangements and are associated with HDAC1 and epigenetic reprogramming. *Cancer Res* 2006; 66(21):10242-6.

14. Mehra R, Han B, Tomlins SA, *et al.* Heterogeneity of TMPRSS2 gene rearrangements in multifocal prostate adenocarcinoma: molecular evidence for an independent group of diseases. *Cancer Res* 2007; 67(17):7991-5.
15. Cerveira N, Ribeiro FR, Peixoto A, *et al.* TMPRSS2-ERG gene fusion causing ERG overexpression precedes chromosome copy number changes in prostate carcinomas and paired HGPIN lesions. *Neoplasia* 2006; 8(10):826-32.
16. Nam RK, Sugar L, Yang W, *et al.* Expression of the TMPRSS2:ERG fusion gene predicts cancer recurrence after surgery for localised prostate cancer. *Br J Cancer* 2007; 97(12):1690-5.
17. Perner S, Mosquera JM, Demichelis F, *et al.* TMPRSS2-ERG fusion prostate cancer: an early molecular event associated with invasion. *Am J Surg Pathol* 2007; 31(6):882-8.
18. Soller MJ, Isaksson M, Elfving P, *et al.* Confirmation of the high frequency of the TMPRSS2/ERG fusion gene in prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2006; 45(7):717-9.
19. Wang J, Cai Y, Ren C, Ittmann M. Expression of variant TMPRSS2/ERG fusion messenger RNAs is associated with aggressive prostate cancer. *Cancer Res* 2006; 66(17):8347-51.
20. Yoshimoto M, Joshua AM, Chilton-Macneill S, *et al.* Three-color FISH analysis of TMPRSS2/ERG fusions in prostate cancer indicates that genomic microdeletion of chromosome 21 is associated with rearrangement. *Neoplasia* 2006; 8(6):465-9.
21. Mosquera JM, Mehra R, Regan MM, *et al.* Prevalence of TMPRSS2-ERG fusion prostate cancer among men undergoing prostate biopsy in the United States. *Clin Cancer Res* 2009; 15(14):4706-11.
22. Clark JP, Cooper CS. ETS gene fusions in prostate cancer. *Nat Rev Urol* 2009; 6(8):429-39.
23. Mani RS, Tomlins SA, Callahan K, *et al.* Induced chromosomal proximity and gene fusions in prostate cancer. *Science* 2009; 326(5957):1230.
24. Lieberman-Aiden E, van Berkum NL, Williams L, *et al.* Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome. *Science* 2009; 326(5950):289-93.
25. Wang J, Cai Y, Yu W, *et al.* Pleiotropic biological activities of alternatively spliced TMPRSS2/ERG fusion gene transcripts. *Cancer Res* 2008; 68(20):8516-24.
26. Sun C, Dobi A, Mohamed A, *et al.* TMPRSS2-ERG fusion, a common genomic alteration in prostate cancer activates C-MYC and abrogates prostate epithelial differentiation. *Oncogene* 2008; 27(40):5348-53.

27. Scheble V, Braun M, Wilbertz T, *et al.* *ERG* rearrangement in small cell lung and prostate cancer. *Histopathology* 2010: in press.

**Figure Legend:**

**Figure 1:**

Average copy number changes across chromosome 21q for 26 different cancer types. Each cancer type (arranged along the x-axis) represents average log<sub>2</sub> ratios from SNP array data obtained from at least 20 and up to 734 cancer specimens. Only prostate cancer exhibits characteristic deletions between *ERG* and *TMPRSS2*.

**Table 1****ERG rearrangement status assessment by FISH on different tumors types**

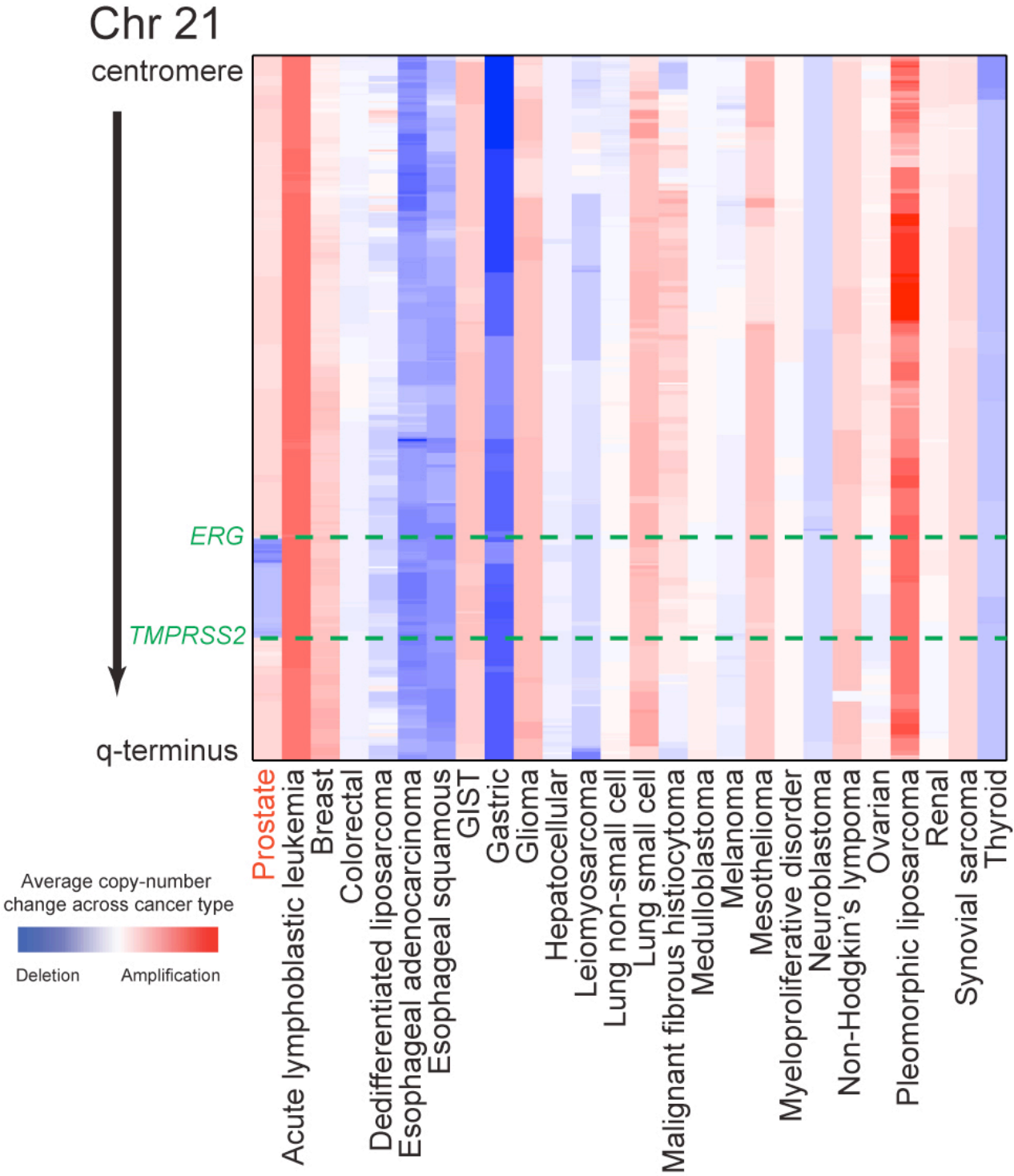
<b>tumor type</b>	<b>no. of cases</b>	<b>assessable cases</b>	<b>ERG rearrangement status</b>	
			<b>positive</b>	<b>negative</b>
Non-small cell lung carcinomas	159	120	0	120
Small cell lung carcinomas	49	32	0	32
Breast carcinomas	190	131	0	131
Colon adenomas	143	111	0	111
Urinary bladder carcinomas	115	94	0	94
Kidney carcinoma	107	85	0	85
Thyroid carcinomas	92	77	0	77
Ovarian carcinomas	111	74	0	74
Endometrium carcinomas	81	68	0	68
Non-Hodgkin lymphomas	66	63	0	63
Malignant melanomas	78	60	0	60
Basaliomas	73	59	0	59
Hepatocellular carcinomas	97	58	0	58
Stomach carcinomas	76	48	0	48
Seminomas	49	45	0	45
Schwannomas	49	44	0	44

Non-seminomatous testicular carcinomas	48	44	0	44
Myometrial myomas	57	42	0	42
Pleomorphic adenomas of the salivary gland	49	41	0	41
Leiomyosarcomas	47	41	0	41
Oral cavity carcinomas	49	40	0	40
Meningeomas	48	40	0	40
Astrocytomas	48	40	0	40
Renal oncocytomas	48	38	0	38
Glioblastomas	44	38	0	38
Pancreatic carcinomas	49	37	0	37
Colon carcinomas	49	36	0	36
Esophagus carcinomas	43	36	0	36
Hodgkin lymphomas	42	36	0	36
Parathyroideal adenomas	43	34	0	34
Thymomas	37	34	0	34
Gallbladder carcinomas	45	33	0	33
Nevi	44	33	0	33
Carcinoids	37	33	0	33
Neurofibromas	41	32	0	32
Larynx carcinomas	57	31	0	31
Thyroid adenomas	39	29	0	29
Malignant fibrocytic histiocytomas	30	29	0	29
Hemangiomas	34	27	0	27

Spinaliomas	38	25	0	25
Salivary gland cylindroma	32	25	0	25
Benign histiocytomas	28	24	0	24
Pheochromocytomas	28	21	0	21
Tendon sheath giant cell tumours	28	21	0	21
Liposarcomas	28	21	0	21
Mesotheliomas	31	19	0	19
Vulvar carcinomas	28	19	0	19
Oligodendrogliomas	25	19	0	19
Salivary gland adenolymphomas	25	18	0	18
Duodenal carcinomas	22	15	0	15
Benign skin tumours	19	13	0	13
Adrenal adenomas	14	12	0	12
Kaposi's sarcomas	25	8	0	8
Paragangliomas	8	8	0	8



**Figure 1**



## Danksagung:

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Sven Perner für die Überlassung des Themas und seine ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung danken. Sein stets konstruktiver und inspirierender Rat hat maßgeblich zur Erstellung dieser Arbeit beigetragen. Über die Promotionsarbeit hinaus stand und steht er mir in zahlreichen wissenschaftlichen Projekten als Mentor zur Seite und weckte mein Interesse für das wissenschaftliche Arbeiten. Besonderer Dank gilt auch Prof. Dr. med. Lukas Bubendorf für die Bereitstellung seiner Multitumor-Kohorte.

Außerdem danke ich Veit Scheble, dafür dass er mich umfassend in die FISH-Diagnostik eingelernt hat und bei Fragen immer zur Verfügung stand. Mein Dank gilt auch Karen Petersen, welcher als Medizinisch-technischer Assistentin bei der Durchführung der molekularen Experimente eine Schlüsselrolle zukam.

Ich danke außerdem den Co-Autoren des Manuskripts, Dr. Rameen Beroukhim, Craig H. Mermel, Dr. med. Christian Ruiz, Theresia Wilbertz, Ann-Cathrin Stiedl, Dr. Markus Reischl, Prof. Dr. med. Rainer Küfer, Dr. med. David Schilling, Prof. Dr. med. Falko Fend, Prof. Dr. med. Glen Kristiansen, Prof. Dr. med. Matthew Meyerson, Prof. Dr. med. Mark A. Rubin für ihre tatkräftige Unterstützung. Sie haben maßgeblich zur Erstellung des Manuskripts beigetragen, ohne sie wären die Durchführung des Projektes und eine Veröffentlichung der Arbeit nicht möglich gewesen.

Danken möchte ich auch meinen Eltern Volker und Sabine Braun sowie meinem Bruder Falko Braun. Sie alle standen mir während meines langen Weges unterstützend zur Seite und schenkten mir stets ein aufmerksames Ohr.