Aus dem Institut für Tumorbiologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf Direktor: Prof. Dr. med. Klaus Pantel

Vergleich genomischer Analysen von Primärtumorgewebe und zirkulierender extrazellulärer DNA in Blut und Knochenmark in Relation zur Tumorzelldisseminierung beim Mamma- und Prostatakarzinom

> Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

> > vorgelegt von Miriam Gottberg Hamburg, 2009

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 08.06.2010 Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg Prüfungsausschus, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. med. Klaus Pantel Prüfungsausschuss, 1. Gutachter/in: Prof. Dr. med. Udo Schumacher Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: PD Dr. med. Volkmar Müller

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	7
1. EINLEITUNG	9
1.1 Epitheliale Tumore	9
1.2 Das Mammakarzinom	9
1.2.1 Epidemiologie	10
1.2.2 Ätiologie und Pathogenese	10
1.2.3 Histopathologische Einteilung	11
1.2.4 Stadieneinteilung	11
1.2.6 Rezeptorstatus	12
1.2.7 Tumormarker	13
1.3 Das Prostatakarzinom	14
1.3.1 Epidemiologie	14
1.3.2 Ätiologie und Pathogenese	14
1.3.3 Diagnostik 1.3.4 Histopathologische Einteilung	15
1.3.5 Stadieneinteilung	16
1.3.6 Tumormarker	18
1.4 Molekulargenetik von Tumoren	18
1.4.1 Zirkulierende Nukleinsäuren	18
1.4.2 Tumorsuppressorgene und Onkogene	19
1.5 Wahl der Mikrosatellitenmarker für die Mammakarzinom-Analysen	19
1.6 Wahl der Mikrosatellitenmarker für die Prostatakarzinom-Analysen	21
1.7 Mikrosatelliten-Längen-Polymorphismus und Mikrosatelliteninstabilität	22
1.8 LOH-Analysen im Tumor, Blut und Knochenmark	23
1.9 Metastasierungskaskade epithelialer Tumore	24
1.10 Metastasierung des Mammakarzinoms und des Prostatakarzinoms	26
1.11 Zirkulierende Tumorzellen im Blut und disseminierte Tumorzellen im Knochenmark von Patienten mit epithelialen Tumoren	27
1.11.1 Tumorzellen in Blut und Knochenmark als Prognosefaktor und entscheidendes	
Kriterium für Therapieplanung und -monitoring	27
1.11.2 Bedeulung der Zirkunerenden Tumorzeilen im peripheren Blut	29 30
1.11.4 Genetische und phänotypische Analysen des Primärtumors und der zirkulierenden	50
und disseminierten Tumorzellen	31
2. ARBEITSHYPOTHESE UND FRAGESTELLUNG	32
2.1 LOH-Analysen in Blut und Knochenmark von Patientinnen mit Mammakarzinom und Patienten mit Prostatakarzinom	32
2.2 Detektion zirkulierender und disseminierter Tumorzellen in Blut und Knochenmark von Patientinnen mit Mammakarzinom und Patienten mit Prostatakarzinom	33
3. PATIENTENKOLLEKTIVE UND MATERIAL	35
3.1 Patientenkollektive (Mamma- und Prostatakarzinompatienten) und Gewebeproben (Blut, Knochenmark und Tumorgewebe)	35
3.1.1 Einteilung der Patientenkollektive und Gewebeproben	35
 3.2 Aufarbeitung von Blut und Knochenmark f ür den immunzytochemischen Nachweis disseminierter Tumorzellen 	36
3.3 Nachweis disseminierter Tumorzellen mit der Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische	50
Phosphatase (APAAP-) Methode	36

3.4 Materialien für die DNA-Analyse der Blut-, Knochenmark- und Tumorproben	37
3.5 Puffer und Lösungen	38
3.6 Kits	39
3.7 PCR-Primer	40
3.7.1 Fluoreszenzmarkierte PCR-Primer f ür die Analysen der Mammakarzinom-Proben3.7.2 Fluoreszenzmarkierte PCR-Primer f ür die Analysen der Prostatakarzinom-Proben	40 40
4. METHODEN	42
4.1 Knochenmark- und Blutzytologie- Aufbereitung und Anreicherung mononukleärer Zellen.	42
4.1.1 Gewinnung und Aufbereitung der Gewebeproben und Herstellung der Zytospins 4.1.2 Immunzytochemische Detektion disseminierter Tumorzellen	42 43
4.2 Genanalyse der Blut-, Knochenmark- und Tumorproben	45
4.2.1 Gewinnung von Plasma aus den Blut- und Knochenmark-Proben und Isolierung der Leukozyten	45
4.2.2 Isolierung zirkulierender DNA aus dem Blut- und KM-Plasma und Isolierung der DN aus dem Tumorgewebe	15 A 45
4.2.3 Isolierung der genomischen DNA aus den Leukozyten	46
4.2.4 Spektrometrische Quantitätsbestimmung der genomischen DNA	46
4.2.5 Qualitätsbestimmung der genomischen DNA	47
4.2.6 PCR zur Detektion genetischer Alterationen mit nicht-fluoreszenzmarkierten Primern	47
4.2.7 Bestimmung der spezifischen Anneaningtemperatur nitt der Grädienten-PCK	49 49
4.2.9 PCR mit fluoreszenzmarkierten Primern	51
5. ERGEBNISSE	
5.1 Einteilung der Mammakarzinom Patientinnen und Prostatakarzinom Patienten in Kollektiv	
5.2 Statistische Methodik	55
5.2 DNA Establishe und Quantifisierung - Karalation der Kanzentation frei im Diet	55
5.5 DINA-EXtraction und Quantilizierung - Korrelation der Konzentration frei im Blut zirkulierender DNA mit den Prognosenarametern	56
5.6 DNA-Anglysen zum Nachweis genetischer Alterationen	50 60
5.6 1 LOH Analysed der Blut, und KM DNA von Drostatakarzinom Patienten durch die	00
Gelektrophorese	61
5.6.1 Bestimmung der optimalen Annealingtemperatur der Primerpaare	62
5.6.3 LOH-Analyse der Blut-, Knochenmark- und Tumor-DNA von Mammakarzinom-	
Patientinnen und Prostatakarzinom-Patienten durch die Kapillarelektrophorese	64
5.6.4 Korrelation des Auftretens von LOH mit den Prognoseparametern bei	
Mammakarzinom-Patientinnen	66
Prostatakarzinom-Patienten	69
5.7 Immunzytochemischer Nachweis von Tumorzellen in Blut und Knochenmerk von	07
Mammakarzinom-Patientinnen und Prostatakarzinom-Patienten	73
5.7.1 Korrelation des Auftretens von Tumorzellen beim Mammakarzinom und	70
Prostatakarzinom	74
5.7.2 Korrelation des Auftretens von Tumorzellen in Blut und Knochenmark der	
Mammakarzinom-Patientinnen mit den Prognosekriterien	74
5.7.3 Korrelation des Auftretens von Tumorzellen im Blut und Knochenmark der	
Prostatakarzinom-Patienten mit den Prognosekriterien	77

6. DISKUSSION	79
6.1 DNA-Konzentrationen bei Mammakarzinom-Patientinnen und Prostatakarzinom-Patienten	79
 6.1.1 Höhere durchschnittliche DNA-Konzentrationen im Blut von Mammakarzinom- Patientinnen als im Blut von Prostatakarzinom-Patienten 6.1.2 Höhere durchschnittliche DNA-Konzentrationen bei Patientinnen mit nodal metastasiertem Mammakarzinom als bei Patientinnen ohne Lymphknotenmetastasen 	79 80
6.2 LOH-Analysen in Blut, Knochenmark und Tumorgewebe von Mammakarzinom- Patientinnen und Prostatakarzinom-Patienten	80
 6.2.1 LOH-Frequenz in Blut und Knochenmark von Mammakarzinom-Patientinnen und Prostatakarzinom-Patienten 6.2.2 Höhere LOH-Frequenz im Knochenmark als im Blut von Prostatakarzinom-Patienten 6.2.3 Limitationen der Detektion von LOH 	80 84 85
6.3 Detektion zirkulierender Tumorzellen im Blut und disseminierter Tumorzellen im Knochenmark von Mammakarzinom-Patientinnen und Prostatakarzinom-Patienten	86
6.3.1 Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Tumorzellen und dem Nodalstatus6.3.2 Höhere Entdeckungsrate von Tumorzellen im Knochenmark als im Blut6.3.3 Können Tumorzell-Analysen im Knochenmark durch Analysen im Blut ersetzt werden?	86 87 88
6.4 Zusammenhang zwischen der LOH-Frequenz und dem Auftreten von Tumorzellen in Blut und Knochenmark	89
7. SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSBLICK	91
8. ZUSAMMENFASSUNG	92
9. LITERATURVERZEICHNIS	94
10. DANKSAGUNG 1	11
11. LEBENSLAUF	12
ERKLÄRUNG 1	14

Abkürzungsverzeichnis

Sofern es keine deutsche Entsprechung gab, wurde auf die in der Literatur geläufige lateinische oder englische Version zurückgegriffen. In Klammern befindet sich die deutsche Übersetzung.

Abb.	Abbildung	
AP	Alkalische Phosphatase	
APAAP	Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase	
APS	Ammoniumpersulfat, $(NH_4)_2S_2O_2$	
bp	Basenpaare	
BRCA	Breast cancer gene (Brustkrebsgen)	
СК	Zytokeratin	
CGH	Komparative genomische Hybridisierungen	
CTC	Zirkulierende Tumorzellen	
dATP	Deoxyadenosintriphosphat	
DCIS	Carcinoma ductale in situ	
DNA	Deoxynukleinsäure	
DTC	Disseminierte Tumorzellen	
ER	Östrogenrezeptor	
FDA	US Food and Drug Administration	
gDNA	genomische DNA	
H/E	Hämatoxylin/Eosin	
Kap.	Kapitel	
KM	Knochenmark	
L	Leukozyten	
LB	Loading buffer (Ladepuffer)	
LCIS	Carcinoma lobulare in situ	
LK	Lymphknoten	
LOH	Loss of Heterozygozity (Verlust an Heterozygotie)	
Μ	Marker	
MaCa	Mammakarzinom	
min.	Minute	

MSI	Mikrosatelliteninstabilität
Р	Plasma
PA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCa	Prostatakarzinom
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PIC	Polymorphic Information Content
PNMT	Phenylethanolamin-N-Methyltransferase
PR	Progesteronrezeptor
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
rpm	Umdrehungen pro Minute (rotations per minute)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
S	Serum
s.	siehe
sek.	Sekunde
SNP	single nucleotide polymorphism (Einzelnukleotid-
	Polymorphismus)
Т	Tumor
TAG	tumorassoziiertes Glykoprotein-Antigen
TAK1	TGF ^B -aktivierende Kinase
TBE	Tris-Borat-EDTA (Ethylendiamintetraacetat)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TMAC	Tetramethylammoniumchlorid
t-PSA	Gesamt-PSA, bestehend aus c-PSA (komplexiertes, an α 1-
	Antichymotrypsin oder α 2-Makroglobulin gebundenes, PSA)
	und f-PSA (freies, ungebundenes PSA)
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSG	Tumorsuppressorgen
TZ	Tumorzellen
UICC	Union Internationale Contre le Cancer

1. Einleitung

1.1 Epitheliale Tumore

Epitheliale Zellen entstehen während der Embryonalentwicklung aus Ektoderm und Entoderm (äußeres und inneres Keimblatt). Das Ektoderm bildet Epidermis, Sinneszellen, Gehirn, Rückenmark, Bindegewebe und Teile des Skeletts. Aus dem Entoderm entstehen Lunge, Darm, Leber und Pankreas. Das mittlere Keimblatt bildet das Mesoderm, aus dem Wirbelsäule, Muskulatur, Nieren, Gonaden und Blutgefäße entstehen. Bösartige epitheliale Tumore werden Karzinome, bösartige mesenchymale Tumore Sarkome genannt.

In der vorliegenden Arbeit werden die epithelialen Tumore der Mamma und der Prostata analysiert. Beide Tumorentitäten haben die gemeinsame Eigenschaft, dass sie in die Knochen metastasieren. Zudem sind sie jeweils die häufigsten Tumore bei Mann und Frau. Es soll der Frage nachgegangen werden, ob die Detektion von CTC (zirkulierende Tumorzellen) oder DTC (disseminierte Tumorzellen) und die Detektion genetischer Alterationen in Tumor, Blut und KM (Knochenmark) der Patientinnen und Patienten als Tool für eine effektive, sensible und sensitive Präventivdiagnostik hinsichtlich Diagnose, Progression, Tendenz zur Metastasierung, Therapie und postoperativem Monitoring Verwendung finden könnte. Außerdem wird der Zusammenhang zwischen der extrahierten tumorassoziierten DNA aus Blut, KM, sowie Tumorgewebe und von CTC und DTC mit den klinischen und klinischpathologischen Daten der Patientinnen und Patienten untersucht.

1.2 Das Mammakarzinom

Die beiden häufigsten Formen des Mammakarzinoms (MaCas) entstehen aus dem Epithel der Milchgänge (ca. 75 %) und der lobulären Endstücke (ca. 15 %). Das Carcinoma ductale in situ (DCIS) und das Carcinoma lobulare in situ (LCIS) sind die Basalmembran nicht überschreitende Veränderungen des Milchgangepithels bzw. der lobulären Endstücke ("Azini"). Bei Überschreiten der Balsalmembran spricht man vom invasiven duktalen bzw. invasiven lobulären Karzinom.

1.2.1 Epidemiologie

Das MaCa ist mit mehr als einer Million Krankheitsfällen und annähernd 600.000 Todesfällen jährlich die häufigste maligne Erkrankung der Frau (IARC, 2003). Jede 10. Frau erkrankt im Laufe ihres Lebens an einem MaCa. Das MaCa ist in Deutschland die häufigste Todesursache der Frau (Statistisches Bundesamt, 2007b). Das Haupterkrankungsalter liegt um das 65. Lebensjahr. In den westlichen Industrienationen tritt das MaCa etwa fünfmal häufiger auf, als in Asien oder Südamerika. Es ist nicht gesichert, wovon die epidemiologischen Unterschiede abhängen (Smid et al., 2006).

1.2.2 Ätiologie und Pathogenese



Abb. 1: Längsschnitt der Brustdrüse Bildquelle: www.brustkrebs-info.de

Der bedeutendste Risikofaktor für die Entstehung eines MaCas ist das Alter. Der Erkrankungsgipfel liegt zwischen dem 50. und 70. Lebensjahr (Schmidt-Matthiesen et al., 2002). Weitere Risikofaktoren sind genetische Prädisposition, wie das Auftreten von MaCa bei Verwandten ersten Grades, die Dauer der Östrogenexposition (frühe Menarche, späte Menopause, Nulliparität und späte Erstschwangerschaft), hoher Nahrungsfettgehalt und ein kontralaterales MaCa (Böcker, 2001; Kreienberg, 2002).

Die beiden TSG BRCA1 (breast cancer gene 1) auf Chromosom 17 (17q21) und

BRCA2 auf Chromosom 13 (13q12-13) spielen eine wichtige Rolle bei Diagnostik und Therapie des MaCa. Einzelheiten hierzu werden im Kapitel "Tumorsuppressorgene und Onkogene" (Kap. 1.4.2) erörtert.



1.2.3 Histopathologische Einteilung

Abb. 2: Darstellung der beiden häufigsten histopathologischen Formen des MaCa mit ihren Vorstufen

Bildquelle: www.brustkrebs-info.de

Histopathologisch wird das MaCa folgendermaßen klassifiziert (Abb.2): 80 % sind duktale Karzinome, 20 % lobuläre Karzinome, 10 % prognostisch günstigere Sonderformen (tubuläres MaCa, medulläres MaCa, papilläres MaCa, muzinöses MaCa, Morbus Paget) (Stauber et al., 2001). Das multizentrische Auftreten ist mit 60 bis 80 % beim lobulären Karzi-

nom häufiger als beim duktalen Karzinom. In der kontralateralen Brust finden sich beim lobulären Karzinom in 20 % der Fälle präinvasive oder invasive Herde. In etwa einem Drittel der Fälle entstehen invasive MaCa multizentrisch.

1.2.4 Stadieneinteilung

Das Tumorstadium der in der vorliegenden Arbeit analysierten MaCa wurde im Institut für Gynäkopathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf und im Institut für Pathologie des Universitätsklinkums Essen beurteilt, wobei Grundlage für die Einteilung die 5. Auflage der TNM-Klassifikation der Union Internationale Contre le Cancer (UICC), 1997 war (Tab. I).

рТ	Primärtumor
pTX	Primärtumor nicht beurteilbar
pT0	Kein Anhalt für Malignität
pTis	Carcinoma in situ
pT1	Tumor 2 cm oder weniger in größter Ausdehnung
pT2	Tumor > 2 cm, aber nicht > 5 cm in größter Ausdehnung
pT3	Tumor > 5 cm in größter Ausdehnung
pT4	Tumor jeglicher Größe mit Infiltration der Haut oder der Brustwand
рN	Regionäre Lymphknoten
pNX	Regionäre Lymphknoten nicht beurteilbar
pN0	Kein Anhalt für Befall der regionären Lymphknoten
pN1	Metastasen in ipsilateralen beweglichen axillären Lymphknoten
pN2	Metastasen in ipsilateralen axillären Lymphknoten, untereinander oder
	an anderen Strukturen fixiert
pN3	Metastasen in ipsilateralen Lymphknoten entlang der Arteria mammaria
	interna
pМ	Fernmetastasen
pMX	Fernmetastasen nicht beurteilbar
pM0	Kein Anhalt für Fernmetastasen
pM1	Fernmetastasen vorhanden

Tab. I.: pTNM-Klassifikation des MaCas nach der 5. Auflage der UICC, 1997

Neben dem TNM-Stadium ist derzeit das Grading der wichtigste Anhaltspunkt für die Prognoseabschätzung des MaCa (Tab. II). Ausmaß der Tubulusbildung, Kernpleomorphie und Mitoserate werden zur Beurteilung des Malignitäts- und Differenzierungsgrades bestimmt (Bloom und Richardson, 1957; Elston und Ellis, 1991).

Tab. II: Histopathologisches Tumorgrading des MaCa

Malignitätsgrad	G-Gruppe	Differenzierungsgrad
Gering	G1	Gut differenziert
Mäßig	G2	Mäßig differenziert
Hoch	G3	Schlecht differenziert

1.2.5 Diagnostik

Die Methoden der Diagnostik des MaCa haben in den letzen Jahren an Komplexität zugenommen. Den etablierten Methoden kommt nach wie vor, gerade in der Primärdiagnostik, eine große Bedeutung zu. So zählen bei Verdacht auf ein MaCa die Beurteilung der Symptome und der sichtbaren und tastbaren Veränderungen, die Mammographie und Galaktographie, die Kernspin-Mammographie, die Sonographie, die Sekretuntersuchung, die Punktionsdiagnostik und die Stanzbiopsie zu den primären Maßnahmen der Diagnostik. Weitere Strategien zur Diagnostik gewinnen aber zunehmend an Bedeutung, so die Bestimmung des Rezeptorstatus, wie z.B. des Her2/neu-Rezeptors, die Detektion genetischer Alterationen, v.a. im Bereich von TSG, und die Beurteilung der Metastasierungstendenz durch die Detektion von CTC und DTC.

1.2.6 Rezeptorstatus

Sowohl das vermehrte Vorkommen an Östrogen(ER)- und Progesteron(PR)-Rezeptoren, als auch die Überexprimierung des Her2/neu-(Humaner epidermaler Wachstumsfaktor 2-)-Rezeptors sind für die Prognoseeinschätzung, die zytotoxische Medikamentenwirkung und die Wahl der medikamentösen adjuvanten Therapie von großer Bedeutung (Elledge et al., 1998; Johnson und Seidman, 2005; Paik et al., 1998; Paik et al., 2004; Quenel et al., 1995; Schwarzenbach et al., 2004; Witzel et al., 2006). Die Expression der ER- und PR-Rezeptoren wird immunhistochemisch bestimmt. Rezeptorpositive Fälle werden als prognostisch günstiger angesehen. Am besten ist die Prognose, wenn der Status der beiden Rezeptortypen positiv ist (Pfeiderer et al., 2001). Für die Diagnose ist die Höhe des Rezeptorwertes von relativ geringer Bedeutung, als "positiv" werden Werte über 20 fmol bezeichnet (Jänicke, 2002). Bei etwa 25 bis 30 % aller Patientinnen mit MaCa ist eine Überexpression des Her2/neu-Rezeptors, eines vom c-erbB2-Gens kodierten membranständigen Rezeptors für Wachstumsfaktoren, nachweisbar.

1.2.7 Tumormarker

Für die Frühdiagnostik des MaCa gibt es bis heute keine ausreichend sensiblen und sensitiven Marker. Die heute gebräuchlichen Marker dienen vor allem der Verlaufskontrolle nach der Therapie. Die Marker CEA (Carcinoembryonales Antigen) und CA 15-3 werden im Blut der Patientinnen bestimmt. Erhöhte Werte sollten nach der Therapie abfallen. Bei 50-85 % der Patientinnen kommt es bei einem Rezidiv zu einem Anstieg dieser Marker (Schmidt-Matthiesen et al., 2002).

Der Tumormarker CA 15-3 ist ein hochmolekulares Glycoprotein (Mucin), das im peripheren Blut der MaCa-Patientinnen gefunden werden kann. Während die CA 15-3-Konzentration bei Patientinnen mit primärem Tumor im normalen Bereich liegt, wird bei Patientinnen mit Metastasen oft ein erhöhter Level an Ca 15-3 im Blut gemessen, der mit einer vergrößerten metastatischen Last korrelieren kann. CEA wird als Serummarker für das Monitoring verschiedener Tumorstadien verwendet.

1.3 Das Prostatakarzinom

Die meisten Prostatakarzinome (PCa) bilden sich aus dem Drüsenepithel und gehören somit ebenso wie das MaCa zu den Adenokarzinomen (Abb.3). Diese Karzinome sind fast immer multifokal nachweisbar, können in verschiedenen Differenzierungsstadien nebeneinander vorliegen und somit unterschiedliche Malignitätsgrade aufweisen.

1.3.1 Epidemiologie

Das PCa ist mit einer Inzidenz von 84 pro 100.000 in Europa die häufigste maligne Erkrankung des Mannes in der westlichen Welt. Nach dem Bronchialkarzinom und dem Darmkrebs ist das PCa die dritthäufigste Todesursache unter den malignen Erkrankungen des Mannes in Deutschland (Statistisches Bundesamt, 2007a). Jährlich gibt es in Deutschland etwa 11.000 Todesfälle (Statistisches Bundesamt, 2007a). Die Inzidenz des PCa nimmt mit einer durchschnittlichen jährlichen Steigerungsrate von 3,7 % stetig zu. Es ist noch ungeklärt, ob für die Zunahme ein erhöhtes Erkrankungsrisiko oder die verbesserte Diagnostik die Ursache ist (Hautmann und Huland, 2001). Die Inzidenz weist deutliche ethische und geographische Unterschiede auf, so schwankt sie zwischen 1,3 (China), 30 (Bundesrepublik Deutschland), 60 (weiße Amerikaner) und 95 (farbige Amerikaner) pro 100.000 Einwohner (Hautmann und Huland, 2001). Einen Zusammenhang zwischen Alter und Erkrankungshäufigkeit gibt es sowohl für das latente als auch für das manifeste PCa, so steigt die Inzidenz deutlich bei Männern über 60 Jahren und ist bei Männern über 80 Jahren am größten (Altwein, 2001).

1.3.2 Åtiologie und Pathogenese

Neben den o.g. ethnographischen Risikofaktoren werden fünf Ursachengruppen für die Entstehung eines PCas diskutiert. Etwa 10-15 % aller PCa sind hereditär bedingt (Hautmann und Huland, 2001). Es wurden Veränderungen auf dem Chromosom 1

in der Region des Gens HPC1 ("human prostate cancer 1") und auf dem X-Chromosom beobachtet (Hautmann und Huland, 2001). Den Laboren von Sandberg et al. (1994) und Carter et al. (1997) gelang der Nachweis von Defekten auf Regionen von Chromosom 7, 10 und 16, die Tumorsuppressorgene (TSG) enthalten. Auch hormonale Faktoren können die Tumorentstehung beeinflussen, z. B. ist die Entwicklung des PCa androgenabhängig (Ross et al., 1983; Sökeland et al., 2002). Exogene Hormone, wie pflanzliche Östrogene, scheinen einen protektiven Einfluss zu haben (Bartha et al., 1996). Weitere Risikofaktoren sind Ernährung mit hauptsächlich tierischem Fett und Eiweiß, Umweltfaktoren, wie Abgase und Luftverschmutzung, und erlittene virale und venerische Entzündungen (Hautmann und Huland, 2001).

1.3.3 Diagnostik

Zu den bisher etablierten primären "Staging"-Untersuchungen des PCas zählen die digitale rektale Untersuchung (DRU), der transrektale Ultraschall (TRUS), die PSA(prostataspezifisches Antigen)-Bestimmung (s. Kap. 1.3.6) und die Stanzbiopsie. Die PSA-Bestimmung aus dem Blutplasma erfolgt meist routinemäßig mittels eines monoklonalen Antikörpers im Rahmen der Krebsvorsorge.

Im Frühstadium ist das PCa häufig völlig symptomlos. Aufgrund seiner peripheren Lage kommt es erst im Spätstadium zu Miktionsbeschwerden und gelegentlich zu einer Hämaturie. Zusätzlich können im Spätstadium so genannte Metastasensymptome auftreten, wie z.B. Knochenschmerzen – insbesondere Kreuzschmerzen durch Wirbelmetastasen – oder Bein- und Skrotalödeme bei Befall von pelvinen Lymphknoten. Erst im sehr weit fortgeschrittenen Stadium zeigen sich allgemeine Tumorzeichen, wie Kachexie oder Anämie.



1.3.4 Histopathologische Einteilung

Abb. 3: Darstellung der anatomischen Lage und der Einteilung der Prostata in Zonen Bildquelle: www.prostate-cancer.org

Die Prostata wird in vier Zonen eingeteilt. 90 % der Karzinome entstehen an der rektalen Seite im peripheren Drüsenanteil, nur 5 % wachsen ausschließlich in der periurethralen Zone. Histopathologisch wird das PCa entsprechend seiner Architektur folgendermaßen klassifiziert: >90 % sind azinäre Adenokarzinome und jeweils < 1 % duktale, muzinöse, adenoid-

zystische Adenokarzinome, Plattenepithelkarzinome, Urothelkarzinome und undifferenzierte Karzinome.

Der Grad der glandulären Differenzierung wird durch das Gleason-System, auf Grund des Wachstumsmusters und der Karzinomarchitektur beschrieben. Je höher der Gleason-Score ist, desto undifferenzierter sind die Zellen und desto schlechter ist die Prognose für den Patienten (Gleason und Mellinger, 1974; Vesalainen et al., 1995).

1.3.5 Stadieneinteilung

Das Tumorstadium der in der vorliegenden Arbeit analysierten PCa wurde im Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf und im Institut für Pathologie des Centre Hospitalier Universitaire CHU de Montpellier beurteilt, wobei Grundlage für die Einteilung die 6. Auflage der TNM-Klassifikation der Union Internationale Contre le Cancer (UICC), 2002 war (Tab. III).

Т	Primärtumor
ΤХ	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für einen Primärtumor
T1	Klinisch nicht erkennbarer Tumor, nicht zu palpieren, nicht durch bildge- bende Verfahren zu erkennen
a	Tumor ist zufälliger histologischer Befund (inzident) in 5% oder weniger des resezierten Gewebes
b	Tumor ist zufälliger histologischer Befund (inzident) in mehr als 5% des resezierten Gewebes
c	Tumor durch Nadelbiopsie identifiziert, weil PSA-Spiegel erhöht
T2	Tumor auf Prostata begrenzt
a	Tumor befällt die Hälfte eines Lappens oder weniger
b	Tumor befällt mehr als die Hälfte eines Lappens, aber nicht beide Lappen
c	Tumor befällt beide Lappen
T3	Tumor hat die Prostatakapsel durchbrochen
a	Einseitige- oder beidseitige extrakapsuläre Ausbreitung
b	Tumor befällt die Samenblasen
T4	Tumor ist fixiert oder infiltriert Nachbarstrukturen
a	Tumor infiltriert Blasenhals und/oder Sphinkter externus und/oder Rektum
b	Tumor infiltriert Levator-Muskeln und/oder ist an der Beckenwand fixiert
Ν	Regionäre Lymphknoten
NX	Regionäre Lymphknoten nicht beurteilbar
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastasen in solitären regionären Lymphknoten, 2 cm oder weniger in größter Ausdehnung
N2	Metastasen in solitären Lymphknoten, mehr als 2 cm, aber nicht mehr als 5 cm in größter Ausdehnung, oder in multiplen regionären Lymphknoten, keine mehr als 5 cm in größter Ausdehnung
N3	Metastase(n) in regionären Lymphknoten, mehr als 5 cm in größter Ausdeh- nung
Μ	Fernmetastasen
MX	Das Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen vorhanden
a	Metastasen in nichtregionären Lymphknoten
a b	Metastasen in nichtregionären Lymphknoten Knochenmetastasen

Tab. III: Stadieneinteilung des primären PCas nach UICC 2002, 6. Auflage

1.3.6 Tumormarker

In der Präventiv- bzw. Frühdiagnostik ist das PSA der bis heute einzig etablierte Tumormarker. Der positive prädiktive Wert in der PSA-Diagnostik ist aber beunruhigend niedrig. Internationale Studien etablierten einen Cut-off-Wert von 4 ng/ml für das t-PSA (Gesamt-PSA) im Blut von PCa-Patienten (Kleer und Oesterling, 1993), jedoch weisen 30 % der PCa-Patienten einen t-PSA-Wert < 4 ng/ml auf und werden fälschlicherweise als gesund beurteilt (Wirth et al., 1990). Bei ca. 75 % aller Patienten ergibt das t-PSA einen falsch positiven Wert. In der vorliegenden Arbeit soll u.a. der Frage nachgegangen werden, ob DNA-Alterationen, wie LOH (Loss of Heterozygosity/ Verlust der Heterozygotie) oder MSI (Mikrosatelliteninstabilität), zu einer im Vergleich zur PSA-Bestimmung präziseren Früherkennung geeignet sein könnten.

1.4 Molekulargenetik von Tumoren

1.4.1 Zirkulierende Nukleinsäuren

Das Vorkommen zirkulierender Nukleinsäuren wurde erstmals 1948 beschrieben (Mandel und Métais, 1948). 30 Jahre später konnte mittels eines Radioimmunoessays gezeigt werden, dass die Konzentration der freien zirkulierenden DNA im Blut von Tumorpatienten signifikant erhöht ist (Leon et al., 1975). Bei Patienten mit metastasierten Tumoren wurde sogar etwa zweimal soviel freie DNA im Blut gefunden wie bei Patienten mit nicht metastasierten Tumoren, was auf eine mögliche Korrelation mit der Progression der Tumore hinweist. Auch konnte zwischen den genetischen Alterationen, wie LOH und MSI, des Primärtumors und den Alterationen in der zirkulierenden DNA eine Übereinstimmung beobachtet werden (Bruhn et al., 2000). Eine geringe Menge frei im Blut zirkulierender DNA wird bei allen gesunden Menschen gefunden. Der Nachweis stark erhöhter Konzentrationen an freier DNA im Blut tumorkranker Patienten und die Erkenntnis, dass die Konzentration bei effektiver Therapie abfallen kann (Leon et al., 1977; Stroun et al., 1987), legt nahe, dass Tumorzellen (TZ) im Verlauf der Erkrankung DNA ins Blut abgeben. Welcher Mechanismus bei diesem Vorgang eine Rolle spielt, wird zur Zeit diskutiert. Apoptose sowie Nekrose und die aktive Freigabe von DNA in den Blutstrom durch TZ tragen zu dem erhöhten DNA-Spiegel im Blut bei (Stroun et al., 2000). Tumorspezifische DNA wurde im Blut von Patienten mit verschiedenen Tumorentitäten gefunden (Fleischhacker und Schmidt, 2007). Deshalb könnte die Detektion tumorspezifischer Aberrationen in der extrazellulären DNA in Körperflüssigkeiten, wie Blut und KM, von klinischer Bedeutung sein (Goessl et al., 2002).

1.4.2 Tumorsuppressorgene und Onkogene

Die Entstehung eines Karzinoms beruht auf der Akkumulation mehrerer Alterationen in verschiedenen Genen. Es spielen meist genetische Veränderungen eine entscheidende Rolle, welche die Funktion bestimmter Gene ausschalten ("loss of function") oder neue Funktionen hervorbringen ("gain of function"). Für die Karzinogenese sind Gene, die an der Regulation von Zellwachstum und Differenzierung beteiligt sind, von besonderer Bedeutung (Ponder, 1992). Sie lassen sich in zwei Gruppen mit unterschiedlichen Wirkmechanismen unterteilen: Onkogene und TSG. Tumoren entstehen durch das Zusammenspiel der aktivierten Expression von Onkogenen und der Suppression von TSG (Fearon und Vogelstein, 1990). Durch verstärkte Expression können die kodierten Proteine der Onkogene eine Tumorentwicklung fördern (Bishop, 1983; Bishop, 1991). Für die Tumorgenese sind TSG von besonderer Bedeutung. Der Verlust dieser Gene kann zum Verlust einer tumorprotektiven Funktion des entsprechenden Genprodukts führen. Beispielsweise kann ein fehlendes oder fehlerhaftes Protein seine proliferationshemmende Wirkung nicht mehr fortsetzen und damit zur Tumorbildung beitragen.

1.5 Wahl der Mikrosatellitenmarker für die Mammakarzinom-Analysen

Bei Diagnostik und Therapie des MaCa spielen die TSG BRCA1 (breast cancer gene 1) auf Chromosom 17 (chromosomaler Locus 17q21.2) (Hall et al., 1990; Silva et al., 1999b) und BRCA2 auf Chromosom 13 (chromosomaler Locus 13q12.36) (Silva et al., 1999b; Wooster et al., 1995) eine wichtige Rolle. Sowohl BRCA1, als auch BRCA2 sind an der Signalkaskade von p53, Retinoblastom (RB) und c-Myc beteiligt und somit in die Transkription, die Regulierung des Zellzyklus, die Reparatur von DNA-Defekten, die Zentrosom-Duplizierung, das Zellwachstum und die Apoptose involviert (Yoshida und Miki, 2004). Die Wahl der Therapieform und die Entscheidung zu einer bilateralen Brustamputation hängen nach Beschluss des 9. internationalen Expertenkonsensustreffens davon ab, ob die Patientin u.a. Trägerin des mutierten Gens BRCA 1 oder 2 ist (Goldhirsch et al., 2005; Rebbeck, 2002; Schwartz et al., 2003).

Das Chromosom 17 hat die meisten bekannten genetischen Alterationen beim MaCa. Neben dem o.g. TSG BRCA1 trägt es ebenfalls das Protoonkogen c-erbB2 (17q12-q21) (Kauraniemi und Kallioniemi, 2006; Murphy et al., 1995; Plummer et al., 1997), das für den membranständigen Her2/neu (Humaner epidermaler Wachstumsfaktor 2)-Rezeptor kodiert. Ebenfalls auf dem Chromosom 17 liegt das für PNMT (Phenylethanolamin-N-Methyltransferase) kodierende Gen (Dressman et al., 2003), welches über die Leptinregulation Einfluss auf die Entstehung des MaCa nehmen kann (Benusiglio et al., 2006; Harvey und Ashford, 2003; Stattin et al., 2004).

Auf dem Chromosom 16 wurden ebenfalls genetische Alterationen beim MaCa nachgewiesen. Die Region 16q22-23 kodiert das TSG E-Cadherin, dessen Genprodukt eine entscheidenden Rolle in der Bildung und dem Erhalt der Zell-Zell-Kontakte spielt. Die Downregulation des Gens kann zu Tumorentstehung, Progression und Metastasierung beitragen (Pecina-Slaus, 2003).

In der folgenden Tabelle sind die in meinen Analysen verwendeten Marker aufgelistet.

Marker	Chromosomale Region	TSG	Literatur
D17S855	17q21	BRCA1	(Hall et al., 1990; Silva et al., 1999b)
D17S250	17q11.2-q12	PNMT	(Benusiglio et al., 2006; Dressman et al., 2003; Harvey und Ashford, 2003; Stattin et al., 2004)
D16S421	16q22-q23	E-Cadherin	(Pecina-Slaus, 2003)

Tab. IV: Mikrosatellitenmarker, chromosomale Region und TSG für die MaCa-Analysen

1.6 Wahl der Mikrosatellitenmarker für die Prostatakarzinom-Analysen

Beim PCa wurden hohe Inzidenzen an LOH in der für den Retinsäurerezeptor B kodierenden Region 3p24 entdeckt. Bindung von all-trans-Retinsäure an seinen Rezeptor hat einen wachstumshemmenden Effekt. Ein Verlust des Rezeptors kann zu erhöhter Zellproliferation führen (Qiu et al., 2000). Eine Downregulation des Rezeptors wurde für das PCa berichtet (Nakayama et al., 2001).

Ein weiteres wichtiges TSG kodiert für die TGF-ß-aktivierte Kinase1 (TAK1) und liegt auf dem Locus 6q16. Untersuchungen an humanen Prostatazellen zeigten, das die durch TGFß induzierte Apoptose dieser Zelllinie auf die Aktivierung der TAK1 zurückzuführen ist. Ektopische Expression von TAK1 stimulierte die Apoptose, eine dominant-negative TAK1-Variante reduzierte diese (Cooney et al., 1996; Konishi et al., 2003).

Auf dem Chromosom 8 befindet sich das TSG Neuroregulin1, das für mehrere Spleißvarianten eines Liganden, der an erbB-Rezeptoren bindet, kodiert. Über einen komplexen Signaltransduktionsweg wird im Verlauf der programmierte Zelltod induziert, wie am Beispiel der androgen-unabhängigen PCa-Zelllinie LNCaP gezeigt wurde (Tal-Or et al., 2003).

Das TSG "Cyclin dependent kinase 2" ("CDKN2") befindet sich in der chromosomalen Region 9p21. Es kodiert für einen Inhibitor der Zyklin-abhängigen Kinase und beeinflusst bei Downregulation den Zellzyklus (Jarrard et al., 1997; Perinchery et al., 1999).

Bei DNA-Verlust im chromosomalen Bereich des 11p12, der für DDB2, eine Untereinheit des "damaged-DNA recognition factor" DDB, kodiert, kommt es zu einer Dysregulation der genetischen Reparaturmechanismen in menschlichen Zellen. Die Expression von DDB2 wird von p53, BRCA1 und ionisierender Strahlung induziert (Yoon et al., 2005).

Auf Chromosom 11 in der Region 11q22 liegt ein TSG, dessen Genprodukt eine Rolle in der Kontrolle des Zellzyklus spielt. Die CHK1 (Checkpoint-Kinase) ist ein Schlüsselregulator des G2-/M-Checkpoints des Zellzyklus. Bei Replikationsfehlern wird sie durch Phosphorylierung aktiviert und kann in phosphorylierter Form die cyclinabhängige Kinase inhibieren. Der Zellzyklus wird dadurch unterbrochen und die DNA-Reparatur kann erfolgen (Katsuragi und Sagata, 2004).

Marker	Chromosomale Region	TSG	Literatur
THRB	3p24	Retinsäure- rezeptor	(Nakayama et al., 2001; Qiu et al., 2000)
D6S1631	6q16	TGF-ß- aktivierte Kinase 1	(Cooney et al., 1996; Konishi et al., 2003)
D8S87	8p12	Neuro- regulin1	(Tal-Or et al., 2003)
D9S171 D9S1748	9p21	CDKN2	(Jarrard et al., 1997; Perinchery et al., 1999)
D11S898	11q22	CHK1	(Katsuragi und Sagata, 2004)
D11S1313	11q12	DDB2	(Yoon et al., 2005)

Tab. V: Mikrosatellitenmarker, chromosomale Region und TSG für die PCa-Analysen

1.7 Mikrosatelliten-Längen-Polymorphismus und Mikrosatelliteninstabilität

Mikrosatelliten-DNA-Abschnitte sind "Tandem-Repeat"-Sequenzen und bestehen aus kurzen hochrepetitiven DNA-Sequenzen von 10 bis 50 Kopien mit einer Länge von 2 bis 6 Basenpaaren (bp) (Nakamura et al., 1987; Weber und May, 1989). Am häufigsten kommen Wiederholungen von Di-, Tri- oder Tetranukleotiden vor wie z.B. (CA)_n, wobei n= 10-50 sein kann. Im Genom sind Mikrosatelliten weit verbreitet und liegen meist in nicht-kodierenden Abschnitten, wobei aber auch die Lokalisation in Exons möglich ist. Häufige Motive sind CA, AC, AAN oder AG. Um die Häufigkeit polymorpher Allele anzugeben, ist der PIC-Wert (Polymorphic Information Content) definiert worden. Er gibt die Häufigkeit in einer Population an, mit der an einem Locus eine heterozygote Konstitution vorliegt. Da sich die Mikrosatelliten-DNA in den maternalen und paternalen Chromosomen in ihrer Länge unterscheiden, kann sie nach Amplifikation mit spezifischen Primern auf einem Polyacrylamidgel bzw. mit Hilfe der Kapillarelektrophorese anschaulich aufgetrennt werden. Mikrosatelliten vereinen demnach mehrere Vorteile für die Unterscheidung homologer Allele und werden deshalb heute oft in Genanalysen, wie der Detektion von DNA-Verlusten (LOH) oder DNA-Gewinnen (MSI) eingesetzt. Aufgrund ihrer gleichmäßigen Verteilung sind sie in großer Zahl für alle Chromosomenregionen mit Hilfe der PCR leicht nachweisbar.

Die Natur der Mikrosatelliten-DNA mit ihren hochrepetitiven Sequenzen kann eine erhöhte Fehlerrate bei der Replikation bewirken, die in einer Strangverkürzung bzw. –verlängerung resultieren kann. Eine Anhäufung solcher Fehler kann dazu führen, dass Reparaturenzyme diese nicht mehr erkennen. Hinzu kommt, dass auch die Reparaturmechanismen infolge der Instabilität des genetischen Systems defekt sein können. Die 1996 von Belchis et al. (1996) beschriebene Instabilität in der Mikrosatelliten-DNA (MSI) deutete auf ein Versagen des DNA-Mismatch-Repair-Systems hin. Überdies zeigten Paulson et al. (1996) im gleichen Jahr eine Korrelation von MSI mit einer schlechten Prognose. Durch die größenabhängige Verschiebung der Allele kann es zu zusätzlichen Banden in einem Gel kommen.

1.8 LOH-Analysen in Tumor, Blut und Knochenmark

Ein Ansatz zur Lokalisation von TSG ist der Nachweis von heterozygoten Deletionen bzw. Allelverlusten (Verlust der Heterozygotie, "loss of heterozygosity", LOH) mithilfe von Mikrosatelliten-Längen-Polymorphismus-Analysen der DNA aus Leukozyten, Tumor, Blut und KM von Tumorpatienten mit polymorphen Markern (Schwarzenbach et al., 2004). Häufige Allelverluste in einer bestimmten Region weisen darauf hin, dass in dieser Region möglicherweise ein TSG liegen könnte, welches bei der Pathogenese eines Tumors eine Rolle spielt. Zum Auffinden eines LOH muss an einem Lokus konstitutionelle Heterozygotie vorliegen. Nur in einer solchen Konstitution kann ein Allelverlust in einer PCRbasierten Mikrosatelliten-Analyse nachgewiesen werden. Eine homozygote Konstellation, bei der väterliches und mütterliches Allel nicht unterscheidbar sind, ist in diesen Analysen nicht informativ. Bei einer heterozygoten Konstitution des Mikrosatelliten kann in Tumor, Blut oder KM im Falle eines Verlusts der Heterozygotie nur eine Allel des betreffenden Markers nachgewiesen und mit den beiden Allelen der Leukozyten-DNA als Referenz-DNA verglichen werden (Lessa und Applebaum, 1993).

Metastasen sind häufig durch Akkumulation von genetischen Änderungen charakterisiert und ein vermehrtes Auftreten von LOH korrelierte signifikant mit einem verkürzten postmetastatischen Überleben der Patientinnen mit MaCa. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die erhöhte LOH-Frequenz die "Dormancy" (s. Kap. 1.11.4) der TZ in entfernten Organen beendet und für die Progression der Metastasen erforderlich ist (Hampl et al., 1999).

1.9 Metastasierungskaskade epithelialer Tumore

Es gibt verschiedene Theorien zur Metastasierungskaskade epithelialer Tumore. Ein traditionelles Modell zur Entstehung von Metastasen besagt, dass Metastasen auf kleine Subpopulationen des Primärtumors, die erst spät in der Tumorgenese entstehen, zurückzuführen sind (Chambers et al., 2002; Fidler und Kripke, 1977). Nach neueren Erkenntnissen wird angenommen, dass die meisten TZ des Primärtumors die Fähigkeit zur Metastasierung besitzen und dass es schon früh in der Tumorentstehung, ausgehend vom Primärtumor, zu einer metastatischen Streuung kommt (Pantel und Brakenhoff, 2004). Zudem konnte eine genetische Determinierung der Zellen bezüglich des Ortes der Metastasierung nachgewiesen werden (Smid et al., 2006; Woelfle et al., 2003). In Genanalysen zeigten CTC und DTC wenig genetische Ähnlichkeit mit ihrem Ursprungsgewebe (Schmidt-Kittler et al., 2003). Vermutlich kommt es während der genetischen Entwicklung des Primärtumors zu einer kontinuierlichen Disseminierung von TZ, die dann neue genetische Eigenschaften erwerben können (Pantel und Brakenhoff, 2004). Um einen Hinweis zu bekommen, wie diese Zellen ihr Metastasierungspotential und gegebenenfalls ihre Resistenz gegen systemische Therapien entwickeln, wäre es interessant, das Milieu, in dem sich die TZ genetisch verändern, zu untersuchen (Gray, 2003).

Basierend auf der frühen Disseminierung und der genetischen Determinierung der TZ haben Pantel und Brakenhoff zwei Modelle einer lymphogenen und hämatogenen Metastasierungskaskade entwickelt (Pantel und Brakenhoff, 2004).

Nach dem ersten Modell hängt die Entstehung primärer Fernmetastasen von dem Vorhandensein von LK-Metastasen ab. Die TZ disseminieren früh sowohl lymphogen als auch hämatogen vom Primärtumor. Die lymphogenen CTC proliferieren und bilden in LK Metastasen, aus denen zu einem späteren Zeitpunkt wiederum TZ zu entfernten Organen disseminieren, um dort Fernmetastasen zu bilden.

Hier wird die Determinierung der CTC durch die Umgebung der LK angenommen. Die hämatogenen CTC haben nur eine kurze Überlebenszeit im peripheren Blut (Chambers et al., 2002; Pantel und Brakenhoff, 2004).

Nach dem zweiten Modell disseminieren die TZ unter Umgehung der LK direkt in entfernte Organe, um früh Fernmetastasen zu bilden. Bei Patienten, die keine LK-Metastasen, aber Fernmetastasen entwickelt haben, wie z.B. bei MaCa-Patientinnen beobachtet, scheint dies der Fall zu sein. In diesem Fall korreliert der Status der TZ-Disseminierung in den LK nicht mit dem im KM (Braun et al., 2001; Gerber et al., 2001; Woelfle et al., 2003). In zahlreichen Studien wurde ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von CTC im peripheren Blut und einer schlechten Prognose sowohl beim metastasierten als auch beim nicht-metastasierten MaCa beschrieben (Cristofanilli et al., 2004; Cristofanilli et al., 2005; Masuda et al., 2005; Müller et al., 2005; Pantel et al., 2009; Stathopoulou et al., 2002; Weigelt et al., 2003).

Nach beiden Modellen kann eine weitere hämatogene Disseminierung sowohl aus den primär hämatogen entstandenen Fernmetastasen, als auch aus den von LK-Metastasen ausgegangenen Fernmetastasen stattfinden. Die DTC könnten deshalb besonders aggressiv sein, weil sie die intensive Passage durch Blut- und Lymphgefäßsystem überlebt haben (Pantel und Brakenhoff, 2004; Pantel et al., 2008; Pantel et al., 1993b).

Die beiden Modelle zur Metastasierungskaskade könnten von entscheidender Bedeutung für die Therapieplanung sein. Nach dem zweiten Modell sind die Diagnosen von LK-Metastasen und Metastasen in entfernten Organen voneinander unabhängige prognostische Informationen. So gibt es eine laufende Debatte darüber, ob die MaCa-Patientinnen entscheidend davon profitieren, dass ihnen routinemäßig die axillären LK entfernt werden, um das Risiko der Metastasierung zu reduzieren (Krag und Single, 2003).



Abb. 4: Modell der Metastasierungskaskade nach Pantel und Brakenhoff (2004) Bildquelle: (Pantel und Brakenhoff, 2004) Die Disseminierung der TZ vom Primärtumor geschieht sowohl lymphogen (rote Pfeile) als auch hämatogen (blaue Pfeile). Nach dem ersten Modell entstehen aus den lymphogen disseminierten TZ LK-Metastasen, während die hämatogen disseminierten TZ sterben oder ruhen. Nach dem zweiten Modell disseminieren die TZ, die hämatogen gestreut sind und bilden Fernmetastasen. Solche Patienten können Fernmetastasen entwickeln ohne, dass LK-Metastasen nachweisbar sind. Nach beiden Modellen kann später eine sekundäre hämatogene Disseminierung ausgehend von Fernmetastasen stattfinden.

1.10 Metastasierung des Mammakarzinoms und des Prostatakarzinoms

Vor allem bei Ma- und PCa metastasieren fortgeschrittene Tumore in die Knochen (Müller et al., 2005; Mundy, 2002; Pantel und Brakenhoff, 2004). Die Metastasierung beim Ma- und PCa erfolgt sowohl lymphogen als auch hämatogen. Das lymphogene Ausbreitungsmuster hängt von der Lokalisation des Primärtumors ab. Die MaCa des oberen äußeren Quadranten siedeln sich meist in die axillären Lymphknoten ab und medial gelegene Tumore metastasieren in die retrosternalen und supraklavikulären LK. Lymphogene Metastasen der PCa werden initial in den Lymphknoten der Obturatorius- und Iliakalregion, später in den extrapelvinen und retroperitonealen Lymphknotengruppen manifest. Weichteilmetastasen des MaCa entstehen wohl am ehesten infolge der lymphogenen Metastasierung in gegenseitiger Mamma, Pleura und Mediastinum und hämatogen in Lunge, Leber, Gehirn und Skelettsystem. Prädilektionsstelle für hämatogene Fernmetastasen des PCa ist das Skelettsystem.

1.11 Zirkulierende Tumorzellen im Blut und disseminierte Tumorzellen im Knochenmark von Patienten mit epithelialen Tumoren

1.11.1 Tumorzellen in Blut und Knochenmark als Prognosefaktor und entscheidendes Kriterium für Therapieplanung und -monitoring

Bei Diagnose eines Karzinoms sind die Metastasierungstendenz des Tumors, die Mechanismen der Metastasierung und die Art der Metastasierung von entscheidender Bedeutung sowohl für die Einschätzung der Prognose als auch für Wahl und Monitoring der Therapie. Weltweit beschäftigen sich zahlreiche Forschungsgruppen und Ausschüsse mit der prognostischen und therapiebeeinflussenden Bedeutung von CTC im Blut und von DTC im KM und in anderen Organen, um eine einheitliche Detektion von CTC und DTC für eine effizientere Therapieplanung mit individuellem Risikomanagement und eine suffizientere Einschätzung der Prognose zu erreichen (Benoy et al., 2006; Braun und Naume, 2005; Cristofanilli et al., 2004; Cristofanilli et al., 2005; Müller et al., 2006b; Müller und Pantel, 2005; Naume et al., 2004; Pantel und Brakenhoff, 2004; Pantel et al., 2003; Pantel und Woelfle, 2005; Pierga et al., 2004; Schmidt-Kittler et al., 2003; Slade et al., 2005; Woelfle et al., 2006).

Bereits in den 90er Jahren konnten die Arbeitsgruppen von Pantel und Schlimok das Vorhandensein von DTC im KM von Patienten mit Bronchial-, Kolorektal- und Magenkarzinom nachweisen und die prognostische Relevanz dieser Ergebnisse belegen (Pantel et al., 1993a; Schlimok et al., 1990; Schlimok et al., 1991). Diel et al. (1992), Mansi et al. (1991), sowie Braun und Pantel (1999) konnten eine signifikante Korrelation eines positiven KM-Befundes mit der Tumorgröße, dem Lymphknoten-Status und dem Tumorgrading beim MaCa nachweisen. Weiterhin wurde ein Zusammenhang des Nachweises von DTC mit rezidivfreiem Überleben, Gesamtüberlebenszeit und Progression der Erkrankung beschrieben (Cote et al., 1991; Harbeck et al., 1994; Mansi et al., 1991). In großen aktuellen Studien konnte das Vorkommen von CTC im peripheren Blut und/oder DTC im KM als signifikanter Prognosefaktor sowohl beim nicht-metastasierten MaCa als auch beim nichtmetastasierten PCa nachgewiesen werden (Braun et al., 2005; Cristofanilli et al., 2004; Cristofanilli et al., 2005; Köllermann et al., 2008; Moreno et al., 2001; Müller et al. 2005: Naume et al. 2004: Pantel und Brakenhoff 2004: Pantel et al. 2008:

et al., 2005; Naume et al., 2004; Pantel und Brakenhoff, 2004; Pantel et al., 2008; Pantel et al., 1993a; Scher und Pantel, 2009; Weckermann et al., 2009). Mehrfach wurde eine signifikante Korrelation zwischen dem Vorkommen von DTC im KM und der Entwicklung von Fernmetastasen nicht nur bei Lymphknoten-positiven, sondern auch bei Lymphknoten-negativen Patienten entdeckt (Janni et al., 2003; Masuda et al., 2005; Pantel und Woelfle, 2005). Der KM-Status dürfte also ein wichtiger Indikator für die Streuung von DTC sein und sollte deshalb in der Behandlung der Patienten berücksichtigt werden (Braun und Naume, 2005; Janni et al., 2005; Müller und Pantel, 2005; Müller et al., 2006c; Pantel und Brakenhoff, 2004; Pantel et al., 1999; Pantel et al., 2003; Pantel und Otte, 2001; Pantel und Woelfle, 2005; Sienel et al., 2003; Woelfle et al., 2006).

Ein Beispiel für den möglichen Einsatz der Detektion von Mikrometastasierung ist der heute gültige Standard zur Therapie von Patientinnen mit einem MaCa ohne nachgewiesene Metastasen. Die Wahl der zusätzlich zur primär-chirurgischen Therapie durchzuführenden systemischen Therapie des MaCa richtet sich nach dem statistischen Risiko der Patientinnen, ein Rezidiv zu erhalten (Goldhirsch et al., 2005), ohne Kenntnis des Vorkommens von CTC im Blut bzw. DTC im KM. Die adjuvante systemische Therapie hat wesentlich zu der Reduktion der Mortalität der Patientinnen mit MaCa beigetragen (Berry et al., 2005). Im Rahmen des individuellen Risikomanagements könnte jedoch die Fokussierung auf eine Therapie, die sich gezielt nach der Detektion von TZ in Blut oder KM richtet, die Mortalität bei gleichzeitiger Senkung der Anzahl belastender sytemischer Therapien wohl weiter reduzieren (Pantel und Brakenhoff, 2004). Basierend u.a. auf Studien von Pantel et al. (2008) und de Bono et al. (2008) erkannte die US Food and Drug Administration (FDA) die Detektion von CTC durch das CellSearch System zum Einschätzen der Prognose und zum Monitoring der Therapieantwort bei Patienten mit PCa-, MaCaund kolorektalem Karzinom an (de Bono et al., 2008; Pantel et al., 2008; Pantel und Riethdorf, 2009; Scher und Pantel, 2009). Die Notwendigkeit der Detektion von DTC zum Monitoring während und nach der Therapie wird durch Hinweise darauf, dass DTC im KM die ersten adjuvanten Chemotherapien überleben können, unterstrichen (Müller et al., 2005; Pantel et al., 1999; Pantel et al., 2003; Slade et al., 2005; Thurm et al., 2003; Wiedswang et al., 2006).

Um Studien weltweit vergleichbar zu machen, die Durchführung von Multizenterstudien zu ermöglichen und so eine Empfehlung für die routinemäßige klinische Anwendung der Detektion von DTC im KM geben zu können, wird aktuell an einer Standardisierung der angewandten Methoden gearbeitet (Borgen et al., 2006; Fehm et al., 2006b; Müller et al., 2006b; Müller und Pantel, 2005).

1.11.2 Bedeutung der zirkulierenden Tumorzellen im peripheren Blut

Eine große Chance für die zukünftige Behandlung von Tumorpatienten ist, dass der TZ-Status in Blut und KM für Diagnose, Progression bzw. klinische Entwicklung, Tendenz zur Metastasierung, Therapie und postoperatives Monitoring hervorragend geeignet sein könnte. Da KM-Analysen invasiv und schmerzhaft sind, stellt sich die Frage, ob die im Blut zirkulierenden CTC die gleichen Informationen liefern könnten, wie die im KM angereicherten DTC. So könnte den Patienten eine wiederholte Entnahme von KM erspart bleiben (Müller et al., 2006b). Zu diesem Zweck wurden auch in der vorliegenden Studie komparative Analysen mit CTC im Blut und DTC im KM durchgeführt. Von besonderer Bedeutung zur Klärung der Frage der Austauschbarkeit ist, ob die prognostische Aussagekraft von DTC und CTC übereinstimmt. Hierzu gibt es bisher noch wenige Studien, jedoch zeichnet sich ab, dass DTC im KM eine bedeutendere prognostische Signifikanz haben als CTC im Blut (Benoy et al., 2006; Pantel et al., 2008; Wiedswang et al., 2006). Eine fehlende Übereinstimmung der prognostischen Aussagekraft von CTC und DTC wurde von Pierga et al. (2004) und Wiedswang et al. (2006) beschrieben. Zur prognostischen Relevanz von CTC trug eine Studie von de Bono et al. bei, die zeigte, dass die mit Hilfe des CellSearch Systems präoperativ detektierten CTC und ihr Vergleich mit dem postoperativen CTC-Level einen unabhängigen Marker für das Überleben von PCa-Patienten darstellten (de Bono et al., 2008). Zum anderen ist der Vergleich der Frequenzen von DTC im KM und CTC im Blut von Bedeutung. Müller et al. und Pierga et al. konnten für das MaCa einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Auftreten von CTC im Blut und DTC im KM nachweisen (Müller et al., 2005; Pierga et al., 2004).

Zusammengefasst kann noch nicht eindeutig geklärt werden, ob die Detektion von DTC durch CTC ersetzt werden kann. Fest steht aber, dass sowohl CTC als auch DTC relevant für das Monitoring metastatischer Progression und die Entwicklung individueller Therapiepläne sein können. Weitere Untersuchungen werden die Bedeutung der CTC analysieren.

1.11.3 Techniken zur Anreicherung und Detektion disseminierter Tumorzellen

Sowohl Arbeiten einzelner Forschungsgruppen als auch laborübergreifende Studien und Symposien beschäftigen sich zurzeit mit dem Entwurf effizienter, standardisierter Anreicherungstechniken (Borgen et al., 2006; Fehm et al., 2006a). In meinen Analysen wurden die DTC über das Ficoll-Gradienten-System angereichert und mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers, der spezifisch für epitheliale Antigene ist, über das APAAP-System immunzytochemisch detektiert (Müller und Pantel, 2004; Pantel und Woelfle, 2006).

Anfang der achtziger Jahre wurden die ersten Versuche zur immunhistochemischen Detektion von DTC durchgeführt (Dearnaley et al., 1983; Dearnaley et al., 1981; Redding et al., 1983; Sloane et al., 1980). Die gegen das Zytoskelett epithelialer Zellen gerichteten Zytokeratin-Antikörper erwiesen sich spezifischer als Antikörper gegen Zellmembranantigene, wie z. B. das humane epitheliale Antigen (HEA), das tumorassoziierte Glykoprotein-Antigen (TAG) oder das in den ersten Versuchen verwendete epitheliale Membranantigen Anti-EMA. Das standardisierte Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase(APAAP)-Nachweisverfahren lieferte eine hohe Reproduzierbarkeit mit dem Zytokeratin-Antikörper (Braun et al., 2001; Pantel und Otte, 2001; Stigbrand et al., 1998). Kreuzreaktivität dieser Antikörper mit Nicht-Epithelzellen konnte durch Doppelmarkierungsstudien weitgehend ausgeschlossen werden (Pantel et al., 1996; Pantel et al., 1994b; Schlimok et al., 1987).

In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl weiterer Systeme zur Detektion von CTC und DTC entwickelt, unter ihnen das CellSearch System (Riethdorf et al., 2007), EpCAM-basierte (Uhr, 2007) und größenbasierte (Pinzani et al., 2006) Anreicherungssysteme, das EPISPOT-System (Alix-Panabieres et al., 2007) und PCRbasierte Methoden (Brakenhoff et al., 1999). Das automatische immunomagnetische System CellSearch, das die immunomagnetische Anreicherung und die Fluoreszenz-Immunocytochemische Charakterisierung von TZ kombiniert, scheint eine Methode zu sein, mit der signifikante Aussagen über die Prognose von Patienten mit PCa, MaCa und kolorektalem Karzinom gemacht werden können (Cohen et al., 2006; Hayes et al., 2006; Shaffer et al., 2007). Basierend auf Studien zur Validierung dieses Systems erkannte die US Food and Drug Administration (FDA) die Detektion von CTC unter Einsatz des CellSearch Systems zum Einschätzen der Prognose und zum Monitoring der Therapieantwort bei Patienten mit metastasiertem PCa und MaCa sowie metastasiertem kolorektalen Karzinom an (de Bono et al., 2008; Pantel et al., 2008; Pantel und Riethdorf, 2009; Riethdorf et al., 2007; Scher und Pantel, 2009).

1.11.4 Genetische und phänotypische Analysen des Primärtumors und der zirkulierenden und disseminierten Tumorzellen

Die genetische und phänotypische Charakterisierung der CTC und DTC dürfte wichtige Informationen über die Metastasierungstendenz, das lokale Wachstumsverhalten und die biologischen Vorraussetzungen, welche die Metastase benötigt, liefern. Damit könnte die Wahl der Therapie, das Verständnis für Therapieresistenz und das Monitoring der adjuvanten Therapie verbessert und somit die Effektivität und Verträglichkeit für den Patienten gesteigert werden.

Komparative genomische Hybridisierungen (CGH) von einzelnen DTC aus KM und CTC aus Blut von Patienten mit verschiedenen Tumorentitäten zeigten eine hohe genetische Divergenz zwischen den TZ und dem Primärtumor (Klein et al., 2002). Überdies hatten die DTC von MaCa-Patientinnen weniger genomische Aberrationen als der Primärtumor von dem aus sie streuten (Schmidt-Kittler et al., 2003). Von Interesse ist, warum sich einige TZ resistent gegenüber der konventionellen Chemotherapie zeigen. Ein Erklärungsansatz ist, dass sich diese Zellen in einem Ruhezustand befinden ("dormancy") befinden (Braun et al., 2000; Müller et al., 2005; Pantel et al., 1993b; Pantel et al., 2009). Tiermodelle ließen vermuten, dass sich ein signifikanter Anteil der TZ nie zu Fernmetastasen entwickelt, sondern abstirbt oder ruht (Chambers et al., 2002). Die Frage, wie solche Zellen wieder aktiviert werden können, um dann Fernmetastasen zu bilden, ist noch nicht abschließend geklärt. Man geht heute davon aus, dass dieser Vorgang aus einem Zusammenspiel von Interaktion mit dem Stroma der aktuellen Umgebung und einer Kombination aus somatischen Aberrationen und hereditären Komponenten resultiert (Wikman et al., 2008).

2. Arbeitshypothese und Fragestellung

2.1 LOH-Analysen in Blut und Knochenmark von Patientinnen mit Mammakarzinom und Patienten mit Prostatakarzinom

Die Identifizierung und Charakterisierung tumorspezifischer Aberrationen in der extrazellulären DNA in Körperflüssigkeiten, wie Blut und KM, könnten von klinischer Bedeutung sein, da vor allem die Mehrzahl der Proteine und Glykoproteine, die in der aktuellen Frühdiagnostik epithelialer Tumore Verwendung finden, als Marker nicht tumorspezifisch sind [Goessl et al., 2002]. Genetische Änderungen, wie LOH und MSI in zirkulierender tumorspezifischer Mikrosatelliten-DNA könnten somit als zusätzliche molekulare Marker ein wichtiges Werkzeug für die Bestimmung der Diagnose, Progression und Therapie von MaCa und PCa werden. Die LOH-Analysen in Tumor, Blut und KM der Patientinnen und Patienten sollen folgende Fragen beantworten:

Besteht ein Zusammenhang zwischen der Menge der tumorassoziierten DNA mit dem Metastasierungsstatus der Patienten, der LOH-Frequenz oder der Anzahl detektierter TZ?

Besteht ein Zusammenhang zwischen der Menge der tumorassoziierten DNA mit ihrem Ursprungsgewebe?

Sind genetische Alterationen wie LOH und MSI in Blut, KM und Tumorgewebe der Patientinnen und Patienten nachzuweisen?

Welche der untersuchten TSG sind am häufigsten von einem LOH oder MSI betroffen?

Besteht ein Zusammenhang zwischen der LOH-Frequenz und dem Auftreten etablierter Risikofaktoren?

Besteht ein Zusammenhang zwischen der LOH-Frequenz und dem Auftreten von CTC im Blut und DTC im KM?

Könnte dieser experimentelle Ansatz ein im Vergleich zu den gängigen diagnostischen Methoden präziseres Screening in der Frühdiagnostik dieser Neoplasien werden?

2.2 Detektion zirkulierender und disseminierter Tumorzellen in Blut und Knochenmark von Patientinnen mit Mammakarzinom und Patienten mit Prostatakarzinom

Die Detektion von CTC im Blut und DTC im KM stellt eine mögliche Methode zum Nachweis einer okkulten Metastasierung dar. Von vielen Autoren wird der Zusammenhang des Nachweises mit einem rezidivfreien Überleben und der Gesamtüberlebenszeit beschrieben. Des Weiteren könnte die Detektion von TZ in Blut und KM für Diagnostik, Prognoseeinschätzung, Metastasierungstendenz, Therapie und postoperatives Monitoring epithelialer Tumore ein wichtiges Tool werden (Pantel und Brakenhoff, 2004; Pantel et al., 2008).

Die Untersuchungen zur Detektion von CTC im Blut und DTC im KM der Patienten sollen folgende Fragen beantworten:

Können CK-positive Zellen im Blut und KM der Patientinnen und Patienten nachgewiesen werden?

Besteht ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von CK-positiven Zellen im Blut und CK-positiven Zellen im KM?

Ist die Bestimmung von CK-positiven Zellen für eine Prognoseabschätzung hinsichtlich der Wahrscheinlichkeit einer Metastasierung beim MaCa und PCa geeignet?

Besteht ein Zusammenhang zwischen der Inzidenz von CK-positiven Zellen in Blut und KM mit dem Auftreten etablierter Risikofaktoren? Besteht ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von CK-positiven Zellen in Blut und KM mit der Detektion genetischer Alterationen in Blut, KM oder Tumorgewebe?

3. Patientenkollektive und Material

3.1 Patientenkollektive (Mamma- und Prostatakarzinompatienten) und Gewebeproben (Blut, Knochenmark und Tumorgewebe)

3.1.1 Einteilung der Patientenkollektive und Gewebeproben

MaCa-Kollektiv	Anzahl der Patientinnen
Blut-Serum	30
KM-Plasma	12
Tumorgewebe	6
Patienten insgesamt	30
Tab. VII: PCa-Patienten	50

Tab. VI: MaCa-Patientinnen

PCa-Kollektiv	Anzahl der Patienten
Blut-Plasma	36
KM-Plasma	21
Patienten insgesamt	36

In der vorliegenden Arbeit wurde Gewebe von insgesamt 66 anonymisierten Patientinnen und Patienten mit epithelialen Tumoren untersucht. Von diesen waren 30 Patientinnen mit gesichertem MaCa und 36 Patienten mit gesichertem PCa. Blut, KM und Tumorgewebe von 10 MaCa-Patientinnen wurden unter der Leitung von Prof. Dr. Jänicke in der Gynäkologischen Klinik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf entnommen. 20 Blut- und KM-Proben wurden von Prof. Dr. Kasimir-Bauer aus dem Universitätsklinikum Essen zur Verfügung gestellt. Blut und KM von 21 PCa-Patienten wurden unter der Leitung von Prof. Dr. med. Hartwig Huland durch Frau Dr. Lange in der Urologischen Klinik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf gewonnen. 15 weitere Proben wurden von der Urologischen Klinik, Montpellier zur Verfügung gestellt. Alle Patientinnen und Patienten stimmten der Verwendung ihrer Daten und Gewebeproben für wissenschaftliche Untersuchungen zu.

3.2 Aufarbeitung von Blut und Knochenmark für den immunzytochemischen Nachweis disseminierter Tumorzellen

Tab. VIII: Materialien,	Reagenzien und Gerä	te, die bei der Blu	ut- und KM-Aufarbeitung	ver-
wendet wurden				

Material/Reagenz/Geräte	Bezugsquelle/Firma
Hank's Salt Solution (1x) ohne Ca^{2+} , Mg^{2+} und Phenol Rot	Biochrom KG
PBS DULBECCOS ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺ und NaH ₂ CO ₃	Gibco BRL
Ficoll-PaqueTM Separating Solution	Amersham Pharmacia Biotech AB
Trypan Blue Solution (0,4%)	Sigma
Objektträger Histo-Bond	Marienfeld
Objektträger Super Frost Plus	Menzel Gläser
Biofuge fresco	Heraeus
MJ Research PTC-200 Peltier Thermal Cyc- ler	Biozym
Vortex Genie 2	Scientific Industries

3.3 Nachweis disseminierter Tumorzellen mit der Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase (APAAP)- Methode

Tab. IX: Materialien, Reagenzien und Geräte, die bei dem immunzytochemischen Nachweis der TZ mit der Alkalische Phosphatase Anti-Alkalische Phosphatase- (APAAP-) Methode verwendet wurden

Material/Reagenz/Geräte	Bezugsquelle/Firma
Dako-Pen	Dako
AB-Serum	Biotest
NaCl	J.T. Baker
$Na_2HPO_4 \ge 2 \cdot H_2O$	Merck
KH ₂ PO ₄	Merck
A45-B/B3 (Primärantikörper muriner mono- klonaler Pan-Cytokeratin-AntikörperIgG1; detektiert CK8, CK18, CK19)	Micromet
MOPC-21 (Isotypkontroll-Antikörper)	Sigma
Brückenantikörper (Kaninchen-Anti-Maus) Z	Dako
APAAP-Komplex (CIAP und muriner mono- klonaler Anti-Alkalische Phosphatase- Antikörper)	
Mammakarzinom-Zelllinie BT-20	
Prostatakarzinom-Zelllinie	
Tris-Puffer 1 M	Gibco BRL
NaNO ₂	Merck
----------------------------------	-------
Levamisol	Sigma
Naphtol AS-BI Phosphat	Sigma
N,N-Dimethylformamid pro analysi	Merck
Neufuchsin	
Hämalaun	
Aquatex	
Kaisers Glyceringelatine	

3.4 Materialien für die DNA-Analyse der Blut-, Knochenmark- und Tumorproben

Tab. X: Gewinnung von Plasma aus den Blut- und KM-Proben; Isolierung der Leukozyten; Extraktion der zirkulierenden DNA aus Tumorgewebe, sowie Blut- und KM-Plasma

Material/Reagenz/Gerät/Software	Bezugsquelle/Firma
Zell-Lyse-Puffer	Qiagen, Hilden
QIAamp DNA Mini Kit (250):	Qiagen, Hilden
Proteinase K-Lösung	
Buffer AL – Lysepuffer	
Buffer AW1 – Waschpuffer 1	
Buffer AW2 – Waschpuffer 2	
Buffer AE – Elutionspuffer	
Thermomixer kompakt	Eppendorf, Hamburg
Vortex Genie 2	Scientific Industries
Biofuge fresco	Heraeus
MJ Research PTC-200 Peltier Thermal Cycler	Biozym
Manifolder (Vakuumkammer)	Qiagen, Hilden
Qiagen-Säule	_
VacConnektoren	_
Säulenaufsatz	
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg

Tab. XI: Nicht-fluoreszenzmarkierte Marker	und fluoreszenzmarkierte Marker für di	e
Polymerase-Kettenraektion (PCR)		

Material/Reagenz/Geräte	Bezugsquelle/Firma
Desoxynucleoside Triphosphate Set (PCR Grade)	Roche, Mannheim
Magnesiumchlorid	Sigma, Taufkirchen
5'Primer	MWG, Ebersberg
3'Primer	_
5'Fluoreszenzprimer	-

AmpliTaq Gold mit GeneAmp 10 x PCR-Puffer	Applied Biosystems, Mannheim
Vortex Genie 2	Scientific Industries

Tab. XII: Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Material/Reagenz/Geräte/Software	Bezugsquelle/Firma
ProtoGel Acryamid (30 % (w/v) Acrylamid: 0,8 % (w/v) Bisacrylamid Stock Solution (37,5:1), Prote- in and Sequencing, Elektrophoesis Grade (Gas Stabilized)	National Diagnostics
5 x TBE (Tris-Borat EDTA)	Biorad, München
Ammoniumpersulfat	Serva, Heidelberg
TEMED (N,N,N´,N´-Tetramethylethylendiamin)	Amersham Bioscience
PhiX 174 DNA / Hinf I Marker	Promega, Mannheim
Elektrophoresis Power Supply Model E143	Consort, Turnhout
Geltrockner Model 583	Biorad, München
Silver Fast Ai	Laser Soft Imaging AG
Photoshop 7,0	Adobe

Tab. XIII: Aufbereitung der PCR-Produkte mit fluoreszenzmarkierten Primer	ukte mit fluoreszenzmarkierten Primern
---	--

Material/Reagenz/Geräte/Software	Bezugsquelle/Firma
HiDi Formamid	Applied Biosystems, Freiburg
Gene Scan ROX Size 500 Standard	Applied Biosystems, Mannheim
HPLC-H ₂ O	Merck; Darmstadt
Genetic Analyzer 310	Applied Biosystems, Mannheim

3.5 Puffer und Lösungen

Tab. XIV: I	Puffer und	Lösungen
-------------	------------	----------

Puffer	Zusammensetzung	Bezugsquelle/Firma
Dulbecco's PBS	w/o Calcium and Magnesium w/o Sodium Bicarbonat	Gibco BRL, Eggenstein
Ethanol 80%, 96%, 100%		Merck, Darmstadt

Fixierlösung	90 ml H ₂ O	Biorad, München
(für 2 Poly-	150 ml Methanol	
acrylamid-Gele)	30 ml Essigsäure 100%	
	30 ml Fixative Enhancer	
5x Loading Buf-	5 ml 50% Glycerol	
fer	1 ml 0,5 M EDTA	
	200 µl 1 M Tris, pH 7,5	
	H ₂ O ad 10 ml	
	Bromphenolblau (1:3)	
	Xylene Cyanol (1:3)	
10x PBS pH 7,4	90 g NaCl	
	14,33 g Na ₂ HPO ₄ x 2·H ₂ O	
	2,67 g KH ₂ PO ₄	
	H ₂ O ad 1 1	
Silbernitrat-	14 ml H ₂ O	
Färbelösung	2 ml Silver Complex Solution	
(für 1 Poly-	2 ml Reduction Moderator	
acrylamid-Gel)	Solution	
	2 ml Image Development	
	Reagent	
	20 ml Development	
	Accelerator Solution	
5x TBE	54 g Trizma Base	
(Tris-Borat	27,5 g Borsäure	
EDTA)	20 ml 0,5 M EDTA pH 8	
	H2O ad 1 1	
Zell-Lyse-Puffer	106,9 g 0,3 M Sucrose	-
	10 ml 1 M10 mM Tris pH 7,5	
	5 ml 1 M 5 ml MgCl2	
	10 ml 100% 1% Triton X 100	
	H2O ad 11	

3.6 Kits

Tab. XV: Kits

Kits	Zusammensetzung	Bezugsquelle/Firma
AmpliTaq Gold	GeneAmp 10x PCR Gold Puf-	Applied Biosystems, Mann-
(200 µl, 1000 U,	fer	heim
5 U/µl)	(1,5 ml 150 mM Tris-HCl,	
	pH 8,0 ; 500 mM KCl)	
	25 mM MgCl ₂ -Lösung (1,5 ml)	

QIAamp DNA Mini Kit (250)	Proteinase K-Lösung Buffer AL – Lysepuffer	Qiagen, Hilden
	Buffer AW1 – Waschpuffer 1	
	Buffer AW2 – Waschpuffer 2	
	Buffer AE – Elutionspuffer	
Silver Stain Plus	Fixative Enhancer Concentrate	Biorad, München
	Silver Complex Solution	
	Reduction Moderator Solution	
	Image Development Reagent	
	Development Accelerator Re-	
	Development Accelerator So-	

3.7 PCR-Primer

3.7.1 Fluoreszenzmarkierte PCR-Primer für die Analysen der Mammakarzinom-Proben

D17S855, 17q21	(5´6-FAM)	
Forward Primer:	GGA TGG CCT TTT AGA AAG TGG	54°C
Reverse Primer:	ACA CAG ACT TGT CCT ACT GCC	143 bp

D17S250, 17q11.2-12 (5'HEX)

Forward Primer:	GGA AGA ATC AAA TAG ACA AT	47°C
Reverse Primer:	GCT GGC CAT ATA TAT ATT TAA ACC	151 bp

D16S421,16q22-23 (5'6-FAM)

Forward Primer:	ACA TGA ACC GAT TGG ACT GA	52°C
Reverse Primer:	CCG TTC CCT ATA TTT CCT GG	206-216 bp

3.7.2 Fluoreszenzmarkierte PCR-Primer für die Analysen der Prostatakarzinom-Proben

THRB, 3p24	(5'HEX)	
Forward primer:	GATCACAAGGAGCTAGAGT	56°C
Reverse primer:	TCAAAGGAGTCAGGCTGTAG	197 bp
D6S1631, 6q16	(5 HEX)	

Forward primer:	TTTGGCTTGAGAACATTTACC	54°C
-----------------	-----------------------	------

Reverse primer:	GTGCCACACTGCCTCTAA	164-182 bp
D8S87, 8p12	(5'TAMRA)	
Forward primer:	GGGTTGTTGTAAATTAAAAC	53°C
Reverse primer:	TGTCAAATACTTAAGCACAG	145 bp
D98171 9n21	$(5^{\prime}T\Delta MR\Delta)$	
Eorword primary		6190
Forward primer.		01 C
Reverse primer:	ACCCIAGCACIGAIGGIAIAGICI	158-177 bp
D9S1748, 9p21	(5'HEX)	
Forward primer:	CACCTCAGAAGTCAGTGAGT	53°C
Reverse primer:	GTGCTTGAAATACACCTTTCC	130 bp
D115808 11a22	(5'6 EAM)	
Earward ariman		5600
Forward primer:	AGCACCATTIGCIGAGACIG	50°C
Reverse primer:	TGTATITGTATCGATTAACCAACIT	140-156 bp
D11S1313, 11q12	(5´6-FAM)	
Forward primer:	CTAAGCATGANGCCAAGTTA	56°C
Reverse primer:	AGTTTGACATTAGGGAATTTTGA	184-204 bp
-		-

Für die LOH-Analysen der PCa-Proben mit der Gelelektrophorese wurden die oben angegeben Primer in nicht-fluoreszenzmarkierter Form verwendet.

4. Methoden

4.1 Knochenmark- und Blutzytologie- Aufbereitung und Anreicherung mononukleärer Zellen

Sowohl für Multizenterstudien als auch für die routinemäßige diagnostische Anwendung der Detektion von CTC und DTC, ist es wichtig, die Methoden so zu gestalten, dass hohe Effizienz und Vergleichbarkeit garantiert sind. Mit modernen Aufbereitungssystemen scheinen diese Anforderungen erfüllt werden zu können. Sowohl Arbeiten einzelner Forschungsgruppen, als auch laborübergreifende Studien und Symposien beschäftigen sich zurzeit mit dem Entwurf effizienter, standardisierter Modelle.

4.1.1 Gewinnung und Aufbereitung der Gewebeproben und Herstellung der Zytospins

Sowohl aus Blut (ca. 20 ml) als auch aus KM (5-10 ml) der MaCa-Patientinnen und PCa-Patienten wurden die mononukleären Zellen angereichert. Alle Arbeiten wurden an einer Sterilbank durchgeführt. Die Anreicherung der Zellen erfolgte über einen Ficoll-Gradienten.

Von den Blut- und KM-Proben wurden nach 5minütiger Zentrifugation bei 1400 rpm 3-4 ml Plasma abgenommen und in Cryo-Röhrchen bis zur Isolierung und Analyse der zirkulierenden DNA bei -20°C gelagert. Die verbliebenen 16-17 ml Blut wurden mit kalter Hanks-Lösung auf 30 ml aufgefüllt und bei 1400 rpm und 4°C 10 min. zentrifugiert. Danach wurde die Fettphase abpipettiert und verworfen. Das Sediment wurde mit kaltem PBS-Puffer auf 30 ml aufgefüllt. Verdünntes Blut und KM wurden dann vorsichtig auf 20 ml Ficoll-Plaque-Lösung überschichtet. Die Gradienten wurde nei 1400 rpm und 4°C für 40 min zentrifugiert. In der Interphase reicherten sich die mononukleären Zellen an. Das Sediment der Blutproben, welches Leukozyten und Erythrozyten enthielt, wurde für die DNA-Isolierung aus den Leukozyten weiterverarbeitet (s. Kap. 4.2.1 und 4.2.2). Der Überstand und die Interphase wurden in ein neues Falcon-Röhrchen überführt und mit PBS-Puffer auf 50 ml aufgefüllt. Anschließend erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 1400 rpm und 4°C; der Überstand wurde danach entfernt. Da das Sediment neben den mononukleären Zellen auch Spuren von Erythrozyten enthielt, wurde eine Erythrozyten-Lyse durchgeführt. Dazu wurde das Sediment mit 1 ml H-Lyse-Puffer resuspendiert, dann mit 50 ml Waschpuffer W aufgefüllt und für 10 min bei 1400 rpm zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 10 ml PBS-Puffer resuspendiert.

Das Auszählen der Zellen erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer. Dazu wurden 10 μ l der Lösung 1:2 mit 10 μ l Trypan Blue Solution gemischt. Nur die intakten, nicht mit Trypan Blue angefärbten Zellen wurden in den vier Quadraten der Zählkammer gezählt und der Mittelwert bestimmt. Für die Berechnung der Zellzahl wurde der Verdünnungsfaktor von 2 berücksichtigt, da die Zellsuspension mit Trypan Blue 1:2 verdünnt worden ist, sowie der Faktor von 10⁴, um die Zellzahl pro 1 ml Blut bzw. KM zu ermitteln. Die Gesamtzellzahl wurde auf das Volumen, in dem die Zellen resuspendiert wurden, bezogen.

Zur Herstellung der Zytospins wurden jeweils ca. 700.000 mononukleäre Zellen bei 1000 rpm für 3 min auf Super-Frost-Objektträger zentrifugiert. Die Cytospins wurden über Nacht luftgetrocknet und dann bis zur immunzytochemischen Färbung in Alufolie gewickelt bei -80°C aufbewahrt.

4.1.2 Immunzytochemische Detektion disseminierter Tumorzellen

4.1.2.1 Immunzytochemische Behandlung der mononukleären Zellen

Die Behandlung der Zytospins zum Nachweis Zytokeratin(CK)-positiver Zellen erfolgte mit der APAAP-Methode. Nach Auftauen der Zytospins und Umrandung der Areale auf den Zytospins, auf denen sich die Zellen befanden, mit dem DAKO-Pen, wurden die Zytospins zur Blockierung unspezifischer Bindungen 20 min mit 150 µl 10%iger AB/PBS-Lösung behandelt. Als Primärantikörper diente der monoklonale Maus-Antikörper A45-B/B3 (IgG₁) in einer Konzentration von 2 µg/ml (zweiter Inkubationsschritt: 20 min). A45-B/B3 (IgG₁) ist gegen die CK-Heterodimere CK8, CK18, CK19 gerichtet. Als Isotypenkontroll-Antikörper wurden 120 µl MOPC-21 (IgG1) eingesetzt (dritter Inkubationsschritt: 45 min). Dieser Antikörper reagiert nicht mit epithelialen Antigenen; somit sollte keine Farbrektion aufgetreten sein. Als Sekundär- oder Brückenantikörper dienten 120 µl Kaninchen-Anti-Maus-Antikörper (Z259) (vierter Inkubationsschritt: 45 min). Die vierte Inkubation diente der farblichen Markierung des durch Primär- und Sekundär- bzw. Brückenantikörper gebundenen Zytokeratins auf den epithelialen Zellen. Hierzu wurde der APAAP-Enzymkomplex verwendet. Der Komplex besteht aus dem Enzym Alkalische Phosphatase und einem gebildeten monoklonalen Maus-Antikörper gegen dieses Enzym. Für die spezifische Erkennung müssen beide, Primärantikörper und der Antikörper des Enzymkomplexes, von derselben Tierart stammen. Nach dreimaligem je 3minütigem Waschen der Zytospins in 1xPBS-Puffer erfolgte die 30minütige Inkubation mit 120 µl des APAAP-Komplexes. Danach wurde erneut 3 x 3 min mit PBS gewaschen.

Die primäre Mammakarzinomzelllinie BT-20 diente als Positivkontrolle für die Proben der MaCa-Patientinnen (Braun et al., 2000), für die PCa-Proben wurde die Zelllinie 3T3 mit MCF7 bestickt verwendet.

4.1.2.2 Färbung und Gegenfärbung

Für die Substratentwicklung wurde eine Neufuchsin-Substratlösung hergestellt:

Lsg. 1: 78,8 ml H₂O + 4,2 ml 1M Tris-Lsg., pH = 9,5 + 200 μ l 0,625M Levamisol Lsg. 2: 415 μ l NaNO₂ + 166 μ l 5 % Neufuchsin, 3 min Inkubation Lsg. 3: 42 mg Naphtol-AS-Biphosphat in 500 μ l Dimethylformamid

Beide Lösungen 1 und 2 wurden gemischt und dann Lösung 3 dazugegeben. Sofort im Anschluss wurde das Substrat auf die Zytospins gegeben und für 20 min inkubiert. Levamisol ist für die endogene (Knochengewebe und Leukozyten) Hemmung der Alkalische Phosphatase verantwortlich.

Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit Hämalaun. Als Fixierlösung wurde 0,1% HOAC und zum Nachbläuen NaHCO3 verwendet. Im Anschluss wurden die Zellen mit Glyzergel Mounting Medium eingedeckelt.

4.1.2.3 Auswertung

Die Auswertung der Zytospins wurde mit dem "Automated Cellular Imaging System" (ACIS; Choma Vision Medical System, Inc., San Juan Apistrano, Kalifornien, USA) durchgeführt. Die ACIS-Software erkennt die durch die APAAP-Methode markierten Zellen. Die positiven Ergebnisse wurden zur Beurteilung, ob es sich um TZ handelt, von mindestens zwei Personen unabhängig voneinander bewertet. Die Detektion der TZ mit der Software des ACIS-Systems zeichnet sich gegenüber der rein manuellen Lichtmikroskopie durch eine wesentlich höhere Sensitivität und Reproduzierbarkeit aus (Bauer et al., 2000; Borgen et al., 1999; Funke und Schraut, 1998).

4.2 Genanalyse der Blut-, Knochenmark- und Tumorproben

4.2.1 Gewinnung von Plasma aus den Blut- und Knochenmark-Proben und Isolierung der Leukozyten

Von den ca. 20 ml Vollblut und den ca. 5-10 ml KM-Proben, wurden nach Zentrifugation für 5 min bei 1400 rpm 3-4 ml Plasma abgenommen und in Cryo-Röhrchen bis zur Isolierung und Analyse der zirkulierenden DNA bei -20°C gelagert. Das Sediment, das nach der Anreicherung der Zellen die Leukozyten und Erythrozyten enthielt, wurde mit einem 4°C kalten Lysepuffer versetzt und für 20 min auf Eis gestellt. Die zunächst nicht durchsichtigen Blutsuspensionen wurden durch die Lyse klar und transparent und durch die Erythrozytenlyse dunkelrot. Die Sedimentation der Leukozyten erfolgte durch 20minütige Zentrifugation mit 3500 rpm bei 5°C. Die Pellets wurden in 30 ml kaltem Lyse-Puffer gewaschen und dann erneut mit 3500 rpm bei 5°C zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurden die Leukozyten-Pellets bei -20°C in 1,5 ml Tubes gelagert.

4.2.2 Isolierung zirkulierender DNA aus dem Blut- und KM-Plasma und Isolierung der DNA aus dem Tumorgewebe

Die Isolierung zirkulierender DNA aus dem Plasma von Blut und KM wurde mit Hilfe des QIAmp DNA Mini Kits durchführt. Nach dem Auftauen der eingefrorenen Blut- und KM-Plasmen wurden ¹/₁₀ des Plasma-Volumens Proteinase K und ein Volumen Lysepuffer AL zu den Plasmen hinzugefügt, um die Proteine im Plasma abzubauen und die DNA von bindenden Proteinen zu befreien. Die Inkubation erfolgte bei 56°C auf einem Thermomixer für 10 min. Die DNA wurde mit einem Volumen 100%iges Ethanol präzipitiert. Qiagen-Säulen mit VacConnectoren und Säulenaufsatz wurden auf eine Vakuumkammer (Manifolder) montiert und das Lysat/Ethanolgemisch wurde auf die Säulen gegeben. Bei geschlossenem Hahn wurde das Vakuum über eine Wasserstrahlpumpe in der Kammer unter den Säulen angelegt. Das Gemisch wurde bei aufgedrehtem Hahn durch das Vakuum in die Kammer gezogen, wobei die DNA an die Säulenmatrix gebunden wurde. Um ungebundenes Material von der Säule zu waschen, wurden nacheinander je 700 μ l Waschpuffer AW1 bzw. AW2 auf die Säulen gegeben. Nach den Waschschritten wurden die Säulen in ein Tube gestellt und bei maximaler Geschwindigkeit für 1 min zentrifugiert. Sie wurden dann in ein neues Tube gestellt und die DNA wurde mit 100 μ l Elutionspuffer AE bei einer Zentrifugation für 1 min bei 5000 rpm eluiert. Das Total-Volumen der eluierten zirkulierenden DNA betrug 100 μ l. Die Konzentration der zirkulierenden DNA wurde in einem UV-Spektrometer bestimmt (s. Kap. 4.2.4) Die DNA wurde bei 4°C gelagert.

4.2.3 Isolierung der genomischen DNA aus den Leukozyten

Die Leukozyten-Pellets wurden zur Isolierung der genomischen DNA (gDNA) unter Verwendung des QIAmp DNA Mini Kits nach einem leicht veränderten Protokoll extrahiert. Die Zellen wurden in 200 µl PBS-Puffer aufgenommen. Um die Zellen zu lysieren und die gDNA von Proteinen zu befreien, wurden 20 μ l ($^{1}/_{10}$ – Volumen) Proteinase K und 200 µl Lysepuffer AL zu den gelösten Zellen gegeben. Während der Inkubationszeit (56°C, 2-3 Stunden) wurde das Gemisch alle 30 min gevortext. Zum Fällen der gDNA wurden 200 µl 100% Ethanol zugegeben. Das Lysat-Ethanolgemisch wurde während einer 1minütigen Zentrifugation von 5000 rpm durch eine Qiagen-Säule in ein Eppendorf-Tube gezogen. Die an der Säule gebundene gDNA wurde durch Zugabe von je 500 µl Waschpuffer AW1 bzw. AW2 und einer Zentrifugation bei 5000 rpm für je 1 min gewaschen. Durch eine dritte Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit für 1 min wurde die Säule von restlichem Waschpuffer befreit. Dann wurde die Säule in ein neues beschriftetes 1,5 ml Eppendorf-Tube gestellt. Für die Elution der gDNA von der Säule wurden zweimal je 100 µl Elutions-Puffer AE auf die Säule gegeben, 1 min inkubiert und 1 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Die Konzentration der eluierten Leukozyten-DNA $(200 \ \mu l)$ wurde in einem UV-Spektrometer bestimmt (s. Kap. 4.2.4). Die DNA wurde bei 4°C gelagert.

4.2.4 Spektrometrische Quantitätsbestimmung der genomischen DNA

Die Konzentrationsbestimmung der gDNA aus Blut- bzw. KM-Plasma und Tumorgewebe erfolgte durch Messung der optischen Dichte (OD) bei 260 nm in einem UV-Spektrometer. Das UV-Meter wurde mit 100 µl Elutionspuffer AE als Blank geeicht. Anschließend wurden jeweils 100 µl der eluierten DNA aus Blut- bzw. KM-Plasma bzw. 50 µl der eluierten DNA aus Tumorgewebe für die OD-Messung bei 260 nm eingesetzt. Zum Errechnen der DNA-Konzentration kann folgende Formel verwendet werden:

DNA-Konzentration ($\mu g/\mu l$) = OD260 x 50 ($\mu g/\mu l$) x Verdünnungsfaktor Eine gemessene OD260 von 1 entspricht einer DNA-Konzentration von 50 mg/ml.

4.2.5 Qualitätsbestimmung der genomischen DNA

Die Qualität der gDNA lässt sich durch die zusätzliche Messung bei einer OD von

280 nm bestimmen.

 $E_{260}/E_{280} = 1,8$ bis 2,0 lässt auf reine DNA schließen. $E_{260}/E_{280} < 1,6$ weist auf Proteinverunreinigungen hin.

4.2.6 PCR zur Detektion genetischer Alterationen mit nichtfluoreszenzmarkierten Primern

Saiki und Mullis wurden 1993 für die Entwicklung der aus der modernen Molekularbiologie nicht mehr wegzudenkenden Methode der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet (Mullis, 1990; Saiki et al., 1985). Die PCR ist eine Methode zur selektiven Vervielfältigung von Nukleinsäuren, bei der spezifische DNA-Sequenzen unter Einsatz eines Primersets, bestehend aus einem Sense-Primer (5[^]) und einem Antisense-Primer (3[^]), angereichert werden können. Schon geringste Ausgangsmengen DNA können durch die PCR exponentiell amplifiziert werden (White et al., 1989). Die gesamte Reaktion beruht auf 3 Teilschritten mit jeweils unterschiedlichen Temperaturen: Denaturierung, Primer-Annealing Elongation. Primer DNA-Einzelstränge und sind kurze (Oligonukleotide), die etwa 15 bis 30 Basen lang sind. Sie binden jeweils an die zu amplifizierende DNA-Sequenz des sense(5')- und antisense(3')-Strangs.

Von der Länge und Basenzusammensetzung der Primer hängt die Schmelztemperatur bzw. Annealingtemperatur der Primer ab. Die Annealingtemperatur lässt sich für kurze Primer mit einer Länge von ungefähr 20 Basen mit Hilfe der GC-Formel abschätzen, die die Zahl der Wasserstoffbrückenbindungen im Molekül berücksichtigt. G und C bilden drei und A und T bilden zwei Wasserstoffbrückenbindungen miteinander aus.

- T_m in °C = 2·(A + T) + 4·(G + C)
- A Anzahl der Adeninbasen
- T Anzahl der Thyminbasen
- G Anzahl der Guaninbasen
- C Anzahl der Cytosinbasen

Eine Standard-PCR-Reaktion wurde nach folgendem Schema pipettiert:

Reagenz	Eingesetzte Menge	End-Konzentration
gDNA-Template	50 ng	
10 x PCR Puffer	3 µl	1 x
25 mM MgCl2	3,6 µl	3 mM
2 mM dNTPs	3 µl	200 µM
20 µM 5 Primer	0,5 µl	10 pM
20 µM 3 Primer	0,5 µl	10 pM
AmpliTaq Gold DNA- Polymerase (5 U/µl)	0,4 µl	2 U
H ₂ O	Ad 30 µl	

Tab. XVI: Standard-Reaktionsansatz der PCR

Die PCR wurde in einem Thermocycler durchgeführt. Die Standardbedingungen für das PCR-Programm gelten wie folgt:

Tab. XVII: St	tandard-Bedingungen	der	PCR
---------------	---------------------	-----	-----

Vorgang	Temperatur	Dauer	Zyklus
Aktivierung der AmpliTaq Gold DNA- Polymerase	95°C	5 min.	1 Zyklus
Denaturierung der DNA; Die DNA wird in Einzelstrang-DNA zer- legt → Matrix für die Synthese	95°C	25 sek.	40 Zuldan
Annealing der Primer: Bindung der im Überschuss vorliegenden Oligonukleotid-Primer an die komplemen- täre Basensequenz der Einzelstrang-DNA.	X (55-72)°C	30 sek.	- 40 Zykien

Elongation:			
Verlängerung der Primer durch die			
AmpliTaq Gold DNA-Polymerase:			
Sie folgt dem Einzelstrang in (3 [^])-(5 [^])-	72°C	30 sek.	
Richtung. Die Amplifikation erfolgt expo-			
nentiell und ist begrenzt durch die Anzahl			
der Oligonukleotide.			
Komplettierung der Elongation:			
Unvollständig kopierte Replikate werden	72°C	7 min.	1 Zyklus
fertig synthetisiert.			

4.2.7 Bestimmung der spezifischen Annealingtemperatur mit der Gradienten-PCR

Primer haben individuelle Schmelztemperaturen T_m , die vom GC-Gehalt und der Länge des Oligonukleotids abhängt. In einer Gradienten-PCR wird ermittelt, bei welcher Temperatur beide Primer optimal an das zu amplifizierende DNA-Template binden können. Der Temperaturbereich wird so gewählt, dass er die errechneten Annealingtemperaturen beider Primer umfasst. Die PCR-Bedingungen und das Pipettierschema bleiben gleich (s.o.), nur die Annealingtemperatur steigt in einem Gradienten von links nach rechts im Gradienten-Thermocycler an. Die jeweiligen Temperaturen an den einzelnen Positionen der PCR-Tubes im Gradienten-Cycler werden vom PCR-Programm vorgegeben.

Mit Hilfe des "Genetic Analyzer" kann die Spezifität und Quantität der Banden für die einzelnen Temperaturen beurteilt und die optimale Temperatur für jedes Primerpaar ermittelt werden.

4.2.8 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

4.2.8.1 Fertigung der Gele

Die PCR-basierte MSI- bzw. LOH-Analyse wurde aufgrund einer sehr genauen Analyse auch geringster Mengen von DNA mit dem "Genetic Analyzer" durchgeführt. Einige Proben wurden zusätzlich mit der Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) untersucht. Aufgrund des hohen Auftrennungsvermögens eines 12% igen Polyacrylamidgels konnten die DNA-Fragmente, die sich in ihrer Größe nur wenig unterscheiden, aufgetrennt werden. Die 12% ige Polyacrylamidlösung wurde mit folgenden Reagenzien hergestellt:

Reagenz	Eingesetzte Menge	Funktion
30 % Polyacrylamid	12,5 ml	Polymerisation, Vernet- zung der linearen Polyme- re durch N,N'- Methylenbisacrylamid
5 x TBE (54 g Trizma Base; 27,5 g Borsäure; 20 ml 0,5 M EDTA, pH 8; ad 11 H ₂ O)	5 ml	Laufpuffer
H ₂ O	7,5 ml	pH-Einstellung
10 % Amoniumpersulfat (APS)	150 µl	Polymerisationsinitiator
TEMED	25 µl	Katalysator der Polymeri- sation

Tab. XVIII: Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zuerst wurde aus Polyacrylamid (PA), 5 x TBE und H_2O ein Ansatz vorbereitet, zu dem das Ammoniumpersulfat und TEMED hinzugefügt wurden. Das Gießen der 2 Gele erfolgte in einem Gießstand. Jeweils eine Glasplatte wurde mit einer Aluminiumplatte kombiniert, wobei zwischen den beiden Platten am rechten und linken Rand Spacer angebracht wurden. Die PA-Lösung wurde zügig und blasenfrei zwischen die Platten pipettiert und jeweils ein Kamm mit 10 Zinken zum Aussparen der Taschen zwischen die Platten in die PA-Lösung gesteckt. Nach der Polymerisation (ca. 30 min) wurde das Gel in eine Elektrophoresekammer eingespannt und mit dem Laufpuffer 1 x TBE vollständig bedeckt. Jeweils 30 µl PCR-Produnkt wurden mit je 5 µl Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Für die Größenbestimmung der Allele wurden 10 µl des DNA-Markers phi174 (750 ng) in die jeweils erste Tasche geladen. Bei einer Spannung von 150 V (25 V/cm) wurden die Gelbanden für ca. 1,5-2 Std. in dem elektrischen Feld getrennt. Die Banden (Allele) waren optimal aufgetrennt, wenn die Xylencyanol-Front des Ladepuffers, die bei ca. 60 bp lief, das untere Ende des Gels erreicht hatte. Nach der Auftrennung der Banden erfolgte die Silberfärbung der Gele.

4.2.8.2 Silberfärbung der Polyacrylamidgele

Die Gele wurden nach der Elektrophorese mit einer Fixierlösung (150 ml Methanol, 30 ml Essigsäure, 30 ml Fixier-Enhancer Konzentrat, 90 ml H₂O) auf einem Schüttler für 20 min inkubiert. Nach 2maligem Waschen der Gele mit einem Überschuss an H₂O für jeweils 10 min wurden die Gele mit einer Silbernitratlösung gefärbt, bis die Banden deutlich sichtbar waren. Mit 5%iger Essigsäure wurde die Farbreaktion gestoppt (15 min). Schließlich wurde das Gel mit H₂O für 5 min gespült.

4.2.8.3 Scannen der Gele

Die PA-Gele wurden am Computer mit dem Programm Silver Fast Ai bei Einstellungen von 500 dpi und 16 bit Graustufen eingescannt und mit Adobe Photoshop 7,0 bearbeitet.

4.2.8.4 Trocknen der Gele

Um die Gele zu konservieren, wurden sie auf Whatmanpapier gelegt, mit einer Ceranfolie bedeckt und bei 80°C für 30 min vakuumgetrocknet.

4.2.9 PCR mit fluoreszenzmarkierten Primern

Für die fluoreszenzmarkierte PCR wurden folgende Reagenzien benutzt:

Reagenz	Eingesetzte Menge	Endkonzentration
gDNA-Template	10 ng	
10x PCR Puffer	1 µl	1x
25 mM MgCl ₂	1 µl	2,5 mM
2 mM dNTPs	1 µl	200 µM
20 µM 5 Fluoreszenz-Primer	0,2 μl	11 pM
20 µM 3 Primer	0,2 µl	11 pM
AmpliTaq Gold DNA- Polymerase (5 U / µl)	0,1 µl	1,5 U
H ₂ O	Ad 10 µl	

Tab. XIX: Reagenzien für die fluoreszenzmarkierte PCR

Die Amplifikation wurde mit einem 5'Fluoreszenz-Primer und einem nichtmarkierten 3'Primer durchgeführt. Diese Primer sind an ihrem 5'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff FAM, HEX oder TAMRA markiert. Das Gesamtvolumen des Ansatzes wurde auf ein Drittel (10 μ l) und alle Komponentenvolumina proportional dazu reduziert.

4.2.9.1 Probenaufbereitung, Denaturierung und Messung

Nach der PCR mit dem Standard-PCR-Programm (s. Tab. XVII) wurden die PCR-Produkte der Leukozytenproben mit HPLC-H₂0 1:20 verdünnt. Die Blut-, KM- und Tumorproben wurden jedoch unverdünnt eingesetzt. Für die Analyse am "Genetic Analyzer" wurde der folgende Ansatz in 0,5 ml-Eppendorf Tubes pipettiert und für 2 min. bei 94°C denaturiert:

0,5 µl fluoreszenzmarkiertes PCR-Produkt (1:20 Verdünnung)

+ 40 µl HiDi Formamid (ultrarein)

+ 0,2 µl ROX Size Standard (für interne Standardisierung)

Nach Entfernung der Deckel wurden die Tubes mit den denaturierten Proben mit einer Durchstechmembran verschlossen. Die Tubes wurden in die genau angeordneten Steckplätze eines Ständers platziert, der dann in das Gerät "Genetic Analyzer 310" gestellt wurde. Während der Messung wurden nacheinander in jede Probe eine Elektrode und eine Kapillare, die mit einer Gelmatrix gefüllt war, geführt und für jeweils 3 sek. ein Aliquot der Proben in das Gel der Kapillare gesaugt. In der anschließenden Kapillarelektrophorese, die bei 15 kV, 0,9 mA und 60°C durchgeführt wurde und für jede Probe 24 min. dauerte, wurden die PCR-Produkte entsprechend ihrer Größe aufgetrennt.

5. Ergebnisse

In der vorliegenden Studie wurden Tumorgewebe, Blut und KM von 66 Patientinnen und Patienten mit epithelialen Tumoren (30 Patientinnen mit MaCa und 36 Patienten mit PCa) untersucht.

5.1 Einteilung der Mammakarzinom-Patientinnen und Prostatakarzinom-Patienten in Kollektive

Die insgesamt 66 Patientinnen und Patienten wurden in Kollektive unterteilt, welche die geltenden Prognosekriterien für das MaCa bzw. das PCa berücksichtigen (Tab. XX). Die Kollektive wurden deskriptiv analysiert und soweit sinnvoll in Korrelationsanalysen ausgewertet.

Kriterium	Low risk	n	High risk	n
Alter	< 50 Jahre	9	≥50 Jahre	21
Tumorgröße	Tumor im Stadium T1oder T2 (Tumor < 5 cm in größter Ausdehnung, keine Infiltration der Haut oder der Brust- wand)	26	Tumor im Stadium T3 oder T4 (Tumor jeglicher Größe mit Infiltration der Haut oder der Brustwand)	2
Nodalstatus	Keine (N0)	19	Vorhanden (N1)	9
Fernmetastasenstatus	Keine (M0)	27	Vorhanden (M1)	2
Metastasierungsstatus	Keine (N0+M0)	18	Vorhanden (N1/M1)	10
Grading	Gemäß dem exakten V	Wert		
Her/2neu	Gemäß dem exakten V	Wert		
ER	Negativ	10	Positiv	19
PR	Negativ	12	Positiv	17
CEA (ng/ml)	< 5	17	≥5	2
CA 15-3 (U/I)	<25	18	≥ 25	10

Tab. XX: Kollektive der MaCa-Patientinnen unterteilt nach Prognosekriterien

n entspricht der jeweiligen Anzahl der Patientinnen, bei denen die entsprechenden klinischen Parameter durch die behandelnden Kliniken erhoben worden sind, sodass n nicht der Größe des Gesamtkollektivs entsprechen muss. Bei den Parametern Grading (1,2,3) und Her/2neu (0,1,2,3) wurden die Kollektive entsprechend dem exakten Wert eingeteilt.

Kriterium	Low risk	n	Median Risk	n	High risk	n
Alter (Jahre)	< = 60	6	> 60-80	27	> 80	3
Tumorgröße	T1, T2 (Tumor auf Prostata begrenzt)	22			T3 (Tumor hat die Pros- tatakapsel durchbrochen	14
Nodalstatus	Keine (N0)	30			Vorhanden (N1)	4
Fernmetastasenstatus	Keine (M0)	28			Vorhanden (M1)	3
Metastasierungsstatus	Keine (N0+M0)	25			Vorhanden (N1+M1)	6
Gleason-Score	<7	13			≥7	21
t-PSA (ng/ml)	< 4	2	4-10	12	> 10	22

Tab. XXI: Kollektive der PCa-Patienten unterteilt nach Prognosekriterien

n entspricht der Anzahl der Patienten, bei denen die entsprechenden klinischen Parameter durch die behandelnden Kliniken erhoben worden sind, so dass n nicht der Größe des Gesamtkollektives entsprechen muss.

Aufgrund der besonderen Bedeutung des Metastasierungsstatus für die Auswertung der Ergebnisse der detektierten TZ wird hier der Metastasierungsstatus unterteilt nach Art des Gewebes dargestellt.

	Gesamt	ohne Metastasen	mit Metastasen	mit Lymphknoten-	mit Fern-
	n	n (n%)	n (n%)	metastasen n (n%)	metastasen n (n%)
Blut	29	19 (65%)	10 (34%)	9 (31%)	2 (6%)
KM	7	3 (5%)	3 (5%)	3 (5%)	0 (0%)
Tumor	6	3 (6%)	2 (4%)	2 (4%)	0 (0%)

Tab. XXII: Kollektive der Blut-, KM und Tumor-Proben von MaCa-Patientinnen unterteilt nach dem Metastasierungsstatus

	Gesamt	ohne Metastasen	mit Metastasen	mit Lymphknoten-	mit Fern-
	n	n (n%)	n (n%)	Metastasen n (n%)	metastasen n (n%)
Blut	36	24 (77%)	6 (19%)	4 (12%)	3 (9%)
KM	21	20 (95%)	1 (5%)	1 (5%)	0 (0%)

Tab. XXIII: Kollektive der Blut- und KM-Proben von PCa-Patienten unterteilt nach dem Metastasierungsstatus

5.2 Statistische Methodik

Die in den labortechnischen Analysen erhobenen Daten umfassen die Konzentrationen der zirkulierenden DNA im Blut, die detektierten LOH im Blut, KM und Tumorgewebe und die detektierten CTC im Blut und DTC im KM. Tumorgewebe war nur im Kollektiv der MaCa-Patienten vorhanden (s. Tab. VI). Quantitative Parameter wurden anhand von Mittelwert und Standardabweichung, Minimum und Maximum sowie den drei Quartilen dargestellt.

Die erhobenen Daten wurden gemäß folgender Tabelle mit den klinischpathologischen Parametern, jeweils nach den geltenden Prognosekriterien unterteilt, korreliert. Die angewandten statistischen Tests waren Kolmogorov-Smirnov-Test, Chi-Quadrat-Test nach Pearson, U-Test nach Mann und Whitney und der T-Test für unabhängige Stichproben. Mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test wurden die quantitativen Größen auf Normalverteilung geprüft, je nach Verteilung wurden der U-Test oder der t-Test für unverbundene Beobachtungen genutzt, um zwei unabhängige Stichproben hinsichtlich eines quantitativen Parameters miteinander zu vergleichen. Es wurde stets zweiseitig getestet und ein Signifikanzniveau von 5% zu Grunde gelegt. Die statistische Analyse wurde mit SPSS für Windows Version 15 (SPSS Inc., Chicago, IL) durchgeführt.

Patienten-	Korrelationsparameter 1	Korrelationsparameter 2				
kollektiv	*	•				
MaCa-	a) LOH	Alter				
Patientinnen	(Blutserum/	Primärtumor				
	KM-Plasma/	Tumorstadium				
	Tumorgewebe)	Nodalstatus				
	b) CTC (Blutserum)	Fernmetastasierungsstatus				
	DTC (KM-Plasma)	Metastasierungsstatus (Lymphkno- ten- und Fernmetastasen)				
	c) Konzentration zirkulie-	Grading				
	(Plutorum/KM Plasma)	Östrogenrezeptor(ER)-Status				
	(Diviseruiii/Kivi-Flasilia)	Progesteronrezeptor(PR)-Status				
		Her/2neu-Status				
		CEA				
		CA 15-3				
PCa-	a) LOH	Alter				
Patienten	(Blutplasma/KM-	Tumorstadium				
	Plasma/Tumorgewebe)	Nodalstatus				
	b) CTC (Blutplasma)	Fernmetastasierungsstatus				
	DTC (KM-Plasma)	Metastasierungsstatus (Lymphkno- ten- und Fernmetastasen)				
	c) Konzentration zirkulie-	Gleason				
	render DNA (Blutplasma)	t-PSA				

Tab. XXIV: Korrelationsanalyse der erhobenen Ergebnisse.

5.3 DNA-Extraktion und Quantifizierung - Korrelation der Konzentration frei im Blut zirkulierender DNA mit den Prognoseparametern

Aus dem Blutserum von 30 MaCa-Patientinnen wurde die zirkulierende DNA isoliert. Von 7 dieser Patientinnen stand KM und von 6 Patientinnen Tumorgewebe zur Verfügung. Auch aus diesen Materialien wurde die DNA isoliert. Zusätzlich wurde aus dem Blutplasma von 36 Patienten mit PCa die zirkulierende DNA isoliert. Von 21 dieser Patienten stand KM zur Verfügung, aus dem ebenfalls die DNA isoliert wurde. In der folgenden Tabelle XXV sind die Konzentrationen der zirkulierenden DNA aus dem Blut der MaCa-Patientinnen und PCa-Patienten ohne und mit Metastasen dargestellt.

Die durchschnittliche DNA-Konzentration im Blut der MaCa-Patientinnen lag bei 1379 ng/ml und war somit wesentlich höher als die durchschnittliche DNA- Konzentration im Blut der PCa-Patienten (759 ng/ml). Zudem fand sich in der deskriptiven Analyse der DNA-Konzentrationen im Blutserum der MaCa-Patientinnen im Kollektiv der Patientinnen mit Lymphknotenmetastasen (N1) ein mit 2802,11 ng/ml deutlich höherer Mittelwert der DNA-Konzentration als bei dem Kollektiv ohne Lymphknotenmetastasen (N0) (738,53 ng/ml) (Abb. 5A). Der Median lag bei 408 bzw. 467. Auch bei den PCa-Patienten lag der Mittelwert der DNA-Konzentration bei den N1-Patienten mit 1074,50 ng/ml höher als bei den N0-Patienten (739,07 ng/ml) (Abb. 5B). Der Median lag fast doppelt so hoch bei Patienten mit Lymphknotenmetastasen (1170 vs. 550).



Abb. 5: Korrelation der DNA-Konzentration im Blut der MaCa-Patientinnen (U-Test, p=0,572) (A) bzw. PCa-Patienten (U-Test, p=0,336) (B) mit dem Nodalstatus als Prognosefaktor

Für den Status der Fernmetastasierung wurde bei den PCa-Patienten mit dem U-Test ein signifikanter negativer Zusammenhang (p=0,024) mit der Höhe der DNA-Konzentration nachgewiesen (DNA-Konzentration bei M0: 880,32 ng/ml, bei M1: 131,67 ng/ml), wobei darauf hingewiesen werden muss, dass in dem Kollektiv der PCa-Patienten zum Zeitpunkt der Datenerhebung lediglich bei drei Patienten Fernmetastasen diagnostiziert worden waren.

			klinische Parameter										
Patient	Alter	Histologie	pTNM Grading		ER	РЯ	CEA (ng/ml)	CA 15-3 (U/I)	Her/ 2neu	DNA-Konz. Blut-Serum (ng/ml)			
1	58	duktal	pT1N0M0	3	neg	neg	/	17	0	392			
2	59	lobulär	pT1aN0M0	/	neg	neg	/	31	2	833			
3	59	lobulär	pT2N0M0	2	neg	neg	/	38,34	0	408			
4	41	duktal	pT1bN0M0	2	pos	pos	/	29,93	2	420			
5	60	duktal	/	/	/	/	/	/	/	2020			
6	53	duktal	pT1bN0M0	2	pos	pos	/	21	1	2040			
7	60	duktal	pT1 N1 M0	2	neg	neg	/	21	1	467			
8	57	duktal	pT2 N1 M0	2	pos	pos	/	42	0	19350			
9	53	duktal	pT2 N1 M0	3	neg	neg	/	15	3	1701			
10	76	muzinös	ızinös pT2 N1M1 3 pos pos / 8		8	0	247						
11	60	duktal	pT1 N1 M0	2	pos	neg	0,64	11,4	/	257			
12	34	duktal	pT2N0M0	1	pos	pos	0,53	23,28	1	337			
13	55	duktal/lobulär	pT2 N1 M0	3	pos	pos	13	31,2	/	107			
14	42	duktal	pT2N0 M1	3	neg	neg	0,18	22,6	2	127			
15	76	duktal	pT1N0M0	3	pos	pos	0,54	10,23	2	133			
16	68	duktal	pT1N0M0	2	pos	pos	0,66	9,36	0	80			
17	56	duktal	pT1N0M0	2	pos	pos	0.81	9,36	/	657			
18	73	muzinös	pT2N0M0	1	pos	pos	0,8	12,05	/	233			
19	52	lobulär	pT2N0M0	2	neg	pos	/	/	0	1103			
20	54	duktal	pT1N0M0	3	neg	neg	1,92	20	0	670			
21	43	duktal	pT1N0M0	2	pos	pos	0,96	12,08	/	213			
22	35	duktal	pT2N0M0	3	pos	neg	2,98	19	/	503			
23	66	duktal	pT1N0M0	2	pos	neg	1,2	28,96	/	110			
24	60	duktal	pT4 N1 M0	3	pos	pos	1,14	44,36	/	823			
25	38	duktal	pT4NXM0	3	neg	neg	5,55	19,12	3	110			
26	45	lobulär	TX N1 M0	3	neg	pos	3,36	27,68	/	2130			
27	53	duktal	pT1N0M0	2	pos	pos	1,96	18,64	0	4910			
28	60	duktal	pT1N0M0	3	pos	neg	1,65	31,29	/	520			
29	40	duktal	pT1 N1 M0	2	pos	pos	2	10,96	/	137			
30	48	duktal	pT2N0M0	2	pos	pos	3,84	27,07	/	343			
									Mittelwert:	1379			

Tab. XXV: Korrelation der frei im Blutserum zirkulierenden DNA der MaCa-Patientinnen mit den Prognoseparametern

	0	klinisc	neter	ла ла			
Patient	Alter	pTNM	Gleason	t-PSA (ng/ml)	DNA-Kon: Blut-Plası (ng/ml)		
1	52	T2cN0MX	3+4	19,35	2675		
2	67	T3bNXMX	4+3	6,66	1012		
3	64	T2cNXMX	4+4	5,72	975		
4	62	T2cNXMX	3+4	12,43	56		
5	63	T2cNXMX	3+2	3,58	177		
6	65	T2cNXMX	3+3	14,98	778		
7	67	T2cN0MX	3+4	30,57	250		
8	64	T2cNXMX	3+3	19,72	1677		
9	64	T2cNXMX	3+4	9,23	1051		
10	63	T2cNXMX	3+2	6,54	62		
11	59	T2cNXMX	3+3	7,71	350		
12	59	T2cNXMX	3+3	4,32	154		
13	48	T2aNXMX	3+3	10,19	1533		
14	69	T2cNXMX	3+3	3,68	713		
15	66	T2cNXMX	3+3	15,01	788		
16	56	T3b N1 MX	4+3	36,22	1800		
17	68	T2aNXMX	3+3	5,9	764		
18	63	T2cN0MX	4+3	6,17	1283		
19	73	T2cN0MX	4+3	8,21	3457		
20	69	T2aNXMX	3+2	7,02	437		
21	70	T3aNXMX	3+4	7,47	663		
22	73	T3N0M0	5+4	106	380		
23	73	T3N0M0	3+4	55	760		
24	79	T3NX M1	4+4	200	90		
25	61	T3 N1 M0	4+4	200	673		
26	83	T2NX M1	5+4	216	147		
27	80	T3NX	3+4	26	1077		
28	79	/	4+5	150	600		
29	63	T2bN0	3+3	6,6	197		
30	82	T3N0M0	6	100	217		
31	68	T3b N1 MX	4+3	14,7	1667		
32	75	T3N1M1	/	20,8	158		
33	77	T3N0MX	4+4	35	130		
34	76	T3N0	4+3	16,1	152		
35	60	/	/	11,5	253		
36	83	T3NXMX	4+4	166	167		
				Mittelwert:	759		

Tab. XXVI: Korrelation der Konzentration der frei im Blutserum zirkulierenden DNA der PCa-Patienten mit den Prognoseparametern

5.6 DNA-Analysen zum Nachweis genetischer Alterationen

Blut, KM und Tumorgewebe der 36 PCa-Patienten und der 30 MaCa-Patientinnen wurden molekulargenetisch auf einen teilweisen oder kompletten Verlust der Heterozygotie der Regionen auf den Chromosomen 3, 8, 9 und 11 beim Prostatakarzinom bzw. 16 und 17 beim Mammakarzinom untersucht. Außerdem wurde in diesen Materialien das Auftreten von MSI untersucht. Die isolierte genomische DNA aus Leukozyten, Blut, KM und mikrodisseziertem Tumorgewebe wurde als Template in einer PCR amplifiziert. Als Referenz diente die Leukozyten-DNA des jeweiligen Patienten, mit der die Blut-, KM- bzw. Tumor-DNA verglichen wurde.

Die Detektion von LOH und MSI erfolgte über die Auftrennung der fluoreszenzmarkierten PCR-Produkte durch eine Kapillarelektrophorese in einem "Genetic Analyser". Die anschließende Auswertung der Daten erfolgte durch die GeneScan Software. Die Daten wurden als Peaks in einem Koordinatensystem dargestellt. Auf der Abszisse ist die Länge der Basenpaare aufgetragen, während die Ordinate über die von der CCD-Kamera registrierte Fluoreszenz - dargestellt als Peaks - und somit über die Menge an PCR-Produkt Auskunft gibt. Der bp-Bereich wird in der GeneScan Software manuell so eingestellt, dass er die erwartete Basenpaarspanne des gewünschten Amplifikationsprodukts erfasst.

Die Berechnung für das Vorliegen eines LOH wurde nach folgender Formel berechnet:

	Höhe rechter Peak Leukozyten	
	Höhe linker Peak Leukozyten	< 0.6 bzw. > 1.6
LOH = -	Höhe rechter Peak Plasma/KM/Tumor	
	Höhe linker Peak Plasma/KM/Tumor	

Ein LOH wird dann angenommen, wenn das Ergebnis einen Wert $\leq 0,6$ bzw. $\geq 1,6$ hat. Dies entspricht einer Differenz von mindestens 40 % zwischen den beiden auf der Ordinate angegebenen Peakhöhen der Referenz und der Blut-/KM-/Tumorprobe. Eine MSI wird in einem Diagramm als eine Vielzahl aneinandergereihter Peaks dargestellt, im Vergleich zeigt die Referenz-Probe nur zwei Peaks, die den beiden Allelen entsprechen.

Zu Beginn meiner Doktorarbeit habe ich die ersten Analysen von Blut- und KM-Proben der PCa-Patienten auch mit der Methode der Gelelektrophorese durchgeführt, da mir der Genetic Analyser noch nicht zur Verfügung stand. Bei der Gelelektrophorese wurde als Kriterium für das Vorliegen von LOH festgelegt, dass die Bandenintensität eines Allels aus Blut, KM oder Tumor um mindestens 50% geringer sein muss als das entsprechende Referenz-Allel. Als Kriterium für das Vorliegen einer MSI wurde die Existenz einer zusätzlichen Bande auf dem Polyacrylamidgel im Vergleich zur Referenz-DNA angenommen.

Die DNA-Analyse mit der Methode der Kapillarelektrophorese hat zwei entscheidende Vorteile gegenüber der Gelelektrophorese. Zum einen ist die Menge der in die PCR einzusetzenden DNA bei der Kapillarelektrophorese (10 ng) wesentlich geringer im Vergleich zur Auftrennung über die Gelelektrophorese (50 ng), zum anderen sind die PCR-Produkte bei der Kapillarelektrophorese wesentlich besser zu analysieren.

5.6.1 LOH-Analyse der Blut- und KM-DNA von Prostatakarzinom-Patienten durch die Gelektrophorese

Jeweils Blut-, KM-, Tumor- und Leukozyten-DNA (als Referenz) wurde mit allen Primern amplifiziert. Mithilfe der NIH-Software wurden die Banden der beiden Allele densitometrisch ausgewertet. Die Amplifikation mit Wasser, anstatt mit gDNA als Template, diente als Negativkontrolle. Die unterschiedliche Höhe der PCR-Doppelbanden kann aufgrund der ungleichen Anzahl von Mikrosatelliten in den amplifizierten Allelen erklärt werden. Auch interindividuelle Größenunterschiede der PCR-Produkte können auf eine mannigfache Mikrosatellitenzahl zurückgeführt werden. Als Beispiel für die Gelelektrophorese ist in Abb. 6 ein Gel mit einer MSI dargestellt.



Spur 1: Mikrosatellitenmarker D11S898

Spur 2-9: Amplifikation mit dem Primer D11S898

Die Blutplasma(P)-DNA des PCa-Patienten 5 (Spur 5) weist zusätzlich zu der Doppelbande eine weitere Bande auf, die in der Referenzprobe des Patienten auf dieser Höhe nicht vorhanden ist (Spur 4), was auf das Vorliegen einer MSI hindeutet. Die MSI konnte in der anschließend durchgeführten Analyse mit dem Genetic Analyser nicht bestätigt werden.

5.6.1 Bestimmung der optimalen Annealingtemperatur der Primerpaare

Als Beispiel ist hier die Bestimmung der optimalen Annealingtemperatur mithilfe der Gradienten-PCR (s. Kap. 4.2.6) für die Fluoreszenz-Primerpaare D3S1255 und D13S218 dargestellt (Abb. 7). Diese Primer wurden in den LOH-Analysen der vorliegenden Arbeit schließlich nicht verwendet. Nach der PCR mit verschiedenen Annealingtemperaturen wurden die Produkte mittels Kapillarelektrophorese analysiert. Die Amplifikation mit Wasser, anstatt mit gDNA als Template, diente als Negativkontrolle. In der Wasserkontrolle wurde kein PCR-Produkt gebildet, was darauf hinweist, dass alle verwendeten Lösungen frei von Kontaminationen waren. Die PCR mit DNA als Template zeigt, dass bei jeder Temperatur des eingestellten Gradienten Primerannealing möglich war und die Peaks im erwarteten Bereich lagen. Je höher die im Diagramm dargestellten Peaks sind, desto mehr PCR-Produkt wurde gebildet. Für den Primer D3S1255 wurde eine Temperatur von 57°C ausgewählt. Die Peakhöhen sind zwar mit 2286 und 1145 niedriger als bei 54° (2679 und 1640), aber die Peaks sind bei 57° etwas schmaler und die Linie bei 0 ist weniger wellig. Für den Primer D13S218 wurde 56°C als optimale Annealingtemperatur be-



stimmt. Die beiden Hauptpeaks (3. und 4. von rechts) sind bei dieser Temperatur am höchsten.

Abb. 7: Bestimmung der optimalen Annealingtemperatur der Primer D3S1255*TAM(gelb) und D13S218*HEX (grün)



5.6.3 LOH-Analyse der Blut-, Knochenmark- und Tumor-DNA von Mammakarzinom-Patientinnen und Prostatakarzinom-Patienten durch die Kapillarelektrophorese

Abb. 8: PCR mit dem fluoreszenzmarkierten Primer D17S250*HEX (151bp) beim MaCa Die PCR-Produkte der Leukozyten-(L) und Blutserum(S)-DNA der MaCa-Patientin 6 wurden im DNA-Analyzer aufgetrennt und mit der GeneScan-Software ausgewertet. Das obere Diagramm zeigt die Wasserprobe, in der keine Peaks nachzuweisen sind. Das mittlere Diagramm zeigt zwei Peaks der amplifizierten Leukozyten-DNA, das untere Diagramm zwei Peks mit einem LOH-Verlust in der Serum-DNA (roter Pfeil).

In Abbildung 8 ist die Datenauswertung der MaCa-Patientin 6 dargestellt. Das obere Diagramm zeigt die Wasserkontrolle, in der aufgrund des fehlenden Templates keine Peaks nachgewiesen wurden. Da die Wasserkontrolle in allen Analysen negativ war, wird sie in den nachfolgenden Diagrammen nicht mehr gezeigt. Das mittlere Diagramm zeigt zwei Peaks in der Leukozytenprobe, die den beiden Allelen in der PAGE entsprechen und sich im Bereich um 151 bp befinden. Im unteren Diagramm ist der rechte Peak der Serumprobe, im Gegensatz zur Referenzprobe im oberen Diagramm, deutlich kleiner und weist schon optisch auf das Vorliegen eines LOH hin. Rechnerisch ergibt sich der Quotient 2,3, also größer als 1,6, was einem LOH entspricht.



Abb. 9: PCR mit dem fluoreszenzmarkierten Primer D17S855*Fam (143bp) beim MaCa Die PCR-Produkte der Leukozyten(L)-,Tumor(T)-und Knochenmark(KM)-Plasma-DNA der MaCa-Patientin 1 wurden im DNA-Analyzer aufgetrennt und mit der GeneScan-Software ausgewertet. Das obere Diagramm zeigt zwei Peaks der amplifizierten Leukozyten-DNA. Im mittleren Diagramm weist der Pfeil auf einen vollständigen DNA-Verlust in der Tumor-DNA. Das untere Diagramm zeigt die zwei Peaks der amplifizierten KM-DNA, in der kein DNA-Verlust nachzuweisen ist.

Abbildung 9 zeigt einen vollständigen DNA-Verlust im Tumorgewebe der MaCa-Patientin 1. Im mittleren Diagramm ist der rechte Peak in der Tumorprobe der Patientin vollkommen verschwunden, wohingegen der rechte Peak im KM-Plasma in der Höhe dem rechten Peak der Leukozytenkontrolle entspricht. Die Patientin hat ein vollständiges LOH im Tumorgewebe, jedoch keines in der KM-Probe.



Abb. 10: PCR mit dem fluoreszenzmarkierten Primer D8S87*Tam (145bp) beim PCa Die PCR-Produkte der Leukozyten-(L) und Blutplasma(P)-DNA des PCa-Patienten 33 wurden im DNA-Analyzer aufgetrennt und mit der GeneScan-Software ausgewertet. Das untere Diagramm zeigt eine MSI in der Blutplasma-DNA.



Abb. 11: PCR mit dem fluoreszenmarkierten Primer D9S171*Tam (158-177bp) beim PCa Die PCR-Produkte der Leukozyten-(L) und Blutplasma(P) des PCa-Patienten 30 wurden im DNA-Analyzer aufgetrennt und mit der GeneScan Software ausgewertet. Das untere Diagramm zeigt eine MSI in der Blutplasma-DNA.

In den Abbildungen 10 und 11 sind die Amplifikationen der Blutplasma-Probe des PCa-Patienten 33 am Beispiel der Primer D8S87 und D9S171 dargestellt. Die aufgetrennte Leukozyten-DNA zeigt zwei Allele im Bereich von ca. 145 bzw. 158 bp (Primer D8S87, Abb. 10) und im Bereich von 160 bzw. 178 bp (Primer D9S171, Abb. 11). Bei der aufgetrennten Blutplasma-DNA liegen jeweils zwei Peaks an der gleichen Position, zusätzlich sind weitere Peaks zu erkennen, was auf eine MSI hindeutet. Bei diesem Patienten wurden insgesamt 4 MSI mit den Primern D8S87, D9S171, D6S1631 und D11S1313 nachgewiesen.

5.6.4 Korrelation des Auftretens von LOH mit den Prognoseparametern bei Mammakarzinom-Patientinnen

Wie in Tabelle XXVII zusammengefasst, wurden bei den MaCa-Patientinnen mit den Mikrosatellitenmarkern D16S421, D17S855 und D17S250 2 LOH im Tumorgewebe und 2 LOH im Blut nachgewiesen. Alle verwendeten Primer ergaben LOH. Bei keiner der Patientinnen wurde mehr als ein LOH gefunden. Neben den metrisch skalierten klinischen Parametern wurden auch die Prognosefaktoren Tumorgröße, Nodalstatus, Fernmetastasenstatus, Grading, sowie Her/2neu-, ER-, und PR-Status in deskriptiver- und Korrelationsanalyse betrachtet (s. Tab. XX und Tab. XXIV).

In der deskriptiven Statistik und der Korrelationsanalyse mit dem Chi-Quadrat-Test bzw. dem Test nach Fischer wurden die drei Primer zusammengefasst, um in der Folge eine Auswertung zu ermöglichen.

Die Patientinnen, bei denen in Blut, KM oder Tumorgewebe ein LOH nachgewiesen werden konnte, waren im Durchschnitt 9 Jahre älter, als die LOH-negativen Patientinnen (62 Jahre vs. 53 Jahre). Die Patientinnen mit LOH in Blut, KM oder Tumor waren 58, 60 bzw. 76 Jahre alt. Bei zwei der vier Patientinnen mit LOH wurden auch TZ im KM nachgewiesen. Bei einer der beiden Patientinnen war der Tumor bereits lymphogen- und fernmetastasiert, zudem lag das Grading bei 3 und ERund PR-Status waren positiv. Bei der zweiten der beiden Patientinnen lagen die klinischen und klinisch-pathologischen Daten nicht vor.

Ein signifikanter Zusammenhang zwischen den Prognosekriterien und dem Auftreten von LOH konnte nicht nachgewiesen werden. MSI wurden in keiner der Proben der MaCa-Patientinnen gefunden.

			klin	ische	Parame	eter					LO	H-Anal	yse					
tien	ter			ing			a (Î	5-3	n /	D	16S42	1	C	017S85	5	D1	752	50
Pat	A	Histologie	рТММ	Gradi	Ш	Н	CE/ (ng/r	CA-1 (U/I	Hei 2ne	В	т	KM	в	т	KM	В	т	КМ
1	58	duktal	pT1N0M0	3	neg	neg	/	17	0	+	+	+	+	LOH	+	+	+	+
2	59	lobulär	pT1aN0M0	/	neg	neg	/	31	2	-			+			+		
3	59	lobulär	pT2N0M0	2	neg	neg	/	38,3	0	-	-	-				+	+	+
4	41	duktal	pT1bN0M0	2	pos	pos	/	29,9	2	+		+	+		+	+		-
5	60	duktal	/	/	/	/	/	/	/	-	-	-	+	+	+	LOH	+	+
6	53	duktal	pT1bN0M0	2	pos	pos	/	21	1	-	-		+	+		LOH	+	
7	60	duktal	pT1 N1 M0	2	neg	neg	/	21	1	+		+	+		+	+		+
8	57	duktal	pT2 N1 M0	2	pos	pos	/	42	0	-	-		+	+		+	+	
9	53	duktal	pT2 N1 M0	3	neg	neg	/	15	3	+		+	+		+	+		+
10	76	muzinös	pT2 N1M1	3	pos	pos	/	8	0	+	LOH	+	+	-	+	+	+	+
11	60	duktal	pT1 N1 M0	2	pos	neg	0,64	11,4	/	-			+			+		
12	34	duktal	pT2N0M0	1	pos	pos	0,53	23,3	1	+			-			+		
13	55	duktal/lobulär	pT2 N1 M0	3	pos	pos	13	31,2	/	-			+			-		
14	42	duktal	pT2N0 M1	3	neg	neg	0,18	22,6	2	-			+			-		
15	76	duktal	pT1N0M0	3	pos	pos	0,54	10,2	2	+			+			+		
16	68	duktal	pT1N0M0	2	pos	pos	0,66	9,36	0	+			+			+		
17	56	duktal	pT1N0M0	2	pos	pos	0.81	9,36	/	+			+			+		
18	73	muzinös	pT2N0M0	1	pos	pos	0,8	12,1	/	-			+			+		
19	52	lobulär	pT2N0M0	2	neg	pos	/	/	0	+			-			+		
20	54	duktal	pT1N0M0	3	neg	neg	1,92	20	0	-			+			-		
21	43	duktal	pT1N0M0	2	pos	pos	0,96	12,1	/	+			+			+		
22	35	duktal	pT2N0M0	3	pos	neg	2,98	19	/	+			+			+		
23	66	duktal	pT1N0M0	2	pos	neg	1,2	29	/	+			+			+		
24	60	duktal	pT4 N1 M0	3	pos	pos	1,14	44,4	/	-			+			+		
25	38	duktal	pT4NXM0	3	neg	neg	5,55	19,1	3	+			+			-		
26	45	lobulär	TX N1 M0	3	neg	pos	3,36	27,7	/	+			+			+		
27	53	duktal	pT1N0M0	2	pos	pos	1,96	18,6	0	+			+			+		
28	60	duktal	pT1N0M0	3	pos	neg	1,65	31,3	/	+			+			-		_
29	40	duktal	pT1 N1 M0	2	pos	pos	2	11	/	-			+			+		
30	48	duktal	pT2N0M0	2	pos	pos	3,84	27,1	/	-			+			+		

Tab. XXVII: Korrelation der genetischen Alterationen mit den Prognoseparametern der MaCa-Patientinnen

5.6.5 Korrelation des Auftretens von LOH mit den Prognoseparametern bei Prostatakarzinom-Patienten

Wie in Tabelle XXVIII dargestellt, war von allen 36 Patienten Blut und von 21 Patienten KM vorhanden. LOH- und MSI Analysen wurden mit den Mikrosatellitenmarkern THRB, D6S1631, D8S87, D9S171, D9S1748, D11S898 und D11S1313 durchgeführt.

Bei den PCa-Patienten wurden mit dem gesamten Primerset 25 LOH nachgewiesen. Bei 18 der 36 Patienten (50 %) konnte mindestens ein LOH im Blut oder KM entdeckt werden. 10 Patienten (28%) hatten jeweils 1 LOH, 5 Patienten (14 %) jeweils 2 LOH, 1 Patient (3%) hatte 3 LOH. Bei 13 Patienten (36 %) wurden LOH im Blut, bei 10 Patienten (28 %) LOH im KM nachgewiesen. Bei 5 Patienten (14 %) wurden LOH sowohl im Blut als auch im KM nachgewiesen. 2 Patienten (6 %) hatten zu den LOH im KM auch DTC im KM. Bei einem Patienten lagen neben einem LOH im Blut auch 3 MSI im Blut vor.

Mit 8 (32 %) der insgesamt 25 detektierten LOH in Blut und KM wurden mit dem Primer D9S1748 die meisten LOH entdeckt. Der Primer D6S1631 ergab 5 LOH (20 %), der Primer D11S898 4 LOH (14 %). Der Primer D8S87 detektierte 3 LOH (12 %) und ein MSI. Mit den Primern D9S171 und D11S1313 wurden je 2 LOH (8 %) und ein MSI entdeckt. Die LOH-Frequenz an den jeweiligen Markern sind in Abbildung 12 dargestellt. Abbildung 13 ist eine Darstellung der informativen Ergebnisse der jeweiligen Primer in Blut und KM zusammen und in Blut und KM getrennt in Bezug auf die Gesamtzahl der analysierten Patienten. Die oberen Anteile der Säulen geben die prozentuale Menge der LOH wieder.





Die LOH-Frequenz wurde aus der Menge der detektierten LOH bezogen auf alle informativen Ergebnisse des jeweiligen Mikrosatellitenmarkers errechnet.



Abb. 13: Vergleich der informativen Ergebnisse und LOH-Frequenz an den verschiedenen Mikrosatellitenmarkern im Blut und KM der PCa-Patienten

Die relative Häufigkeit der informativen Ergebnisse wurde errechnet aus der Anzahl der informativen Ergebnisse bezogen auf die Gesamtzahl der Analysen mit dem jeweiligen Mikrosatellitenmarker (gesamte Säule). Die LOH-Frequenz entspricht dem oberen abgesetzten Teil der Säulen und ist die relative Häufigkeit in Bezug auf alle informativen Ergebnisse des jeweiligen Mikrosatellitenmarkers.

Neben den metrisch skalierten klinischen Parametern wurden die Prognosefaktoren Tumorgröße, Nodalstatus, sowie Fernmetastasierungsstatus in deskriptiver- und Korrelationsanalyse betrachtet (s. Tab. XXI und Tab. XXIV). In der deskriptiven Statistik wurden die Primer THRB, D6S1631, D8S87, D9S171, D9S1748, D11S898 und D11S13 sowie Blut und KM zusammen berechnet. LOH ist positiv, falls mindestens einer von beiden Werten positiv ist.

Für die Konzentration der freien DNA im Blutplasma fand sich bei den Patienten mit LOH ein um 392,5 ng/ml höherer Mittelwert (955 ng/ml versus 563 ng/ml). Ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Auftreten von LOH und den Prognosekriterien wurde nicht gefunden. Die Zusammenhänge wurden dabei für jeden einzelnen Marker und für alle 7 Marker zusammen berechnet.

MSI wurde in 3 Fällen nachgewiesen. Sie betrafen immer den gleichen Patienten (Patient 33). Der Patient war bei Diagnosestellung 77 Jahre alt (9 Jahre älter, als der Durchschnitt aller PCa-Patienten), hatte einen Tumor im Stadium T3N0MX und einen Gleason-Score von 8 (Score um 1 höher, als der Durchschnitt aller PCa-Patienten). t-PSA (35 ng/ml) und DNA-Konzentration (130 ng/ml) des Patienten waren niedriger als beim Durchschnitt der Patienten ohne MSI (t-PSA: 43,5 ng/ml, DNA-Konzentration: 759 ng/ml). Zusätzlich hatte der Patient ein LOH am Marker D11S898.

		kliniso	che Pa	arameter	LOH-Analyse													
ent	er	I	L L	1	TH	IRB	D6S	1631	D8S	587	D9S	6171	D9S	1748	D119	5898	D11S	1313
Pati	Alt	pTNN	Gleaso	t-PS⊿ (ng/m	В	КМ	в	КМ	в	KM	в	KM	в	КМ	в	KM	в	КМ
1	52	T2cN0MX	3+4	19,35	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	LOH	-
2	67	T3bNXMX	4+3	6,66	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-
3	64	T2cNXMX	4+4	5,72	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+
4	62	T2cNXMX	3+4	12,43	-	-	LOH	LOH	-	-	+	+	-	LOH	+	+	+	+
5	63	T2cNXMX	3+2	3,58	-	-	-	-	+	+	+	+	LOH	LOH	+	+	+	-
6	65	T2cNXMX	3+3	14,98	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-
7	67	T2cN0MX	3+4	30,57	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	64	T2cNXMX	3+3	19,72	+	LOH	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	64	T2cNXMX	3+4	9,23	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
10	63	T2cNXMX	3+2	6,54	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
11	59	T2cNXMX	3+3	7,71	-	-	+	LOH	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
12	59	T2cNXMX	3+3	4.32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	LOH	+	-
13	48	T2aNXMX	3+3	10.19	+	-	+	-	+	-	+	-	LOH	-	-	-	+	-
14	69	T2cNXMX	3+3	3.68	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-
15	66	T2cNXMX	3+3	15.01	+	+	+	+	+	+	+	LOH	-	-	-	-	+	+
16	56	T3bN1MX	4+3	36.22	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-
17	68	T2aNXMX	3+3	5.9	-	-	-	-	+	LOH	LOH	+	+	+	+	+	+	+
18	63	T2cN0MX	4+3	6.17	+	-	-	-	+	LOH	-	-	+	+	-	-	+	-
19	73	T2cN0MX	4+3	8,21	+	-	-	-	-		_	-	LOH	LOH	-	_	+	+
20	69	T2aNXMX	3+2	7.02	-	-	+	LOH	+	+	+	+	LOH	+	+	+	-	+
21	70	T3aNXMX	3+4	7 47	-	-	+		-	-	+	+	+	-	+	+	-	-
22	73	T3N0M0	5+4	106	-		-		-		+		+		+		_	
23	73	T3N0M0	3+4	55	_		_		_		_		-				+	
24	79	T3NxM1	4+4	200			-		-		+		-		- ·		-	
25	61	T3N1M0	4+4	200	_		-		-		-		+		-		-	
26	83	T2NvM1	5+4	216			-								+			
20	80		3+4	26			-						- T		IOH		 	
28	79	/	4+5	150			-						LOH				-	
20	63		313	66			- T											
29	82	T3NOMO	6	100			-		ТОН				- -					
21	62		4.2	14 7			- T						- T		1 <u>0 H</u>			
20	75		++3 /	20.9			+		<u> </u>				-		LOII			
32	73			20,0	-		+		- MGI		- MGI		-				+ MGI	
33	76		4+4	16.1	-						INISI		-		LOII			
34	01	13100	4+3	11 5	-				+		-		+		-		+	
35	83	/ T3N/vM/v		166			+		-		+		+		+		+	
36	83	T3NxMx	4+4	166	-		-		+		+		+		+		+	

Tab. XXVIII: Korrelation der genetischen Altera	ationen mit den Prognoseparametern der PCa-Patienten
---	--
5.7 Immunzytochemischer Nachweis von Tumorzellen in Blut und Knochenmark von Mammakarzinom-Patientinnen und Prostatakarzinom-Patienten

Von allen 21 nicht-metastasierten MaCa-Patientinnen war Blut und von 6 dieser Patientinnen war KM für die immunzytochemische Untersuchung vorhanden. Von den 9 metastasierten Patientinnen war von 6 Patientinnen Blut und von 3 Patientinnen KM verfügbar (Tab. VI).

Von den 29 nicht-metastasierten PCa-Patienten wurde das Blut und KM von 20 Patienten auf CK-positive Zellen untersucht. Nur bei einem Patienten der 6 metastasierten Patienten waren Blut und KM verfügbar (Tab. VII).

Die Abbildungen 14 und 15 zeigen eine Positivkontrolle als repräsentative Färbung mononukleärer Zellen und eine Ausschnittsvergrößerung der Positivkontrolle mit Darstellung einer CK-positiven Zelle.



Abb. 14: Repräsentative APAAP-Färbung monoklonaler Zellen Übersichtsaufnahme einer Positivkontrolle



Abb. 15: Ausschnittvergrößerung der Positivkontrolle (Abb. 14) mit Darstellung einer CK-positiven Zelle im Zentrum

In den Abbildungen 16 A,B,C sind die im KM der PCa-Patienten 5 und 10 detektierten CK-positiven Zellen dargestellt.



Abb. 16: A, B: CK-positive Zellen im KM des PCa-Patienten 5 C: CK-positive Zelle im KM des PCa-Patienten 10

5.7.1 Korrelation des Auftretens von Tumorzellen beim Mammakarzinom und Prostatakarzinom

Tab. XXIX: Zusammenhang zwischen dem Auftreten von TZ bei den beiden Tumorentitäten MaCa und PCa

	MaCa	PCa	Gesamt
CTC/DTC negativ	12 (44,4%)	18 (85,7%)	30 (62,5%)
CTC/DTC positiv	15 (55,6%)	3 (14,3%)	18 (37,5%)
Gesamt	27 (100%)	21 (100%)	48 (100%)

Zwischen dem TZ-Nachweis und den zwei Tumorentitäten MaCa und PCa lässt sich eine signifikante Abhängigkeit nachweisen (Chi-Quadrat-Test, p=0,003). Die Chance auf einen positiven TZ-Nachweis ist dabei in der Gruppe der MaCa-Proben 7,5mal höher als in der PCa-Gruppe (Odds Ratio).

5.7.2 Korrelation des Auftretens von Tumorzellen in Blut und Knochenmark der Mammakarzinom-Patientinnen mit den Prognosekriterien

Die Ergebnisse der Analysen sind in Tabelle XXXI zusammengefasst. Laut Kolmogorov-Smirnov-Index waren alle Größen normalverteilt. Neben den metrisch skalierten klinischen Parametern wurden die Prognosekriterien Tumorgröße, Nodalstatus, Fernmetastasenstatus, Grading, sowie Her/2neu-, ER-, und PR-Status in einer deskriptiven Analyse und einer Korrelationsanalyse betrachtet.

Ein signifikanter Zusammenhang (Exakter Fisher Test, p=0,02) wurde zwischen dem Nodal-Status und dem TZ-Status der Patientinnen gefunden. MaCa-Patientinnen mit Lymphknotenmetastasen haben 2,375 mal häufiger TZ im Blut

und/oder KM als Patientinnen ohne Lymphknotenmetastasen. Da die Fallzahl für eine Korrelationsanalyse der klinischen und klinisch-pathologischen Parameter mit dem Auftreten von CTC im KM zu klein war, wurden hier die Inzidenzen der CTC im Blut und DTZ im KM zusammengefasst und mit den Prognosekriterien korreliert. Insgesamt wurden bei 15 der 27 Patientinnen (56 %) CTC oder DTC entdeckt. Im KM wurden im Verhältnis mehr TZ nachgewiesen als im Blut (71 % vs. 41 %). Im KM der metastasierten Patientinnen wurden bei allen Patientinnen DTC gefunden (100 %). Bei den metastasierten Patientinnen wurden mehr DTC und CTC nachgewiesen als bei den Patientinnen ohne Nachweis von Metastasen (s. Tab. XXX). Bei den Patientinnen mit TZ im Blut und/oder KM konnte neben der signifikanten Korrelation mit dem Lymphknotenstatus ein um 7 Jahre höherer Mittelwert für das Alter der Patientinnen nachgewiesen werden als bei den Patientinnen ohne TZ im Blut und/oder KM (57 Jahre vs. 50 Jahre). Der Mittelwert der DNA-Konzentration im Serum der Patientinnen lag bei den TZ-positiven Patientinnen um 418 ng/ml höher, als bei den Patientinnen ohne Nachweis von CTC und/oder DTC (988 ng/ml vs. 570 ng/ml).

Zudem lag der Mittelwert des Alters bei den Patientinnen mit CTC um 2,2 Jahre höher, als bei den Patientinnen ohne CTC (53 Jahre vs. 55 Jahre). Auch der Mittelwert der CA-15-3-Konzentration lag bei den CTC-positiven Patientinnen mit 22,77 U/l höher als bei den CTC-negativen Patientinnen (19,98 U/l).

In der Korrelationsanalyse des Auftretens von CTC im Blut mit den Prognosekriterien nach Chi-Quadrat- bzw. Fisher-Test ergab sich kein signifikanter Zusammenhang.

Kollektiv	Material	Patientinnen mit CTC/DTC				
Metastasiert und nicht	Blut und/oder KM (n=27)	15 (56%)				
metastasiertes MaCa	Blut (n=27)	11 (41%)				
	KM (n=7)	5 (71%)				
N0 und/oder M0	Blut (n=23)	8 (35%)				
	KM (n=4)	2 (50%)				
N1 und/oder M1	Blut (n=4)	3 (75%)				
	KM (n=3)	3 (100%)				

Tab. XXX: Korrelation des Auftretens von CTC/DTC mit dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen/Fernmetastasen beim MaCa

			LOH-Analyse																	
ent	P			Ð				က္		C	016S42	1	D	17S85	5	D17S250			СТС	DTC
Patie	Alte	Histologie	рТММ	Gradin	ER	PR	CEA (ng/ml	CA-15- (U/I)	Her/ 2neu	в	т	KM	в	т	KM	в	Т	KM	im Blut	im KM
1	58	duktal	pT1N0M0	3	neg	neg	/	17	0	+	+	+	+	LOH	+	+	+	+	neg	neg
2	59	lobulär	pT1aN0M0	/	neg	neg	/	31	2	-			+			+			neg	/
3	59	lobulär	pT2N0M0	2	neg	neg	/	38,3	0	-	-	-				+	+	+	pos	pos
4	41	duktal	pT1bN0M0	2	pos	pos	/	29,9	2	+		+	+		+	+		-	neg	neg
5	60	duktal	/	/	/	/	/	/	/	-	-	-	+	+	+	LOH	+	+	neg	pos
6	53	duktal	pT1bN0M0	2	pos	pos	/	21	1	-	-		+	+		LOH	+		neg	/
7	60	duktal	pT1 N1 M0	2	neg	neg	/	21	1	+		+	+		+	+		+	neg	pos
8	57	duktal	pT2 N1 M0	2	pos	pos	/	42	0	-	-		+	+		+	+		/	1
9	53	duktal	pT2 N1 M0	3	neg	neg	/	15	3	+		+	+		+	+		+	neg	pos
10	76	muzinös	pT2 N1M1	3	pos	pos	/	8	0	+	LOH	+	+	-	+	+	+	+	neg	pos
11	60	duktal	pT1 N1 M0	2	pos	neg	0,64	11,4	/	-			+			+			/	1
12	34	duktal	pT2N0M0	1	pos	pos	0,53	23,3	1	+			-			+			neg	1
13	55	duktal/lobulär	pT2 N1 M0	3	pos	pos	13	31,2	/	- +				-			/	1		
14	42	duktal	pT2N0 M1	3	neg	neg	0,18	22,6	2	-			+			-			neg	1
15	76	duktal	pT1N0M0	3	pos	pos	0,54	10,2	2	+			+			+			pos	/
16	68	duktal	pT1N0M0	2	pos	pos	0,66	9,36	0	+			+			+			pos	/
17	56	duktal	pT1N0M0	2	pos	pos	0.81	9,36	/	+			+			+			neg	/
18	73	muzinös	pT2N0M0	1	pos	pos	0,8	12,1	/	-						+			neg	/
19	52	lobulär	pT2N0M0	2	neg	pos	/	/	0	+			-			+			pos	/
20	54	duktal	pT1N0M0	3	neg	neg	1,92	20	0	-			+			-			neg	/
21	43	duktal	pT1N0M0	2	pos	pos	0,96	12,1	/	+			+			+			pos	/
22	35	duktal	pT2N0M0	3	pos	neg	2,98	19	/	+			+			+			neg	/
23	66	duktal	pT1N0M0	2	pos	neg	1,2	29	/	+			+			+			pos	/
24	60	duktal	pT4 N1 M0	3	pos	pos	1,14	44,4	/	-			+			+			pos	/
25	38	duktal	pT4NXM0	3	neg	neg	5,55	19,1	3	+		+			-			neg	/	
26	45	lobulär	TX N1 M0	3	neg	pos	3,36	27,7	/	+			+			+			pos	/
27	53	duktal	pT1N0M0	2	pos	pos	1,96	18,6	0	+			+			+			pos	/
28	60	duktal	pT1N0M0	3	pos	neg	1,65	31,3	/	+			+			-			neg	/
29	40	duktal	pT1 N1 M0	2	pos	pos	2	11	/	-			+			+			pos	/
30	48	duktal	pT2N0M0	2	pos	pos	3.84	27.1	/	-			+			+			pos	1

Tab. XXXI: Korrelation des Auftretens von CTC im Blut und DTC im KM mit den Prognosekriterien und dem Auftreten von LOH in Blut, KM und Tumorgewebe beim MaCa

5.7.3 Korrelation des Auftretens von Tumorzellen im Blut und Knochenmark der Prostatakarzinom-Patienten mit den Prognosekriterien

Die Ergebnisse der Analysen sind in Tabelle XXXII zusammengefasst. Laut Kolmogorov-Smirnov-Index waren alle Größen normalverteilt. Im KM wurden bei drei PCa-Patienten DTZ entdeckt. Im Blut der Patienten konnten keine CTC nachgewiesen werden, sodass für die folgende gruppierte deskriptive Statistik die TZ-KM-Variable als Gruppenfaktor herangezogen wurde.

Die Korrelation des Auftretens von DTC mit dem Alter wurde mit dem T-Test untersucht. Die Assoziation mit den Parametern Gleason-Score, t-PSA und Blutplasma-DNA-Konzentration wurden mit dem U-Test untersucht, wobei ein signifikant niedrigerer Gleason-Score (p=0,023) bei DTC-positiven-Patienten nachgewiesen wurde. Allerdings haben die Ergebnisse der Korrelationsanalysen aufgrund der geringen Anzahl von Patienten mit DTC im KM eine eingeschränkte Aussagekraft.

t		klinische	e Param	neter	LOH-Analyse														DTO	
tien	lter	pTNM	uo	A (ור	THRB		D6S1631		D8	S87	D9S	S171	D9S1748		D11S898		D11S1313		im	im
Pa	A		Gleas	t-PS (ng/n	В	КМ	В	КМ	В	КМ	В	КМ	В	KM	В	KM	в	KM	Blut	КМ
1	52	T2cN0MX	3+4	19,35	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	LOH	-	neg	neg
2	67	T3bNXMX	4+3	6,66	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	neg	neg
3	64	T2cNXMX	4+4	5,72	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	neg	neg
4	62	T2cNXMX	3+4	12,43	-	-	LOH	LOH	-	-	+	+	-	LOH	+	+	+	+	neg	neg
5	63	T2cNXMX	3+2	3,58	-	-	-	-	+	+	+	+	LOH	LOH	+	+	+	-	neg	pos
6	65	T2cNXMX	3+3	14,98	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	neg	neg
7	67	T2cN0MX	3+4	30,57	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	neg	neg
8	64	T2cNXMX	3+3	19,72	+	LOH	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	neg	neg
9	64	T2cNXMX	3+4	9,23	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	neg	neg
10	63	T2cNXMX	3+2	6,54	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	neg	pos
11	59	T2cNXMX	3+3	7,71	-	-	+	LOH	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	neg	neg
12	59	T2cNXMX	3+3	4,32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	LOH	+	-	neg	neg
13	48	T2aNXMX	3+3	10,19	+	-	+	-	+	-	+	-	LOH	-	-	-	+	-	neg	neg
14	69	T2cNXMX	3+3	3,68	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	neg	neg
15	66	T2cNXMX	3+3	15,01	+	+	+	+	+	+	+	LOH	-	-	-	-	+	+	neg	pos
16	56	T3b N1 MX	4+3	36,22	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	neg	/
17	68	T2aNXMX	3+3	5,9	-	-	-	-	+	LOH	LOH	+	+	+	+	+	+	+	neg	neg
18	63	T2cN0MX	4+3	6,17	+	-	-	-	+	LOH	-	-	+	+	-	-	+	-	neg	neg
19	73	T2cN0MX	4+3	8,21	+	-	-	-	-	-	-	-	LOH	LOH	-	-	+	+	neg	neg
20	69	T2aNXMX	3+2	7,02	-	-	+	LOH	+	+	+	+	LOH	+	+	+	-	+	neg	neg
21	70	T3aNXMX	3+4	7,47	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	neg	neg
22	73	T3N0M0	5+4	106	-		-		-		+		+		+		-			
23	73	T3N0M0	3+4	55	-		-		-		-		-		+		+			
24	79	T3NX M1	4+4	200	-		+		+		+		-		+		+			
25	61	T3 N1 M0	4+4	200	-		+		-		-		+		-		+			
26	83	T2NX M1	5+4	216	-		-		+		-		+		+		+			
27	80	T3NX	3+4	26	-		-		-		-		-		LOH		+			
28	79	/	4+5	150	-		+		-		+		LOH		+		-			
29	63	T2bN0	3+3	6,6	-		-		+		+		+		+		+			
30	82	T3N0M0	6	100	-		+		LOH		-		+		+		+			
31	68	T3b N1 MX	4+3	14,7	-		+		-		-		-		LOH		LOH			
32	75	T3N1M1	/	20,8	-		+		-		-		-		-		+			
33	77	T3N0MX	4+4	35	-		+		MSI		MSI		-		LOH		MSI			
34	76	T3N0	4+3	16,1	-		LOH		+		-		+		-		+			
35	60	/	/	11,5	-		+		-		+		+		+		+			
36	83	T3NXMX	4+4	166	-		-		+		+		+		+		+			

Tab. XXXII: Korrelation von CTC im Blut und DTC im KM mit den Prognosekriterien und dem Auftreten von LOH im Blut und KM beim PCa

78

6. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die extrazelluläre DNA im Blut von 36 Patienten mit PCa und 30 Patientinnen mit MaCa auf das Vorhandensein genetischer Alterationen, wie LOH und MSI, untersucht. Vergleichende Analysen wurden mit KM-Proben der PCa-Patienten sowie KM- und Tumorproben der MaCa-Patientinnen durchgeführt. Zur Detektion der genetischen Alterationen wurde für das PCa ein Set von 7 Mikrosatellitenmarkern und für das MaCa ein Set von 3 Mikrosatellitenmarkern eingesetzt. Die Ergebnisse der detektierten Aberrationen der Mikrosatellitenmarker wurden mit den geltenden Prognosekriterien (Tab. XX und XXI) korreliert, um Antwort zu erhalten, ob dieser experimentelle Ansatz für die Früherkennung des MCa und PCa geeignet ist. Zudem wurden Blut und KM der Patientinnen und Patienten auf das Vorhandensein von CTC bzw. DTC untersucht, um die Bedeutung der TZ im Blut und KM für die Früherkennung lymphogener und hämatogener Metastasierung zu erforschen. Des Weiteren wurde in der vorliegenden Arbeit der potentielle Zusammenhang zwischen dem Auftreten von CTC und DTC und der LOH-Frequenz geprüft.

Im Folgenden werden die Hauptergebnisse der Arbeit diskutiert.

6.1 DNA-Konzentrationen bei Mammakarzinom-Patientinnen und Prostatakarzinom-Patienten

6.1.1 Höhere durchschnittliche DNA-Konzentrationen im Blut von Mammakarzinom-Patientinnen als im Blut von Prostatakarzinom-Patienten

Die Messungen der Konzentrationen der im Blut zirkulierenden DNA zeigten, dass MaCa-Patientinnen im Durchschnitt zweimal soviel zellfreie DNA im Blut hatten wie PCa-Patienten. Ein möglicher Grund hierfür könnte die Verwendung von verschiedenen Blutbestandteilen sein. Bei den MaCa-Patientinnen wurde die Messung im Blutserum, bei den PCa-Patienten im Blutplasma durchgeführt. In vergleichenden Studien fanden Taback et al. (2004) und Thijssen et al. (2002) ebenfalls höhere DNA-Konzentrationen im Blutserum von Melanom-Patienten bzw. Patienten mit Lebermetastasen kolorektaler Karzinome, als in den korrespondierenden Plasmaproben. Weitere komparative Analysen mit den gleichen klinischen Materialien sollten zeigen, ob diese deutlich höheren DNA-Konzentrationen im Blut von MaCa-Patientinnen in der Verwendung von Blutserum anstatt Plasma begründet sind oder ob MaCa-Patientinnen gewöhnlich eine höhere Konzentrationen extrazellulärer DNA in ihrem Blut haben als PCa-Patienten.

6.1.2 Höhere durchschnittliche DNA-Konzentrationen bei Patientinnen mit nodal metastasiertem Mammakarzinom als bei Patientinnen ohne Lymphknotenmetastasen

Eine Gegenüberstellung der durchschnittlichen DNA-Konzentrationen im Blut von Patientinnen mit und ohne Lymphknotenmetastasen zeigte, dass die durchschnittliche Konzentration bei N1-metastasierten MaCa-Patientinnen fast viermal höher war, als bei Patientinnen ohne Lymphknotenmetastasen (N0). Obwohl der Konzentrationsunterschied bei PCa-Patienten nicht so deutlich wie bei MaCa-Patientinnen war, lag der Mittelwert der DNA-Konzentration bei N1-metastasierten PCa-Patienten nicht ganz zweimal höher als bei den N0-Patienten. Diese Daten lassen vermuten, dass bei der lymphogenen Metastasierung des MaCa deutlich mehr DNA ins Blut abgegeben wird als beim PCa. Die Reliabilität dieser Daten kann jedoch erst dann bestätigt werden, wenn der Einfluss der Verwendung veschiedener Blutbestandteile, wie Serum beim MaCa und Plasma beim PCa auf die DNA-Konzentration geklärt ist.

Ähnliche Konzentrationsunterschiede wie in der vorliegenden Arbeit wurden bereits in verschiedenen Studien beschrieben (Fleischhacker und Schmidt, 2007; Jahr et al., 2001; Leon et al., 1975). Auch Chun et al. (2006) und Schwarzenbach et al. (2004) stellten in ihren Studien Konzentrationsunterschiede bei Metastasierung fest. Diese Ergebnisse weisen auf eine positive Korrelation zwischen der DNA-Konzentration und der Tumorprogression hin.

6.2 LOH-Analysen in Blut, Knochenmark und Tumorgewebe von Mammakarzinom-Patientinnen und Prostatakarzinom-Patienten

6.2.1 LOH-Frequenz in Blut und Knochenmark von Mammakarzinom-Patientinnen und Prostatakarzinom-Patienten

Die vorliegende Studie diente u.a. der Definition eines spezifischen Mikrosatellitenpanels für einen sensitiven Assay und der Untersuchung der LOH-Frequenz an den chromosomalen Loci 3p24, 6q16, 8p12, 9p21, 11q12, 11q22, 17q21, 17q11.2q12 und 16q22-q23. Folgende Mikrosatellitenmarker wurden für den Nachweis genetischer Alterationen im PCa an diesen Loci getestet: THRB, D6S1631, D8S87, D9S171, D9S1748, D11S898 und D11S1313. Für das MaCa wurden die Analysen mit den Markern D16S421, D17S855 und D17S250 durchgeführt.

Im Blut der PCa-Patienten wurde in 9 % und im KM in 18 % der informativen Fälle LOH detektiert. Für keinen der Marker konnte eine Assoziation zwischen dem Auftreten von LOH und dem Tumorstadium, dem Gleason-Score, sowie dem t-PSA-Wert gefunden werden. Mit je 14 % der informativen Proben im KM und Blut konnte am Marker D9S1748 die höchste LOH-Frequenz gefunden werden. Überraschenderweise konnte in der vorliegenden Studie am Marker D9S171 mit einer Frequenz von 3 % im Blut und 5 % im KM wesentlich weniger LOH nachgewiesen werden. Perinchery et al. (1999) untersuchten die Region 9p21 auf genetische Alterationen an den Loci D9S1748, D9S171 und D9S270 und fanden die höchste LOH-Frequenz von 15 getesteten Mikrosatellitenmarkern in dieser Region. In 9p21 liegt ein TSG, welches das Protein CDKN2/p16, einen Inhibitor der cyclin-abhängigen Kinase, kodiert. Eine genetische Alteration in dieser Region führt zu einer erhöhten Zellteilungsrate. Perinchery et al. beschrieben, dass normale Zellen der Prostata eine hohe p16-Proteinexpression zeigten, wohingegen die Expression dieses Proteins in PCa sehr gering war oder ganz fehlte. In der Literatur sind mit einer LOH-Frequenz von 3,5 % bis 50 % LOH an den Markern D9S1748 und D9S171 sehr unterschiedliche Frequenzen für das Plasma beschrieben worden (Perinchery et al., 1999; Schwarzenbach et al., 2009; Schwarzenbach et al., 2008; von Knobloch et al., 2004). Schwarzenbach et al. (2009) fanden eine signifikante Korrelation zwischen dem Tumorstadium und der LOH-Frequenz am Marker D9S171. In den Analysen der vorliegenden Studie hatten die Patienten mit einem LOH an diesem Marker das Tumorstadium T2a bzw. T2c. Bei einem der Patienten konnte an diesem Marker sowie an den Markern D8S87 und D11S1313 eine MSI nachgewiesen werden. Der Patient hatte einen Tumor im Stadium pT3N0MX, sein Gleason-Score lag bei 4+4 und der tPSA-Wert bei 35 ng/ml.

In der Region 6q16 ist der Marker D6S1631 lokalisiert. Im KM konnte an diesem Marker eine ebenso hohe LOH-Frequenz von 14 % wie am Marker D9S1748 entdeckt werden. Im Blut lag die Frequenz bei 6 %. Auch Schwarzenbach et al. (2008) beschrieben eine LOH-Frequenz von 6 % im Plasma in einer Studie mit 230 PCa-Patienten. Konishi et al. (2003) fanden eine Korrelation zwischen dem Tumorstadium T3 und dem Auftreten von Deletionen in 6q. Diese Assoziation konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. In der Region 6q16 liegt das Gen, das für die TAK1 (TGFß-aktivierende Kinase) kodiert. Untersuchungen an humanen Prostatazellen zeigten, dass die durch TGFß induzierte Apoptose auf die Aktivierung der TAK1 zurückzuführen ist. Ektopische Expression von TAK1 stimulierte die Apoptose, während eine dominant-negative TAK1-Variante diesen programmierten Zelltod reduzierte (Edlund et al., 2003).

Die Untersuchung des Markers D8S87 ergab 10 % LOH im KM und nur 3 % LOH im Blut. Auch Müller et al. (2006a) und Schwarzenbach et al. (2008) beschrieben LOH-Frequenzen von 2 % bzw. 3 % für das Blutplasma von PCa-Patienten, was das vorliegende Ergebnis der Blutanalysen bestätigt. Bova et al. (1996) und Prasad et al. (1998) fanden sowohl proximal und distal von D8S87 als auch direkt an diesem Locus häufige genetische Alterationen. Im Bereich 8p12 liegt das TSG Neuroregulin 1, das im Verlauf eines komplexen Signaltransduktionsweges den programmierten Zelltod induziert (Tal-Or et al., 2003).

An den Markern THRB, D11S898 und D11S1313 wurden jeweils unter 10 % LOH in Blut und KM detektiert. Der Marker THRB ergab eine LOH-Frequenz von 5 % im KM und kein LOH im Blut. Die Angaben zur LOH-Frequenz an diesem Locus schwanken in der Literatur: Dahiya et al. (1997) fanden in 90 % ihrer informativen Ergebnisse LOH an diesem Marker, konnten aber keinen Zusammenhang mit Stadium oder Grading des Tumors beobachten. Müller et al. (2006a) fanden eine LOH-Frequenz von 22 %, während in der Vergleichsgruppe der Patienten mit benigner Prostatahyperplasie kein LOH an dem Marker nachgewiesen werden konnte. Schwarzenbach et al. (2008) konnten in 18,5 % ihrer informativen Ergebnisse LOH an diesem Marker nachweisen. Weshalb in der vorliegenden Arbeit nur wenige LOH an diesem Marker detektiert werden konnten, ist unklar. Der Marker D11S898 ergab 5 % LOH im KM und 8 % im Blut. Schwarzenbach et al. fanden eine Frequenz von 11 % in Blutproben, was das Ergebnis der vorliegenden Studie unterstützt. Dahiya et al. beschrieben eine sehr hohe LOH-Frequenz von 66 % an diesem Marker. Am Locus D11S1313 zeigten sich in der vorliegenden Arbeit 6 % LOH im Blut und kein LOH im KM, während Dahiya et al. (1997) und Schwarzenbach et al. (2008) 39 % LOH im Blut der PCa-Patienten fanden.

In den MaCa-Proben wurden nur bei 13 % der Patientinnen LOH gefunden. Im Blut ließen sich in 3 % und im Tumorgewebe in 17 % der informativen Fälle LOH nachweisen. Die Analyse der korrespondierenden KM-Proben ergab kein LOH. Pa-

tientinnen mit LOH im Blut oder Tumorgewebe waren im Durchschnitt 9 Jahre älter als Patientinnen ohne LOH (62 vs. 53 Jahre). Weitere Korrelationen mit den Prognosefaktoren bestanden nicht.

Am Marker D16S421 konnte ein LOH im Tumorgewebe nachgewiesen werden; jedoch waren 67 % der Analysen nicht informativ. In einer Analyse, in der auch die Ergebnisse der vorliegenden Studie enthalten waren, zeigte dieser Marker einen leichten Anstieg der LOH-Frequenz von M0 zu M1 (Schwarzenbach et al., 2007b). Bereits 2004 konnten Schwarzenbach et al. eine solche Tendenz an diesem Marker beobachten (Schwarzenbach et al., 2004). Auch diese LOH-positive Patientin in dem Kollektiv der vorliegenden Studie hatte einen M1-Tumor und war zudem lymphogen metastasiert. Das Grading lag bei 3 und ER- und PR- Status waren positiv. Im KM der Patientin konnte eine DTZ nachgewiesen werden. Der Marker D16S421 liegt in der Region 16q22-23, welche für das TSG E-Cadherin kodiert. E-Cadherin spielt eine entscheidende Rolle in der Bildung und dem Erhalt der Zell-Zell-Kontakte. Die Downregulation seiner Genexpression kann zu Tumorentstehung, Progression und Metastasierung beitragen (Pecina-Slaus, 2003).

Der Primer D17S855 auf Chromosom 17 detektierte ein LOH im Primärtumor. Über eine hohe Frequenz von LOH an diesem Marker (Silva et al., 1999a) und einen Zusammenhang mit Lymphknotenmetastasen wurde berichtet (Hampl et al., 1999). Schwarzenbach et al. beschrieben 2009 erstmals einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von LOH am Marker D17S855 und der Anzahl von CTC im Blut bei PCa-Patienten (Schwarzenbach et al., 2009). In meinem Kollektiv waren bei der Patientin mit LOH an diesem Marker keine TZ nachzuweisen, wobei dieses Ergebnis aufgrund der geringen Anzahl von LOH nicht repräsentativ ist. An einem größeren Kollektiv könnte getestet werden, ob ein solcher Zusammenhang zwischen LOH und CTC auch für das MaCa nachgewiesen werden könnte. Der Locus 17q21 kodiert für BRCA1, das an einer Vielzahl biologischer Programme der Zelle, wie Regulation des Zellzyklus, DNA-Raparatur, Transkription, Zellwachstum und Apoptose, beteiligt ist.

Der Marker D17S250 ergab zwei LOH (8 %) im Blut der MaCa-Patientinnen. Bei einer der beiden Patientinnen konnte eine DTZ im KM nachgewiesen werden. Der Marker liegt in der Region der Methyltransferase PNMT und wird mit einer schlechten Prognose assoziiert (Nagai et al., 1994). Im Tumorgewebe konnten keine entsprechenden Alterationen festgestellt werden. Die fehlende Konkordanz des Auftretens genetischer Alterationen im Blut mit denen im Primärtumor könnte in der multifokalen Heterogenität des MaCa, der lokalen Nekrose in diesem Gewebe, dem potentiellen Vorhandensein freier DNA aus mikrometastatischen Zellen und der Maskierung von LOH durch normale DNA begründet sein.

Für die Unterschiede zwischen den Ergebnissen der einzelnen Labore gibt es verschiedene Erklärungsmöglichkeiten. Zum einen bestehen ausgeprägte ethische und geographische Unterschiede sowohl beim MaCa als auch beim PCa. Zum anderen bietet die Kapillarelektrophorese gegenüber der Gelelektrophorese eine exaktere Möglichkeit der Detektion. Auch schwanken die Grenzwerte zur Bestimmung eines LOH von 21 % relativem Allelverlust (Buerger et al., 2000) bis zu 50 % (Dahiya et al., 1997) in den verschiedenen Laboren. Zudem verwendet fast jedes Labor unterschiedliche Techniken zur Gewinnung und Isolierung von DNA und die Techniken ändern sich mit den Jahren fortlaufend (Fleischhacker und Schmidt, 2007). Auch die Berechnung des AI-Scores wird in den Laboren sehr unterschiedlich gehandhabt: Einige vergleichen die Peakflächen, andere die Peakhöhen miteinander. Dass die Ergebnisse der verschiedenen Loci in den Studien unseres Labors regelmäßig übereinstimmen und dass wiederholt in der DNA der Gesunden keine genetischen Alterationen (Schwarzenbach et al., 2009) und in der DNA von BPH-Patienten wesentlich niedrigere LOH-Frequenzen gefunden wurden (Müller et al., 2006a), lässt auf die Reliabilität und Korrektheit der in unserem Labor durchgeführten Analysen schließen.

6.2.2 Höhere LOH-Frequenz im Knochenmark als im Blut von Prostatakarzinom-Patienten

In der vorliegenden Studie wurde eine doppelt so hohe LOH-Frequenz im KM wie im Blut von Prostatakarzinom-Patienten gemessen (18 % vs. 9 %). Die Ergebnisse einer großen Studie von Schwarzenbach et al. (2007a) mit KM und Blut, in denen auch das Patientenkollektiv der vorliegenden Arbeit enthalten war, bestätigten die in der vorliegenden Studie gefundene erhöhte LOH-Frequenz im KM. LOH-Analysen mit frei zirkulierender DNA im KM von PCa-Patienten wurden in unserem Labor im Rahmen der vorliegenden Studie erstmals durchgeführt. Beschreibungen über Studien zur Detektion genetischer Aberrationen in tumorspezifischer DNA aus Blut gibt es in der Literatur zahlreich (Fleischhacker und Schmidt, 2007; Goessl et al., 2002; Schwarzenbach et al., 2007a; Schwarzenbach et al., 2004). In diesen Studien konnten Zusammenhänge zwischen dem Auftreten genetischer Alterationen in der freien DNA des Blutes mit den Prognosekriterien festgestellt werden (Müller et al., 2008; Schwarzenbach et al., 2009; Schwarzenbach et al., 2007a).

In den vorliegenden Analysen wurde bei Patienten mit metastasiertem Karzinom eine LOH-Frequenz von 10 % im Blut entdeckt, die nur etwas höher war, als bei Patienten ohne Metastasen (9 %). Korrespondierende Alterationen im Blut und KM fanden sich bei nur 15 % der Patienten. Eine Ursache für die fehlende Übereinstimmung zwischen Blut und KM könnte sein, dass die freie tumorspezifische DNA im Blut von normaler freier DNA maskiert wurde, während die tumorspezifische DNA im KM der Tumorpatienten akkumuliert.

In dem Kollektiv der MaCa-Patientinnen konnten bei keiner der 7 Patientinnen, von denen KM zur Verfügung stand, genetische Alterationen im KM nachgewiesen werden. Im Blut der Patientinnen waren in 3 % der informativen Fälle LOH nachzuweisen, im Tumor in 17 %. Jedoch fanden Taback et al. (2003) im KM eines viel größeren Kollektivs von MaCa-Patientinnen eine höhere LOH-Frequenz als im Blut und begründeten dies damit, dass KM ein statisches Reservoir und eine günstige Umgebung zur Akkumulation von freier DNA darstellt, wohingegen die Passage durch das Blut ein transienter Vorgang ist.

6.2.3 Limitationen der Detektion von LOH

Die teils niedrige LOH-Frequenz im Blut von MaCa-Patientinnen und PCa-Patienten in der vorliegenden Studie könnte folgendermaßen erklärt werden: Zum einen kann tumorspezifische DNA durch normale DNA maskiert werden (Coulet et al., 2000; Müller et al., 2008; Schwarzenbach et al., 2007a). Zudem ist die Identifizierung genetischer Alterationen oft durch geringe DNA-Quantität und –Qualität eingeschränkt (Müller et al., 2008). Es ist beschrieben, dass beim Einsatz zu geringer Mengen an DNA sogar artifizielle genetische Alterationen auftreten können (Farrand et al., 2002). Mit der Verwendung niedermolekularer DNA nach Fraktionierung der Plasma-DNA, sowie der Stabilisierung der DNA-Amplifikation durch Reduzierung unspezifischer Bindungen und dem Verhindern unerwünschter Produkte durch die Zugabe von Tetramethylammoniumchlorid (TMAC) in eine PCR könnte eine höhere und verlässlichere LOH-Frequenz erreicht werden (Hung et al., 1990; Müller et al., 2008; Wang et al., 2004).

Ein weiterer Grund für die teils niedrige LOH-Frequenz im Blut könnte das verwendete Markerset sein. Tumorassoziierte freie DNA scheint stärker degradiert zu sein und somit in kleineren Fragmenten vorzuliegen, als normale DNA (Dahiya et al., 1997). Hata et al. (2006) schlugen den Einsatz von "single nucleotide polymorphism"(SNP)-Markern vor, die Deletionen auf der Ebene einzelner Nukleotide erkennen, und zeigten in ihren Analysen mit Tumorgewebe von Gliom-Patienten, dass sogar in Proben, die bis zu 80 % mit normaler DNA kontaminiert waren, LOH detektiert werden konnten. Es wäre interessant, die LOH-Frequenzen an den korrespondierenden Längenpolymorphismus- und SNP-Markern zu vergleichen, um zu entscheiden, welche Methode für die Detektion von LOH verlässlichere Daten liefert.

6.3 Detektion zirkulierender Tumorzellen im Blut und disseminierter Tumorzellen im Knochenmark von Mammakarzinom-Patientinnen und Prostatakarzinom-Patienten

6.3.1 Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Tumorzellen und dem Nodalstatus

Die Präsenz von DTC im KM wurde wiederholt mit einer schlechteren Prognose in Zusammenhang gebracht (Braun et al., 2005; Gebauer et al., 2001; Pantel et al., 1994a; Pantel et al., 2003; Pantel und Riethdorf, 2009; Riethdorf et al., 2008). Die vorliegende Studie konnte die prognostische Relevanz von DTC und CTC für das MaCa bestätigen. Für DTC bzw. CTC fand sich eine signifikante Korrelation mit dem Nodalstatus (p=0,02). Eine Korrelation zwischen dem Vorkommen von DTC im KM und dem Nodalstatus wurde von Braun et al. (2005) beschrieben. Einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von CTC im Blut und dem Nodalstatus fanden Nakagawa et al. (2007). Allerdings werden immer wieder fehlende Korrelation nen zwischen TZ- und Nodalstatus beschrieben (Müller et al., 2005; Pierga et al., 2004). Diese Ergebnisse wiederum könnten die Theorie unterstützen, dass die hämatogene TZ-Disseminierung nicht streng mit der lymphatischen Route der Disseminiation verknüpft sein muss (Pantel und Brakenhoff, 2004), sondern, dass das TZ-Profil im Blut sowohl die CTC, die direkt aus dem Tumor ins Blut disseminieren, als auch die aus den Lymphknoten disseminierten TZ widerspiegelt. Unterstützt

wird diese Theorie durch das Vorkommen von Fernmetastasen bei MaCa- und PCa-Patienten, die keine Lymphknotenmetastasen hatten. Zusammengefasst wird die prognostische Bedeutung der Korrelation zwischen TZ und dem Nodalstatus in der Literatur kontrovers diskutiert. Allerdings werden Anstrengungen unternommen, das Risiko der Patientinnen Lymphknotenmetastasen zu entwickeln, durch eine verbesserte Detektion von TZ im KM und Blut besser prognostisch einzuschätzen. Viele Komplikationen durch totale Lymphnodektomien im Rahmen der primären Operation könnten damit vermieden werden.

Die vorliegenden Korrelationsanalysen zeigten zusätzlich zum Nodalstatus auch Zusammenhänge des Auftretens von CTC bzw. DTC mit dem Alter und von CTC mit der Ca-15-3-Konzentration bei MaCa-Patientinnen. Patientinnen mit CTC im Blut bzw. DTC im KM waren im Durchschnitt 7 Jahre älter als Patientinnen ohne TZ. Die CA15-3-Konzentration war bei Patientinnen mit CTC etwas höher als bei Patientinnen ohne CTC (23 vs. 20U/l). Einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von CTC und Ca15-3 beschrieben Müller et al. (Müller et al., 2005). Für das PCa fanden Schwarzenbach et al. einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Auftreten von CTC und einem ansteigenden Gleason-Score sowie einem fortgeschrittenen Tumorstadium (Schwarzenbach et al., 2009). Überraschenderweise ergaben die vorliegenden Analysen einen signifikant negativen Zusammenhang (p=0,023) zwischen Gleason-Score und DTC, wobei dieses Ergebnis aufgrund der geringen Anzahl von Patienten mit DTC im KM nicht aussagekräftig ist.

6.3.2 Höhere Entdeckungsrate von Tumorzellen im Knochenmark als im Blut

In der vorliegenden Arbeit konnten im Kollektiv der MaCa-Patientinnen bei insgesamt 56 % der untersuchten Patientinnen CK-positive Zellen im Blut oder KM nachgewiesen werden. Im KM wurden mit 71% wesentlich mehr CK-positive Zellen detektiert als im Blut (41 %). Im KM der PCa-Patienten wurden in 15 % der analysierten Proben DTC nachgewiesen, während im Blut der Patienten keine CTC detektiert werden konnten. In den bisher veröffentlichten Studien ist konsistent eine höhere Frequenz von DTC im KM als von CTC im Blut beschrieben worden (Cristofanilli et al., 2004; Müller et al., 2005; Pierga et al., 2004; Wiedswang et al., 2006). Eine mögliche Interpretation für die höheren Frequenzen von DTC gegenüber CTC können die geeigneten Bedingungen des KM für das Verweilen und Überleben der DTC sein, wohingegen die Ergebnisse der CTC-Analysen nur einen kurzen Ausschnitt der TZ-Dissemination beschreiben (Pantel et al., 2008).

Trotz des Fortschritts in der frühen Diagnostik und Therapie des MaCa und PCa und verbesserter adjuvanter Therapie ist die Prognose nach wie vor durch das Auftreten von Fernmetastasen limitiert. Die entscheidenden Mechanismen, die es TZ ermöglichen, das ursprüngliche Gewebe zu verlassen und außerhalb zu persistieren und zu wachsen, sind bis heute nicht ausreichend verstanden (Pantel und Brakenhoff, 2004). Man geht davon aus, dass okkulte Mikrometastasen bei der Mehrzahl der Betroffenen bereits bei der ersten Diagnosestellung vorliegen. Leider sind sie auch mit hochauflösenden radiologischen Methoden nicht zu detektieren. Die Prognosen zum Metastasierungsrisiko und die Behandlungskonzepte basieren immer noch hauptsächlich auf den statistischen Risikoparametern. Von besonderem Interesse ist daher in der aktuellen Forschung die weitere Verbesserung und Standardisierung der Detektion von CTC und DTC, der Zusammenhang zwischen dem Auftreten von genetischen Alterationen und CTC und die Identifikation zusätzlicher Parameter zur Charakterisierung der TZ zum Erstellen persönlicher Risikoprofile und Therapiepläne (Riethdorf und Pantel, 2008).

6.3.3 Können Tumorzell-Analysen im Knochenmark durch Analysen im Blut ersetzt werden?

In der vorliegenden Studie wurden bei 20 % der MaCa-Patientinnen TZ sowohl im Blut als auch im KM nachgewiesen. Bei PCa-Patienten konnten hingegen nur TZ im KM detektiert werden. Dies könnte, wie oben bereits erwähnt, u.a. damit erklärt werden, dass das KM geeignete Bedingungen für das Verweilen und Überleben der DTC bietet. Zudem scheinen CTC häufiger apoptotisch zu sein als DTC (Fehm et al., 2007; Mehes et al., 2001) und sind im Blut in der Regel in kleinerer Menge vorhanden, als DTC im KM (Pantel et al., 2008).

Meine Ergebnisse sind von besonderem Interesse für die in der aktuellen Literatur diskutierte Frage, ob die aufwändigeren und für den Patienten unangenehmeren TZ-Analysen im KM durch Analysen im Blut ersetzt werden können (Riethdorf und Pantel, 2008). Auch wird die klinische Bedeutung von DTC vor dem Hintergrund des heutigen Stands der Forschung von einigen Autoren sehr kritisch betrachtet (Scher und Pantel, 2009). In der Literatur wurden verschiedene Aspekte über den Ersatz der KM-Analysen durch Blutanalysen besprochen.

Zum einen ist der Vergleich der Frequenzen von DTC im KM und CTC im Blut von Bedeutung. Müller et al. (2005) und Pierga et al. (2004) konnten für das MaCa einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Auftreten von CTC im Blut und DTC im KM nachweisen.

Zum anderen ist die prognostische Aussagekraft der CTC und DTC zu berücksichtigen. Hierzu gibt es bisher noch wenige Studien, jedoch zeichnet sich ab, dass DTC im KM eine bedeutendere prognostische Signifikanz haben als CTC im Blut (Benoy et al., 2006; Pantel et al., 2008; Wiedswang et al., 2006). Eine fehlende Übereinstimmung der prognostischen Aussagekraft von CTC und DTC wurde von Pierga et al. (2004) und Wiedswang et al. (2006) beschrieben. Zur prognostischen Relevanz von CTC trug eine Studie von de Bono et al. (2008) bei, die zeigte, dass die mit Hilfe des CellSearch Systems präoperativ detektierten CTC und ihr Vergleich mit dem postoperativen CTC-Level einen unabhängigen Marker für das Überleben von PCa-Patienten darstellen.

Zusammengefasst kann noch nicht eindeutig geklärt werden, ob die Detektion von DTC durch CTC ersetzt werden kann. Fest steht aber, dass sowohl CTC als auch DTC relevant für das Monitoring metastatischer Progression und die Entwicklung individueller Therapiepläne sein können.

6.4 Zusammenhang zwischen der LOH-Frequenz und dem Auftreten von Tumorzellen in Blut und Knochenmark

Da TZ sowohl beim MaCa, als auch beim PCa im KM akkumulieren (Pantel und Brakenhoff, 2004), wurde untersucht, ob eine Korrelation zwischen den detektierten KM-LOH-Profilen und dem Vorhandensein von DTC im KM besteht. Tatsächlich wurden in 67 % der DTC-positiven Fälle im KM der PCa-Patienten LOH in den korrespondierenden KM-Proben nachgewiesen, was darauf hinweist, dass ein Anstieg von KM-LOH mit einem Anstieg von DTC im KM einhergeht. Es ist vorstellbar, dass die freie KM-DNA in Zusammenhang mit einer erhöhten Turnover-Rate der DTC steht und dass die freie DNA sowohl von metastatischen Zellen als auch vom Tumor selbst stammt. Meine Daten sind konsistent mit den Ergebnissen einer großen Studie von Schwarzenbach et al. (2007a), die auch die Ergebnisse der vorliegenden Analyse umfasst. Zusätzlich berichteten Schwarzenbach et al. (2009) über einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Auftreten von CTC und der LOH-Frequenz im Blut von PCa-Patienten. Im Kollektiv der MaCa-Patientinnen war das Auftreten CK-positiver Zellen im KM bei 40 % der Patientinnen mit dem Auftreten von LOH assoziiert, wobei die genetischen Alterationen nicht im KM, sondern in den korrespondierenden Tumor- und Blutproben auftraten. Die Ursache für die fehlende Assoziation zwischen dem Auftreten von DTC und der KM-LOH-Frequenz bei den MaCa-Patientinnen ist wahrscheinlich die mit 7 Proben sehr geringe Anzahl untersuchter KM-Proben. Deshalb sollte ein solcher Zusammenhang durch weitere Analysen mit einem größeren Kollektiv untersucht werden. Auch gab es keine Assoziation zwischen dem Auftreten von CTC und der Frequenz genetischer Alterationen bei MaCa-Patientinnen.

7. Schlussfolgerungen und Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie unterstreichen die klinische Relevanz der Detektion von CTC im Blut und DTC im KM als früher Marker für eine okkulte Mikrometastasierung. Zum einen wurde ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Detektion von DTC bzw. CTC und dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen festgestellt. Zum anderen konnten mehr DTC im KM detektiert werden als CTC im Blut, was das KM zur Suche nach okkulter Metastasierung besonders gewichtet.

Zudem wurde in der vorliegenden Studie eine Assoziation zwischen der LOH-Frequenz im KM und dem Auftreten von DTC im KM beim PCa beobachtet. Die Analyse genetischer Alterationen in freier Plasma-DNA könnte also ein zusätzlicher Ansatz zur Detektion mikrometastatischer Streuung werden.

In Bezug auf die Detektion genetischer Alterationen ergibt sich nach der Auswertung der Daten der vorliegenden Arbeit eine für Forschung und Praxis interessante Fragestellung. Ist Blutserum besser zur Detektion genetischer Alterationen geeignet als Blutplasma, da auch in der vorliegenden Arbeit beobachtet wurde, dass die Konzentration freier DNA im Blutserum höher ist als im Blutplasma?

Zur aktuellen Diskussion, ob TZ-Analysen im KM durch Blutanalysen ersetzt werden können, tragen die vorliegenden Ergebnisse bei, dass nur in einem geringen Prozentsatz eine Konkordanz zwischen dem Auftreten von CTC im Blut und DTC im KM gezeigt wurde, was möglicherweise gegen einen Ersatz von KM- durch Blutanalysen sprechen würde. Weitere vergleichende Studien sind notwendig, um diese klinisch bedeutsame Frage abschließend beantworten zu können. Hierbei sollte auch geklärt werden, ob die prognostische Aussagekraft von DTC und CTC konkordant ist.

Für eine allgemeine Implementierung eines Blut-basierten Assays zur Analyse genetischer Alterationen und zur Detektion von CTC und DTC in die klinische Praxis sind große prognostische Studien notwendig. Eine laborübergreifende Standardisierung der Methoden ist dabei unabdingbar, um eine hohe Reliabilität der Ergebnisse erreichen zu können.

8. Zusammenfassung

Die zurzeit eingesetzten Methoden zur Diagnostik des MaCa und PCa sind nicht sensitiv genug, um alle Karzinome in frühen Stadien zu erkennen. Auch genügen die heute üblichen Indikatoren für eine Metastasierung nicht, um alle Fälle metastatischer Streuung vor der klinischen Manifestation zu entdecken. Die vorliegende Arbeit sollte prüfen, ob die Detektion genetischer Alterationen, wie LOH und MSI, für die Früherkennung des MCa und PCa geeignet ist. Zudem wurde die klinische Bedeutung von CTC im Blut und DTC im KM für die Früherkennung von Metastasierung erforscht. Zu diesem Zweck wurde die extrazelluläre DNA im Blut von 36 PCa-Patienten und 30 MaCa-Patientinnen auf das Vorhandensein genetischer Alterationen untersucht. Vergleichende Analysen wurden mit 21 KM-Proben der PCa-Patienten sowie 7 KM- und 6 Tumorproben der MaCa-Patientinnen durchgeführt. Zudem wurden Blut und KM auf das Vorhandensein von CTC bzw. DTC untersucht. Alle Ergebnisse wurden mit den geltenden Prognoseparametern korreliert. Des Weiteren wurde geprüft, ob es eine Assoziation zwischen dem Auftreten von CTC und DTC und der LOH-Frequenz gibt.

Folgende Hauptergebnisse erbrachte die vorliegende Untersuchung:

- (1) Im Blutserum wurde bei MaCa-Patientinnen im Durchschnitt fast doppelt soviel extrazelluläre DNA nachgewiesen wie im Blutplasma von PCa-Patienten.
- (2) Die Konzentration der extrazellulären DNA lag im Durchschnitt bei N1-metastasierten MaCa-Patientinnen fast viermal höher als bei N0-Patientinnen. Bei N1-metastasierten PCa-Patienten war die durchschnittliche DNA-Konzentration fast doppelt so hoch wie bei N0-Patienten.
- (3) Bei PCa-Patienten war die LOH-Frequenz im KM etwa doppelt so hoch wie im Blut.
- (4) Bei MaCa-Patientinnen wurden im KM fast zweimal soviel DTC detektiert wie im Blut CTC. Bei PCa-Patienten wurden im KM weniger DTC nachgewiesen als bei MaCa-Patientinnen; im Blut der PCa-Patienten fanden sich keine CTC.
- (5) Das Auftreten von CTC bzw. DTC bei MaCa-Patientinnen korrelierte signifikant (p=0,02) mit dem Nodalstatus.
- (6) Bei PCa-Patienten fanden sich in 67 % der DTC-positiven KM-Proben auch LOH in den korrespondierenden KM-Proben. Bei MaCa-Patientinnen bestand in

40 % eine Assoziation zwischen dem Auftreten von DTC im KM und LOH im KM.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie unterstreichen die Bedeutung der Detektion von CTC und DTC zum Monitoring der Progression des MaCa und PCa. Besondere Relevanz in der TZ-Analyse hat das KM, wie in der vorliegenden Studie gezeigt wurde. Ein zusätzlicher Ansatz zur Detektion mikrometastatischer Streuung könnte die Analyse genetischer Alterationen in extrazellulärer DNA werden.

Große prognostische Studien sind notwendig, um die in der vorliegenden Arbeit gemachten Hypothesen zu bekräftigen und letztendlich Empfehlungen für die routinemäßige klinische Anwendung geben zu können.

9. Literaturverzeichnis

- Alix-Panabieres, C.; Vendrell, J. P.; Pelle, O.; Rebillard, X.; Riethdorf, S.; Muller, V.; Fabbro, M. und Pantel, K. (2007): Detection and characterization of putative metastatic precursor cells in cancer patients, Clin Chem 53 [3], Seite 537-9.
- Altwein, JE (2001): Prostatakarzinom. In Uroonkologie 3, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Bartha, R; Griffiths, K und Altwein, JE (1996): Der Einfluss nutritiver und nonnutritiver Nahrungsinhaltsstoffe auf die Inzidenz des Prostatakarzinoms. In Aktuelle Urologie 27.
- Bauer, K. D.; de la Torre-Bueno, J.; Diel, I. J.; Hawes, D.; Decker, W. J.; Priddy, C.; Bossy, B.; Ludmann, S.; Yamamoto, K.; Masih, A. S.; Espinoza, F. P. und Harrington, D. S. (2000): Reliable and sensitive analysis of occult bone marrow metastases using automated cellular imaging, Clin Cancer Res 6 [9], Seite 3552-9.
- Belchis, D. A.; Meece, C. A.; Benko, F. A.; Rogan, P. K.; Williams, R. A. und Gocke, C. D. (1996): Loss of heterozygosity and microsatellite instability at the retinoblastoma locus in osteosarcomas, Diagn Mol Pathol 5 [3], Seite 214-9.
- Benoy, I. H.; Elst, H.; Philips, M.; Wuyts, H.; Van Dam, P.; Scharpe, S.; Van Marck, E.; Vermeulen, P. B. und Dirix, L. Y. (2006): Real-time RT-PCR detection of disseminated tumour cells in bone marrow has superior prognostic significance in comparison with circulating tumour cells in patients with breast cancer, Br J Cancer 94 [5], Seite 672-80.
- Benusiglio, P. R.; Pharoah, P. D.; Smith, P. L.; Lesueur, F.; Conroy, D.; Luben, R. N.; Dew, G.; Jordan, C.; Dunning, A.; Easton, D. F. und Ponder, B. A. (2006): HapMap-based study of the 17q21 ERBB2 amplicon in susceptibility to breast cancer, Br J Cancer 95 [12], Seite 1689-95.
- Berry, D. A.; Cronin, K. A.; Plevritis, S. K.; Fryback, D. G.; Clarke, L.; Zelen, M.; Mandelblatt, J. S.; Yakovlev, A. Y.; Habbema, J. D. und Feuer, E. J. (2005): Effect of screening and adjuvant therapy on mortality from breast cancer, N Engl J Med 353 [17], Seite 1784-92.
- Bishop, J. M. (1983): Cellular oncogenes and retroviruses, Annu Rev Biochem 52, Seite 301-54.
- Bishop, J. M. (1991): Molecular themes in oncogenesis, Cell 64 [2], Seite 235-48.
- Bloom, H. J. und Richardson, W. W. (1957): Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years, Br J Cancer 11 [3], Seite 359-77.

- Böcker, W; Kunze, K-D (2001): Mamma. In Pathologie, Fischer, Urban &, München, Jena.
- Borgen, E ; Naume, B; Nesland, JM ; Kvalheim, G; Beiske, K; Fodstad, Ø; Diel, I; Solomayer, E; Theocharous, P; Coombes, RC; Smith, B; Wunder, E; Marolleau, JP; Garcia, J und Pantel, K (1999): Standardization of the immunocytochemical detection of cancer cells in BM and blood: I. establishment of objecive criteria for the evaluation of immunostained cells, Cytometry 1, Seite 377-388.
- Borgen, E.; Pantel, K.; Schlimok, G.; Muller, P.; Otte, M.; Renolen, A.; Ehnle, S.; Coith, C.; Nesland, J. M. und Naume, B. (2006): A European interlaboratory testing of three well-known procedures for immunocytochemical detection of epithelial cells in bone marrow. Results from analysis of normal bone marrow, Cytometry B Clin Cytom 70 [6], Seite 400-9.
- Bova, G. S.; MacGrogan, D.; Levy, A.; Pin, S. S.; Bookstein, R. und Isaacs, W. B. (1996): Physical mapping of chromosome 8p22 markers and their homozygous deletion in a metastatic prostate cancer, Genomics 35 [1], Seite 46-54.
- Brakenhoff, R. H.; Stroomer, J. G.; ten Brink, C.; de Bree, R.; Weima, S. M.; Snow, G. B. und van Dongen, G. A. (1999): Sensitive detection of squamous cells in bone marrow and blood of head and neck cancer patients by E48 reverse transcriptase-polymerase chain reaction, Clin Cancer Res 5 [4], Seite 725-32.
- Braun, S. und Pantel, K. (1999): Micrometastatic bone marrow involvement: detection and prognostic significance, Med Oncol 16 [3], Seite 154-65.
- Braun, S.; Pantel, K.; Muller, P.; Janni, W.; Hepp, F.; Kentenich, C. R.; Gastroph, S.;
 Wischnik, A.; Dimpfl, T.; Kindermann, G.; Riethmuller, G. und Schlimok, G. (2000): Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer, N Engl J Med 342 [8], Seite 525-33.
- Braun, S.; Cevatli, B. S.; Assemi, C.; Janni, W.; Kentenich, C. R.; Schindlbeck, C.; Rjosk, D. und Hepp, F. (2001): Comparative analysis of micrometastasis to the bone marrow and lymph nodes of node-negative breast cancer patients receiving no adjuvant therapy, J Clin Oncol 19 [5], Seite 1468-75.
- Braun, S. und Naume, B. (2005): Circulating and disseminated tumor cells, J Clin Oncol 23 [8], Seite 1623-6.
- Braun, S.; Vogl, F. D.; Naume, B.; Janni, W.; Osborne, M. P.; Coombes, R. C.;
 Schlimok, G.; Diel, I. J.; Gerber, B.; Gebauer, G.; Pierga, J. Y.; Marth, C.;
 Oruzio, D.; Wiedswang, G.; Solomayer, E. F.; Kundt, G.; Strobl, B.; Fehm,
 T.; Wong, G. Y.; Bliss, J.; Vincent-Salomon, A. und Pantel, K. (2005): A
 pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer, N Engl J
 Med 353 [8], Seite 793-802.
- Bruhn, N.; Beinert, T.; Oehm, C.; Jandrig, B.; Petersen, I.; Chen, X. Q.; Possinger, K. und Fleischhacker, M. (2000): Detection of microsatellite alterations in the DNA isolated from tumor cells and from plasma DNA of patients with lung cancer, Ann N Y Acad Sci 906, Seite 72-82.

- Buerger, H.; Mommers, E. C.; Littmann, R.; Diallo, R.; Brinkschmidt, C.; Poremba, C.; Dockhorn-Dworniczak, B.; van Diest, P. J. und Bocker, W. (2000): Correlation of morphologic and cytogenetic parameters of genetic instability with chromosomal alterations in in situ carcinomas of the breast, Am J Clin Pathol 114 [6], Seite 854-9.
- Carter, H. B.; Partin, A. W.; Luderer, A. A.; Metter, E. J.; Landis, P.; Chan, D. W.; Fozard, J. L. und Pearson, J. D. (1997): Percentage of free prostate-specific antigen in sera predicts aggressiveness of prostate cancer a decade before diagnosis, Urology 49 [3], Seite 379-84.
- Chambers, A. F.; Groom, A. C. und MacDonald, I. C. (2002): Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites, Nat Rev Cancer 2 [8], Seite 563-72.
- Chun, F. K.; Muller, I.; Lange, I.; Friedrich, M. G.; Erbersdobler, A.; Karakiewicz, P. I.; Graefen, M.; Pantel, K.; Huland, H. und Schwarzenbach, H. (2006): Circulating tumour-associated plasma DNA represents an independent and informative predictor of prostate cancer, BJU Int 98 [3], Seite 544-8.
- Cohen, S. J.; Alpaugh, R. K.; Gross, S.; O'Hara, S. M.; Smirnov, D. A.; Terstappen, L. W.; Allard, W. J.; Bilbee, M.; Cheng, J. D.; Hoffman, J. P.; Lewis, N. L.; Pellegrino, A.; Rogatko, A.; Sigurdson, E.; Wang, H.; Watson, J. C.; Weiner, L. M. und Meropol, N. J. (2006): Isolation and characterization of circulating tumor cells in patients with metastatic colorectal cancer, Clin Colorectal Cancer 6 [2], Seite 125-32.
- Cooney, K. A.; Wetzel, J. C.; Consolino, C. M. und Wojno, K. J. (1996): Identification and characterization of proximal 6q deletions in prostate cancer, Cancer Res 56 [18], Seite 4150-3.
- Cordell, J. L.; Falini, B.; Erber, W. N.; Ghosh, A. K.; Abdulaziz, Z.; MacDonald, S.; Pulford, K. A.; Stein, H. und Mason, D. Y. (1984): Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes), J Histochem Cytochem 32 [2], Seite 219-29.
- Cote, R. J.; Rosen, P. P.; Lesser, M. L.; Old, L. J. und Osborne, M. P. (1991): Prediction of early relapse in patients with operable breast cancer by detection of occult bone marrow micrometastases, J Clin Oncol 9 [10], Seite 1749-56.
- Coulet, F.; Blons, H.; Cabelguenne, A.; Lecomte, T.; Lacourreye, O.; Brasnu, D.; Beaune, P.; Zucman, J. und Laurent-Puig, P. (2000): Detection of plasma tumor DNA in head and neck squamous cell carcinoma by microsatellite typing and p53 mutation analysis, Cancer Res 60 [3], Seite 707-11.
- Cristofanilli, M.; Budd, G. T.; Ellis, M. J.; Stopeck, A.; Matera, J.; Miller, M. C.; Reuben, J. M.; Doyle, G. V.; Allard, W. J.; Terstappen, L. W. und Hayes, D. F. (2004): Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer, N Engl J Med 351 [8], Seite 781-91.
- Cristofanilli, M.; Hayes, D. F.; Budd, G. T.; Ellis, M. J.; Stopeck, A.; Reuben, J. M.; Doyle, G. V.; Matera, J.; Allard, W. J.; Miller, M. C.; Fritsche, H. A.; Horto-

bagyi, G. N. und Terstappen, L. W. (2005): Circulating tumor cells: a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer, J Clin Oncol 23 [7], Seite 1420-30.

- Dahiya, R.; McCarville, J.; Lee, C.; Hu, W.; Kaur, G.; Carroll, P. und Deng, G. (1997): Deletion of chromosome 11p15, p12, q22, q23-24 loci in human prostate cancer, Int J Cancer 72 [2], Seite 283-8.
- de Bono, J. S.; Scher, H. I.; Montgomery, R. B.; Parker, C.; Miller, M. C.; Tissing, H.; Doyle, G. V.; Terstappen, L. W.; Pienta, K. J. und Raghavan, D. (2008): Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer, Clin Cancer Res 14 [19], Seite 6302-9.
- Dearnaley, D. P.; Sloane, J. P.; Ormerod, M. G.; Steele, K.; Coombes, R. C.; Clink, H. M.; Powles, T. J.; Ford, H. T.; Gazet, J. C. und Neville, A. M. (1981): Increased detection of mammary carcinoma cells in marrow smears using antisera to epithelial membrane antigen, Br J Cancer 44 [1], Seite 85-90.
- Dearnaley, D. P.; Ormerod, M. G.; Sloane, J. P.; Lumley, H.; Imrie, S.; Jones, M.; Coombes, R. C. und Neville, A. M. (1983): Detection of isolated mammary carcinoma cells in marrow of patients with primary breast cancer, J R Soc Med 76 [5], Seite 359-64.
- Diel, IJ ; Kaufmann, M; Goerner, L; Costa, SD; Kaul, S und Bastert, G (1992): Detection of tumor cells in bone marrow of patients with primary breast cancer: a prognostic factor for distant metastasis, n. Onc 10, Seite 1534-1539.
- Dressman, M. A.; Baras, A.; Malinowski, R.; Alvis, L. B.; Kwon, I.; Walz, T. M. und Polymeropoulos, M. H. (2003): Gene expression profiling detects gene amplification and differentiates tumor types in breast cancer, Cancer Res 63 [9], Seite 2194-9.
- Edlund, S.; Bu, S.; Schuster, N.; Aspenstrom, P.; Heuchel, R.; Heldin, N. E.; ten Dijke, P.; Heldin, C. H. und Landstrom, M. (2003): Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta)-induced apoptosis of prostate cancer cells involves Smad7-dependent activation of p38 by TGF-beta-activated kinase 1 and mitogen-activated protein kinase kinase 3, Mol Biol Cell 14 [2], Seite 529-44.
- Elledge, R. M.; Green, S.; Ciocca, D.; Pugh, R.; Allred, D. C.; Clark, G. M.; Hill, J.; Ravdin, P.; O'Sullivan, J.; Martino, S. und Osborne, C. K. (1998): HER-2 expression and response to tamoxifen in estrogen receptor-positive breast cancer: a Southwest Oncology Group Study, Clin Cancer Res 4 [1], Seite 7-12.
- Elston, CW und Ellis, IO (1991): Pathological prognostis factors in breast cancer. I. The value of histologicalgrade in breast cancer: experiences from a large study with long-term follow-up, Histopathology 19, Seite 403-410.
- Farrand, K.; Jovanovic, L.; Delahunt, B.; McIver, B.; Hay, I. D.; Eberhardt, N. L. und Grebe, S. K. (2002): Loss of heterozygosity studies revisited: prior quantification of the amplifiable DNA content of archival samples improves efficiency and reliability, J Mol Diagn 4 [3], Seite 150-8.

- Fearon, E. R. und Vogelstein, B. (1990): A genetic model for colorectal tumorigenesis, Cell 61 [5], Seite 759-67.
- Fehm, T.; Becker, S.; Bachmann, C.; Beck, V.; Gebauer, G.; Banys, M.; Wallwiener, D. und Solomayer, E. F. (2006a): Detection of disseminated tumor cells in patients with gynecological cancers, Gynecol Oncol 103 [3], Seite 942-7.
- Fehm, T.; Braun, S.; Muller, V.; Janni, W.; Gebauer, G.; Marth, C.; Schindlbeck, C.; Wallwiener, D.; Borgen, E.; Naume, B.; Pantel, K. und Solomayer, E. (2006b): A concept for the standardized detection of disseminated tumor cells in bone marrow from patients with primary breast cancer and its clinical implementation, Cancer 107 [5], Seite 885-92.
- Fehm, T.; Becker, S.; Duerr-Stoerzer, S.; Sotlar, K.; Mueller, V.; Wallwiener, D.; Lane, N.; Solomayer, E. und Uhr, J. (2007): Determination of HER2 status using both serum HER2 levels and circulating tumor cells in patients with recurrent breast cancer whose primary tumor was HER2 negative or of unknown HER2 status, Breast Cancer Res 9 [5], Seite R74.
- Fidler, I. J. und Kripke, M. L. (1977): Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor, Science 197 [4306], Seite 893-5.
- Fleischhacker, M. und Schmidt, B. (2007): Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer--a survey, Biochim Biophys Acta 1775 [1], Seite 181-232.
- Funke, I. und Schraut, W. (1998): Meta-analyses of studies on bone marrow micrometastases: an independent prognostic impact remains to be substantiated, J Clin Oncol 16 [2], Seite 557-66.
- Gebauer, G.; Fehm, T.; Merkle, E.; Beck, E. P.; Lang, N. und Jager, W. (2001): Epithelial cells in bone marrow of breast cancer patients at time of primary surgery: clinical outcome during long-term follow-up, J Clin Oncol 19 [16], Seite 3669-74.
- Gerber, B.; Krause, A.; Muller, H.; Richter, D.; Reimer, T.; Makovitzky, J.; Herrnring, C.; Jeschke, U.; Kundt, G. und Friese, K. (2001): Simultaneous immunohistochemical detection of tumor cells in lymph nodes and bone marrow aspirates in breast cancer and its correlation with other prognostic factors, J Clin Oncol 19 [4], Seite 960-71.
- Gleason, DF und Mellinger, GT (1974): Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging, J Urol 111, Seite 58-64.
- Goessl, C.; Muller, M.; Straub, B. und Miller, K. (2002): DNA alterations in body fluids as molecular tumor markers for urological malignancies, Eur Urol 41 [6], Seite 668-76.
- Goldhirsch, A.; Glick, J. H.; Gelber, R. D.; Coates, A. S.; Thurlimann, B. und Senn, H. J. (2005): Meeting highlights: international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2005, Ann Oncol 16 [10], Seite 1569-83.

- Gray, J. W. (2003): Evidence emerges for early metastasis and parallel evolution of primary and metastatic tumors, Cancer Cell 4 [1], Seite 4-6.
- Hall, J. M.; Lee, M. K.; Newman, B.; Morrow, J. E.; Anderson, L. A.; Huey, B. und King, M. C. (1990): Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21, Science 250 [4988], Seite 1684-9.
- Hampl, M.; Hampl, J. A.; Reiss, G.; Schackert, G.; Saeger, H. D. und Schackert, H. K. (1999): Loss of heterozygosity accumulation in primary breast carcinomas and additionally in corresponding distant metastases is associated with poor outcome, Clin Cancer Res 5 [6], Seite 1417-25.
- Harbeck, N.; Untch, M.; Pache, L. und Eiermann, W. (1994): Tumour cell detection in the bone marrow of breast cancer patients at primary therapy: results of a 3-year median follow-up, Br J Cancer 69 [3], Seite 566-71.
- Harvey, J. und Ashford, M. L. (2003): Leptin in the CNS: much more than a satiety signal, Neuropharmacology 44 [7], Seite 845-54.
- Hata, N.; Yoshimoto, K.; Yokoyama, N.; Mizoguchi, M.; Shono, T.; Guan, Y.; Tahira, T.; Kukita, Y.; Higasa, K.; Nagata, S.; Iwaki, T.; Sasaki, T. und Hayashi, K. (2006): Allelic losses of chromosome 10 in glioma tissues detected by quantitative single-strand conformation polymorphism analysis, Clin Chem 52 [3], Seite 370-8.
- Hautmann, R und Huland, H (2001): Urologie 2, Springer-Verlag, Berlin.
- Hayes, D. F.; Cristofanilli, M.; Budd, G. T.; Ellis, M. J.; Stopeck, A.; Miller, M. C.; Matera, J.; Allard, W. J.; Doyle, G. V. und Terstappen, L. W. (2006): Circulating tumor cells at each follow-up time point during therapy of metastatic breast cancer patients predict progression-free and overall survival, Clin Cancer Res 12 [14 Pt 1], Seite 4218-24.
- Hung, T.; Mak, K. und Fong, K. (1990): A specificity enhancer for polymerase chain reaction, Nucleic Acids Res 18 [16], Seite 4953.
- IARC (2003): World Cancer Report.
- Jahr, S.; Hentze, H.; Englisch, S.; Hardt, D.; Fackelmayer, F. O.; Hesch, R. D. und Knippers, R. (2001): DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells, Cancer Res 61 [4], Seite 1659-65.
- Jänicke, F. (2002): Prognostische und prädiktive Faktoren bei Patientinnen mit Mammakarinom. In Management des Mammakarzinoms 2, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Janni, W.; Hepp, F.; Strobl, B.; Rack, B.; Rjosk, D.; Kentenich, C.; Schindlbeck, C.; Hantschmann, P.; Pantel, K.; Sommer, H. und Braun, S. (2003): Patterns of disease recurrence influenced by hematogenous tumor cell dissemination in patients with cervical carcinoma of the uterus, Cancer 97 [2], Seite 405-11.

- Janni, W.; Rack, B.; Schindlbeck, C.; Strobl, B.; Rjosk, D.; Braun, S.; Sommer, H.; Pantel, K.; Gerber, B. und Friese, K. (2005): The persistence of isolated tumor cells in bone marrow from patients with breast carcinoma predicts an increased risk for recurrence, Cancer 103 [5], Seite 884-91.
- Jarrard, D. F.; Bova, G. S.; Ewing, C. M.; Pin, S. S.; Nguyen, S. H.; Baylin, S. B.; Cairns, P.; Sidransky, D.; Herman, J. G. und Isaacs, W. B. (1997): Deletional, mutational, and methylation analyses of CDKN2 (p16/MTS1) in primary and metastatic prostate cancer, Genes Chromosomes Cancer 19 [2], Seite 90-6.
- Johnson, M. L. und Seidman, A. D. (2005): Emerging targeted therapies for breast cancer, Oncology (Williston Park) 19 [5], Seite 611-8.
- Katsuragi, Y. und Sagata, N. (2004): Regulation of Chk1 kinase by autoinhibition and ATR-mediated phosphorylation, Mol Biol Cell 15 [4], Seite 1680-9.
- Kauraniemi, P. und Kallioniemi, A. (2006): Activation of multiple cancer-associated genes at the ERBB2 amplicon in breast cancer, Endocr Relat Cancer 13 [1], Seite 39-49.
- Kleer, E. und Oesterling, J. E. (1993): PSA and staging of localized prostate cancer, Urol Clin North Am 20 [4], Seite 695-704.
- Klein, C. A.; Blankenstein, T. J.; Schmidt-Kittler, O.; Petronio, M.; Polzer, B.; Stoecklein, N. H. und Riethmuller, G. (2002): Genetic heterogeneity of single disseminated tumour cells in minimal residual cancer, Lancet 360 [9334], Seite 683-9.
- Konishi, N.; Nakamura, M.; Kishi, M.; Ishida, E.; Shimada, K.; Matsuyoshi, S.; Nagai, H. und Emi, M. (2003): Genetic mapping of allelic loss on chromosome 6q within heterogeneous prostate carcinoma, Cancer Sci 94 [9], Seite 764-8.
- Köllermann, J; Weikert, S; Schostak, M; Kempkensteffen, C; Kleinschmidt, K; Rau, T; Pantel, K (2008): Prognostic significance of disseminated tumor cells in bone marrow of prostate cancer patients treated with neoadjuvant hormone treatment, J Clin Ocol 26 [30], Seite 4928-33.
- Krag, D. N. und Single, R. M. (2003): Breast cancer survival according to number of nodes removed, Ann Surg Oncol 10 [10], Seite 1152-9.
- Kreienberg, Rolf; Volm T; Alt, D; (2002): Krankheitsbild: Mammakarzinom. In Management des Mammakarzinoms: mit 135 Tabellen 2, Springer-Verlag, Onkologie aktuell, Berlin, Heidelberg, New York.
- Leon, S. A.; Green, A.; Yaros, M. J. und Shapiro, B. (1975): Radioimmunoassay for nanogram quantities of DNA, J Immunol Methods 9 [2], Seite 157-64.
- Leon, S. A.; Shapiro, B.; Sklaroff, D. M. und Yaros, M. J. (1977): Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy, Cancer Res 37 [3], Seite 646-50.

- Lessa, E. P. und Applebaum, G. (1993): Screening techniques for detecting allelic variation in DNA sequences, Mol Ecol 2 [2], Seite 119-29.
- Mandel, P und Métais, P (1948): Les acides nucléiques du plasma sanguine chez l'homme, C R Acad Sci Paris 142, Seite 143-241.
- Mansi, J. L.; Easton, D.; Berger, U.; Gazet, J. C.; Ford, H. T.; Dearnaley, D. und Coombes, R. C. (1991): Bone marrow micrometastases in primary breast cancer: prognostic significance after 6 years' follow-up, Eur J Cancer 27 [12], Seite 1552-5.
- Masuda, T. A.; Kataoka, A.; Ohno, S.; Murakami, S.; Mimori, K.; Utsunomiya, T.; Inoue, H.; Tsutsui, S.; Kinoshita, J.; Masuda, N.; Moriyama, N. und Mori, M. (2005): Detection of occult cancer cells in peripheral blood and bone marrow by quantitative RT-PCR assay for cytokeratin-7 in breast cancer patients, Int J Oncol 26 [3], Seite 721-30.
- Mehes, G.; Witt, A.; Kubista, E. und Ambros, P. F. (2001): Circulating breast cancer cells are frequently apoptotic, Am J Pathol 159 [1], Seite 17-20.
- Moir, D. J.; Ghosh, A. K.; Abdulaziz, Z.; Knight, P. M. und Mason, D. Y. (1983): Immunoenzymatic staining of haematological samples with monoclonal antibodies, Br J Haematol 55 [3], Seite 395-410.
- Moreno, J. G.; O'Hara, S. M.; Gross, S.; Doyle, G.; Fritsche, H.; Gomella, L. G. und Terstappen, L. W. (2001): Changes in circulating carcinoma cells in patients with metastatic prostate cancer correlate with disease status, Urology 58 [3], Seite 386-92.
- Müller, I.; Urban, K.; Pantel, K. und Schwarzenbach, H. (2006a): Comparison of genetic alterations detected in circulating microsatellite DNA in blood plasma samples of patients with prostate cancer and benign prostatic hyperplasia, Ann N Y Acad Sci 1075, Seite 222-9.
- Müller, I.; Beeger, C.; Alix-Panabieres, C.; Rebillard, X.; Pantel, K. und Schwarzenbach, H. (2008): Identification of loss of heterozygosity on circulating free DNA in peripheral blood of prostate cancer patients: potential and technical improvements, Clin Chem 54 [4], Seite 688-96.
- Müller, V. und Pantel, K. (2004): Bone marrow micrometastases and circulating tumor cells: current aspects and future perspectives, Breast Cancer Res 6 [6], Seite 258-61.
- Müller, V. und Pantel, K. (2005): BM micrometastases and circulating tumor cells in breast cancer patients: where have we been, where are we now and where does the future lie?, Cytotherapy 7 [6], Seite 478-82.
- Müller, V.; Stahmann, N.; Riethdorf, S.; Rau, T.; Zabel, T.; Goetz, A.; Janicke, F. und Pantel, K. (2005): Circulating tumor cells in breast cancer: correlation to bone marrow micrometastases, heterogeneous response to systemic therapy and low proliferative activity, Clin Cancer Res 11 [10], Seite 3678-85.

- Müller, V.; Hayes, D. F. und Pantel, K. (2006b): Recent translational research: circulating tumor cells in breast cancer patients, Breast Cancer Res 8 [5], Seite 110.
- Müller, V.; Witzel, I.; Pantel, K.; Krenkel, S.; Luck, H. J.; Neumann, R.; Keller, T.; Dittmer, J.; Janicke, F. und Thomssen, C. (2006c): Prognostic and predictive impact of soluble epidermal growth factor receptor (sEGFR) protein in the serum of patients treated with chemotherapy for metastatic breast cancer, Anticancer Res 26 [2B], Seite 1479-87.
- Mullis, K. B. (1990): The unusual origin of the polymerase chain reaction, Sci Am 262 [4], Seite 56-61, 64-5.
- Mundy, G. R. (2002): Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities, Nat Rev Cancer 2 [8], Seite 584-93.
- Murphy, D. S.; McHardy, P.; Coutts, J.; Mallon, E. A.; George, W. D.; Kaye, S. B.; Brown, R. und Keith, W. N. (1995): Interphase cytogenetic analysis of erbB2 and topoII alpha co-amplification in invasive breast cancer and polysomy of chromosome 17 in ductal carcinoma in situ, Int J Cancer 64 [1], Seite 18-26.
- Nagai, M. A.; Yamamoto, L.; Salaorni, S.; Pacheco, M. M.; Brentani, M. M.; Barbosa, E. M.; Brentani, R. R.; Mazoyer, S.; Smith, S. A.; Ponder, B. A. und et al. (1994): Detailed deletion mapping of chromosome segment 17q12-21 in sporadic breast tumours, Genes Chromosomes Cancer 11 [1], Seite 58-62.
- Nakagawa, T.; Martinez, S. R.; Goto, Y.; Koyanagi, K.; Kitago, M.; Shingai, T.;
 Elashoff, D. A.; Ye, X.; Singer, F. R.; Giuliano, A. E. und Hoon, D. S.
 (2007): Detection of circulating tumor cells in early-stage breast cancer metastasis to axillary lymph nodes, Clin Cancer Res 13 [14], Seite 4105-10.
- Nakamura, Y.; Leppert, M.; O'Connell, P.; Wolff, R.; Holm, T.; Culver, M.; Martin, C.; Fujimoto, E.; Hoff, M.; Kumlin, E. und et al. (1987): Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping, Science 235 [4796], Seite 1616-22.
- Nakayama, T.; Watanabe, M.; Yamanaka, M.; Hirokawa, Y.; Suzuki, H.; Ito, H.; Yatani, R. und Shiraishi, T. (2001): The role of epigenetic modifications in retinoic acid receptor beta2 gene expression in human prostate cancers, Lab Invest 81 [7], Seite 1049-57.
- Naume, B.; Wiedswang, G.; Borgen, E.; Kvalheim, G.; Karesen, R.; Qvist, H.; Janbu, J.; Harbitz, T. und Nesland, J. M. (2004): The prognostic value of isolated tumor cells in bone marrow in breast cancer patients: evaluation of morphological categories and the number of clinically significant cells, Clin Cancer Res 10 [9], Seite 3091-7.
- Paik, S.; Bryant, J.; Park, C.; Fisher, B.; Tan-Chiu, E.; Hyams, D.; Fisher, E. R.; Lippman, M. E.; Wickerham, D. L. und Wolmark, N. (1998): erbB-2 and response to doxorubicin in patients with axillary lymph node-positive, hormone receptor-negative breast cancer, J Natl Cancer Inst 90 [18], Seite 1361-70.

- Paik, S.; Shak, S.; Tang, G.; Kim, C.; Baker, J.; Cronin, M.; Baehner, F. L.; Walker, M. G.; Watson, D.; Park, T.; Hiller, W.; Fisher, E. R.; Wickerham, D. L.; Bryant, J. und Wolmark, N. (2004): A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer, N Engl J Med 351 [27], Seite 2817-26.
- Pantel, K.; Izbicki, J. R.; Angstwurm, M.; Braun, S.; Passlick, B.; Karg, O.; Thetter, O. und Riethmuller, G. (1993a): Immunocytological detection of bone marrow micrometastasis in operable non-small cell lung cancer, Cancer Res 53 [5], Seite 1027-31.
- Pantel, K.; Schlimok, G.; Braun, S.; Kutter, D.; Lindemann, F.; Schaller, G.; Funke, I.; Izbicki, J. R. und Riethmuller, G. (1993b): Differential expression of proliferation-associated molecules in individual micrometastatic carcinoma cells, J Natl Cancer Inst 85 [17], Seite 1419-24.
- Pantel, K.; Felber, E. und Schlimok, G. (1994a): Detection and characterization of residual disease in breast cancer, J Hematother 3 [4], Seite 315-22.
- Pantel, K.; Schlimok, G.; Angstwurm, M.; Weckermann, D.; Schmaus, W.; Gath, H.; Passlick, B.; Izbicki, J. R. und Riethmuller, G. (1994b): Methodological analysis of immunocytochemical screening for disseminated epithelial tumor cells in bone marrow, J Hematother 3 [3], Seite 165-73.
- Pantel, K.; Braun, S.; Passlick, B. und Schlimok, G. (1996): Minimal residual epithelial cancer: diagnostic approaches and prognostic relevance, Prog Histochem Cytochem 30 [3], Seite 1-60.
- Pantel, K.; Cote, R. J. und Fodstad, O. (1999): Detection and clinical importance of micrometastatic disease, J Natl Cancer Inst 91 [13], Seite 1113-24.
- Pantel, K. und Otte, M. (2001): Occult micrometastasis: enrichment, identification and characterization of single disseminated tumour cells, Semin Cancer Biol 11 [5], Seite 327-37.
- Pantel, K.; Muller, V.; Auer, M.; Nusser, N.; Harbeck, N. und Braun, S. (2003): Detection and clinical implications of early systemic tumor cell dissemination in breast cancer, Clin Cancer Res 9 [17], Seite 6326-34.
- Pantel, K. und Brakenhoff, R. (2004): Dissecting the Metastatic cascade, nature 4, Seite 448-456.
- Pantel, K. und Woelfle, U. (2005): Detection and molecular characterisation of disseminated tumour cells: implications for anti-cancer therapy, Biochim Biophys Acta 1756 [1], Seite 53-64.
- Pantel, K. und Woelfle, U. (2006): Circulating tumor cells as an indicator for invasion, AACRJournals [1], Seite 116-119.
- Pantel, K.; Brakenhoff, R. H. und Brandt, B. (2008): Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells, Nat Rev Cancer 8 [5], Seite 329-40.

- Pantel, K. und Riethdorf, S. (2009): Pathology: are circulating tumor cells predictive of overall survival?, Nat Rev Clin Oncol 6 [4], Seite 190-1.
- Paulson, T. G.; Wright, F. A.; Parker, B. A.; Russack, V. und Wahl, G. M. (1996): Microsatellite instability correlates with reduced survival and poor disease prognosis in breast cancer, Cancer Res 56 [17], Seite 4021-6.
- Pecina-Slaus, N. (2003): Tumor suppressor gene E-cadherin and its role in normal and malignant cells, Cancer Cell Int 3 [1], Seite 17.
- Perinchery, G.; Bukurov, N.; Nakajima, K.; Chang, J.; Li, L. C. und Dahiya, R. (1999): High frequency of deletion on chromosome 9p21 may harbor several tumor-suppressor genes in human prostate cancer, Int J Cancer 83 [5], Seite 610-4.
- Pfeiderer, A; Breckwoldt, M und Martius, G (2001): Maligne Tumoren der Mamma. In Gynäkologie und Geburtshilfe 12, Thieme-Verlag, Stuttgart.
- Pierga, J. Y.; Bonneton, C.; Vincent-Salomon, A.; de Cremoux, P.; Nos, C.; Blin, N.; Pouillart, P.; Thiery, J. P. und Magdelenat, H. (2004): Clinical significance of immunocytochemical detection of tumor cells using digital microscopy in peripheral blood and bone marrow of breast cancer patients, Clin Cancer Res 10 [4], Seite 1392-400.
- Pinzani, P.; Salvadori, B.; Simi, L.; Bianchi, S.; Distante, V.; Cataliotti, L.; Pazzagli, M. und Orlando, C. (2006): Isolation by size of epithelial tumor cells in peripheral blood of patients with breast cancer: correlation with real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction results and feasibility of molecular analysis by laser microdissection, Hum Pathol 37 [6], Seite 711-8.
- Plummer, S. J.; Adams, L.; Simmons, J. A. und Casey, G. (1997): Localization of a growth suppressor activity in MCF7 breast cancer cells to chromosome 17q24-q25, Oncogene 14 [19], Seite 2339-45.
- Ponder, B. A. (1992): Molecular genetics of cancer, Bmj 304 [6836], Seite 1234-6.
- Prasad, M. A.; Trybus, T. M.; Wojno, K. J. und Macoska, J. A. (1998): Homozygous and frequent deletion of proximal 8p sequences in human prostate cancers: identification of a potential tumor suppressor gene site, Genes Chromosomes Cancer 23 [3], Seite 255-62.
- Qiu, H.; Lotan, R.; Lippman, S. M. und Xu, X. C. (2000): Lack of correlation between expression of retinoic acid receptor-beta and loss of heterozygosity on chromosome band 3p24 in esophageal cancer, Genes Chromosomes Cancer 28 [2], Seite 196-202.
- Quenel, N.; Wafflart, J.; Bonichon, F.; de Mascarel, I.; Trojani, M.; Durand, M.; Avril, A. und Coindre, J. M. (1995): The prognostic value of c-erbB2 in primary breast carcinomas: a study on 942 cases, Breast Cancer Res Treat 35 [3], Seite 283-91.

- Rebbeck, T. R. (2002): Prophylactic oophorectomy in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers, Eur J Cancer 38 Suppl 6, Seite S15-7.
- Redding, W. H.; Coombes, R. C.; Monaghan, P.; Clink, H. M.; Imrie, S. F.; Dearnaley, D. P.; Ormerod, M. G.; Sloane, J. P.; Gazet, J. C.; Powles, T. J. und et al. (1983): Detection of micrometastases in patients with primary breast cancer, Lancet 2 [8362], Seite 1271-4.
- Riethdorf, S.; Fritsche, H.; Muller, V.; Rau, T.; Schindlbeck, C.; Rack, B.; Janni, W.; Coith, C.; Beck, K.; Janicke, F.; Jackson, S.; Gornet, T.; Cristofanilli, M. und Pantel, K. (2007): Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the CellSearch system, Clin Cancer Res 13 [3], Seite 920-8.
- Riethdorf, S. und Pantel, K. (2008): Disseminated tumor cells in bone marrow and circulating tumor cells in blood of breast cancer patients: current state of detection and characterization, Pathobiology 75 [2], Seite 140-8.
- Riethdorf, S; Wikmann, H; Pantel, K (2008): Review: Biological relevance of disseminated tumor cells in cancer patients, Int J Cancer 123 [9], Seite 1991-2006.
- Ross, RK; Paganini-Hill, A und Henderson, B (1983): The etiology of prostate cancer: What does epidemiology suggest?, Prostate 4, Seite 333-334.
- Saiki, R. K.; Scharf, S.; Faloona, F.; Mullis, K. B.; Horn, G. T.; Erlich, H. A. und Arnheim, N. (1985): Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia, Science 230 [4732], Seite 1350-4.
- Sandberg, A. A. (1994): Cancer cytogenetics for clinicians, CA Cancer J Clin 44 [3], Seite 136-59.
- Scher, H. I. und Pantel, K. (2009): Bone marrow aspiration for disseminated tumor cell detection: a must-have test or is the jury still out?, J Clin Oncol 27 [10], Seite 1531-3.
- Schlimok, G.; Funke, I.; Holzmann, B.; Gottlinger, G.; Schmidt, G.; Hauser, H.;
 Swierkot, S.; Warnecke, H. H.; Schneider, B.; Koprowski, H. und et al. (1987): Micrometastatic cancer cells in bone marrow: in vitro detection with anti-cytokeratin and in vivo labeling with anti-17-1A monoclonal antibodies, Proc Natl Acad Sci U S A 84 [23], Seite 8672-6.
- Schlimok, G.; Funke, I.; Bock, B.; Schweiberer, B.; Witte, J. und Riethmuller, G. (1990): Epithelial tumor cells in bone marrow of patients with colorectal cancer: immunocytochemical detection, phenotypic characterization, and prognostic significance, J Clin Oncol 8 [5], Seite 831-7.
- Schlimok, G.; Funke, I.; Pantel, K.; Strobel, F.; Lindemann, F.; Witte, J. und Riethmuller, G. (1991): Micrometastatic tumour cells in bone marrow of patients with gastric cancer: methodological aspects of detection and prognostic significance, Eur J Cancer 27 [11], Seite 1461-5.

- Schmidt-Kittler, O.; Ragg, T.; Daskalakis, A.; Granzow, M.; Ahr, A.; Blankenstein, T. J.; Kaufmann, M.; Diebold, J.; Arnholdt, H.; Muller, P.; Bischoff, J.; Harich, D.; Schlimok, G.; Riethmuller, G.; Eils, R. und Klein, C. A. (2003): From latent disseminated cells to overt metastasis: genetic analysis of systemic breast cancer progression, Proc Natl Acad Sci U S A 100 [13], Seite 7737-42.
- Schmidt-Matthiesen, H; Bastert, G und Wallwiener, D (2002): Gynäkoloische Onkologie 7, Schattauer-Verlag, Stuttgart, New York.
- Schwartz, M. D.; Kaufman, E.; Peshkin, B. N.; Isaacs, C.; Hughes, C.; DeMarco, T.; Finch, C. und Lerman, C. (2003): Bilateral prophylactic oophorectomy and ovarian cancer screening following BRCA1/BRCA2 mutation testing, J Clin Oncol 21 [21], Seite 4034-41.
- Schwarzenbach, H.; Muller, V.; Stahmann, N. und Pantel, K. (2004): Detection and characterization of circulating microsatellite-DNA in blood of patients with breast cancer 1022, Ann N Y Acad Sci.
- Schwarzenbach, H.; Chun, F. K.; Lange, I.; Carpenter, S.; Gottberg, M.; Erbersdobler, A.; Friedrich, M. G.; Huland, H. und Pantel, K. (2007a): Detection of tumor-specific DNA in blood and bone marrow plasma from patients with prostate cancer, Int J Cancer.
- Schwarzenbach, H.; Muller, V.; Beeger, C.; Gottberg, M.; Stahmann, N. und Pantel, K. (2007b): A critical evaluation of loss of heterozygosity detected in tumor tissues, blood serum and bone marrow plasma from patients with breast cancer, Breast Cancer Res 9 [5], Seite R66.
- Schwarzenbach, H.; Chun, F. K.; Muller, I.; Seidel, C.; Urban, K.; Erbersdobler, A.; Huland, H.; Pantel, K. und Friedrich, M. G. (2008): Microsatellite analysis of allelic imbalance in tumour and blood from patients with prostate cancer, BJU Int 102 [2], Seite 253-8.
- Schwarzenbach, H.; Alix-Panabieres, C.; Muller, I.; Letang, N.; Vendrell, J. P.; Rebillard, X. und Pantel, K. (2009): Cell-free tumor DNA in blood plasma as a marker for circulating tumor cells in prostate cancer, Clin Cancer Res 15 [3], Seite 1032-8.
- Shaffer, D. R.; Leversha, M. A.; Danila, D. C.; Lin, O.; Gonzalez-Espinoza, R.; Gu, B.; Anand, A.; Smith, K.; Maslak, P.; Doyle, G. V.; Terstappen, L. W.; Lilja, H.; Heller, G.; Fleisher, M. und Scher, H. I. (2007): Circulating tumor cell analysis in patients with progressive castration-resistant prostate cancer, Clin Cancer Res 13 [7], Seite 2023-9.
- Sienel, W.; Seen-Hibler, R.; Mutschler, W.; Pantel, K. und Passlick, B. (2003): Tumour cells in the tumour draining vein of patients with non-small cell lung cancer: detection rate and clinical significance, Eur J Cardiothorac Surg 23 [4], Seite 451-6.
- Silva, J. M.; Dominguez, G.; Garcia, J. M.; Gonzalez, R.; Villanueva, M. J.; Navarro, F.; Provencio, M.; San Martin, S.; Espana, P. und Bonilla, F. (1999a): Pres-

ence of tumor DNA in plasma of breast cancer patients: clinicopathological correlations, Cancer Res 59 [13], Seite 3251-6.

- Silva, J. M.; Garcia, J. M.; Gonzalez, R.; Dominguez, G.; Jareno, E.; Palacios, J.; Navarro, F.; Provencia, M.; Espana, P. und Bonilla, F. (1999b): Abnormal frequencies of alleles in polymorphic markers of the 17q21 region is associated with breast cancer, Cancer Lett 138 [1-2], Seite 209-15.
- Slade, M. J.; Singh, A.; Smith, B. M.; Tripuraneni, G.; Hall, E.; Peckitt, C.; Fox, S.; Graham, H.; Luchtenborg, M.; Sinnett, H. D.; Cross, N. C. und Coombes, R. C. (2005): Persistence of bone marrow micrometastases in patients receiving adjuvant therapy for breast cancer: results at 4 years, Int J Cancer 114 [1], Seite 94-100.
- Sloane, J. P.; Ormerod, M. G.; Imrie, S. F. und Coombes, R. C. (1980): The use of antisera to epithelial membrane antigen in detecting micrometastases in histological sections, Br J Cancer 42 [3], Seite 392-8.
- Smid, M.; Wang, Y.; Klijn, J. G.; Sieuwerts, A. M.; Zhang, Y.; Atkins, D.; Martens, J. W. und Foekens, J. A. (2006): Genes associated with breast cancer metastatic to bone, J Clin Oncol 24 [15], Seite 2261-7.
- Sökeland, H; Helpap, B und Alken, C-E (2002): Urologie: verstehen, sehen, anwenden 12, Thieme-Verlag, Stuttgart.
- Stathopoulou, A.; Vlachonikolis, I.; Mavroudis, D.; Perraki, M.; Kouroussis, Ch;
 Apostolaki, S.; Malamos, N.; Kakolyris, S.; Kotsakis, A.; Xenidis, N.; Reppa,
 D. und Georgoulias, V. (2002): Molecular detection of cytokeratin-19positive cells in the peripheral blood of patients with operable breast cancer:
 evaluation of their prognostic significance, J Clin Oncol 20 [16], Seite 340412.
- Statistisches Bundesamt (2007a): Prostataerkrankungen, Gesundheitsberichterstattung des Bundes, Themenheft 36.
- Statistisches Bundesamt (2007b): Todesursachen in Deutschland, Fachserie 12 Reihe 4, Wiesbaden
- Stattin, P.; Soderberg, S.; Biessy, C.; Lenner, P.; Hallmans, G.; Kaaks, R. und Olsson, T. (2004): Plasma leptin and breast cancer risk: a prospective study in northern Sweden, Breast Cancer Res Treat 86 [3], Seite 191-6.
- Stauber, Matthias; Weyerstahl, Thomas und Beham, Alexander (2001): Gynäkologie und Geburtshilfe 5, Thieme, Stuttgart.
- Stigbrand, T.; Andres, C.; Bellanger, L.; Bishr Omary, M.; Bodenmuller, H.;
 Bonfrer, H.; Brundell, J.; Einarsson, R.; Erlandsson, A.; Johansson, A.; Leca, J. F.; Levi, M.; Meier, T.; Nap, M.; Nustad, K.; Seguin, P.; Sjodin, A.; Sundstrom, B.; van Dalen, A.; Wiebelhaus, E.; Wiklund, B.; Arlestig, L. und Hilgers, J. (1998): Epitope specificity of 30 monoclonal antibodies against cytokeratin antigens: the ISOBM TD5-1 Workshop, Tumour Biol 19 [2], Seite 132-52.

- Stroun, M.; Anker, P.; Lyautey, J.; Lederrey, C. und Maurice, P. A. (1987): Isolation and characterization of DNA from the plasma of cancer patients, Eur J Cancer Clin Oncol 23 [6], Seite 707-12.
- Stroun, M.; Maurice, P.; Vasioukhin, V.; Lyautey, J.; Lederrey, C.; Lefort, F.; Rossier, A.; Chen, X. Q. und Anker, P. (2000): The origin and mechanism of circulating DNA, Ann N Y Acad Sci 906, Seite 161-8.
- Taback, B.; Giuliano, A. E.; Hansen, N. M.; Singer, F. R.; Shu, S. und Hoon, D. S. (2003): Detection of tumor-specific genetic alterations in bone marrow from early-stage breast cancer patients, Cancer Res 63 [8], Seite 1884-7.
- Taback, B.; O'Day, S. J. und Hoon, D. S. (2004): Quantification of circulating DNA in the plasma and serum of cancer patients, Ann N Y Acad Sci 1022, Seite 17-24.
- Tal-Or, P.; Di-Segni, A.; Lupowitz, Z. und Pinkas-Kramarski, R. (2003): Neuregulin promotes autophagic cell death of prostate cancer cells, Prostate 55 [2], Seite 147-57.
- Thijssen, M. A.; Swinkels, D. W.; Ruers, T. J. und de Kok, J. B. (2002): Difference between free circulating plasma and serum DNA in patients with colorectal liver metastases, Anticancer Res 22 [1A], Seite 421-5.
- Thurm, H.; Ebel, S.; Kentenich, C.; Hemsen, A.; Riethdorf, S.; Coith, C.; Wallwiener, D.; Braun, S.; Oberhoff, C.; Janicke, F. und Pantel, K. (2003): Rare expression of epithelial cell adhesion molecule on residual micrometastatic breast cancer cells after adjuvant chemotherapy, Clin Cancer Res 9 [7], Seite 2598-604.
- Uhr, J. W. (2007): Cancer diagnostics: one-stop shop, Nature 450 [7173], Seite 1168-9.
- UICC. 1997. TNM-Klassifikation maligner Tumoren. Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, New York.
- UICC. 2002. TNM-Klassifikation maligner Tumoren. Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, New York.
- Vesalainen, S.; Lipponen, P.; Talja, M. und Syrjanen, K. (1995): Mitotic activity and prognosis in prostatic adenocarcinoma, Prostate 26 [2], Seite 80-6.
- von Knobloch, R.; Konrad, L.; Barth, P. J.; Brandt, H.; Wille, S.; Heidenreich, A.; Moll, R. und Hofmann, R. (2004): Genetic pathways and new progression markers for prostate cancer suggested by microsatellite allelotyping, Clin Cancer Res 10 [3], Seite 1064-73.
- Wang, M.; Block, T. M.; Steel, L.; Brenner, D. E. und Su, Y. H. (2004): Preferential isolation of fragmented DNA enhances the detection of circulating mutated kras DNA, Clin Chem 50 [1], Seite 211-3.
- Weber, J. L. und May, P. E. (1989): Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction, Am J Hum Genet 44 [3], Seite 388-96.
- Weckermann, D; Polzer, B; Ragg, T; Blana, A; Schlimok, G; Arnoldt, H; Bertz, S; Harzmann, R; Klein, C. A. (2009): Perioperative activation of disseminated tumor cells in bone marrow of patients with prostate cancer, J Clin Oncol 27 [10], Seite 1549-56.
- Weigelt, B.; Bosma, A. J.; Hart, A. A.; Rodenhuis, S. und van 't Veer, L. J. (2003): Marker genes for circulating tumour cells predict survival in metastasized breast cancer patients, Br J Cancer 88 [7], Seite 1091-4.
- White, T. J.; Arnheim, N. und Erlich, H. A. (1989): The polymerase chain reaction, Trends Genet 5 [6], Seite 185-9.
- Wiedswang, G.; Borgen, E.; Schirmer, C.; Karesen, R.; Kvalheim, G.; Nesland, J. M. und Naume, B. (2006): Comparison of the clinical significance of occult tumor cells in blood and bone marrow in breast cancer, Int J Cancer 118 [8], Seite 2013-9.
- Wikman, H.; Vessella, R. und Pantel, K. (2008): Cancer micrometastasis and tumour dormancy, Apmis 116 [7-8], Seite 754-70.
- Wirth, MP; Manseck, A und Frohmüller, H (1990): Wertigkeit des prostataspezifischen Antigens (PSA) und der prostataspezifischen sauren Phosphatase in der Früherkennung des Prostata-Carcinoms, Urologe A 29, Seite 10.
- Witzel, I.; Thomssen, C.; Krenkel, S.; Wilczak, W.; Bubenheim, M.; Pantel, K.; Neumann, R.; Janicke, F. und Muller, V. (2006): Clinical utility of determination of HER-2/neu and EGFR fragments in serum of patients with metastatic breast cancer, Int J Biol Markers 21 [3], Seite 131-40.
- Woelfle, U.; Cloos, J.; Sauter, G.; Riethdorf, L.; Janicke, F.; van Diest, P.; Brakenhoff, R. und Pantel, K. (2003): Molecular signature associated with bone marrow micrometastasis in human breast cancer, Cancer Res 63 [18], Seite 5679-84.
- Woelfle, U.; Muller, V. und Pantel, K. (2006): Disseminated tumor cells in breast cancer: detection, characterization and clinical relevance, Future Oncol 2 [4], Seite 553-61.
- Wooster, R.; Bignell, G.; Lancaster, J.; Swift, S.; Seal, S.; Mangion, J.; Collins, N.; Gregory, S.; Gumbs, C. und Micklem, G. (1995): Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2, Nature 378 [6559], Seite 789-92.
- Yoon, T.; Chakrabortty, A.; Franks, R.; Valli, T.; Kiyokawa, H. und Raychaudhuri, P. (2005): Tumor-prone phenotype of the DDB2-deficient mice, Oncogene 24 [3], Seite 469-78.

Yoshida, K. und Miki, Y. (2004): Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage, Cancer Sci 95 [11], Seite 866-71.

10. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Dr. phil. II Heidi Schwarzenbach, die diese Arbeit mit außerordentlichem Engagement, zahlreichen wertvollen Ratschlägen und großer Hilfsbereitschaft betreute.

Herrn Prof. Dr. med. Klaus Pantel danke ich für die Überlassung des interessanten Themas dieser Dissertation, für die ständige Diskussionsbereitschaft und konstruktive Kritik.

Für die Bereitstellung der Proben bedanke ich mich bei Prof. Dr. med. Hartwig Huland und Dr. med. Imke Lange, Klinik für Urologie des UKE, Prof. Dr. med. Jänicke, Klinik für Gynäkologie des UKE, PD Dr. med. Andreas Erbersdobler, Institut für Pathologie des UKE, PD Dr. med. Sabine Kasimir-Bauer, Universitätsklinik Essen, Dr. Catherine Alix-Panabières, Service d'Urologie, CHU Lapeyronie, Montpellier.

Antje Andreas, Cornelia Coith und Malgorzata Stoupiec danke ich sehr für die exzellente Einarbeitung und Anleitung während des experimentellen Teils der Arbeit.

Für die angenehme Arbeitsatmosphäre und viele hilfreiche Ratschläge möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Tumorbiologie bedanken. Insbesondere danke ich Dr. med. Karoline Urban, Dr. Frank Wischnewski, Dr. Imke Müller, Dr. Jan-Wilhelm Kornfeld, Dr. med. Sebastian Carpenter, Dr. Reinhard Müller und Dr. Stefan Werner für die gutgelaunte gemeinsame Zeit im Labor.

Mein ganz persönlicher Dank gehört meinen Freunden, die meine Arbeit an der Dissertation mit Interesse und großer Anteilnahme verfolgt haben.

Von Herzen danke ich meiner Familie- meinen Eltern Axel und Ilona Gottberg, meinem Bruder Alexander Gottberg, meinen Onkeln Heinz Gottberg und Dieter Allers, meinem Mann Christophe Bayer und dem kleinen Mann Julius- dafür, dass sie immer für mich da sind und waren und mich immer vorbehaltlos, liebevoll und über alle Maßen großzügig unterstützt haben. Meinen Eltern und Christophe möchte ich zudem für die großartige Unterstützung bei der Vollendung dieser Arbeit danken.

11. Lebenslauf

Aus Gründen des Datenschutzes ist der Lebenslauf in der Internetveröffentlichung nicht dargestellt.

Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit "Nachweis und Charakterisierung von extrazellulärer DNA sowie zirkulierenden und disseminierten Tumorzellen in Blut, Knochenmark und Tumorgewebe von Prostatakarzinom-Patienten und Mammakarzinom-Patientinnen" selbständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen- und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Hamburg, 12. Juli 2009

Miriam Gottberg