

Institut für Tumorbiologie
Direktor: Prof. Dr. med. Klaus Pantel
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

**Analyse der freien zirkulierenden DNA von
Prostatakarzinom-Patienten auf allelische Imbalance**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Christoph Seidel
aus Hamburg

Hamburg 2008

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am: 05.03.2009

Veröffentlichung mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. med. Klaus Pantel

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. med. Udo Schumacher

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. med. Hans Heinzer

ABKÜRZUNGEN UND FREMDWÖRTER	1
1. ARBEITSHYPOTHESE UND FRAGESTELLUNG	3
2. EINLEITUNG	4
2. 1. DIE PROSTATA	4
2.2. DAS PROSTATAKARZINOM	6
2.2.1. <i>Epidemiologie</i>	6
2.2.2. <i>Ätiologie</i>	6
2.2.3. <i>Pathologie und Stadieneinteilung</i>	7
2.2.4. <i>Metastasierungskaskade</i>	8
2.2.5. <i>Diagnostik</i>	10
2.2.6. <i>Das Prostata-spezifische Antigen</i>	11
2.2.7. <i>Der Gleason-Score</i>	12
2.2.8. <i>Therapie</i>	13
2.3. DIE BENIGNE PROSTATAPHYPERPLASIE	13
2.3.1. <i>Ätiologie</i>	13
2.3.2. <i>Epidemiologie</i>	14
2.3.3. <i>Symptomatik</i>	15
2.3.4. <i>Therapie</i>	15
2.4. FREIE ZIRKULIERENDE DNA	16
2.5. MOLEKULARE MECHANISMEN DER KARZINOGENESE	16
2.6. MIKROSATELLITEN-DNA	17
2.7. AUSWAHL DER MIKROSATELLITEN-MARKER	18
3. MATERIAL	21
3.1. BLUT- UND GEWEBEPROBEN	21
3.2. REAGENZIEN	21
3.3. PUFFER UND LÖSUNGEN	22
3.4. KITS	23
3.5. PCR PRIMER	24
3.6. DNA MARKER	25
3.7. SOFTWARE	25
3.8. GERÄTE	25
3.9. VERBRAUCHSMATERIALIEN UND SONSTIGES	26
4. METHODEN	27
4.1. GEWINNUNG VON PLASMA UND ISOLIERUNG DER LEUKOZYTEN	27
4.2. DNA-EXTRAKTION	27
4.2.1. <i>Isolierung der freien zirkulierenden DNA aus Plasma</i>	27
4.2.2. <i>Isolierung genomischer DNA aus Leukozyten</i>	28
4.2.3. <i>Isolierung der freien zirkulierenden DNA durch das Promega Kit</i>	28
4.2.4. <i>DNA-Extraktion durch die klassische Phenol/Chloroform-Methode</i>	29
4.3. SPEKTROMETRISCHE QUANTITÄTS- UND QUALITÄTSKONTROLLE VON NUKLEINSÄUREN	30
4.4. PCR MIT FLUORESCENZMARKIERTEN MIKROSATELLITEN-MARKERN	30
4.5. KAPILLAR-GELELEKTROPHORESE DER PCR-PRODUKTE	34
5. ERGEBNISSE	35
5.1. DNA-EXTRAKTION UND PHOTOSPEKTROMETRISCHE KONZENTRATIONSBESTIMMUNG DER FREIEN ZIRKULIERENDEN DNA	35

5.2. VERGLEICH VERSCHIEDENER METHODEN ZUR EXTRAKTION FREIER ZIRKULIERENDER DNA	38
5.3. EVALUATION DER DURCH DIE PCR-BASIERTEN MIKROSATELLITEN-ANALYSEN ERMITTELTEN DATEN	40
5.4. PCR-ANALYSE DER FREIEN ZIRKULIERENDEN DNA IM BLUT VON PROSTATAKARZINOM-PATIENTEN.....	42
5.5. PCR-ANALYSE DER TUMOR-DNA VON PROSTATAKARZINOM-PATIENTEN.....	45
5.6. VERGLEICH DER DATEN DER TUMOR-DNA MIT DENEN DER PLASMA-DNA	47
5.7. AUSWERTUNG DER PCR-PRODUKTE DER FREIEN ZIRKULIERENDEN DNA VON BPH-PATIENTEN	48
5.8. PCR-ANALYSE FREIER ZIRKULIERENDER DNA VON GESUNDEN PROBANDEN.....	49
5.9. KORRELATIONEN DER LOH-FREQUENZ AN DEN JEWELIGEN MIKROSATELLITEN-MARKERN MIT DEN KLINISCHEN DATEN DER PROSTATAKARZINOM-PATIENTEN	49
5.10. ZUSAMMENFASSUNG DER LOH-FREQUENZEN IM BLUT VON PROSTATAKARZINOM-, BPH-PATIENTEN UND GESUNDEN PROBANDEN UND DER LOH-FREQUENZ IM TUMORGEWEBE.....	50
6. DISKUSSION.....	52
6.1. CHARAKTERISIERUNG DER ZIRKULIERENDEN ZELLFREIEN DNA IM BLUT FÜR DIE DIAGNOSTIK DES PROSTATAKARZINOMS	52
6.2. VERGLEICH DER DNA-KONZENTRATIONEN IM BLUT VON PROSTATAKARZINOM-PATIENTEN MIT DEN KONZENTRATIONEN VON BPH-PATIENTEN UND GESUNDEN PROBANDEN.....	53
6.3. AUSWAHL DER MIKROSATELLITEN-MARKER	54
6.4. VERGLEICH DER HÄUFIGKEIT VON AI IM PLASMA VON PROSTATAKARZINOM-PATIENTEN MIT DERJENIGEN IM PRIMÄRTUMOR	54
6.5. VERGLEICH DER HÄUFIGKEIT VON AI IM PLASMA VON PROSTATAKARZINOM-PATIENTEN MIT DERJENIGEN IM PLASMA VON BPH-PATIENTEN UND GESUNDEN PROBANDEN.....	55
6.6. VERGLEICH DER ERGEBNISSE MIT DEN KLINISCHEN DATEN	55
6.7. ANALYSE MÖGLICHER FEHLERQUELLEN UND QUALITÄT VON PLASMA-DNA	56
6.8 AUSBLICK	57
7. ZUSAMMENFASSUNG.....	59
8. LITERATURVERZEICHNIS.....	61
9. DANKSAGUNG.....	67
10. LEBENS LAUF	68
11. ERKLÄRUNG.....	69

Abkürzungen und Fremdwörter

Abb.	Abbildung
AI	Allelische Imbalance
Annealing	Bindung von Primern an das Template
antisense	komplementäre DNA-Sequenz zu einem Genbereich
Antisense-Primer	PCR-Primer, der am 3'-Ende der zu amplifizierenden Sequenz am DNA-Strang bindet
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat, $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$
Assay	Test
bp	Basenpaare
BPH	Benigne Prostatahyperplasie
Cap	Deckel eines Eppendorf-Gefäßes
CCD	charge-coupled device
c-PSA	komplexiertes, an α 1-Antichymotrypsin oder α 2-Makroglobulin gebundenes, PSA
dATP	Deoxyadenosintriphosphat
dCTP	Deoxycytidintriphosphat
Denaturierung	Auftrennung der DNA-Doppelhelix in die Einzelstränge
dGTP	Deoxyguanosintriphosphat
DHT	Dihydrotestosteron
DNA	Deoxyribonukleinsäure
dNTP	Deoxynukleotidtriphosphat
dTTP	Deoxythymidintriphosphat
Elongation	Verlängerung der an die zu amplifizierende Sequenz gebundenen Primer durch die DNA-Polymerase bei der PCR
EtBr	Ethidiumbromid
Exon	kodierender Abschnitt eines Gens
f-PSA	freies, ungebundenes PSA
gDNA	genomische DNA
Gen	Abschnitt auf der DNA, der für ein Protein kodiert
kD	Kilodalton

Intron	nicht-kodierender Bereich eines Gens
Inzidentes Prostatakarzinom	Z.B. durch die Resektion einer BPH zufällig entdecktes Prostatakarzinom
latentes Prostatakarzinom	klinisch nicht auffällig gewordenes, durch eine Autopsie entdecktes Karzinom
LB	Loading buffer (Ladepuffer)
LOH	Loss of Heterozygoty
Mb	Megabasen
min.	Minute
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
PA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCL	Phenol/Chloroform
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
Primer	Oligonukleotid, das bei einer PCR spezifisch an die zu amplifizierende Sequenz bindet
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
5- α -Reduktase	Enzym das Testosteron in seinem Zielgewebe zu 5- α -Dihydrotestosteron reduziert
Replikation	Herstellung einer Kopie eines DNA-Bereichs bzw. des Genoms
rpm	rotations per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
sek.	Sekunde
sense	einem Genbereich entsprechende DNA-Sequenz
Sense-Primer	PCR-Primer, der am 5'-Ende der zu amplifizierenden Sequenz am DNA-Strang bindet
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Template	DNA, die bei einer PCR als Vorlage zur Amplifikation dient
t-PSA	Gesamt-PSA, bestehend aus c-PSA und f-PSA
TSG	Tumorsuppressorgen

1. Arbeitshypothese und Fragestellung

In meiner Doktorarbeit wird die freie zirkulierende DNA aus dem Blutplasma von Prostatakarzinom-Patienten, BPH-Patienten und gesunden Probanden isoliert, um zu untersuchen, ob aufgrund unterschiedlicher DNA-Konzentrationen im Plasma zwischen malignen und benignen Tumoren der Prostata unterschieden werden kann.

Nach der Konzentrationsbestimmung der freien zirkulierenden DNA wird diese auf allelische Imbalance (AI), wie LOH oder MSI, untersucht. Hierfür wurde ein Set von 10 Mikrosatelliten-Markern ausgewählt, die in Regionen von Tumorsuppressorgenen lokalisiert sind. Für die Analysen wird die DNA durch eine PCR mit Primern, die an diese Marker genspezifisch binden, amplifiziert. Durch die Analysen der freien zirkulierenden DNA von BPH-Patienten und gesunden Probanden soll festgestellt werden, ob der Nachweis von genetischen Alterationen spezifisch für Prostatakarzinom-Patienten ist, oder auch bei Patienten oder Probanden ohne eine bösartige Läsion vorkommen kann.

Um Auskunft über die Herkunft der freien zirkulierenden DNA im Plasma zu erhalten, werden vergleichende Analysen über das Auftreten von AI im Primärtumor derselben Patienten durchgeführt.

Die gewonnenen Daten werden anschließend mit den klinisch-pathologischen Parametern der Prostatakarzinom-Patienten statistisch verglichen. Auf diese Weise soll festgestellt werden, ob dieser experimentelle Ansatz zur Erkennung eines Prostatakarzinoms geeignet ist und ob durch die genetische Charakterisierung der freien zirkulierenden Plasma-DNA klinisch wertvolle Informationen über den Tumor erhalten werden können.

2. Einleitung

2. 1. Die Prostata

Die Prostata ist eine exokrine Drüse, die an ihrer nach oben gerichteten Basis mit der Harnblase verwachsen ist. Die nach kaudal ziehende Spitze erreicht das Diaphragma urogenitale. Die Facies posterior grenzt, durch ein rektovesikales Septum getrennt, an die Ampulle des Rektums. Ventral fixiert das Ligamentum puboprostaticum die Facies anterior mit dem Schambein. Durch die Prostata zieht der erste Abschnitt der Harnröhre, die Pars Prostatica urethrae. Die Prostata besteht aus einem Bindegewebsgerüst mit glatter Muskulatur. Hier sind 30-50 tubuloalveoläre Drüsen eingelagert, die mit 15-30 Öffnungen in die Harnröhre münden. Das Drüsengewebe der Prostata kann durch histologische und funktionelle Kriterien in drei Zonen eingeteilt werden (Abb.1). Die periurethrale Zone umgreift die Urethra und besteht aus Drüsen, die aus Divertikeln der Urethra hervorgegangen sind. Sie gehört somit entwicklungsbiologisch nicht zur Prostata. Die Innenzone (ca. 25% der Prostata) umschließt die Ductus ejaculatorii und besteht aus verzweigten Drüsen. Das umliegende Stroma enthält hier besonders viel glatte Muskulatur. Die Außenzone (ca. 75% der Prostata) enthält 30–50 tubuloalveoläre Drüsen, die in einen Drüsenkörper aus glatten Muskelzellen und elastischen Fasernetzen eingebettet sind (Abb. 2). Die tubuloalveolären Drüsen bilden ein einreihiges bis mehrreihiges Epithel, wobei die Epithelzellen je nach sekretorischer Aktivität hochprismatisch, isoprismatisch oder flach sein können. Insbesondere in den hochprismatischen Zellen befinden sich im apikalen Zytoplasma zahlreiche Sekretgranula und Vakuolen, die über die Zellkuppe sezerniert werden. An der Basalmembran liegen die Basalzellen zur Regeneration des Drüsenepithels.

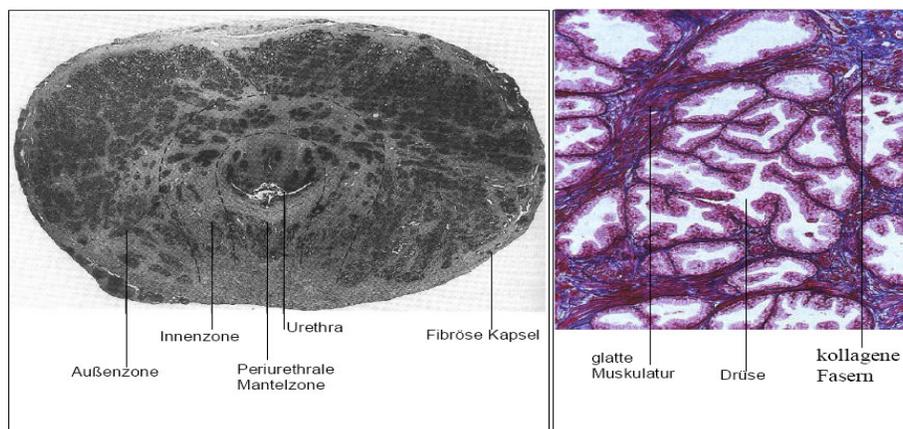


Abb. 1: Prostataquerschnitt
(2,5-fache Vergrößerung)

Abb. 2: Prostataquerschnitt;
Azanfärbung (80-fache Vergrößerung)

Das von der Prostata sezernierte Sekret trägt 15-30% zur Flüssigkeitsmenge des Ejakulats bei. Es ist dünnflüssig, farblos, reagiert sauer (pH 6,4) und enthält relativ viel Zink, Zitronensäure, Prostaglandine, Spermin und Spermidin, Immunglobuline, saure Phosphatase und Proteasen. Die genaue Funktion jeder einzelnen Substanz ist nicht bekannt.

Die Prostata ist als akzessorische Geschlechtsdrüse ein hormonsensitives Organ. Testosteron wird aufgenommen und unter Mitwirkung der 5- α -Reduktase in das biologisch aktivere Dihydrotestosteron (DHT) reduziert (Abb.3). Die Enzymaktivität ist in den Zellen des fibromuskulären Stromas am stärksten ausgeprägt. Das Dihydrotestosteron führt über Androgenrezeptoren zur Entwicklung der Prostata und sorgt für den Erhalt ihrer Funktion [Löffler, Petrides, Biochemie&Pathobiochemie, Springer Verlag, Berlin; 7. Auflage].

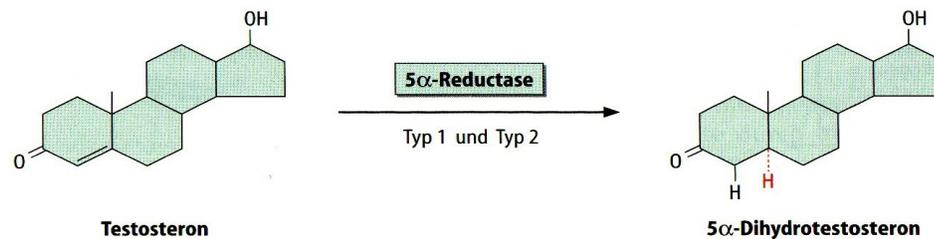


Abb. 3: Umwandlung von Testosteron in Dihydrotestosteron

Die Prostata wird durch dorsale und laterale Äste der A. rectalis media und der A. vesicalis inferior versorgt. Ventral erfolgt die Durchblutung durch Äste der A. pudenda interna. In der Drüsenkapsel bildet sich ein arterielles Geflecht. Die kleinen Gefäße erreichen das Drüsenparenchym und die periurethrale Zone. Die Venen der Prostata finden Anschluss an den ausgedehnten Plexus Vesicoprostaticus im kleinen Becken, der über die Vv. vesicales die V. iliaca interna erreicht. Die Lymphgefäße verlassen die Prostata über die versorgenden Arterien und schließen sich dem Ductus deferens an. Verbindungen bestehen zu den Lymphbahnen der Harnblase und des Rektums. Regionäre Lymphknotenstationen sind die Nodi lymphoidei iliaci externi et interni. Die Nervenversorgung der Prostata erfolgt durch den Plexus Prostaticus, der eine Fortsetzung des Plexus Hypogastricus inferior ist. Sympathische Fasern stimulieren hierbei die Sekretabgabe bei der Ejakulation [Benninghoff, Drenckhahn, Anatomie Band 1, Urban & Fischer, München; 16. Auflage].

2.2. Das Prostatakarzinom

2.2.1. Epidemiologie

Das Prostatakarzinom ist der häufigste urologische Tumor des Mannes und in der BRD die Ursache für ca. 12.000 Krebstodesfälle im Jahr. Nach dem Bronchialkarzinom und dem Kolorektalen Karzinom stellt das Prostatakarzinom somit die dritthäufigste Krebstodesursache des Mannes dar. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 72-74 Jahren. Erkrankungen vor dem 50. Lebensjahr kommen in weniger als 0,1% der Fälle vor. Die Inzidenz schwankt je nach Region zwischen 9 (Japan), 40 (West-Europa) und 95 (USA) pro 100.000 Einwohner [Parkin et al., 1999]. Pro Jahr werden in Deutschland etwa 40.000 neue Fälle diagnostiziert. Durch Autopsiestudien wurde festgestellt, dass die Prävalenz des Prostatakarzinoms weitaus größer ist. Hierbei wurden mikroskopisch kleine, gut differenzierte Adenokarzinome der Prostata bei 40% aller 60- bis 70-Jährigen verstorbenen, mit weiterer Zunahme in jeder Lebensdekade entdeckt [Brawn et al., 1995]. Die Häufigkeit dieser latenten Prostatakarzinome ist in fast allen ethnischen Gruppen gleich groß. Eine Reihe von Thesen wurden zur Erklärung dieser Diskrepanz entwickelt. Es wird ein erhöhter Testosteronspiegel, die Beeinflussung des Testosteronspiegels durch Diät, eine unterschiedliche Aktivität der 5- α -Reduktase, oder eine virale Genese durch aszendierende Infekte über die Urethra diskutiert. Um diese Thesen zu beweisen liegen aber noch keine hinreichend sicheren Daten vor [Rowley et al., 1997]. Unumstritten ist, dass eine genetische Disposition das Risiko an einem Prostatakarzinom zu erkranken, erhöht. Im Zusammenhang mit der hereditären Form des Prostatakarzinoms wurden chromosomale Veränderungen auf dem 1. Chromosom und dem X-Chromosom identifiziert [El-Zein et al., 2005].

2.2.2. Ätiologie

Die Ätiologie des Prostatakarzinoms ist nicht bekannt. Man geht von einem multifaktoriellen Geschehen aus [Flanders, 1984]. Für die Erkenntnis, dass das Wachstum des Prostatakarzinoms hormonabhängig ist, wurde Charles Brenton Huggins 1966 der Nobelpreis verliehen [Huggins, 1943]. Männer mit einem niedrigen Hormonlevel (z.B. Eunuchen) erkranken äußerst selten an einem Prostatakarzinom [Ross et al., 1983; Franks, 1974]. Eine androgene Stimulation, z.B. durch Testosteron, begünstigt die Entstehung des Prostatakarzinoms [Klocker et al., 1994]. Da eine familiäre Häufung von Prostatakarzinomen vorkommen kann, spielt die genetische Disposition eine Rolle bei der Entstehung einiger der Tumore. Tatsächlich haben Studien ergeben, dass die Erkrankung von mehreren Verwandten ersten Grades das Risiko, ein Prostatakarzinom zu entwickeln,

im ungünstigsten Fall bis zu 10fach erhöht. Hierbei wurde festgestellt, dass bis zu 20% aller Prostatakarzinomfälle auf ein solches hereditäres Prostatakarzinom zurückgeführt werden können [Hemminiki et al., 2008]. Auch äußere Lebensumstände wie Essgewohnheiten und Umweltfaktoren scheinen die Inzidenz des Prostatakarzinoms zu beeinflussen [Whittemore et al., 1995]. Z.B. erkrankten nachfolgende Generationen japanischer Einwanderer in den USA häufiger an einem Prostatakarzinom als die Durchschnittsbevölkerung in Japan. Hier spielen wahrscheinlich die Umstellung der Ernährung, sowie andere Umweltfaktoren eine Rolle. Durch die direkte Verbindung der Prostata mit der Urethra können auch Infektionen als Ursache in Betracht gezogen werden [Klein, Silverman., 2008].

2.2.3. Pathologie und Stadieneinteilung

Nach McNeal lassen sich 4 unterschiedliche Zonen in der Prostata identifizieren. Ein anteriores Stroma, das nur von sehr wenigen Drüsenzellen durchsetzt ist. Eine periphere Zone, der einzige mit dem Finger zu tastende Teil der Prostata. Die zentrale Zone und das sogenannte präprostatiche Gewebe mit der Transitionalzone (Übergangszone), der kleinste Drüsenanteil und alleiniger Ausgangspunkt der benignen Prostatahyperplasie (BPH).

Ungefähr 90% aller Prostatakarzinome gehen von der rektalen Seite der peripheren Zone aus. In seltenen Fällen entstehen Prostatakarzinome in der zentralen Zone, die um die Ductus ejaculatorii liegen. Aus der Übergangszone kann sich eine gutartige, vom Stroma ausgehende Wucherung entwickeln. Sie wird als BPH bezeichnet. Bei ca. 10% aller Männer, bei denen eine BPH entfernt wurde, findet man ein sogenanntes inzidentes Prostatakarzinom. Sie verhalten sich im Wesentlichen wie Prostatakarzinome der peripheren Zone.

Das Prostatakarzinom entsteht in 98% aller Fälle aus dem Drüsenepithel. Bei den Übrigen handelt es sich um Plattenepithelkarzinome oder Übergangsepithelkarzinome, die meist von der Blasenschleimhaut ausgehen und die Prostata infiltrieren. Ebenso selten sind Sarkome, wie Rhabdomyosarkome oder Leiomyosarkome. Diese Krebsformen sind äußerst aggressiv und schwer zu therapieren. Beim Adenokarzinom, das meist multifokal vorliegt, werden je nach Klassifikationsschema 3 oder 4 Malignitätsgrade beschrieben. Die Hälfte aller Tumore weisen unterschiedliche Differenzierungsgrade in einzelnen Tumorarealen vor. Der Malignitätsgrad wird durch die Morphologie der Krebszellen bzw. der Drüsenarchitektur bestimmt. Normale Drüsen werden durch eine säulenartige Epithelschicht ausgekleidet. Maligne Drüsen sind oft kleiner. Bei Grad-I-Veränderungen ist noch ein deutliches Lumen zu erkennen. Es wird jedoch von einem flachen, kubischen Epithel ausgekleidet, da die Basalzellschicht fehlt (Abb. 4).

Darüber hinaus gibt es mehrere Variationen der Karzinomarchitektur, vom so genannten cribiformigen Wachstumsmuster bis hin zum anaplastischen Tumor (Abb. 5), bei dem eine Drüsenarchitektur gar nicht mehr erkennbar ist.

Abb. 4: Hochdifferenziertes Adenokarzinom der Prostata (G 1-Karzinom)

Die mittelgroßen Drüsenschläuche liegen dicht nebeneinander. Die einreihig liegenden Kerne sind wenig pleomorph. In den Drüsenlichtungen gibt es graues Schleimmateriale und zwischen den Drüsenschläuchen liegt wenig Bindegewebe. (x125)

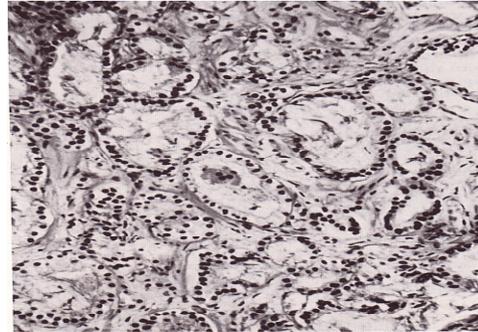
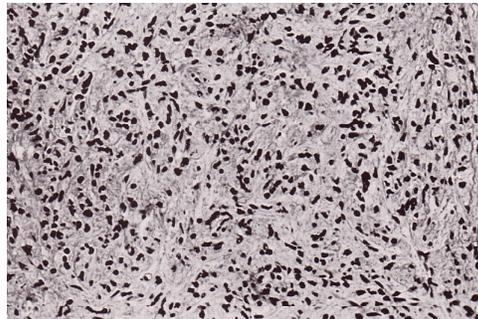


Abb. 5: Anaplastisches undifferenziertes Karzinom der Prostata (G 3-4)

Die kleinen Tumorzellen bilden keine organoide Formation. Sie liegen dissoziiert vor und sind durch ein Bindegewebe auseinander gedrängt. Die Kerne sind klein, hyperchromatisch und pleomorph. (x125)



2.2.4. Metastasierungskaskade

Das Prostatakarzinom wächst bevorzugt zur Spitze der Prostata. Beim weiteren lokalen Fortschreiten wird dann die Organkapsel penetriert. Lymphknoten in der Fossa obturatoria sind die ersten Stationen einer lymphogenen Metastasierung und stellen so beim Staging einen Indikator dar. Die nächsten Lymphstationen sind die präsaacralen und inguinalen Lymphknoten, sowie die Lymphknoten entlang der Vasa iliaca communis und der paraaortalen Region. Danach werden die mediastinalen und supraclaviculären Lymphknoten befallen. Über die Blutbahn metastasiert das Prostatakarzinom häufig ins Skelettsystem. Es handelt sich dabei meist um osteoblastische Metastasen.

Bei 85% der Patienten, die am Prostatakarzinom versterben, liegt eine ossäre Filiasierung vor. Am häufigsten sind hierbei Lendenwirbelkörper, proximaler Femur, Becken, thorakale Wirbelkörper, Rippen, Sternum, Schädel und der Humerus betroffen. Die Metastasierung verläuft allgemein von zentralen zu peripheren Skelettabschnitten. In seltenen Fällen

werden auch viszerale Organe wie Lunge, Leber, Nebennieren oder das Peritoneum befallen. Am häufigsten erfolgt zuerst die lymphogene und dann die hämatogene Metastasierung. Beim Prostatakarzinom korreliert das Tumolvolumen mit der Aggressivität des Tumors. Kleine Karzinome mit einem Volumen von weniger als 0,1 oder 0,2 cm³ haben noch keine Metastasierungsfähigkeit. Erst bei Volumina von >4 cm³ findet man im zunehmenden Maße Kapselpenetration, Samenblaseninfiltration und positive Lymphknoten. Tumoren von mehr als 12 cm³ sind hingegen bereits fast immer metastasiert [Hautmann, Huland, Urologie, Springer, Berlin; 3. Auflage].

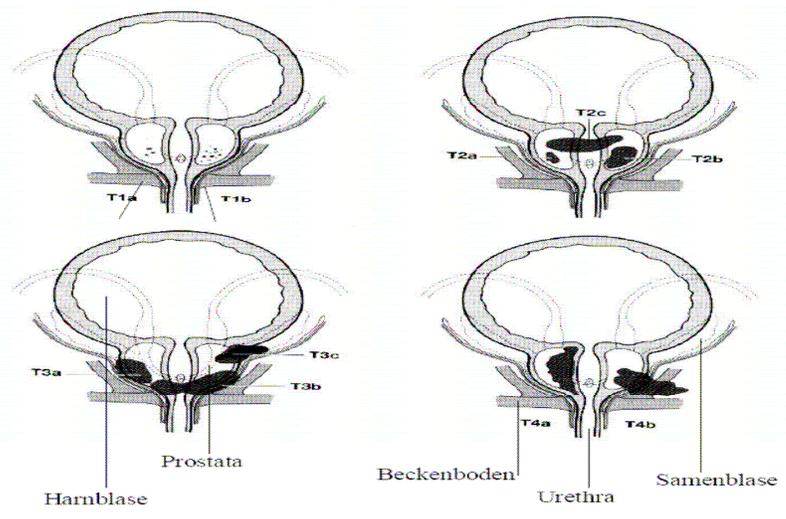


Abb. 6: TNM-Klassifikation: Stadieneinteilung des primären Prostatakarzinoms

Tabelle I: Stadieneinteilung des primären Prostatakarzinoms

T	Primärtumor
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	kein Anhalt für einen Primärtumor
T1	klinisch nicht erkennbarer Tumor
T1a	Tumor zufälliger histologischer Befund (<5% des resezierten Gewebes)
T1b	Tumor zufälliger histologischer Befund (>5% des resezierten Gewebes)
T1c	Tumor durch Nadelbiopsie diagnostiziert
T2	Tumor begrenzt auf Prostata
T2a	Tumor befällt einen Lappen
T2b	Tumor befällt beide Lappen
T3	Tumor durchbricht die Kapsel
T3a	Tumor durchbricht die Kapsel einseitig oder beidseitig
T3b	Tumor infiltriert die Samenblase
T4	Tumor ist fixiert oder infiltriert andere Strukturen als die Samenblasen

Tabelle II: Stadieneinteilung von Lymphknotenmetastasen beim Prostatakarzinom

N	Regionäre Lymphknoten
NX	Vorliegen von Lymphknotenmetastasen kann nicht beurteilt werden
N1	regionale Lymphknotenmetastasen

Tabelle III: Stadieneinteilung von Fernmetastasen beim Prostatakarzinom

M	Fernmetastasen
M0	keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen
M1a	Fernmetastasen in nicht-regionären Lymphknoten
M1b	Fernmetastasen im Skelettsystem
M1c	Fernmetastasen in anderen Lokalisationen

2.2.5. Diagnostik

Das Prostatakarzinom verursacht im Anfangsstadium nur selten Symptome. Im fortgeschrittenen lokalen Stadium kann es manchmal durch Kompression der Urethra zur Obstruktionssymptomatik kommen. Eine Hämaturie ist selten.

Findet keine Vorsorgeuntersuchung statt, werden viele Betroffene häufig erst aufmerksam, wenn durch Knochenmetastasen Schmerzen am Bewegungsapparat auftreten. Wesentlicher Bestandteil einer Krebsvorsorge ist die digital rektale Tastuntersuchung der Prostata. Das gesunde Organ hat bei einem jungen Mann ein Gesamtvolumen von ca. 20-25 ml. In der Mitte lässt sich ein Sulcus tasten. Zu beiden Seiten hin müssen rechter und linker Lappen gut abgrenzbar sein. Die Konsistenz der Prostata entspricht etwa der Daumenballenmuskulatur. Einen Anhalt für das Vorliegen eines Prostatakarzinoms gibt die Tastung eines derben, höckerigen Knotens. Liegt ein solcher Befund vor, oder ist eine Seite der Prostata von ihrer Konsistenz her fester als die andere, muss die bioptische Abklärung des Befundes erfolgen.

Als Differentialdiagnosen können chronische Entzündungen, Prostatakonkremente, Prostatainfarkte, Prostatazysten und die granulomatöse Prostatitis in Frage kommen. Eine Vorsorgeuntersuchung wird ab dem 45. Lebensjahr jährlich empfohlen. Bei Risikogruppen, d.h. Männer, die Verwandte I. und II. Grades mit einem Prostatakarzinom haben, wird die Vorsorgeuntersuchung schon ab dem 40. Lebensjahr empfohlen.

2.2.6. Das Prostata-spezifische Antigen

Weiteren Anhalt für das Vorliegen eines Prostatakarzinoms kann die Messung eines erhöhten PSA-Wertes geben. Das Prostata-spezifische Antigen (PSA) ist ein Glykoprotein, das ausschließlich im Prostatagewebe gebildet wird und zur Verflüssigung des Ejakulates dient, das sonst koagulieren würde. Im Jahr 1979 wurde das PSA erstmals aus dem Seminalplasma isoliert, in dem es in hohen Konzentrationen (bis zu 3 mg/ml) vorkommt [Wang et al., 1979]. Im Serum kann das PSA mit dem Radio- oder Enzymimmunoassay nachgewiesen werden. Karzinomgewebe erhöht den PSA-Wert etwa um den Faktor 10 im Vergleich zu einer gutartigen Gewebsmenge (etwa 1 g BPH-Gewebe erhöht den Serum-PSA-Wert um 0,3 ng/ml und 1 g Prostatakarzinomgewebe um 3 ng/ml).

Tabelle IV: Vom Alter abhängige PSA-Grenzwerte

Lebensalter	PSA- Wert in ng / ml
40 – 50	0,0 - 2,5
50 – 60	0,0 - 3,5
60 – 70	0,0 - 4,5
> 70	0,0 - 6,5

Wird der PSA-Wert bei der Vorsorguntersuchung bestimmt, haben 2% aller Männer über 50 einen deutlich erhöhten PSA-Wert von über 10 ng/ml. Bei 60% dieser Männer wird ein behandlungsbedürftiges Prostatakarzinom diagnostiziert. 8% haben eine PSA-Erhöhung mit Werten zwischen 4 und 10 ng/ml. Bei Werten in diesem Bereich liegt in 25% der Fälle ein Prostatakarzinom vor.

Die Bestimmung der molekularen Fraktionen des Gesamt-PSA ermöglicht eine weitere Verbesserung der Aussagekraft des PSA-Tests. Der Quotient des freien (ungebundenen) PSA zum Gesamt-PSA (%f-PSA) ist bei einem Mann mit einem Prostatakarzinom in der Regel niedriger. Ein Quotient von <15% deutet auf das Vorhandensein eines Karzinoms hin. Patienten mit BPH weisen hingegen oft einen erhöhten Quotienten des freien PSA zum Gesamt-PSA auf. Eine weitere Möglichkeit, die Spezifität des PSA-Wertes zu verbessern, ist die Bestimmung der Anstiegsgeschwindigkeit der PSA-Konzentration im Blut. Es wurde gezeigt, dass Patienten mit einem Prostatakarzinom im Vergleich zu BPH-Patienten eine deutliche Zunahme der PSA-Serumkonzentration pro Jahr aufweisen (>0.75 ng/ml/Jahr). Aufgrund der Schwankungen einzelner PSA-Testverfahren sind diese Unterschiede jedoch oft nicht ausreichend informativ. Wird die rektale Untersuchung bei der

Vorsorgeuntersuchung durchgeführt, entdeckt man bei 1-2% der Männer über 50 Jahre ein Prostatakarzinom, das in 50% der Fälle auf die Prostata beschränkt ist. Wird der PSA-Wert bestimmt, findet man bei 3-4% aller untersuchten Männer ein Prostatakarzinom, das zu 70% auf die Prostata begrenzt ist. Werden rektale Untersuchung und PSA-Wert zusammen bei der Vorsorgeuntersuchung durchgeführt, so findet man bei bis zu 5% der untersuchten Männer im Alter von über 50 Jahren ein Prostatakarzinom, das ebenfalls zu 70% auf die Prostata begrenzt ist [Hautmann, Huland, Urologie, Springer, Berlin; 3. Auflage].

2.2.7. Der Gleason-Score

Der Pathologe Dr. Donald Gleason beobachtete, dass die Krebszellen und die Drüsenarchitektur der Prostatakarzinome von der Morphologie her sehr heterogen sein können [Gleason et al., 1974]. Aufgrund dieser Beobachtung führte er ein Einstufungssystem zur Beurteilung der Malignität des Prostatakarzinoms ein. Hierfür wird mikroskopisch die Karzinomarchitektur begutachtet, indem die glanduläre Differenzierung und die Beziehung der Drüsen zum Stroma betrachtet werden (Abb. 7). Dabei werden die zwei größten Areale des Tumors durch den Gleason-Score beurteilt. Somit besteht der Gleason-Score aus der Summe zweier Punktwerte zwischen 1 und 5. Der kombinierte Grad reicht von 2 (1+1) bis 10 (5+5). Beim Gleason-Score wird das am größten ausgeprägte Tumorareal zuerst beschrieben. Die Diagnose mit einem Gleason-Score von 4+3=7 ist dementsprechend schlechter als ein Gleason-Score von 3+4=7. Je höher der Wert ist, desto undifferenzierter ist das Tumorareal, was auf ein beschleunigtes Wachstum und die Neigung zur Metastasierung schließen lässt.

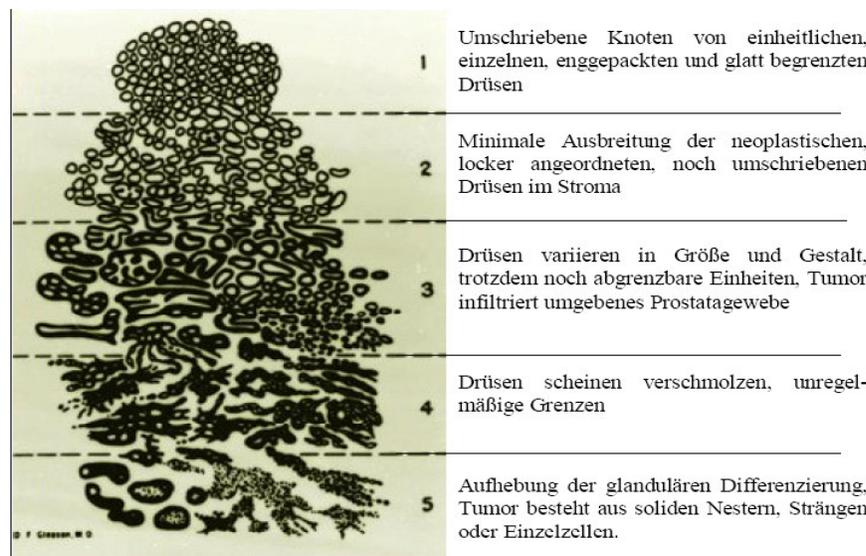


Abb. 7: Tumorstadien nach Gleason

2.2.8. Therapie

Beim Stadium T1a handelt es sich um ein inzidenten Prostatakarzinom, das z.B. anlässlich der transurethralen Resektion einer BPH diagnostiziert wurde, wobei weniger als 5% des resezierten Materials mit Tumorzellen durchsetzt sind. Nach etwa 10 Jahren werden 15-20% der Patienten, bei denen ein T1a-Tumor festgestellt wurde, mit einer Progression rechnen müssen. Patienten, die jünger als 60 Jahre sind, wird daher eine radikale Prostatektomie empfohlen, während bei älteren Patienten kontrolliertes Zuwarten empfohlen werden kann. Bei einem lokalisierten Prostatakarzinom (T1b, T2, T3, N0, M0) ist die radikale Prostatektomie Therapie der Wahl. Ist das Karzinom bereits fortgeschritten (T3, T4, N1 bis N4, M1), kann der Krebs durch eine Operation nicht mehr vollständig entfernt werden. Daher wird eine medikamentöse Therapie in Form von Antiandrogenen durchgeführt. Etwa 80% der Tumorzellen sprechen auf die Hormontherapie an, was zu einer Remission über einen Zeitraum von 2-4 Jahre führen kann und 10% der Patienten das Überleben weiterer 10 Jahre gewährt.

2.3. Die benigne Prostatahyperplasie

2.3.1 Ätiologie

Die Ätiologie der BPH ist bisher nicht eindeutig geklärt. Androgene spielen bei der Entstehung eine Rolle, erklären aber nicht ausreichend diesen Proliferationsschub im Alter. Genauere Kenntnisse des histologischen Aufbaus der Prostata haben zu einem besseren Verständnis dieser Krankheit beigetragen. Nach McNeal [McNeal et al., 1972] lassen sich vier Zonen der Prostata unterscheiden. Das sogenannte präprostatiche Gewebe der Übergangszone ist Ausgangspunkt der BPH. Dieses periurethrale Gebiet besteht hauptsächlich aus glatten Muskelzellen, die zirkulär um die Harnröhre angeordnet sind und so einen Sphinkter bilden, der die retrograde Ejakulation in die Blase verhindert.

Entlang der Urethra sind paarige Drüsenknospen angelegt, aus denen sich die Prostata und alle anderen kleinen Paraurethraldrüsen entwickeln. Entlang der proximalen Harnröhre im Bereich des muskulären Sphinkters unterbleibt die weitere Ausbildung dieser Drüsenknospe. Nicht so am Übergang zwischen proximaler und distaler Harnröhre, wo die sphinkterären Muskelfasern auseinanderweichen. Hier kommt es ab dem 30. Lebensjahr zu einer Formation neuer Drüsenkomplexe, die im Laufe der Zeit auswachsen und die Hauptmasse der BPH bilden. Zu diesem postembryonalen Wachstum der zunächst ruhenden Drüsenknospen gibt es verschiedene Hypothesen. Zahlreiche, von den Stromazellen produzierte Wachstumsfaktoren wurden beschrieben, die einen direkten

Einfluss auf Proliferation und Funktion epithelialer Prostatazellen nehmen. Eine Veränderung im Zusammenspiel dieser Faktoren könnte für die Entstehung der BPH verantwortlich sein. Bezüglich der Hormonabhängigkeit der Prostata wurden, neben dem bekannten Einfluss der Androgene, insbesondere des Dihydrotestosterons, weitere Hormone entdeckt, die im hyperplasierten Prostatagewebe angereichert und gebunden werden. Z.B. könnten Östrogene für die Induktion der BPH eine wichtige Rolle spielen, deren Rezeptoren sich im fibromuskulären Stroma nachweisen lassen. Östrogenen wird ein synergistischer Effekt mit Androgenen zugesprochen. Sie werden außerdem im Alter durch die vermehrte Aktivität des Enzyms Aromatase aus Androgenmetaboliten synthetisiert.

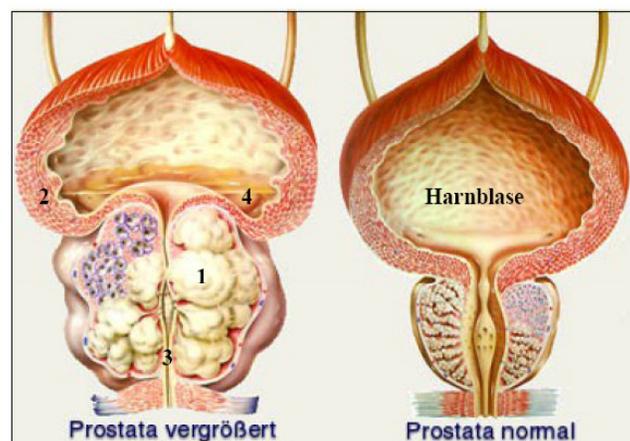


Abb. 8: Die hypertrophierte Prostata (1) kann zu einer überdehnten Blasenwand (2) führen, da der Muskel gegen eine verengte Harnröhre (3) arbeiten muss, was zur Restharnbildung (4) führen kann.

2.3.2. Epidemiologie

Der Begriff BPH steht nur für das benigne Wachstum der Prostata im Alter. Zum Ausdruck eines Krankheitsbildes, das durch die Obstruktion der Harnröhre aufgrund einer Prostatahyperplasie verursacht wird, sollte dieser Begriff aber vermieden werden, da jede Prostata im Alter hyperplasiert und dies nicht immer mit Symptomen einhergeht. Zur Beschreibung der Krankheit, die durch eine BPH verursacht werden kann, sollte man stattdessen Ausdrücke wie benignes Prostatasyndrom und benigne Prostataobstruktion verwenden. Da es in meiner Arbeit um die molekulargenetische Charakterisierung der freien zirkulierenden DNA von Prostatakarzinom-Patienten, auch im Vergleich mit der freien zirkulierenden DNA von Patienten mit einer gutartigen Läsion geht, verwende ich den Begriff BPH.

In Deutschland leiden etwa 30% aller Männer über 50 an einer durch die BPH verursachten Miktionsstörung, die nach WHO-Definition in ihrer Ausprägung als behandlungsbedürftig eingeschätzt wird. Von diesen Männern begeben sich nur 30% in Therapie. Die Prävalenz der Miktionsbeschwerden kann mit dem „Internationalen Prostata-Symptomscore“ IPSS gemessen und klassifiziert werden und steigt deutlich mit dem Alter, wobei 40% der ≥ 70 -Jährigen betroffen sind. Es wird angenommen, dass die häufigste Ursache hierfür eine BPH ist.

2.3.3. Symptomatik

Im Frühstadium registriert der Patient mit einer BPH nur geringe Miktionsstörungen, da der Detrusormuskel den erhöhten Auslasswiderstand kompensieren kann. Im weiteren Verlauf kommt es daher kompensatorisch zu einer Hypertrophie der Blasenmuskulatur. Im Endstadium dieser Muskelhypertrophie kann es dann zur Dilatation der Blasenwand kommen, die sich im Ultraschall in Form einer Trabekelblase und Pseudodivertikelbildung darstellt (Abb. 8). Vorhandene hohe Restharmengen gehen häufig mit rezidivierenden Infektionen einher. Eine überdehnte dekompenzierte Blase wird gelegentlich durch unkontrollierten Harnabgang als Ischuria paradoxa auffällig. Die chronische Blasendekompensation kann von einer Stauung und Dilatation der oberen Harnwege begleitet werden. Die progrediente obstruktive Hydronephrose kann ohne rechtzeitige Entlastung zu einer terminalen Niereninsuffizienz führen.

2.3.4 Therapie

Es stehen operative und konservative Therapiemethoden zur Verfügung. Man unterscheidet vor der Operation zwischen der absoluten und relativen Indikation. Eine absolute Indikation liegt vor, wenn es bedingt durch die Prostatahyperplasie zu rezidivierenden Harnverhalten, Makrohämaturie oder Harnwegsinfekten kommt. Ebenso stellt eine beginnende Niereninsuffizienz und die Bildung von Blasensteinen eine absolute Operationsindikation dar. Als Goldstandard gilt hierbei die transurethrale Resektion der Prostata (TUR-B). Zur konservativen Therapie der BPH werden $\alpha 1$ -Rezeptorblocker verwendet, die den Spannungszustand der glatten Muskelzellen im hyperplasierten Prostatagewebe reduzieren und so zu einer Abnahme des Miktionsdruckes führen sollen.

Außerdem besteht auch bei der BPH die Möglichkeit zur antiandrogenen Therapie. Dihydrotestosteron ist das wichtigste Androgen für die Prostatazellen. Eine Inhibition der Bildung von DHT ist durch die 5- α -Reduktasehemmung möglich. Hierdurch soll langfristig

eine Drüsenvolumenreduktion erzielt werden, die zum Teil durch eine verminderte Sekretion der Drüsenzellen, aber auch durch eine androgenentzugsbedingte Apoptose zu erklären ist.

2.4. Freie zirkulierende DNA

Das Vorkommen von zirkulierenden Nukleinsäuren im Plasma wurde erstmals 1948 beschrieben [Mandel und Métais, 1948]. Erst 27 Jahre später konnte durch ein Radioimmunassay gezeigt werden, dass die Konzentration der freien zirkulierenden DNA bei Tumorpatienten signifikant erhöht ist [Leon et al., 1975]. Bei Karzinompatienten wurde eine DNA-Serum-Konzentration von 180 ng/ml gemessen. Im Vergleich dazu lag die DNA-Serum-Konzentration von gesunden Probanden bei 23 ng/ml. Bei metastasierten Patienten wurden doppelt so hohe DNA-Konzentrationen im Blut nachgewiesen wie bei nicht metastasierten. Zwischen den genetischen Aberrationen des Primärtumors und den Alterationen in der zirkulierenden DNA konnten Übereinstimmungen beobachtet werden [Fleischhacker et al., 2007]. Obwohl bei Tumorpatienten signifikant erhöhte Werte an Nukleinsäuren im Blut detektiert wurden, ist der genaue Ursprung der zirkulierenden Nukleinsäuren im Blut noch nicht genau erklärt. Verschiedene Mechanismen, die zur Freisetzung der DNA führen, werden in Betracht gezogen. Es wird angenommen, dass DNA von Tumorzellen aktiv freigesetzt werden kann, oder passiv von nekrotischen oder apoptotischen Zellen ins Blut gelangt [Stroun et al., 2001; Jahr et al., 2001]. Tumorspezifische DNA wurde bisher im Plasma von Patienten mit verschiedenen Tumorentitäten detektiert [Schwarzenbach et al., 2004, 2006, 2007; Chen et al., 1996; Nawroz et al., 1996; Silva et al., 1999; Anker et al., 1997]. Die Identifizierung und Charakterisierung tumorspezifischer Abberationen von extrazellulärer DNA in Körperflüssigkeiten, wie Blut oder Urin, kann zur Etablierung neuer diagnostischer Methoden von Bedeutung sein [Goessl et al., 2002].

2.5. Molekulare Mechanismen der Karzinogenese

In der Krebsentstehung und –progression spielt die Inaktivierung der Tumorsuppressorgene und die Aktivierung der Protoonkogene eine wichtige Rolle. Eine Überexpression von Onkogenen führt zu einem unregulierten Wachstum der Zelle. Dagegen sind die Produkte der klassischen Tumorsuppressorgene an der Übermittlung von wachstumshemmenden Signalen beteiligt, bei deren Funktionsverlust es durch Mutation oder DNA-Deletion zu einem unregulierten Proliferationsschub kommen kann. Das bekannteste

Tumorsuppressorgen kodiert für p53, das beim zellulären Stress das Zellwachstum inhibiert und die Apoptose stimuliert. Bei etwa der Hälfte aller Tumoren treten somatische Mutationen im Tumorsuppressorgen p53-Gen auf [Harris CC, Hollstein M.; 1993].

Der Ausfall des Tumorsuppressorgens BRCA1 ist mit dem hohen Risiko verbunden, ein Mammakarzinom zu entwickeln. Da nur in 45% der familiären Mammakarzinome BRCA1 inaktiviert ist, wurde nach einem zweiten Brustkrebs-spezifischen Gen gesucht. 1995 wurde das Gen BRCA2 in der chromosomalen Region 13q12.36 entdeckt [Wooster et al., 1995]. Beide Genprodukte, BRCA1 und BRCA2, binden und wirken auf eine Anzahl von regulatorischen Proteinen, einschließlich p53, Retinoblastom (RB) und c-Myc und sind in mehrere biologische Programme involviert, wie RNA-Transkription, Regulierung des Zellzyklus, Reparatur von DNA-Defekten, Zentrosom-Duplizierung, Zellwachstum und Apoptose [Yoshida et al., 2004]. Eine hohe Rate (36%) von Allelverlusten in der Region von BRCA1 in der chromosomalen Region 17q21 wurden beim Mammakarzinom mit Lymphknotenmetastasen berichtet [Silva et al., 1999]. Das Produkt des Tumorsuppressorgens RB1 (Retinoblastom) hat eine hemmende Wirkung auf die Zellproliferation. Es wurde gezeigt, dass dieses Gen bei vielen Tumoren deletiert ist.

2.6. Mikrosatelliten-DNA

Die Mikrosatelliten-DNA besteht aus kurzen hochrepetitiven DNA-Sequenzen von 2-6 bp, wobei bevorzugt Wiederholungen von Di-, Tri- oder Tetranukleontiden vorkommen. Meistens handelt es sich um repetitive (CA)_n Sequenzen. Im Genom sind Mikrosatelliten weit verbreitet und liegen meist in nicht kodierenden Abschnitten. Während kodierende Gene bis auf einzelne Nukleotid-Polymorphismen (SNPs) eine identische Basensequenz haben, weisen Mikrosatelliten-DNA-Sequenzen zwischen den paternalen und maternalen Allelen häufig eine unterschiedliche Anzahl von Repeats auf. Aufgrund dieses Längen-Polymorphismus können beide Allele voneinander unterschieden werden. Für die Untersuchungen von Mutationen und DNA-Verlusten von Tumorsuppressorgen wird Mikrosatelliten-DNA verwendet. Durch die Analyse tumorspezifischer Mikrosatelliten-DNA kann der Funktionsverlust eines Tumorsuppressorallels nachgewiesen werden. Die Stränge der hochrepetitiven Mikrosatelliten-Sequenzen können während der Replikation unterschiedlich kopiert werden. Wenn der Vorlage-Strang kurze Tandem-Wiederholungen enthält, zum Beispiel CA-Wiederholungen, können der neu replizierte Strang und der Vorlage-Strang aufgrund ihrer Anzahl von Repeats gegeneinander verschoben werden. Bei der Replikation kann es zu falschen Paarungen kommen und Wiederholungen können

doppelt oder gar nicht kopiert werden, was abhängig von der Richtung der Verschiebung ist. In Bezug auf den neu replizierten Strang, kann zwischen Vorwärtsverschiebung (forward slippage) und Rückwärtsverschiebung (backward slippage) unterschieden werden. Wenn der neue Strang nach vorne rutscht (in Synthese-Richtung), bleiben am Elternstrang einige ungepaarte Basen übrig, was zur Deletion führt.

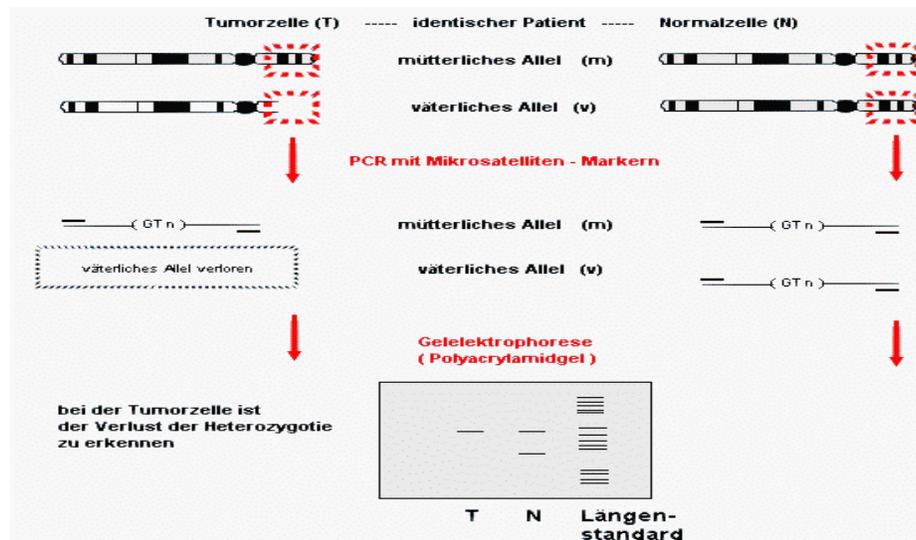


Abb. 9: Schematische Abbildung einer PCR mit anschließender Detektion der PCR-Produkte auf einem Polyacrylamidgel. Die Abbildung zeigt zwei Chromosomen (ein väterliches und ein mütterliches) in einer normalen Zelle und einer Tumorzelle. In der Tumorzelle zeigt das väterliche Chromosom einen DNA-Verlust. Die Amplifikation der aus diesen Zellen extrahierten DNA mit Mikrosatelliten-Primern spezifisch für diesen Genabschnitt und die anschließende Auftrennung der PCR-Produkte durch eine Gelelektrophorese demonstriert einen Allelverlust (LOH) in der Tumor-DNA, wie an der einen Bande, die einem Allel entspricht, zu erkennen ist.

2.7. Auswahl der Mikrosatelliten-Marker

Zehn Mikrosatelliten-Marker wurden für den Nachweis von LOH in einem sensitiven Gradienten-PCR-Assay getestet. Die Mikrosatellitenmarker der Loci D6S474, D6S1631, D7S522, D8S87, D8S286, D8S360, D9S1748, D10S1765, D11S898, D11S1313 auf den Chromosomen 6, 7, 8, 9, 10 und 11 wurden aufgrund ihrer Lokalisation in der Nähe von bekannten Tumorsuppressorgenen ausgewählt. Ihre Qualität als diagnostischer Marker wurde durch den Nachweis von LOH getestet, denn deletierte Gensequenzen können Informationen enthalten, deren Produkte die Tumorentstehung hemmen. So können LOH-Analysen zur Bildung eines molekularen Profils des Prostatakarzinoms beitragen.

Der Mikrosatellitenmarker D6S474 liegt in der chromosomalen Region 6q21. Das in diesem Bereich befindliche Gen kodiert für den Proteinkinase Inhibitor B (PKI B). In Prostatakarzinomen ist die Expression der Proteinkinase B (PKB) hochreguliert und korreliert mit der Tumorentwicklung und –progression. Die PKB spielt eine Rolle bei der Proliferation und Inhibition der Apoptose. Die Assoziation einer erhöhten PKB-Expression mit einem hohen präoperativen PSA-Wert im Serum wurde beobachtet [Liao et al., 2003]. Der Verlust des PK-Inhibitors führt zu einer verstärkten Aktivität der PKB und damit zu einer Stimulation der Zellproliferation.

Der Mikrosatellitenmarker D6S1631 liegt in der chromosomalen Region 6q16. Hier befindet sich ein Gen, das für die TAK1 kodiert, die „Transforming growth factor“ (TGF- β)-aktivierende Kinase. Untersuchungen an der humanen Prostatazelllinie PC-3U zeigten, dass die TGF- β induzierte Apoptose dieser Zellen auf die Aktivierung der TAK1 zurückzuführen ist. Ektopische Expression von TAK1 stimuliert die Apoptose, während eine dominant negative TAK1-Variante die Apoptose reduziert [Edlund et al., 2003]. In der Literatur wurde das Auftreten von LOH in diesem Bereich häufig in späteren Tumorstadien beschrieben und deshalb mit einer schlechteren Prognose in Zusammenhang gebracht [Konishi et al., 2003].

Das Gen für Caveolin-1 befindet sich auf Chromosom 7q31.1 (D7S522) und ist die Hauptkomponente der Caveolae-Membrandomänen, die in den meisten Zelloberflächen vorkommen. Das Produkt dieses Tumorsuppressorgens hemmt als Membranprotein die Motilität der Zelle und ist bei vielen epithelialen Tumoren deletiert. In der Signaltransduktion fungiert Caveolin-1 als negativer Regulator der Ras-p42/44 MAP Kinase-Kaskade und als ein transkriptionaler Repressor des Cyclin D1 [Liu et al., 2002].

Im Bereich 8p12 (D8S87), auf dem kurzen Arm von Chromosom 8, liegt das Tumorsuppressorgen Neuregulin 1 (NRG 1). Dieses Gen kodiert für mehrere alternative Spleißvarianten eines Liganden, der an ErbB-Rezeptoren, EGF ähnliche Wachstumsfaktorrezeptoren mit Tyrosinkinaseaktivität, bindet. Die Bindung von Neuregulin führt zur Heterodimersierung und somit zur Aktivierung dieser ErbB-Rezeptoren. Im weiteren Verlauf der Signaltransduktionskaskade wird der programmierte Zelltod induziert, wie am Beispiel der androgen-unabhängigen Prostatakarzinomzelllinie LNCaP gezeigt wurde [Tal-Or et al., 2003]. Niedrige NRG 1-Spiegel wurden auch mit einer schlechten Prognose assoziiert [Raj et al., 2001]. Ein potentieller chromosomaler

„Breakpoint“ wurde proximal von 8q12 identifiziert. Er liegt variabel in einer mindestens 1 Mb langen Region zwischen den Markern D8S137 und D8S87. Häufige homozygote Deletionen dieses Abschnitts proximal von D8S87 wurden in Prostatakarzinomen beobachtet [Bova et al., 1996, Prasad et al., 1998].

In der chromosomalen Region 9p21 (D9S1748) liegt ein Tumorsuppressorgen, das einen Inhibitor der cyclin-abhängigen Kinase CDKN2/p16, kodiert. Inaktivierung dieses 16 kD Proteins durch homozygote Deletion, Punktmutation oder Methylierung der Promotorregion führt zur erhöhten Zellzyklus-Rate. Immunhistologische Daten zeigten eine hohe Proteinexpression von p16 in normalen Epithelzellen der Prostata, während in Prostatakarzinomen die Expression von p16 vergleichsweise geringer war oder ganz fehlte. Dies weist darauf hin, dass p16 in der Karzinogenese der Prostata involviert ist [Perincherly et al., 1999].

Der Mikrozell-vermittelte Chromosomentransfer des humanen Chromosoms 11 in der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 inhibierte die Tumorgenität dieser Zellen und zeigte, dass die Region 11q22-23 auf dem langen Chromosomenarm in diesem Prozess involviert ist [Negri et al., 1994]. Der Bereich 11q22 (D11S898) enthält ein Tumorsuppressorgen, dessen Genprodukt CHK1 (Checkpoint-Kinase) eine Rolle in der Kontrolle des Zellzyklus spielt. Die CHK1 ist ein Schlüsselregulator des G2-/M-Checkpoints des Zellzyklus. Bei Replikationsfehlern wird sie durch Phosphorylierung aktiviert und kann dann die cyclin-abhängige Kinase inhibieren. Dadurch wird der Zellzyklus unterbrochen, damit die DNA-Reparatur erfolgen kann [Katsuragi et al., 2004]. Folglich könnte ein LOH in dieser Region dazu führen, dass die Reparatur nicht mehr stattfindet und defekte DNA repliziert wird.

Der Marker D11S1313 liegt in der chromosomalen Bande 11q12. In dieser Region befinden sich die Mismatch-Repair (MMR)-Gene hMSH2 und hMLH1. Fehlerhafte Reparatur kann zu einer Mikrosatelliteninstabilität führen [Yeh et al., 2001]. Die Produkte dieser Gene erkennen die in den DNA-Strang falsch eingebauten Nukleotide an der fehlenden Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen den beiden Basen und entfernen das falsch eingebaute Nukleotid. Die Inaktivierung dieser MMR-Gene und ihre reduzierte Proteinexpression korreliert mit dem Risiko, ein Prostatakarzinom zu entwickeln [Strom et al., 2001].

3. Material

3.1. Blut- und Gewebeproben

Von 80 anonymisierten Patienten (64 Patienten mit gesichertem Prostatakarzinom und 16 Patienten mit einer BPH) und 9 gesunden Probanden der urologischen Klinik der Universität Hamburg, unter der Leitung von Prof. Dr. Hartwig Hulan und der urologischen Abteilung der Beau Soleil Clinic, Montpellier, Frankreich, in Kooperation mit Dr. Catherine Alix-Panabières, wurden Blutproben entnommen. Von 25 der Prostatakarzinom-Patienten wurden von PD Dr. med. Andreas Erbersdobler aus dem Pathologischen Institut der Universität Hamburg Gewebeproben zur Verfügung gestellt. Alle Patienten stimmten der Verwendung ihrer Daten und ihrer Blut- und Tumorproben zu wissenschaftlichen Untersuchungen zu.

3.2. Reagenzien

Ammoniumpersulfat (zur Analyse)	Serva, Heidelberg
7.5 M Ammoniumazetat	
Aqua ad iniectabilia	Baxter SA, Lessines
Borsäure	Sigma, Taufkirchen
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Chloroform	Sigma, Taufkirchen
Desoxynucleoside Triphosphate Set (PCR grade)	Roche, Mannheim
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	Sigma, Taufkirchen
Eosin	Merck, Darmstadt
Essigäure (100% zur Analyse)	Merck, Darmstadt
Ethanol (absolut zur Analyse)	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	Sigma, Taufkirchen
Glycerol (anhydrous pure)	Merck, Darmstadt
Guanidinthiocyanat	Promega, Mannheim

Silbernitrat-Färbelösung (für 1 PA-Gel)

Biorad, München

- 14 ml H₂O
- 2 ml Silver Complex Solution
- 2 ml Reduction Moderator Solution
- 2 ml Image Development Reagent
- 20 ml Development Accelerator Solution

5x TBE (Tris-Borat EDTA)

- | | |
|------------------|--------|
| Trizma Base | 54 g |
| Borsäure | 27,5 g |
| 0,5 EDTA pH 8 | 20 ml |
| H ₂ O | ad 1 l |

Zell-Lyse-Puffer

- | | |
|------------------------|------------|
| 0,3 M Sucrose | 106,9 g |
| 10 mM Tris pH 7,5 | 10ml 1 M |
| 5 ml MgCl ₂ | 5 ml 1 M |
| 1% Triton X 100 | 10 ml 100% |
| H ₂ O | ad 1 l |

3.4. Kits

AmpliTaq Gold (200 µl, 1000 U, 5 U/µl)

- Mit GeneAmp 10x PCR Gold Puffer
- (1,5 ml, 150 mM Tris-HCl, pH 8,0, 500 mM KCl)
- und 25 mM MgCl₂-Lösung (1,5 ml)

Promega DNA Kit

Promega, Mannheim

QIAamp DNA Mini Kit (250)

Qiagen, Hilden

- Proteinase K-Lösung
- Buffer AL – Lysepuffer

Buffer AW1 – Waschpuffer 1

Buffer AW2 – Waschpuffer 2

Buffer AE – Elutionspuffer

Taq Polymerase

Qiagen, Hilden

PCR-Buffer 10x

3.5. PCR Primer

D6S474

5'TAM-makiert (blau)

Forward (f): 5' – TGT ACA AAA GCC TAT TTA GTC AGG – 3'

Reverse (r): 5' – TCA TGT GAG CCA ATT CCT CT – 3'

D6S1631

5'HEX-makiert (grün)

(f): 5' – TTT GGC TTG AGA ACA TTT ACC – 3'

(r): 5' – GTG CCA CAC TGC CTC TAA – 3'

D7S522

5'FAM-makiert (schwarz)

(f): 5' – GCC AAA CTG CCA CCT CTC – 3'

(r) 5' ACG TGT TATA GCC ACT CCC – 3'

D8S87

5'TAM-makiert (schwarz)

(f): 5' – GGG TTG TTG ATT AAA AC – 3'

(r) 5' – TGT CAA ATA CTT AAG CAC AG – 3'

D8S286

5'TAM-makiert (schwarz)

(f): 5' – CTG TTT ATT TGC CCA TGT CA – 3'

(r): 5' – AGC ATG AAA CTG TCA CTG AGA – 3'

D8S360

5'TAM-makiert (schwarz)

(f): 5' – CTA GCT CCT GTG TTT CCA TCA – 3'

(r): 5' – TCT CAC AGG TGC CTG TGC AG – 3'

D9S1749 5'HEX-makiert (grün)
 (f): 5' – CAC CTC AGA AGT CAG TGA GT – 3'
 (r): 5' – GTC CTT GAA ATA CAC CTT TCC – 3'

D10S1765 5'FAM-makiert (blau)
 (f): 5' – ACA CTT ACA TAG TGC TTT CTG CG – 3'
 (r): 5' – CAG CCT CCC AAA GTT GC – 3'

D11S898 5'FAM-makiert (blau)
 (f): 5' – AGC ACC ATT TGC TGA GAC TG – 3'
 (r): 5' – TGT ATT TGT ATC GAT TAA CCA AA CTT – 3'

D11S1313 5'FAM-makiert (blau)
 (f): 5' – CTA AGC ATG AAG CTG CCA AGT TA – 3'
 (r): 5' – AGT TTG ACA TTA GGG AAT TTT GA – 3'

3.6. DNA Marker

DNA Molecular Weight Marker XIV	Roche, Mannheim
100 base pair ladder	
Phi 174 DNA/Hinf I Marker	Promega, Mannheim
Gene Scan ROX Size 500 Standard	Applied Biosystems, Mannheim

3.7. Software

NIH Image	RSB/NIH
Gene Scan	Applied Biosystems, Mannheim
Photoshop 7.0	Adobe, Unterschleißheim
SPSS for PC	SPSS Inc., Chicago, USA

3.8. Geräte

Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Electrophoresis Power Supply Model E143	Consort, Turnhout, Belgien
Gel imager	INTAS, Göttingen

Geltrockner Model 583	Biorad, München
Genetic Analyzer 310	Applied Biosystems, Mannheim
Hera guard Sterilbench	Heraeus, Hanau
Mikrowelle	Promicro, München
MJ Research PTC-200 Peltier Thermal Cyclor	Biozym, Hessisch Oldendorf
Thermomixer kompakt	Eppendorf, Hamburg
Vortex Genie	Scientific industries, New York, USA

3.9. Verbrauchsmaterialien und Sonstiges

Cryo-Röhrchen	Nalgene, Rochester, USA
Eppendorf, Reaktionsgefäße (Tubes)	Eppendorf, Hamburg
UVette	Eppendorf, Hamburg
Klarsichtfolie	Krupps, Stuttgart
Chromatographie Papier	Whatman, Dassel
Gelelektrophorese-Anlagen	BioRad Laboratories GmbH, München

4. Methoden

4.1. Gewinnung von Plasma und Isolierung der Leukozyten

Zur Gewinnung von Blutplasma wurden jeweils 20 ml Vollblut aus EDTA Röhrchen für 10 min. bei 3500 rpm zentrifugiert. Von der oberen Phase wurden mit der Pipette vorsichtig 3 bis 4 ml Plasma abgenommen und bis zur weiteren Verwendung in Eppendorf Tubes bei einer Temperatur von -20°C gelagert. Die untere Phase enthielt die korpuskulären Bestandteile des Blutes, aus der die Leukozyten isoliert wurden. Hierfür wurde die untere Phase mit einem 4°C kalten Lysepuffer auf 50 ml ergänzt und die Lyse für 15 min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurde dieses Gemisch bei 4°C für 20 min. mit 3500 rpm zentrifugiert und der Überstand abgekippt. Das durch diesen Zentrifugationsschritt entstandene Pellet wurde mit 30 ml eiskaltem Lysepuffer resuspendiert. Die Suspension wurde bei 4°C und 3500 rpm für 15 min. zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand dekantiert. Das Leukozyten-Pellet wurde ein weiteres Mal in 1 ml Lysepuffer gewaschen und in ein beschriftetes 1,5-ml-Tube überführt. Die Leukozyten wurden wieder bei 13000 rpm bei 4°C für 5 min. zentrifugiert. Nach der Entfernung des Überstands wurde das Leukozyten-Pellet bis zur Isolation der Leukozyten-DNA bei -20°C gelagert.

4.2. DNA-Extraktion

4.2.1. Isolierung der freien zirkulierenden DNA aus Plasma

Für die molekulargenetischen Analysen der Plasma-DNA von Prostatakarzinom-Patienten wurde die freie zirkulierende DNA durch das QIAamp DNA Mini Kit aus dem Blutplasma extrahiert. Das Gesamtvolumen von 2-4 ml Plasma wurde hierbei auf Aliquots von $650\ \mu\text{l}$ in 2-ml-Eppendorf-Gefäße verteilt. Anschließend wurden $1/10$ des Plasmavolumens Proteinase K ($65\ \mu\text{l}$) und ein Volumen Lysepuffer AL ($650\ \mu\text{l}$) hinzugegeben. Das Gemisch wurde gevortext und bei 56°C auf einen Thermomixer für 10 min. inkubiert. Die Präzipitation der DNA wurde durch die Zugabe von 1 Volumen 100%igen Ethanol ($650\ \mu\text{l}$) eingeleitet und auf eine Säule gegeben, die mit einem Adapter und Säulenaufsatz auf einer Vakuumkammer montiert war. Bei geschlossenem Hahn wurde durch eine Wasserstrahlpumpe ein Vakuum in der Kammer angelegt. Daraufhin wurde das Lysat/Ethanolgemisch auf eine durch einen montierten Aufsatz verlängerte Säule gegeben. Das Gemisch wurde durch den angelegten Unterdruck bei offenem Hahn durch die Säule in die Vakuumkammer gesogen, wobei die negativ geladene DNA an die positiv geladene

Säulenmatrix gebunden wurde. Ungebundene Moleküle wurden von der Säulenmatrix in zwei Schritten, jeweils mit 700 µl der Waschpuffer AW1 und AW2 entfernt. Nach den beiden Waschschrritten wurde der Hahn zugedreht. Die Säule mit der gebundenen DNA wurde in ein Eppendorf-Gefäß gestellt und bei 13000 rpm für 1 min. zentrifugiert, um die restliche Waschlösung von der Matrix zu entfernen. Anschließend wurde die Säule mit der gebundenen DNA in ein frisches Gefäß gestellt. Auf die Säulenmatrix wurden 100 µl Elutionspuffer pipettiert. Nach einminütiger Inkubation bei RT wurde die Säule bis 5000 rpm für 1 min. zentrifugiert, so dass die gebundene DNA von der Matrix in das Eppendorf-Gefäß eluiert wurde. Das Eluat wurde anschließend bis zur Konzentrationsmessung bei 4°C gelagert.

4.2.2. Isolierung genomischer DNA aus Leukozyten

Die Leukozyten-DNA wurde durch dasselbe Kit von Qiagen isoliert. Hierfür versetzte man die Leukozyten Pellets mit jeweils 200 µl PBS, 1/10 Volumen (20 µl) Proteinase K und 1 Volumen (200 µl) Lysepuffer AL. Anschließend wurde das Gemisch gevortext und bei 56°C für 2-3 Stunden auf einem Thermomixer inkubiert. Durch diese Behandlung lysierten die Zellen und die DNA wurde von bindenden Proteinen befreit. Durch Zugabe von 1 Volumen (200 µl) 100%igem Ethanol wurde die DNA gefällt. Das Lysat-Ethanolgemisch wurde dann auf eine in einem Eppendorf-Gefäß befindliche Qiagen-Säule überführt und bei 5000 rpm für 1 min. zentrifugiert. Die an der Säulenmatrix gebundene DNA wurde nacheinander durch Zugabe von je 500 µl Waschpuffer AW1 und AW2 mit anschließender Zentrifugation bei 5000 rpm für 1 min. gewaschen. Durch eine einminütige Zentrifugation bei 13000 rpm im Anschluss wurde die restliche Waschlösung von der Säule entfernt. Anschließend wurde die Qiagen-Säule in ein neues 1,5-ml-Eppendorf-Gefäß gestellt und 100 µl Elutionspuffer AE auf die Matrix gegeben. Die einminütige Inkubation bei RT und eine darauf folgende Zentrifugation bei 5000 rpm für 1 min. führte zur Elution der DNA von der Säule in ein Eppendorf-Tube. Die Elution mit 100 µl Puffer AE wurde wiederholt, so dass das Elutionsvolumen nach dem zweiten Schritt insgesamt 200 µl betrug. Die eluierte DNA wurde bis zur Konzentrationsmessung bei 4°C gelagert.

4.2.3. Isolierung der freien zirkulierenden DNA durch das Promega Kit

Neben der DNA-Isolations-Methode durch das QIAamp DNA Kit wurde zum Vergleich unterschiedlicher Extraktionsmethoden ein Kit von Promega getestet. Hierbei wurde zum

Volumen von 0,5 ml Plasma zwei Volumenmengen 6 M Guanidinthiocyanat hinzugefügt. Dieses Gemisch aus Guanidinthiocyanat und Blutplasma wurde mehrmals invertiert und für 5 min. bei RT inkubiert. Danach wurde das Gemisch auf eine Minisäule übertragen. Diese Minisäule ist jeweils für ein Maximalvolumen von 1,5 ml ausgerichtet. Im Anschluss wurde die mit dem Plasma-Guanidinthiocyanat Gemisch aufgefüllte Minisäule für 1 min. bei maximaler Geschwindigkeit von 13000 rpm zentrifugiert. Für die Reinigung der an der Säule gebundenen DNA wurde im ersten Schritt ein Volumen von 750 µl Waschpuffer auf die Säule aufgetragen und für 1 min. bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Im zweiten Durchgang wurde ein weiteres Volumen von 250 µl Waschpuffer auf die Säule pipettiert und der Zentrifugationsschritt wiederholt. Im Anschluss dieses Waschvorganges wurde die Säule ein weiteres Mal für 2 min. bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Auf diese Weise wurde der restliche noch haftende Waschpuffer von der Matrix entfernt. Zur DNA Elution wurde die Säule in ein neues Tube gestellt und 50 µl NF-Wasser auf die Matrix pipettiert und für 1 min. inkubiert. Anschließend wurde die Säule bei maximaler Geschwindigkeit für 1 min. zentrifugiert. Das Eppendorf-Röhrchen enthielt nun die eluierte DNA.

4.2.4. DNA-Extraktion durch die klassische Phenol/Chloroform-Methode

Die Isolierung genomischer DNA aus Plasma erfolgte auch durch die klassische Methode der Phenol/Chloroform (PCL)-Extraktion. Hierfür wurde 0,5 ml Plasma in ein 2-ml-Eppendorf-Gefäß überführt. Ein Volumen von 0,5 ml SDS Proteinase K Lösung wurde dem Plasma hinzugegeben. Dieses Gemisch wurde gevortext und über Nacht bei 55°C im Wasserbad inkubiert. Am nächsten Tag wurde ein gleiches Volumen PCL in die Lösung gegeben. Das Gemisch wurde für 30 sek. gevortext und für 2 min. bei 13000 rpm zentrifugiert. Durch diesen Zentrifugationsschritt wurde das Gemisch in drei Phasen getrennt. Die obere Phase enthielt die Nukleinsäuren. In der mittleren Phase lagerten sich die Proteine ab und das restliche organische Material befand sich in der unteren Phase. Zur Extraktion der DNA wurde die obere Phase in ein zweites Eppendorf-Tube überführt, das ein Volumen PCL enthielt. Anschließend wurde das Gemisch wieder für 30 sek. gevortext und für 2 min. bei 13000 rpm zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde die obere Phase wieder in ein neues Eppendorf-Gefäß mit 1 Vol. PCL gegeben und die letzten Schritte noch einmal wiederholt. Die obere Phase wurde in ein neues, leeres Eppendorf-Gefäß überführt. Um die DNA zu fällen, wurden 1 µl Glycogen (20 mg/ml), 0,3 ml 7.5 M Ammoniumazetat und 1 Volumen Isopropanol hinzugefügt. Nach mehrmaliger Invertierung des Röhrchens

wurde es für 30-60 min. bei 4°C zentrifugiert. Hierbei bildete sich ein Pellet am Boden des Behältnisses. Der Überstand wurde vorsichtig abgegossen und 1 ml 70%iges Ethanol auf das Pellet gegeben. Nach Zentrifugation bei 13000 rpm für 5 min. wurde das Ethanol vollständig dekantiert und auch die kleinen Reste Alkohol mit einer Pipette sorgfältig aus dem Tube entfernt. Das Pellet mit der DNA wurde für 10 min. an der Luft getrocknet. Die DNA wurde mit 50 µl TE resuspendiert und anschließend wurde die DNA-Konzentration bestimmt.

4.3. Spektrometrische Quantitäts- und Qualitätskontrolle von Nukleinsäuren

Die Konzentration der isolierten gDNA wurde durch Messung der Optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm durch ein UV-Spektrometer bestimmt. Das UV-Meter wurde mit 50 bzw. 100 µl Elutionspuffer AE, der sich in einer DNase-freien Plastikkuvette befand, geeicht. Anschließend wurden jeweils 100 µl der eluierten DNA aus Plasma oder Leukozyten für die OD-Messung bei 260 nm eingesetzt. Die Nukleinsäurekonzentration kann mit folgender Formel berechnet werden:

<p style="text-align: center;">DNA-Konzentration: $c[\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260} \times \text{Volumen} \times \text{Verdünnung}$</p>

Eine gemessene OD₂₆₀ von 1 entspricht einer DNA-Konzentration von 50 mg/ml. Für die Qualitätsbestimmung der Präparation wurde die DNA zusätzlich bei einer OD von 280 nm gemessen. Der Reinheitsgrad der untersuchten Proben lässt sich durch die Ermittlung des Verhältnisses E₂₆₀ zu E₂₈₀ beurteilen. Ein Quotient zwischen 1,8 und 2 entspricht reiner DNA. Werte unter 1,6 weisen auf Proteinverunreinigungen hin.

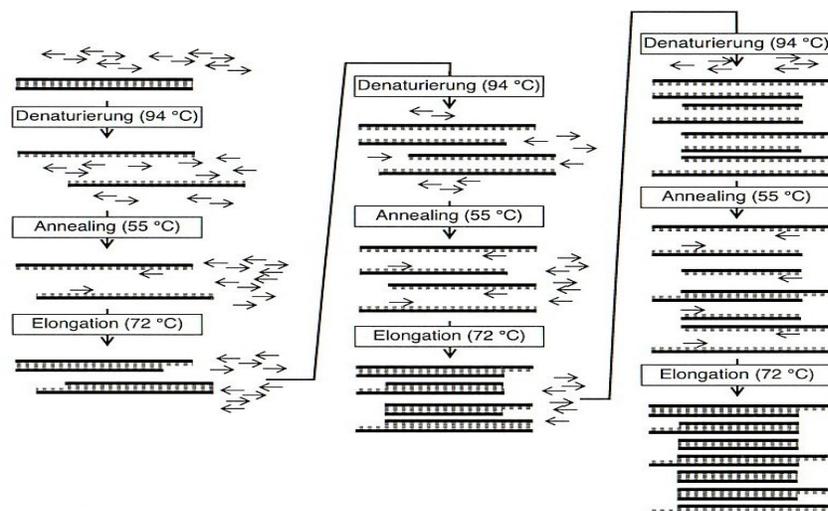
4.4. PCR mit fluoreszenzmarkierten Mikrosatelliten-Markern

Für die Doktorarbeit wurde eine Gruppe von 10 Mikrosatelliten-Marker ausgewählt, die in der Nähe von Tumorsuppressorgenen binden. Diese im Kapitel Material aufgelisteten Primer und die dazugehörigen Tumorsuppressorgene sind in Tabelle V dargestellt.

Tabelle V: Mikrosatelliten-Marker und deren zugeordneten Tumorsuppressorgene

Primer	Gen
D6S476	Protease Inhibitor B
D6S1631	TGF- β -activating kinase
D7S522	Caveolin 1
D8S87	Neuregulin 1
D8S286	HNF-4c
D8S360	n.a.
D9S1748	CDKN2/p16
D10S1765	PTEN
D11S898	Checkpoint kinase 1
D11S1313	MSH2, MLH 1

Die PCR ist eine in vitro Amplifikation einer DNA-Sequenz, die mit Hilfe eines Primersets, bestehend aus einem Sense-Primer (5') und einem Antisense-Primer (3'), in einem Thermocycler vervielfältigt wird [Saiki et al., 1988]. Durch mehrere aufeinander folgende Zyklen, die aus den Schritten Denaturierung, Primer-Annealing und Elongation bestehen, werden DNA-Fragmente potenziell amplifiziert.

**Abb. 10:** Das PCR-Prinzip

Gezeigt wird die Denaturierung der DNA-Doppelhelix und die Bindung beider Primer (Pfeile) an die DNA-Einzelstränge. Die Elongation führt zur Synthese eines neuen DNA-Strangs und somit zur Bildung von DNA-Doppelsträngen. Der Denaturierungsschritt erfolgt gewöhnlich bei 94°C. Die „Annealing“-Temperatur von 55°C wurde in dieser Reaktion willkürlich vorgeschlagen. Sie wird für jedes in der Amplifikation verwendete Primer-Paar neu berechnet. Die Elongation findet gewöhnlich bei 72°C statt.

Primer sind kurze DNA-Einzelstränge (Oligonukleotide) mit einer Länge von etwa 15 bis 30 Basenpaare (bp). Sie binden jeweils an die zu amplifizierende DNA-Sequenz des Sense-(5')- und Antisense-(3')-Strangs. Da die DNA-Polymerase nur doppelsträngige DNA binden kann, werden Primer benötigt, die mit ihren komplementären Basen an die gewünschte Sequenz hybridisieren und so den Replikaktionsstartpunkt zum Kopieren der Einzelstränge bilden. Für die Aktivität der DNA-Polymerase sind Mg^{2+} -Ionen notwendig. Die Bausteine zur DNA-Replikation sind Desoxyribonukleinphosphate (dNTPs), die aus einem Gemisch von dATP, dCTP, dGTP und dTTP bestehen. Für die Amplifikation wurde die AmpliTaq Gold DNA-Polymerase, ein thermostabiles Enzym ausgewählt, das bei RT in einer inaktiven Form vorliegt. Erst durch Erhitzen auf 95°C kommt es zu einer Aktivierung der Polymerase. Die vorliegende Tabelle stellt alle Reagenzien zusammen, die für einen PCR-Ansatz notwendig sind, um die Amplifikation der ausgewählten DNA-Sequenzen zu ermöglichen.

Tabelle VI: PCR-Ansatz mit fluoreszenzmarkierten Primern

	Eingesetzte Menge	Endkonzentration
gDNA-Template	10 ng	
10x PCR Puffer	1 μ l	1x
25 mM $MgCl_2$	1 μ l	2,5 mM
2 mM dNTPs	1 μ l	200 μ M
20 μ M 5' Fluoreszenzprimer	0,2 μ l	11 pM
20 μ M 3' Primer	0,2 μ l	11 pM
AmpliTaq Gold DNA-Polymerase (5 U/ μ l)	0,1 μ l	1,5 U
H ₂ O	Ad 10 μ l	

Die Schmelztemperatur wurde mit Hilfe der Länge und der Basenzusammensetzung der Primer-Sequenz bestimmt. Sie lässt sich mit Hilfe der GC-Formel abschätzen. Diese Formel berücksichtigt die Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Basenpaaren. G und C bilden drei, A und T zwei Wasserstoffbrückenbindungen miteinander aus. Die Formel ist allerdings nur für kurze Primer mit einer Länge bis ca. 20 Basen geeignet.

$$T_m \text{ in } ^\circ\text{C} = 2 \times (A+T) + 4 \times (G+C)$$

T_m - Schmelztemperatur

A-Anzahl der Adeninbasen

T-Anzahl der Thyminbasen

G-Anzahl der Guaninbasen

C-Anzahl der Cytosinbasen

Die optimale Annealing-Temperatur der Primerpaare wurden in der Arbeitsgruppe durch Gradienten PCR bereits etabliert und musste daher nicht neu bestimmt werden.

Tabelle VII: Charakteristika der Primer-Paare

Primerpaar	Locus	Größe des PCR-Produkts (bp)	Annealing-Temperatur (°C)
D6S474	6q21-22	151-167	53
D6S1631	6q16	164-182	54
D7S522	7q31.1	217-229	56
D8S87	8p12	145	53
D8S286	8q13	238	53
D8S360	8p21	95	59
D9S1748	9q21	110	53
D10S1765	10q23.3	166-184	56
D11S898	11q22	140-156	56
D11S1313	11p12	184-204	56

Für die erfolgreiche Amplifikation der gewünschten Mikrosatelliten-Bereiche wurde zuerst die inaktive AmpliTaq Gold DNA-Polymerase für 5 min. bei 95°C aktiviert. Dann erfolgte die Amplifikation der DNA, wobei sich die einzelnen Schritte der Denaturierung, Annealing und Elongation über 40 Zyklen wiederholten. Durch Erhitzen auf 95°C für 25 sek. wurde die DNA-Doppelhelix in Einzelstränge denaturiert. Das Abkühlen des Reaktionsansatzes für 30 sek. auf eine für das jeweilige Primerset optimale Annealing-Temperatur (siehe Tabelle VII) erlaubte die spezifische Bindung der Primer an die DNA. Die Amplifikation der DNA durch die AmpliTaq Gold DNA-Polymerase, in der die einzelsträngige DNA als Matrize diente, erfolgte für 30 sek. bei 72°C. Nach 40 Zyklen wurden bei 72°C für 7 min. die noch unvollständig kopierten Replikate fertig synthetisiert.

4.5. Kapillar-Gelelektrophorese der PCR-Produkte

Für die Auswertung der PCR-Produkte wurde die amplifizierte Leukozyten-DNA mit DNase-freiem Wasser 1:10 verdünnt. Die PCR Produkte der Plasma und Tumorproben wurden unverdünnt eingesetzt, da aufgrund der niedrigeren Konzentration und Reinheit weniger PCR-Produkt gebildet wurde. Zur Analyse am „Genetic Analyzer“ wurde folgender Ansatz in ein 0,5 ml-Eppendorf-Tube pipettiert:

0,5 µl fluoreszenzmakiertes PCR-Produkt (1:10 Verdünnung des Leukozyten PCR Produkts)
+ 40 µl HiDi Formamid (ultrarein)
+ 0,2 µl ROX Size Standard (für interne Standardisierung)

Dieser Ansatz wurde für 2 min. bei 94°C denaturiert und anschließend sofort auf Eis gestellt, um dann durch Kapillar-Gelelektrophorese in einem „Genetic Analyzer“ analysiert zu werden. Während der Analyse der PCR-Produkte wurde eine Elektrode und eine Kapillare, die mit einer Gelmatrix gefüllt war, in jede Probe eingeführt, um für jeweils 3 sek. ein Aliquot des PCR Produktes in das Gel der Kapillare einzusaugen. In einer anschließend stattfindenden Kapillarelektrophorese, die bei 15 kV, 0,9 mA und 60°C durchgeführt wurde und für jede Probe 24 min. dauerte, wurden die PCR-Produkte ihrer Größe nach aufgetrennt. Ein Argon-Laser, dessen Hauptemissionen bei Wellenlängen von 488 nm und 514,5 nm lagen und dessen Energie 9,9 mW betrug, war auf dieses Trennsystem gerichtet. Erreichte ein fluoreszenzmarkiertes DNA-Fragment den Bereich des Gels, den der Laserstrahl traf, wurde das Fluorchrom im PCR-Produkt zur Fluoreszenzstrahlung angeregt. Die Fluoreszenz fokussierte eine Linse. Nachdem das Licht in einem Hohlspiegel prismatisch aufgespalten wurde, erfolgte die Datenaufnahme durch eine CCD-Kamera, die ihre Informationen an einen Computer weiterleitete. Mit Hilfe eines internen Größenstandards konnten Größe und Menge der amplifizierten Mikrosatelliten-Sequenzen ermittelt werden. Die amplifizierten Allele wurden als Peaks in Diagramme am Computer dargestellt und mit Hilfe der Gene Scan Software ausgewertet.

5. Ergebnisse

5.1. DNA-Extraktion und photospektrometrische Konzentrationsbestimmung der freien zirkulierenden DNA

Von 89 Männern wurde die freie zirkulierende DNA aus dem Blutplasma isoliert. 64 Proben waren von Prostatakarzinom-Patienten, 16 von BPH-Patienten, sowie 9 von gesunden Probanden. Nach Extraktion der freien zirkulierenden DNA aus dem Plasma und deren photospektrometrischen Konzentrationsbestimmung wurde die DNA-Konzentration auf ein Volumen von 1 ml berechnet. Die folgende Tabelle VIII enthält die gemessenen Werte der DNA-Konzentrationen im Blutplasma der Prostatakarzinom-Patienten, sortiert nach aufsteigendem Gleason-Score und t-PSA-Werten der Patienten. Die meisten Patienten befanden sich im Tumorstadium T1c. Auch die detektierten DNA-Konzentrationen der BPH-Patienten (Tabelle IX) und gesunden Probanden (Tabelle X) wurden tabellarisch zusammengefasst. Wie in Tabelle X gezeigt, hatten die gesunden Probanden nur eine geringe und vernachlässigbare Konzentration freier zirkulierender DNA in ihrem Blut. Teilweise lagen die Werte auch unter der Nachweisgrenze des Photometers. Nur bei einem gesunden Probanden konnte ein hoher Wert von 1210 ng/ml detektiert werden (Tabelle X). Dieser Ausreißer wurde in der Berechnung der durchschnittlichen DNA-Konzentration nicht berücksichtigt. Warum dieser Proband eine so hohe DNA-Konzentration in seinem Blut hatte, kann nachträglich nicht mehr geklärt werden. Eventuell hatte er zur Zeit der Blutabnahme eine gutartige Entzündung. Die durchschnittliche DNA-Konzentration der übrigen 8 Probanden betrug 38,08 ng/ml.

Ein höherer durchschnittlicher DNA-Konzentrationswert wurde bei den BPH-Patienten festgestellt. Bei insgesamt 16 Patienten wurde eine durchschnittliche DNA-Konzentration von 1109 ng/ml detektiert (Tabelle IX). Am höchsten lag, wie erwartet, die durchschnittliche DNA-Konzentration bei Prostatakarzinom-Patienten. Hier wurde ein Durchschnittswert von 1675 ng/ml detektiert (Tabelle VIII). Mit Hilfe der Software SPSS wurden die Plasmakonzentrationen der gesunden Probanden, BPH-Patienten und der Patienten mit einem histologisch gesicherten Prostatakarzinom miteinander verglichen (Abb. 11). Für diese Statistik wurden die einzelnen DNA-Konzentrationen der Patienten mit der Diagnose korreliert und Kreuztabellen erstellt, durch die eine Merkmalsabhängigkeit mit dem χ^2 -Test ermittelt wurde. Hierbei konnte ein signifikanter Zusammenhang ($p=0,02$) der DNA-Konzentrationen im Plasma von Prostatakarzinom-Patienten und BPH-Patienten mit denen von gesunden Probanden festgestellt werden.

Tabelle VIII: DNA-Konzentrationen und klinische Daten von Prostatakarzinom-Patienten

Patient	klinische Parameter			freie zirkulierende DNA ng/ml
	Klin. Stadium	Gleason-Faktor	t-PSA (ng/ml)	
1	T1c	2+3	5,16	1987
2	T1c	3+2	7,85	3420
3	T1c	3+2	4,24	929,63
4	T1c	3+2	0,69	46
5	T1c	3+2	17,33	116,48
6	T1c	3+2	5,12	550
7	T1c	3+2	6,08	112
8	T1c	3+3	2,05	1877
9	T1c	3+3	4,41	2357
10	T1c	3+3	1,13	61
11	T1c	3+3	13,62	1093,3
12	T1c	3+3	5,93	1120
13	B1	3+3	4,75	1287
14	T1c	3+3	7,3	1136
15	T1c	3+3	5,26	16279
16	T1c	3+3	4,15	1000
17	T1c	3+3	4,59	1353,7
18	T1c	3+3	5,22	40
19	T1c	3+3	5,1	5417
20	T1c	3+3	3,36	620
21	T1c	3+3	4,28	127
22	T1c	3+3	8,87	1157,4
23	T1c	3+3	7,17	993,1
24	T1c	3+3	11,79	1663
25	T1c	3+3	7,74	1926
26	T1c	3+4	20,34	343,43
27	T1c	3+4	0,19	235
28	T1c	3+4	4,1	113
29	T1c	3+4	0	779
30	T1c	3+4	3,2	2347,8
31	B1	3+4	3,58	200
32	T1c	3+4	3,88	704
33	B1	3+4	2,65	84
34	T1c	3+4	5,43	2041
35	T1c	3+4	4,32	3753
36	T1c	3+4	17,26	1120
37	T1c	3+4	6,49	1667
38	T1c	3+4	5,15	6571
39	T1c	3+4	4,77	1981,63
40	T1c	3+4	5,46	11
41	T1c	3+4	5,59	1385,4
42	T1c	4+3	0,43	2333
43	B1	4+3	10,09	339
44	T1c	4+3	3,36	40
45	B2	4+3	34,32	265,2
46	T1c	5+4	8,2	771,4
47	T1c	n.a.	7,36	1333
48	B1	n.a.	5,41	1764
49	ossär met.	n.a.	1000,9	57
50	T1c	n.a.	4,77	1144,4
51	C	n.a.	22,46	1612,5
52	T1c	n.a.	9,96	2080
53	T1c	n.a.	0,52	1686
54	T1c	n.a.	111,88	2475
55	T1c	n.a.	0,62	1533
56	T1c	n.a.	4,04	1778
57	T1c	n.a.	10,54	6875
58	T1c	n.a.	11,13	4184
59	T1c	n.a.	8,46	890,5
60	n.a.	n.a.	3,19	735
61	T1c	n.a.	14,99	654,3
62	T1c	n.a.	0,83	187,2
63	B1	n.a.	4,7	863,6
64	n.a.	n.a.	0,83	187,2

Tabelle IX: DNA-Konzentration im Plasma von BPH-Patienten

Patient	freie zirkulierende DNA in ng/ml
1	236,6
2	425
3	275
4	300
5	1320
6	1100
7	875
8	950
9	1200
10	1050
11	1625
12	1343
13	1600
14	1450
15	1767
16	2225

Tabelle X: DNA-Konzentration im Plasma von gesunden Probanden

Proband	freie zirkulierende DNA in ng/ml
1	6,7
2	11,1
3	71,4
4	15,6
5	31,1
6	35
7	45,7
8	88
9	1210

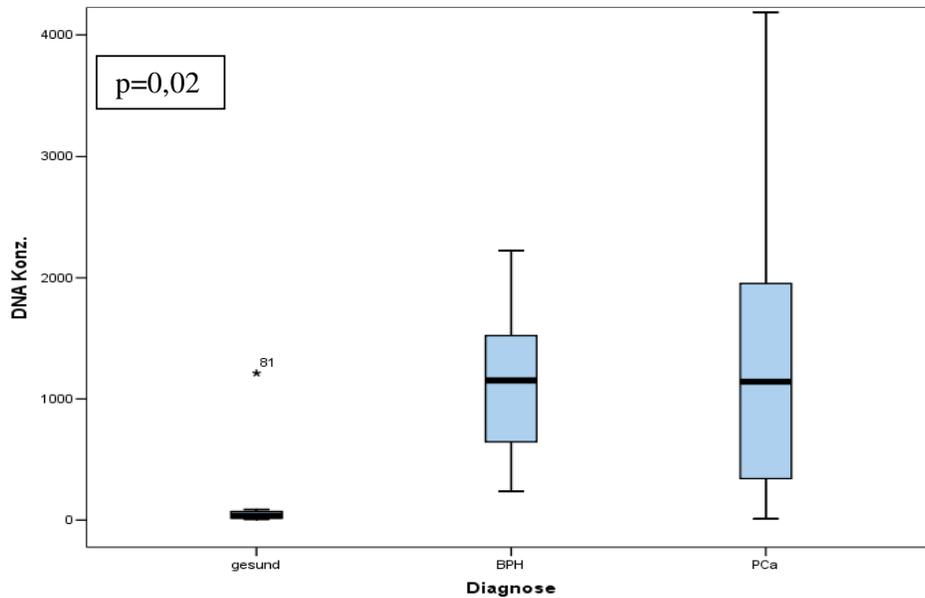


Abb. 11: Vergleich der DNA-Konzentrationen [ng/ml] im Plasma von Prostatakarzinom-Patienten, BPH-Patienten und gesunden Probanden

5.2. Vergleich verschiedener Methoden zur Extraktion freier zirkulierender DNA

Um für die molekulargenetische Analyse DNA von höchstmöglicher Qualität und Quantität aus dem Blut zu extrahieren, wurden neben dem DNA-Extraktionskit von Qiagen zwei weitere Extraktionsmethoden getestet. Plasma-DNA wurde mit einem Extraktions-Kit von Promega und der klassischen Methode durch die Phenol/Chloroform-Extraktion isoliert. Die Plasma-Proben von 10 Prostatakarzinom-Patienten wurden so aufgeteilt, dass jeweils ein Aliquot für jede Isolationsmethode verwendet werden konnte. Um die verschiedenen Methoden zu vergleichen, wurde anschließend die Qualität und Quantität der DNA bestimmt. Abbildung 12 stellt die gemessenen DNA-Konzentrationen als Balkendiagramm dar. Bei den Proben 4, 5 und 6 wurde die DNA nur durch das Qiagen-Kit und die Phenol/Chloroform-Methode isoliert. Bei Plasma-Probe 10 erfolgte die DNA-Extraktion nur durch die Phenol/Chloroform-Methode.

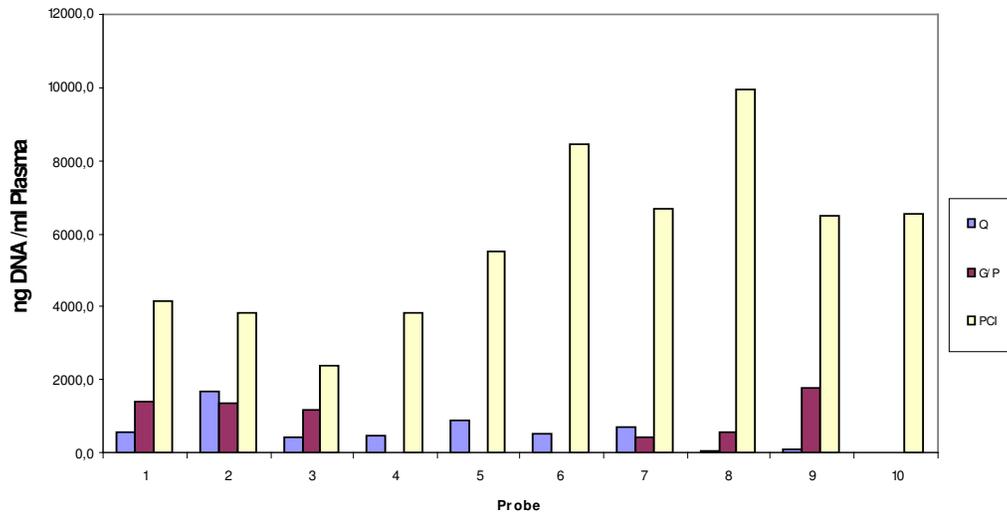


Abb. 12: Vergleich der DNA-Konzentrationen im Plasma von 10 Patienten mit einem Prostatakarzinom. Die DNA-Extraktion wurde mit 3 verschiedenen Techniken durchgeführt: Qiagen (Q), Promega (G/P), Phenol/Chlorophorm (PCI)-Extraktion

Wie in Abb. 12 gezeigt, konnte die höchste Menge an DNA aus dem Plasma durch die Phenol/Chloroform-Methode isoliert werden. Die gemessenen Konzentrationen der DNA, die durch die beiden Kits von Qiagen und Promega extrahiert wurden, waren ähnlich. Bei Probe 1, 3, 8 und 9 war die DNA-Konzentration der DNA, die mit den Promega-Säulen extrahiert wurde, etwas höher als diejenige, die mit der Qiagen-Methode isoliert wurde. Umgekehrt war bei den Proben 2 und 7 die Ausbeute mit der Qiagen-Methode etwas höher.

Quotient 260/280

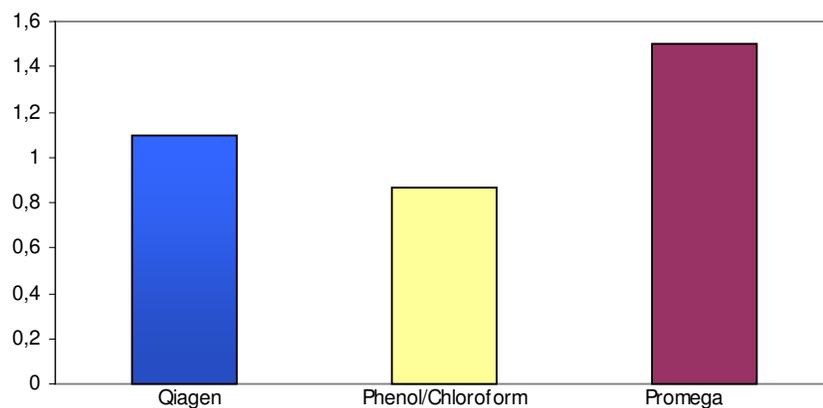


Abb. 13: Vergleich der Qualität der freien zirkulierenden DNA, die durch drei verschiedenen Techniken extrahiert wurde. Die DNA wurde mit den Qiagen-Säulen (blaue Säule), Phenol/Chlorophorm (beige Säule), und dem Promega-Kit (lila Säule) extrahiert und anschließend bei einem Wellenlängen-Quotient von 260/280 nm die Qualität der DNA bestimmt.

Eine Qualitätsbestimmung von 1,8–2 weist auf eine hohe Reinheit der DNA und unter 1,8 auf die Verunreinigung mit Proteinen hin. Der Reinheitsgrad der freien zirkulierenden DNA, die durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion isoliert wurde, liegt im Schnitt unter 1, was auf eine starke Verunreinigung der DNA schließen lässt. Dies wäre auch eine Erklärung für die äußerst hohen DNA-Konzentrationen, die durch dieses Verfahren isoliert wurden. Wahrscheinlich war die eigentliche DNA-Konzentration viel niedriger, denn auch andere Moleküle können Licht in einer Wellenlänge von 260 nm absorbieren und somit für einen scheinbar hohen DNA-Konzentrationswert verantwortlich sein. Erfahrungen mit der Reinheitsbestimmung der freien zirkulierenden DNA zeigen aber, dass Präparationen in der Regel nicht über ein Wellenlängen-Verhältnis von 1,5 hinausgehen. Die Plasma-DNA, die durch Promega-Säulen extrahiert wurde, zeigt mit einem Durchschnittswert von 1,5 die beste Qualität (Abb. 13). Die Qualität der Plasma-DNA, die durch Qiagen-Säulen extrahiert wurde, liegt zwischen der Qualität der Plasma-DNA, die durch die Phenol/Chlorophorm-Methode und mit dem Kit von Promega extrahiert wurde. Da aber bereits vor Beginn meiner Arbeit im Institut stets die DNA-Isolation mit Kits von Qiagen durchgeführt wurde, blieb ich bei dieser Methode. Auf diesem Wege konnten nach Abschluss meiner Arbeit alle Ergebnisse besser mit den bereits gewonnenen Daten aus den vorhergegangenen Arbeiten verglichen und in einer großen Gesamtstatistik ausgewertet werden.

5.3. Evaluation der durch die PCR-basierten Mikrosatelliten-Analysen ermittelten

Daten

Die mit dem Qiagen und Promega-Kit extrahierte freie zirkulierende DNA wurde durch PCR mit fluoreszenzmarkierten Primern amplifiziert und durch Kapillar-Gelelektrophorese am „Genetic Analyzer“ analysiert. Die ermittelten Daten wurden mit der Software des Gerätes ausgewertet und als Diagramm dargestellt. Das Vorliegen von einem LOH konnte mit der Division der im Diagramm dargestellten Peaks berechnet werden und erfolgte entsprechend den Angaben des Handbuchs zur Fragmentanalyse nach folgender Formel:

$$\text{LOH} = \frac{\frac{\text{(Höhe rechter Peak L)}}{\text{(Höhe linker Peak L)}}}{\frac{\text{(Höhe linker Peak R)}}{\text{(Höhe rechter Peak R)}}} \Rightarrow 1,6 \text{ oder } <0,6$$

Ein LOH wird dann angenommen, wenn der Quotient $>1,6$ oder $<0,6$ ist. Dies entspricht einer Differenz von mindestens 40% zwischen den beiden Peakhöhen und folglich einen 40%igen Allelverlust. Ergab die Analyse ein LOH, wurde die PCR wiederholt, um ein falsch positives Ereignis auszuschließen.

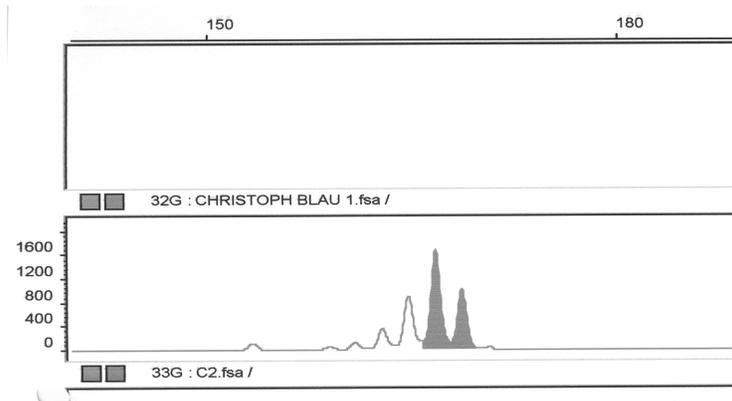
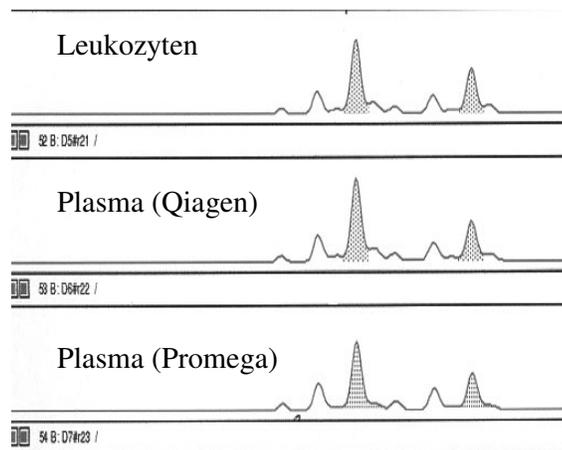


Abb.: 14: Darstellung von zwei Peaks, die den beiden Allelen der hier amplifizierten Leukozyten DNA entsprechen. Das obere Diagramm zeigt die negative H₂O-Kontrolle. Das untere Diagramm das PCR-Produkt der Leukozyten-DNA.

Abb. 15: PCR-Produkt (164-182 bp) mit dem fluoreszenzmarkierten Primer

D11S898 *FAM (blau)

Die DNA aus dem Plasma von einem gesunden Probanden wurde durch das Qiagen und das Promega-Kit isoliert. In beiden Fällen bestätigten sich die Ereignisse, dass die freie zirkulierende DNA heterozygot ist.



Auf der Abszisse ist die Länge der Fragmente in Basenpaaren aufgetragen. Die Ordinate gibt Auskunft über die von der CCD-Kamera registrierten Intensität der Fluoreszenz, dargestellt als Peaks, die der Menge des PCR-Produkts entsprechen. Das obere Diagramm in Abbildung 14 zeigt eine Wasserkontrolle, in der, aufgrund fehlender Template-DNA, kein PCR-Produkt zu sehen ist. Im unteren Diagramm der Abbildung 14 sind zwei Peaks, die den Allelen der Referenzprobe (Leukozyten) entsprechen, dargestellt. Die Abbildung 15

zeigt neben den Peaks der Leukozyten-DNA (oberes Diagramm) die Gegenüberstellung der PCR-Produkte der Plasma-DNA, die mit dem Qiagen und Promega-Kit isoliert wurde (untere Diagramme) und deren Profil der Peaks einander ähnlich sind.

Insgesamt 88 Plasma-Proben mit den dazugehörigen Leukozyten-Proben wurden mit 10 verschiedenen Primerpaaren in einer PCR-basierten Mikrosatelliten-Analyse amplifiziert und ausgewertet. Von 25 der 64 Patienten mit einem histologisch gesicherten Prostatakarzinom stand außerdem DNA aus Tumorgewebe zur Analyse zur Verfügung. Ein Vergleich der Ergebnisse der freien zirkulierenden DNA mit denjenigen der Tumor-DNA sollte Aufschluss darüber geben, ob sich die im Tumor gefundenen AIs auch in der freien zirkulierenden DNA im Plasma entdecken lassen. Die Resultate der Auswertungen der PCR-Produkte durch die Gene Scan Software wurden tabellarisch zusammengefasst (Tabelle XV). Die Amplifikation der DNA der 64 Plasma-Proben mit 10 verschiedenen Primer-Sets lieferte 412 informative Ergebnisse. Die Amplifikation der DNA von 25 Tumorgewebsproben mit denselben Primer-Sets lieferte 138 informative Ergebnisse. Um die Frage zu beantworten, inwieweit AI tumorspezifisch ist, wurden zum Vergleich Plasmaproben von 16 BPH-Patienten und 8 gesunden Probanden als Kontrollgruppen analysiert. Hierbei konnten bei den BPH-Patienten 116 und bei dem gesunden Kollektiv 41 Ereignisse als informativ gewertet werden (Tabelle XVI). Im weiteren Verlauf des Ergebnisteils werden zuerst die analysierten PCR-Produkte der Plasma- und Tumor-DNA von Prostatakarzinom-Patienten besprochen. Dann werden diese Daten mit denjenigen der BPH-Patienten und den gesunden Probanden verglichen.

5.4. PCR-Analyse der freien zirkulierenden DNA im Blut von Prostatakarzinom-Patienten

412 informative Ergebnisse wurden aufgrund der Analysen der Plasma-DNA-Proben von 64 Prostatakarzinom-Patienten mit 10 verschiedenen Mikrosatelliten-Primern erhalten. In 20 von 412 Fällen (5%) konnte ein LOH entdeckt werden. Die 20 Allelverluste wurden im Blut von 15 (23%) Prostatakarzinom-Patienten entdeckt. Bei 5 (8%) Patienten wurden 2 LOH und bei 10 (17%) 1 LOH an einem der Mikrosatelliten-Marker entdeckt. Die Tabelle XI fasst die Ergebnisse im Plasma zusammen. Die Tabelle XII und das Säulendiagramm in Abbildung 16 stellen die Verteilung der detektierten Allelverluste bezogen auf die Mikrosatelliten-Marker dar. Am Marker D6S1631 konnten die meisten LOH detektiert werden.

Tabelle XI: Korrelation der LOH-Ergebnisse im Plasma von Prostatakarzinom-Patienten mit den klinischen Daten der Prostatakarzinom-Patienten

PAT.NR.	D6S474	D6S1631	D7S522	D8S37	D8S286	D8S360	D8S1748	D10S1765	D11S898	D11S1313	Gesamt PSA bei PE	Gesamt Vd.	Gleason
1	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	20,34	32	3+4
2	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	3,36	93	4+3
3	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	17,33	77	3+2
4	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	0,19	25	3+4
5	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	4,1	38	3+4
6	+	LOH	+	+	-	-	+	-	+	LOH	0	51	3+4
7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	2,05	40	3+3
8	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	1,88	89	3+3
9	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	3,53	41	3+4
10	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	3,88	43,5	3+4
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,13	69	3+3
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,65	21	3+4
13	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	0,69	20	3+2
14	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	5,43	63,9	3+4
15	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	4,32	47	3+4
16	+	+	+	-	+	-	LOH	+	+	-	5,22	na	3+3
17	+	-	+	LOH	+	+	+	+	-	-	7,17	47	3+3
18	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	4,77	49	na
19	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	6,08	42	3+2
20	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	17,26	47	3+4
21	+	-	LOH	+	+	+	+	LOH	-	+	4,75	44	3+3
22	-	+	+	+	LOH	+	LOH	+	-	+	7,3	39	3+3
23	-	LOH	-	+	+	-	+	+	-	-	4,77	39	3+4
24	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	4,24	24	3+2
25	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	5,26	67	3+3
26	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	7,85	44	3+2
27	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	11,13	120	na
28	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	8,46	63	na
29	+	+	LOH	+	+	+	-	-	+	+	10,09	90	4+3
30	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	4,75	47	3+4
31	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	3,19	56	na
32	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	14,99	27	na
33	+	LOH	+	-	+	+	+	-	+	+	5,12	59	3+2
34	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	4,59	30	3+3
35	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	0,83	na	na
36	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	5,1	52	3+3
37	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	4,7	33	na
38	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	3,36	57	3+3
39	+	+	-	+	LOH	-	-	+	-	-	8,2	na	5+4
40	-	LOH	+	-	+	-	-	+	LOH	+	7,36	31	na
41	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	5,41	35	na
42	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	1000,9	na	na
43	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	5,46	38	3+4
44	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	4,28	43	3+3
45	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	8,87	41	3+3
46	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	5,59	91	3+4
47	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	11,79	60	3+4
48	-	+	LOH	+	-	-	-	+	+	-	7,74	69	3+3
49	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	34,32	64	na
50	-	LOH	+	+	+	+	+	LOH	-	+	4,15	na	3+3
51	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	3,2	36	3+4
52	-	+	-	-	LOH	+	+	+	-	+	22,46	30	na
53	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	9,96	30	na
54	-	+	-	+	+	+	+	-	-	LOH	5,16	27	2+3
55	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	13,62	29	3+3
56	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	0,43	55	4+3
57	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	5,93	70	3+3
58	-	+	-	+	+	-	-	+	LOH	+	0,52	17	na
59	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	111,88	45	na
60	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	0,62	na	na
61	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	6,49	56	3+4
62	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	4,04	45	na
63	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	10,54	37	na
64	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	5,15	53	3+4

Tabelle XII: Vergleich der Anzahl der detektierten LOH im Plasma von Prostatakarzinom-Patienten mit den verschiedenen Mikrosatelliten-Markern

Marker	LOH	informative Fälle	LOH in %
D6S474	0	38	0%
D6S1631	5	38	13%
D7S522	3	37	8%
D8S87	1	39	3%
D8S286	3	45	7%
D8S360	0	33	0%
D9S1748	2	47	4%
D10S1765	2	48	4%
D11S898	2	43	5%
D11S1313	2	44	5%
Gesamt	20	412	5%

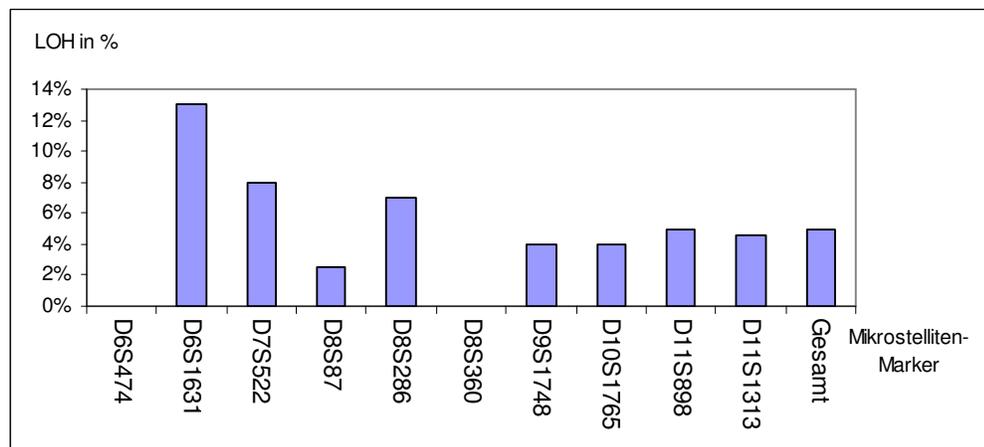


Abb. 16: Vergleich der LOH Frequenzen an den verschiedenen Mikrosatelliten-Markern im Plasma. Die LOH-Frequenz des jeweiligen Markers wurde aus der Division der Anzahl LOH durch die Anzahl der informativen Fälle ermittelt.

Abb. 17: PCR-Produkt (140-156 bp) amplifiziert mit dem fluoreszenzmarkierten Primer **D11S898*FAM (blau)**

Die amplifizierte Leukozyten und Plasma DNA eines Patienten wurde am „Genetic Analyzer“ aufgetrennt und mit der GeneScan Software ausgewertet. Das obere Diagramm zeigt zwei komplette Peaks der amplifizierten Leukozyten-DNA und das untere Diagramm zwei Peaks mit einem DNA-Verlust (LOH) im Plasma.

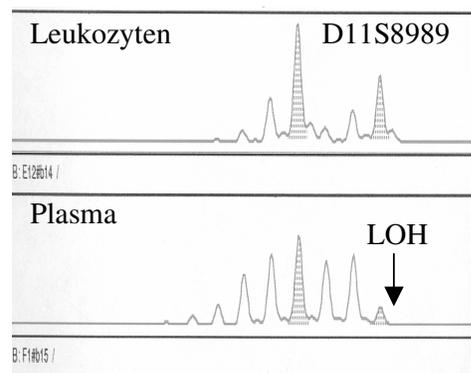
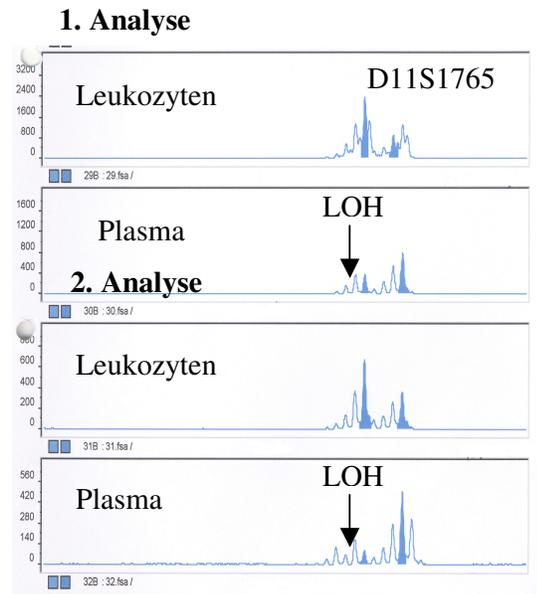


Abb. 18: PCR-Produkt (166-184 bp) amplifiziert mit dem fluoreszenzmarkierten Primer **D10S1765*FAM (blau)**. Das LOH der amplifizierten Plasma-DNA eines Patienten in der 1. Analyse konnte durch eine Wiederholung (2. Analyse) bestätigt werden. Die Diagramme der beiden Analysen entsprechen einander.



5.5. PCR-Analyse der Tumor-DNA von Prostatakarzinom-Patienten

Tumorgewebe stand bei 25 der 64 Patienten mit einem histologisch gesicherten Prostatakarzinom zur Verfügung. Insgesamt lieferte die Amplifikation der DNA aus dem Tumorgewebe mit 10 verschiedenen Primern 138 informative Ergebnisse. Bei 15 (11%) der 138 detektierten Ereignisse lag ein LOH und in 8 Fällen (6%) ein MSI vor. Bei 5 von 25 (20%) Patienten, konnte jeweils ein LOH detektiert werden. Bei 3 Patienten (12%) wurden 2 LOH detektiert und bei einem Patienten konnten sogar 4 LOH detektiert werden. Folgende Tabelle XIII stellt die Verteilung der detektierten Alterationen bezogen auf die einzelnen Mikrosatelliten Marker dar. Die meisten Alterationen im Tumor konnten durch den Mikrosatelliten-Primer D11S1313 detektiert werden. Hier kamen auf 17 informative Fälle 4 LOH (24%) und 3 MSI (18%). Der Marker D8S87 zeigte mit 2 LOH auf 11 informative Fälle (18%) die zweithöchste Frequenz an LOH und zusammen mit dem Mikrosatelliten-Marker D11S1313 mit 2 MSI auf 11 informative Fälle (18%) die höchste Frequenz an MSI, die durch einen Marker detektiert werden konnte. Tabelle XIV gibt einen genauen Überblick über die im Tumor detektierten Alterationen in Bezug auf die Gesamtmenge der informativen Fälle. In Abbildung 19 wurde durch ein Säulendiagramm der prozentuale Anteil der detektierten LOH bezogen auf die Gesamtanzahl der informativen Fälle dargestellt.

Tabelle XIII: Gesamtheit der gewonnenen Ergebnisse aus den Analysen der aus dem Tumorgewebe isolierten DNA

PAT.NR.	D6S474	D6S1631	D7S522	D8S87	D8S286	D8S360	D9S1748	D10S1765	D11S898	D11S1313	Gesamt-PSA	GesV	Gleason
1	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	20,34	32	3+4
2	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	3,36	93	4+3
3	+	+	-	+	-	+	MSI	+	+	+	17,33	77	3+2
4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0,19	25	3+4
5	+	-	+	LOH	-	+	+	+	+	-	4,1	38	3+4
6	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	0	51	3+4
7	+	+	-	-	-	+	+	-	+	MSI	2,05	40	3+3
8	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	1,88	89	3+3
9	+	-	+	+	LOH	+	-	+	-	LOH	3,58	41	3+4
10	+	-	+	LOH	-	-	+	+	+	+	3,88	43,5	3+4
11	-	+	+	-	+	+	+	+	+	LOH	1,13	69	3+3
12	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	2,65	21	3+4
13	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	0,69	20	3+2
14	-	+	-	MSI	-	-	-	-	-	+	5,43	63,9	3+4
15	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	4,32	47	3+4
16	-	+	-	-	+	-	-	+	LOH	-	5,22	n.a.	3+3
17	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	7,17	47	3+3
18	-	LOH	-	-	-	-	-	-	-	LOH	4,77	49	n.a.
19	+	LOH	-	-	LOH	+	-	LOH	LOH	-	6,08	42	3+2
20	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	17,26	47	3+4
21	-	+	-	+	-	+	+	+	MSI	+	7,85	44	3+2
22	-	MSI	LOH	-	-	+	LOH	-	-	MSI	5,12	59	3+2
23	-	-	+	-	+	-	+	+	+	LOH	4,59	30	3+3
24	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	3,36	57	3+3
25	-	+	+	MSI	-	-	-	+	+	-	7,74	69	3+3

Tabelle XIV: Zusammenfassung der detektierten AI-Frequenzen an den verschiedenen Mikrosatelliten-Markern im Tumorgewebe

Primer	Anzahl informativer	Anzahl der	LOH in %	Anzahl informativer	Anzahl der	MSI in %
D6S474	11	0	-	11	0	-
D6S1631	15	2	13%	15	1	7%
D7S522	11	1	9%	11	0	-
D8S87	11	2	18%	11	2	18%
D8S286	12	2	16%	12	0	-
D8S360	13	0	-	13	0	-
D9S1748	16	1	6%	16	1	6%
D10S1765	17	1	6%	17	0	-
D11S898	15	2	13%	15	1	7%
D11S1313	17	4	24%	17	3	18%
gesamt	138	15	11%	138	8	6%

Abb. 19: Vergleich der LOH-Frequenzen an den verschiedenen Mikrosatelliten-Markern im Tumorgewebe.

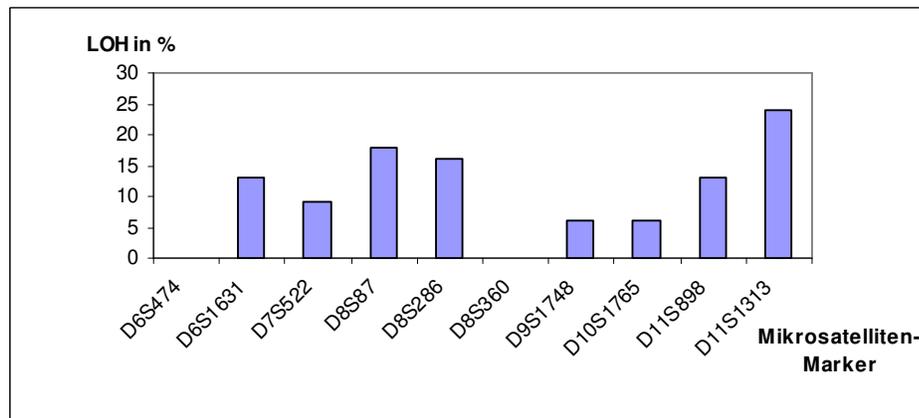
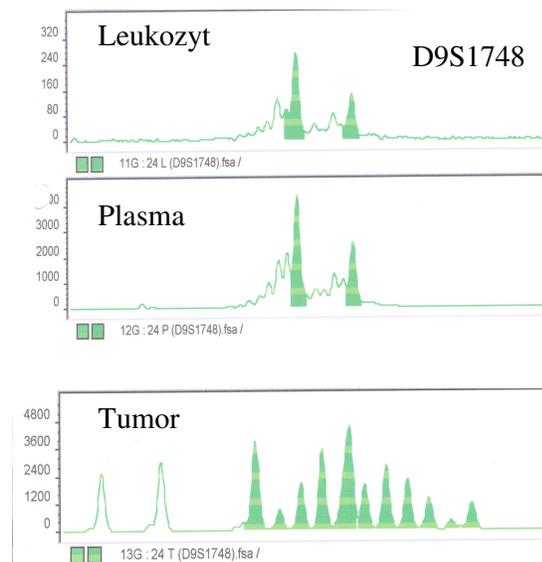


Abb. 20: PCR-Produkt (95bp), amplifiziert mit dem fluoreszenzmarkierten Primer **D9S1748*HEX (grün)**. Die PCR-Produkte der Leukozyten-, Plasma- und Tumor-DNA eines Patienten wurden durch Kapillarelektrophorese aufgetrennt und mit der Gene Scan Software ausgewertet. Das untere Diagramm stellt ein MSI der Tumor-DNA dar, belegt durch das Vorkommen von zusätzlichen Peaks.



5.6. Vergleich der Daten der Tumor-DNA mit denen der Plasma-DNA

In den vorhandenen Tumorgeweben waren 11% der informativen Ergebnisse LOH und 6% der Fälle MSI. Im Vergleich hierzu konnte durch die Analyse der freien zirkulierenden DNA im Blut der Patienten in nur 5% der informativen Ereignisse ein LOH detektiert werden. In keinem der informativen Fälle des Plasmas wurde ein MSI detektiert. Keine Übereinstimmung konnte zwischen den detektierten Alterationen im Primärtumor und denen der freien zirkulierenden DNA aus dem Plasma festgestellt werden. An den Mikrosatelliten-Markern D6S474 und D8S360 wurden weder in der freien zirkulierenden DNA des Plasmas noch im Tumor ein LOH detektiert. Am Marker D6S1631 konnten, bezogen auf die Gesamtanzahl der informativen Ergebnisse, im Plasma genau so viele

Alterationen wie im Tumor detektiert werden. An allen anderen Mikrosatelliten-Markern war die Frequenz der detektierten genetischen Alterationen im Tumor immer höher. Der Vergleich der Frequenzen im Blut und Primärtumor wurde in Abb. 21 durch ein Balkendiagramm dargestellt.

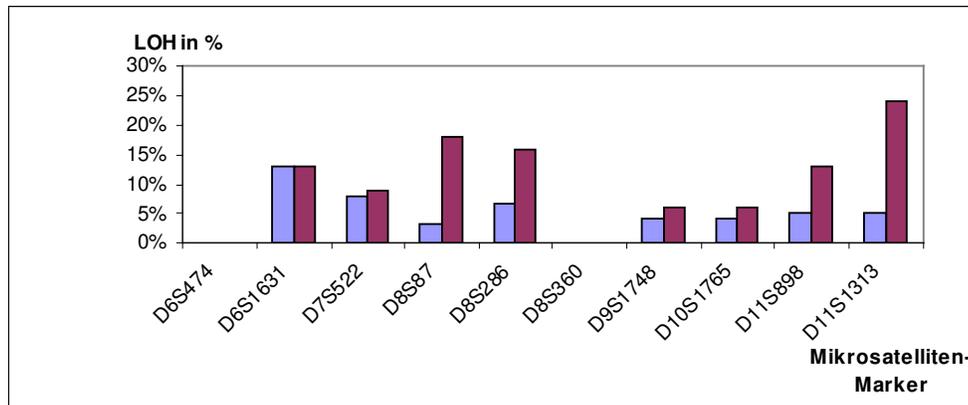


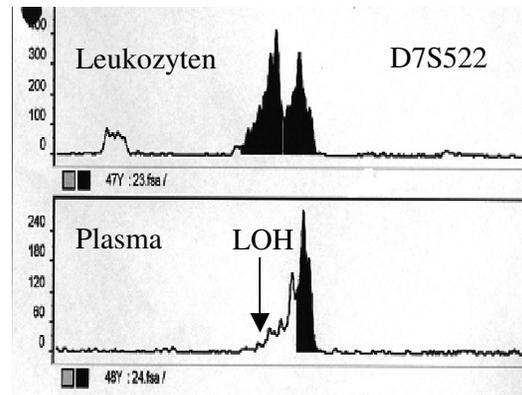
Abb. 21: Vergleich der detektierten LOH-Frequenzen in % im Plasma (blau) und Tumor (rot)

5.7. Auswertung der PCR-Produkte der freien zirkulierenden DNA von BPH-

Patienten

Um zu überprüfen, ob das Auftreten von AI in der freien zirkulierenden DNA ein charakteristisches Merkmal für das Vorhandensein einer bösartigen Erkrankung ist, wurde zum Vergleich auch das Blut von BPH-Patienten durch dieselbe molekulargenetische Analyse auf AI untersucht. Hierbei konnten durch die Untersuchungen der freien zirkulierenden DNA von 16 BPH-Patienten insgesamt 116 informative Ergebnisse ermittelt werden. An den Mikrosatelliten-Markern D6S474 und D7S522 wurde jeweils ein LOH detektiert.

Abb. 22: PCR-Produkt (217-229 bp), amplifiziert mit dem fluoreszenzmarkierten Primer **D7S522*TAM (gelb)**. Die PCR-Produkte der Leukozyten- und Plasma-DNA des BPH-Patienten wurde durch Kapillarelektrophorese aufgetrennt und mit der Gene Scan Software ausgewertet. Insgesamt konnten in diesem Kollektiv zwei LOH detektiert werden. Eines davon ist in dieser Abbildung dargestellt.



5.8. PCR-Analyse freier zirkulierender DNA von gesunden Probanden

Das Kollektiv der Plasmaproben von gesunden Probanden umfasste 9 Männer mit einem durchschnittlichen Alter von 34 Jahren, wobei für einen Probanden die zur DNA-Analyse notwendige Leukozyten-DNA nicht zur Verfügung stand. Wie bereits im Kapitel 4.1. beschrieben, lagen bis auf einen Wert die DNA-Konzentrationen des Plasmas in einem sehr niedrigen Bereich. Deshalb musste zur Durchführung der PCR ein großes Elutionsvolumen eingesetzt werden, um ein analysierbares Amplifikationsprodukt zu synthetisieren. Die PCR der freien zirkulierenden DNA mit 10 verschiedenen Primern ergab 41 informative Ereignisse. Hierbei wurde kein LOH detektiert.

5.9. Korrelationen der LOH-Frequenz an den jeweiligen Mikrosatelliten-Markern mit den klinischen Daten der Prostatakarzinom-Patienten

Bei 46 der 64 Patienten mit einem Prostatakarzinom wurde postoperativ der Gleason-Score erhoben. Diese Werte reichten von 5 bis 9 (Wertebereich von 2 bis 10 möglich). 21 Patienten (46%) hatten einen Gleason-Score von 7, 17 Patienten (37%) einen Score von 6, 7 Patienten (15%) einen Score von 5 und ein Patient einen Score von 9. Insgesamt lagen die im Serum bestimmten PSA-Werte in einem Bereich von 0 bis 1000,9 ng/ml. 47 Patienten (73%) hatten einen totalen PSA-Wert von über 4 ng/ml, was in der Diagnostik als allgemeiner Cut-off-Wert betrachtet wird (s. Kap. 2.2.6.). 13 Patienten (20%) hatten einen PSA-Wert von über 10 ng/ml. Der Quotient des freien (ungebundenen) PSA (f-PSA) zum Gesamt-PSA sollte bei Patienten mit einem Prostatakarzinom erniedrigt (<15%) sein.

31 der 64 Patienten (48%) hatten einen Quotienten vom freien zum gebundenen PSA von <15%.

Das Tumolvolumen konnte bei 58 Patienten bestimmt werden. 22 dieser Patienten (38%) hatten ein Tumolvolumen von mehr als 50 cm³, welches im Verhältnis zur Prostata-Normalgröße von ca. 20 cm³ deutlich vergrößert ist (Tabelle XVI).

Mit Hilfe der Software SPSS wurde die im Plasma entdeckte LOH-Frequenz an dem jeweiligen Marker mit den klinischen Parametern statistisch verglichen. Für diese Statistik wurden Kreuztabellen erstellt und die Merkmalsabhängigkeit mit dem χ^2 -Test ermittelt. Die Korrelation der gemessenen t-PSA-Werte mit den entdeckten LOH-Frequenzen im Plasma ergab für keinen Marker eine Abhängigkeit auf einem Niveau von 5%.

Die t-PSA-Werte der Patienten mit mindestens einem LOH oder MSI lagen sowohl in einem stark erhöhten Bereich von über 10 ng/ml als auch in niedrigen Bereichen.

Die Mehrzahl der Patienten ohne LOH hatten t-PSA-Werte von unter 10 ng/ml. Auch der Gleason-Score konnte nicht mit dem Auftreten von LOH im Plasma signifikant korreliert werden, da im Patientenkollektiv, wie oben beschrieben, der Gleason Score bei den meisten Patienten 3+3 oder 3+4 war. Des Weiteren konnte zwischen dem Prostatavolumen und den detektierten Alterationen im Plasma keine signifikante Korrelation nachgewiesen werden. Eine Prostata drüse kann auch durch einen benignen Prozess hyperplasieren. Insofern muss das Auftreten von LOH im Plasma nicht mit dem Volumen der Drüse zusammenhängen. In der Tabelle XI sind die LOH-Ergebnisse zusammen mit den klinischen Daten des Kollektivs der Prostatakarzinom-Patienten aufgelistet. Aufgrund der geringen Anzahl der Tumorgewebsproben wurde auf die statistische Auswertung zwischen den klinischen Parametern der Patienten und den im Tumor detektierten Alterationen verzichtet.

5.10. Zusammenfassung der LOH-Frequenzen im Blut von Prostatakarzinom-, BPH-Patienten und gesunden Probanden und der LOH-Frequenz im Tumorgewebe

Von 64 Patienten mit einem gesicherten Prostatakarzinom waren bei 25 Patienten Tumorgewebe vorhanden. Zusätzlich wurden von 16 BPH-Patienten und 8 gesunden Probanden die Plasma-DNA auf AI untersucht. Die folgenden Tabellen geben einen Überblick über die detektierten Alterationen in der freien zirkulierenden DNA von Prostatakarzinom-Patienten, BPH-Patienten, gesunden Probanden und der aus dem Tumorgewebe isolierten DNA.

Tabelle XV: Anzahl der detektierten AI in der Tumor- und Plasma-DNA von Prostatakarzinom-Patienten bezogen auf alle informativen Analysen

Material	informative Ergebnisse gesamt	AI	AI in %	LOH	LOH in %	MSI	MSI in %
DNA aus Tumor	138	23	17%	15	11	8	6
DNA aus Plasma	412	20	5%	20	5	0	0

Die Tabelle XV zeigt, dass genetische Alterationen (LOH+MSI) mit einer Frequenz von 17% am häufigsten im Tumorgewebe detektiert wurden. MSI konnte ausschließlich in der DNA des Tumorgewebes entdeckt werden. BPH-Patienten hatten mit einer Frequenz von 2 LOH auf 116 informative Ergebnisse (2%) markant seltener LOH im Blut als Prostatakarzinom-Patienten mit einer Frequenz von 20 AI auf 412 informative Ergebnisse (5%). In der Analyse der DNA von gesunden Probanden konnte kein LOH gefunden werden, was auf die Spezifität dieser Analyse im Hinblick auf die Unterscheidung zwischen krank und gesund, bzw. auf ein vermehrtes Zellwachstum im Gewebe hinweist (Tabelle XVI).

Tabelle XVI: Vergleich der Häufigkeit von detektierten LOH im Plasma von Prostatakarzinom-Patienten, BPH-Patienten und gesunden Probanden

Patienten	informative Ergebnisse gesamt	heterozygote Allele	LOH	LOH in %	Patienten mit ≥ 1 LOH
Prostatakarzinom-Patienten	412	392	20	5	5
BPH-Patienten	116	114	2	2	0
gesunde Probanden	41	41	0	0	0

6. Diskussion

6.1. Charakterisierung der zirkulierenden zellfreien DNA im Blut für die Diagnostik des Prostatakarzinoms

Das Ziel meiner Doktorarbeit war es, das pathologische Auftreten von zellfreier DNA und AI in dieser zirkulierenden DNA im peripheren Blut von Prostatakarzinom-Patienten zu analysieren. Zum Vergleich wurde außerdem die freie zirkulierende DNA zweier Kontrollgruppen, die BPH-Patienten und gesunde Probanden einschließen, auf genetische Alterationen untersucht. Die Ergebnisse wurden anschließend mit den klinischen Parametern der Patienten verglichen. Um Informationen über die Herkunft der freien zirkulierenden DNA im Plasma zu erhalten, wurden vergleichende Analysen über das Auftreten von AI im Primärtumor derselben Patienten durchgeführt. Auf diese Weise sollte festgestellt werden, ob dieser experimentelle Ansatz zur Erkennung eines Prostatakarzinoms geeignet ist und die Möglichkeit besteht, durch die Charakterisierung der genetischen Alterationen in der freien zirkulierenden Plasma-DNA Informationen über den Tumor zu erhalten.

Die Früherkennung des Prostatakarzinoms erfolgt derzeit durch die Bestimmung der Konzentration des PSA-Wertes (Kap. 2.2.6.) und der digital rektalen Untersuchung. Für ein individuelles Staging, das ein Prostatakarzinom näher charakterisiert, ist die PSA-Bestimmung jedoch zu ungenau [Lerner et al., 1996]. Eine sichere Diagnose kann letztlich nur durch die Biopsie und der anschließenden histologischen Untersuchung erreicht werden. Es wäre wünschenswert, durch die Charakterisierung der genetischen Alterationen im Blut einen neuen Ansatz für die Diagnostik des Prostatakarzinoms zu etablieren. Geht man davon aus, dass sich die erhöhten DNA-Konzentrationen im Blut von Tumor-Patienten durch die aktive oder passive Abgabe der DNA direkt aus den Krebszellen erklären lassen, ließen sich durch die molekulargenetischen Analysen dieser DNA-Moleküle aus dem Plasma Informationen über den Tumor gewinnen. Durch eine einfache Venenpunktion kann Blut durch ein EDTA-Röhrchen asserviert und anschließend die freie zirkulierenden DNA durch ein Extraktions-Kit isoliert werden. Es folgt eine anschließende molekulargenetische Charakterisierung durch die PCR-basierte Mikrosatelliten-Analyse. Dieses Verfahren könnte als eine, für den Patienten schonende, diagnostische Standarduntersuchung etabliert werden.

6.2. Vergleich der DNA-Konzentrationen im Blut von Prostatakarzinom-Patienten mit den Konzentrationen von BPH-Patienten und gesunden Probanden

Nach der Entdeckung zellfreier DNA im Blut im Jahr 1948 [Mandel und Métais, 1948], konnte 30 Jahre später durch einen Radio-Immuno-Assay gezeigt werden, dass die Konzentration der extrazellulären DNA im Blut von Tumorpatienten im Vergleich zu gesunden Individuen deutlich erhöht ist [Leon et al., 1975]. Messungen zellfreier DNA scheinen diagnostisches Potential zum Monitoring von bösartigen Erkrankungen zu haben (Chun et al., 2006). Die Analysen meiner Doktorarbeit zeigen auch erhöhte DNA-Konzentrationen im Blut von Prostatakarzinom-Patienten. Dagegen liegen die DNA-Konzentrationen im Plasma von gesunden Patienten in der Regel nur knapp über der Nachweisgrenze.

Der Vergleich zwischen beiden Kollektiven der Prostatakarzinom- und der BPH-Patienten zeigt, dass Patienten mit bösartigen Tumoren höhere durchschnittliche DNA-Konzentrationen (1675 ng/ml) im Blut haben, als Patienten mit gutartigen Läsionen (1109 ng/ml). Jedoch liegen die gemessenen DNA-Konzentrationen in einem weiten Bereich. Aufgrund dieser Schwankungen kann die Messung der zellfreien DNA nicht als spezifischer Tumormarker eingesetzt werden, aber als zusätzlicher Marker könnte die Bestimmung der DNA-Konzentration auf ein pathologisches Geschehen hinweisen. Die Mechanismen, die zur Freisetzung der DNA führen, sind bis heute noch nicht vollständig geklärt. Effekte von entzündlichen Prozessen im Gewebe könnten als einer der Auslöser für eine Freisetzung der DNA ins Blut in Frage kommen. Hierbei kann es aber auch im Rahmen einer allgemeinen Entzündungsreaktion ohne den Hintergrund einer lokalen Ausbreitung eines Tumors zur Ausschüttung der DNA aus normalem Gewebe kommen [Jahr et al., 2001]. Die alleinige Konzentrationsbestimmung der freien zirkulierenden DNA ist auch als ein diagnostischer Marker nicht aussagefähig genug, weil ein gutartiger entzündlicher Prozess nicht ausgeschlossen werden kann. Jedoch gibt eine Erhöhung der DNA-Konzentration im Blut immer einen Hinweis auf eine Erkrankung. Wenn sich während des Wachstumsprozesses der Tumor weiter ausdehnt, kann es neben den lokalen Abwehrmechanismen auch zu Zelluntergängen durch eine Hypoxie kommen. Hierbei können Tumorzellen, aber auch gesunde Zellen gleichermaßen betroffen sein [Vogelstein et al., 2006]. Also kann auch DNA aus gesunden Zellen während einer Krebserkrankung vermehrt ins Blut abgegeben werden.

6.3. Auswahl der Mikrosatelliten-Marker

Zehn Mikrosatelliten-Marker wurden für den Nachweis von LOH in einem sensitiven Gradienten-PCR-Assay getestet. Die Mikrosatellitenmarker D6S464, D6S1631, D7S522, D8S87, D8S286, D8S360, D9S1748, D10S1765, D11S898, D11S1313 auf den Chromosomen 6, 7, 8, 9, 10 und 11 wurden wegen ihrer Lokalisation in der Nähe von bekannten Tumorsuppressorgenen ausgewählt. Ihre Qualität als diagnostischer Marker wurde durch den Nachweis von LOH getestet, da durch deletierte Gensequenzen Informationen verloren gehen können, deren Produkte die Tumorentstehung hemmen können. So können Analysen über die Detektion von LOH zu einem molekularen Profil des Prostatakarzinoms beitragen.

6.4. Vergleich der Häufigkeit von AI im Plasma von Prostatakarzinom-Patienten mit derjenigen im Primärtumor

Das vorhandene Tumorgewebe zeigte LOH bei 11% und MSI bei 6% der informativen Fälle. Im Vergleich wies die zirkulierende DNA im Blut der Patienten eine Frequenz von nur 5% auf, wobei MSI in keinen der informativen Fälle entdeckt werden konnte. Des Weiteren gab es keine Übereinstimmung im LOH-Profil zwischen dem Primärtumor und den detektierten Alterationen im Blut. Für diese fehlende Konkordanz gibt es mehrere Erklärungen. Die freie zirkulierende DNA stammt nicht ausschließlich vom Primärtumor, sondern auch von gesunden Zellen. Insbesondere gesunde Zellverbände, nahe eines malignen Tumors, können durch Verdrängungs- und Entzündungsprozesse absterben und dabei ihre DNA ins Blut abgeben. Die normale DNA kann dann die genetischen, tumorassoziierten Abberationen der DNA maskieren, was zu einer geringeren Detektionsrate von LOH im Blut führt [Schwarzenbach et al., 2008].

Die Plasma-DNA kann zudem von unterschiedlichen genetisch-heterogenen Bereichen des Primärtumors stammen. Insbesondere einzelne Zellklone des Prostatakarzinoms können sich im Genotyp unterscheiden, sodass auch mikroskopisch betrachtet, Abschnitte des Tumors morphologisch unterschiedlich sind (s. Kap.2.2.7.). Die freie zirkulierende Plasma-DNA konstituiert dann einen Pool aus DNA mit unterschiedlichen genetischen Profilen, die aus diversen Arealen des Primärtumors befreit wurde. Überdies können auch im Blut zirkulierende apoptotische, mikrometastatische Zellen ihre DNA ins Blut entladen. Aufgrund dieser unterschiedlichen Quellen darf die zellfreie Plasma-DNA sich in ihrer genetischen Ausstattung vom Primärtumor unterscheiden. Um ein exaktes genetisches

Profil des Primärtumors zu erhalten, hätte die Genetik aller Areale untersucht werden müssen. Dies ist jedoch sehr mühsam, da das Tumorgewebe, aufgrund seiner Heterogenität, mikrodisssektiert werden muss.

6.5. Vergleich der Häufigkeit von AI im Plasma von Prostatakarzinom-Patienten mit derjenigen im Plasma von BPH-Patienten und gesunden Probanden

Um zu überprüfen, ob genetische Alterationen im Blut ein charakteristisches Merkmal für Patienten mit einer bösartigen Erkrankung sind, wurde auch das Blut von BPH-Patienten und gesunden Probanden auf AI untersucht. Bei dem Kollektiv der BPH-Patienten wurde jeweils ein LOH an den Markern D6S474 und D7S522 detektiert. Bei den gesunden Probanden wurden, wie erwartet, keine genetischen Alterationen entdeckt. Meine Ergebnisse zeigen, dass genetische Alterationen, wenn auch selten, in gutartigen Läsionen vorkommen können [Schwarzenbach et al., 2008]. Der Marker D6S474 kodiert für den Proteinkinase Inhibitor B (PKI B). Dieser hemmt die Proteinkinase B (PKB), die eine Rolle bei der Proliferation und Inhibition der Apoptose spielt. Der Marker D7S522 codiert für das Membranprotein Caveolin 1, ein motilitätshemmendes Membranprotein zur Stabilisierung der Zellen im Zellverband. Da die BPH keine präneoplastische Läsion des Prostatakarzinoms ist, scheinen die LOH dieser beiden Genprodukte allein nicht relevant für die Beurteilung eines malignen Prozesses zu sein. Sie zeigen aber, dass diese Marker auch genetisch instabil in gutartigen Hyperplasien sein können. Wie meine Untersuchungen bestätigen, tritt eine erhöhte Instabilität der DNA auf, wenn eine bösartige Tumorerkrankung vorliegt und diese Instabilität konnte an den anderen 8 Mikrosatelliten-Markern tumorspezifisch dokumentiert werden.

6.6. Vergleich der Ergebnisse mit den klinischen Daten

Nach der molekulargenetischen Analyse der DNA wurden die Ergebnisse mit den klinischen Parametern verglichen. Der t-PSA- und f-PSA-Wert, das Tumolvolumen, Tumorstadium und der präoperative Gleason-Faktor wurden betrachtet. Von den 64 analysierten Patienten hatten alle ein klinisch gesichertes Prostatakarzinom. Der Vergleich der LOH-Frequenz mit dem präoperativen PSA zeigte, dass sowohl in der Patientengruppe (n=17) mit niedrigen (<4 ng/ml) als auch mit stark erhöhten t-PSA-Werten (>10 ng/ml, n=13) LOH im Plasma gefunden wurde. Eine Häufung von LOH wurde in der Patientengruppe (n=34) mit einem PSA im Bereich von 4 bis 10 ng/ml beobachtet. Jedoch gab es in meinem Patientenkollektiv

keine signifikante Korrelation zwischen den gefundenen genetischen Veränderungen im Plasma und den präoperativen t-PSA- und f-PSA-Werten. Eine Assoziation mit den t-PSA-Werten wurde auch nicht erwartet, da ein erhöhter PSA-Wert auch bei benignen Hyperplasien vorliegen kann (s. Kap. 2.3.).

Bei 38% der Patienten lag ein Tumervolumen von mehr als 50 cm³ vor, was im Verhältnis zur Prostata-Normalgröße von ca. 20 cm³ deutlich erhöht ist (s. Tabelle XI). Jedoch konnte ich auch hier keinen Zusammenhang zwischen den genetischen Alterationen im Plasma und dem Tumervolumen erkennen.

Die meisten Patienten meines Kollektivs befanden sich im Anfangsstadium der Krankheit, was erklären könnte, warum eine sehr geringe LOH-Frequenz durch die verschiedenen Mikrosatellitenmarker im Plasma detektiert wurde, da angenommen werden kann, dass genetische Alterationen während der Tumorprogression akkumulieren. Von diesen Patienten hatten 15% der Patienten (n=7) ein T-Stadium von T2a, 2% (n=1) von T2b, 65% (n=30) von T2c, 11% (n=5) von T3a und 7% (n=3) von T3b. Eine signifikante Korrelation zwischen den einzelnen T-Stadien und der Frequenz der detektierten genetischen Alterationen im Plasma konnte nicht festgestellt werden. In Tumoren höherer Stadien wurde in der Literatur eine Beziehung zwischen den detektierten genetischen Alterationen im Tumorgewebe und dem Tumorstadium beschrieben [Hyytinen et al., 2002]. Obwohl eine Assoziation mit höheren Tumorstadien beschrieben wurde, zeigte ein Vergleich der genetischen Veränderungen mit dem Gleason-Score keinen signifikanten Zusammenhang mit der LOH-Inzidenz [Schwarzenbach et al., 2007; Fromont et al., 2003; Hyytinen et al., 2002].

6.7. Analyse möglicher Fehlerquellen und Qualität von Plasma-DNA

Das Prostatakarzinom zeichnet sich morphologisch sowie genetisch durch eine starke Heterogenität aus. Die mikroskopische Begutachtung verschiedener Tumoreareale zur Einteilung der Malignität des Karzinoms wird durch den Gleason-Score beschrieben. Durch das Vorhandensein von unterschiedlichen Arealen mit verschiedenen genetischen Alterationen, die sich aus mehreren Foci in der Prostata entwickeln, wird ein Vergleich zwischen den genetischen Alterationen des Tumors und der Plasma-DNA erschwert. So kann eventuell ein im Plasma detektiertes LOH aus einem Areal des Tumors stammen, das nicht mikrodisektiert und untersucht wurde.

An den genetischen Analysen ist aufgefallen, dass mehr Alterationen im Tumor als im Plasma nachgewiesen werden konnten. Dies könnte durch das Vorhandensein normaler

DNA im Plasma erklärt werden [Wang Q et al., 2003; Coulet et al., 2000; Hibi K et al., 1998; Kopreski et al., 1997].

Durch die lokalen Wachstumsprozesse kann auch gesundes Gewebe durch Apoptose oder Nekrose untergehen und dessen DNA kann sich dann in den Blutkreislauf ergießen. Außerdem kann ein Teil der isolierten DNA auch von Leukozyten stammen, die ihre DNA aktiv in den Blutstrom abgeben. So könnte es insgesamt zu einer Maskierung eines LOH durch normale DNA-Anteile kommen. Ein Problem bei den Untersuchungen der freien zirkulierenden DNA auf AI war das Auftreten von künstlichen LOH, die sich in der Wiederholung der PCR als falsch positiv herausstellten. In manchen Fällen wurde das LOH gespiegelt, d.h. z.B. beim ersten Versuch fehlte das kurze Allel und bei der Analyse der Wiederholungs-PCR fehlte das längere Allel. Eine Erklärung für das Auftreten dieses Artefaktes, das unser Labor als „mirror image“ bezeichnet, liegt darin, dass teilweise die Fragmente der Plasma-DNA für eine effektive Amplifikation durch die DNA-Polymerase zu kurz sind. Ferner war die effektive DNA-Konzentration wahrscheinlich niedriger als die mit dem Photometer gemessene Konzentration. Ausschlaggebend für das Auftreten dieser beschriebenen Artefakte ist übrigens die relativ schlechte Qualität der isolierten DNA. Die Qualitätsbestimmung der DNA am Photometer (260/280) zeigte Werte an, die auf das Vorkommen von Proteinen hindeuten.

Plasma-DNA hat natürlich nicht die Qualität der im Zellkern lokalisierten DNA. Sie zirkuliert frei im Blut und ist deshalb mehr der Degradierung durch DNasen ausgesetzt. In vitro Analysen zeigten, dass nekrotische und apoptotische Zellen durch Makrophagen phagozytiert werden und verdaute DNA im Kulturmedium befreit wird [Choi et al., 2005]. Eine Studie maß die Variation in der Länge der löslichen Plasma-DNA-Fragmente durch ein Elektronenmikroskop und zeigte, dass ein bedeutender Anteil der zirkulierenden DNA von apoptotischen Zellen stammt und somit kurze Fragmente aufweist [Giacona et. al., 1998]. Außerdem scheint die abnormale Proliferation benigner und maligner Zellen durch vermehrten apoptotischen Zelltod begleitet zu sein, was zur Akkumulation kleiner, fragmentierter DNA in der Blutzirkulation führt [Schulte-Herman et. al., 1995].

6.8 Ausblick

Für die Entdeckung tumorassoziierter, genetisch veränderter DNA im Blut von Prostatakarzinom-Patienten, wurde die extrahierte Plasma-DNA mit einem Set von ausgewählten Mikrosatelliten-Markern molekulargenetisch analysiert. Die Identifikation von spezifischen, deletierten Tumorsuppressorgenen könnte zu einer besseren

Früherkennung des Prostatakarzinoms beitragen, als durch die alleinige Bestimmung des PSA-Wertes. Ein PSA-Wert zwischen 4 und 10 ng/ml führt zu einem Krebsverdacht, der sich durch weitere Diagnostik bei 75% der Patienten nicht bestätigen lässt. Ferner könnte die molekulargenetische Charakterisierung maligner Prozesse wichtige Daten zur Entstehung und Entwicklung von Karzinomen liefern. Hierbei könnte die Korrelation mit den klinischen Parametern der Patienten Auskunft darüber geben, ob die Detektion von genetischen Abberationen in der freien zirkulierenden DNA Aussagen über das Stadium der Krankheit oder die Prognose des Krankheitsverlaufes liefern kann. Zum Erreichen dieses Zieles sind weitere Analysen der freien zirkulierenden DNA und Tumor-DNA mit einem größeren Primer-Set notwendig.

7. Zusammenfassung

Das Prostatakarzinom ist die häufigste maligne Erkrankung des Mannes und nach dem Bronchialkarzinom und dem Kolorektalen Karzinom die dritthäufigste Krebstodesursache des Mannes in Deutschland. Trotzdem ist über die Biologie des Prostatakarzinoms nur wenig bekannt. In der Tumorgenese spielen genetische Veränderungen eine entscheidende Rolle, die Funktionen von Tumorsuppressorgenen ausschalten („loss of function“) oder neue Funktionen von Protoonkogenen („gain of function“) hervorbringen.

In meiner Arbeit habe ich die genetischen Veränderungen von 64 Patienten mit einem Prostatakarzinom, im Vergleich mit 16 BPH-Patienten und 8 gesunden Probanden, auf LOH und MSI untersucht.

Für eine komparative Analyse wurde zellfreie DNA aus dem Plasma der Patienten und DNA aus Tumorgewebe von 25 dieser Patienten extrahiert und in einer Mikrosatelliten-basierten PCR amplifiziert. Das Auftreten von LOH und MSI an den Markern D6S474, D6S1631, D7S522, D8S87, D8S286, D8S360, D9S1748, D10S1765, D11S898 und D11S1313, auf den Chromosomen 6, 7, 8, 9, 10 und 11, wurde untersucht.

Meine Ergebnisse zeigen, dass die Konzentration der zirkulierenden DNA im Blut von Prostatakarzinompatienten und BPH-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden signifikant ($p=0,02$) erhöht war. Im Plasma von 10 der 64 Prostatakarzinom-Patienten (16%) konnte je ein LOH und bei 5 Patienten (8%) konnten jeweils 2 LOH detektiert werden. Am Marker D6S1631, der auf Chromosom 6q16 liegt, wurden mit 5 aus 20 die meisten LOH entdeckt. Im Tumorgewebe von 14 der 25 Patienten (56%) wurden insgesamt 15 LOH und 8 MSI entdeckt. Bei 5 von 25 (20%) Patienten konnte jeweils ein LOH detektiert werden. Bei 3 Patienten (12%) wurden 2 LOH detektiert und bei einem Patienten konnten sogar 4 LOH festgestellt werden. Die LOH-Frequenz war im Primärtumor mit 15 auf 138 detektierten Ergebnissen (11%) höher als im Blut, wo auf 412 informative Ergebnisse 20 LOH (5%) kamen. Die nachgewiesenen genetischen Alterationen im Plasma wurden mit den klinischen Daten, wie dem PSA-Wert, dem Tumolvolumen und –stadium sowie dem Differenzierungsgrad, verglichen. Die statistische Auswertung der Daten zeigte keine signifikante Korrelation. Um die Spezifität der Mikrosatelliten-Marker als Tumormarker zu untersuchen, wurde das Blut von BPH-Patienten und gesunden Probanden auf LOH untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass ein seltenes Auftreten von LOH auch in gutartigen Läsionen möglich ist. Dabei konnte je ein LOH an den Markern D6S474 und D7S522 im Blut von BPH-Patienten detektiert werden.

Zusammenfassend zeigen meine Ergebnisse, dass die Detektion von AI in der freien zirkulierenden DNA von Prostatakarzinom-Patienten mit Hilfe einer Blut-basierten DNA-Screening-Methode möglich ist und dass eine erhöhte DNA-Konzentration signifikant mit einer entzündlichen Läsion korrelieren darf.

8. Literaturverzeichnis

- Alken, Walz (1998), Urologie, Chapman & Hall, Weinheim, 2. Auflage: 246-258
- Anker P, Lefort F, Vasioukhin V, Lyautey J, Lederrey C, Chen XQ, Stroun M, Mulcahy HE, Farthing MJ (1997) K-ras mutations are found in DNA extracted from the plasma of patients with colorectal cancer. *Gastroenterology* 112: 1114-1120
- Bova GS, MacGrogan D, Levy A, Pin SS, Bookstein R, Isaacs WB (1996) Physical mapping of chromosome 8p22 markers and their homozygous deletion in a metastatic prostate cancer. *Genomics* 35: 46-54
- Benninghoff, Drenckhahn (2003), Anatomie Band 1, Urban & Fischer, München; 16. Auflage: 824-827
- Brawn PN, Kuhl D, Speights VO, Johnson CF 3rd, Lind M (1995) The incidence of unsuspected metastases from clinically benign prostate glands with latent prostate carcinoma. *Arch Pathol Lab Med* 119: 731-733
- Bruhn N, Beinert T, Oehm C, Jandrig B, Petersen I, Chen XQ, Possinger K, 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: 72-82
- Catalona WJ, Hudson MA, Scardino PT, Richie JP, Ahmann FR, Flanigan RC, deKernion JB, Ratliff TL, Kavoussi LR, Dalkin BL, et al (1994). Selection of optimal prostate specific antigen cutoffs for early detection of prostate cancer: receiver operating characteristic curves. *J Urol* 152: 2037-42.
- Chen XQ, Stroun M, Magnenat JL, Nicod LP, Kurt AM, Lyautey J, Lederrey C, Anker P (1996) Microsatellite alterations in plasma DNA of small cell lung cancer patients. *Nat Med* 2: 1033-1035
- Jin-Jung Choi, Charles F. Reich III, David S. Pisetsky (2005) The role of macrophages in the *in vitro* generation of extracellular DNA from apoptotic and necrotic cells. *Immunology* 115: 55-62
- Coulet F, Blons H, Cabelguenne A, Lecomte T, Laccourreye O, Brasnu D, Beaune P, Zucman J, 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: 707-11

- Frank Diehl^{*}, Meng Li^{*}, Devin Dressman^{*}, Yiping He^{*}, Dong Shen^{*}, Steve Szabo^{*}, Luis A. Diaz, Jr^{*}, Steven N. Goodman^{*}, Kerstin A. David[†], Hartmut Juhl[†], Kenneth W. Kinzler^{*}, and Bert Vogelstein^{*,‡} (2005) Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102: 16368-73
- Edlund S, Bu S, Schuster N, Aspenstrom P, Heuchel R, Heldin NE, ten Dijke P, Heldin CH, Landstrom M (2003) Transforming growth factor-beta 1 (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: 529-544
- El-Zein R, Gu Y, Sierra MS, Spitz MR, Strom SS (2005) Chromosomal instability in peripheral blood lymphocytes and risk of prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 14: 748-52.
- Flanders, Review: prostate cancer epidemiology. 1984, *Prostate* . 5: 621-9.
- Fleischhacker M, Schmidt B (2007) Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer--a survey. *Jan, Biochim Biophys Acta.*, 1775: 181-232.
- Franks LM (1974) Biology of the prostate and its tumors. In: Castro JE. The treatment of prostatic hyperplasia and neoplasia. Medical and Technical Publ, London, 1-26
- Fromont G, Joulin V, Chantrel-Groussard K, Vallancien G, Guillonneau B, Validire P, Latil A, Cussenot O (2003) Allelic losses in localized prostate cancer: Association with prognostic factors. *J Urol* 170: 1394-1397
- Giacona MB, Ruben GC, Iczkowski KA, Roos TB, Porter DM, Sorenson GD (1998). Cell-free DNA in human blood plasma: Length measurements in patients with pancreatic cancer and healthy controls. *Pancreas*, 17: 89-97.
- Goessl C, Müller M, Straub B, Miller K (2002) DNA Alterations in body fluids as molecular tumor markers for urological malignancies. *Eur Urol* 41: 668-676
- Gleason DF, Mellinger GT (1974) Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *J Urol* 111: 58-64
- Harris CC, Hollstein M (1993) Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. *N Engl J Med.* 329: 1318-27.
- Hautmann, Huland (2006) *Urologie*, Springer, Berlin, Heidelberg, New York; 3. Auflage: 165-174, 229-241
- Hemminki K, Sundquist J, Bermejo JL (2008) How common is familial cancer? *Ann Oncol.* 19: 163-7.

- Hibi K, Robinson CR, Booker S, Wu L, Hamilton SR, Sidransky D, Jen J (1998) Molecular detection of genetic alterations in the serum of colorectal cancer patients. *Cancer Res.* 58: 1405-7
- Huggins C (1943) Endocrine control of Prostatic cancer. *Science* 97: 541-544
- Hyytinen E-R, Saadut R, Chen C, Paull L, Koivisto PA, Vessella R L, Frierson Jr. H F, Dong J-T (2002) Defining the region(s) of deletion at 6q16-q22 in human prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 34: 306-312
- Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch R-D, 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: 1659-1665
- Katsuragi Y, Sagata N (2004) Regulation of Chk1 kinase by autoinhibition and ATR-mediated phosphorylation. *Mol Biol Cell* 15: 1680-1689
- Klein EA, Silverman R (2008) Inflammation, infection, and prostate cancer. *Curr Opin Urol.*, 18:315-9.
- Klocker H, Culig Z, Hobisch A, Cato AC, Bartsch G (1994) Androgen Receptor alterations in prostatic carcinoma. *Prostate* 25: 266-273
- Konishi N, Nakamura M, Kishi M, Ishida E, Shimada K, Matsuyoshi S, Nagai H, Emi M (2003) Genetic mapping of allelic loss on chromosome 6q within heterogenous prostate carcinoma. *Cancer Sci* 94: 764-768
- Kopreski MS, Benko FA, Kwee C, Leitzel KE, Eskander E, Lipton A, Gocke CD (1997) Detection of mutant K-ras DNA in plasma or serum of patients with colorectal cancer. *Br J Cancer.* 76: 1293-9
- Latini JM, Rieger-Christ KM, Wang DS, Silverman ML, Libertino JA, Summerhayes IC (2001) Loss of heterozygosity and microsatellite instability at chromosomal sites 1q and 10q in morphologically distinct regions of late state prostate lesions. *J Urol*, 166: 1931-1936
- Leon SA, Green A, Yaros MJ, Shapiro B (1975) Radioimmunoassay for nanogram quantities of DNA. *J. Immunol Methods* 9: 157-164
- Lerner SE, Jacobsen SJ, Lilja H (1996) Free, complexed, and total serum prostate-specific antigen concentrations in their proportions in predicting stage, grade and deoxyribonucleic acid ploidy in patients with adenocarcinoma of the prostate. *Urology* 48: 240-248

- Liao Y, Grobholz R, Abel U, Trojan L, Michel MS, Angel P, Mayer D (2003) Increase of AKT/PKB expression correlates with gleason pattern in human prostate cancer. *Int J Cancer* 107: 676-680
- Liu P, Rudick M, Anderson RG (2002) Multiple functions of caveolin-1. *J Biol Chem.* 277: 41295-8.
- Löffler, Petrides (2003), *Biochemie & Pathobiochemie*, Springer, Berlin, Heidelberg, New York; 7. Auflage: 892, 1166-1168
- Mandel P, Métais P (1948) Les acides nucleiques du plasma sanguin chez l'homme. *CR Acad Sci Paris* 142: 241-243
- McNeal J (1972) the prostate and prostatic urethra: a morphologic synthesis. *J Urol.* 107: 1008-16
- Mühlhardt (2003): *Molekularbiologie/Genomics*, Spektrum Verlag, Berlin; 4. Auflage: 73-76
- Müller I, Urban K, Pantel K, Schwarzenbach H. (2006) 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: 222-9.
- Nawroz H, Koch W, Anker P, Stroun M, Sidransky D (1996) Microsatellite alterations in serum DNA of head and neck cancer patients. *Nat Med.* 2: 1035-7.
- Negrini M, Sabbioni S, Possati L, Rattan S, Corallini A, Barbanti-Brodano G, Croce CM (1994) Suppression of tumorigenicity of breast cancer cells by microcell-mediated chromosome transfer: studies on chromosomes 6 and 11. *Cancer Res* 54: 1331-1336
- Noltenius, *Tumor Handbuch* (1987), Urban & Schwarzenberg, München; 2. Auflage: 1539-1542
- Parkin DM, Pisani P, Ferlay J (1999) Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 49: 33-64, 1.
- Passarge (2004), *Taschenatlas der Genetik*, Thieme, Stuttgart; 2. Auflage: 70-74, 228
- Perinchery G, Bukurov N, Nakajima K, Chang J, Li L-C, Dahiya R (1999) High frequency of deletion on chromosome 9p21 may harbour several tumor-suppressor genes in human prostate cancer. *Int J Cancer* 83: 610-614
- Prasad MA, Trybus TM, Wojno KJ, Macoska JA (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: 255-262

- Raj EH, Skinner A, Mahji U, Nirmala KN, Ravichandran K, Shanta V, Hurst HC, Gullick WJ, Rajkumar T (2001) Neuregulin 1-alpha expression in locally advanced breast cancer. *Breast*, 10: 41-45
- Ross RK, Paganini-Hill A, Henderson BE (1983) The etiology of prostate cancer: what does the epidemiology suggest? *Prostate*. 4: 333-44.
- Rowley KH, Mason MD (1997) The aetiology and pathogenesis of prostate cancer. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 9: 213-8.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491
- Schulte-Hermann R, Bursch W, Grasl-Kraupp B, Török L, Ellinger A, Müllauer L (1995) Role of active cell death (apoptosis) in multi-stage carcinogenesis. *Toxicol Lett*. 82-83: 143-8.
- Schwarzenbach H, Müller V, Stahmann N, Pantel K (2004) Detection and characterization of circulating microsatellite-DNA in blood of patients with breast cancer. *Ann N Y Acad Sci*. 1022: 25-32.
- Schwarzenbach H, Müller V, Beeger C, Gottberg M, Stahmann N, Pantel K. (2007) 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: R66
- Schwarzenbach H, Chun FK, Lange I, Carpenter S, Gottberg M, Erbersdobler A, Friedrich MG, Huland H, Pantel K. (2007) Detection of tumor-specific DNA in blood and bone marrow plasma from patients with prostate cancer. *Int J Cancer* 120: 1465-71.
- Schwarzenbach H, Chun FK, Müller I, Seidel C, Urban K, Erbersdobler A, Huland H, Pantel K, Friedrich MG (2008) Microsatellite analysis of allelic imbalance in tumour and blood from patients with prostate cancer. *BJU Int.*, 102: 253-8
- Silva JM, Gonzalez R, Provencio M, Dominguez G, Garcia JM, Gallego I, Palacios J, Espana P, Bonilla F. (1999) Loss of heterozygosity in BRCA1 and BRCA2 markers and high-grade malignancy in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 53: 9-17.
- Strom SS, Spitz MR, Yamamura Y, Babaian RJ, Scardino PT, Wei Q (2001) Reduced expression of hMSH2 and hMLH1 and risk of prostate cancer: a case-control study. *Prostate*, 47: 269-275
- Stroun M, Anker P, Lyautey J, Lederrey C, Maurice PA (1987) Isolation and characterization of DNA from plasma of cancer patients. *Eur J Cancer Clin Oncol*, 23: 707-712

- Stroun M, Lyautey J, Lederrey C, Olson-Sand A, Anker P (2001) About the possible origin and mechanism of circulating DNA apoptosis and active DNA release. *Clin Chim Acta.* 313: 139-42
- Tal-Or P, Di-Segni A, Lupowitz Z, Pinkas-Kramarski R (2003) Neuregulin promotes autophagic cell death of prostate cancer cells. *Prostate* 55: 147-157
- Yeh CC, Lee C, Dahiya R (2001) DNA mismatch repair enzyme activity and gene expression in prostate cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 285: 409-413
- Wang MC, Valenzuela LA, Murphy GP, Chu TM (1979) Purification of a human prostate specific antigen. *Invest Urol*, 17: 159-163
- Wang M, Block TM, Steel L, Brenner DE, Su YH (2004) Preferential isolation of fragmented DNA enhances the detection of circulating mutated k-ras DNA, *Clin Chem.* 50: 211-3
- Wang Q, Larson PS, Schlechter BL, Zahid N, Finnemore E, de las Morenas A, Blanchard RA, Rosenberg CL (2003) Loss of heterozygosity in serial plasma DNA samples during follow-up of women with breast cancer. *Int J Cancer.* 106: 923-9
- Whittemore AS, Kolonel LN, Wu AH, John EM, Gallagher RP, Howe GR, Burch JD, Hankin J, Dreon DM, West DW, et al. (1995) Prostate cancer in relation to diet, physical activity, and body size in blacks, whites, and Asians in the United States and Canada. *J Natl Cancer Inst.* 87: 652-61.
- Wilfinger WW, Mackey K, Chomczynski P (1997) Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *Biotechniques* 22: 474-6, 478-81.
- Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal S, Mangion J, Collins N, Gregory S, Gumbs C, Micklem G (1995) Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature.* 378: 76
- Yoshida K, 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: 866-7

9. Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei all denen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Besonderer Dank gilt:

Dr. phil. II Heidi Schwarzenbach für eine exzellente Betreuung und die uneingeschränkte Unterstützung bei der Durchführung meiner Doktorarbeit.

Ich danke meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Klaus Pantel für seine Anregungen und Ideen und die Möglichkeit, an seinem Institut diese interessanten Forschungen durchzuführen.

Dr. med. Hendrik Isbarn, PD Dr. Erbersdobler und Prof. Dr. med. Hartwig Huland aus Hamburg und Dr. med. Catherine Alix-Panabières aus Montpellier für die Bereitstellung des Untersuchungsmaterials und der klinischen Daten.

Petra Merkert aus der Chirurgie (Forschung) für die Unterstützung am „Genetic Analyzer“.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Tumorbiologie für eine nette Atmosphäre und Imke Müller und Frank Wischnewski dafür, dass die Arbeit immer Spaß gemacht hat.

Prof. Dr. Burkhardt Brandt, Antje Andreas, Dr. Sabine Riethdorf, Dr. Haiju Wikman für wertvolle Tipps in allen Belangen des Laboralltags.

Größter Dank gilt natürlich meinen Eltern, die zu mir gehalten haben und mir ein sorgenfreies Studium ermöglichten.

10. Lebenslauf

Name Seidel
Vorname Christoph, Alexander
Geburtsdatum 7. Januar 1981
Geburtsort Hamburg
Nationalität deutsch
Familienstand ledig

Schulbildung

1987-1991 Grundschule Swatten Weg, Hamburg
1991-2001 Gymnasium Schenefeld, Schleswig-Holstein, Abitur bestanden Juni 2001
1997-1998 McAlester High School, Oklahoma, USA

Zivildienst

September 2001-Juli 2002 Zivildienst in der Krankenpflege, Asklepios Klinik Altona, Hamburg

Studium

Oktober 2002 – November 2008 Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg
September 2004 ärztliche Vorprüfung / Physikum
November 2008 2. ärztliche Prüfung

Juli-August 2006 Famulatur: Urologie, Krankenhaus Elizabeth Herzberge, Berlin
August-September 2006 Famulatur: Gynäkologie, Vivantes Klinik Friedrichshein, Berlin
Oktober-November 2006 Famulatur: ZMNA, AK Altona, Hamburg
November-Dezember 2006 Famulatur: Internistische Onkologie, AK St.Georg, Hamburg
August-Dezember 2007 PJ-Tertial: Urologie, AK Altona, Hamburg
Dezember 2007-April 2008 PJ-Tertial: Chirurgie, Diakonie Klinikum Alten Eichen, Hamburg
North York General Hospital, Toronto, Kanada
April-Juli 2008 PJ-Tertial: Innere Medizin, UKE, Hamburg

Promotion

April 2005-April 2006 Arbeiten im Labor von Dr. Heidi Schwarzenbach des Instituts für Tumorbologie zur Dissertation: „Analyse der freien zirkulierenden DNA von Prostatakarzinom-Patienten auf allelische Imbalance“

Publikation

Schwarzenbach H, Chun FK, Müller I, **Seidel C**, Urban K, Erbersdobler A, Huland H, Pantel K, Friedrich MG. Microsatellite analysis of allelic imbalance in tumour and blood from patients with prostate cancer. BJU Int. 2008 Mar 10.

11. Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe 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 einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift