

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

**Klinische Bedeutung von zirkulierender Mikrosatelliten-DNA  
und Tumorzellen im Blut und Knochenmark von  
Prostatakarzinom-Patienten**

**Dissertation**

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

vorgelegt von

Sebastian William Carpenter  
aus London, G.B.

Hamburg, 2012

Angenommen von der Medizinischen Fakultät  
der Universität Hamburg am: 28.06.2012

Veröffentlichung mit Genehmigung der Medizinischen  
Fakultät der Universität Hamburg

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

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: PD Dr. med. Felix Chun

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: PD Dr. phil. II Heidi Schwarzenbach

*Meiner Familie gewidmet.*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Die Prostata .....	1
1.2	Das Prostatakarzinom.....	3
1.2.1	Epidemiologie, Ätiologie und Risikofaktoren.....	3
1.2.2	Pathologie und Klassifikation .....	6
1.2.3	Diagnostik und Früherkennung .....	11
1.2.4	Therapie .....	15
1.3	Tumorbiologie.....	16
1.3.1	Neoplastische Transformationen.....	16
1.3.2	Onkogene und Tumorsuppressorgene .....	18
1.3.3	Initiation und Proliferation des Prostatakarzinoms .....	19
1.3.4	Molekulare Progression .....	19
1.4	Repetitive DNA-Abschnitte .....	20
1.4.1	Mikrosatelliten .....	20
1.4.2	Mikrosatelliten-Längen-Polymorphismus .....	21
1.4.3	Postreplikative DNA-Reparatur und DNA-Mismatch-Reparatur.....	21
1.4.4	Mikrosatellitenalterationen .....	21
1.5	Zirkulierende Nukleinsäuren .....	22
1.5.1	Zellfreie, zirkulierende DNA (f-DNA) im Blut.....	22
1.5.2	Zellfreie DNA (f-DNA) im Knochenmark.....	23
1.5.3	Studien zur Analyse zellfreier DNA im Blut bei Prostatakarzinom-Patienten .....	23
1.6	Mechanismen der Metastasierung .....	23
1.6.1	Disseminierte Tumorzellen (DTC).....	24
1.6.2	Minimale residuelle Krebserkrankung und Tumor-Dormancy.....	26
1.6.3	Detektion von disseminierten Tumorzellen.....	26
1.6.4	Klinische Bedeutung disseminierter Tumorzellen im Knochenmark .....	27
1.6.5	Klinische Bedeutung disseminierter Tumorzellen beim Prostatakarzinom .....	28
<b>2</b>	<b>Arbeitshypothese und Fragestellung .....</b>	<b>31</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>32</b>
3.1	Untersuchungsmaterial/Patientenkollektiv .....	32
3.1.1	Chemikalien .....	33
3.1.2	Enzyme .....	34
3.1.3	DNA-Größenmarker für die Fragmentanalyse/Gelelektrophorese .....	34
3.1.4	Oligonukleotide.....	35
3.1.5	Verwendete Kits.....	37
3.1.6	Verbrauchsmaterialien .....	37
3.1.7	Geräte.....	38
3.1.8	Puffer und Lösungen.....	39
3.2	Methoden .....	40
3.2.1	Gewinnung von Blut, Knochenmark und Tumorgewebe .....	40
3.2.2	Gewinnung von Blutplasma und Isolierung der Leukozyten.....	41
3.2.3	Verarbeitung von Knochenmark (KM) .....	41
3.2.4	Verarbeitung von Tumorgewebe.....	45
3.2.5	Isolierung der genomischen DNA.....	47
3.2.6	Quantitäts- und Qualitätsbestimmung der isolierten DNA (OD-Messung) .....	49
3.2.7	Amplifikation der extrahierten DNA mit Gen-spezifischen-Primerpaaren .....	49
3.2.8	Verwendete Mikrosatellitenmarker .....	51
3.2.9	Fragmentanalyse am Genetic-Analyser .....	53
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>55</b>
4.1	Überblick über die Patientenkollektive .....	55
4.2	PSA-Werte .....	57
4.2.1	Vergleich des % f-PSA-Wertes zwischen den beiden Patientenkollektiven .....	57

4.2.2	t-PSA-Werte der Prostatakarzinom-Patienten.....	58
4.2.3	Auswertung des % f-PSA-Wertes bei Patienten mit positiven DTCs im Knochenmark .....	58
4.3	DNA-Isolierung und Quantifizierung aus Blut, Knochenmark und Tumorgewebe .....	59
4.3.1	Vergleich der Menge an zellfreier, zirkulierender DNA im Blut zwischen den Kollektiven.....	59
4.3.2	Vergleich des DNA-Gehaltes im Blut mit den relevanten klinischen Parametern .....	60
4.3.3	Vergleich des DNA-Gehaltes im Blut und Knochenmark.....	60
4.3.4	DNA-Isolierung aus Tumorgewebe .....	62
4.3.5	Isolierung der DNA aus dem Knochenmark-Plasma.....	64
4.4	Nachweis genetischer Alterationen wie LOH/MSI an Mikrosatelliten-DNA.....	65
4.4.1	Auswertung der Peaks (PCR-Produkte) am Genetic-Analyser mit der Gene-Scan®-Software65	
4.4.2	DNA-Alterationen in der zellfreien, zirkulierenden DNA bei BPH-Patienten.....	69
4.4.3	DNA-Alterationen bei den Prostatakarzinom-Patienten .....	71
4.4.4	LOH-Verteilungsmuster an den verschiedenen Markern .....	75
4.4.5	Korrelation mit den relevanten klinischen Daten der Patienten und Tendenzen .....	77
4.4.6	Vergleich der genetischen Alterationen im Blutplasma zwischen den Kollektiven .....	77
4.5	Immunzytochemischer Nachweis disseminierter Tumorzellen (DTC) im Knochenmark von Prostatakarzinom-Patienten.....	78
4.5.1	Klinische Details der Patienten mit Nachweis von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark .....	78
4.5.2	Auswertung der klinischen Daten der Patienten mit positiven DTC im Knochenmark.....	79
4.5.3	Gesamt-LOH-Frequenzen im Blut, Knochenmark und Tumorgewebe: DTC-positive vs. DTC-negative Patienten .....	80
4.5.4	LOH-Frequenzen im Knochenmark und Tumorgewebe: DTC-positive vs. DTC-negative Patienten .....	81
4.5.5	LOH-Verteilungsmuster an den verschiedenen Markern bei DTC-positiven vs. DTC-negativen Patienten. ....	82
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>84</b>
5.1	PSA-Werte .....	85
5.2	Quantifizierung der freien zirkulierenden DNA.....	86
5.3	DNA-Analysen in Blut, Knochenmark und Tumorgewebe von Patienten mit Prostatakarzinom und benigner Prostatahyperplasie.....	87
5.3.1	Charakterisierung der Mikrosatellitenmarker und Bestimmung der LOH-Frequenzen.....	87
5.3.2	Konkordanz der genetischen Veränderungen zwischen den Kompartimenten.....	92
5.3.3	LOH-Frequenzen bei DTC-positiven vs. DTC-negativen Patienten .....	93
5.3.4	LOH-Verteilungsmuster bei DTC-positiven vs. DTC-negativen Patienten .....	93
5.3.5	Vergleich der DNA-Analysen zwischen den Patientenkollektiven .....	94
5.4	Prostatakarzinom-Patienten mit disseminierten Tumorzellen im Blut und Knochenmark .....	94
5.4.1	Kontroverse Diskussion über die Bedeutung von DTCs beim Prostatakarzinom .....	95
5.4.2	Disseminierte Tumorzellen (DTCs) vs. zirkulierende Tumorzellen (CTCs).....	96
5.4.3	Besonderheiten der Patienten mit DTCs im Knochenmark.....	97
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>99</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>101</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>115</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>116</b>
<b>10</b>	<b>Erklärung.....</b>	<b>118</b>

# Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Lage der Prostata im Becken.....	1
Abb. 2: Einfluss von Alter und Rasse auf die Inzidenz des Prostatakarzinoms.....	4
Abb. 3: T-Stadien schematisch.....	9
Abb. 4: Einteilung der histologischen Befunde nach Gleason .....	10
Abb. 5: Metastasierungskaskade nach Pantel und Brakenhoff, 2004, modifiziert. Dargestellt sind zwei mögliche Metastasierungswege, die lymphogene und die hämatogene Metastasierung. Bestehende primäre Fernmetastasen können durch erneute Disseminierung sekundäre Fernmetastasen ausbilden. ....	25
Abb. 6: Schematische Darstellung einer Knochenmarkspunktion.....	41
Abb. 7: Schema der Knochenmark-Aufbereitung (Pantel & Brakenhoff, 2004).....	42
Abb. 8: APAAP-Enzym-Komplex .....	43
Abb. 9: Automated Cellular Imaging System (ACIS) .....	44
Abb. 10: PALM-Apparatur, mikrodissziertes Areal.....	47
Abb. 11: PCR-Reaktion mit exponentieller Amplifikation der PCR-Kopien.....	50
Abb. 12: Genetic-Analyser (ABI-PRISM®310) .....	53
Abb. 13: Prinzip des ABI-PRISM®-310-Detektionssystems.....	54
Abb. 14: Statistisch signifikanter Unterschied der % f-PSA-Werte zwischen den beiden Patientenkollektiven (p= 0,001) .....	58
Abb. 15: DTC-positive Patienten und % f-PSA im Blut .....	59
Abb. 16: DNA-Gehalt im Blut bei BPH- und Prostatakarzinom-Patienten, dargestellt als Boxplot. Der Unterschied war statistisch signifikant p= 0,001. ....	60
Abb. 17: DNA-Mengen im Knochenmark-Plasma bei DTC-positiven vs. DTC-negativen Patienten, dargestellt als Boxplot (p = 0,001). ....	62
Abb. 18: Ergebnis der vergleichenden PCR mit DNA aus dem Tumorgewebe des Patienten K36 mit dem Primerpaar D10S1765.....	63
Abb. 19: HE 1:5 (links) vs. Toluidin-Blau-Färbung (rechts) zweier Prostata-Schnitte, 10-fach vergrößert. ....	64
Abb. 20: Abhängigkeit des PCR-Erfolges vom eingesetzten Begleitvolumen .....	65
Abb. 21: Beispiel eines informativen Falles, es liegt Heterozygotie vor. Der Patient K57 ohne LOH/MSI am Locus D10S1765. Nacheinander von oben nach unten: Leukozyten (LEUCO), Blutplasma (PLASMA), Knochenmark-Plasma (KM), Tumorgewebe (TUMOR). ....	66
Abb. 22: Beispiel eines nicht-informativen Falles (NI), es liegt Homozygotie (H) vor. Der Patient K36 am Marker D8S87. Nacheinander von oben nach unten: Leukozyten (LEUCO), Blutplasma (PLASMA), Knochenmark-Plasma (KM), Tumorgewebe (TUMOR). ....	67
Abb. 23: Interessanter Fall eines am Marker D11S1313 homozygoten Patienten (K38). Im Tumorgewebe zeigt sich an diesem Locus eine Mikrosatelliteninstabilität (MSI). Nacheinander von oben nach unten: Leukozyten (LEUCO), Blutplasma (PLASMA), Knochenmark-Plasma (KM), Tumorgewebe (TUMOR).....	67
Abb. 24: Beispiel eines weiteren informativen Falles, es liegt Heterozygotie vor. Patient K31 zeigt eine Mikrosatelliteninstabilität (MSI) im Tumorgewebe am Marker D11S1313. Nacheinander von oben nach unten: Leukozyten (LEUCO), Blutplasma (PLASMA), Knochenmark-Plasma (KM), Tumorgewebe (TUMOR).....	68
Abb. 25: LOH im Knochenmark-Plasma (KM) und Tumorgewebe (T) bei dem Patienten K23 am Marker D6S1631. Nacheinander von oben nach unten: Leukozyten (L), Blutplasma (P), Knochenmark-Plasma (KM), Tumorgewebe (T).....	69
Abb. 26: Übersicht über die Anzahl und Prozentsätze an informativen Fällen (I), nicht-informativen Fällen (NI) und Mikrosatellitenalterationen (LOH und MSI) an den jeweiligen Markern in dem BPH-Kollektiv.....	70
Abb. 27: LOH-Frequenz an den einzelnen Markern bei den BPH-Patienten .....	71
Abb. 28: LOH- und MSI-Raten in den verschiedenen Kompartimenten (Blut, Knochenmark und Tumorgewebe) bei den Prostatakarzinom-Patienten. ....	72
Abb. 29: Übersicht über Frequenz und Anzahl an informativen (I), nicht-informativen Fällen (NI), LOH und MSI im Kollektiv der Prostatakarzinom-Patienten.....	73
Abb. 30: LOH-Frequenz an den einzelnen Markern bei den Prostatakarzinom-Patienten.....	75

---

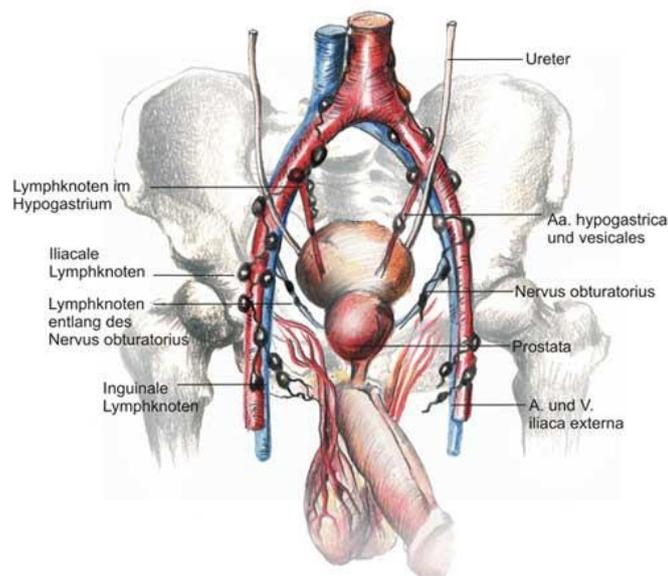
Abb. 31: LOH-Muster im Blut von Prostatakarzinom- und BPH-Patienten .....	77
Abb. 32: Cytokeratin (CK-19)-positive Zellen im Knochenmark der Patienten K40, K43 und K48. Der Befund ganz rechts im Bild (02131473) bei Patient K48 wurde als Verunreinigung und somit als Artefakt gewertet (somit nur 2 DTC). .....	79
Abb. 33: Statistische Signifikanz zwischen dem Gesamtvolumen der Prostata und dem Knochenmarkstatus .....	79
Abb. 34: Gleason-Score bei DTC-positiven Patienten .....	80
Abb. 35: Anzahl der Patienten mit mindestens 1 LOH in einer der Proben in Abhängigkeit vom Knochenmarkstatus .....	81
Abb. 36: Anzahl der LOH pro Patient in Abhängigkeit vom Knochenmarkstatus .....	81
Abb. 37: Vergleich der LOH-Raten im Knochenmark und Tumorgewebe der DTC-positiven und DTC-negativen Patienten .....	82
Abb. 38: LOH-Muster im Knochenmark in Abhängigkeit vom Knochenmarkstatus .....	82
Abb. 39: LOH-Muster im Tumorgewebe in Abhängigkeit vom Knochenmarkstatus .....	83

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Prostata

### Allgemeines und makroskopische Anatomie

Die in etwa kastaniengroße Vorsteherdrüse (Prostata) umschließt die Harnröhre am Blasenfundus. Dabei lagert sie unmittelbar auf dem sog. Diaphragma urogenitale, in etwa 2-3 cm Entfernung vom Symphysenrand. Nach hinten grenzt sie an den Enddarm, getrennt durch eine bindegewebige Schicht, das Septum rectoprostaticum (Denonvilliers). Man unterscheidet anatomisch eine Periurethralzone von einer Innen- und Außenzone. Die Prostata steht unter hormonellen Einflüssen, dabei wird die Innenzone mehr von Östrogenen, die Außenzone dagegen mehr von Androgenen beeinflusst. Das Organ wird von einer derben Kapsel, der Capsula prostaticae, umgeben und beidseits von den sog. Levatorenschenkeln flankiert (Abb.1).



**Abb. 1: Lage der Prostata im Becken**

Die Blutversorgung der Prostata erfolgt aus den Arteriae vesicales inferiores et superiores, sowie den Rami vesicales aus der Arteria rectalis media. Das venöse Blut wird über den ausgedehnten Venenplexus drainiert. Dieser Venenplexus setzt sich aus dem Plexus venosus prostaticus einerseits und dem Plexus venosus vesicalis andererseits, zum sog. Plexus venosus vesicoprostaticus zusammen. In diesen münden auch die Penisvenen ein (Blutfang nach der Erektion). Von dort fließt das Blut in die Venae iliacaе internaе. Der Lymphabfluss erfolgt zu den regionalen Lymphknoten entlang der Vv. iliacaе (Nodi lymphatici iliaca int.) sowie zu den anorektalen und sakralen Lymphknoten (Nn. lymphatici anorectales et. sacrales). Ein ausgedehntes Nervengeflecht von sympathischen (Th10- L1), parasym-

phatischen (S1- S3) und motorischen Ästen (S2- S4) aus jeweiligen Rückenmarkssegmenten umgibt die Prostata. Hierdurch wird die Erektion, die Blasendynamik (sakralautonomes- und sympathisches Blasenzentrum, unwillkürlicher und willkürlicher Verschluss des Sphinkters) und der Beckenboden gesteuert [Rohen, 1999].

### **Mikroskopische- und funktionelle Anatomie**

Die Funktion der Prostata, die histologisch aus ~30-50 tubulo-alveolären Drüsenpaketen sowie reichlich Muskel- und Bindegewebe besteht, ist im Wesentlichen die Produktion eines leicht alkalischen (pH 7,4 -7,8) Sekretes.

Dieses Sekret wird bei der Ejakulation freigesetzt (~30-40 % des Ejakulatvolumens) und dient den Spermien als Nährmedium (hoher Fruktosegehalt). Auch ist es für die Reproduktionsphysiologie unerlässlich, indem es das saure Scheidenmilieu vorübergehend puffern kann, hierzu dienen vor allem Zitrat- und Zinkbestandteile. Letztere beeinflussen auch den Testosteronmetabolismus. Proteasen wie das Prostata Spezifische Antigen (PSA), welches in hoher Konzentration vorliegt (>1-2 mg/ml), beeinflussen die Beweglichkeit der Spermatozoen, indem sie das Ejakulat (durch Spaltung von Seminogelin I und II) gewissermaßen verflüssigen können. Spermin und Spermidin erhöhen ebenfalls die Motilität und auch die Befruchtungsfähigkeit der Spermatozoen. Im Ejakulat enthaltene Prostaglandine haben einen stimulierenden Einfluss auf den Uterus [Rohen, 1999, 2000; Balk 2003].

### **Hormonelle Faktoren**

Die Prostata ist ein hormonsensitives Organ und wird im Wesentlichen von Androgenen stimuliert (Wachstum, Sekretion) und reguliert. Im Blut zirkulierende Androgene (Testosteron) und Androstenoide (z. B. Dehydroepiandrosteron) von unterschiedlicher Herkunft (Hoden, Nebenniere) werden in der Prostata zu Testosteron bzw. zu Dihydrotestosteron umgewandelt. Die aktivierten Androgene regulieren das Wachstum der Prostatazellen und haben somit direkten Einfluss auf die Genexpression. Auch Östrogene kommen in niedriger Konzentration in der Prostata vor, ihr genauer Wirkmechanismus ist ungeklärt. Es besteht vermutlich ein synergistischer Effekt zu den Androgenen. Im Laufe des Lebens sinkt der Androgenspiegel des Mannes und der Östrogenspiegel steigt an, so dass der Östrogen-Testosteron-Quotient ansteigt. Dieser Umstand wird als ein pathophysiologischer Faktor für die benigne Prostatahyperplasie diskutiert. Östrogene kommen beim Mann nur in niedrigen Serumspiegeln vor (100 ng/l) [Holstein, 1985; Welen et al., 2011].

Einen weiteren hormonellen Einfluss hat das Hypophysenvorderlappenhormon Prolaktin auf die Prostata, zum einen erhöht es die periphere Testosteronproduktion, zum anderen kann es die Testosteronaufnahme in das Prostatagewebe und die Wirkung des Testosterons in der Prostata steigern. In Bezug auf die Entwicklung des Prostatakarzinoms spielt Prolaktin nur eine untergeordnete Rolle, scheint aber für die Progression des Tumors von Bedeutung zu sein [Goffin et al., 2011].

## 1.2 Das Prostatakarzinom

### 1.2.1 Epidemiologie, Ätiologie und Risikofaktoren

#### Epidemiologie

Das Prostatakarzinom zählt zu den häufigsten malignen Neoplasien in der westlichen Welt. Mit Ausnahme von Hauttumoren hat das Prostatakarzinom mit 30 % die höchste Inzidenzrate (Anzahl der Neuerkrankungen innerhalb eines definierten Zeitraumes) unter den bösartigen Neubildungen [Hsing et al., 2000; 2006] und rangiert bei den krebsbedingten Todesfällen, hinter dem Bronchialkarzinom, auf dem zweiten Rang [Jemal et al, 2007]. In Amerika werden in diesem Jahr ca. 218.000 Neuerkrankungen, bei etwa 27.000 Todesfällen durch die Folgen des Prostatakarzinoms erwartet [Jemal et al, 2007].

In Deutschland werden jährlich etwa 48.500 (22,3% aller bösartigen Neubildungen) Prostatakarzinome diagnostiziert. Das mittlere Alter bei Diagnosestellung liegt bei ~70 Jahren. Bei unter 50-Jährigen beträgt die Anzahl der Neuerkrankungen noch ~30-50/100.000 und steigt bis auf ~700/100.000 bei den über 75-Jährigen. Über dem 80. Lebensjahr liegt die Rate bei etwa 850/100.000 Einwohner [Krebs in Deutschland, GEKiD, 2006; www.rki.de]. Diese ausgeprägte Altersabhängigkeit ist eine Besonderheit des Prostatakarzinoms, ebenso die Entität des sog. latenten oder inzidenten Prostatakarzinoms ohne klinische Relevanz. Autopsiestudien zeigen einen sehr hohen Anteil an klinisch bedeutungslosen, differenzierten Prostatakarzinomen. So konnte im Alter zwischen 20 und 40 Jahren bereits bei ca. 29% und im Alter zwischen 60 und 70 Jahren bei 64% der Fälle ein Prostatakarzinom nachgewiesen werden [Sakr et al., 1994]. Nach Brawn et al. ist in ca. 38% der Fälle mit einem sogenannten okkulten Karzinom zu rechnen [Brawn et al., 1995]. Sheldon et. al. fanden in 10% der 50-Jährigen und in 70% der über 80-Jährigen ein latentes Prostatakarzinom [Sheldon et al., 1980]. Da die Wahrscheinlichkeit an einem Prostatakarzinom zu erkranken bei einem 80-Jährigen etwa 6% beträgt [Jemal et al, 2007], bedeutet dies, dass 90% der Karzinome überhaupt nicht diagnostiziert werden. Die Mortalität des Prostatakarzinoms beträgt in Deutschland ~10% (~11.400) und nimmt damit den 3. Rang unter den krebsbedingten Todesursachen ein [Krebs in Deutschland, GEKiD, 2006]. Sie ist von verschiedenen Faktoren (z. B. Alter des Betroffenen, ethnische Zugehörigkeit und geografische Faktoren) abhängig. Die Prognose ist bei rechtzeitiger Diagnosestellung als gut anzusehen. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei ~82% und das mittlere Sterbealter bei 78 Jahren. Allerdings ist hierbei zwischen frühen, aggressiven und metastasierenden Verlaufsformen und langsam progredienten Verlaufsformen zu unterscheiden. Diese Zahlen unterstreichen die immense sozioökonomische Bedeutung des Prostatakarzinoms.

#### Ätiologie

Eine abschließende Klärung der Ätiologie und molekularen Pathogenese des Prostatakarzinoms steht noch aus. Ein multifaktorielles und mehrstufiges Geschehen gilt wie bei der überwiegenden Anzahl an malignen Tumoren für die meisten Prostatakarzinome als gesichert. Die für die Entstehung des Prostatakarzinoms bereits nachgewiesenen sowie die ak-

tuell diskutierten Risikofaktoren werden im Folgenden dargestellt. Auf die Tumorbilogie des Prostatakarzinoms wird in Kapitel 1.3 näher eingegangen.

Prostatakarzinome treten überwiegend sporadisch auf (ca. 75 %), eine familiäre Häufung liegt in ca. 20-25 % der Fälle vor, den übrigen Karzinomen liegt ein hereditärer Mechanismus zugrunde [Hanus et al., 1999].

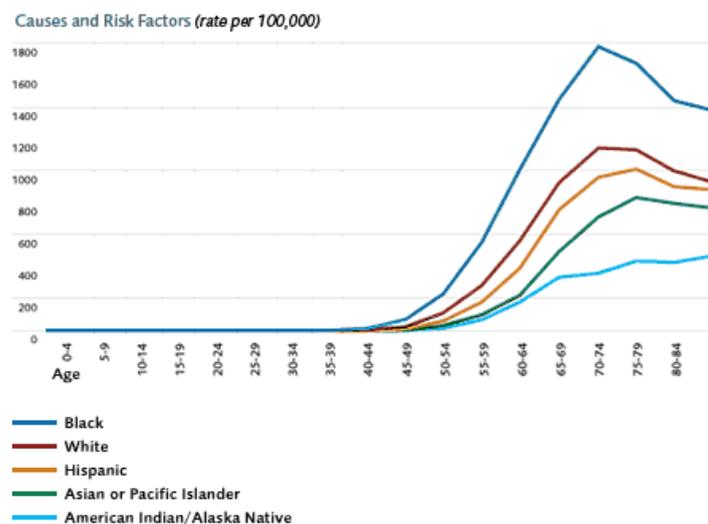
### Risikofaktoren

Als mittlerweile gesicherte Risikofaktoren gelten:

- # Alter, ethnische- und geografische Faktoren
- # genetische Faktoren (familiäre Disposition)
- # Umweltfaktoren.

### Alter, ethnische- und geografische Faktoren

Das Alter ist der stärkste unabhängige Risikofaktor überhaupt. Wie bereits dargestellt, ist unter dem 50. Lebensjahr eine Diagnosestellung äußerst selten. Bereits über dem 65. Lebensjahr handelt es sich um den häufigsten bösartigen Tumor. 80% der Patienten sind bei Diagnosestellung über 65 Jahre alt (Abb. 2, aus [www.prostatecancerfoundation.org](http://www.prostatecancerfoundation.org)).



**Abb. 2: Einfluss von Alter und Rasse auf die Inzidenz des Prostatakarzinoms**

Die Abb. 2 zeigt deutlich die unterschiedlichen Inzidenzen bei den verschiedenen ethnischen Bevölkerungsgruppen. Das höchste Risiko tragen in die USA eingewanderte Afroamerikaner. So ist die Anzahl der Neuerkrankungen unter den schwarzen US-Bürgern mit ~149/100.000 höher als unter den weißen Amerikanern (109/100.000) und den Asiaten (~39/100.000) [Taylor et al., 1994; Irvine et al., 1995]. Weltweit wird ein West-Ost- sowie ein Nord-Süd-Gefälle beobachtet. Als ursächlich in diesem Zusammenhang sind hauptsächlich die unterschiedlichen Ernährungsgewohnheiten zu sehen. Dafür sprechen zum einen die Zunahme von Neuerkrankungen insbesondere in Japan, einem Land, das immer

mehr westliche Ernährungsgewohnheiten annimmt [Denis et al., 1999], zum anderen die Tatsache, dass sich die Anzahl an Neuerkrankungen bei den in die USA ausgewanderten Asiaten spätestens in der 2. Generation an die der übrigen Amerikaner angleicht.

### **Genetische Faktoren (familiäre Disposition)**

Eine familiäre Disposition gilt seit etwa den 1950er-Jahren als erwiesen. Durch die Beobachtung von familiären Häufungen des Prostatakarzinoms konnte auf eine genetische Disposition geschlossen werden. Mittlerweile wurden mehrere Kandidaten-Gene untersucht und identifiziert, die eine Rolle in der Tumorentstehung spielen. Auf Grund der großen Variabilität und Heterogenität ist es allerdings schwierig, bestimmte Gene als alleinige Verursacher des Prostatakarzinoms zu identifizieren [Nwosu et al., 2001, Gonzalgo et al., 2003]. Sicher ist, dass die positive Familienanamnese mit einem oder mehreren betroffenen Verwandten 1. Grades ein deutlich erhöhtes, im ungünstigsten Falle ein bis zu 10-fach erhöhtes Risiko für den Betroffenen bedeutet [Steinberg et al., 1990; Carter et al., 1992; Kalish et al., 2000]. Insgesamt allerdings werden maximal etwa 10% der Prostatakarzinome ein hereditärer Mechanismus zugeschrieben. Dieser Zusammenhang ist umso ausgeprägter, je niedriger das Alter des Betroffenen bei Diagnosestellung ist. Unter dem 55. Lebensjahr gibt es eine auffällige, statistisch signifikante Häufung des familiären Prostatakarzinoms (sog. „*early-onset-disease*“) [Carter et al., 1992].

### **Umweltfaktoren**

Eine Häufung des Auftretens von Prostatakarzinomen wird in der sog. westlichen Welt beobachtet. Hierfür werden mehrere Umwelt- sowie Ernährungsfaktoren verantwortlich gemacht. So wird der Einfluss von Viren, Schwermetallen und anderen Kanzerogenen rege diskutiert.

Als gesichert und am stärksten ausgeprägt gilt jedoch der Einfluss von Ernährungsfaktoren auf die Prostatakarzinom-Prävalenz. So steht fest, dass fettreiche und faserarme Kost sowie tierische Fette mit einem erhöhten Karzinomrisiko einhergeht und umgekehrt das Risiko durch die Aufnahme von bestimmten pflanzlichen Nahrungsbestandteilen deutlich gesenkt werden kann [Whittemore et al., 1995]. Protektiv auf die Entwicklung eines Prostatakarzinoms wirken folgende Nahrungsbestandteile:

- # pflanzliche Lignane und Isoflavonoide
- # Vitamin D3 und Vitamin E
- # Selen.

Insbesondere Soja und gelbgrünes Gemüse, aber auch Hülsenfrüchte, Leinsamen und andere Getreide- und Gemüsesorten sind reich an diesen Substanzen und bieten somit eine Erklärung für die 30- bis zu 120-mal niedrigere Rate von Prostatakarzinomen in China und weiten Teilen Japans, wo diese Nahrungsbestandteile mit einem Anteil von ca. 80% vertreten sind. Analog steigt langsam die Rate von Prostatakarzinomen in Japan, wo sich die Ernährungsgewohnheiten zwar langsam wohl aber am stärksten den westlichen Ernäh-

rungsgewohnheiten annähern [Denis et al., 1999]. Lignane beispielsweise werden im Darm zu Enterolactonen und Enterodiol umgewandelt und dann resorbiert. Sie entfalten eine schwache östrogenartige Wirkung und lassen sich im Prostatasekret nachweisen (Hinweis auf die intraprostatiche Anreicherung dieser Substanzen). Darüber hinaus konnten hohe Isoflavonoidspiegel im Blut und Urin von Asiaten nachgewiesen werden [Denis et al., 1999].

Kontrovers diskutiert wird die Bedeutung der

- # Vasektomie
- # Ejakulationsfrequenz
- # hormonellen Einflüsse (kofaktoriell).

## 1.2.2 Pathologie und Klassifikation

### Histologie

Die Einteilung der Prostatatumoren erfolgt nach der histologischen Klassifikation der WHO und berücksichtigt nur maligne und potentiell maligne Geschwülste der Prostata [Mostofi et al., 2002]. Unterschieden werden dabei hauptsächlich epitheliale von nicht-epithelialen Tumoren; zusätzlich werden verschiedene von sekundären und hämatopoetisch-lymphatischen sowie unklassifizierten Tumoren unterschieden. Auch sog. Vorläuferstufen finden somit in der Klassifikation Berücksichtigung. Die wichtigsten Entitäten sind:

#### Epitheliale Tumoren

- # Vorläuferläsion: Prostatistische intraepitheliale Neoplasie (PIN)
- # **Adenokarzinom**
- # Varianten des Adenokarzinoms
  - # muzinöses Adenokarzinom
  - # adenoid-zystisches Karzinom
  - # papillär-duktales Karzinom
- # Urotheliales (Transitionalzell-) Karzinom
- # Plattenepithelkarzinom
- # Basalzellkarzinom
- # Kleinzelliges Karzinom
- # Undifferenziertes Karzinom

#### Nicht-epitheliale Tumoren

- # Rhabdomyosarkom
- # Leiomyosarkom

- # Stromasarkom
- # Andere Sarkome

### Verschiedene Tumoren

- # Karzinoidtumor
- # Karzinosarkom
- # Melanom
- # Phylloides tumor
- # Tumoren des mesonephrischen Gewebes
- # Paragangliome.

Die überwiegende Mehrheit der Prostatakarzinome (>95%) sind Adenokarzinome, die restlichen malignen Tumoren verteilen sich auf o. g. Tumorentitäten und spielen klinisch eher eine untergeordnete Rolle.

### **Stadieneinteilung**

Die Stadieneinteilung des Prostatakarzinoms erfolgt nach dem TNM-System, einer klinischen Klassifikation für maligne Tumoren. Dabei stehen die Abkürzungen für

- # T (Tumor), beschreibt die Ausdehnung des Primärtumors
- # N (Nodus), beschreibt das Fehlen bzw. Vorhandensein regionärer Lymphknotenmetastasen
- # M (Metastase), beschreibt das Fehlen bzw. Vorhandensein von Fernmetastasen

Durch das Hinzufügen von Zahlenwerten wird die anatomische Ausdehnung des malignen Prozesses angegeben.

### **Klassifikation des Prostatakarzinoms nach der TNM-Klassifikation, 6. Aufl. UICC 2002 [Wittekind et al., 2002].**

- # **T**-Stadium (Abb. 3)
  - TX** Primärtumor nicht beurteilbar
  - T0** Kein Anhalt für Primärtumor
  - T1** Inzidentelles Prostatakarzinom (weder tastbar, noch mit bildgebenden Verfahren erkennbar)
  - T1a** Inzidentelles Karzinom in 5% oder weniger des Resektionsmaterials
  - T1b** Inzidentelles Karzinom in mehr als 5% des Resektionsmaterials
  - T1c** Bioptisch gesicherter Tumor in einem oder beiden Prostatalappen der weder palpatorisch noch in der Bildgebung auffällig geworden ist.

- T2** Organbegrenztes Prostatakarzinom
- T2a** Tumor befällt die Hälfte eines Lappens oder weniger
- T2b** Tumor befällt mehr als die Hälfte eines Lappens
- T2c** Tumor befällt beide Lappen
- T3** Kapselüberschreitendes Prostatakarzinom
- T3a** Extrakapsuläres Wachstum (ein- oder beidseitig)
- T3b** Tumor infiltrierte Samenblase(n)
- T4** Tumor ist fixiert oder infiltrierte Nachbarstrukturen, die bei T3 nicht genannt sind, z.B. Blasenhalshals und/oder externen Sphinkter und/oder Rektum und/oder Levatormuskel und/oder ist an der Beckenwand fixiert.
- # **N-Stadium**
- NX** Beurteilung der regionären Lymphknoten nicht möglich
- N0** Keine regionären Lymphknotenmetastasen
- N1** Regionäre Lymphknotenmetastasen
- # **M-Stadium**
- MX** Beurteilung von Fernmetastasen nicht möglich
- M0** Fernmetastasen nicht vorhanden
- M1** Fernmetastasen
- M1a** Nicht-regionärer Lymphknotenbefall
- M1b** Knochenmetastasen
- M1c** Andere Lokalisation

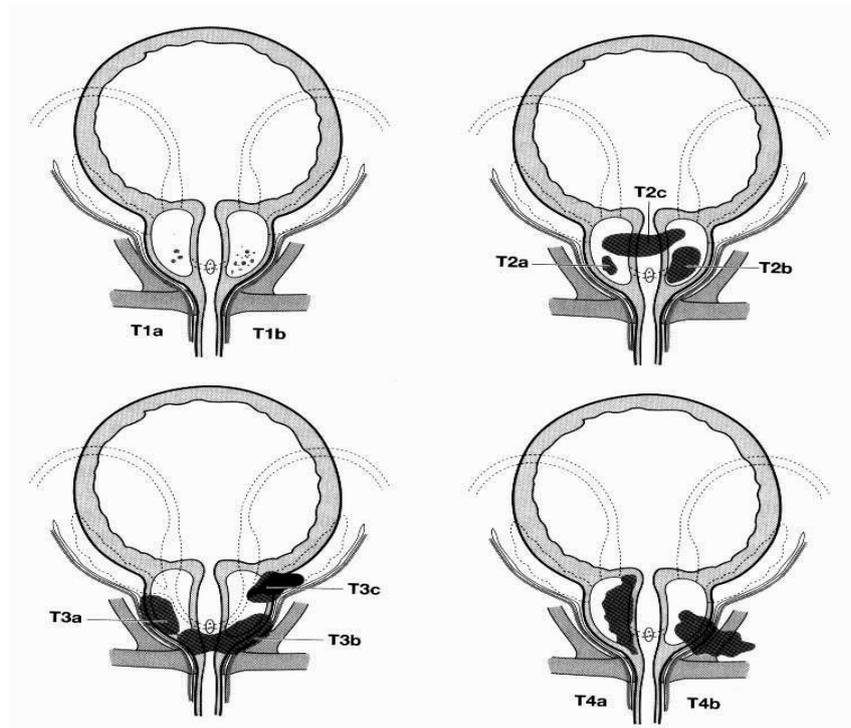


Abb. 3: T-Stadien schematisch

### Grading nach Gleason et al. 1974

Im Jahr 1974 wurde von Dr. Donald Gleason ein Einstufungssystem zur histologischen Gradierung des Prostatakarzinoms entwickelt, das sich bis heute bewährt hat [Gleason et al., 1974]. Das Wachstumsmuster und die Karzinomarchitektur des vorliegenden Karzinoms werden nach dem Ausmaß der glandulären Differenzierung und der jeweiligen Beziehung der Drüsen zum umliegenden Stroma betrachtet. Um der Multifokalität und Heterogenität von Prostatakarzinomen Rechnung zu tragen, werden Punkte für den überwiegenden Karzinomanteil (sog. primäres Grading) und Punkte für den Karzinomanteil, der die zweitgrößte Komponente bildet (sog. sekundäres Grading), vergeben.

Morphologische Kriterien führen dabei zur Punktvergabe (Abb. 4):

# **1 Punkt:**

Runde bis ovale gleichgroße Einzeldrüsen, dicht nebeneinander liegend, scharf gegen die Umgebung abgegrenzt.

# **2 Punkte:**

Etwas weniger uniforme Einzeldrüsen, getrennt durch geringe Mengen von Stroma, weniger scharf begrenzter Tumorrund.

# **3 Punkte:**

A. Unregelmäßig große und unregelmäßig gestaltete Drüsen mit gewöhnlich reichlicherem Stroma, gelegentlich auch dicht gelagert, unregelmäßige und unscharfe Tumorgrenze.

**B.** Papilläre oder kribriforme Strukturen, z. T. in großen gangähnlichen Bildungen.

# **4 Punkte:**

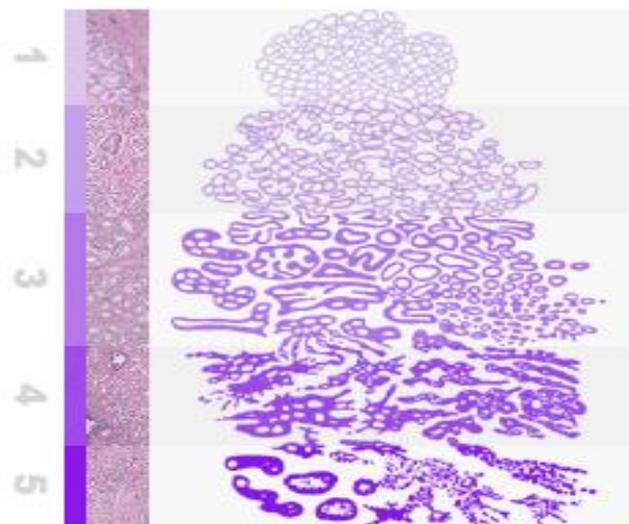
**A.** Große unregelmäßige Epithelformationen durch Drüsenverschmelzung („fused glands“) sowie verzweigte Drüsen mit unregelmäßiger Infiltration in die Umgebung.

**B.** Adenokarzinom mit ausgeprägt klarem Zytoplasma ähnlich den klarzelligen Adenokarzinomen der Niere.

# **5 Punkte:**

**A.** Scharf begrenzte runde Epithelhaufen mit meist solidem und kribriformem Bau, gewöhnlich mit zentraler Nekrose (komedo-karzinomähnlich).

**B.** Unregelmäßig begrenzte Formationen eines undifferenzierten Karzinoms, das nur durch gerade noch erkennbare Drüsenbildung oder Vakuolen (siegelringähnlich) als Adenokarzinom zu identifizieren ist.



**Abb. 4: Einteilung der histologischen Befunde nach Gleason**

Die abschließende Beurteilung erfolgt dann durch die Bildung einer Gesamtpunktzahl, den sog. Gleason-Score.

Berechnung der Gesamtpunktzahl:

# **Einheitlich strukturierte Tumoren:**

Vergebene Punkte nach obigem Schema multipliziert mit der Zahl 2 = Gleason-Score.

# **Unterschiedlich strukturierte Tumoren:**

Punktwert für den überwiegenden Anteil + Punktwert für den Anteil, der die zweitgrößte Komponente bildet = Gleason-Score.

Wenn bei Stanzbiopsien mehr als 2 dominante histologische Formationen vorhanden sind, wird für das sekundäre Grading der Anteil mit dem ungünstigsten Punktwert verwendet.

Im Hinblick auf die Prognoseabschätzung des Prostatakarzinoms hat das histologische Grading nach Gleason mittels Gleason-Score maßgebliche Bedeutung. Zu berücksichtigen ist hierbei, dass nach Validierungsstudien anhand von Gewebeproben nach Prostatektomie, der über eine herkömmliche Sextantenbiopsie gewonnene Gleason-Score den Malignitätsgrad der tatsächlichen Tumorausbreitung eher unterschätzt. Eine höhere Verlässlichkeit in Bezug auf das tatsächlich vorliegende Tumorstadium und den ermittelten Gleason-Score kann eine erweiterte Sextantenbiopsie mit >10 Probenentnahmen gewährleisten [San Francisco et al., 2003, King et al., 2004].

### **1.2.3 Diagnostik und Früherkennung**

Das Prostatakarzinom ist im Allgemeinen ein langsam wachsender Tumor, der vor allem in den Frühstadien häufig symptomlos bleibt. Aufgrund seiner überwiegend peripheren Lage innerhalb der Drüse kommt es erst in Spätstadien zu klinischen Symptomen (Ausnahme: die primären Tumoren der Periuethralzone). Hierzu zählen dann meist Miktionsbeschwerden, gelegentlich kann eine Hämaturie oder Hämatospermie auftreten. Im metastasierten Spätstadium treten dann weitere Symptome wie Kreuz- oder Beckenschmerzen durch Knochenmetastasen oder Bein- und Skrotalödeme durch Lymphknotenbefall im Becken hinzu. Allgemeine Tumorzeichen wie z. B. die Kachexie werden nur selten beobachtet und treten in sehr weit fortgeschrittenen Stadien auf.

Aus diesen Gründen empfiehlt sich eine spezielle Diagnostik zur Früherkennung dieses Tumors [Adolphs, 1991]. Die wichtigsten diagnostischen Maßnahmen zur Früherkennung des Prostatakarzinoms sind die digital-rektale Untersuchung (DRU), die Bestimmung des prostataspezifischen Antigens (PSA) sowie die transrektale Sonographie (TRUS) mit oder ohne Biopsieentnahme.

#### **Das Prostata-Spezifische-Antigen (PSA)**

Das PSA ist eine androgen-regulierte Serinprotease aus der Familie der Gewebs-Kallikrein-Proteasen und wurde erstmals 1971 durch Hara et al. beschrieben [Hara et al., 1971]. Die erste Isolierung aus dem Seminalplasma, wo es in sehr hohen Konzentrationen (bis zu 3 mg/ml) vorliegt, gelang im Jahre 1979 durch Wang et al. [Wang et al., 1979]. Es wird ausschließlich durch das sekretorische Epithel der ducti und acini der Prostata Drüsen (Epithelzellen) androgenabhängig synthetisiert und sezerniert. Das PSA ist ein Glykoprotein von ca. 30 kDa mit der biochemisch-biologischen Funktion, die Viskosität des Seminalplasmas zu erhöhen und damit die Beweglichkeit der Spermien. Dieses geschieht durch die Umwandlung von Semenogelin I und II [Balk et al., 2003]. Kontrolliert wird die Synthese des PSA über Testosteron/Dihydrotestosteron abhängige Androgenrezeptoren der epithelialen Prostatazelle [Altwein, 2001].

Im Blut liegt das PSA in zwei verschiedenen Formen vor. Ca. 80 % sind an  $\alpha$ -1-Antichymotrypsin/ $\alpha$ -2-Makroglobulin gebunden (c-PSA) und 20 % zirkulieren als freies PSA (f-PSA). C-PSA und f-PSA ergeben somit das Gesamt-PSA (t-PSA).

In der Diagnostik des Prostatakarzinoms wird das PSA als sog. Tumormarker zur Früherkennung sowie zur Verlaufsbeobachtung und Verlaufsdokumentation eingesetzt. Da es sowohl von der gesunden als auch von der erkrankten Prostata freigesetzt wird, handelt es sich um einen organspezifischen Marker (Gewebemarker) und nicht um einen karzinom-spezifischen Marker. Es ergeben sich dementsprechend Schwierigkeiten und Probleme, was die Sensitivität für das Karzinom und die Interpretation von Befunden angeht. Denn mechanische Manipulationen der Prostata, wie beispielsweise die digital-rektale Untersuchung oder Prostatabiopsien, können den PSA-Wert ebenso erhöhen wie entzündliche Veränderungen (Prostatitis), die benigne Prostatahyperplasie (BPH) oder eben das Karzinom.

Seit der Etablierung des ersten PSA-Screening-Tests im Jahre 1986 hat sich mittlerweile die Bestimmung des PSA-Wertes als wichtigste Untersuchungs- und Früherkennungsmethode neben der digital-rektalen Untersuchung etabliert [Wirth et al., 1999]. Seit der Einführung des PSA als Tumormarker erhöhte sich die Zahl der entdeckten lokalisierten Karzinome und die Zahl von Patienten mit regionalen Lymphknotenmetastasen bei Diagnosestellung [Bader et al., 2002] sank folglich.

Als Normalbereich wird ein PSA-Wert von 0-2,5 ng/ml angesehen, dennoch etablieren internationale Studien einen Cut-off-Wert von 4 ng/ml für das t-PSA im Blut von Prostatakarzinom-Patienten [Kleer et al., 1993]. Die Inzidenz eines Karzinombefalls der Prostata liegt bei Werten unter 4 ng/ml immerhin noch zwischen 4 und 9%, bei 4-10 ng/ml um 25% und ab Werten von 10 ng/ml bei 33 -42% [Catalona et al., 1997]. Thompson et al. [2003] fanden im Prostate Cancer Prevention Trial (PCPT), dass die Karzinominzidenz bei PSA-Werten unter 4 ng/ml bei bis zu 15% lag, zwischen 4 und 10 ng/ml bei 25% und bei Werten >10 ng/ml bei über 50%. Andererseits ergibt das t-PSA bei ca. 75% aller Patienten einen falsch positiven Wert, was bedeutet, dass viele Patienten mit einem falschen Karzinom-Verdacht unnötige und teils invasive weiterführende Diagnostik erhalten.

Eine leichte Verbesserung der Sensitivität und Spezifität und damit der dargestellten Problematik in der Prostatakarzinom-Diagnostik, kann durch die Berücksichtigung sog. altersspezifischer Cut-off-Werte erreicht werden. Hierbei gelten niedrigere Grenzwerte für jüngere Patienten und höhere für ältere Patienten [Ebert, 1997].

Altersspezifische PSA-Werte:

#	40-49 <2,5 ng/ml
#	50-59 <3,5 ng/ml
#	60-69 <4,5 ng/ml
#	70-79 <6,5 ng/ml
#	80 + <8,5 ng/ml

Dennoch ist der positive prädiktive Wert in der PSA-Diagnostik beunruhigend niedrig. Die Spezifität kann um bis zu 20 % erhöht werden, wenn man den Anteil des f-PSA in Beziehung zum t-PSA setzt. Je kleiner der Quotient (f-PSA/t-PSA) und somit der Anteil des f-PSA, desto wahrscheinlicher ist das Vorliegen eines Karzinoms [Catalona et al., 1997]. Auch die Kombination der PSA-Testung mit anderen Untersuchungsergebnissen kann die Aussagekraft des PSA-Wertes verbessern. So wird bei Bestimmung der PSA-Density (PSA-d) der t-PSA-Wert im Blut in Beziehung zu dem im Ultraschall (TRUS) ermittelten Prostatavolumen gesetzt. Die PSA-Velocity hingegen beschreibt die zeitliche Veränderung des t-PSA-Wertes über einen definierten Zeitabschnitt [Pearson et al., 1994]. Hierbei ist dringend zu beachten, dass immer nur Werte, die mit dem gleichen Testsystem bestimmt worden sind, verglichen werden.

### **Die digitale rektale Untersuchung (DRU)**

Die DRU ist wichtiger und fester Bestandteil der klinischen Prostatakarzinom-Diagnostik; sie ist als sehr einfache Screening-Methode anerkannt. Durchgeführt wird die Untersuchung in Steinschnittlage, Seitenlage oder auch beim vorgebeugten Patienten am besten in Knie-Ellenbogen-Lage. Nur die Karzinome in der Außenzone der Prostata sind palpabel (ca. 80%). Tumoren in der Prostata sind etwa ab einem Durchmesser von 7 mm oder ab einem Volumen von 0,5 ml tastbar. Beurteilt werden bei der DRU die

- # Größe
- # Konsistenz
- # Abgrenzbarkeit
- # Oberfläche
- # Verschieblichkeit der Rektumschleimhaut
- # Druckschmerzhaftigkeit.

Als suspekt gelten harte und knotige Bezirke der Prostata. Ein sogenannter holzharter Tastbefund ist allerdings nicht spezifisch für ein Prostatakarzinom. Daher ist eine bioptische Abklärung eines suspekten Palpationsbefundes obligat [Bartels et al., 1992]. Die Prostatakarzinomfindungsrate in einer Screening-Population durch die DRU liegt bei 0,1–4% der untersuchten Männer [Pedersen et al, 1990]. Die Sensitivität für die Diagnose eines Prostatakarzinoms beträgt in verschiedenen Studien zwischen 69-92%, die Spezifität liegt zwischen 48% und 89% [Adolphs, 1991].

Obwohl der PSA-Wert die sensitivere Methode in der Früherkennung ist, sollte auf die DRU keinesfalls verzichtet werden, da durch die DRU die PSA-negativen Tumoren entdeckt werden können. Daher sollte nach aktuellen Empfehlungen jährlich kombiniert die PSA-Bestimmung und die DRU zur Krebsvorsorgeuntersuchung durchgeführt werden.

### **Der Transrektale Ultraschall (TRUS)**

Der TRUS wird mit speziellen, hoch auflösenden Sonden durchgeführt.

Beurteilt werden bei der transrektalen Sonographie:

- # Größe (Volumen), Form und Lage
- # Echomuster, Homogenität
- # Kapsel der Prostata, Abgrenzbarkeit
- # Angrenzende Strukturen.

Prostatakarzinome stellen sich in der Mehrzahl der Fälle als echoarme Areale dar, allerdings weisen bis zu 25% der Karzinome der peripheren Zone eine Isoechogenität zum umgebenden Prostatagewebe auf. Andersherum kann auch eine karzinomfreie Prostata durch andere Pathologien wie Regression, Infarkte, Adenome oder Inflammation unterschiedliche Echogenitäten im TRUS aufweisen [Ellis et al., 1994].

Für die orientierende Stadieneinteilung ist die Frage nach Kapselüberschreitung und/oder Infiltration von Umgebungsstrukturen (Samenblasen, Rektum, Blasenhal) von Bedeutung. Die notwendige Unterscheidung zwischen intra- oder extrakapsulärem Tumorwachstum kann mittels TRUS mit guter Sensitivität und Spezifität vorgenommen werden.

### **Ultraschallgesteuerte Biopsie**

Besondere Bedeutung hat der TRUS neben der Beurteilung der Ausbreitung des Prostatakarzinoms in der Sicherung der Diagnose durch die Biopsie.

Mit speziellen Sonden können im gleichen Untersuchungsgang unter prophylaktischer Gabe von Antibiotika Gewebeproben entnommen werden. Dabei erfolgt die Biopsie entweder gezielt aus verdächtigen Organbezirken oder als systematische Mehrfachbiopsie. Aufgrund eindeutiger Vorteile gilt heute die sog. Sextantenbiopsie, bei der aus sechs Regionen der Prostata systematisch Gewebe entnommen wird, als Methode der Wahl. Die Sensitivität bei der Erstbiopsie liegt dabei bei etwa 60% [Hodge et al., 1989]. Die Sensitivität kann durch erweiterte (>6) Stanzbiopsien und/oder Re-Biopsien verbessert werden. Insbesondere große Drüsen sollten durch mehr als 6 Biopsien untersucht werden. Auch gelingt durch die systematische Biopsie die grobe Abschätzung des vorliegenden lokalen Tumorstadiums, da die Anzahl der tumorbefallenen Stanzzyylinder mit der lokalen Tumorausdehnung korreliert [Hammerer et al., 1991; Uzzo et al., 1995; Djavan et al., 2001].

### **Erweiterte Diagnostik**

Es können neben der PSA-Bestimmung, der DRU und dem TRUS mit/ohne Biopsie weitere apparative Untersuchungen in der Karzinomdiagnostik eingesetzt werden:

- # Computertomographie (CT)
- # Magnetresonanztomographie (MRT)
- # Knochenszintigraphie (KS).

Diese Untersuchungen spielen in der Primärdiagnostik des Prostatakarzinoms allerdings keine oder nur eine sehr untergeordnete Rolle im Rahmen der erweiterten Ausbreitungsdi-

agnostik (Staging) bei fortgeschrittenen Tumorstadien oder der erweiterten Behandlungsplanung.

Der zusätzliche Informationsgewinn einer CT-Untersuchung gegenüber dem TRUS und der DRU ist sehr gering, daher spielt es in der Primärdiagnostik keine Rolle. Im Rahmen des Staging kann es bei höheren T-Stadien ein organüberschreitendes Wachstum anzeigen. Regelmäßig zum Einsatz kommt die CT im Rahmen der Planung einer Strahlentherapie.

Das MRT kann durch das hohe Auflösungsvermögen zur Bestimmung der lokalen Tumorausdehnung beitragen (Infiltration des periprostatichen Fettgewebes in T1 und von Nachbarorganen in T2), hier steht der zusätzliche Informationsgewinn aber einer schlechten Kosten-Nutzen-Relation im Vergleich zur DRU und dem TRUS gegenüber. Deshalb ist das MRT nur speziellen Fragestellungen vorbehalten.

Das Knochenszintigramm hingegen hat seinen festen Stellenwert im M-Staging des Prostatakarzinoms. Diese Untersuchung hat eine 100% Sensitivität bei sehr geringer Spezifität, da alle stoffwechselaktiven Umbauvorgänge im Knochen detektiert werden können. Die Indikation zur Untersuchung wird vor allem in Abhängigkeit vom PSA-Wert gestellt. Die Grenze wird dabei bei etwa 10 ng/ml gesehen, da bei Werten unter 10 ng/ml die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen von Knochenmetastasen als extrem gering anzusehen ist [Oesterling et al., 1993]. Positive Befunde im Knochenszintigramm müssen in einer weiteren nativröntgenologischen Untersuchung abgeklärt werden.

#### 1.2.4 Therapie

Die Behandlung des Prostatakarzinoms erfolgt in Abhängigkeit vom klinischen Stadium, sog. stadiengerechte Therapie des Prostatakarzinoms. Entscheidend hierbei ist, ob ein lokal begrenzter, lokal fortgeschrittener oder metastasierter Tumor vorliegt. Verschiedene Faktoren müssen vor der Therapieentscheidung berücksichtigt werden, die wichtigsten sind:

- # Höhe des PSA-Wertes
- # Alter
- # Lebenserwartung
- # Gleason-Score.

Neben den harten klinischen Fakten ist der Patientenwunsch zu respektieren und im Rahmen der Aufklärung ist der Patient auch über die Alternativen wie das sog. „watchful-waiting“ zu informieren. Werden alle Faktoren berücksichtigt, kann gemeinsam mit dem Patienten eine Therapieentscheidung getroffen werden.

Bei den Therapieverfahren werden kurative von nicht-kurativen Therapieansätzen unterschieden. Ein kurativer Therapieansatz erscheint nur für lokal begrenzte Tumorstadien, also bis zum Tumorstadium T3a, sinnvoll. Als Behandlung kommen die radikale Prostatek-

tomie, die externe Strahlentherapie und die Brachytherapie infrage. Auch eine Kombination dieser Verfahren mit additiver bzw. adjuvanter Strahlentherapie ist möglich. Eine vergleichende Übersicht der Behandlungsergebnisse von T2-Tumoren zeigte zum Teil erhebliche Unterschiede in den einzelnen Patientengruppen wegen unterschiedlicher Selektionskriterien und mangelnder Definition von einheitlichen Progressionskriterien [Middleton, 1994, 1995]. Dennoch sind die Behandlungsverfahren in den frühen lokalisierten Stadien hinsichtlich der Ergebnisse vergleichbar.

Beim lokal fortgeschrittenen Prostatakarzinom kommt überwiegend die externe Strahlentherapie, evtl. auch kombiniert mit der High-Dose-Rate-Brachytherapie, zur Anwendung. Kombinationen mit einer neoadjuvanten oder adjuvanten temporären oder permanenten Hormonablation werden durchgeführt. Auch eine radikale Operation kann in Betracht gezogen werden, insbesondere um lokale Spätkomplikationen durch den Primärtumor zu vermeiden.

Bei bestimmten Patienten hohen Alters oder mit einem hohen Behandlungsrisiko mit klinisch insignifikanten Karzinomen kann die „watchful-waiting“-Strategie durchaus sinnvoll sein. Hierbei wird durch engmaschiges klinisches Monitoring mittels PSA-Wert-Bestimmung, DRU und TRUS der Verlauf beobachtet. Die Patienten können so einer invasiven Therapie ganz und gar entgehen oder im Verlauf jederzeit einer Behandlung zugeführt werden.

Das metastasierte Prostatakarzinom erfordert eine systemische Behandlung durch hormonablative Verfahren (chirurgische oder medikamentöse Kastration) und/oder eine zytostatische Chemotherapie als Mono- oder Kombinationstherapie. Bei hormon- und androgeninsensitiven Tumoren wird die alleinige Chemotherapie eingesetzt [Wirth 2001]. Auch müssen beim metastasierten Tumorleiden unter Umständen lokale Komplikationen im Becken oder auch Fernmetastasen mitbehandelt werden. Eine professionelle Schmerztherapie muss dann in der Regel ebenfalls erfolgen. Die Wertigkeit anderer Therapieverfahren wie der Kryotherapie, der hochintensive fokussierte Ultraschall (HIFU), die Photonentherapie, die photodynamische Therapie oder Laserverfahren ist nicht abschließend geklärt.

## **1.3 Tumorbiologie**

### **1.3.1 Neoplastische Transformationen**

Als neoplastische Transformation bezeichnet man eine Summe von Einzelvorgängen, die eine normale Zelle zu unkontrolliertem Wachstum und somit zur Malignität verhilft. Die malignen Eigenschaften einer Tumorzelle sind u. a. charakterisiert durch folgende biologischen Merkmale:

- # Klonale Proliferation
- # Autonomes Wachstum

- # Anaplasie
- # Fähigkeit zur Metastasierung.

Die neoplastische Transformation (sog. Karzinogenese) stellt einen schrittweise ablaufenden Prozess dar. Vereinfacht dargestellt lässt er sich auf 3 Schritte (klassisches, hypothetisches Dreistufenmodell der Karzinogenese) zusammenfassen:

- # Initiation
- # Promotion
- # Transformation/Progression.

Für das initiierende Ereignis dieser Kaskade muss die DNA einer Zelle auf chromosomaler Ebene geschädigt werden. Diese sogenannten genetischen und/oder epigenetischen Schädigungen der DNA werden z. B. durch einzelne spontane Mutationen, durch einen hereditären Mechanismus oder auch durch Umweltfaktoren wie Karzinogene, die genotoxisch wirken oder epigenetische Auswirkungen verursachen können, verursacht. Diese initiale DNA-Veränderung führt dann, sofern sie nicht durch Apoptose (programmierter Zelltod) oder DNA-Reparaturmechanismen eliminiert werden, zu einer Mutation in der betroffenen Zelle. Liegt diese Mutation im Promoterbereich eines Gens, kann dies zu einer veränderten Genexpression führen. Es ist auch möglich, dass die Mutation im kodierenden Bereich oder Spleißbereich liegt; in diesem Fall kann ein inaktives, bzw. dauerhaft aktives Protein entstehen. Wenn DNA-Abschnitte betroffen sind, die für die Kontrolle des Zellzyklus oder der Zellteilung verantwortlich sind, entsteht ein Zellklon, der häufig einen Selektionsvorteil gegenüber dem Ursprungsgewebe hat und somit einen Tumor ausbildet (Stadium der Promotion). In diesem Stadium ist der initiierte Zellklon noch auf bestimmte Stimuli angewiesen, die eine weitere Proliferation erlauben und fördern. Entsprechende Stimuli können humorale Wachstumssignale (z. B. Wachstumsfaktoren oder Hormone), chronische Entzündungsprozesse (z. B. die proliferative inflammatorische Atrophie der Prostata [Nelson et. al., 2003]) oder weitere Umweltfaktoren sein. Die weitere Umwandlung des benignen Tumors zu einem invasiv wachsenden, metastasierenden Tumor durch weitere Anhäufung von genetischen und epigenetischen Veränderungen wird als Progression/ Transformation bezeichnet. Dieser Vorgang wird, bei evtl. ausgeschalteten Kontroll- und Reparaturmechanismen, durch die erhöhte Proliferationsrate unter dem anhaltenden entsprechenden Stimulus stark begünstigt.

### **Multi-Hit-Konzept**

Aktuellere Konzepte gehen nicht mehr von drei streng aufeinander folgenden Schritten bei der Krebsentstehung aus, sondern beschreiben ein Mehrstufenmodell (sog. „Multi-Hit-Konzept“). Mehrere genetische und epigenetische Ereignisse laufen demnach unabhängig voneinander ab. Dabei kommt es zur Akkumulation von strukturellen Veränderungen der Erbsubstanz und/ oder zur Veränderung der Expression von Schlüsselgenen („critical target genes“), was dann die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten weiterer Mutationen erhöht und schließlich zur Krebsentstehung führt. Als Schlüssel-Gene werden sogenannte (Proto)-

Onkogene und Tumorsuppressorgene (TSGs) bezeichnet, die für Proteine kodieren, die wichtige biologische Funktionen im Zellzyklus, bei der Signaltransduktion, der Zelldifferenzierung und der Zellproliferation übernehmen [Bishop 1987; Weinstein et al. 1988; Harris 1991; Vogelstein 1993; Perera 1996].

### 1.3.2 Onkogene und Tumorsuppressorgene

Protoonkogene, als Bestandteile des normalen menschlichen Genoms und somit per se nicht pathogen, kodieren für folgende Proteinklassen:

- # Proteinkinasen
- # G-Proteine
- # Wachstums- und Transkriptionsfaktoren
- # Wachstumsfaktorrezeptoren
- # sowie Onkogene aus Viren.

Bei Aktivierung zum Onkogen haben sie einen aktivierenden Einfluss auf die entsprechende Zelle, beeinflussen also den malignen Phänotyp aktiv.

Potentielle Mechanismen der Onkogen-Aktivierung sind:

- # Translokation
- # Amplifikation
- # Punktmutation.

Onkogene haben dabei einen dominanten Einfluss auf die Zelle, d. h. die Veränderung nur eines der beiden Allele bedingt die Ausprägung des entsprechenden Merkmals [Dirks et al., 1999].

Die Existenz von Tumorsuppressorgenen (TSGs) und deren Rolle in der Tumorentstehung wurde erstmals von Knudson et al. durch statistische Untersuchungen von Patienten mit Retinoblastomen beschrieben. Seine Theorie konnte 1990 durch Goodrich et al. bestätigt werden. Demnach führt der Verlust beider Allele des Retinoblastom-Gens (*RB*-Gen) zum Auftreten des Tumors [Knudson et al., 1971; Goodrich et al., 1990].

Anders als Onkogene haben TSGs einen hemmenden Einfluss auf die Zellteilung und Zelldifferenzierung, kontrollieren also den Zellzyklus durch folgende verschiedene Mechanismen:

- # Anhalten des Zellzyklus (Zellzyklusarrest)
- # Einleitung der Apoptose
- # DNA-Reparatur
- # Unterdrückung von Wachstumsfaktoren.

Demnach muss es zum Verlust oder zu der Inaktivierung des jeweiligen TSGs kommen, um zu einer neoplastischen Transformation einer Zelle beizutragen. Mechanismen der Inaktivierung von TSGs sind:

- # Mutation/ Deletion
  - # Methylierung der CpG-Region im Promotor (>Expressionsverlust)
- [Jones et al., 1999].

Die Wirkung von TSGs ist rezessiv, d. h. erst die Inaktivierung beider Allele führt zum vollständigen Funktionsverlust. Zusätzlich muss es zur Akkumulation weiterer Mutationen, wie z. B. in Onkogenen derselben Zelle, kommen, damit eine unkontrollierte Proliferation resultiert [Knudson, 1972].

### 1.3.3 Initiation und Proliferation des Prostatakarzinoms

Die Initiation und Proliferation des Prostatakarzinoms geht meist von dem Epithelgewebe der exokrinen Drüsen aus (> 95 % Adenokarzinome). Wie bei allen Krebserkrankungen liegt auch dem Prostatakarzinom letztlich die kumulative Veränderung von verschiedenen Genen zugrunde (Initiierung), bevor ein lokalisiertes Prostatakarzinom entsteht. Mutationen in Genen, die für DNA-Reparaturproteine kodieren, führen dabei zur Akkumulation von Replikationsfehlern und letztlich zu einer steigenden Karzinogeneserate der einzelnen Zellen, da diese Zellklone einen Selektionsvorteil aufweisen. Über einen Zeitraum von Monaten bis Jahren bilden sich dann einzelne Zellcluster und Foci innerhalb der Prostata aus, die jeweils ein unterschiedlich stark verändertes Genom aufweisen [Qian et al., 1995]. Eine typische Adenom-Karzinom-Sequenz liegt beim Prostatakarzinom nicht vor, vielmehr finden sich sehr heterogene genetische und epigenetische Veränderungen der einzelnen Tumorzellen. Diese histologische und genetische Heterogenität des Prostatakarzinoms erschwert die genaue Bestimmung der klinischen und pathologischen Stadien. Auch die Analyse molekularer Veränderungen ist folglich erschwert und eine exakte Prognose über die Progression und das Rezidivrisiko des Prostatakarzinoms ist nicht immer möglich [Gleason, 1992; Strohmeyer et al., 2004].

### 1.3.4 Molekulare Progression

Die schrittweise Entwicklung des Karzinoms erfolgt über Monate und Jahre ausgehend von der normalen Prostatazelle, die vielfältige genetische Alterationen akkumuliert (z. B. Verlust von Chromosom 8 oder reduzierter Vitamin-D-Rezeptor-Aktivität, u.v.m.), zum lokalisierten Prostatakarzinom. Nach Anhäufung weiterer genetischer Veränderungen innerhalb einzelner Zellen des Primärtumors (z. B. Verlust von Chromosom 16, p53 Inaktivierung, u.v.m.), kann sich ein metastasiertes Prostatakarzinom entwickeln. Dieser mehrstufige Prozess wird als molekulare Progression des Prostatakarzinoms bezeichnet. Weitere Veränderungen im Spätstadium können dann zur Androgen-Unabhängigkeit des Prostatakarzinoms führen (z. B. PTEN-Mutation oder Mutation des Androgen-Rezeptors (AR)), was die Be-

handlung erheblich erschwert, da eine Hormonablation nicht mehr wirksam ist [Nelson et al., 2003; Karayi et al., 2004].

## 1.4 Repetitive DNA-Abschnitte

### Organisation des menschlichen Genoms

Der diploide humane Chromosomensatz besteht aus 6400 Giga-Basenpaaren DNA, jeweils die Hälfte mütterlichen und väterlichen Ursprungs. Zusätzlich wird ein kleiner Teil (~16,5 kilo-Basenpaare) an mitochondrialer DNA mütterlicherseits vererbt, dieser Anteil am gesamten Genom beträgt etwa 0,0003 %. Im Rahmen des humanen Genomprojektes [Venter et al., 2001; Istrail et al., 2004] wurde klar, dass nur etwa 25- 30% des Genoms für Exons (1 %) und Introns (24%), also für Gene und an Genen assoziierte DNA-Abschnitte kodieren. Die Funktion des restlichen und überwiegenden Anteils der menschlichen DNA (75 %), die sogenannten extragenetischen DNA-Abschnitte, ist somit bis heute nicht vollständig geklärt [Venter et al. 2001].

Große Anteile dieser extragenetischen DNA (~15%) werden als repetitive DNA-Elemente bezeichnet und liegen in langen Abschnitten zwischen kodierenden DNA-Sequenzen. Die genaue biologische Funktion ist unbekannt. Ungefähr die Hälfte der repetitiven Sequenzen besteht aus sog. SINE- und LINE-Abschnitten (short bzw. long interspersed repetitive elements) und die andere Hälfte aus „Tandem-Repeat-Sequenzen“ der sog. Satelliten-DNA. Dabei werden Satelliten von Mini- und Mikrosatelliten (je nach Länge der Basenpaare) unterschieden. Die Satelliten-DNA besteht aus kurzen hintereinander geschalteten (sog. „tandem“) repetitiven DNA-Abschnitten. Im Bereich der Chromosomenzentromere befinden sich vor allem AT-reiche Sequenzen, auch kommen dort GGAAT-Wiederholungen vor. Besonders in Subtelomer-Bereichen liegen die Minisatelliten, die aus Kopien von DNA-Abschnitten zwischen 16-64 Basenpaaren bestehen [Li et al., 2001; Bennet, 2000].

#### 1.4.1 Mikrosatelliten

Mikrosatelliten-DNA, auch als „short-tandem-repeats“ (STRs) bezeichnet, bestehen aus sehr einfachen Sequenzwiederholungen von 1-6 Basenpaaren (z. B. CA, AC, AG, GAG, AAN oder AAAG) und kommen im gesamten Genom vor. Sie liegen meist in nicht kodierenden DNA-Abschnitten, aber auch die Lokalisation in Exons ist möglich [Weber et al., 1989]. Die Größe der Sequenzwiederholungen beträgt 10-50 bp. Mono- und Dinukleotidwiederholungen kommen dabei am häufigsten, etwa einmal pro 30 kb, vor. Dabei sind bestimmte Wiederholungen häufiger als andere (z. B. sind (AC)<sub>n</sub> und (AT)<sub>n</sub> häufiger als (AG)<sub>n</sub> und (GC)<sub>n</sub>). Die Tri-, Tetra- und vor allem die Penta- und Hexanukleotidwiederholungen sind deutlich seltener. Vereinfacht lässt sich sagen, dass die Vielfalt der Mikrosatelliten mit der Anzahl an Nukleotidwiederholungen abnimmt [Subramanian et al. 2003].

### **1.4.2 Mikrosatelliten-Längen-Polymorphismus**

Mikrosatelliten zeigen einen ausgeprägten Längenpolymorphismus, da maternales und paternales Allel unterschiedlich lange Mikrosatellitenwiederholungssequenzen aufweisen. Somit trägt jedes Individuum ein einzigartiges Set an Mikrosatelliten in seinem Genom und gibt dieses an die Nachkommen weiter. Der Vererbungsmodus des Längenpolymorphismus folgt dabei den Mendelschen Vererbungsregeln und ist kodominant.

Wegen der Heterogenität und wegen des ubiquitären Vorkommens im gesamten Genom ist die Analyse von Mikrosatelliten weit verbreitet, z. B. bei der Anwendung zu Bevölkerungsanalysen, evolutionsbiologischen Fragestellungen oder bei forensischen Problemstellungen zur Identifizierung von Personen sowie dem Vaterschaftsnachweis. Auch in der Tumorbilogie werden mit Hilfe von Mikrosatelliten-DNA Genanalysen durchgeführt. Aufgrund des Längenpolymorphismus können nach Amplifikation der DNA mit spezifischen Primern die beiden Allele auf einem Polyacrylamidgel oder mit Hilfe der Kapillarelektrophorese aufgetrennt werden [Koreth et al. 1996, Tòth et al. 2000, Forster et al. 2000].

Gemäß des experimentellen Ansatzes dieser Arbeit kann, wenn die angrenzende DNA-Sequenz eines Genabschnittes bekannt ist, gezielt mit o. g. Methode nach DNA-Alterationen wie LOH oder MSI gesucht werden.

### **1.4.3 Postreplikative DNA-Reparatur und DNA-Mismatch-Reparatur**

Die Replikation von Mikrosatelliten-DNA kann zu einer erhöhten Fehlerrate beim Ablesen des Matrizenstrangs führen. Während der Replikation werden normalerweise falsch eingebaute Nukleotide durch die 3'-5'-Exonuklease erkannt und können entfernt werden. Dies funktioniert allerdings nicht immer fehlerfrei, so dass entstandene Falschpaarungen, die sog. „Mismatches“, in der replizierten DNA bestehen bleiben können. Diese Falschpaarungen können dann zu Verkürzungen oder Verlängerungen des synthetisierten DNA-Stranges führen. Falls die resultierenden „Mismatches“ in kodierenden Bereichen von Genen liegen, ist diese Längenveränderung potentiell mutagen.

Zusätzlich besitzen Zellen die Fähigkeit mit einem postreplikativen DNA-Reparatursystem (DNA-mismatch-repair (MMR)-System) diese Fehler wieder zu korrigieren. Dabei wird postreplikativ, unter Beteiligung mehrerer MMR-Gene, der Fehler korrigiert und die Stabilität des Genoms kann bewahrt werden [Karran et al., 1994].

### **1.4.4 Mikrosatellitenalterationen**

Zwei unterschiedliche Formen von Mikrosatellitenalterationen sind beschrieben. Zum einen die Mikrosatelliteninstabilität (MIS), welche eine Amplifikation von Allelen bezeichnet und zum anderen das sogenannte „Loss of Heterozygosity“ (LOH), welches einen kompletten Allel-Verlust bezeichnet.

Beide Formen der Mikrosatellitenalteration können mit ein und derselben Untersuchungsmethode nachgewiesen werden, sofern ein Längenpolymorphismus zwischen väterlichem

und mütterlichem Allel vorliegt. In einem solchen informativen Fall können beide Allele, nach Amplifikation mit einem entsprechenden Primerpaar, elektrophoretisch aufgetrennt werden. Wenn sich die beiden Allele in ihrer Länge nicht unterscheiden (fehlende Heterogenität), erfolgt keine Auftrennung und es liegt ein sog. nicht informativer Fall vor (NI). Es liegt dann nur ein Peak in der Kapillarelektrophorese vor (Homozygote Ausprägung).

Eine MSI ist das Resultat von Fehlern in den postreplikativen Reparatursystemen, somit resultiert entweder eine Verlängerung oder Verkürzung der jeweiligen Mikrosatellitensequenz. Die Detektion von MSI gelang erstmals in Tumoren von HNPCC-Patienten (hereditary nonpolyposis colorectal cancer) [Aaltonen et al., 1993], aber auch bei Prostatakarzinomen gelang der Nachweis von MSI [Rohrbach et al., 1999].

Der Verlust (Deletion) von ganzen DNA-Segmenten wird als LOH bezeichnet. Bei der Replikation kann es wegen der genannten Eigenschaften der replikativen DNA-Elemente zu Falschpaarungen kommen. Durch ein sog. „slippage“ entlang des Matrizenstranges kann ein vollständiger Verlust (Deletion) eines Allels resultieren. Kommt es zusätzlich zu einer Veränderung des zweiten Allels des betroffenen Gens, beispielsweise durch eine Punktmutation oder durch andere Mechanismen, führt dies zu einem kompletten Expressionsverlust des betroffenen Gens [Knudson 1971; Jones et al., 1999].

## 1.5 Zirkulierende Nukleinsäuren

### 1.5.1 Zellfreie, zirkulierende DNA (f-DNA) im Blut

Den ersten Nachweis frei zirkulierender Nukleinsäuren im Blut erbrachten Mandel und Métails im Jahre 1948. Erst 30 Jahre später konnte gezeigt werden, dass die Konzentration an f-DNA im Blut von Tumorpatienten gegenüber Gesunden signifikant erhöht ist. Bei Patienten mit metastasierten Tumorstadien war etwa doppelt so viel f-DNA im Blut nachweisbar wie bei Patienten mit lokalisierten Karzinomen, was einen möglichen Zusammenhang zwischen der Progression des Tumors und der Menge an f-DNA im Blut anzeigt. Auch ein Effekt der Therapie auf die Konzentrationen der f-DNA im Blut konnte beobachtet werden [Leon et al., 1975, 1977; Stroun et al., 1987]. Die Herkunft bzw. die genauen Mechanismen der Freisetzung von f-DNA sind noch nicht abschließend geklärt. Ein multifaktorieller Mechanismus wird angenommen. Die f-DNA stammt je nach Größe der DNA-Fragmente von apoptotischen oder nekrotischen Zellen, aber auch eine aktive Sekretion der DNA ins Blut wird diskutiert [Jahr et al., 2001; Stroun et al., 2001]. Mittlerweile wurden für verschiedene Tumorentitäten erhöhte f-DNA-Spiegel im Blut nachgewiesen, so auch beim Prostatakarzinom [Schwarzenbach et al., 2011]. An der f-DNA durchgeführte molekulargenetische Analysen konnten zeigen, dass genetische Alterationen des Primärtumorgewebes im Blut an der zirkulierenden f-DNA nachweisbar sind [Bruhn et al., 2000]. Auf Grund des Vorhandenseins gesunder DNA im Blut und der Heterogenität des Tumors lassen sich aber nicht alle genetischen Alterationen, die im Primärtumor nachgewiesen werden können, auch in der f-DNA nachweisen. Diese Ergebnisse sind mittlerweile für viele

Tumorentitäten erhoben und reproduziert worden [Fleischhacker et al., 2007; Schwarzenbach et al., 2011] und der Nachweis tumorspezifischer Aberrationen an f-DNA aus Körperflüssigkeiten wie Blut, Urin und Knochenmark hat einen festen Stellenwert in der Grundlagenforschung erhalten. Dieses wird auch in Zukunft für die Etablierung neuer diagnostischer Methoden von Bedeutung sein [Goessl et al., 2002; Schwarzenbach et al., 2011].

### **1.5.2 Zellfreie DNA (f-DNA) im Knochenmark**

Knochenmark unterscheidet sich gegenüber dem schnell zirkulierenden Blut als bevorzugtes Kompartiment für die Anreicherung von Krebszellen, speziell bei einigen Tumorentitäten wie dem Prostatakarzinom oder dem Mammakarzinom. Aufgrund dieser Tatsache könnte das Knochenmark eine interessante Quelle für freigewordene Tumor-DNA darstellen [Schwarzenbach et al., 2007]. Auch im Knochenmark kann die DNA dabei theoretisch entweder von disseminierten Tumorzellen (DTCs) oder von apoptotischen Tumorzellen aus Knochenmetastasen stammen. Der Übertritt aus dem Blut wäre ebenfalls denkbar. Mittels Punktion und Aspiration kann Knochenmark zur Untersuchung gewonnen werden und ist dann einer weiteren Untersuchung zugänglich.

### **1.5.3 Studien zur Analyse zellfreier DNA im Blut bei Prostatakarzinom-Patienten**

Mehrere Studien haben sich mit Untersuchungen an f-DNA bei Prostatakarzinom-Patienten befasst. Dabei konnte deren Einsatz als suffizienter molekularer Marker belegt werden, der bei Prostatakarzinom-Patienten gegenüber gesunden Kontrollen signifikant erhöht ist [Papadopoulo et al., 2004; Boddy et al., 2005]. Bei Jung et al. war die Erhöhung der zellfreien DNA im Plasma mit dem Vorliegen von Lymphknoten- und Fernmetastasen assoziiert, es zeigte sich zudem eine gute Assoziation mit den Serum-PSA-Werten und dem Gesamtüberleben [Jung et al., 2004]. Chun et al. zeigten, dass tumorassoziierte f-DNA im Blut als unabhängiger und informativer Prädiktor für das Prostatakarzinom dienen kann [Chun et al., 2006].

## **1.6 Mechanismen der Metastasierung**

Die Metastasierung stellt heute trotz moderner multimodaler Therapiekonzepte weiterhin den entscheidenden prognostischen Faktor im Hinblick auf das Überleben einer Krebserkrankung dar. Sie ist ein sehr komplexer schrittweiser, mehrstufig und kaskadenartig ablaufender Prozess, der bis heute noch nicht genau verstanden wird und stets Gegenstand intensiver Forschungsbemühungen ist. Die genaue Kenntnis von den molekularen Vorgängen, die zur manifesten Metastasierung führen, wäre von entscheidender Bedeutung für eine verbesserte Risikostratifizierung der einzelnen Patienten und für die Entwicklung neuer medikamentöser Therapieverfahren [Pantel und Wölfle, 2005; Eccles und Welch, 2007].

Die Metastasierung beim Prostatakarzinom erfolgt bevorzugt hämatogen in die Knochen, aber auch lymphogen entlang der Obturator-, sacralen, inguinalen, pelvinen, paraaortalen und selten auch den mediastinalen Lymphknotenstationen. Die hämatogene Metastasierung

erfolgt überwiegend in das Skelettsystem (ossäre Metastasierung), hierbei findet sich meist primär ein Befall des Achsskeletts (Becken, Wirbelsäule, Oberschenkelknochen). Seltener werden andere Organsysteme wie die Lunge oder die Leber befallen. Gut 80-90 % der an einem Prostatakarzinom verstorbenen Patienten weisen eine ossäre Metastasierung auf [Hautmann und Huland, 2006].

Im Verlaufe der molekularen Progression des Prostatakarzinoms, in der viele genetische Alterationen akkumulieren und einzelne Zellklone neue Eigenschaften generieren, werden ausgehend von der Neoangio- und Lymphangiogenese, die folgenden Schritte vom lokalisierten bis zum metastasierenden Prostatakarzinom durchlaufen [Arya et al., 2006]:

- # Verlust der Zelladhäsion
- # Degradation des lokalen Stromas und Migration
- # Invasion in das Gefäßsystem
- # Überleben in der Zirkulation
- # „Homing“ zum Zielorgan
- # Endothelinteraktion
- # Extravasation in das sekundäre Organ
- # Erneute Proliferation im fremden Milieu zu sekundären Tumoren.

In Prostatazellen, die diese Kaskade durchlaufen, lassen sich bis zu 100 unterschiedliche Proteinveränderungen oder -verluste nachweisen. Es handelt sich also um einen speziellen metastatischen Phänotyp [Varambally et al., 2005].

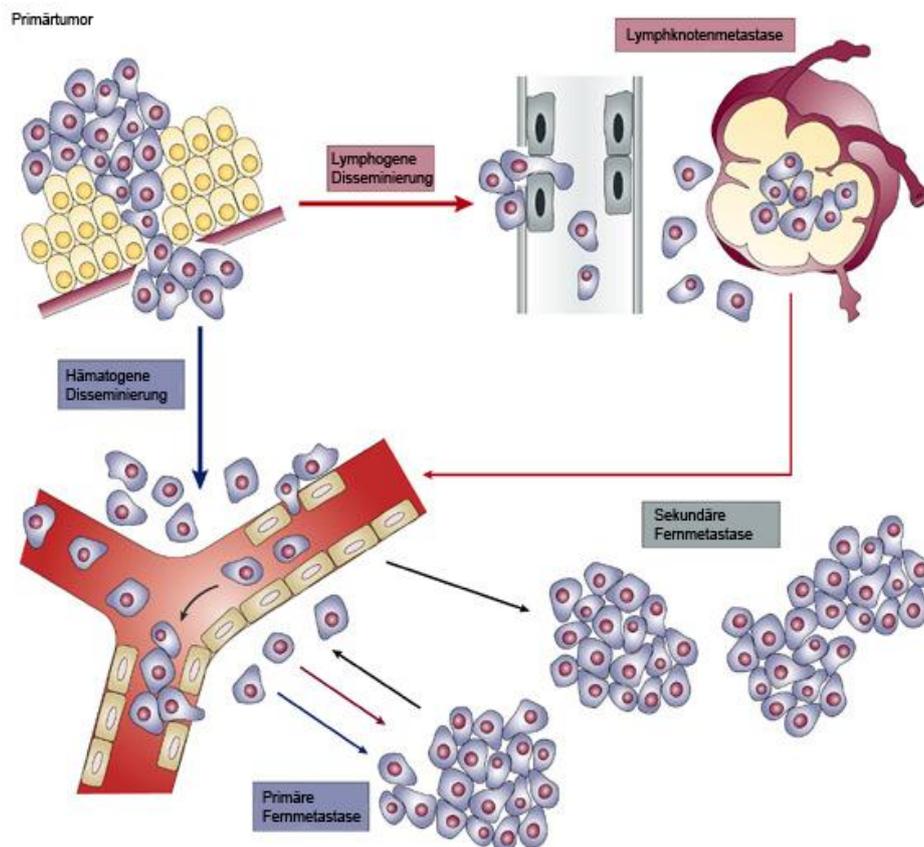
### **1.6.1 Disseminierte Tumorzellen (DTC)**

Bei disseminierten Tumorzellen (DTC) handelt es sich definitionsgemäß um einzelne Tumorzellen oder kleine Tumorzellcluster, die in einem Sekundärorgan nachweisbar sind, aber noch keine „manifeste“ Metastase ausgebildet haben. Dies unterscheidet sie von zirkulierenden Tumorzellen (CTC), die noch keine Extravasation aus dem Gefäßsystem vollzogen haben. Die Begriffe CTC und DTC sind somit nicht synonym zu gebrauchen.

DTC sind durch spezielle Anreicherungs- und Detektionstechniken nachweisbar. Ein häufiges Zielorgan für die DTC stellt das Knochenmark dar, welches einer Untersuchung verhältnismäßig leicht zugänglich ist. Mittlerweile sind bei vielen epithelialen Tumorentitäten bereits in frühen Tumorstadien DTC im Knochenmark nachgewiesen worden [Pantel und Brakenhoff, 2004; Alix-Panabières et al., 2008].

Entgegen dem klassischen Metastasierungsmodell, wonach die Metastasierung ein eher spätes Ereignis einiger „ausreichend“ aggressiver Zellklone darstellt, handelt es sich bei der Disseminierung von Tumorzellen häufig um ein frühes Ereignis in der Tumorgenese. Die überwiegende Anzahl von Tumorzellen des Primärtumors scheinen hierzu in der Lage zu sein [Bernards und Weinberg, 2002; Pantel und Brakenhoff, 2004].

Nach dem Metastasierungsmodell von Pantel und Brakenhoff gibt es zwei potentielle Möglichkeiten der Tumorzell-disseminierung, die hämatogene oder die lymphogene, die sich gegenseitig nicht ausschließen und die eine Diskrepanz zwischen Lymphknoten- und Fernmetastasen-Status gut erklären können. Auch die Abhängigkeit von Fernmetastasen von einem positiven Lymphknotenstatus, wie bei einigen Tumoren zu beobachten, ist durch dieses Modell gut erklärbar. Ob eine Tumorzelle eine Präferenz für die hämatogene oder die lymphogene Metastasierung hat, scheint genetisch determiniert zu sein [Wölfle et al., 2003]. Ausgehend von ausgebildeten primären Fern- oder Lymphknotenmetastasen können durch erneute Tumorzell-Disseminierung aus den primären Metastasen sekundäre Fernmetastasen entstehen [Pantel und Brakenhoff, 2004; (Abb.5)]. Auch die erneute Ansiedelung im ursprünglichen Organ, auch als „self-seeding“ oder „cross-seeding“ bezeichnet, ist möglich. Diskutiert wird, ob diese Zellen auch für Lokalrezidive verantwortlich sind [Kim et al., 2009; Aguirre-Ghiso et al., 2010].



**Abb. 5:** Metastasierungskaskade nach Pantel und Brakenhoff, 2004, modifiziert. Dargestellt sind zwei mögliche Metastasierungswege, die lymphogene und die hämatogene Metastasierung. Bestehende primäre Fernmetastasen können durch erneute Disseminierung sekundäre Fernmetastasen ausbilden.

### 1.6.2 Minimale residuelle Krebserkrankung und Tumor-Dormancy

Der klinisch manifesten Metastasierung mit Ausbildung solider Fernmetastasen, die durch klinische Symptomatik und technisch-apparative Diagnostik erkennbar werden, geht also eine frühzeitige Tumorzell-Disseminierung voraus. Da diese Zellen oder Zell-Aggregate selbst hochauflösenden radiologischen Untersuchungsmethoden entgehen und keine klinische Symptomatik verursachen, wird der Nachweis dieser DTCs auch als minimale residuelle Krebserkrankung (minimal residual disease = MRD) bezeichnet [Dearnaley et al., 1981].

Dabei bilden nicht alle DTCs im Verlauf Fernmetastasen aus. Viele DTCs befinden sich nach Einwanderung in das jeweilige Zielorgan in einer Art Latenzzustand, der unterschiedlich lange andauern kann. Dieser Latenzzustand wird als Tumor-Dormancy bezeichnet und ist sehr komplex reguliert. Der Mechanismus, der die Dormancy reguliert und beenden kann („escape of dormancy“) ist bis heute nicht vollständig verstanden [Pantel et al., 2009; Wikman et al., 2008; Aguirre-Ghiso 2007]. Einen Einfluss auf die Aktivierung der Tumorzellen aus der Latenz haben:

- # hereditäre Faktoren des Patienten
- # angiogenetische Faktoren
- # immunologische Faktoren
- # genetische Veränderungen in der Tumorzelle (Genotyp)  
(Onkogene und Metastasen-Suppressorgene)
- # Tumorzell-Stroma-Interaktion (Milieufaktoren)
- # Wachstumsfaktoren.

Durch die Verbesserung der diagnostischen Möglichkeiten über die letzten drei Jahrzehnte ist es gelungen, diese Zellen zuverlässig und reproduzierbar in Lymphknoten, dem Knochenmark und weiteren sekundären Organen zu detektieren.

### 1.6.3 Detektion von disseminierten Tumorzellen

Sensitive Methoden können heute eine CTC aus dem Blut oder DTC aus dem Knochenmark unter ca.  $10^6$  -  $10^7$  mononukleären Zellen nachweisen. Hierfür werden sensitive immunologische oder PCR-basierte molekulare Methoden eingesetzt. Üblicherweise handelt es sich um ein kombiniertes Verfahren aus zunächst Anreicherung und anschließender Detektion der Tumorzellen [Pantel et al., 2008].

Gängige Anreicherungs- und Detektionsverfahren basieren auf den speziellen physikalischen oder biologischen Eigenschaften der Tumorzellen, die sie von den umgebenden hämatopoetischen Zellen unterscheiden.

Physikalische Eigenschaften sind:

- # Größe und Dichte

- # Elektrische Ladung
- # Verformbarkeit (Diapedese).

Biologische Eigenschaften sind:

- # Expression bestimmter Epitope (Oberflächen- oder Strukturproteine)
- # Funktions- und Überlebensfähigkeit
- # Fähigkeit zur Invasion/Migration.

Üblicherweise werden die zu analysierenden Proben, vor Anwendung des Detektionsverfahrens, zunächst einem Anreicherungsverfahren unterzogen. Dabei werden die o. g. physikalischen- und biologischen Eigenschaften der Tumorzellen genutzt. Die am häufigsten eingesetzten Verfahren zur Anreicherung von Tumorzellen sind die Dichte-Gradienten-Zentrifugation (z. B. Ficoll-Hypaque) und immuno-magnetische Verfahren. Weitere Verfahren sind die Trennung durch spezielle Zellfilter oder durch elektrophoretische Separation [Paterlini-Brechot et al., 2007; Alix-Panabières et al., 2011].

Nach Anreicherung können die Tumorzellen detektiert werden, dabei werden indirekte von direkten Nachweisverfahren unterschieden.

Die indirekten Methoden detektieren die Zellen aufgrund ihrer speziellen Eigenschaften (z. B. epitheliale Epitope oder Eiweiße) indirekt, dadurch ist nicht automatisch die Herkunft aus einem bösartigen Tumor bewiesen. Es werden immunologische- und molekulare (PCR-basierte) Verfahren unterschieden. Die molekularen Verfahren (RT-PCR) haben eine höhere Sensitivität als immunologische antikörperbasierte Nachweisverfahren. Bei den immunologischen Methoden werden sensitive monoklonale Antikörper zur Detektion von disseminierten Tumorzellen eingesetzt, die gegen bestimmte Strukturproteine oder epitheliale Epitope (z. B. Cytokeratine) der Tumorzellen gerichtet sind. PCR-basierte molekulare Methoden weisen spezifische Transkripte der Tumorzellen nach (z. B. MAGE, PSA).

Die direkten Nachweismethoden ermöglichen eine diagnostische Identifizierung und somit einen direkten Nachweis einer CTC bzw. DTC. Es handelt sich um zytopathologische Nachweismethoden der Zellen selbst oder um den Nachweis molekularer/genomischer Veränderungen in den Zellen, die ihre Malignität belegen. Gängige Methoden sind FISH, CGH und Mutationsanalysen. Für die Untersuchung größerer Zellmengen als Suchverfahren sind diese Methoden somit nicht geeignet, da sie sehr teuer und zeitintensiv sind. Vielmehr dienen sie der näheren Analyse von CTCs/DTCs, die durch andere Verfahren detektiert wurden [Paterlini-Brechot et al., 2007].

#### **1.6.4 Klinische Bedeutung disseminierter Tumorzellen im Knochenmark**

Die Detektion und Charakterisierung von CTCs/DTCs ist hilfreich in der Risikostratifizierung der Patienten (Einschätzung des metastatischen Risikos). Sie hilft in der Entscheidung über eine adjuvante Therapiemaßnahme nach Primärtherapie und kann in der Therapieüberwachung (Monitoring des Erfolges/Misserfolges) unter einer systemischen Krebstherapie eingesetzt werden. Auch kann die nähere Analyse der Eigenschaften dieser Zellen zu

einem besseren Verständnis der Metastasierungskaskade beitragen und so die Entwicklung neuer systemischer Therapieverfahren beschleunigen. In der klinischen Onkologie könnte der Einsatz der CTC/DTC als Biomarker zur Echtzeit-Überwachung der jeweiligen systemischen Therapie erfolgen. Dadurch könnte frühzeitig der Nutzen einer jeweiligen Therapie (z. B. Chemotherapie) für den einzelnen Patienten abgelesen werden [Alix-Panabières et al., 2008; Pantel et al., 2009].

Auch wenn bisher viele Untersuchungen für den Nachweis von DTCs bei den häufigsten epithelialen Tumorentitäten durchgeführt wurden [Pantel et al., 2009], existieren valide Daten für die prognostische Bedeutung von DTCs im Knochenmark nur für das Mammakarzinom.

In einer sehr großen, gepoolten Analyse mit >4500 Patienten betrug die Detektionsrate von DTCs ~30%. Die Detektion dieser DTCs im Knochenmark war mit einer signifikant schlechteren Prognose (Gesamt- und rezidivfreies Überleben) assoziiert. Des Weiteren korrelierten die DTCs signifikant mit dem Tumorstadium, dem Grading, dem Lymphknotenstatus und der Hormonrezeptorexpression. Die prognostische Relevanz von DTC-positivem Knochenmark konnte für alle Subgruppen nachgewiesen werden, sogar für Patienten mit kleinen Tumoren ohne Lymphknotenmetastasen [Braun et al., 2000]. Basierend auf den Forschungsergebnissen der letzten zwei Jahrzehnte wurde das Vorhandensein von DTCs beim Mammakarzinom mittlerweile in das TNM-Klassifikationssystem und das Cancer Staging Manual des American Joint Committee on Cancer (AJCC) aufgenommen [Sobin et al., 2002; Greene et al., 2002; Singletary et al., 2003]. Auch die amerikanische Gesellschaft für klinische Onkologie (ASCO) berücksichtigt seit 2007 den CTC-/DTC-Status in den aktualisierten Empfehlungen zum Umgang mit Tumormarkern beim Mammakarzinom [Harris et al., 2007].

### **1.6.5 Klinische Bedeutung disseminierter Tumorzellen beim Prostatakarzinom**

Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt für Patienten mit einem lokalisierten Prostatakarzinom etwa 90%, bei metastasierten Tumoren dagegen nur 30% [Pantelakou et al., 2009]. Diese Zahlen unterstreichen die klinische Bedeutung der Metastasierung und der Mikrometastasierung im Hinblick auf das Gesamtüberleben der Patienten.

Bei etwa 25 % der Patienten mit sog. lokalisierten Tumorstadien lässt sich nach chirurgischer Resektion des Tumors ein persistierender oder ansteigender PSA-Spiegel im Blut nachweisen ohne Anhaltspunkte für ein Lokalrezidiv oder manifeste Metastasen [Khan et al., 2003]. Eine mögliche Ursache könnten DTCs sein, die sich in der Tumorgenese im Knochenmark angesiedelt haben [Pantel und Brakenhoff, 2004].

Viele Arbeitsgruppen haben sich in den letzten Jahren mit der Detektion von DTCs bei Prostatakarzinom-Patienten befasst und konnten DTCs nachweisen. Indirekte Nachweisverfahren wurden am häufigsten eingesetzt, aber auch RT-PCR-basierte molekulare Methoden fanden Anwendung. Die Detektionsraten lagen zwischen 10 und 90%, vereinzelt zeigten sich Korrelationen zu unterschiedlichen klinisch etablierten Risikofaktoren. Einige

Autoren konnten eine schlechtere Gesamtprognose im Hinblick auf das Rezidiv-freie-Überleben nachweisen [Riethdorf et al., 2008] (Tab. 2).

**Tabelle 1:** Auswahl von Studien über die Detektion von DTCs im Knochenmark bei Patienten mit einem Prostatakarzinom.

Autoren	Anzahl Patienten (Anzahl Patienten mit DTCs in %)	Detektionsmethode	Ergebnisse/Relevante Korrelationen	Follow-up
Berg et al., 2007	272 (18%)	Anti-Cytokeratin-AK (AE1/AE3)	Gleason-Score (p=0,04), Fernmetastasen (p=0,07)	7 Jahre
Oberneder et al., 1994	84 (33%)	Anti-Cytokeratin-AK (CK18)	Tumorstadium, Grading, Metastasierung	-
Köllermann et al., 2008	193 (44.6%)	Anti-Cytokeratin-AK (A45-B/B3)	erneuter PSA-Anstieg (p=0,014)	44 Monate
Weckermann et al., 2001	82 (24%,CK2), (40%, A45-B/B3)	Anti-Cytokeratin-AK (A45-B/B3, CK2)	vorzeitiger PSA-Anstieg (p=0,004)	48 Monate
Bianco et al., 2001	58 (36.2%)	RT-PCR (PSA-mRNA), Anti-Cytokeratin-AK, MIB-1-AK	↑Gleason, Rezidiv-freies Überleben (p=0,05)	-
Weckermann et al., 2009	384 (13%)	Anti-Cytokeratin-AK (A45-B/B3)	DTCs vor OP unabhängiger Risikofaktor für Metastasen nach 48 Monaten (P=<0,001)	48 Monate
Wood et al., 1997	86 (45%)	RT-PCR (PSA-mRNA)	Rezidiv-freies Überleben (p=0,004), PSA-Wert (p=0,001) T-Stadium (p=0,003)	15 Monate
Gao et al., 1999	116 (44.0%)	RT-PCR (PSA-mRNA)	Rezidiv-freies Überleben (p=0,054)	15 Monate
Pantel et al., 1997	36 (58,3%)	Anti-Cytokeratin-AK (CK18)	Reduktion DTCs auf 19% nach Hormonablation	-

Alle bisher publizierten Studien über das Prostatakarzinom haben nur geringe Fallzahlen untersucht. Valide prognostische Follow-up-Informationen und valide Daten über den Einfluss von Hormontherapie oder anderen systemischen Therapieformen auf die DTCs fehlen, obwohl bereits ein Einfluss der Hormontherapie auf die Detektionsraten und Anzahl von DTCs in kleineren Serien beschrieben wurde [Pantel et al., 1997, Wood et al., 1998].

## 2 Arbeitshypothese und Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Patienten-Kollektive (Prostatakarzinom- und BPH-Patienten) untersucht.

Zunächst sollte die freie zirkulierende DNA aus dem Blutplasma und dem Knochenmark von Prostatakarzinom-Patienten isoliert werden, ebenso die freie DNA aus Blutproben der BPH-Patienten. Zusätzlich sollte DNA aus dem Primärtumorgewebe der Karzinompatienten, welche eine potentielle Quelle der freien DNA im Blut und Knochenmark sein könnte, isoliert und analysiert. In meiner Studie sollte zunächst der Frage nachgegangen werden, ob aufgrund unterschiedlich hoher DNA-Konzentrationen im Blutplasma zwischen Karzinom- und BPH-Patienten unterschieden werden kann. Ferner war die Quantifizierung freier DNA im Knochenmark im Vergleich zum Blutplasma von Prostatakarzinom-Patienten von Interesse.

Nach Isolierung und Quantifizierung der freien zirkulierenden DNA aus den einzelnen Kompartimenten (Blut, Knochenmark und Tumorgewebe) sollte die DNA auf genetische Veränderungen wie das Vorliegen von LOH oder MSI untersucht werden. Hierfür wurde ein Panel von 13 Mikrosatelliten-Markern ausgewählt, die spezifisch in der Nähe von Tumorsuppressorgenen binden. Die DNA sollte durch eine PCR amplifiziert und anschließend mit der Kapillarelektrophorese analysiert werden. Durch die zusätzliche Analyse der freien zirkulierenden DNA von BPH-Patienten soll festgestellt werden, ob der Nachweis von genetischen Alterationen im Blut spezifisch für das Prostatakarzinom ist, oder auch bei BPH-Patienten ohne eine bösartige Läsion beobachtet werden kann. Um Auskunft über die Herkunft der freien zirkulierenden DNA im Plasma zu erhalten, sollten vergleichende Analysen über das Auftreten von LOH/MSI im Primärtumor der Prostatakarzinom-Patienten durchgeführt werden.

Die erhaltenen Daten aus den DNA-Analysen sollten statistisch ausgewertet und mit den bekannten klinischen Parametern der Patienten (Tumorstadium, PSA, etc.) verglichen werden, um mögliche signifikante Korrelationen aufzuzeigen. Auf diese Weise soll festgestellt werden, ob dieser experimentelle Ansatz zur besseren Früherkennung eines Prostatakarzinoms geeignet sein könnte und ob durch die genetischen Analysen der freien zirkulierenden DNA klinisch wertvolle Informationen über den Tumor erhalten werden können.

Zusätzlich zu den genannten Untersuchungen sollte das Knochenmark aller Prostatakarzinom-Patienten auf das Vorhandensein von disseminierten Tumorzellen (DTCs) hin untersucht werden. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sollten ebenfalls mit den DNA-Analysen korreliert werden. Es ging dabei vor allem um die Frage, ob ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von DTCs im Knochenmark und den detektierten genetischen Alterationen in Blut, Knochenmark oder Tumorgewebe einerseits oder den etablierten klinischen Parametern andererseits besteht.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Untersuchungsmaterial/Patientenkollektiv

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Patientenkollektive der Klinik und Poliklinik für Urologie unter der damaligen Leitung von Herrn Prof. Dr. Hartwig Huland (heutige Leitung der Klinik durch Frau Prof. Dr. Margit Fisch) untersucht.

Das erste Kollektiv umfasst 36 Patienten mit einem histologisch gesicherten (Stanzbiopsie) Prostatakarzinom mit einer Indikation zur chirurgischen Resektion der Prostata. Von diesen Patienten wurde im Rahmen der präoperativen Voruntersuchungen Vollblut zur DNA-Isolierung aus den Leukozyten und dem Serum gewonnen. Des Weiteren wurde den Patienten nach Narkoseeinleitung und vor der Prostataresektion aus beiden Beckenkämmen (Spinae iliacae anteriores superiores) insgesamt 15 ml Knochenmark entnommen. Das Knochenmark wurde zur Detektion von disseminierten Tumorzellen (DTCs) einerseits sowie zur DNA-Analyse der zellfreien DNA andererseits verwendet. Für dieses Kollektiv lagen die klinisch relevanten Daten wie Alter, PSA-Werte, Prostatavolumen, Gleason-Score und das T-Stadium vor.

Das zweite Kollektiv umfasst 27 Patienten, die wegen einer symptomatischen BPH diagnostiziert und reseziert wurden. Von diesen Patienten wurde ebenfalls im Rahmen der präoperativen Untersuchungen Vollblut zur DNA-Isolierung aus den Leukozyten und dem Serum gewonnen. Zusätzlich wurde der präoperative Anteil am freien PSA im Serum (f-PSA) der Patienten bestimmt und wurde in die Auswertung miteinbezogen (s. Ergebnisse). Weitere relevante klinische Daten sind von diesem Kollektiv nicht bekannt. Das Hauptaugenmerk lag auf der Quantifizierung und Analyse der zellfreien, zirkulierenden DNA im Blut, um für die Auswertung der Daten der Patienten mit Prostatakarzinom ein Vergleichskollektiv zu haben.

Alle Blut- und Knochenmarkproben wurden innerhalb von 30 Minuten weiterverarbeitet. Es erfolgte die Abzentrifugation der Zellelemente der jeweiligen Proben, die flüssigen Überstände (Plasma) und zellulären Blutbestandteile wurden sofort weiter verarbeitet (DNA-Isolierung und Quantifizierung) oder bis zur weiteren Bearbeitung eingefroren. Das Zentrifugat vom Knochenmark konnte nicht eingefroren werden, hier erfolgte umgehend die Weiterverarbeitung nach u. g. Schema (Kapitel 3.2).

Nach einer ausführlichen Aufklärung und Beratung haben alle in diese Studie eingeschlossenen Patienten der Verwendung ihrer klinischen Daten und Spezimen zugestimmt (schriftliches Einverständnis). Die Entnahme des Untersuchungsmaterials, die Generierung der klinischen Daten und die Aufklärungsgespräche erfolgten durch die Mitarbeiter der Klinik für Urologie. Verantwortlich für diese Studie waren Herr PD Dr. Felix Chun und Frau Dr. Imke Lange. Die Untersuchungen und Auswertungen der Materialien und der Patientendaten erfolgten anonymisiert.

Die Aufarbeitung der Operationspräparate (Prostaten), deren feingewebliche Untersuchung (Histologie) mit der Eingrenzung der Tumorareale (foci), erfolgten durch Herrn PD. Dr. Andreas Ebersdobler aus dem Institut für Pathologie (Leitung Herr Prof. Dr. Guido Sauter).

### 3.1.1 Chemikalien

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
AB Serum	Biotest AG, Dreieich
Ammoniumpersulfat (zur Analyse)	Serva, Heidelberg
APAAP Enzymkonjugat	DAKO, Hamburg
Aqua ad iniectabilia	Baxter SA, Lessines
Borsäure	Sigma, Deisenhofen
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Desoxynucleoside Triphosphate Set	Roche, Mannheim
N,N-Dimethylformamid	Merck, Darmstadt
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Sigma, Deisenhofen
Eosin	Merck, Darmstadt
Essigsäure (100 %, zur Analyse)	Merck, Darmstadt
Ethanol (absolut, zur Analyse)	Merck, Darmstadt
Ficoll	Amersham Biosciences, Freiburg
Glyzergel Mounting Medium	DAKO, Hamburg
Hämatoxylin	Merck, Darmstadt
HiDi Formamid	Applied Biosystems, Freiburg
HPLC-H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Levamisol	Sigma, Deisenhofen
Methanol	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Sigma, Deisenhofen

Naphtol-AS-Bisphosphat	Sigma, Deisenhofen
Neufuchsin	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	J.T. Baker, Deventer
Natriumnitrit	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Nuklease-freies Wasser	Promega, Mannheim
ProtoGel Acrylamid	National diagnostics, Atlanta
Salzsäure 5 M	Merck, Darmstadt
Sucrose	Sigma, Deisenhofen
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)	Amersham Bioscience, Freiburg
Triton X 100	Sigma, Deisenhofen
Trizma Base	Sigma, Deisenhofen
Xylencyanole FF	Sigma, Deisenhofen
Xylol	Fluka, Buchs

### 3.1.2 Enzyme

Leukozyten, Blutplasma, Knochenmarküberstand und mikrodisssektiertes Tumorgewebe wurden mit Proteinase K (Qiagen, Hilden) lysiert.

Als Polymerase wurde die AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, Mannheim) verwendet.

### 3.1.3 DNA-Größenmarker für die Fragmentanalyse/Gelelektrophorese

ROX Size500 Standard (Applied Biosystems, Mannheim)

Fragmentgrößen in bp:

35/ 50/ 75/ 100/ 139/ 150/ 160/ 200/ 250/ 300/ 340/ 350/ 400/ 450/ 490/ 500

PhiX 174 DNA/Hin f I Marker (Promega, Mannheim)

Fragmentgrößen in bp:

24/ 40/ 42/ 48/ 66/ 82/ 100/ 118/ 140/ 151/ 200/ 249/ 311/ 413/ 417/ 427/ 500/ 553/ 713/ 726

### 3.1.4 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide sind von der Firma Sigma Aldrich bezogen worden.

5'-fluoreszenzmarkierte Sense-Primer wurden für die Amplifikation der Mikrosatellitenregionen auf den Chromosomen 3/ 6/ 7/ 8/ 9/ 10/ 11/ und 17 verwendet.

Folgende Primerpaare wurden eingesetzt:

#### *Mikrosatellitenmarker auf Chromosom 3:*

Name/Lokus	Sequenz	Produkt (bp)
THRB 3p24	Sense: 5'- GAT CAC AAG GAG CTA GAG T - 3' Antisense: 5'- TCA AAG GAG TCA GGC TGT AG - 3'	197 5'-HEX
D3S3703 3q13.3	Sense : 5'- GGA AAT GTG GAA CCA ACA G - 3' Antisense: 5'- TCC ATT CCT GAG TTA CTT CAC TT -3'	226-244 5'-HEX

#### *Mikrosatellitenmarker auf Chromosom 6:*

Name/Lokus	Sequenz	Produkt (bp) Farbe
D6S474 6q21-22	Sense: 5'- TGT ACA AAA GCC TAT TTA GTC AGG - 3' Antisense: 5'- TCA TGT GAG CCA ATT CCT CT - 3'	151-167 5'-FAM
D6S1631 6q16	Sense: 5'- TTT GGC TTG AGA ACA TTT ACC - 3' Antisense: 5'- GTG CCA CAC TGC CTC TAA - 3'	164-182 5'-HEX

#### *Mikrosatellitenmarker auf Chromosom 7:*

Name/Lokus	Sequenz	Produkt (bp) Farbe
D7S522 7q31.1	Sense: 5'- GCC AAA CTG CCA CTT CTC - 3' Antisense: 5'- ACG TGT TAT GCC ACT CCC - 3'	217-229 5'-TAM

#### *Mikrosatellitenmarker auf Chromosom 8:*

Name/Lokus	Sequenz	Produkt (bp) Farbe
D8S87	Sense: 5'- GGG TTG TTG TAA ATT AAA AC - 3'	145

8p12	Antisense: 5'- TGT CAA ATA CTT AAG CAC AG - 3'	5'-TAM
D8S137 8p21.1	Sense: 5'- GCT AAT CAG GGA ATC ACC CAA - 3' Antisense: 5'- AAA TAC CGA GAC TCA CAC TAT A - 3'	150-162 5'-FAM
D8S360 8p21	Sense: 5'- CTA GCT CCT GTG TTT CCA TCA - 3' Antisense: 5'- TCT CAC AGG TGC CTG TGC AG - 3'	95 5'-TAM

*Mikrosatellitenmarker auf Chromosom 9:*

Name/Lokus	Sequenz	Produkt (bp) Farbe
D9S1748 9p21	Sense: 5'- CAC CTC AGA AGT CAG TGA GT - 3' Antisense: 5'- GTG CTT GAA ATA CAC CTT TCC - 3'	110- 120 5'-HEX

*Mikrosatellitenmarker auf Chromosom 10:*

Name/Lokus	Sequenz	Produkt (bp) Farbe
D10S1765 10q23.3	Sense: 5'- ACA CTT ACA TAG TGC TTT CTG CG - 3' Antisense: 5'- CAG CCT CCC AAA GTT GC - 3'	166- 184 5'-FAM

*Mikrosatellitenmarker auf Chromosom 11:*

Name/Lokus	Sequenz	Produkt (bp) Farbe
D11S898 11q22	Sense: 5'- AGC ACC ATT TGC TGA GAC TG - 3' Antisense: 5'- TGT ATT TGT ATC GAT TAA CCA ACT T - 3'	140-156 5'-FAM
D11S1313 11p12	Sense: 5'- CTA AGC ATG AAG CTG CCA AGT TA - 3' Antisense: 5'- AGT TTG ACA TTA GGG AAT TTT GA - 3'	184-204 5'-FAM

*Mikrosatellitenmarker auf Chromosom 17:*

Name/Lokus	Sequenz	Produkt (bp) Farbe

TP53.6	Sense: 5'- TAA AAA GGG AGA AGG AGG GG – 3'	107
17p13.1	Antisense: 5'- GGA AGG GTC AAC ATC TTT TAC A – 3'	5'-HEX

### 3.1.5 Verwendete Kits

KIT	Hersteller
<b>AmpliTaq Gold (200 µl, 1000 U, 5 U/µl)</b> mit GeneAmp 10x PCR Gold Puffer und 25 mM MgCl <sub>2</sub> -Lösung	Applied Biosystems, Mannheim
<b>QIAamp DNA Mini Kit (250)</b> Proteinase K-Lösung Buffer AL – Lysepuffer Buffer AW1 – Waschpuffer 1 Buffer AW2 – Waschpuffer 2 Buffer AE – Elutionspuffer	Qiagen, Hilden
<b>Silver Stain Plus</b> Fixative Enhancer Concentrate Silver Complex Solution Reduction Moderator Solution Image Development Reagent Development Accelerator Reagent Development Accelerator Solution	Biorad, München

### 3.1.6 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Cytospintrichter und Haltevorrichtung	Hettich, Tuttingen
Dako Pen Fettstift	Dako, Hamburg
Deckgläser Supe-Rior	Marienfeld Laboratory, Marienfeld

Falcon Röhrchen 50ml	Bacton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Kryoröhrchen	Nalgene, Rochester
Neubauer Zählkammer improved	Marienfeld Laboratory, Marienfeld
Rex Leuchtplatte	Rex, Babenhausen
Sterile 1*Pipetten 3ml	Elkay Eireann, Galway, Irland
Sterile epT.I.P.S 10�l, 20�l, 100�l, 300�l, 1000�l	Eppendorf, Hamburg
Sterile Kan�len Sterican Gr. 14/17/18	Braun Medical, Emmenbrücke, CH
Superfrost Objektträger	Menzelgl�ser, Braunschweig
Tubes 0,2ml, 0,5ml, 1,5ml, 2ml	Eppendorf, Hamburg
UVette	Eppendorf, Hamburg

### 3.1.7 Geräte

Folgende Geräte zur Durchführung oder Auswertung der Versuche wurden eingesetzt:

Gerät	Hersteller
Multifuge Zentrifuge 3S/3S-R	Heraeus/Kendro, Hanau
Mikroflow Steril-Bench	Nunc, Wiesbaden
Mikroskop Axiostar plus	Zeiss, Göttingen
Rotofix 32 Zentrifuge	Hettich, Tuttingen
Stuart Roller Mixer	Bibby Sterilin, Staffordshire, U.K.
Leica Mikrotom SM 2000 R	Leica, Nussloch
Biofuge pico Zentrifuge	Heraeus/Kendro, Hanau
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Scanner Epson Expression 1680 pro	Epson Deutschland, Meerbusch
Rotamax 120 Sch�ttler	Heidolf Instruments, Schwabach
Hofer SE-245 Dual Gel Caster	Amersham Bioscience, Buckinghamsh., U.K.
Elektrophorese Power Supply Consort E143	Turnhout, Belgien

OT-Schnelltrockner TDO 66	Medite, Burgsdorf
Biorad Geldryer Modell 583	Biorad, München
MJ Research PTC-200	MJ Research, Watertown, USA
ABI Prism Genetic Analyser 310	Applied Biosystems, Mannheim
Biophotometer	Eppendorf, Hamburg
Automated cellular imaging system (ACIS)	ChromaVision Medical Systems, Californien

### 3.1.8 Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt.

Lösung/Hersteller	Zusammensetzung
Dulbecco's PBS Gibco BRL, Eggenstein	w/o Calcium and Magnesium w/o Sodium Bicarbonat
Ethanol Merck, Darmstadt	80 %, 96 %, 100 %
Fixierlösung (für 2 PA-Gele)  Biorad, München	90 ml H <sub>2</sub> O 150 ml Methanol 30 ml Essigsäure 100% 30 ml Fixative Enhancer
Hanks Salz-Lösung Biochrom AG	
5x Loading Buffer	50% Glycerol            5 ml 0,5 M EDTA            1 ml 1 M Tris pH 7,5        200 µl H <sub>2</sub> O                        ad 10 ml Bromphenolblau (1:3) Xylene Cyanol (1:3)
10x PBS pH 7,4	90 g NaCl 14,33 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O 2,67 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

	H <sub>2</sub> O ad 1 l
Silbernitrat-Färbelösung (für 1 PA-Gel)	14 ml H <sub>2</sub> O 2 ml Silver Complex Solution 2 ml Reduction Moderator Solution 2 ml Image Development Reagent
Biorad, München	20 ml Development Accelerator Solution
5x TBE (Tris-Borat EDTA)	Trizma Base 54 g Borsäure 27,5 g 0,5 M EDTA pH 8 20 ml H <sub>2</sub> O ad 1 l
TBS	50 mM Tris-HCl 150 mM NaCl
DAKO, Hamburg	pH 7,6
1 M Tris pH 7,5, pH 9,5	
Trypanblau	Sigma, Deisenhofen
Waschpuffer W 1x Konzentrat	
R&D Systems, Minneapolis	
Zell-Lyse-Puffer	0,3 M Sucrose 106,9 g 10 mM Tris pH 7,5 10 ml 1 M 5 ml MgCl <sub>2</sub> 5 ml 1 M 1% Triton X 100 10 ml 100% H <sub>2</sub> O ad 1 l

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Gewinnung von Blut, Knochenmark und Tumorgewebe

Für die Mikrosatelliten-Analysen wurde genomische DNA (gDNA) aus Blut, Knochenmarküberstand (als Knochenmark-Plasma bezeichnet) und Primärtumorgewebe (nach der histologischen Aufarbeitung) isoliert. Als Referenzprobe diente die gDNA aus Leukozyten des jeweiligen Patienten.

### 3.2.2 Gewinnung von Blutplasma und Isolierung der Leukozyten

Zur Gewinnung von Blutplasma wurden die 20 ml venöses EDTA-Blut für 10 Min. bei 3500 rpm zentrifugiert. Der Überstand (Blutplasma) wurde zur Gänze (ca. 3-5ml) in sog. Kryoröhrchen überführt und bis zur endgültigen Bearbeitung (DNA-Isolierung und Mikrosatelliten-Analysen) bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Aus dem verbliebenen Blut wurden die Leukozyten folgendermaßen isoliert: Das Blut wurde mit gekühltem Lysepuffer ( $4^{\circ}\text{C}$ ) auf 50 ml aufgefüllt und für 15 Min. auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die Zentrifugation mit 3500 rpm. für 20 Min. bei  $4^{\circ}\text{C}$ . Der Überstand wurde verworfen und das zurückgebliebene Pellet in 30 ml Lysepuffer resuspendiert. Es folgte die erneute Zentrifugation mit 3500 rpm für 15 Min. bei  $4^{\circ}\text{C}$ . Wieder wurde der Überstand verworfen. Zur Lösung und Überführung des Leukozyten-Pellets in ein beschriftetes 1,5 ml Tube wurde erneut 1 ml Lysepuffer eingesetzt. Nach Überführung wurde mit 13000 rpm bei  $4^{\circ}\text{C}$  für 5 Min. zentrifugiert und der Überstand verworfen. Danach wurde das Leukozyten-Pellet ebenfalls bis zur endgültigen Bearbeitung (DNA-Isolierung und Mikrosatelliten-Analysen) bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 3.2.3 Verarbeitung von Knochenmark (KM)

Die Gewinnung des Knochenmarks wurde präoperativ nach Einleitung der Vollnarkose, meist beidseitig durchgeführt (Abb. 6).



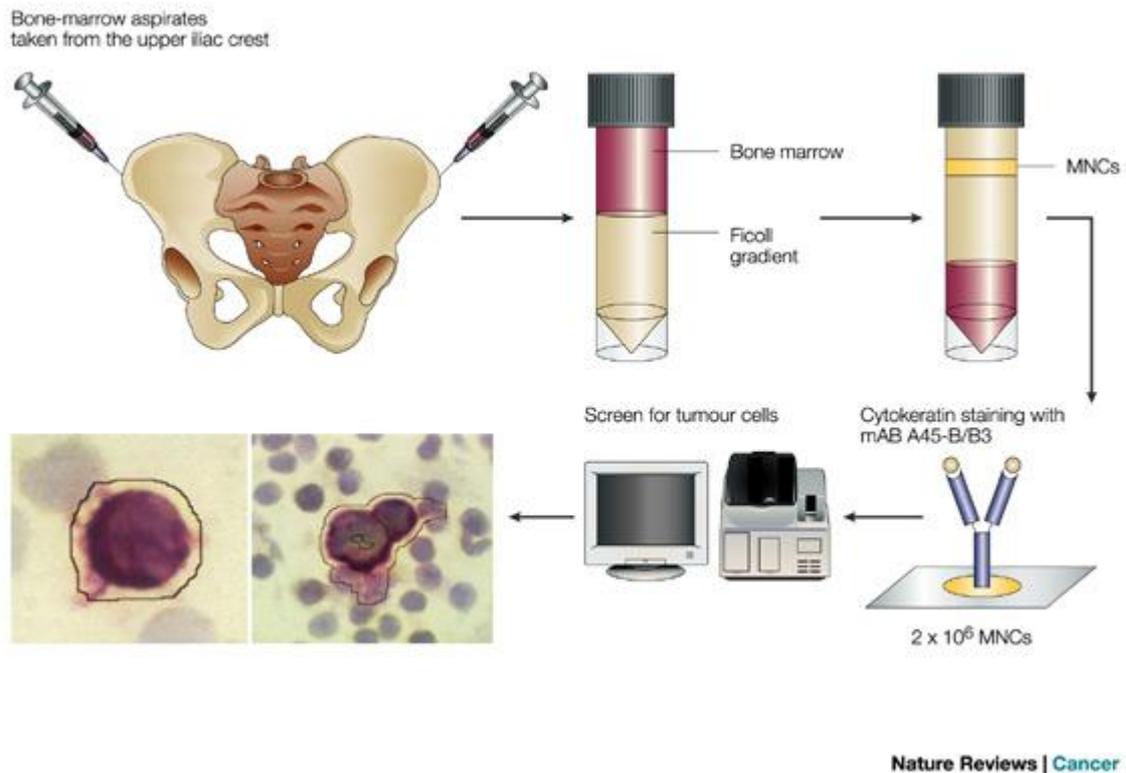
**Abb. 6:** Schematische Darstellung einer Knochenmarkspunktion

Das aspirierte Material (ca. 15 ml) wurde in sterilen 1-Mal-Spritzen ohne Zusatz von Antikoagulantium aufgenommen und zur sofortigen Weiterbearbeitung übergeben.

#### Gewinnung von Knochenmark-Plasma

Zunächst wurde das gewonnene Aspirat in 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Dann erfolgte die sofortige Zentrifugation bei 1400 rpm für 10 Min. Der Überstand (2-5 ml KM-Plasma) wurde in Kryoröhrchen überführt und bis zur endgültigen Bearbeitung (DNA-Isolierung und Mikrosatelliten-Analysen) bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

## Isolierung disseminierter Tumorzellen mit dem Ficoll-Gradienten



**Abb. 7: Schema der Knochenmark-Aufbereitung (Pantel & Brakenhoff, 2004)**

Das nach der Gewinnung des Überstandes (KM-Plasma) verbliebene Knochenmark wurde mit kalter Hanks-Lösung bis auf 30 ml aufgefüllt und bei 4°C und 1400 rpm für 10 Min. zentrifugiert. Danach wurde der Überstand (mit der Fettphase) bis auf 10 ml abpipettiert. Das Sediment wurde sogleich mit kaltem PBS-Puffer auf 30 ml aufgefüllt. Ein neues Falcon-Röhrchen mit 20 ml Ficoll-Paque-Lösung wurde nun mit dem verdünnten Knochenmark vorsichtig überschichtet. Dann wurde für 30 Min. bei 1400 rpm und 4°C zentrifugiert, ohne am Ende die Zentrifuge zu bremsen. Die Interphase enthielt mononukleäre Zellen (MNCs) (Abb. 7), die mit dem restlichen Überstand in ein weiteres Falcon-Röhrchen überführt wurden. Erneutes Auffüllen mit PBS-Puffer auf 50 ml und Zentrifugation bei 1400 rpm und 4°C für 10 Min. Der Überstand wurde diesmal verworfen.

### Erythrozyten-Lyse

Wenn das Pellet eine rötliche Färbung (als Ausdruck einer Verunreinigung durch Erythrozyten) aufwies, wurde eine sog. Ery-Lyse mit dem *Whole Blood Erythrocyte Lysing Kit* angeschlossen. Dazu wurde 1 ml des H-Lyse-Puffer auf das Pellet gegeben und für 3 Min. auf dem Rollenmischer gemischt. Anschließend wurden 40 ml Wasch-Puffer hinzugefügt und die Lösung für 10 Min. bei 1400 rpm zentrifugiert. Danach wurde der Überstand erneut verworfen.

### Ermittlung der Zellzahl

Jetzt konnte das Pellet zur Bestimmung der Zellzahl, je nach Trübungsgrad der Lösung, mit 5 oder 10 ml PBS-Puffer resuspendiert werden. Aus der gut durchmischten Zellsuspension wurden 10 µl entnommen und mit 10 µl Tryphanblau in einer Mikro-Titer-Platte gemischt. Danach erfolgte die Auszählung in der Neubauer-Zählkammer. Zur Bestimmung der Gesamtzellzahl der Lösung wurde die ermittelte Zellzahl auf das Gesamtvolumen verrechnet. Bei sehr hohen Zellzahlen/ml wurde mit PBS-Puffer weiter verdünnt.

### Herstellung von Cytospins

Nach der Auszählung wurden die Cytospins hergestellt. Dazu wurden 700.000 Zellen (MNCs) für 3 Min. bei 1000 rpm auf einen Objektträger zentrifugiert. Insgesamt wurden maximal 12 Cytospins hergestellt, 6 für die immunhistochemische Färbung, 6 zum Einfrieren bei -80° C (Kryokonservierung). Bei noch höheren Zellzahlen wurde ab einer Anzahl von 10 Millionen Zellen eine Zellkultur angelegt. Die fertigen Cytospins wurden über Nacht getrocknet und danach immunhistochemisch gefärbt bzw. in Aluminium-Folie eingefroren.

### Immunhistochemischer Nachweis Zytokeratin (CK-19)-positiver Zellen

Zur Detektion der DTCs mit dem ACIS (automated cellular imaging system) wurden die Cytospins immunhistochemisch gefärbt. Der monoklonale Antikörper A45-B/B3 (IgG1) aus der Maus, der gegen die Zytokeratine (u. a. Heterodimere 8-18, 8-19) gerichtet ist [Stigbrand et al.,1998], diente als Primärantikörper (2µg/ml). In der gleichen Konzentration wurde als Isotyp-Kontrolle der polyklonale Antikörper MOPC-21 (IgG1) eingesetzt. Als Sekundärantikörper wurde ein Anti-Maus-Antikörper (175µg/ml) verwendet (Brückenantikörper Z-0259, Dako), der aus dem Kaninchen stammt und in der Lage ist, das APAAP-Enzym-Konjugat mit einem gegen alkalische Phosphatase (AP) gerichteten Antikörper aus der Maus über den Primärantikörper zu verbinden (Abb. 8).

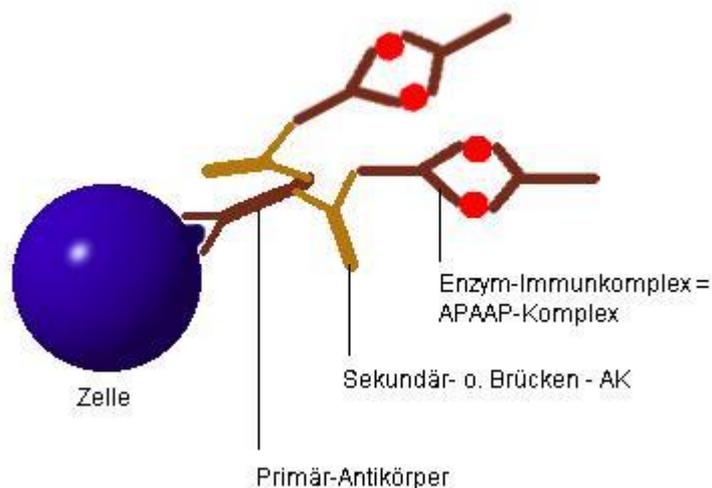


Abb. 8: APAAP-Enzym-Komplex

Dieses Konjugat bildet aus dem hinzugegebenen Substrat Neufuchsin (Azofarbstoff) die Färbung.

### Vorgehensweise

Nach dem Trocknen (bzw. Auftauen) der Objektträger (OTs) mit den MNCs wurde mit einem Dako-Pen (Fettstift) der relevante Bereich auf den OTs umrandet. Alle weiteren Schritte erfolgten bei Raumtemperatur in stets feuchtem Milieu, um ein Austrocknen der OTs zu vermeiden. Nach Benetzung der Zellareale mit PBS-Puffer für 5 Min. folgte die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit 150µl 10%-igem AB-Serum in PBS für 20 Min. Dann folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (100µl mA45B/B3) bzw. der Isotyp-Kontrolle (100µl MOPC-21) für 45 Min. Nach 3-fachem Waschen mit PBS folgte die Inkubation mit dem Sekundär-Antikörper (120µl Z-0259) aus dem Kaninchen. Nach erneutem 3-maligem Waschen mit PBS wurde die APAAP-Lösung (120µl APAAP-Enzym-Konjugat) hinzugefügt und für 30 Min. inkubiert. Abermals folgten 3 Waschschritte mit PBS und nach der Zugabe der Substrat-Lösung (150µl Neufuchsin-Substrat-Lösung mit Levamisol) die Inkubation für 20 Min. und 3-maliges Waschen mit PBS. Das Levamisol blockiert bei dieser Reaktion die endogene AP-Aktivität aus Knochen und Leukozyten. Dann wurde die Kernfärbung (Gegenfärbung) mit Hämalaun durchgeführt, erneut gewaschen (3x PBS) und abschließend die Cytospins mit Glycerin-Gel eingedeckelt.

Als Positiv-Kontrolle wurde für jede Färbung eine Cytokeratin-Positive-Karzinom-Zelllinie (MCF-7) in getrennten Behältern gefärbt.

### ACIS (automated cellular imaging system)

Die gefärbten Cytospins wurden nun mit dem *automated cellular imaging system (ACIS, ChromaVision Medical System)* auf das Vorhandensein von DTCs analysiert [Krivacic et al., 2004] (Abb. 9).



Abb. 9: Automated Cellular Imaging System (ACIS)

Die durch das System detektierten Zellen, wurden von Frau Dr. S. Riethoff und Prof. Dr. K. Pantel unabhängig voneinander beurteilt. Zur Erhöhung der Sensitivität wurden die Cytospins aller Patienten und auch die Positiv-Kontrollen jeweils 3-mal analysiert.

### **3.2.4 Verarbeitung von Tumorgewebe**

#### **Histologische Aufarbeitung**

Die Gewebeproben aus den Primärtumoren von 29 Patienten mit Prostatakarzinom (Kollektiv 1) sind in die Analysen mit einbezogen worden. Nach der operativen Entfernung der Prostaten durch die Urologen wurden die Operationspräparate der Patienten in gewohnter Weise durch die Pathologen aufgearbeitet und befundet (histologische Typisierung, Gleason-Score, Ausdehnung, Beurteilung von Lymphknoten und anhängendem paraprostatischem Gewebe). Das Gewebe wird zu diesem Zweck in Paraffin gegossen und damit einer histologischen Aufarbeitung zugänglich. Aus diesem Paraffinblock werden Schnitte von ~5-7 µm Dicke angefertigt und mikroskopisch beurteilt.

Unter Berücksichtigung der klinischen Angaben des Operators erfolgt eine abschließende klinisch-pathologische Korrelation (klinische Stadieneinteilung, Radikalität, etc.). Nach Abschluss dieser routinemäßigen Vorgehensweise wurden mir die in Paraffin eingebetteten Gewebelöcher freundlicherweise vom pathologischen Institut (Herrn PD. Dr. A. Erbersdobler) zur Verfügung gestellt.

#### **Mikrodissektion von Tumorgewebe**

Nach Abschluss des oben geschilderten Verfahrens, wurden von 29 Patienten mit dem Mikrotom weitere Paraffin-Schnitte angefertigt, auf Objektträger gebracht und bis zur weiteren Verarbeitung (Färbung und DNA-Isolierung) in speziellen Behältern im Dunkeln bei Raumtemperatur gelagert.

Die für die Mikrodissektion unter dem Mikroskop erforderliche Eingrenzung des Tumors auf Areale, die mindestens 70% Tumormasse (Karzinom) haben, wurde einheitlich von Herrn PD. Dr. A. Erbersdobler aus dem Institut für Pathologie vorgenommen. Die jeweiligen Areale wurden mit einem wasserfesten Marker gekennzeichnet.

Das Laser-Assisted-Pressure-Catapulting mit dem PALM Micro-Laser-System wurde bei 6 Patienten eingesetzt, bei denen das Tumor-Areal entweder zu klein oder zu inhomogen für die Lupen-Dissektion war. Hierdurch kann eine Kontamination mit morphologisch unauffälligem Prostatagewebe und Stromagewebe erheblich reduziert werden.

#### **Färbung der Schnitte**

Bevor eine Mikrodissektion von Tumorgewebe durchgeführt werden konnte, mussten die hergestellten Schnitte zur weiteren mikroskopischen Beurteilung und zum Abgleich mit dem markierten HE-Schnitt zunächst gefärbt werden. Da die dabei gewählte Färbemethode einen Einfluss auf die Quantität und Qualität der später zu isolierenden DNA haben kann [Okuducu et. al, 2003], wurde zunächst eine Toluidin-Blau-Färbung mit einer leicht modifizierten HE-Färbung verglichen.

Zunächst wurden dafür die Schnitte entparaffiniert. Dazu wurden die OTs für 60 Min. bei 60°C gebacken. Danach wurden sie für 2 Min. in Xylol getaucht und anschließend einer absteigenden Alkoholreihe zugeführt (100%, 100%, 96%, 96%, 80% Ethanol; jeweils für 1 Min.). Zuletzt wurden die Schnitte in destilliertes Wasser (3x) getaucht.

### **HE-Färbung**

Die Schnitte wurden für 45 Sek. in 1:5 verdünntes Mayers Hämatoxylin getaucht und für 1 Min. in Leitungswasser gespült. Im Anschluss erfolgte die Gegenfärbung mit Eosin für 10 Sek. Nach 5x Spülen mit destilliertem Wasser wurden die Schnitte bis zur Dissektion an der Luft getrocknet.

### **Toluidin-Blau-Färbung**

Hier wurden die Schnitte vom destillierten Wasser aus für 30 Sek. in 1% Toluidin-Blau-Lösung überführt. Dann wurden die OTs für 1 Min. in 0,9% NaCl-Lösung gewaschen und anschließend in Ethanol (kurz 75%, 30 Sek. 100%) überführt. Danach wurden die Schnitte ebenfalls an der Luft getrocknet.

### **Lupen-Mikro-Dissektion**

Drei Paraffinschnitte (à 7µm Dicke) wurden von jedem der 23 Patienten für die DNA-Gewinnung verarbeitet. Die Färbung wurde in oben beschriebener Weise durchgeführt. Alle Arbeiten wurden mit Mundschutz und sterilen 1-Mal-Handschuhen durchgeführt. Nach dem Abgleichen der angefertigten Schnitte mit dem vorgegebenen und markierten HE-Schnitt wurde das korrespondierende Areal mit einer sterilen 1-Mal-Kanüle (BRAUN, Sterican Gr. 14/17/18) abgekratzt und die Gewebefragmente in ein steriles Eppendorf-Tube überführt. Diese Arbeit wurde auf einem Leuchttisch durchgeführt, um die Sichtbedingungen zu optimieren. Die Kanüle wurde mit sterilem, destilliertem Wasser angefeuchtet, wodurch die Gewebefragmente leichter zu handhaben waren (statische Aufladung). Aus dem auf diese Weise erhaltenen Gewebe wurde die DNA isoliert.

### **Laser-Assisted-Pressure-Catapulting**

Für die Laser-Assistierte-Mikrodissektion wurden von 6 Patienten Schnitte mit 2µm Dicke hergestellt und auf Spezial-Objektträger (PALM® MembraneSlides®) gebracht. Diese Objektträger mit einer Polyethylen-Naphtalen-Membran wurden zuvor für 30 Min. mit UV-Licht (254 nm) bestrahlt, um den hydrophoben Charakter der Slides herabzusetzen und somit die Adhärenz der Paraffin-Schnitte zu verbessern. Die 2 µm dicken Schnitte wurden auf die MembraneSlides® verbracht, hierbei musste auf eine gute Haftung des Materials auf dem Slide geachtet werden.

Für die Dissektionen wurden nun unter dem Mikroskop die relevanten Areale exploriert und mit Ethanol befeuchtet. Gleichzeitig erfolgte die Markierung der Zielareale mit der Software. Dann wurde ein steriles Eppendorf-Tube, das mit einem speziellen PCR-Öl (light weight mineral oil) gefüllt war, in den Tube-Halter eingespannt und das markierte Areal in das Tube katapultiert (Abb. 10).



**Abb. 10: PALM-Apparatur, mikrodisseziertes Areal**

Das Tube wurde mit 13.000 rpm für 5-10 Min zentrifugiert, um die gewonnenen Gewebeanteile auf den Boden des Eppendorf-Tube zu befördern. Die weitere Bearbeitung erfolgte mit dem QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland.

### **3.2.5 Isolierung der genomischen DNA**

Die Isolierung der genomischen DNA (gDNA) aus den entsprechenden Geweben (Blut, Knochenmark und Tumorgewebe) wurde mit Hilfe des QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland), jeweils in modifizierter Form, durchgeführt.

#### **DNA-Isolierung aus Blut- und Knochenmarkplasma**

Das in den Kryoröhrchen eingefrorene Blut- und Knochenmarkplasma wurde in Portionen zu jeweils 650  $\mu$ l (=Plasmavolumen, PV) auf sterile 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt. Jeweils 1/10 PV Proteinase K (65  $\mu$ l) und 1 PV Lysepuffer AL (650  $\mu$ l) wurden dazugegeben. Dieses Gemisch wurde gut durchmischt (Vortex) und bei 56°C auf einem Thermomixer für 10 Min. inkubiert. Durch die Proteinase-K-Behandlung wurden die Proteine im Plasma abgebaut und die DNA von bindenden Proteinen befreit. Die DNA-Präzipitation wurde mit 1 PV 100%igem Ethanol (650  $\mu$ l) eingeleitet.

Auf eine Vakuumkammer wurden nun Qiagen-Säulen mit VacConnectoren und Säulenaufsätzen montiert. Durch ein Vakuum, welches eine Wasserstrahlpumpe in der Vakuumkammer erzeugte, wurde das Lysat durch die Säule gesogen, so dass die DNA an die Säulenmatrix binden konnte. Um ungebundenes Material von der Säule zu entfernen, wurden im Anschluss jeweils 700  $\mu$ l eines Waschpuffers (AW1 und AW2) eingesetzt, der die Säule reinigte. Danach wurden die Säulen mit der gebundenen DNA in Eppendorf-Tubes gestellt und für 1 Min. bei 13.000 rpm zentrifugiert, um den restlichen Waschpuffer zu entfernen. Nach erneutem Wechsel des Tubes wurden 100 $\mu$ l Elutionspuffer AE auf die Säulen gegeben und für 60 Sek. inkubiert. Durch Zentrifugation bei 5000 rpm für 1 Min. wurde die DNA in das frische Tube eluiert. Die gelöste DNA wurde bis zur Quantitäts- und Qualitätsmessung (OD-Messung) bei 4°C gelagert.

### **DNA-Isolierung aus Leukozyten**

Das in dem Eppendorf-Tube gelagerte Leukozyten-Pellet wurde nach kurzem Auftauen bei Raumtemperatur mit 200 µl (Volumen, V) PBS-Puffer, 1/10 V Proteinase-K (20 µl) und 1 V Lysepuffer AL (200µl) versetzt und gut durchmischt (Vortex). Anschließend wurde das Gemisch bei 56°C, unter regelmäßigem Mixen (Vortex), für 2-3 Stunden auf einem Thermomixer inkubiert. Dadurch wurden eine Lyse der Zellen und eine Proteinverdauung induziert. Durch Zugabe von 1 V 100%igem Ethanol (200 µl) wurde die DNA-Präzipitation eingeleitet.

Das Lysat wurde auf eine Qiagen-Säule gegeben und bei 5000 rpm. für 1 Min. in ein Eppendorf-Tube zentrifugiert, so dass die DNA an die Säulenmatrix binden konnte. Um ungebundenes Material von der Säule zu entfernen, wurden im Anschluss jeweils 500 µl eines Waschpuffers (AW1 und AW2) eingesetzt, der die Säule reinigte. Danach wurde die Säule mit der gebundenen DNA in ein Eppendorf-Tube gestellt und für 1 Min bei 13.000 rpm zentrifugiert, um den restlichen Waschpuffer zu entfernen. Nach erneutem Wechsel des Tubes wurden 100 µl Elutionspuffer AE auf die Säule gegeben und für 60 Sek. inkubiert. Durch Zentrifugation bei 5000 rpm für 1 Min. die DNA in ein frisches Tube eluiert. Die Elution mit 100 µl Puffer AE wurde wiederholt, so dass das Elutionsvolumen insgesamt 200 µl betrug. Die gelöste DNA wurde bis zur Quantitäts- und Qualitätsmessung (OD-Messung) bei 4°C gelagert.

### **DNA-Isolierung aus Tumorgewebe**

Das durch Lupen-Mikrodissektion gewonnene Tumorgewebe konnte direkt mit 180 µl Gewebepuffer ATL und 20 µl Proteinase K versetzt werden, das durch Laser-assistierte-Mikrodissektion gewonnene Gewebe musste zunächst durch einen weiteren Zentrifugationsschritt von dem PCR-Öl befreit werden, bevor die Lyse eingeleitet werden konnte. Es folgte die gründliche Durchmischung mit dem Vortex.

Das Gemisch wurde dann bei 56°C, unter regelmäßigem Mixen auf dem Vortex, für 2-3 Stunden auf einem Thermomixer inkubiert. Dann wurde durch Zugabe von Lysepuffer AL (200 µl) bei 70°C für 10 Min. die Lyse der Zellen induziert. Durch Zugabe von 1 V 100%igem Ethanol (200 µl) wurde die DNA-Präzipitation eingeleitet.

Das Lysat wurde auf eine Qiagen-Säule gegeben und bei 5000 rpm. für 1 Min. in ein Eppendorf-Tube zentrifugiert, so dass die DNA an die Säulenmatrix binden konnte. Um ungebundenes Material von der Säule zu entfernen, wurden im Anschluss jeweils 500 µl eines Waschpuffers (AW1 und AW2) eingesetzt, der die Säule reinigte. Danach wurde die Säule mit der gebundenen DNA in ein Eppendorf-Tube gestellt und für 1 Min bei 13.000 rpm zentrifugiert, um den restlichen Waschpuffer zu entfernen. Nach erneutem Wechsel des Tubes wurden 50 µl Elutionspuffer AE auf die Säule gegeben und für 60 Sek. inkubiert. Durch Zentrifugation bei 5000 rpm für 1 Min. wurde die DNA in das frische Tube eluiert. Die Elution mit 50 µl Puffer AE wurde wiederholt, so dass das Elutionsvolu-

men insgesamt 100 µl betrug. Die gelöste DNA wurde bis zur Quantitäts- und Qualitätsmessung (OD-Messung) bei 4°C gelagert.

### 3.2.6 Quantitäts- und Qualitätsbestimmung der isolierten DNA (OD-Messung)

Die Quantität der DNA wurde durch Messung der optischen Dichte (OD) bei 260 nm in einem UV-Spektrometer bestimmt.

Nach Einstellung des Spektrometers auf doppelsträngige DNA wurde als Referenz zunächst 50 µl des Elutionspuffer AE in einer nukleasefreien Plastikkuvette gemessen und somit das Gerät geeicht. Dann folgte die Messung der jeweiligen DNA-Lösungen in stets sterilen, nukleasefreien Plastikkuvetten. Die Nukleinsäurekonzentration wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{DNA-Konzentration } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \text{OD}_{260} \times 50 (\mu\text{g}/\mu\text{l}) \times \text{Verdünnung}$$

Eine gemessene OD<sub>260</sub> von 1 entspricht somit einer DNA-Konzentration von 50 mg/ml. Die Qualität (Reinheitsgehalt) der Proben lässt sich über den Quotienten E<sub>260</sub>/E<sub>280</sub> ermitteln. Dazu wurden die Proben auch bei 280 nm gemessen. Ein Quotient von 1,8 entspricht reiner DNA. Hingegen weisen Werte unter 1,6 auf Proteinverunreinigungen hin.

### 3.2.7 Amplifikation der extrahierten DNA mit Gen-spezifischen-Primerpaaren

Für die Detektion von Tumor-spezifischen-DNA-Veränderungen (LOH und MSI) wurde eine PCR durchgeführt. Hierfür wurden Primerpaare verwendet, die an bestimmten Mikrosatellitenmarkern binden und diese dadurch amplifizieren.

#### Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Mit der PCR gelingt es, kleinste Mengen an DNA nachzuweisen bzw. spezifische DNA-Abschnitte zu amplifizieren. Dadurch kann genetisches Material, welches nur in Spuren vorhanden ist, mit Hilfe der PCR einer molekularbiologischen Analyse zugänglich gemacht werden. Die Methode wurde Mitte der Achtzigerjahre von Saiki et al. etabliert und seither modifiziert und weiterentwickelt, ohne jedoch das grundlegende Prinzip verändert zu haben [Saiki et al., 1989].

Ausgehend von zwei sog. Oligonukleotid-Primern, einem Sense-Primer (5', fluoreszenzmarkiert) und einem Antisense-Primer (3', nicht markiert), die gegenläufig an komplementäre DNA-Stränge binden, werden in mehreren Zyklen DNA-Sequenzen synthetisiert. Der Einsatz thermostabiler Polymerasen (Taq-Polymerase) erlaubt es, diesen Amplifikationsprozess zu automatisieren und zu kontrollieren. Die einzelnen Zyklen bestehen aus der Initiierung (Aktivierung der Taq-Polymerase und Denaturierung der DNA), der Bindung des jeweiligen Primers (Primer-Annealing) und der darauf folgenden Synthese des DNA-Stranges (Elongation/Extension) aus im Überschuss vorhandenen Desoxy-Nukleosidtriphosphaten (dNTPs). Durch die zyklische Wiederholung (40 Zyklen) dieses Prozesses wird die DNA exponentiell angereichert (Abb. 11).

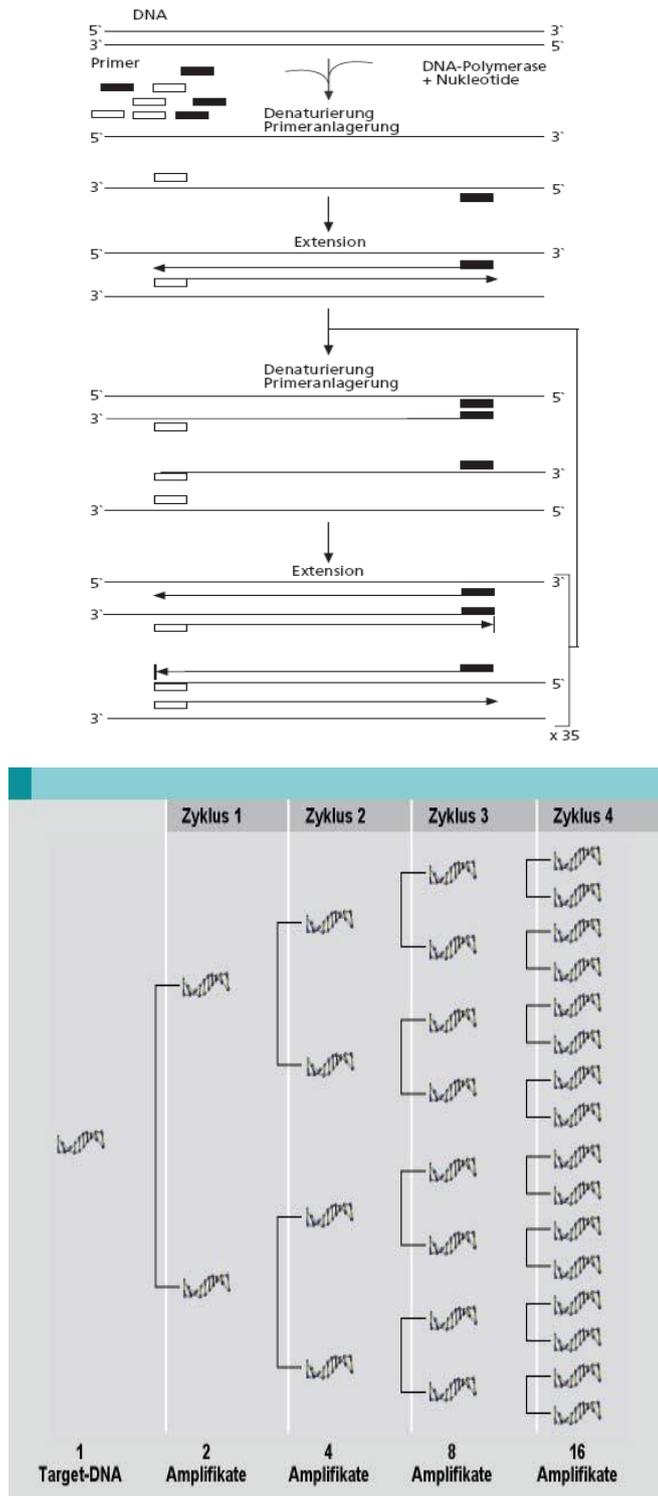


Abb. 11: PCR-Reaktion mit exponentieller Amplifikation der PCR-Kopien

### DNA-Polymerase

Eine Polymerase verknüpft chemisch Monomere zu Polymeren. Ausgehend von einem Primer synthetisiert die DNA-Polymerase den DNA-Strang aus den Desoxy-Nukleosidtriphosphaten (dNTPs). Dabei nutzt die DNA-Polymerase einen bereits bestehenden DNA-Einzelstrang (Matrize/Vorlage) für die Synthese eines neuen sog. komplementären Stranges. Die Nukleotid-Abfolge (DNA-Sequenz) wird dabei von der Matrize

bestimmt. Der Erhalt dieser DNA-Sequenz ist eine entscheidende Fähigkeit der DNA-Polymerase. Für die Aktivität der DNA-Polymerase sind  $Mg^{2+}$ -Ionen essentiell, deshalb wird in einen PCR-Reaktionsansatz zusätzlich zum PCR-Puffer Magnesiumchlorid ( $MgCl_2$ ) hinzugefügt. Es wurde ein Prototyp der DNA-Polymerase, nämlich die Taq-Polymerase von *Thermus aquaticus* verwendet.

### **Primer**

Primer sind kurze DNA-Einzelstränge (Oligonukleotide), die etwa 15 bis 30 Basenpaare (bp) lang sind. Sie binden jeweils an die zu amplifizierende DNA-Sequenz des sense-(5') und antisense-(3')-Stranges. Die DNA-Polymerase benötigt die Primer als Replikationsstartpunkt für das Kopieren der jeweiligen Einzelstränge. Aus den im Überschuss vorhandenen Primern und Nukleotiden (dNTP-Mix) kann die Polymerase nun neue komplementäre DNA-Stränge synthetisieren, in dem Nukleotide (in der entsprechenden Sequenz) an das 3'-Ende der Primer angeheftet werden.

Für die anschließende Analyse durch Kapillarelektrophorese werden 5'-Primer mit einem Farbstoff (sog. Fluoreszenz-Amidit) in den Farben TAM, HEX und FAM verwendet, um ein PCR-Produkt zu erhalten, das fluoresziert (sog. 5'-Endmarkierungsmethode).

### **3.2.8 Verwendete Mikrosatellitenmarker**

Für die Analysen wurden 13 Mikrosatelliten-Marker (THRB, D3S3703, D6S474, D6S1631, D7S522, D8S87, D8S137, D8S360, D9S1748, D10S1765, D11S898, D11S1313 und TP53.6) für den Nachweis von LOH/MSI eingesetzt. Alle gewählten Primer liegen in der Nähe von bekannten Tumorsuppressorgenen (TSGs) auf den Chromosomen 3, 6, 7, 8, 9, 10, 11 und 17 (Tab. 2).

Die Primer sind alle in unserer Arbeitsgruppe etabliert und bereits mehrfach verwendet worden [Schwarzenbach et al., 2004, 2007, 2008, 2009; Müller, 2004; Seidel, 2008; Gottberg, 2009].

**Tabelle 2:** Charakterisierung der Mikrosatelliten und der verwendeten Primer

Primer	Temp	Produkt (bp)	Region	Tumorsuppressorgen (TSG)
D3S3703	57° C	226-244	3q13.3	Beta-1,4-Galactosyltransferase
THRB	56° C	197	3p24	Retinoid-Acid-Receptor B
D6S474	53° C	151-167	6q21-22	Protease-Inhibitor B
D6S1631	54° C	164-182	6q16	TGF- $\beta$ -Aktivierende-Kinase
D7S522	56° C	217-229	7q31.1	Caveoline 1
D8S87	53° C	145	8p12	Neuroregulin 1
D8S137	54° C	150-162	8p21.1	Dematin
D8S360	59° C	95	8p21	unbekannt
D9S1748	53° C	110-120	9q21	CDKN2/p16
D10S1765	56° C	166-184	10q23.3	PTEN
D11S898	56° C	140-156	11q22	Checkpoint-Kinase 1
D11S1313	56° C	184-204	11p12	MMR-Gene (hMSH2,hMLH1)
TP53.6	57° C	107	17p13.1	P53

### PCR-Reaktionsansatz

Es wurde für jedes Primerpaar ein sog. Mastermix angesetzt, um größere Volumina pipettieren zu können (höhere Genauigkeit beim Pipettieren). Aus diesem Mastermix wurden dann 3,5  $\mu$ l in das PCR-Tube gegeben. Nach Zugabe der jeweiligen DNA und H<sub>2</sub>O betrug das Gesamtvolumen in einem PCR-Tube 10  $\mu$ l.

Lösung	Volumen	Endkonzentration
gDNA 10 ng (Template)	nach DNA-Konz.	
10x PCR Puffer (MgCl <sub>2</sub> frei)	1 $\mu$ l	1x
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1 $\mu$ l	2,5 mM
2 mM dNTP-Mix	1 $\mu$ l	200 $\mu$ M
20 $\mu$ M 5' Primer (markiert)	0,2 $\mu$ l	11 pM
20 $\mu$ M 3' Primer (unmarkiert)	0,2 $\mu$ l	11 pM
AmpliTaq Gold DNA-Polymerase (5 U/ $\mu$ l)	0,1 $\mu$ l	1,5 U
H <sub>2</sub> O	auf 10 $\mu$ l	

### PCR-Bedingungen

Die PCR-Bedingungen waren, bis auf die Annealing-Temperaturen, für alle Primer gleich und bestanden aus folgenden Schritten:

- |    |                |   |
|----|----------------|---|
| #1 | 95°C / 5 min.  | Aktivierung der DNA-Polymerase (1 Zyklus)   |
| #2 | 95°C / 25 sec. | Denaturierung der DNA                       |
| #3 | X°C / 30 sec.  | Annealing der Primer (X= Primer-Temperatur) |
| #4 | 72°C / 30 sec. | Extension/ Elongation                       |

*#2- #4 insgesamt 40 Zyklen*

- |    |               |                                  |
|----|---------------|----------------------------------|
| #5 | 72°C / 7 min. | Extension/ Elongation (1 Zyklus) |
|----|---------------|----------------------------------|

Es wurde der Thermocycler PTC-200 von der MJ Research Inc. verwendet. Nach Beendigung der PCR wurden die PCR-Produkte bei 4°C gekühlt und bis zur Fragmentanalyse bei -20°C tiefgefroren.

### Vorbereitung der Proben für die Fragment-Analyse am Genetic-Analyser

Nach der PCR wurden die PCR-Produkte der Leukozyten-DNA-Proben aufgrund der hohen Ausbeute 1:20 mit HPLC-H<sub>2</sub>O verdünnt. Die PCR-Produkte der DNA-Proben aus Blutplasma, Knochenmark-Plasma und Tumorgewebe wurden unverdünnt eingesetzt. Folgender Ansatz wurde in sterile 0,5-ml Eppendorf-Tubes pipettiert:

- # 0,5 µl fluoreszenzmarkiertes PCR-Produkt (unverdünnt oder 1:20 verdünnt)
- # 40 µl HiDi-Formamid
- # 0,2 µl ROX-Size-Standard

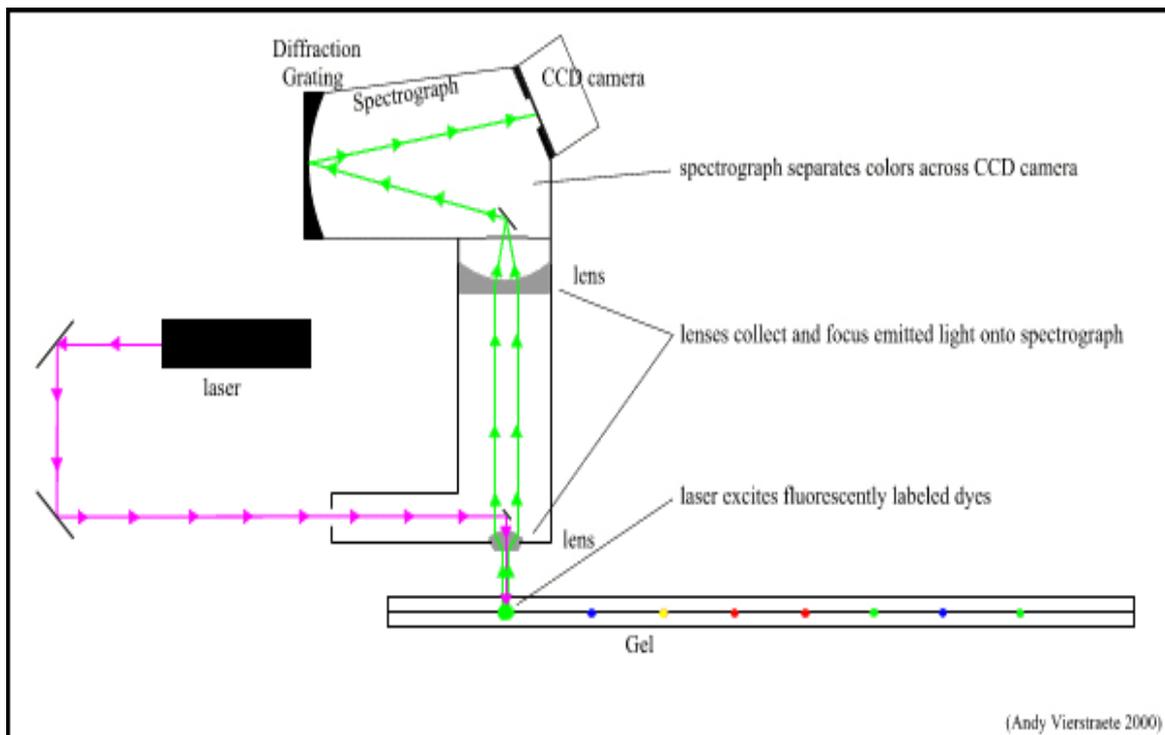
Es folgte die Denaturierung für 2 Min. bei 94°C im Thermocycler PTC-200. Direkt im Anschluss wurden die Proben „schockgefroren“.

### 3.2.9 Fragmentanalyse am Genetic-Analyser



Abb. 12: Genetic-Analyser (ABI-PRISM®310)

Die denaturierten Proben wurden in sog. Recks sortiert. Zusätzlich wurde das Work-Sheet mit der entsprechenden Reihenfolge in den Computer eingegeben. Nach Start des Programms wurden nun die Proben nacheinander in eine mit einer Gelmatrix gefüllte Kapillare gesogen. Die Kapillarelektrophorese (15 kV / 0,9 mA / 60 °C) dauerte pro Probe 24 Min. Dabei wurden die PCR-Produkte entsprechend ihrer Fragment-Größe aufgetrennt und detektiert.



**Abb. 13: Prinzip des ABI-PRISM®-310-Detektionssystems**

Ein Argon-Laser, dessen Hauptemissionen bei Wellenlängen zwischen 488 nm und 514,5 nm liegen, ist das Kernstück der Detektionseinheit. Dabei wird ein Laserstrahl (Energie: 10 mW) durch einen halbdurchlässigen Spiegel auf das vorbeilaufende Trennsystem (Gelmatrix) gerichtet. Wird nun ein Fluoreszenz-markiertes DNA-Fragment des PCR-Produktes von dem Laserstrahl getroffen, wird der jeweilige Farbstoff zur Fluoreszenz angeregt. Das emittierte Licht trifft auf eine konkave Sammellinse, welche die Lichtstrahlen bündelt und auf einen Spektrographen fokussiert. Nachdem das Licht in einem Hohlspiegel prismatisch aufgespalten wurde, erfolgt die Registrierung durch eine CCD-Kamera. Von dort wird die Information an einen Computer weitergeleitet.

Mit Hilfe eines internen Größenstandards (ROX-Size-Standard) können die Größen der DNA-Fragmente erfasst werden und in einem Diagramm als sog. „Peaks“ dargestellt werden. Eine Wasserprobe diente als Negativkontrolle, um Verunreinigungen auszuschließen. Die Darstellung und Auswertung der Peaks am Computer wurde mit der GeneScan-Analysis®3.1 Software durchgeführt (Kap. 4.4).

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Überblick über die Patientenkollektive

In der vorliegenden Arbeit wurden die in Kapitel 3.1 beschriebenen Patientenkollektive untersucht und ausgewertet. Die Tabellen 3 und 4 geben einen Überblick über die jeweiligen Patientenkollektive der Patienten mit benigner Prostatahyperplasie (BPH-Patienten) und der Patienten mit gesichertem Prostatakarzinom mit den vorhandenen klinischen Daten und den Blutplasma-DNA-Konzentrationen.

**Tabelle 3:** BPH-Patienten (n= 27), % f-PSA Werte- und Menge an zellfreier DNA im Blutplasma.

Nr.	Pat-Nr.	%-f-PSA im Serum	Plasma-DNA (ng/ml)
1	15	16,35	385
2	18	29,72	136
3	28	18,34	126
4	40	14,15	195
5	251	16,78	311
6	256	23,08	100
7	259	50	232
8	266	30	2546
9	268	17,78	1642
10	269	16,45	96
11	272	53,66	1155
12	274	26,73	77
13	277	15,27	559
14	295	26,98	267
15	297	32,08	2908
16	298	8,96	1081
17	299	17,52	531
18	301	27,71	470
19	302	26,53	269
20	303	49,26	183
21	306	4,52	117
22	308	17,84	266
23	311	19,63	997

24	313	32,56	716
25	314	18,83	170
26	315	21,07	230
27	318	20,8	356
<i>Mittelwert</i>		24,17	597,07
<i>Median</i>		20,8	269
<i>MIN</i>		4,52	77
<i>MAX</i>		53,66	2908

**Tabelle 4:** Übersicht über die Prostatakarzinom-Patienten und die vorliegenden klinischen Parameter.

Nr.	Patienten-Nr.	Alter	t-PSA	% PSA	f-	Prostata-Volumen cm <sup>3</sup>	pT-Stadium	Gleason	Blutplasma-DNA (ng/ml)
1	K22	64	6,88	--		92	pT2c	3+4	626
2	K23	64	5,61	15,5		30	pT2c	3+3	451
3	K24	47	5,17	7,4		38	pT2a	3+4	361
4	K25	65	33,9	2,8		28	pT3b	3+4	742
5	K26*	56	3,38	9,5		38	pT2a	3+4	813
6	K27	64	7,99	6,9		53	pT3a	3+4	1536
7	K28	70	8,87	0,1		155	pT2c	3+4	659
8	K29*	67	4,11	7,3		31	pT2c	3+4	816
9	K30*	64	4,33	7,2		46	pT3a	3+4	370
10	K31	71	5,52	24,5		43	pT2c	3+3	2018
11	K32	68	14,98	--		44	pT2c	3+3	5530
12	K33	59	4,74	21,1		76	pT2c	3+2	1325
13	K34*	60	3,51	8,8		38	pT3a	3+4	934
14	K35	60	10,94	15,8		98	pT2c	3+3	1679
15	K36	67	10,47	62,9		37	pT2c	3+3	814
16	K37	54	5,41	0,1		37	pT2c	3+3	509
17	K38*	62	2,03	27,1		53	pT2c	3+2	891

18	K39	58	3,57	30,5	59	pT2c	3+2	1776
19	K40	56	6,77	7,7	46	pT2c	3+4	590
20	K41	66	6,87	0,2	38	pT2c	3+4	7575
21	K42	63	5,96	25,5	79	pT2a	3+2	413
22	K43*	68	3,69	0,1	28	pT2a	3+3	331
23	K44	65	4,9	--	86	pT2c	3+3	1428
24	K45	63	8,55	6,1	34	pT2c	3+4	518
25	K46	65	9,94	27	47	pT2c	3+3	268
26	K47	63	8,12	10,2	48	pT2c	3+3	1750
27	K48	67	5,01	20	--	pT3b	3+4	931
28	K49	64	5,74	--	40	pT3a	3+2	1629
29	K50*	61	1,7	--	25	pT2c	3+3	592
30	K51	64	4,63	18,4	40	pT2c	3+2	214
31	K52*	67	3,3	17,9	55	pT2c	3+3	918
32	K53	59	5,15	21,2	51	pT2c	3+3	939
33	K54	66	5,33	13,7	75	pT2c	3+3	890
34	K55	58	4,53	15,7	48	pT3a	3+4	748
35	K56	57	6,28	9,7	45	pT2c	3+4	134
36	K57	46	9	16	58	pT2c	3+3	548
<i>Mittelwert</i>		<i>62,16</i>	<i>6,85</i>	<i>14,73</i>	<i>52,54</i>			<i>1174,05</i>
<i>Median</i>		<i>64</i>	<i>5,46</i>	<i>13,7</i>	<i>46</i>			<i>813,5</i>
<i>MIN</i>		<i>46</i>	<i>1,7</i>	<i>0,1</i>	<i>25</i>			<i>134</i>
<i>MAX</i>		<i>71</i>	<i>33,9</i>	<i>62,9</i>	<i>155</i>			<i>7575</i>

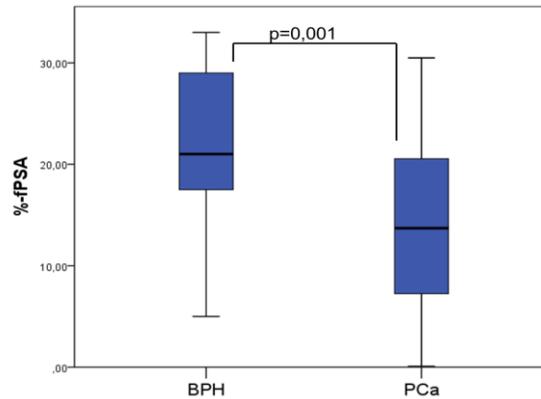
\*Grau unterlegte Felder: Patienten mit DTC-positivem Knochenmarksbefund.

## 4.2 PSA-Werte

### 4.2.1 Vergleich des % f-PSA-Wertes zwischen den beiden Patientenkollektiven

Von beiden Patientenkollektiven liegen PSA-Werte zur Auswertung vor. Der Quotient aus f-PSA/t-PSA (% f-PSA) ist in beiden Patientenkollektiven gebildet worden. Bei den BPH-Patienten liegt der t-PSA-Wert nicht vor (Tab. 3 und 4).

Die % f-PSA-Werte der BPH-Patienten wurden mit denen der Karzinompatienten verglichen, die statistische Auswertung wurde mit dem Mann-Whitney-Test durchgeführt. Der Unterschied in beiden Gruppen ist statistisch signifikant ( $p = 0.001$ ; Abb. 14).



**Abb. 14: Statistisch signifikanter Unterschied der % f-PSA-Werte zwischen den beiden Patientenkollektiven ( $p = 0,001$ )**

#### 4.2.2 t-PSA-Werte der Prostatakarzinom-Patienten

Für die Patienten mit Prostatakarzinom lagen zusätzlich die t-PSA-Werte vor. Die genauere Betrachtung der Werte zeigte, dass 28 Patienten (78 %) PSA-Werte aufwiesen, die oberhalb der altersadjustierten Normalwerte lagen. Nur 8 Patienten (22 %) haben normwertige PSA-Werte nach Altersadjustierung. Von diesen 8 Patienten wiesen 5 Patienten (63 %) einen prozentualen f-PSA-Anteil von <10% auf (Tab. 4). Messtechnisch waren somit 33 von 36 Patienten suspekt auf ein Prostatakarzinom.

#### 4.2.3 Auswertung des % f-PSA-Wertes bei Patienten mit positiven DTCs im Knochenmark

Die Korrelation des % f-PSA Wertes mit dem Knochenmarkstatus zeigte eine starke Tendenz hin zu niedrigen % f-PSA-Werten bei DTC-positiven Patienten. Allerdings lag keine statistische Signifikanz vor. Der p-Wert betrug 0,096 (Abb. 15).

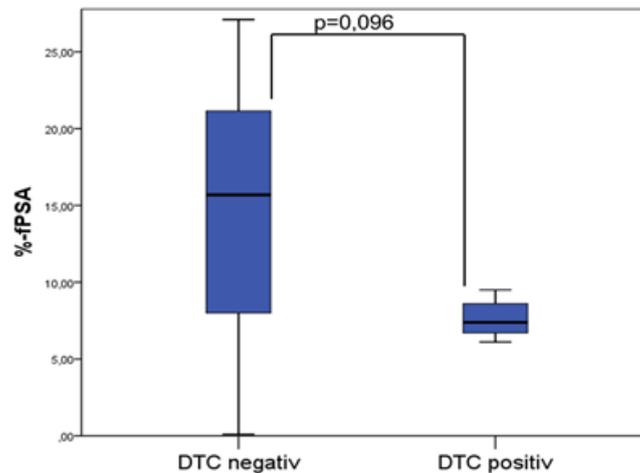


Abb. 15: DTC-positive Patienten und % f-PSA im Blut

### 4.3 DNA-Isolierung und Quantifizierung aus Blut, Knochenmark und Tumorgewebe

Die DNA-Isolierung erfolgte wie in Kap. 3.2 beschrieben. Die isolierte DNA aus Blut von BPH-Patienten sowie aus Blut, Knochenmark und Tumorgewebe von Prostatakarzinom-Patienten wurde quantifiziert. Die Menge an freier DNA im Blut (ng/ml) konnte somit zwischen den beiden Patientenkollektiven verglichen werden.

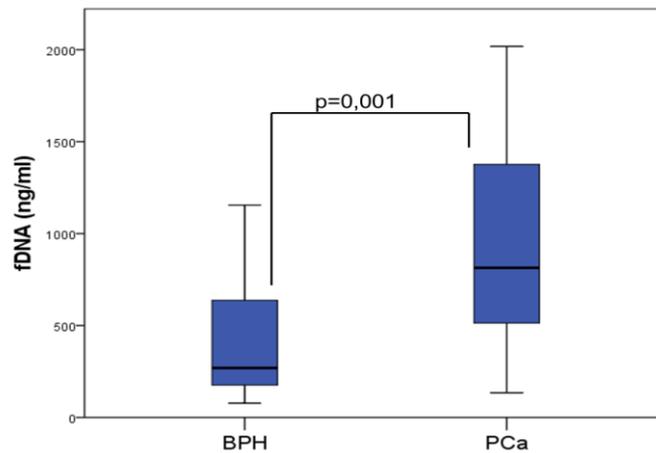
#### 4.3.1 Vergleich der Menge an zellfreier, zirkulierender DNA im Blut zwischen den Kollektiven

Es wurden die absoluten Zahlen wie Mittelwert, Median, Minimum und Maximum (Tab. 4) verglichen, zusätzlich erfolgte eine statistische Auswertung der Messwerte mit dem Mann-Whitney-Test. Die DNA-Mengen waren in den beiden Kollektiven unterschiedlich hoch. Die statistische Auswertung zeigt, dass die Menge an zellfreier, zirkulierender DNA im Blut von Patienten mit Prostatakarzinom gegenüber BPH-Patienten erhöht war ( $p=0,001$ ; Abb. 16).

**Tabelle 5:** DNA-Mengen im Blut von BPH- und Karzinompatienten

	DNA-Gehalt BPH-Patienten in ng/ml	DNA-Gehalt PCa-Patienten in ng/ml
MW	597,0740741	1174,05
Median	269	813,5
MIN	77	134
MAX	2908	7575

Mittelwert, MW; Minimum, MIN; Maximum, MAX



**Abb. 16:** DNA-Gehalt im Blut bei BPH- und Prostatakarzinom-Patienten, dargestellt als Boxplot. Der Unterschied war statistisch signifikant  $p=0,001$ .

#### 4.3.2 Vergleich des DNA-Gehaltes im Blut mit den relevanten klinischen Parametern

Innerhalb des Kollektivs der Patienten mit Prostatakarzinom erfolgten weitere statistische Auswertungen mit den klinischen Parametern der Patienten und dem DNA-Gehalt der Proben (Tab. 4). Dabei konnten keine signifikanten Beziehungen zwischen DNA-Gehalt im Blut und dem T-Stadium, dem Gleason-Score, dem Gesamtvolumen und dem Alter der Patienten errechnet werden.

#### 4.3.3 Vergleich des DNA-Gehaltes im Blut und Knochenmark

Die Menge an zellfreier zirkulierender DNA im Blut von Patienten mit Prostatakarzinom gegenüber der Menge an freier DNA im Knochenmark von Patienten mit Prostatakarzinom war erhöht.

Die Mittelwerte, angegeben in  $\text{ng}/\mu\text{l}$ , betragen  $69,27 \text{ ng}/\mu\text{l}$  für Blut gegenüber  $49,96 \text{ ng}/\mu\text{l}$  im Knochenmark (Tab. 6).

**Tabelle 6:** Vergleich der gemessenen DNA-Werte im Blut und im Knochenmark in Abhängigkeit vom KM-Status (DTC-positiv vs. DTC-negativ).

	B in $\text{ng}/\mu\text{l}$	B in $\text{ng}/\mu\text{l}$	B in $\text{ng}/\mu\text{l}$	KM in $\text{ng}/\mu\text{l}$	KM in $\text{ng}/\mu\text{l}$	KM in $\text{ng}/\mu\text{l}$
		DTC pos.	DTC neg.		DTC pos.*	DTC neg.*
K22	18,8		18,8	16,1		16,1
K23	29,8		29,8	16,2		16,2
K24*	13,8	13,8		27,9	27,9	
K25	31,2		31,2	26,8		26,8
K26*	24,4	24,4		195	195	

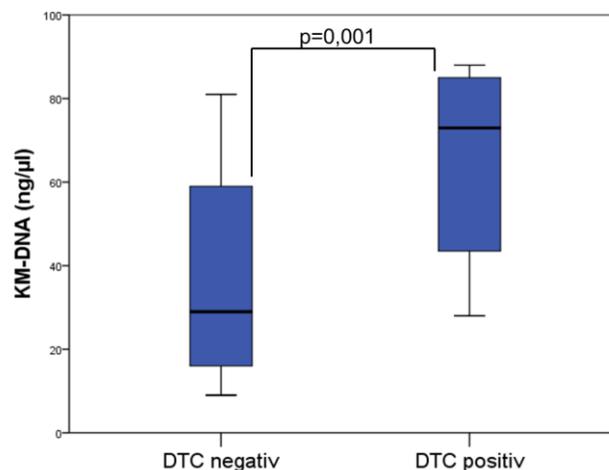
---

K27	92,2		92,2	24,1		24,1
K28	43,5		43,5	58,5		58,5
K29*	44,1	44,1		38,6	38,6	
K30	22,2		22,2	53,4		53,4
K31	133,2		133,2	53,3		53,3
K32	365		365	80,3		80,3
K33	63,3		63,3	31,2		31,2
K34	67,3		67,3	8,6		8,6
K35	80,3		80,3	10,7		10,7
K36	34,2		34,2	43,6		43,6
K37	21,4		21,4	75		75
K38	53,5		53,5	15,9		15,9
K39	127,9		127,9	142,2		n. a.
K40*	31,9	31,9		79,5	79,5	
K41	250		250	18,2		18,2
K42	29,8		29,8	81,2		81,2
K43*	23,9	23,9		66,5	66,5	
K44	121,4		121,4	13,2		13,2
K45*	37,3	37,3		88,5	88,5	
K46	12,9		12,9	11,2		11,2
K47*	94,5	94,5		79,7	79,9	
K48*	44,7	44,7		81,9	81,9	
K49*	88	88		47,8	47,8	
K50	32		32	62,2		62,2
K51	16,7		16,7	29,4		29,4
K52	60,6		60,6	65,5		65,5
K53	45,1		45,1	15,9		15,9
K54	64,1		64,1	37,4		37,4
K55	44,9		44,9	21,3		21,3
K56	56,5		56,5	59,7		59,7

K57	29,6		29,6	22,4		22,4
<b>MW*</b>	65,27	44,7	65,3	49,96	<b>78,37*</b>	<b>53,9*</b>
Median	44,4	37,3	45,1	41,1	79,5	28,1
MIN	12,9	13,8	12,9	8,6	27,9	8,6
MAX	365	94,5	365	195	195	88,5

*\*Grau unterlegte Felder: Patienten mit DTC-positivem Knochenmarksbefund sowie die Menge an freier DNA im Knochenmark als Mittelwert in Abhängigkeit vom Knochenmark-Status. Die DTC-positiven Patienten weisen im Durchschnitt (MW) eine höhere Konzentration an freier DNA im Knochenmark-Plasma auf. Diese Beobachtung war statistisch signifikant ( $p=0,001$ ).*

Interessant in diesem Zusammenhang war die Tatsache, dass dieser Unterschied nicht für Patienten gilt, bei denen DTCs im Knochenmark nachgewiesen wurden. Die DNA-Mengen im Knochenmark-Plasma bei den Patienten mit positivem Knochenmarkstatus (MW: 78,37ng/μl) war gegenüber den Patienten mit negativem KM-Status (MW: 53,9 ng/μl) deutlich erhöht. Dieser Unterschied erreichte statistische Signifikanz ( $p=0,001$ ; Abb. 17).



**Abb. 17: DNA-Mengen im Knochenmark-Plasma bei DTC-positiven vs. DTC-negativen Patienten, dargestellt als Boxplot ( $p=0,001$ ).**

#### 4.3.4 DNA-Isolierung aus Tumorgewebe

##### **Einfluss der gewählten Färbemethode auf die DNA-Qualität und den DNA-Gehalt**

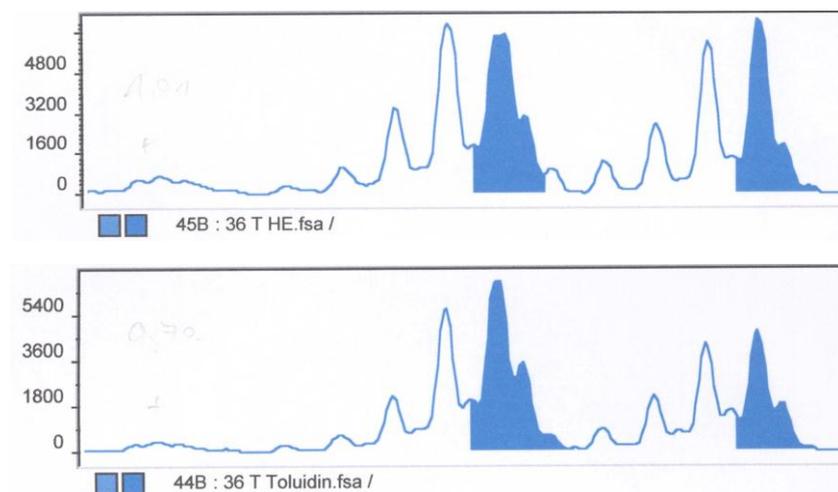
Wie in Kap. 3.2.4 dargestellt, wurde aus den Prostata-tumoren der Patienten mit Prostatakarzinom DNA isoliert und quantifiziert. Zuvor wurden die Gewebeschnitte gefärbt, um die relevanten Areale besser identifizieren zu können. Da die dabei gewählte Färbemethode einen Einfluss auf die Quantität und Qualität der später zu isolierenden DNA haben kann,

wurden zwei Methoden im Hinblick auf die DNA-Ausbeute (Quantität und Qualität) miteinander verglichen.

### Technische Schwierigkeit 1: HE-Färbung vs. Toluidin-Blau-Färbung

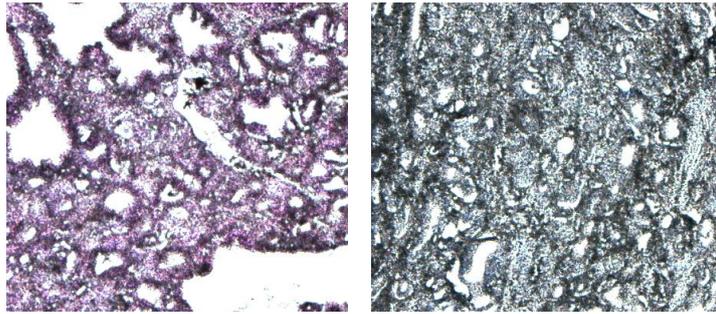
Einen Einfluss der gewählten Färbemethode auf die RT-PCR und die quantitative Genexpressionsanalyse wurde bereits beschrieben [Okuducu et. al, 2003]. Um einen ähnlichen Einfluss auf die Quantität und Qualität der später aus diesem Gewebe zu isolierenden DNA und somit auch auf die PCR für die untersuchten Patienten auszuschließen, wurden mit mehreren Kontrollschnitten zwei Färbemethoden miteinander verglichen. Die Toluidin-Blau-Färbung wurde mit einer leicht modifizierten HE-Färbung verglichen (Kap. 3.2.4).

Die angeschlossene vergleichende Bearbeitung der Schnitte (histologische Beurteilung der Karzinome, DNA-Isolierung und anschließende PCR mit dem Primer D10S1765) zeigte in Bezug auf DNA-Menge und den Reinheitsgehalt keinen Unterschied zwischen den beiden Färbemethoden. Die PCR-Ausbeute (Abb. 18) war bei der HE-Färbung nur minimal höher.



**Abb. 18: Ergebnis der vergleichenden PCR mit DNA aus dem Tumorgewebe des Patienten K36 mit dem Primerpaar D10S1765.**

Die HE-Schnitte waren allerdings unter dem Lichtmikroskop etwas leichter zu beurteilen (Abb. 19) und auch die Handhabung der HE-Färbung war einfacher, so dass diese Färbung als Standard-Methode gewählt wurde. Eine gute Beurteilung der Schnitte ist wichtig, um eine Kontamination der Tumor-DNA mit Stroma-DNA weitgehend zu vermeiden.



**Abb. 19: HE 1:5 (links) vs. Toluidin-Blau-Färbung (rechts) zweier Prostata-Schnitte, 10-fach vergrößert.**

#### **4.3.5 Isolierung der DNA aus dem Knochenmark-Plasma**

##### **Technische Schwierigkeit 2: Fett als Inhibitor der Polymerase im Knochenmark?**

Nach Isolierung der freien DNA aus dem Knochenmark-Plasma mit dem QIamp® DNA-Blood-Mini-Kit wie in Kap. 3.2.5 beschrieben, konnte zunächst trotz ausreichender Quantität und guter Qualität die DNA mit mehreren Primern nicht in einer PCR amplifiziert werden. Vermutlich war die DNA bzw. das Eluat mit einer Substanz aus dem Knochenmark (z. B. Fett?) kontaminiert. Die Fa. Qiagen® riet zur Wiederholung des Reinigungsschrittes und des Eluierungsschrittes. Dies und auch der Einsatz höherer DNA-Mengen erbrachten keinen Erfolg in Bezug auf ein PCR-Produkt.

Wir führten daher, unter der Hypothese einer Verunreinigung mit einem Inhibitor (z. B. Fett), Verdünnungsreihen mit mehreren Primerpaaren durch. Hierbei zeigte sich eine ausgeprägte Abhängigkeit des PCR-Erfolges von der Menge des eingesetzten Begleitvolumens der DNA-Proben (Abb. 20). Bei zunehmenden eingesetzten Mengen an Eluat wurde die PCR erneut negativ, obwohl sie zuvor funktioniert hatte (Abb. 20).

Wir führten in der Folge die PCRs mit verdünnten Proben durch, insgesamt haben wir dabei eine gute Rate an informativen Fällen erhalten (67,5% im Knochenmark vs. 71,5 % im Blut). Was im Einzelnen das Problem verursacht hatte, konnte abschließend leider nicht geklärt werden, die Literaturrecherche war diesbezüglich unergiebig.

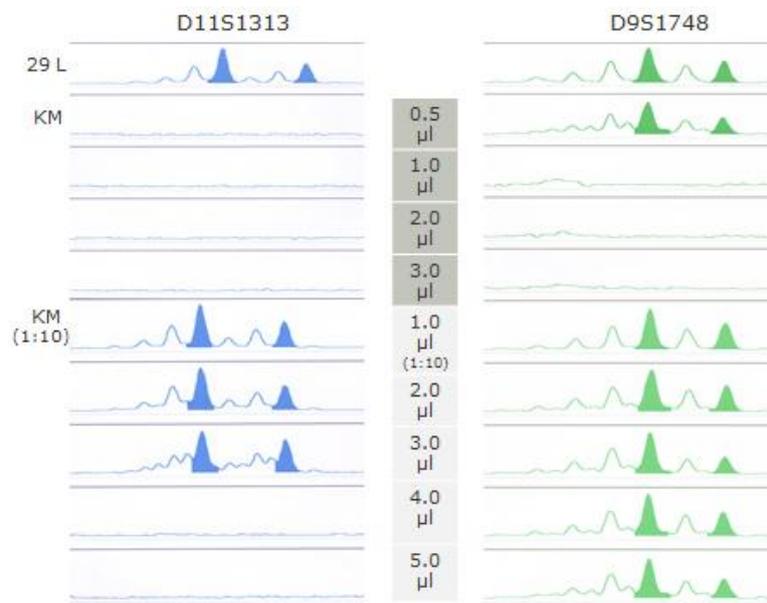


Abb. 20: Abhängigkeit des PCR-Erfolges vom eingesetzten Begleitvolumen

#### 4.4 Nachweis genetischer Alterationen wie LOH/MSI an Mikrosatelliten-DNA

Beide Patienten-Kollektive (BPH- und Prostatakarzinom-Patienten) wurden auf das Vorliegen von Mikrosatelliten-Alterationen in der zellfreien zirkulierenden tumorassoziierten DNA untersucht. Hierzu wurde ein Panel von Primerpaaren, die an 13 Mikrosatelliten-Markern binden, eingesetzt (Kap. 3.2.7).

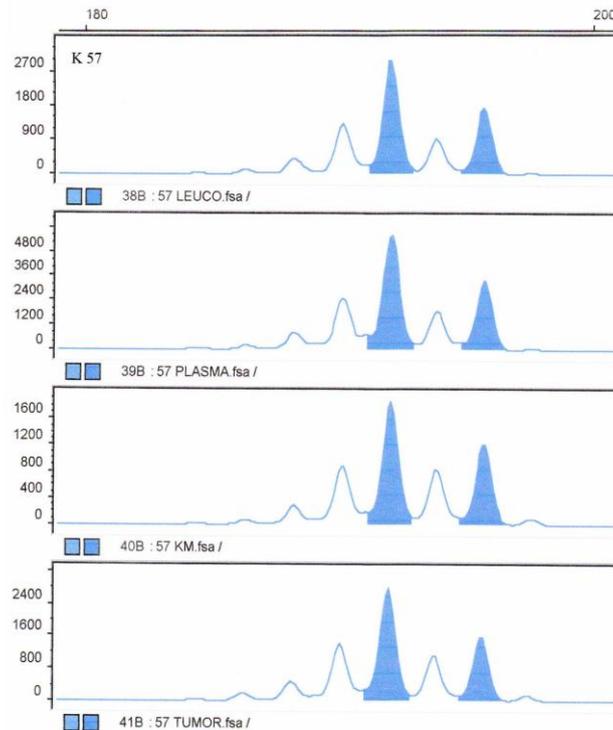
Für die Untersuchung des Kollektivs der BPH-Patienten stand freie zirkulierende DNA ausschließlich aus Blut (B) zur Verfügung. Für das Kollektiv der Karzinompatienten standen zusätzlich freie DNA aus Knochenmark (KM) und Tumorgewebe (T) zur Verfügung.

##### 4.4.1 Auswertung der Peaks (PCR-Produkte) am Genetic-Analyser mit der Gene-Scan®-Software

Für die Auswertung der Proben und Bestimmung von LOH/MSI wurde die DNA aus Leukozyten als gesundes Vergleichsgewebe des jeweiligen Patienten genutzt. Vor Beginn der eigentlichen Auswertung wurde zunächst die sogenannte Leerprobe (Negativkontrolle) begutachtet. War diese Probe leer, bedeutete dies, dass keine Verunreinigung in den Proben enthalten und die Proben somit aussagefähig waren.

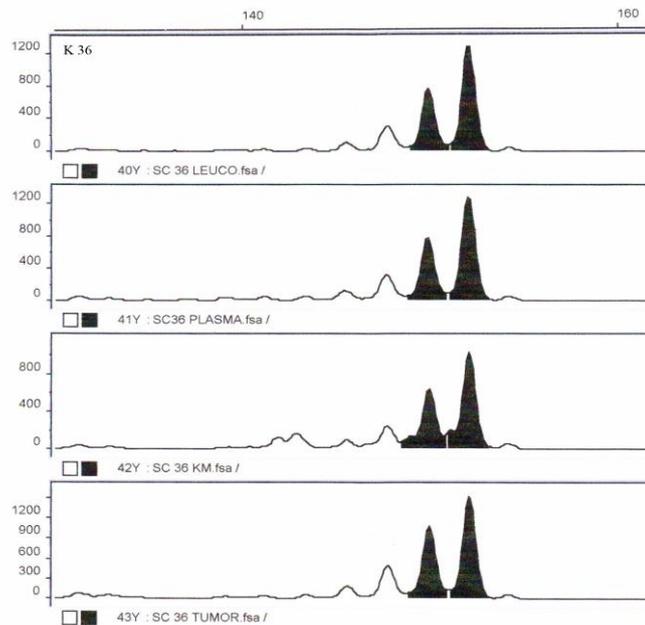
Weiterhin interessierte die Peakhöhe [angegeben in sog. Fluoreszenzeinheiten (FE)], die den Wert von 200 FE nicht unter- und den Wert von >6000-7000 FE nicht überschreiten sollte. Bei der optischen Auswertung der Peaks, also letztlich der Allele, war es wichtig, die entstandenen PCR-Artefakte [sog. Slippage-Peaks (Stotterbanden) und sog. A-Trails (Adeninanhänge)] vom eigentlichen Allel zu unterscheiden. Die ausgewählten Peaks wurden mithilfe der Gene-Scan®-Software farblich markiert, durch die gesetzten Markierungen

wurden automatisch die Fluoreszenzeinheiten (Peakhöhe) in einer Tabelle angegeben. Neben der Höhe der Peaks in FE wurden auch die Fläche unter der Kurve (Quantität) und die Fragment-Größe angegeben (Abb. 21).



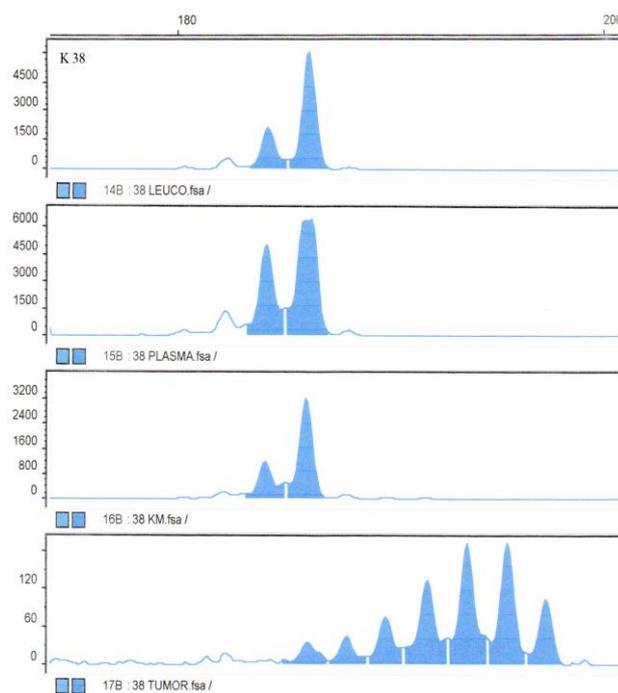
**Abb. 21: Beispiel eines informativen Falles, es liegt Heterozygotie vor. Der Patient K57 ohne LOH/MSI am Locus D10S1765. Nacheinander von oben nach unten: Leukozyten (LEUCO), Blutplasma (PLASMA), Knochenmark-Plasma (KM), Tumorgewebe (TUMOR).**

Im Rahmen der durchgeführten optischen Auswertung zeigte sich auch, ob die untersuchten Patienten und Proben in Hinblick auf die Fragestellung für den jeweiligen Primer informativ waren, also ob Heterozygotie vorlag oder nicht. Lag der Fall einer Homozygotie vor oder war ein PCR-Produkt nicht vorhanden, wurde die Probe ggf. nach Wiederholung als nicht-informativ (NI) im Hinblick auf die Fragestellung gewertet (Abb. 22).

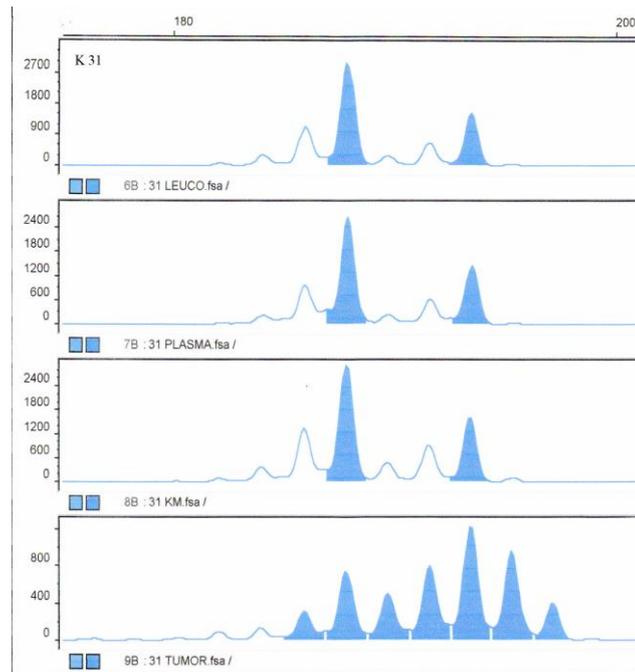


**Abb. 22:** Beispiel eines nicht-informativen Falles (NI), es liegt Homozygotie (H) vor. Der Patient K36 am Marker D8S87. Nacheinander von oben nach unten: Leukozyten (LEUCO), Blutplasma (PLASMA), Knochenmark-Plasma (KM), Tumorgewebe (TUMOR).

Die rein optische Auswertung war bei Patienten mit einer detektierten Mikrosatelliteninstabilität möglich und ausreichend. Denn durch das Vorliegen zusätzlicher Banden sind diese Fälle relativ leicht zu erkennen (Abb. 23 und 24).



**Abb. 23:** Interessanter Fall eines am Marker D11S1313 homozygoten Patienten (K38). Im Tumorgewebe zeigt sich an diesem Locus eine Mikrosatelliteninstabilität (MSI). Nacheinander von oben nach unten: Leukozyten (LEUCO), Blutplasma (PLASMA), Knochenmark-Plasma (KM), Tumorgewebe (TUMOR).

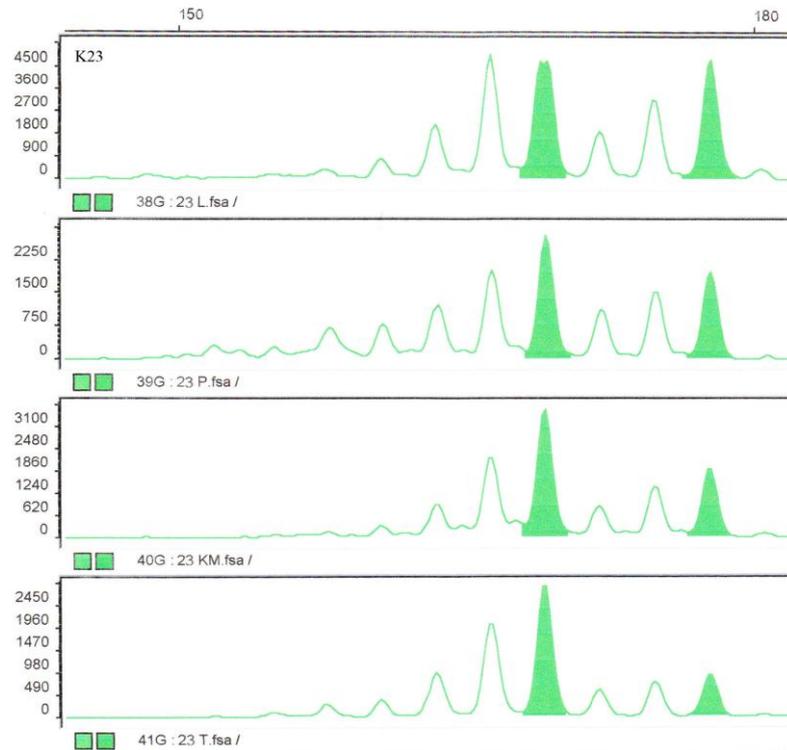


**Abb. 24:** Beispiel eines weiteren informativen Falles, es liegt Heterozygotie vor. Patient K31 zeigt eine Mikrosatelliteninstabilität (MSI) im Tumorgewebe am Marker D11S1313. Nacheinander von oben nach unten: Leukozyten (LEUCO), Blutplasma (PLASMA), Knochenmark-Plasma (KM), Tumorgewebe (TUMOR).

Die mathematische Auswertung mit Berechnung der Peaks und deren Verhältnis zueinander war für die Fälle notwendig, die in der optischen Auswertung den Verdacht auf das Vorliegen einer LOH ergaben. Da ein kompletter Verlust eines Allels selten vorliegt, sondern vielmehr ein relativer Allelverlust, werden die Allele durch eine Formel zueinander in Beziehung gesetzt und das Ausmaß des Allelverlustes somit festgestellt.

$$\text{LOH} = \frac{\frac{\text{Höhe rechter Peak Leukozyten}}{\text{Höhe linker Peak Leukozyten}}}{\frac{\text{Höhe rechter Peak B/KM/T}}{\text{Höhe linker Peak B/KM/T}}} \leq 0,6 \text{ bzw. } \geq 1,6$$

Wenn der gebildete Quotient entsprechend oberhalb oder unterhalb der festgesetzten Grenzwerte lag, bedeutete dies eine Differenz zwischen den Peakhöhen der beiden Allele von >40%, also einen Allelverlust von >40%. Die Abbildung 25 zeigt ein LOH bei dem Patienten K23 im Tumorgewebe und im Knochenmark-Plasma (T, KM). Die Berechnungen der Peakhöhen sind exemplarisch in Tabelle 7 dargestellt.



**Abb. 25:** LOH im Knochenmark-Plasma (KM) und Tumorgewebe (T) bei dem Patienten K23 am Marker D6S1631. Nacheinander von oben nach unten: Leukozyten (L), Blutplasma (P), Knochenmark-Plasma (KM), Tumorgewebe (T).

**Tabelle 7:** Höhe der Peaks in Abb. 25. Patient K23 zeigt ein LOH im Tumorgewebe und im Knochenmark-Plasma am Locus D6S1631.

Allele	Peakhöhe (FE)	Peak 2/Peak 1	Quotient
Peak 1 L	5781	0,93	---
Peak 2 L	5423		
Peak 1 P	3190	0,7	1,32
Peak 2 P	2234		
Peak 1 KM	4015	0,54	1,72
Peak 2 KM	2188		
Peak 1 T	3334	0,31	3,0
Peak 2 T	1036		

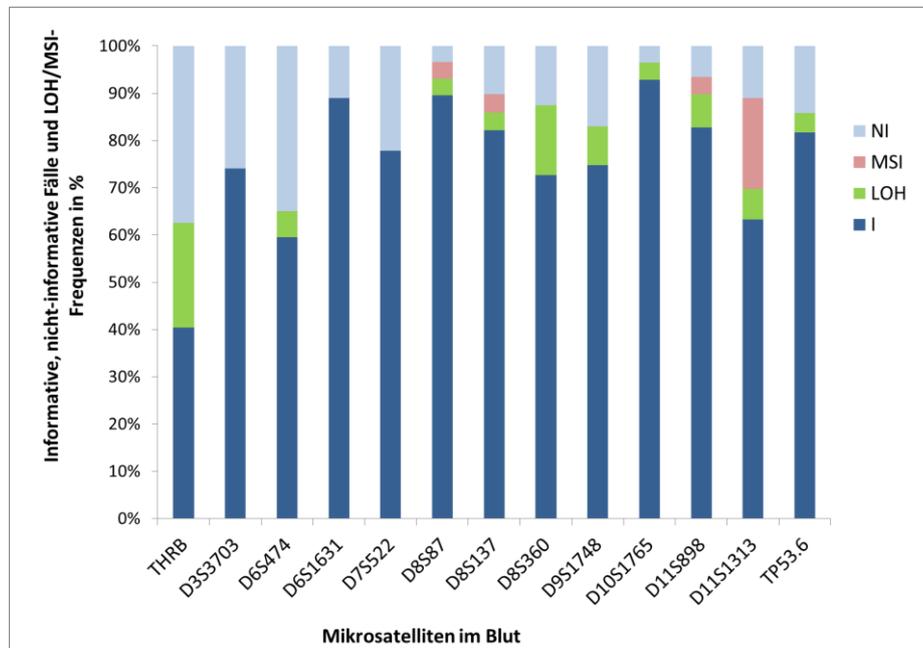
*Grau unterlegt: Die errechneten Quotienten für das Knochenmarkplasma (Peak 1 und 2 KM: 1,72) und für das Tumorgewebe (Peak 1 und 2 T: 3,0) bei dem Patienten K23.*

#### 4.4.2 DNA-Alterationen in der zellfreien, zirkulierenden DNA bei BPH-Patienten

Das Kollektiv der BPH-Patienten umfasste 27 Patienten. Bei 13 untersuchten Markern wurden folglich 351 Proben (27x13) untersucht. Davon waren 288 Proben (82,1 % der Fälle) informativ (I), es bestand also Heterozygotie für die beiden Allele. 63 Proben (17,9 % der Fälle) waren hingegen nicht informativ (NI), es bestand also entweder Homozygotie,

oder die Proben waren aus anderen Gründen nicht informativ (z. B. fehlendes PCR-Produkt).

Bei den 288 informativen Fällen wurden insgesamt 28 Alterationen detektiert, 19 x (6,59% der informativen Fälle) wurde ein LOH, 9 x (3,12% der informativen Fälle) wurde eine MSI festgestellt (Abb. 26; Tab. 8).



**Abb. 26:** Übersicht über die Anzahl und Prozentsätze an informativen Fällen (I), nicht-informativen Fällen (NI) und Mikrosatellitenalterationen (LOH und MSI) an den jeweiligen Markern in dem BPH-Kollektiv.

Insgesamt zeigten 15 Patienten (55,5%) im BPH-Kollektiv mindestens 1 LOH/MSI. Der Index (Anzahl der LOH/MSI pro Patient bezogen auf die informativen Fälle) betrug 6,5 % für LOH und 3,4% für die MSI.

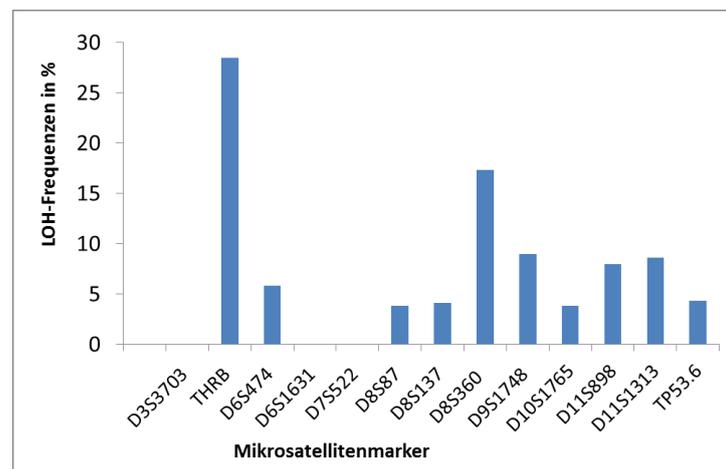
Es waren 10 der 13 Marker von LOH/MSI-Ereignissen betroffen. Die Marker D3S3703, D6S1631 und D7S522 zeigten keine Ereignisse und waren tumorspezifisch. Die Marker THRB (28,5%) und D8S360 sind am meisten betroffen (17,3%). Einen Überblick gibt die Abb. 27 und die Tabelle 8.

**Tabelle 8:** Tabellarische Übersicht der einzelnen Mikrosatelliten-Marker mit Anzahl der informativen Fälle sowie der LOH- und MSI-Frequenzen.

Marker	Blut					
	LOH	inform.	%	MSI	inform.	%
D3S3703	0	20	0	0	20	0
THRB	4	14	28,5	0	14	0
D6S474	1	17	5,8	0	17	0

D6S1631	0	24	0	0	24	0
D7S522	0	21	0	0	21	0
D8S87	1	26	3,8	1	26	3,8
D8S137	1	24	4,1	1	24	4,1
D8S360	4	23	17,3	0	23	0
D9S1748	2	22	9	0	22	0
D10S1765	1	26	3,8	0	26	0
D11S898	2	25	8	1	25	4
D11S1313	2	23	8,6	6	23	26
TP53.6	1	23	4,3	0	23	0
$\Sigma^*$	19	288	6,59	9	288	3,1 2

*Grau unterlegte Felder: Die am häufigsten von LOH/MSI betroffenen Marker sind kenntlich gemacht. Die Zahlen jeweils rechts in den Spalten geben die Ereignishäufigkeiten in % bezogen auf die Gesamtzahl an informativen Fällen (Mitte) an. \*=Gesamthäufigkeit an LOH und MSI im Blut in % (Vgl. Abb. XX).*



**Abb. 27: LOH-Frequenz an den einzelnen Markern bei den BPH-Patienten**

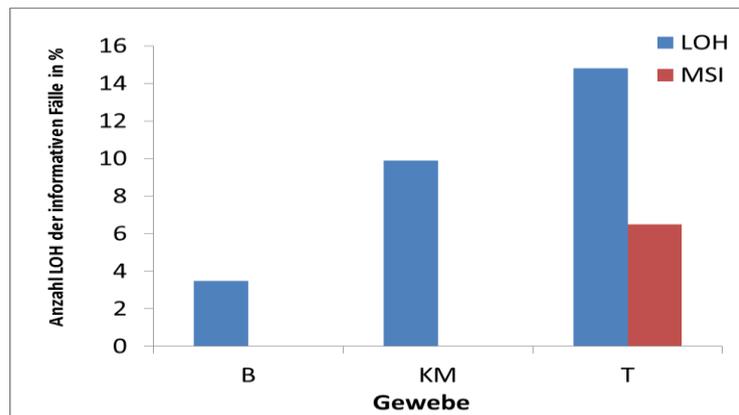
Die Analyse und Korrelation der vorliegenden klinischen Daten (% f-PSA, freie DNA im Blut) erbrachte keine Unterschiede bzw. Auffälligkeiten zwischen den Patienten mit oder ohne DNA-Alterationen, weder für die Gesamtzahl an LOH an allen Markern noch für einzelne Marker. Die Mittelwerte zwischen LOH- und nicht LOH-Patienten für % f-PSA (23,3 vs. 24,8) und f-DNA in ng/ml (589,3 vs. 603,3) im Blut waren annähernd gleich.

#### 4.4.3 DNA-Alterationen bei den Prostatakarzinom-Patienten

Für das Kollektiv der Prostatakarzinom-Patienten stand freie DNA aus Blut (B), Knochenmark (KM) sowie DNA aus dem Tumorgewebe (T) für die Analysen zur Verfügung.

Insgesamt zeigten 32 von 36 Patienten des Kollektivs (88,8 %) mindestens 1 LOH oder MSI im Blut, Knochenmark oder Tumorgewebe. Dabei zeigten 66,6% der Tumorproben, 52,7% der Knochenmarksproben und 30,5% der Blutproben LOH oder MSI an mindestens einem Locus. In allen untersuchten Kompartimenten (B, KM, T) waren somit Mikrosatellitalterationen nachweisbar. Die einzelnen Kompartimente wurden getrennt ausgewertet.

Bezogen auf die informativen Fälle wurden im Blut insgesamt 12 LOH (3,6 %), im Knochenmark 30 LOH (9,9%) und im Tumorgewebe 39 LOH (14,4%) nachgewiesen. Zusätzlich wurden im Tumorgewebe 17 MSI (6,3 %) nachgewiesen, keine MSI zeigten sich im Blutplasma oder Knochenmark. Zusammenfassend war also die Rate an Ereignissen (Mikrosatellitenalterationen) bezogen auf die informativen Fälle im Tumorgewebe am höchsten, dann folgten das Knochenmark-Plasma und das Blutplasma (siehe Tab. 9, Abb. 28 und 29).



**Abb. 28: LOH- und MSI-Raten in den verschiedenen Kompartimenten (Blut, Knochenmark und Tumorgewebe) bei den Prostatakarzinom-Patienten.**

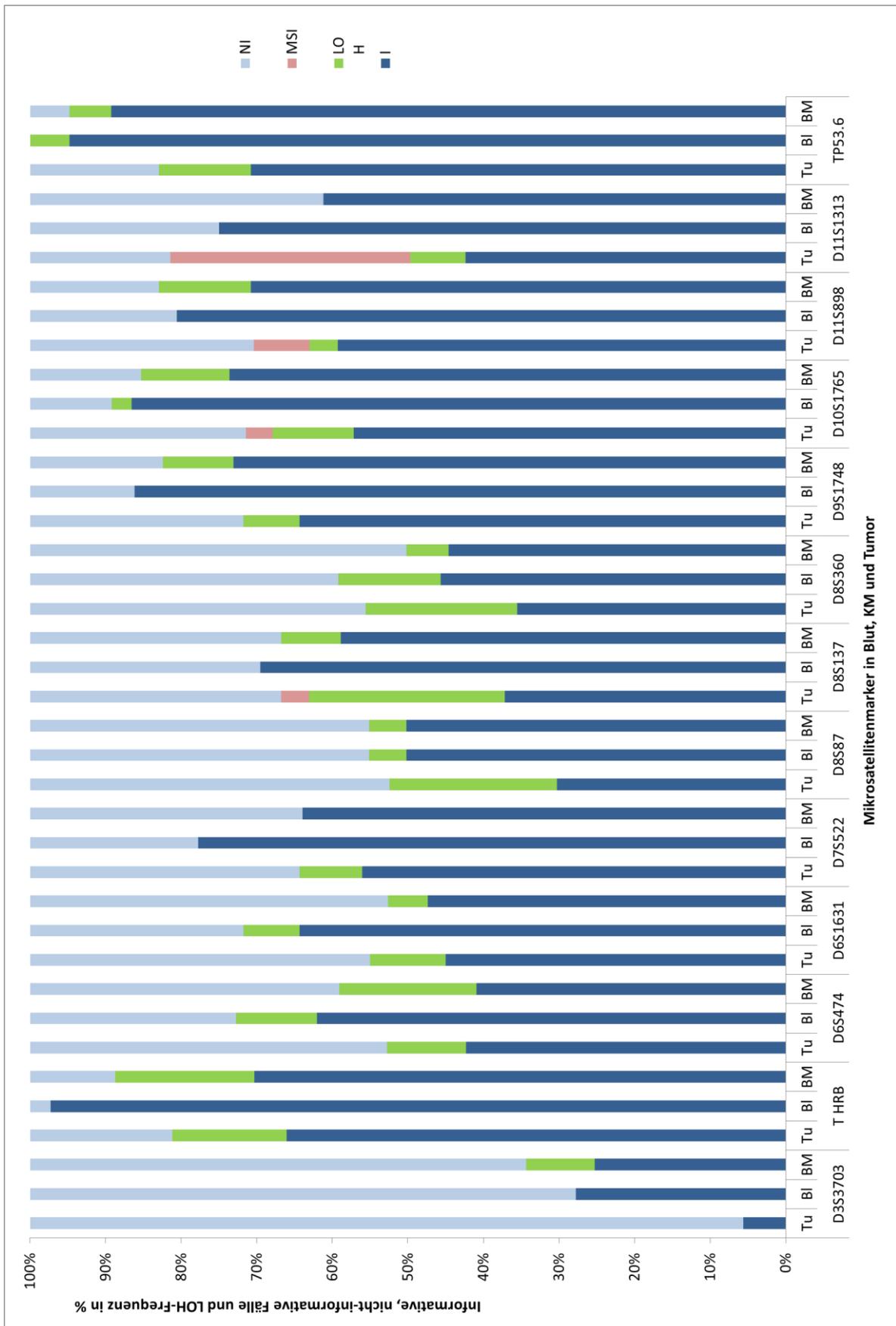
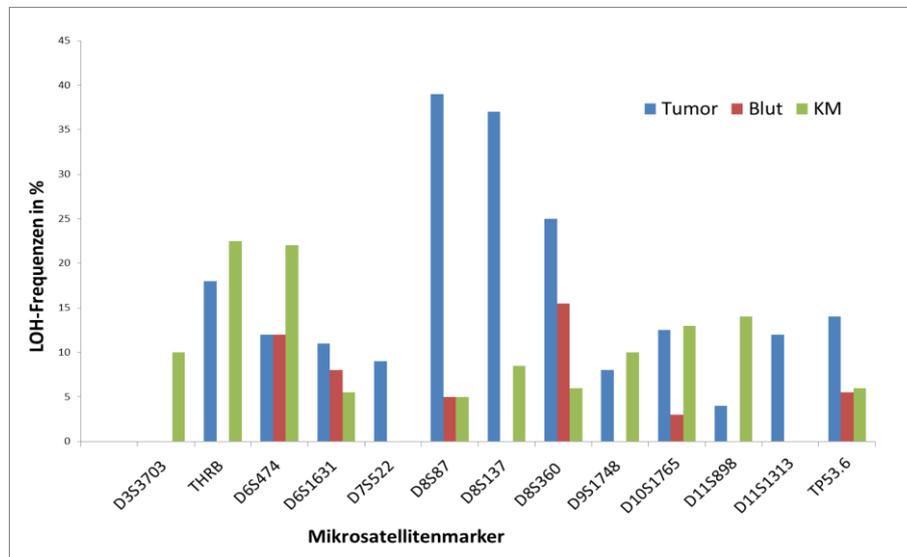


Abb. 29: Übersicht über Frequenz und Anzahl an informativen (I), nicht-informativen Fällen (NI), LOH und MSI im Kollektiv der Prostatakarzinom-Patienten.



#### 4.4.4 LOH-Verteilungsmuster an den verschiedenen Markern

Alle aufgeführten Marker wurden in die LOH-Analysen miteinbezogen und zeigten mindestens ein LOH/MSI in eines der Kompartimente Blut, Knochenmark oder Tumorgewebe (Abb. 29 und 30; Tab. 10).



**Abb. 30:** LOH-Frequenz an den einzelnen Markern bei den Prostatakarzinom-Patienten

Wie in Abb. 30 gezeigt, weichen die LOH-Frequenzen zwischen den untersuchten Geweben deutlich voneinander ab. Im Tumorgewebe waren im Unterschied zum Blut und zum Knochenmark LOH besonders an den Markern THRB (18%), D8S87 (39%), D8S137 (37%), D8S360 (25%), D11S1313 (12%) und TP.53.6 (14%) nachzuweisen.

Im Knochenmark waren die Marker D3S3707 (10%), THRB (22,5%) D6S474 (22%) und D11S898 (14%) bevorzugt von einem LOH betroffen.

Das Blut der Prostatakarzinom-Patienten zeigte die wenigsten Ereignisse. Hier waren die bevorzugten Marker der D6S474 (12%) und D8S360 (15,5%).

Die sehr hohe Rate an MSI im Tumorgewebe konnte besonders am Marker D11S1313 (52% d. F.) nachgewiesen werden.

**Tabelle 10:** Tabellarische Übersicht der einzelnen Mikrosatelliten-Marker mit Anzahl der informativen Fälle sowie der LOH- und MSI-Frequenzen.

Marker	Blut			Tumor						KM		
	LOH	inform.	%	LOH	inform.	%	MSI	inform.	%	LOH	inform.	%
D3S3703	0	10	0	0	2	0	0	2	0	1	10	10
THRB	0	35	0	5	28	18	0	28	0	7	31	22,5
D6S474	3	25	12	2	17	12	0	17	0	4	18	22

D6S1631	2	18	8	2	25	11	0	25	0	1	18	5,5
D7S522	0	28	0	2	22	9	0	22	0	0	23	0
D8S87	1	19	5	4	14	39	0	14	0	1	19	5
D8S137	0	25	0	7	19	37	1	19	5,2	2	23	8,5
D8S360	3	19	15,5	4	16	25	0	16	0	1	17	6
D9S1748	0	31	0	2	25	8	0	25	0	3	29	10
D10S1765	1	32	3	3	24	12,5	1	24	4	4	30	13
D11S898	0	29	0	1	24	4	2	24	8	4	29	14
D11S1313	0	27	0	3	25	12	13	25	52	0	22	0
TP53.6	2	36	5,5	4	29	14	0	29	0	2	34	6
$\Sigma^*$	12	334	3,6	39	270	14,4	17	270	6,3	30	303	9,9

*Grau unterlegte Felder: Die am häufigsten von LOH oder MSI betroffenen Marker sind für die jeweiligen Kompartimente (Blut, Knochenmark, Tumorgewebe) kenntlich gemacht. Die Zahlen jeweils rechts in den Spalten geben die Ereignishäufigkeiten in % bezogen auf die Gesamtzahl an informativen Fällen (Mitte) an. Für die MSI ist eine Spalte angelegt, sie trat nur im Tumorgewebe auf. \*=Gesamthäufigkeit an LOH und MSI im jeweiligen Kompartiment in % (Vgl. Abb. 28).*

### **Konkordanz zwischen den detektierten genetischen Veränderungen in Blut, Knochenmark und Tumorgewebe**

Entsprechend der Fragestellung und des experimentellen Ansatzes dieser Arbeit wurde die Konkordanz zwischen den einzelnen Kompartimenten ausgewertet.

Dabei zeigte sich, dass 9 (30%) der im Knochenmark detektierten LOH auch im korrespondierenden Tumorgewebe nachweisbar waren. In 21 Fällen (70%) war das entsprechende LOH aus dem KM nicht im Tumor nachweisbar.

Für das Blut ergaben sich ähnliche Werte: Lediglich 4 LOH aus dem Blut (33,3%) waren in der korrespondierenden Tumorprobe nachweisbar und in 67% war das LOH aus dem Blut nicht im Tumorgewebe nachweisbar.

Interessanterweise war zwischen den Kompartimenten Blut und Knochenmark überhaupt keine Übereinstimmung bezüglich der detektierten LOHs festzustellen. Nur eines der im KM nachgewiesenen LOH war auch in der korrespondierenden Blutprobe nachweisbar (3,3%).

Die im Tumorgewebe detektierten MSI waren allesamt im Blut und im Knochenmark nicht nachweisbar.

#### 4.4.5 Korrelation mit den relevanten klinischen Daten der Patienten und Tendenzen

Die durchgeführten Korrelationsanalysen konnten keine statistisch signifikanten Korrelationen für Alter, T-Stadium, Gleason-Score, DNA-Mengen und PSA-Werte nachweisen.

##### Tendenzen

Neben den absoluten Häufigkeiten von LOH mit unterschiedlicher Präferenz für unterschiedliche Marker in unterschiedlichen Kompartimenten zeigte sich eine gewisse Konsistenz für die Detektion von LOH an den Markern D6S474, D6S1631, D8S360 und TP.53.6 in allen Kompartimenten. Anders formuliert könnte man sagen, dass in dem analysierten Kollektiv die genannten Marker an den Chromosomen 6, 8 und 17 im Blut und Knochenmark, vor dem Hintergrund der Fragestellung, am ehesten in der Lage waren, die Ereignisse im Primärtumor abzubilden.

#### 4.4.6 Vergleich der genetischen Alterationen im Blutplasma zwischen den Kollektiven

Der Vergleich zwischen den beiden Kollektiven in Bezug auf detektierte LOHs zeigt eine heterogene Verteilung von LOH auf mehrere Marker sowohl im BPH-Kollektiv als auch im Karzinom-Kollektiv. Relativ konsistent war dabei der LOH-Nachweis an den Markern D6S474, D8S360, D10S1765 und TP.53.6 in beiden Kollektiven. Der Marker D6S1631 war am ehesten karzinomspezifisch, die Loci THRB, D8S137, D9S1748, D11S898 und D11S1313 zeigten im Blut dagegen nur bei den BPH-Patienten LOH (Abb. 31).

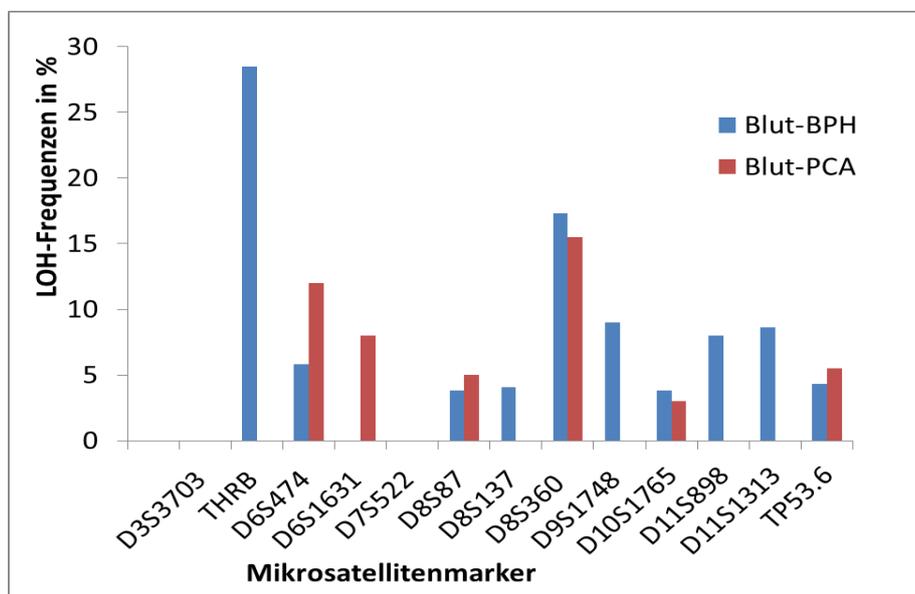


Abb. 31: LOH-Muster im Blut von Prostatakarzinom- und BPH-Patienten

## 4.5 Immunzytochemischer Nachweis disseminierter Tumorzellen (DTC) im Knochenmark von Prostatakarzinom-Patienten

Von insgesamt 35 der 36 Patienten mit Prostatakarzinom wurde das Knochenmark mit der Ficoll-Gradienten-Methode und anschließender Färbung und Auswertung (Kap. 3.2) nach DTCs durchsucht. Die Probe des Patienten K39 ist im Verlaufe der Isolierung zu Schaden gekommen, sodass eine Auswertung bezüglich der DTC nicht mehr möglich war. Das KM-Plasma dieses Patienten ist für die LOH-Analysen erhalten geblieben.

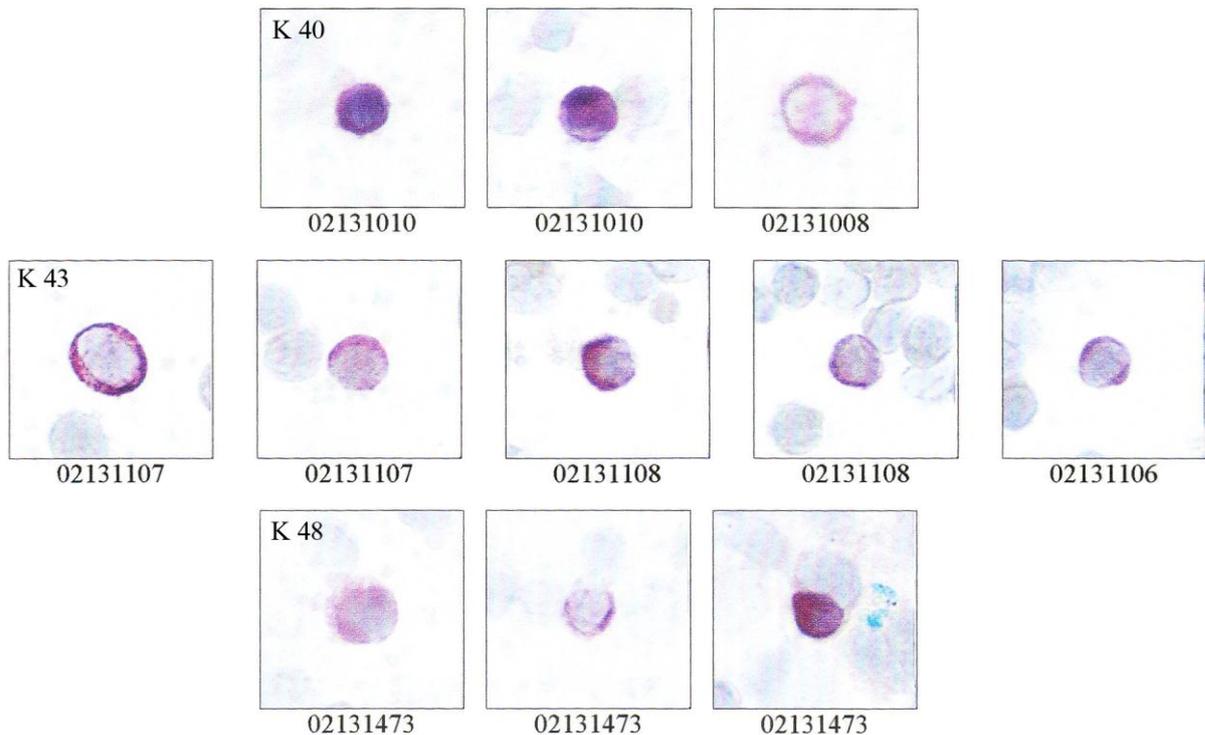
### 4.5.1 Klinische Details der Patienten mit Nachweis von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark

Insgesamt wurden bei 9 Patienten (25,7 %) Cytokeratin-positive Zellen im Knochenmark detektiert. Die Tabelle 9 gibt einen Überblick über die klinischen Details dieser Patienten.

**Tabelle 11:** DTC-positive Patienten und die vorhandenen klinischen Parameter.

Patient	Anzahl DTC	Gleason	DNA-KM in ng/μl	DNA-B in ng/μl	Volumen cm <sup>3</sup>	T-Stadium
K24	2	3+4	27,9	13,8	38	pT2a
K26	2	3+4	195	24,4	28	pT3b
K29	1	3+4	38,6	44,1	38	pT2a
K40	3	3+4	79,5	31,9	53	pT3a
K43	7	3+3	66,5	23,9	155	pT2c
K45	1	3+4	88,5	37,3	31	pT2c
K47	1	3+3	79,9	94,5	46	pT3a
K48	2	3+4	81,9	44,7	43	pT2c
K49	3	3+2	47,8	88	44	pT2c
<i>Mittelwert</i>			<i>78,4</i>	<i>44,7</i>	<i>52,9</i>	

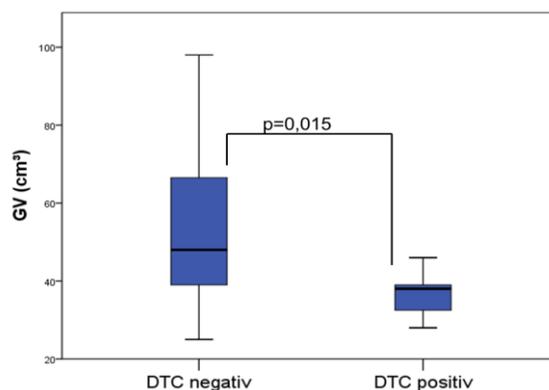
Exemplarisch sind in der Abbildung 32 detektierte Cytokeratin-positive Zellen der Patienten K40 (insg. 3 DTC), K43 (insg. 7 DTC) und K48 (insg. 2 DTC) dargestellt. Die technische Auswertung und Vorauswahl aller positiven Zellen wurde von Frau Antja Andreas durchgeführt, die endgültige Befundung der detektierten Zellen erfolgte dann durch Frau Dr. Sabine Riethdorf und Herrn Prof. Dr. Klaus Pantel am ACIS (Kap. 3.2.3). Zur Erhöhung der Sensitivität wurden alle Cytopspinnungen insgesamt 3-mal durchgesucht.



**Abb. 32: Cytokeratin (CK-19)-positive Zellen im Knochenmark der Patienten K40, K43 und K48. Der Befund ganz rechts im Bild (02131473) bei Patient K48 wurde als Verunreinigung und somit als Artefakt gewertet (somit nur 2 DTC).**

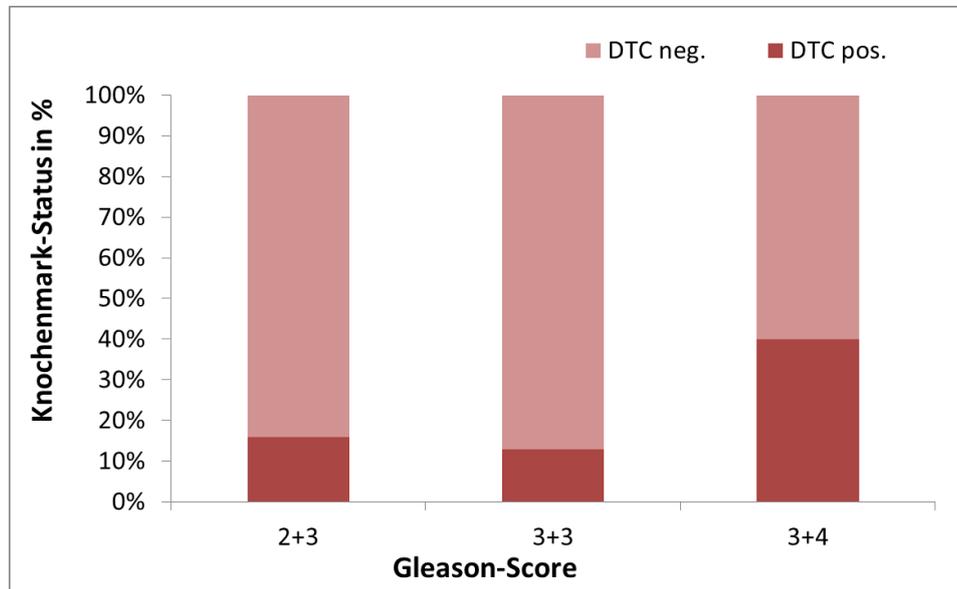
#### 4.5.2 Auswertung der klinischen Daten der Patienten mit positiven DTC im Knochenmark

Die Analyse der klinischen Daten in dem Kollektiv zeigt eine auffällige Tendenz bei den DTC-positiven Patienten zu eher kleineren Drüsen ( $p=0,015$ ) in niedrigen Tumorstadien (67% pT2) und einem höheren Gleason-Score (Gleason-Summe  $(3+2)5 = 16\%$ ,  $(3+3)6 = 13\%$ ,  $(3+4)7 = 40\%$ ). Angesichts des eher kleinen Kollektivs sind die Ergebnisse der Korrelationsanalysen und die der deskriptiven Statistik allerdings als nicht sehr aussagekräftig anzusehen, obgleich für das Gesamtvolumen statistische Signifikanz vorliegt (Abb. 33).



**Abb. 33: Statistische Signifikanz zwischen dem Gesamtvolumen der Prostata und dem Knochenmarkstatus**

Die Abbildung 34 zeigt die Ergebnisse der Auswertung in Bezug auf den Gleason-Score. Hier zeigt sich, dass bei einem höheren Gleason-Score (>6) das Risiko für einen positiven Knochenmarksbefund (DTC-positiv) tendenziell höher lag als bei einem Gleason-Score  $\leq 6$  (Abb. 34).



**Abb. 34: Gleason-Score bei DTC-positiven Patienten**

Wie bereits dargestellt ist die Konzentration zirkulierender DNA bei den DTC-positiven Patienten im Knochenmark deutlich erhöht ( $p=0,001$ ). Die Korrelation der weiteren klinischen Daten der Patienten wie Alter, T-Stadium, LOH-Frequenzen, PSA-Werte ergab keine statistisch signifikanten Ergebnisse.

#### **4.5.3 Gesamt-LOH-Frequenzen im Blut, Knochenmark und Tumorgewebe: DTC-positive vs. DTC-negative Patienten**

Die LOH-Frequenzen, bezogen auf die informativen Fälle, waren bei den Patienten mit positivem Knochenmarksbefund erhöht.

Zum einen zeigten insgesamt 67% der Patienten mit DTCs im Knochenmark mindestens ein LOH in Blut, Knochenmark oder Tumorgewebe, wohingegen nur 52 % der Patienten ohne nachweisbare DTCs im Knochenmark von LOH-Ereignissen in Blut, Knochenmark oder Tumorgewebe betroffen waren (deutliche Tendenz, keine Signifikanz). Zum anderen war tendenziell auch die Rate an LOH pro Patient (3,3 vs. 2,7 LOH) geringfügig erhöht (s. Abb. 35 und 36).

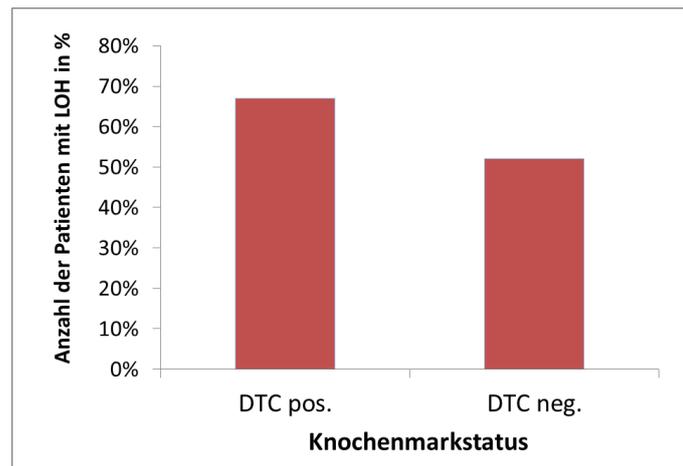


Abb. 35: Anzahl der Patienten mit mindestens 1 LOH in einer der Proben in Abhängigkeit vom Knochenmarkstatus

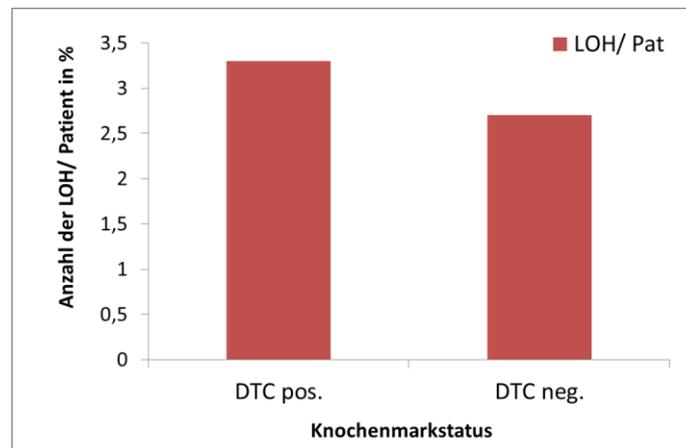
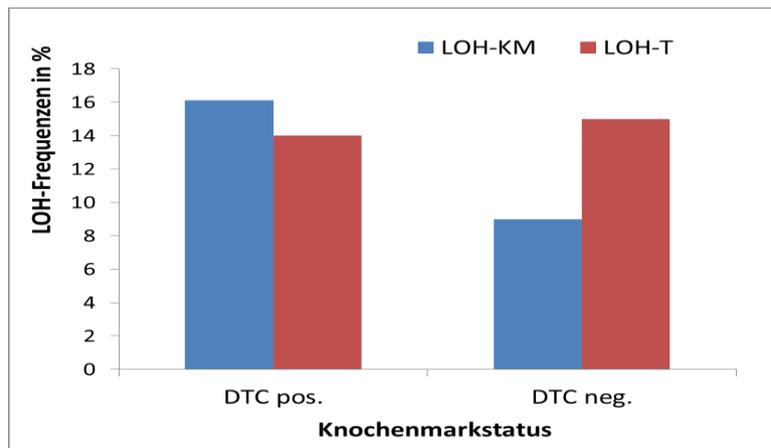


Abb. 36: Anzahl der LOH pro Patient in Abhängigkeit vom Knochenmarkstatus

#### 4.5.4 LOH-Frequenzen im Knochenmark und Tumorgewebe: DTC-positive vs. DTC-negative Patienten

Neben den geschilderten Befunden mit insgesamt und auch pro Patient erhöhten LOH-Raten bei DTC-positiven Patienten waren nach genauer Analyse nur die Raten der LOH-Ereignisse im Knochenmarkplasma deutlich erhöht (16% vs. 9%, keine Signifikanz).

Im Tumorgewebe war die Rate an LOH (14% vs. 15%) annähernd gleich (Abb. 37).



**Abb. 37: Vergleich der LOH-Raten im Knochenmark und Tumorgewebe der DTC-positiven und DTC-negativen Patienten**

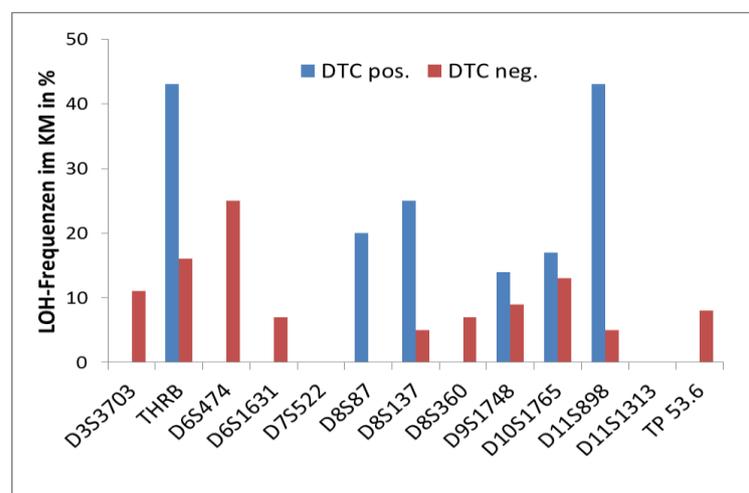
### LOH im Blut bei DTC-positiven Patienten

Für das Blut erfolgte in der Subgruppe (DTC-positive und DTC-negative Patienten) keine Auswertung, da die Gesamtausbeute mit 4 LOH aller informativen Fälle für Blut bei den DTCs-positiven Patienten insgesamt zu gering war. Die im Blut detektierten LOH waren an den Markern D6S474, D6S1631, D8S360 und TP53.6 nachweisbar.

Interessanterweise waren die LOH an D6S474 (Patient K26) und an D8S360 (Patient K40) auch im Tumor (konkordant) nachweisbar.

### 4.5.5 LOH-Verteilungsmuster an den verschiedenen Markern bei DTC-positiven vs. DTC-negativen Patienten.

Neben den dargestellten interessanten Ergebnissen mit der erhöhten LOH-Rate im Knochenmark bei DTC-positiven Patienten (Abb. 37) zeigte sich, dass LOH im Knochenmark an sehr unterschiedlichen Loci innerhalb der beiden Subgruppen (DTC-pos. vs. DTC-neg.) zu beobachten war (Abb. 38).



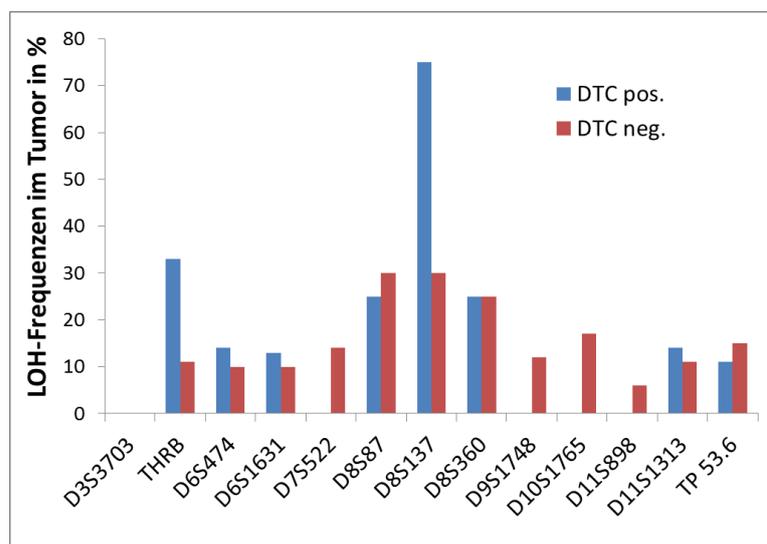
**Abb. 38: LOH-Muster im Knochenmark in Abhängigkeit vom Knochenmarkstatus**

Bei DTC-positiven Patienten waren im Unterschied zu den DTC-negativen Patienten vor allem die Marker THRB (43% vs. 16%), D8S87 (20% vs. 0%), D8S137 (25% vs. 5%), D9S1748 (14% vs. 9%), D10S1765 (17% vs. 13%) und D11S898 (43% vs. 5%) von LOH betroffen.

Die Marker D3S3703 (0% vs. 11%), D6S474 (0% vs. 27%), D6S1631 (0% vs. 7%), D8S360 (7% vs. 0%) und TP 53.6 (0% vs. 8%) zeigten dagegen bei DTC-negativen Patienten vermehrt LOHs.

### LOH im Tumorgewebe bei Patienten mit positivem Knochenmarkstatus

Im Tumorgewebe waren die LOH an den einzelnen Markern deutlich homogener verteilt (Abb. 39).



**Abb. 39: LOH-Muster im Tumorgewebe in Abhängigkeit vom Knochenmarkstatus**

Eine auffällige Ausnahme bei DTC-positiven Patienten bilden hier die Marker THRB (33% vs. 11%) und D8S137 (75% vs. 30%).

Bei den DTC-negativen Patienten hingegen zeigten die Loci D7S522 (0% vs. 14%), D9S1748 (0% vs. 12%), D10S1765 (0% vs. 17%) und D11S898 (0% vs. 7%) im Tumor häufiger LOH.

## 5 Diskussion

Derzeit erfolgt die Früherkennung des Prostatakarzinoms in Deutschland nach den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Urologie, mit der Bestimmung des PSA-Wertes im Blut kombiniert mit der digitalen-rektalen Untersuchung der Prostata (DRU) und ggf. einer transrektalen Sonographie (TRUS) mit oder ohne Biopsieentnahme. Neben dem totalen PSA-Wert können weitere Berechnungen und Bestimmungen (altersspezifische Cut-off-Werte, PSA-Density, PSA-Velocity, % f-PSA) erfolgen, um die diagnostische Genauigkeit im Hinblick auf ein Prostatakarzinom zu verbessern. Diese Art der Früherkennung führt zu dem Problem der Überdiagnose und Übertherapie der männlichen Bevölkerung, ohne sicher eine Senkung der Mortalitätsraten für das Prostatakarzinom herbeigeführt zu haben. Die Daten der großen klinischen randomisierten Untersuchungen zu diesem Thema haben bezüglich Nutzen und Risiko des PSA-Screenings widersprüchliche Resultate gezeigt, wonach nun weder der Nutzen noch der Nicht-Nutzen des PSA-Screenings belegt ist [Crosswell et al., 2011; Chen et al., 2011]. Deshalb werden neue diagnostische Ansätze, die den PSA-Test ergänzen, dringend benötigt. Tumorspezifische DNA ist im Blut von Patienten mit Krebserkrankungen erhöht nachweisbar, da Tumorzellen durch verschiedene Mechanismen DNA in das Blut abgeben [Leon et al., 1975; Schwarzenbach et al., 2011]. Es ist interessant, spezifische genetische Veränderungen des Primärtumors direkt im zirkulierenden Blut nachzuweisen, da Blut wie bei der PSA-Bestimmung sehr einfach durch Venenpunktion gewonnen werden kann. Zum einen würde man auf diese Weise die Diagnostik im Hinblick auf ein Karzinom verfeinern können, zum anderen könnten aus den detektierten genetischen Veränderungen bereits prognostische Informationen gewonnen werden.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Analyse von zirkulierender, zellfreier DNA neben Blut auch aus dem Knochenmark und der genomischen DNA aus dem Primärtumor von Patienten mit einem Prostatakarzinom. Diese DNA wurde auf tumorspezifische Alterationen wie LOH und MSI untersucht. Die DNA-Analysen erfolgten über 13 verschiedene Mikrosatellitenmarker, die an 8 verschiedenen Chromosomen liegen. Als Vergleichskollektiv zu den Prostatakarzinom-Patienten wurden Patienten mit einer gutartigen Prostatavergrößerung (BPH) auf die gleiche Weise analysiert, allerdings wurde bei diesen Patienten kein Prostatagewebe untersucht. Die Ergebnisse der DNA-Analysen aus dem Blutplasma wurden zwischen den beiden Patientenkollektiven (gutartige vs. bösartige Prostataerkrankung) verglichen. Innerhalb des Kollektivs der Karzinompatienten erfolgte zusätzlich ein Vergleich der Ergebnisse der DNA-Analysen zwischen den drei untersuchten biologischen Kompartimenten Blut, Knochenmark und Tumorgewebe, um die Konkordanz zwischen den detektierten Veränderungen in den jeweiligen Kompartimenten zu untersuchen.

Neben der Analyse von zellfreier DNA aus Blut, Knochenmark und Tumorgewebe wurden die Prostatakarzinompatienten auch auf das Vorliegen von disseminierten Tumorzellen (DTCs) im Knochenmark untersucht, da Untersuchungen der letzten Jahre eine prognostische Relevanz solcher Zellen im Knochenmark, bei mehreren soliden Tumorentitäten, vor-

schlagen [Riethdorf et al., 2008]. Die DTC-positiven und DTC-negativen Patienten wurden mit den detektierten DNA-Alterationen (LOH-Muster, LOH-Frequenz im Blut, Knochenmark und Tumorgewebe) verglichen.

In die statistische Auswertung wurden zusätzlich die klinischen Daten und bereits etablierte Prognose- und Risikofaktoren miteinbezogen. Im Folgenden werden die relevanten Ergebnisse dieser Arbeit diskutiert.

## 5.1 PSA-Werte

Zur Auswertung lagen die t-PSA-Werte der Patienten mit Prostatakarzinom vor, zusätzlich der % f-PSA-Quotient. Für die BPH-Patienten lag ausschließlich der % f-PSA-Quotient vor.

### PSA Werte bei den Patienten mit Prostatakarzinom

Die t-PSA Werte der Karzinompatienten waren zu 78% auffällig, das bedeutet oberhalb der altersadjustierten Cut-off-Werte. Die Patienten mit unauffälligen t-PSA-Werten (22%) hatten zu 63% einen karzinomsuspekten % f-PSA-Quotienten (<10%). Anhand der beiden Parameter (t-PSA und % f-PSA) konnten somit 33 der 36 Patienten mit Prostatakarzinom detektiert werden.

Diese Ergebnisse zeigen zum einen, dass mit dem % f-PSA-Wert in Kombination mit dem t-PSA-Wert die Aussagekraft erhöht werden kann, zum anderen zeigen sie, dass das PSA-Screening alleine in der Früherkennung des Prostatakarzinoms nicht ausreichend ist (Problem der falsch negativen und falsch positiven Ergebnisse).

### Vergleich der % f-PSA-Werte zwischen den Kollektiven

Die % f-PSA-Werte der Patienten mit Prostatakarzinom waren gegenüber den Werten der Patienten mit einer BPH erniedrigt. Zwischen den beiden Patientenkollektiven bestand ein statistisch signifikanter Unterschied.

Die Spezifität der PSA-Testung kann um bis zu 20 % erhöht werden, wenn man den Anteil des f-PSA in Beziehung zum t-PSA setzt. Je kleiner der Quotient (f-PSA/t-PSA) und somit der Anteil des f-PSA in % ist, desto wahrscheinlicher ist das Vorliegen eines Karzinoms [Catalona et al., 1997].

### % f-PSA-Werte bei DTC-positiven Patienten

Die DTC-positiven Patienten hatten gegenüber den DTC-negativen Patienten eine deutliche Tendenz hin zu sehr niedrigen % f-PSA-Werten (75% < 10%). Statistische Signifikanz lag hierfür allerdings nicht vor. Auffällig war, dass innerhalb des Kollektivs der Karzinompatienten die DTC-positiven Patienten in 75% der Fälle normale t-PSA-Werte im Blut hatten. Die Beobachtung, dass der t-PSA-Wert trotz DTCs im Knochenmark unauffällig sein kann, könnte durch die „Dormancy“ der DTCs erklärt werden. Zusätzlich zeigt dieser Befund an, dass der alleinigen Früherkennung mittels PSA-Wert-Bestimmung im Blut, selbst

Karzinome entgehen können, in denen bereits eine Disseminierung von Tumorzellen stattgefunden hat. Auch wird die moderne Theorie bestätigt, dass bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt in der Karzinomentwicklung einige Krebszellen in der Lage sind, die komplette Metastasierungskaskade zu durchlaufen [Pantel und Brakenhoff, 2004].

Weitere Korrelationen zwischen den PSA-Werten und den übrigen vorliegenden klinischen Parametern einerseits sowie den LOH-Mustern und -Frequenzen andererseits ergaben keine statistischen Signifikanzen.

## **5.2 Quantifizierung der freien zirkulierenden DNA**

Da Tumorzellen freie DNA durch aktive Sekretion, Apoptose oder Nekrose in das Blut abgeben, könnte durch die Quantifizierung der DNA im Blut, zusätzlich zur Bestimmung des PSA-Wertes, eine bessere Genauigkeit bezüglich der Frage, ob ein Karzinom vorliegt oder nicht, erreicht werden. Mehrere Untersuchungen haben dies bisher vorgeschlagen [Jung et al., 2004; Papadopoulou et al., 2004; Boddy et al., 2005; Chun et al., 2006; Müller et al., 2006; Fleischhacker et al., 2007; Schwarzenbach et al., 2009].

### **Vergleich der DNA-Konzentration im Blutplasma**

In dem Kollektiv der Patienten mit Prostatakarzinom war der DNA-Gehalt im Blut deutlich und statistisch signifikant gegenüber dem Vergleichskollektiv der BPH-Patienten erhöht. Dennoch ist bei der Interpretation von erhöhten DNA-Spiegeln im Blut Vorsicht geboten, da auch konkurrierende Ursachen wie Entzündungen oder gutartige Tumoren für die Erhöhung der DNA im Blut verantwortlich sein können [Schwarzenbach et al., 2011]. Eventuell wäre ein Cut-off-Level deshalb hilfreich, jedoch gibt es auch einzelne Patienten, deren DNA-Level nicht so deutlich erhöht war.

### **Vergleich der DNA-Konzentration im Blut- und Knochenmarkplasma in Abhängigkeit vom Knochenmarkstatus**

Auch wenn DTCs bereits in anderen Organen nachweisbar sind, so dient das Knochenmark gewissermaßen als Reservoir für DTCs, von wo aus die Zellen erneut zirkulieren können oder in der „Dormancy“ verharren [Pantel und Alix-Panabières, 2010]. Die Untersuchung dieses Kompartimentes nach freier Tumor-assoziiierter DNA ist ein sehr interessanter Ansatz, wenn man davon ausgeht, dass ein Teil der DNA im Knochenmark von den DTCs stammen kann [Taback et al., 2003]. Auch könnten durch Nachweis tumorspezifischer genetischer Alterationen an dieser DNA die DTCs näher charakterisiert werden.

Bei den Patienten mit Prostatakarzinom ließ sich insgesamt mehr DNA im Blutplasma als im Knochenmark-Plasma nachweisen. Bei DTC-positiven Patienten war die Konzentration an freier DNA im Knochenmark signifikant höher als in DTC-negativen Patienten. Dieses spricht für einen Freisetzungsmechanismus von DNA in das Knochenmark durch die Tumorzellen analog zu den Mechanismen, die für die erhöhten Spiegel an freier DNA im Blutplasma von Karzinompatienten gelten [Taback et al., 2003; Schwarzenbach et al.,

2011]. Ein erhöhter DNA-Spiegel im Knochenmark könnte also auf die Freisetzung dieser DNA durch DTCs und somit auf DTCs im Knochenmark hinweisen.

### **5.3 DNA-Analysen in Blut, Knochenmark und Tumorgewebe von Patienten mit Prostatakarzinom und benigner Prostatahyperplasie**

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen experimentellen Ansatz für die Analyse von zellfreier tumorspezifischer DNA im Blut von Prostatakarzinom zu etablieren. Die Eignung dieses Ansatzes sollte zur Früherkennung und Charakterisierung des Prostatakarzinoms geprüft werden. Als Kontrollgruppe diente ein Kollektiv von Patienten mit benigner Prostatahyperplasie. Neben der DNA im Blut wurden auch das Knochenmarkplasma und das Primärtumorgewebe der Patienten mit Prostatakarzinom auf genetische Alterationen wie LOH und MSI untersucht.

Eine häufige genetische Alteration im Prostatakarzinom stellt der Verlust der Heterozygotie (LOH) dar. An mehreren chromosomalen Loci wurden bisher Deletionen durch molekularbiologische Techniken wie die komparative genomische Hybridisierung (CGH) oder mikrosatellitenbasierte LOH-Analysen nachgewiesen [Dong, 2001; Elo et al., 2001; Yano et al., 2004]. Durch Transfer von bestimmten deletierten Genabschnitten in Zelllinien konnte gezeigt werden, dass diese deletierten Gene in der Tumorentstehung und Progression des Prostatakarzinoms eine wichtige Rolle spielen können. In Abhängigkeit von einem fortgeschrittenen Tumorstadium lässt sich eine erhöhte LOH-Frequenz nachweisen, wobei dann auch Gene betroffen sind, die in der Tumorprogression und Metastasierung eine Rolle spielen [Ichikawa et al., 2000; von Knobloch et al., 2004]. Auch MSI wurde bereits in hoher Anzahl in Prostataatumoren nachgewiesen [Rohrbach et al., 1999; Wullich et al., 2001]. Da Tumorzellen freie DNA durch verschiedene Mechanismen in das Blut abgeben, stellt die Analyse dieser frei zirkulierenden DNA aus dem Blut- und Knochenmarkplasma von Prostatakarzinom-Patienten ein attraktives Tool für die Detektion dieser genetischen Veränderungen dar. Zum einen ist Blut leicht zu gewinnen, zum anderen ist das Knochenmark der häufigste Metastasierungsort des Prostatakarzinoms [Pantel et al., 2004; Schwarzenbach et al., 2007 und 2011]. Da das Knochenmark im Gegensatz zum fließenden Blut ein eher stationäres Kompartiment bildet und zeitgleich der häufigste Metastasierungsort und ein Reservoir für disseminierte Prostatakarzinomzellen darstellt [Pantel und Alix-Panabières, 2010], könnte tumorspezifische DNA dort akkumulieren.

#### **5.3.1 Charakterisierung der Mikrosatellitenmarker und Bestimmung der LOH-Frequenzen**

In dem in dieser Arbeit untersuchten Kollektiv von 36 Patienten mit einem Prostatakarzinom wurde bei 88,8 % der Patienten mindestens 1 LOH/MSI entweder im Blut, Knochenmark oder Tumorgewebe an 13 Mikrosatellitenmarkern nachgewiesen. Es wurden im Blut 12 LOH (3,6 %), im Knochenmark 30 LOH (9,9%) und im Tumorgewebe 39 LOH (14,4%)

detektiert. Zusätzlich zeigten sich im Tumorgewebe 17 MSI (6,3 %), die im Blutplasma oder Knochenmark nicht auftraten. Somit war also die Rate der Mikrosatellitenalterationen im Tumorgewebe am höchsten, es folgten das Knochenmarkplasma und das Blutplasma. Für die Entität des Prostatakarzinoms wurden bisher keine Untersuchungen veröffentlicht, die genetische Alterationen der isolierten tumorspezifischen DNA aus Knochenmarkpunktionen untersucht haben. Ähnliche Ergebnisse haben Taback et al. [2003] veröffentlicht. Ihnen gelang in 23 % der Fälle LOH an freier DNA aus dem Knochenmarkplasma bei Mammakarzinom-Patientinnen nachzuweisen. Die LOH-Rate im Knochenmark war dabei mit zunehmendem Tumorstadium erhöht, zusätzlich konnte eine Konkordanz mit den genetischen Veränderungen im Primärtumorgewebe gezeigt werden. Auch in der Arbeitsgruppe von Taback war die LOH-Rate im Knochenmark höher als im Blut [Taback et al., 2003]. Das Knochenmarkplasma scheint also als eher stationäres Kompartiment im Hinblick auf tumorspezifische Alterationen mehr informativ zu sein als das zirkulierende Blut. Zumindest kann dies für bevorzugt ossär metastasierende Karzinome wie das Prostata- und das Mammakarzinom hypothetisch postuliert werden.

Im Folgenden werden die 13 von mir untersuchten Mikrosatellitenmarker nach ihrer Lage auf den Chromosomen charakterisiert und die Ergebnisse für die einzelnen Marker diskutiert.

### Chromosom 3

Der Tumormarker **D3S3703** befindet sich auf dem Chromosom 3q13.3. In dem untersuchten Kollektiv fand sich lediglich 1 LOH (10% der informativen Fälle) im Knochenmarkplasma. Dieser Locus kodiert ein membrangebundenes Glykoprotein (Beta-1,4-Galactosyltransferase), das eine Rolle in der Glykolipid-Biosynthese spielt. Die Veränderung oder der Verlust der Expression scheint für die abweichende Biosynthese der membrangebundenen Carbohydrate während der Metastasierung eine Rolle zu spielen [Kemmer et al., 1997]. Einschränkend muss erwähnt werden, dass dieser Marker wenig informative Fälle im Blut (10), Knochenmarkplasma (10) und Tumorgewebe (2) zeigte. Daher ist der Marker D3S3703 für diese Studie nicht geeignet.

Beim Prostatakarzinom wurden hohe Inzidenzen an LOH in der für den Retinsäure-Rezeptor B kodierenden Region 3p24 (**THRB**) entdeckt. Die Bindung von All-trans-Retinsäure an seinen Rezeptor hat einen wachstumshemmenden Effekt. Ein Verlust des Rezeptors kann zu einer erhöhten Zellproliferation führen und eine Downregulation des Rezeptors wurde für das Prostatakarzinom berichtet [Qiu et al., 2000; Nakayama et al., 2001]. Auch in meinem untersuchten Kollektiv fand sich eine sehr hohe Anzahl an LOHs im Knochenmarkplasma (22,5%) und Tumorgewebe (18%) bei einer hohen Anzahl an informativen Fällen. Im Blut konnte dagegen bei 35 informativen Fällen kein einziges LOH detektiert werden. Ein LOH am Marker **THRB** fand sich bei 43% der Patienten mit DTCs im Knochenmark. Dieses zeigt eine Assoziation mit der Tumorzell dissemination. Bei 33% der Patienten mit DTCs war das LOH zwischen Tumorgewebe und Knochenmarkplasma konkordant.

### Chromosom 6

Der Mikrosatellitenmarker **D6S474** liegt in der chromosomalen Region 6q21. Das in diesem Bereich befindliche Gen kodiert für den Proteinkinase-Inhibitor-B (PKI-B). Der Verlust des PKI-B bedingt eine gesteigerte Aktivität der Proteinkinase B (PKB) und damit eine Stimulation der Zellproliferation und gleichzeitig eine Inhibition der Apoptose. In Prostatakarzinomen ist die Expression der PKB hochreguliert und korreliert mit dem Gleason-Score. Die Assoziation einer erhöhten PKB-Expression mit einem hohen präoperativen PSA-Wert im Serum wurde ebenfalls beobachtet [Liao et al., 2003]. In meinem Kollektiv zeigte dieser Marker im Blut 3 LOHs (12%), im Tumorgewebe 2 LOHs (22%) und im Knochenmark 4 LOHs (22%). Eine Korrelation mit einem hohen PSA-Wert oder dem Gleason-Score lag nicht vor.

Der Mikrosatellitenmarker **D6S1631** liegt in der Region 6q16. Hier befindet sich ein Gen, das für die Transforming-Growth-Factor (TGF- $\beta$ )-aktivierende Kinase (TAK-1) kodiert. Untersuchungen an der humanen Prostatazelllinie PC-3U zeigten, dass die TGF- $\beta$ -induzierte Apoptose dieser Zellen auf die Aktivierung der TAK1 zurückzuführen ist. Ektopische Expression von TAK-1 stimuliert die Apoptose, während der Verlust die Apoptose herunterreguliert [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]. Insgesamt fanden sich in meinem Kollektiv 5 LOHs an diesem Marker, 2 (8%) im Blut, 2 (11%) im Tumorgewebe und 1 (5,5%) im Knochenmarkplasma. Ob diese Patienten eine schlechtere Prognose hatten, ist nicht bekannt, da keine Follow-up-Daten vorliegen.

### Chromosom 7

In meinem Kollektiv zeigte der Marker (**D7S522**) 2 LOHs im Tumorgewebe. Im Blut oder Knochenmark wurden keine Alterationen detektiert. Der Marker scheint also wenig informativ im Hinblick auf die Fragestellung zu sein. Das Gen für Caveolin-1 befindet sich auf dem Chromosom an Lokus 7q31.1 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 zum einen als negativer Regulator der Ras-p42/44 MAP-Kinase-Kaskade und zum anderen als ein transkriptionaler Repressor des Cyclin D1 [Liu et al., 2002].

### Chromosom 8

Das Chromosom 8 ist beim Prostatakarzinom sehr häufig und an mehreren Abschnitten deletiert. Einige Autoren berichten an diesem Chromosom Verluste in bis zu 60% der Fälle [Bova et al., 1996; Crundwell et al., 1996]. Im Bereich 8p12 (**D8S87**) liegt das Tumorsuppressorgen Neuregulin-1 (NRG 1). Dieses Gen kodiert für mehrere alternative Spleißvarianten eines Liganden, der an ErbB-Rezeptoren, EGF ähnlichen Wachstumsfaktorrezeptoren mit Tyrosinkinaseaktivität, bindet. Die Bindung von Neuregulin führt zur Heterodimersie-

rung 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 NGR 1-Spiegel wurden auch mit einer schlechten Prognose assoziiert [Raj et al., 2001]. Ein potentieller chromosomaler „Breakpoint“ wurde proximal von 8p12 identifiziert und liegt variabel in einer mindestens 1 Mb langen Region zwischen den Markern **D8S137** und **D8S87**. Häufige homozygote Deletionen im Abschnitt proximal von D8S87 wurden in Prostatakarzinomen beobachtet und auch an dem Marker **D8S360** detektiert. Der dazugehörige chromosomale Abschnitt (8p21-23) kodiert für ein Tumorsuppressorgen, das jedoch noch nicht identifiziert wurde [Bova et al., 1996, Prasad et al., 1998; Schaid 2004]. In meinem Kollektiv zeigten sich im Tumorgewebe an allen 3 Markern (4 LOH an D8S87, 39%; 7 LOH an D8S137, 37% und 4 LOH an D8S360, 25%) eine hohe Anzahl an LOHs sowie ein MSI am Marker D8S137. Im Blut (5%, 0%, 15,5%) und Knochenmark (5%, 8,5%, 6%) fanden sich zwar ebenfalls LOHs, allerdings nicht in der hohen Frequenz, wie aufgrund der Häufigkeit im Tumorgewebe zu erwarten gewesen wäre. Obwohl viele LOHs detektiert werden konnten, war die Anzahl an informativen Fällen mit insgesamt ca. 50% eher niedrig. Gut 40% der Patienten mit DTCs zeigten LOHs an diesen Markern. Statistisch signifikante Zusammenhänge mit den klinischen Parametern bestanden nicht.

### Chromosom 9

In der Region 9p21 (**D9S1748**) liegt ein Tumorsuppressorgen, das einen Inhibitor der Cyclin-abhängigen Kinase (CDKN2/p16) kodiert. Inaktivierung dieses Proteins durch Deletion, Punktmutation oder durch 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 sogar ganz fehlte [Perincheray et al., 1999]. In meinem Kollektiv wurden an diesem Marker keine LOHs im Blut der Patienten detektiert, im Tumorgewebe konnten 2 (8%) und im Knochenmarkplasma 3 (10%) LOHs nachgewiesen werden. Ein Patient mit DTCs zeigte LOH an diesem Marker im Knochenmarkplasma. Die Rate der informativen Fälle an diesem Marker war hoch.

### Chromosom 10

Das Tumorsuppressorgen PTEN (Phosphatase and Tensin Homologue) liegt am Genlokus 10q23.3, ist eine Lipidphosphatase und bildet eine Komponente der IP3-Signalkaskade. PTEN antagonisiert die Phosphatidylinositol-3-Kinase (IP3-K) und reguliert dadurch negativ die Zellproliferation [Maehama et al., 2007]. Der Marker **D10S1765** liegt innerhalb des PTEN-Gens und wurde erstmalig durch Pesche et al. in genetischen Analysen von Prostatakarzinomen untersucht. Dabei zeigte sich in 55% der untersuchten Tumoren LOH in der Region 10q23.3 [Pesche et al., 1998]. In dem hier untersuchten Kollektiv zeigte sich an diesem Marker ein hoher Anteil an informativen Fällen (>80%). Dabei wurden im Blut 1 LOH (3%), im Tumorgewebe 3 LOHs (12,5%) und im Knochenmarkplasma 4 LOHs (13%) detektiert. Im Tumorgewebe konnte zusätzlich 1 MSI (4%) nachgewiesen werden.

Auffällig war, dass mit einer Ausnahme nur die Patienten ohne DTCs im Knochenmark an diesem Marker LOH zeigten. In einem Fall wurde das LOH konkordant im Tumorgewebe und Knochenmarkplasma nachgewiesen.

### **Chromosom 11**

Auf dem Chromosom 11 sind beim Prostatakarzinom ebenfalls in hoher Zahl deletierte Genabschnitte beschrieben worden. Die relevanten Genabschnitte liegen dabei in 4 Regionen: 11p15, 11p12, 11q22 und 11q23-24. In einer Studie wurde in diesen 4 Abschnitten das Auftreten von LOH kumuliert in mehr als 70% der untersuchten Tumoren beschrieben. Davon entfielen 39% auf die Region 11p12 und 66% auf 11q22 [Dahiya et al., 1997]. Diese beiden Abschnitte wurden in meinem Kollektiv untersucht:

Der Mikrozell-vermittelte Chromosomentransfer des humanen Chromosoms 11 in die Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7 inhibierte die Tumorigenität dieser Zellen und zeigte, dass die Region 11q22-23 auf dem langen Chromosomenarm in diesem Prozess involviert ist [Negrini et al., 1994]. Der Bereich 11q22 (**D11S898**) enthält ein Tumorsuppressorgen, dessen Genprodukt CHK1 (Checkpoint-Kinase 1) 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 und die DNA-Reparatur kann erfolgen [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 im Bereich 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 (veränderte DNA-Geometrie) 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].

In meinem Kollektiv zeigten beide Marker keine Ereignisse im Blut trotz einer hohen Anzahl an informativen Fällen. Im Tumorgewebe fanden sich 1 LOH (4%) am D11S898 und 3 LOHs (12%) am D11S1313, im Knochenmark 4 (14%) und 0% LOHs. Somit war die Rate an LOHs an diesen Markern nicht sehr hoch. Interessanterweise konnte im untersuchten Tumorgewebe an dem Marker D11S1313 in 52% (13x) MSI nachgewiesen werden. Von den Patienten mit DTCs im Knochenmark hatten 55,5% MSI oder LOH im Tumorgewebe am Marker D11S1313. Insgesamt zeigten 44% der Patienten eine Alteration am Marker D11S1313 und keine der Alterationen war im Blut oder Knochenmark nachweisbar. Die LOHs am Marker D11S898 traten bei 33,3% der DTC-positiven Patienten im Knochenmarkplasma auf, nicht aber in den korrespondierenden Tumorgewebeproben.

## Chromosom 17

Im Bereich 17p13.1 (**TP53.6**) liegt das Tumorsuppressorgen TP53. Das Genprodukt (p53) wird regelmäßig gebildet und liegt in niedrigen Konzentrationen in der Zelle vor. Treten Schädigungen der DNA auf, so kann p53 in der Zelle akkumulieren und DNA-Reparatur-Mechanismen werden aktiviert. Dadurch wird der Zellzyklus zunächst gestoppt. Dies geschieht durch Induktion des Proteins 21 (p21), welches einerseits den Cyclin D/CDK4/6-Komplex und andererseits den Cyclin E/CDK2-Komplex hemmt. Diese Komplexe führen gewöhnlich zu einer Freisetzung eines weiteren Transkriptionsfaktors (E2F), der den Zellzyklus weiterführt. Jedoch bremst die Akkumulation von p53 den Zellzyklus. Bei zunehmender Akkumulation von p53 werden zusätzlich Gene der Bcl2-Familie (u. a. der Apoptose-Regulator BAX) aktiviert. Die Induktion von Caspasen leitet schließlich die Apoptose ein. Der Verlust von p53 ist in ca. 50% aller menschlichen Tumoren nachweisbar und ist ein eher spätes Ereignis in der Tumorprogression beim Prostatakarzinom [Lane et al., 1997; Karayi et al., 2004]. Die Expression von p53 in lokalisierten Prostatatumoren wurde als ein unabhängiger prognostischer Marker für ein erkrankungsfreies Überleben nach radikaler Prostatektomie beschrieben [Bauer et al., 1995]. In meinem Kollektiv wurden im Blut 2 LOHs (5,5%), im Tumorgewebe 4 LOHs (14%) und im Knochenmark 2 LOHs (6%) detektiert. Die Rate an informativen Fällen war hoch, während die LOH-Rate für diesen Marker dagegen eher niedrig war. Es fanden sich keine Besonderheiten bei den betroffenen Patienten mit einem LOH an diesem Marker.

### 5.3.2 Konkordanz der genetischen Veränderungen zwischen den Kompartimenten

Es zeigte sich, dass 9 aller im Knochenmark detektierten LOHs (30%) auch im korrespondierenden Tumorgewebe nachweisbar waren. Ein vergleichbarer Anteil konkordanter Ereignisse fand sich auch für das Blut (4 LOH, 33,3%). Somit konnte nur etwa jedes dritte LOH, das im Tumorgewebe detektiert wurde, wieder in den beiden Kompartimenten (Blut und Knochenmark) gefunden werden. Interessanterweise war nur eines der im KM nachgewiesenen LOH auch in der korrespondierenden Blutprobe nachweisbar (3,3%). Die im Tumorgewebe detektierten MSI waren allesamt nicht im Blut oder im Knochenmark nachweisbar; der Grund dafür ist unklar.

Diese fehlende Konkordanz zwischen den einzelnen untersuchten Kompartimenten hat mehrere Ursachen und kann vor allem durch die Heterogenität des Tumors erklärt werden. Das Prostatakarzinom besteht in der Regel aus mehreren unterschiedlich stark alterierten Karzinomarealen, die jeweils unterschiedliche genetische Veränderungen aufweisen können. Es existieren somit unterschiedliche molekulare Entwicklungsstadien desselben Tumors nebeneinander [Nwosu et al., 2001]. Nicht alle diese genetischen Veränderungen, die im Tumor vorliegen, müssen ins Blut oder Knochenmark übertreten. Auch ist es denkbar, dass ein Teil der freien DNA im Blut oder Knochenmark von zirkulierenden oder disseminierten Tumorzellen stammt und diese wiederum andere genetische Alterationen aufweisen können als der ursprüngliche Tumor. Ein weiterer Grund ist, dass nicht alle im Blut zirkulierende freie DNA von Tumorzellen stammt, sondern im Rahmen des Tumorwachstums

auch von ursprünglich gesunden Zellen, durch Inflammation, Hypoxie, Nekrose und Apoptose vermehrt DNA ins Blut ausgeschüttet wird. Hierdurch kann tumorspezifische DNA maskiert werden [Coulet et al., 2000; Schwarzenbach et al., 2007]. Eine weitere mögliche Erklärung stellt die geringe Halbwertszeit von zirkulierender DNA im Blut dar, wodurch die Detektion von tumorspezifischen Veränderungen natürlich erschwert werden kann [Lo et al., 1999].

Auch technische Aspekte haben einen Einfluss auf die Analysen an zirkulierender DNA und können somit eine Erklärung für die geringe Konkordanz sein. Menge und Qualität der freien DNA im Blut sind häufig gering, daher kann es zur Detektion von artifiziellen genetischen Alterationen kommen [Jahr et al., 2001; Farrand et al., 2002]. Die starke Fragmentierung der freien DNA kann eine Ursache für PCR-Fehler sein. Eine Fraktionierung der zellfreien DNA in hoch- und niedermolekulare DNA sowie der Zusatz von Tetramethylammoniumchlorid (TMAC) zur Stabilisierung der Amplifikation durch Eliminierung unerwünschter PCR-Produkte und Verminderung von unerwünschtem Primen sind Möglichkeiten, die Ausbeute an LOH zu verbessern [Müller et al., 2008].

### **5.3.3 LOH-Frequenzen bei DTC-positiven vs. DTC-negativen Patienten**

Die Anzahl an LOHs, bezogen auf die informativen Fälle, war bei den Patienten mit DTCs im Knochenmark erhöht. Insgesamt 67% der Patienten mit DTCs im Knochenmark zeigten ein LOH in Blut, Knochenmark oder Tumorgewebe, im Vergleich zu 52% der Patienten ohne DTCs im Knochenmark (Tendenz, keine statistische Signifikanz). Auch die Rate an LOH pro Patient (3,3 vs. 2,7) war tendenziell erhöht. Interessanterweise basierte diese Beobachtung ausschließlich auf der erhöhten Rate an LOHs im Knochenmarkplasma (16% vs. 9%). Im Tumorgewebe war die Rate an LOH zwischen DTC-positiven und DTC-negativen Patienten (14% vs. 15%) dagegen annähernd gleich, im Blutplasma zeigte sich ebenfalls kein Unterschied. Diese Entdeckung stützt die Hypothese, dass einerseits die DTCs tumorspezifische DNA ins Knochenmarkplasma abgeben und andererseits DTCs genetische Alterationen tragen, die zusätzliche Informationen über die Tumorprogression liefern könnten [Taback et al., 2003; Schwarzenbach et al., 2007; Scher und Pantel, 2009].

### **5.3.4 LOH-Verteilungsmuster bei DTC-positiven vs. DTC-negativen Patienten**

Nicht nur die Anzahl an genetischen Veränderungen insgesamt und pro Patient, sondern auch die Verteilungsmuster der detektierten LOHs im Knochenmark zwischen diesen beiden Subgruppen war unterschiedlich. So zeigten bei den DTC-positiven Patienten vor allem die Marker THRB (43% vs. 16%), D8S87 (20% vs. 0%), D8S137 (25% vs. 5%) und D11S898 (43% vs. 5%) LOHs. Die an diesen Markern lokalisierten Tumorsuppressorgene spielen eine Rolle in der Zellproliferation (Retinsäurerezeptor, THRB) der Tumorprogression (Demantin, D8S87 und D8S137) und der DNA-Reparatur (Checkpoint-Kinase 1, D11S898).

Im Tumorgewebe wiesen die einzelnen Marker häufiger und homogener LOH auf. Interessanterweise zeigten die DTC-positiven Patienten im Tumorgewebe ebenfalls häufiger LOH

an dem Marker THRB (33% vs. 11%) und D8S137 (75% vs. 30%), was konkordant zu den Beobachtungen im Knochenmark dieser Patienten ist. Eine statistische Signifikanz lag für diese Beobachtungen jedoch nicht vor, auch bestand keine Korrelation zu den übrigen klinischen Parametern der Patienten. Dennoch schlagen diese Beobachtungen vor, dass DTCs ganz offenbar über andere genetische Eigenschaften verfügen müssen, um eine Disseminierung in das Knochenmark vollziehen zu können.

### **5.3.5 Vergleich der DNA-Analysen zwischen den Patientenkollektiven**

Auch bei der benignen Prostatahyperplasie lassen sich genetische Alterationen wie LOH und MSI in zellfreier DNA im Blutplasma nachweisen [Müller et al., 2006]. Von den in dieser Arbeit untersuchten 27 Patienten mit BPH zeigten 55,5 % an mindestens einem der 13 eingesetzten Marker LOH und/oder MSI im Blutplasma. Ähnliche Beobachtungen wurden auch in einer anderen Studie gemacht, in der 65 Prostatakarzinom-Patienten 36 Patienten mit einer BPH verglichen wurden. Die BPH-Patienten zeigten in 22%, gegenüber 34% der Karzinompatienten, genetische Alterationen in der freien zirkulierenden DNA im Blut [Müller et al., 2006].

Bei den informativen Fällen des BPH-Kollektivs in dieser Arbeit wurden insgesamt 28 Alterationen detektiert, 19 x wurde ein LOH und 9 x wurde MSI festgestellt. Bei der BPH waren im Gegensatz zu den Karzinompatienten aber nur 10 der 13 Marker von LOH/MSI-Ereignissen betroffen. Die Marker THRB (28,5%) und D8S360 (17,3%) zeigten bei den BPH-Patienten am meisten LOH. Die MSI trat interessanterweise in hoher Frequenz (6 Fälle, 26%) nur am Marker D11S1313 auf. Die Marker D3S3703, D6S1631 und D7S522 zeigten bei den BPH-Patienten keinerlei genetische Alterationen und sind somit möglicherweise karzinomspezifisch.

Die doch relativ hohe Anzahl an LOH bei den BPH-Patienten ist erstaunlich, aber auch Müller et al. zeigten in 22% der Patienten LOH in der zirkulierenden DNA [Müller et al., 2006]. Diese Daten zeigen, dass auch gutartige Läsionen genetische Veränderungen aufweisen.

## **5.4 Prostatakarzinom-Patienten mit disseminierten Tumorzellen im Blut und Knochenmark**

Der immunzytochemische Nachweis von Cytokeratin-positiven Zellen im Knochenmark ist mittlerweile für viele Krebserkrankungen (solide, epitheliale Tumoren) eine etablierte Methode zum Nachweis einer mikrometastatischen Karzinomerkrankung, dabei ist der Einsatz von Anti-Cytokeratin-Antikörpern bei Prostatakarzinom-Patienten am weitesten verbreitet [Pantel und Brakenhoff, 2004; Pantel et al., 2008].

### **Mögliche Bedeutung für die Früherkennung des Prostatakarzinoms**

Neben der prognostischen Assoziation von DTCs und CTCs ist auch ihr Nachweis für die Früherkennung des Prostatakarzinoms denkbar. Eine erst kürzlich veröffentlichte Studie hat die Bestimmung von CTCs im Blut mit der Prostatabiopsie verglichen. Die Autoren kommen zu dem Schluss, dass der Nachweis von CTCs im Blut zum einen wegen der hohen Sensitivität (83,3%) und Spezifität (84,6%) und zum anderen wegen eines negativen prädiktiven Wertes von 94,3% für den Ausschluss eines Karzinoms eine Prostatabiopsie ersetzen könnte, insbesondere bei Patienten mit unauffälligen PSA-Werten [Murray et al., 2011].

Auch die Kombination aus der Detektion von CTCs im Blut und DTCs im Knochenmark und dem Screening nach genetischen Veränderungen der zellfreien DNA im Blut von Prostatakarzinom-Patienten wäre ein möglicher Ansatz zur Früherkennung einer Krebserkrankung [Schwarzenbach et al., 2009].

#### **5.4.1 Kontroverse Diskussion über die Bedeutung von DTCs beim Prostatakarzinom**

Die Bedeutung von CK-positiven Zellen im Blut und Knochenmark von Prostatakarzinom-Patienten wird bis heute kontrovers diskutiert. Die Mehrzahl der Forscher konnten mittlerweile für DTC-positive Patienten signifikante Korrelationen zu etablierten Risiko- und Prognosefaktoren wie dem Gleason-Score [Berg et al., 2007], dem Grading [Oberneder et al., 1994], dem Tumorstadium [Oberneder et al., 1994; Wood et al., 1997], dem Auftreten einer Fernmetastasierung [Oberneder et al., 1994; Berg et al., 2007; Weckermann et al., 2009] oder einem vorzeitigen erneuten PSA-Anstieg nach Therapie [Weckermann et al., 2001; Köllermann et al., 2008] nachweisen. Eine prognostische Relevanz für das Rezidivfreie Überleben konnte ebenfalls bereits nachgewiesen werden [Wood et al., 1997; Gao et al., 1999; Bianco et al., 2001]. Auch konnte gezeigt werden, dass die Detektion von DTCs im Knochenmark zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bei lokalisierten Tumorstadien einen unabhängigen Prognosefaktor für das progressionsfreie Überleben darstellt [Köllermann et al., 2008].

In anderen Untersuchungen ließen sich bei 54% (DTCs) und 24% (CTCs) der Patienten vor einer Prostatektomie PSA-exprimierende Zellen (DTCs/CTCs) mittels RT-PCR im Knochenmark bzw. im Blut nachweisen. Auch nach 4 Monaten (33% DTCs vs. 9% CTCs) und nach 5 Jahren (29% DTCs vs. 0% CTCs) nach der Operation (Prostatektomie) waren bei den Patienten noch immer PSA-exprimierende Zellen nachweisbar ohne Anhaltspunkte für ein Tumorrezidiv [Ellis et al., 2003]. Die Autoren kamen daher zu dem Schluss, dass der Prozess der Tumorzell dissemination (CTCs/DTCs) ineffektiv in Bezug auf die Ausbildung von Fernmetastasen ist. Auch Weckermann et al. konnten in einem Gesamtbeobachtungszeitraum nach Prostatektomie von bis zu 10 Jahren, in 20% der Patienten DTCs im Knochenmark nachweisen, ebenfalls ohne Anhaltspunkte für ein Tumorrezidiv und ohne negativen Einfluss auf das Gesamtüberleben dieser Patienten. Weil nur die präoperativ detektierten DTCs stark prädiktiv für die Ausbildung von Metastasen innerhalb von 48

Monaten waren und weil keine signifikanten genetischen Unterschiede zwischen prä- und postoperativ isolierten DTCs vorlagen, postulierten die Autoren einen unbekanntem perioperativen Mechanismus, der DTCs aktivieren kann und plädieren deshalb für eine adjuvante Behandlung der Patienten, die präoperativ DTCs aufweisen [Weckermann et al., 2009].

Mittlerweile ist bekannt, dass Tumorzellen teilweise sehr lange in einem inaktiven Zustand verharren können (*dormancy*) und dass die Faktoren, die diesen inaktiven Zustand bewirken, unterhalten und auch beenden können („escape from dormancy“), noch nicht genau verstanden sind [Wikman et al., 2008].

#### **5.4.2 Disseminierte Tumorzellen (DTCs) vs. zirkulierende Tumorzellen (CTCs)**

Die Detektion von DTCs im Knochenmark von Patienten mit soliden Tumoren der Brust, der Prostata oder des Colons hat prognostische Implikationen, die mittlerweile nachgewiesen wurden. Dabei liegen die validesten Daten für das Mammakarzinom vor [Riethdorf et al., 2008, Pantel et al. 2009]. Kontrovers diskutiert wird die Frage, ob die Detektion von CTCs im Blut ebenso aussagekräftig ist wie die Detektion von DTCs im Knochenmark bei Patienten mit einem Prostatakarzinom. Es wäre wünschenswert, wenn durch wiederholte Bestimmungen von CTCs im Blut, im Sinn eines Biomarkers, eine prognostische Aussage hinsichtlich des Gesamtüberlebens, des Rezidiv-freien Überlebens und hinsichtlich des Therapieeffektes (Therapiemonitoring) getroffen werden kann, da die Entnahme von Blut wesentlich einfacher und weniger invasiv ist als eine Knochenmarkspunktion [Pantel et al., 2010].

Aktuell wird dieser Frage intensiv nachgegangen und es liegen bereits Daten für einige Tumorentitäten vor, dass CTCs ebenfalls eine fundierte prognostische Aussage hinsichtlich der metastatischen Progression einer Krebserkrankung liefern können. Diese Ergebnisse haben zu der Zulassung des CellSearch™-Systems, zur Detektion von DTCs im Blut, durch die Food and Drug Administration (FDA) geführt [Cohen et al., 2008, Cristofanilli et al., 2004, De Bono et al., 2008]. Für das hormon-refraktäre Prostatakarzinom konnte an 231 Patienten gezeigt werden, dass die Detektion von CTCs im Blut, im Gegensatz zu den herkömmlichen Tests, der genaueste und stärkste Prädiktor für das Gesamtüberleben dieser Patienten war. Die Aussagekraft war dabei wesentlich besser als die des PSA-Tests. Auch bestand eine Korrelation von Gesamtüberleben zu der Menge (Anzahl) an detektierten CTCs, was ein sehr genaues Therapiemonitoring ermöglicht, da verschiedene Risikogruppen definiert werden können [De Bono et al., 2008]. Sollten sich diese Ergebnisse für noch größere Patientenzahlen und andere Indikationen (z. B. lokalisierte Tumorstadien) bestätigen, wäre ein genaueres Monitoring der minimal residuellen Krebserkrankung (MRD) tatsächlich durch wiederholte Blutentnahmen möglich und es könnte eine bessere Risikostratifizierung resultieren als mit der Bestimmung des PSA-Wertes alleine. Auch könnten Patienten frühzeitig erkannt werden, die entweder schlecht oder gar nicht auf bestimmte Chemotherapeutika ansprechen [Pantel und Riethdorf, 2009; Pantel und Alix-Panabières 2010].

Allerdings gibt es auch Anhaltspunkte dafür, dass die prognostischen Informationen, die von CTCs und DTCs ausgehen, unterschiedlich sind. Zum einen sind die Detektionsraten für DTCs höher als die für CTCs, weil das Knochenmark offenbar ein besseres Milieu darstellt als das zirkulierende Blut. Zum anderen sind CTCs häufiger apoptotisch oder inaktiv, so dass unter Umständen von ihnen keine Gefahr mehr ausgeht, sie aber detektiert werden. Auch stellt das Stadium der Zirkulation von Tumorzellen im Blut vermutlich nur eine Momentaufnahme der komplexen Kaskade der Tumorzell dissemination dar [Pantel et al., 2008; Benoy et al., 2006; Müller et al., 2005; Mehes et al., 2001]. An 341 Patientinnen mit einem Mammakarzinom konnte gezeigt werden, dass eine besonders schlechte Prognose resultierte, wenn CTCs und DTCs gemeinsam nachweisbar waren, gegenüber dem alleinigen Nachweis von DTCs ( $p=0,0001$ ). Der alleinige Nachweis von CTCs hatte dagegen keine statistisch signifikante Auswirkung ( $p=0,516$ ) auf die Prognose der Patientinnen [Wiedswang et al., 2006]. Daher wird der Nachweis von DTCs noch als Goldstandard gesehen.

Für den Einsatz in der Routine wäre aber auch ein abgestuftes Vorgehen denkbar, bei dem Patienten in fortgeschrittenen Tumorstadien, unter laufender adjuvanter Chemotherapie, mit CTC-Monitoring im Blut überwacht werden. Patienten in lokalisierten Tumorstadien dagegen erhalten Knochenmarkuntersuchungen zum Screening nach DTCs im Knochenmark zum Zeitpunkt der Diagnosestellung, um eine Aussage über die Prognose, die Nachsorge und ggf. eine neoadjuvante/adjuvante Behandlung zu erhalten. In der vorliegenden Arbeit wurden nur DTCs im Knochenmark untersucht.

### **5.4.3 Besonderheiten der Patienten mit DTCs im Knochenmark**

#### **Detektionsrate**

Insgesamt wurden in meinem Kollektiv bei 9 Patienten (25,7%) mit dem Pan-Cytokeratin-Antikörper (A45-B/B3) DTCs in unterschiedlicher Anzahl (1-7 positive Zellen) im Knochenmark nachgewiesen. Dieser Wert entspricht einer durchschnittlichen Detektionsrate von DTCs beim Prostatakarzinom [Riethdorf et al., 2008; Alix-Panabières et al., 2008].

#### **Anzahl der detektierten DTCs**

Inwieweit die Anzahl an detektierten DTCs für die Prognose relevant ist, ist bisher für das Prostatakarzinom noch nicht untersucht worden. In meinem Kollektiv wurden im Durchschnitt 2,44 DTCs/Patient nachgewiesen (1-7 DTCs), wobei nur bei einem Patienten mehr als 5 DTCs nachgewiesen wurden. Einzige Auffälligkeit dieses Patienten war eine mit 155 cm<sup>3</sup> extrem große Prostata.

Zuletzt konnte aber für CTCs mehrfach gezeigt werden, dass nicht nur der einfache Nachweis, sondern auch die Anzahl an detektierten Tumorzellen eine entscheidende prognostische Bedeutung hat. In einer der Studien wurden die Patienten dabei in zwei Risikogruppen ( $\leq 5$  CTCs und  $> 5$  CTCs) vor (Chemo-) Therapiebeginn eingeteilt. Die Überlebensraten der Patienten mit wenigen Tumorzellen unterschieden sich zu denjenigen mit vielen CTCs. Zusätzlich konnte anhand der Menge an unter der Therapie nachgewiesenen Zellen sehr gut

der Therapieerfolg abgelesen werden. Diejenigen Patienten, die durch die systemische Therapie aus der höheren ( $\geq 5$  CTCs) in die niedrigere ( $\leq 5$  CTCs) Risikogruppe überführt werden konnten, hatten einen signifikanten Überlebensvorteil (21,3 vs. 6,8 Monate) [de Bono et al., 2008]. Die Daten dieser Untersuchungen sind hochinteressant und rechtfertigen den Einsatz von CTCs als Biomarker. Allerdings wurden diese Daten an Patienten erhoben, die unter metastasierten, hormonrefraktären, hormonunabhängigen und/oder gegenüber der medikamentösen Kastration resistenten Prostatakarzinomen litten [Danila et al., 2007; de Bono et al., 2008; Okegawa et al., 2008].

#### **Auswertung der klinischen Daten der DTC-positiven Patienten**

Die Analyse der vorliegenden klinischen Daten zeigte bei DTC-positiven Patienten eine Tendenz zu eher kleineren Drüsen in niedrigen Tumorstadien (67% pT2). Es lag häufiger ein höherer Gleason-Score vor (Gleason-Summe (3+2)5 =16%, (3+3)6 =13%, (3+4)7=40%) als bei DTC-negativen Patienten.

Angesichts meines eher kleinen Kollektivs sind die Ergebnisse der Korrelationsanalysen und die der deskriptiven Statistik allerdings als nicht sehr aussagekräftig anzusehen, obgleich für das geringe Gesamtvolumen der Prostaten eine statistische Signifikanz vorlag. Die Ergebnisse der Auswertung in Bezug auf den Gleason-Score ergaben, dass bei einem höheren Gleason-Score (Summe  $>6$ ) das Risiko für einen positiven Knochenmarksbefund (DTC-positiv) tendenziell höher lag als bei einem Gleason-Score  $\leq 6$ , allerdings lag keine statistische Signifikanz vor. Mehrere Autoren konnten bereits einen ähnlichen Zusammenhang zwischen dem Gleason-Score und DTCs im Knochenmark nachweisen [Bianco et al., 2001; Berg et al., 2007; Schwarzenbach et al., 2009].

## 6 Zusammenfassung

Das Prostatakarzinom ist die häufigste maligne Erkrankung des Mannes und nach dem Bronchialkarzinom die zweithäufigste krebsbedingte Todesursache. Die Tumorprogression und die Metastasierung stellen dabei den entscheidenden prognostischen Faktor im Hinblick auf das Überleben einer Krebserkrankung dar, die molekularen Mechanismen, die dazu führen, sind noch nicht gut verstanden. Die Früherkennung und die rechtzeitige Erkennung von Risikopatienten für eine Tumorprogression sind bisher zu ungenau bzw. nicht ausreichend, daher müssen neue Diagnostikmethoden erforscht und etabliert werden.

In der vorliegenden experimentellen Arbeit wurde ein potenzieller Ansatz zur Optimierung der Diagnostik evaluiert. Dafür wurden verschiedene Gewebeproben von 36 Patienten mit einem gesicherten Prostatakarzinom auf tumorspezifische Veränderungen wie LOH und MSI untersucht. Es wurde die freie zirkulierende DNA aus Blutplasma und Knochenmarkplasma isoliert, quantifiziert und analysiert. Zusätzlich wurde DNA aus dem Tumorgewebe, welche eine potenzielle Quelle der freien DNA im Blut und Knochenmark sein könnte, isoliert und analysiert. Als Referenzgruppe galt ein Kollektiv von 27 Patienten mit einer BPH. Für die mikrosatellitenbasierte PCR wurde ein Panel von 13 Mikrosatellitenmarkern auf den Chromosomen 3, 6, 7, 8, 9, 10, 11 und 17 ausgewählt, die in der Nähe von bekannten Tumorsuppressorgenen (TSGs) lokalisiert sind (THRB, D3S3703, D6S474, D6S1631, D7S522, D8S87, D8S137, D8S360, D9S1748, D10S1765, D11S898, D11S1313 und TP.53.6) amplifiziert. Zusätzlich wurde das Knochenmark der Prostatakarzinom-Patienten auf das Vorliegen disseminierter Tumorzellen (DTCs) untersucht, um mögliche Zusammenhänge zwischen den detektierten DNA-Veränderungen und einer Disseminierung von Tumorzellen aufzudecken. Die Analyse der DNA im Blut von BPH-Patienten sollte zeigen, ob der Nachweis von genetischen Alterationen im zirkulierenden Blut prostatakarzinom-spezifisch ist.

Es zeigte sich, dass die durchschnittliche Konzentration an freier zirkulierender DNA im Blut von Prostatakarzinom-Patienten gegenüber der von Patienten mit einer BPH deutlich erhöht ist ( $p=0,001$ ). Weiterhin zeigte sich innerhalb des Kollektivs der Patienten mit einem Prostatakarzinom, dass die durchschnittliche Konzentration an freier DNA im Blut bei DTC-negativen Patienten höher ist als die im Knochenmarkplasma. DTC-positive Patienten haben dagegen eine höhere DNA-Konzentration im Knochenmarkplasma als im Blut ( $p=0,001$ ).

Fast 90% der Patienten mit Prostatakarzinom zeigten bei den LOH-Analysen mindestens ein LOH/MSI im Blut, Knochenmark oder Tumorgewebe an mindestens einem der 13 Mikrosatellitenmarker. An allen Markern ließen sich LOH oder MSI detektieren, wobei MSI nur im Tumorgewebe nachgewiesen werden konnte. Die Menge der detektierten genetischen Alterationen war im Tumorgewebe (14,4%) am höchsten, dann folgten das Knochenmarkplasma (9,9%) und das Blutplasma (3,6%). Genetische Alterationen im Tumor-

gewebe konnten dabei im Blut oder Knochenmark in bis zu 33% der Fälle konkordant nachgewiesen werden.

Insgesamt zeigten 25% der Karzinompatienten DTCs in ihrem Knochenmark. Diese Patienten hatten, im Unterschied zu Patienten ohne DTCs im Knochenmark, zu 67% ein pT-Stadium 2, durchschnittlich kleinere Prostaten ( $p=0,015$ ) und tendenziell höhere Gleason-Scores. Auch die LOH/MSI-Frequenz (67% vs. 52%) und die Anzahl an LOHs/Patient (3,3 vs. 2,7) waren höher als bei DTCs-negativen Patienten. Dabei war die Rate an LOHs vor allem im Knochenmark erhöht und auch die LOH-Muster an den Markern waren zwischen diesen beiden Subgruppen unterschiedlich. Meine Beobachtungen unterstützen Erkenntnisse der letzten Jahre, nach denen eine frühe Tumorzell dissemination bei epithelialen Tumoren auftreten kann. Dabei scheint eher der Differenzierungsgrad (Gleason) als die Größe des Tumors für die frühzeitige TZ-Disseminierung von Bedeutung zu sein.

Weiter konnte ich zeigen, dass auch Patienten mit einer gutartigen Veränderung der Prostata (BPH) genetische Veränderungen im Blut aufweisen. Bei 52% der Patienten mit BPH konnte mindestens ein LOH/MSI nachgewiesen werden, allerdings waren nur 10 der 13 untersuchten Mikrosatellitenmarker von LOH/MSI betroffen.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die Detektion und Analyse genetischer Veränderungen in der freien DNA im Blut und Knochenmark möglich ist und sie interessante Informationen über das molekulare Profil des Tumorgewebes liefern kann. Auch konnte ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten LOH-Frequenz und dem Vorkommen von DTCs beobachtet werden. Die Kombination aus DNA-Analysen an tumorspezifischer DNA und der Detektion von DTCs könnte somit ein Ansatz sein, die Diagnostik für das Prostatakarzinom zu verfeinern, wenn sich diese Ergebnisse an größeren Patientenkollektiven bestätigen lassen.

## 7 Literaturverzeichnis

- Aaltonen LA**, Peltomäki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkänen L, Mecklin JP, et al. (1993) Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 260:812-816.
- Adolphs HD** (1991) Screening-Diagnostik und Ausschlußdiagnostik urologischer Tumoren. Prostatakarzinom- rektale Palpation mit hoher Sensitivität. *Therapiewoche* 41 (12):735-740.
- Aguirre-Ghiso JA** (2007) Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nat Rev Cancer* 7(11):834-846.
- Aguirre-Ghiso JA** (2010) On the theory of tumor self-seeding: implications for metastasis progression in humans. *Breast Cancer Res* 12:304.
- Alix-Panabières C**, Riethdorf S, Pantel K (2008) Circulating tumor cells and bone marrow micrometastasis. *Clin Cancer Res* 14(16):5013-5021.
- Alix-Panabières C**, Schwarzenbach H, Pantel K (2011) Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA. *Annu Rev Med*.
- Altwein JE** (2001) Prostatakarzinom-Epidemiologie, Ätiologie, Pathologie, Diagnostik, prognostische Faktoren. In: Rübber H. (Hrsg.). *Uroonkologie*; Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York: 169-220.
- Arya M**, Bott SR, Shergill IS, Ahmed HU, Williamson M, Patel HR (2006) The metastatic cascade in prostate cancer. *Surg Oncol* 15(3):117-128.
- Bader P**, Burkhard FC, Studer UE (2002) Lymphadenektomie beim Prostatakarzinom. Wenn ja, dann wo? *Urologe B* 42:406-408.
- Balk SP**, Ko YJ, Bubley GJ (2003) Biology of prostate-specific antigen. *J Clin Oncol* 21:383-391.
- Bartels H**, Brüggelboes B, Glaser F (1992) Prostatakarzinom. Verbesserte Früherkennung mit ultraschallgezielter Biopsie. *Dtsch Ärztebl* 89 11:906-912.
- Bauer JJ**, Sesterhenn IA, Mostofi KF, McLeod DG, Srivastava S, Moul JW (1995) p53 nuclear protein expression is an independent prognostic marker in clinically localized prostate cancer patients undergoing radical prostatectomy. *Clin Cancer Res* (11):1295-1300.
- Bennett P** (2000) Microsatellites. *Mol Pathol* 53:177-183.
- Benoy IH**, Elst H, Philips M, Wuyts H, Van Dam P, Scharpé S, Van Marck E, Vermeulen PB, Dirix LY (2006) Real-time RT-PCR detection of disseminated tumour cells in bone marrow has superior prognostic significance in comparison with circulating tumour cells in patients with breast cancer. *Br J Cancer* 94(5):672-680.

- Berg A**, Berner A, Lilleby W, Bruland ØS, Fosså SD, Nesland JM, Kvalheim G (2007) Impact of disseminated tumor cells in bone marrow at diagnosis in patients with nonmetastatic prostate cancer treated by definitive radiotherapy. *Int J Cancer* 120(8):1603-1609.
- Bernards R**, Weinberg RA (2002) A progression puzzle. *Nature* 418:823.
- Bianco FJ Jr**, Wood DP Jr, Gomes de Oliveira J, Nemeth JA, Beaman AA, Cher ML (2001) Proliferation of prostate cancer cells in the bone marrow predicts recurrence in patients with localized prostate cancer. *Prostate* 49(4):235-242.
- Bishop JM** (1987) The molecular genetics of cancer. *Science* 16 (235):305-311.
- Boddy JL**, Gal S, Malone PR, Harris AL, Wainscoat JS (2005) Prospective study of quantitation of plasma DNA levels in the diagnosis of malignant versus benign prostate disease. *Clin Cancer Res* 11(4):1394-1399.
- 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(1):46-54.
- Braun S**, Pantel K, Müller P, Janni W, Hepp F, Kantenich CR, Gastroph S, Wischnik A, Dimpfl T, Kindermann G, Riethmüller G, Schlimok G (2000) Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer. *N Engl J Med* 342(8):525-533.
- Brawn PN**, Kuhl D, Speights VO, Johnson CF, Lind M (1995) The incidence of unsuspected metastases from clinically benign prostate glands with latent prostate carcinoma. *Arch Pathol Lab Med* 119:731-733.
- Breul J**, Zimmermann F, Dettmar P, Paul R (2003) Manual: Urogenitale Tumoren; Prostatakarzinom. München, Tumorzentrum München:1-42.
- 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.
- Carter BS**, Beaty TH, Steinberg GD, Childs B, Walsh PC (1992) Mendelian inheritance of familial prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:3367-3371.
- Catalona W**, Smith D, Ornstein D (1997) Prostate cancer detection in men with serum PSA concentration of 2, 6 to 4, 0 ng/ml and Benign Prostate Examination. *JAMA* 277:1452-1455.
- Chen CP**, Staggers FE, Roach M 3<sup>rd</sup> (2011) Benefits and pitfalls of prostate cancer screening: "no proof of benefit" does not equal "proof of no benefit". *Oncology (Williston Park)* 25(6):466,468.

- Chun FK**, Muller I, Lange I, Friedrich MG, Erbersdobler A, Karakiewicz PI, Graefen M, Pantel K, Huland H, Schwarzenbach H (2006) Circulating tumour-associated plasma DNA represents an independent and informative predictor of prostate cancer. *BJU Int* 98(3):544-548.
- Cohen SJ**, Punt CJ, Iannotti N, Saidman BH, Sabbath KD, Gabrail NY, Picus J, Morse M, Mitchell E, Miller MC, Doyle GV, Tissing H, Terstappen LW, Meropol NJ (2008) Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 26(19):3213-3221.
- Coulet F**, Blons H, Cabelguenne A, Lecomte T, Lacourreye 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(3):707-711.
- Cristofanilli M**, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, Reuben JM, Doyle GV, Allard WJ, Terstappen LW, Hayes DF (2004) Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 351(8):781-791.
- Croswell JM**, Kramer BS, Crawford ED (2011) Screening for prostate cancer with PSA testing: current status and future directions. *Oncology (Williston Park)* 25(6):452-60, 463.
- Crundwell MC**, Chughtai S, Knowles M, Takle L, Luscombe M, Neoptolemos JP, Morton DG, Phillips SM (1996) Allelic loss on chromosomes 8p, 22q and 18q (DCC) in human prostate cancer. *Int J Cancer* 69(4):295-300.
- Dahiya R**, McCarville J, Lee C, Hu W, Kaur G, Carroll P, Deng G (1997) Deletion of chromosome 11p15, p12, q22, q23-24 loci in human prostate cancer. *Int J Cancer* 72(2):283-288.
- Danila DC**, Heller G, Gignac GA, Gonzalez-Espinoza R, Anand A, Tanaka E, Lilja H, Schwartz L, Larson S, Fleisher M, Scher HI (2007) Circulating tumor cell number and prognosis in progressive castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res* 13(23):7053-7058.
- Dearnaley DP**, Sloane JP, Ormerod MG, Steele K, Coombes RC, Clink HM, Powles TJ, Ford HT, Gazet JC, Neville, AM (1981) Increased detection of mammary carcinoma cells in marrow smears using antisera to epithelial membrane antigen. *Br J Cancer* 44(1):85-90.
- de Bono JS**, Scher HI, Montgomery RB, Parker C, Miller MC, Tissing H, Doyle GV, Terstappen LW, Pienta KJ, Raghavan D (2008) Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res* 14(19):6302-6309.

- Denis L**, Morton MS, Griffiths K (1999) Diet and its preventive role in prostatic disease. *Eur J Urol*, 35:377-387.
- Dirks W**, Rome D, Ringel F, Jager K, MacLeod RA, Drexler HG (1999) Expression of the growth arrest-specific gene 6 (GAS6) in leukemia and lymphoma cell lines. *Leuk Res* 23(7):643-651.
- Djavan B**, Ravery V, Zlotta A, Dobronski P, Dobrovits M, Fakhari M, Seitz C, Susani M, Borkowski A, Boccon-Gibod L, Schulman CC, Marberger M (2001) Prospective evaluation of prostate cancer detected on biopsies 1, 2, 3 and 4: when should we stop? *J Urol* 166:1679–1683.
- Dong JT** (2001) Chromosomal deletions and tumor suppressor genes in prostate cancer. *Cancer Metastasis Rev* 20:173–193.
- Ebert T**, Bendhack ML (1997) Prostatakarzinom-Diagnostik, hormonelle Therapie, Radio- und Chemotherapie. *Urologe A Jahrgang* 36:(6):570-577.
- Eccles SA**, Welch DR (2007) Metastasis: recent discoveries and novel treatment strategies. *Lancet* 369(9574):1742-1757.
- 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.
- Ellis WJ**, Chetner MP, Preston SD, Brawer MK (1994) Diagnosis of prostatic carcinoma the yield of serum prostate specific antigen, digital rectal examination and transrectal ultrasonography. *J Urol* 152:1520–1525.
- Ellis WJ**, Pfitzenmaier J, Colli J, Arfman E, Lange PH, Vessella RL (2003) Detection and isolation of prostate cancer cells from peripheral blood and bone marrow. *Urology* 61(2):277-281.
- Elo, JP**, Visakorpi T (2001) Molecular genetics of prostate cancer. *Ann Med* 33:130–141.
- Farrand K**, Jovanovic L, Delahunt B, McIver B, Hay ID, Eberhardt NL, Grebe SK (2002) Loss of heterozygosity studies revisited: prior quantification of the amplifiable DNA content of archival samples improves efficiency and reliability. *J Mol Diagn* 4(3):150-158.
- Fleischhacker M**, Schmidt B (2007) Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer--a survey. *Biochim Biophys Acta* 1775(1):181-232.
- Forster P**, Röhl A, Lünemann P, Brinkmann C, Zerdal T, Tyler-Smith C, Brinkmann B (2000) A short tandem repeat – based phylogeny for the human Y chromosome. *Am J Hum Genet* 67:182-196.

- Gao CL**, Dean RC, Pinto A, Mooneyhan R, Connelly RR, McLeod DG, Srivastava S, Moul JW (1999) Detection of circulating prostate specific antigen expressing prostatic cells in the bone marrow of radical prostatectomy patients by sensitive reverse transcriptase polymerase chain reaction. *J Urol* 161(4):1070-1076.
- Gleason DF**, Mellinger GT (1974) Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *J Urol* 111:58-64.
- Gleason DF** (1992) Histologic grading of prostate cancer: a perspective. *Hum Pathol* 23(3):273-279.
- Goessl C**, Muller M, Straub B, Miller K (2002) DNA alterations in body fluids as molecular tumor markers for urological malignancies. *Eur Urol* 41(6):668-676.
- Goffin V**, Hoang DT, Bogorad RL, Nevalainen MT (2011) Prolactin regulation of the prostate gland: a female player in a male game. *Nat Rev Urol* 8(11):597-607.
- Gonzalvo ML**, Isaacs WB (2003) Molecular pathways to prostate cancer. *J Urol* 170:2444-2452.
- Goodrich DW**, Lee WH (1990) The molecular genetics of retinoblastoma. *Cancer Surv* 9(3):529-554.
- Gottberg M** (2009) Vergleich genomischer Analysen von Primärtumorgewebe und zirkulierende extrazelluläre DNA in Blut und Knochenmark in Relation zur Tumorzell-disseminierung beim Mamma- und Prostatakarzinom. Med Dissertation. Universität Hamburg.
- Greene FL**, Page DL, Fleming ID, et al., editors (2002) *AJCC cancer staging manual*. 6th edition New York: Springer.
- Hammerer P**, Huland H (1991) Diagnosis of localized prostate cancer: screening and pre-operative staging. *Urologe A* 30:378-386.
- Hanus MC**, Zagars GK, Pollack A (1999) Familial prostate cancer: outcome following radiation therapy with or without adjuvant androgen ablation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 15(43):379-383.
- Hara M**, Koyanagi Y, Inoue T (1971) Some physico-chemical characteristics of 'γ-seminoprotein', an antigenic component specific for human seminal plasma. Forensic immunological study of body fluids and secretion. *VII Nihon Hoigaku Zasshi* 25:322-324.
- Harris CC** (1991) Chemical and physical carcinogenesis: Advances and perspectives for the 1990s. *Cancer Res (suppl.)* 18:5023s-5044s.
- Harris L**, Fritsche H, Mennel R, Norton L, Ravdin P, Taube S, Somerfield MR, Hayes DF, Bast RC Jr (2007) American Society of Clinical Oncology. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol* 25(33):5287-5312.

- Hautmann**, Huland (2006) *Urologie*, Springer, Berlin, Heidelberg, New York; 3. Auflage:165-174, 229-241
- Hodge KK**, McNeal JE, Terris MK, Stamey TA (1989) Random systematic versus directed ultrasound guided transrectal core biopsies of the prostate. *J Urol* 142:71–75.
- Holstein AF** (1985) Die männlichen Geschlechtsorgane. In: Benninghoff Anatomie, München, Wien, Baltimore, Fleischhauer K, Staubesand J, Zencker W (Hrsg.) 14. Auflage 493-497.
- Hsing AW**, Tsao L, Devesa SS (2000) International trends and patterns of prostate cancer incidence and mortality. *Int J Cancer* 85:60-67.
- Hsing AW**, Chokkalingam AP (2006) Prostate cancer epidemiology. *Front Biosci* 11:1388-1413.
- Ichikawa T**, Hosoki S, Suzuki H, Akakura K, Igarashi T, Furuya Y, Oshimura M, Rinker-Schaeffer CW, Nihei N, Barrett JC, Isaacs JT, Ito H (2000) Mapping of metastasis suppressor genes for prostate cancer by microcell-mediated chromosome transfer. *Asian J Androl* 2(3):167-171.
- Irvine RA**, Yu MC, Ross RK, Coetzee GA (1995) The CAG and GGC microsatellites of the androgen receptor gene are in linkage disequilibrium in men with prostate cancer. *Cancer Res* 55:1937-1940.
- Istrail S**, Sutton GG, Florea L, Halpern AL, Mobarry CM, Lippert R, Walenz B, Shatkay H, et al. (2004) Whole-genome shotgun assembly and comparison of human genome assemblies. *Proc Natl Acad Sci* 101:1916-1921.
- Jahr S**, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer, FO, Hesch RD, Knippers R (2001) DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res* 61 (4):1659-1665.
- Jemal A**, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ (2007) Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin* 57:43-66.
- Jones PA**, Laird PW (1999) Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet* 21:163-167.
- Jung K**, Stephan C, Lewandowski M, Klotzek S, Jung M, Kristiansen G, Lein M, Loening SA, Schnorr D (2004) Increased cell-free DNA in plasma of patients with metastatic spread in prostate cancer. *Cancer Lett* 205(2):173-180.
- Kalish LA**, McDougal WS, McKinlay JB (2000) Family history and the risk of prostate cancer. *Urology* 56:803-806.
- Karayi MK**, Markham AF (2004) Molecular biology of prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 7(1):6-20.
- Karran P**, Bignami M (1994) DNA damage tolerance, mismatch repair and genome instability. *Bioessays* 16:833-839.

- Katsuragi Y**, Sagata N (2004) Regulation of Chk1 kinase by autoinhibition and ATR-mediated phosphorylation. *Mol Biol Cell* 15(4):1680-1689.
- Khan MA**, Han M, Partin AW, Epstein JI, Walsh PC (2003) Long-term cancer control of radical prostatectomy in men younger than 50 years of age: update 2003. *Urology* 62(1):86-91.
- Kemmer H**, Tripier D, Jouvenal K, Scriba D, Zanotti G, Maione AM, Ziegler K (1997) Binding proteins for cyclic and linear oligopeptides in plasma membranes and the cytosol of rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 54:481-490.
- Kim MY**, Oskarsson T, Acharyya S, Nguyen DX, Zhang XH, Norton L, Massague J (2009) Tumor self-seeding by circulating cancer cells. *Cell* 139:1315–1326.
- King CR**, McNeal JE, Gill H, Presti JC Jr (2004) Extended prostate biopsy scheme improves reliability of Gleason grading: implications for radiotherapy patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 59:386-389.
- Kleer E**, Oesterling JE (1993) PSA and staging of localized prostate cancer. *Urol Clin North Am* 20:695-705.
- Knudson AG Jr.** (1971) Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 68(4):820-823.
- Knudson AG Jr.**, Strong LC (1972) Mutation and cancer: a model for Wilms' tumor of the kidney. *J Natl Cancer Inst* 48:313-324.
- Köllermann J**, Weikert S, Schostak M, Kempkensteffen C, Kleinschmidt K, Rau T, Pantel K (2008) Prognostic significance of disseminated tumour cells in the bone marrow of prostate cancer patients treated with neoadjuvant hormone treatment. *J Clin Oncol* 26(30):4928-4933.
- 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 heterogeneous prostate carcinoma. *Cancer Sci* 94(9):764-768.
- Koreth J**, O'Leary JJ, O'D McGee J (1996) Microsatellites and PCR genomic analysis. *J Pathol* 178:239-248.
- Krivacic RT**, Ladanyi A, Curry DN, Hsieh HB, Kuhn P, Bergsrud DE, Kepros JF, Barbera T, Ho MY, Chen LB, Lerner RA, Bruce RH (2004) A rare-cell detector for cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(29):10501-10504.
- Lane DP**, Crawford LV (1979) T antigen is bound to a host protein in SV40 transformed cells. *Nature* 278(5701):261-263.
- Leon SA**, Green A, Yaros MJ, Shapiro B (1975) Radioimmunoassay for nanogram quantities of DNA. *J Immunol Methods* 9(2):157-164.

- Leon SA**, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros ML (1977) Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res* 37(3):646-650.
- Li WH**, Gu H, Wang H, Nekrutenko A (2001) Evolutionary analyses of the human genome. *Nature* 409:847-849.
- 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 J**, Wang XB, Park DS, Lisanti MP (2002) Caveolin-1 expression enhances endothelial capillary tubule formation. *J Biol Chem* 277:10661-10668.
- Lo YM**, Zhang J, Leung TN, Lau TK, Chang AM, Hjelm NM (1999) Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet* 64(1):218-224.
- Maehama T** (2007) PTEN: its deregulation and tumorigenesis. *Biol Pharm Bull* 30(9):1624-1627.
- Mandel P**, Métais P (1948) Les acides nucléiques du plasma sanguine chez l'homme. *CR Acad Sci Paris* 142:143-241.
- Méhes G**, Witt A, Kubista E, Ambros PF (2001) Circulating breast cancer cells are frequently apoptotic. *Am J Pathol* 159(1):17-20.
- Middleton RG** (1994) Prostate cancer. *J Urol* 151:655.
- Middleton RG** (1995) Counseling patients about therapy for localized prostate cancer. *Semin Urol Oncol* 13:187-190.
- Mostofi FK**, Sesterhenn IA, Davis CJ (2002) Histological typing of prostate tumours in WHO international histological classification of tumours. Second edition Springer Berlin, Heidelberg, New York pp 15-16.
- Müller I** (2004) Nachweis und Charakterisierung zirkulierender Mikrosatelliten-DNA im Plasma von Karzinompatienten. Diplomarbeit Biologie. Universität Hamburg.
- Müller V**, Stahmann N, Riethdorf S, Rau T, Zabel T, Goetz A, Jänicke F, Pantel K (2005) Circulating tumor cells in breast cancer: correlation to bone marrow micrometastases, heterogeneous response to systemic therapy and low proliferative activity. *Clin Cancer Res* 11(10):3678-3685.
- 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* 1075:222-229.
- Murray NP**, Reyes E, Tapia P, Orellana N, Dueñas R, Fuentealba C, Badinez L (2011) Diagnostic performance of malignant prostatic cells detection in blood for early detection of prostate cancer: comparison to prostatic biopsy. *Arch Esp Urol* 64(10):961-971.

- Nakayama T**, Watanabe M, Yamanaka M, Hirokawa Y, Suzuki H, Ito H, Yatani R, Shiraishi T (2001) The role of epigenetic modifications in retinoic acid receptor beta2 gene expression in human prostate cancers. *Lab Invest* 81(7):1049-1057.
- 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(5):1331-1336.
- Nelson WG**, De Marzo AM, Isaacs WB (2003) Prostate cancer. *N Engl J Med* 349:366-381.
- Nwosu V**, Carpten J, Trent JM, Sheridan R (2001) Heterogeneity of genetic alterations in prostate cancer: evidence of the complex nature of the disease. *Hum Mol Genet* 10:2313-2318.
- Oberneder R**, Riesenberger R, Kriegmair M, Bitzer U, Klammert R, Schneede P, Hofstetter A, Riethmüller G, Pantel K (1994) Immunocytochemical detection and phenotypic characterization of micrometastatic tumour cells in bone marrow of patients with prostate cancer. *Urol Res* 22(1):3-8.
- Oesterling J**, Martin SK, Bergstralh EJ (1993) The use of prostate-specific antigen in staging patients with newly diagnosed prostate cancer. *JAMA* 269:57.
- Okegawa T**, Nutahara K, Higashihara E (2008) Immunomagnetic quantification of circulating tumor cells as a prognostic factor of androgen deprivation responsiveness in patients with hormone naive metastatic prostate cancer. *J Urol* 2008 180(4):1342-1347.
- Okuducu AF**, Janzen V, Hahne JC, Ko Y, Wernert N (2003) Influence of histochemical stains on quantitative gene expression analysis after laser-assisted microdissection. *Int J Mol Med* 11(4):449-453.
- Pantel K**, Enzmann T, Köllermann J, Caprano J, Riethmüller G, Köllermann MW (1997) Immunocytochemical monitoring of micrometastatic disease: reduction of prostate cancer cells in bone marrow by androgen deprivation. *Int J Cancer* 71(4):521-525.
- Pantel K**, Brakenhoff RH (2004) Dissecting the metastatic cascade. *Nat Rev Cancer* 4(6):448-456.
- Pantel K**, Wölfle U (2005) Detection and molecular characterization of disseminated tumor cells: implications for anti-cancer therapy. *Biochim Biophys Acta* 1756(1):53-64.
- Pantel K**, Brakenhoff RH, Brandt B (2008) Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells. *Nat Rev Cancer* 8(5):329-340.
- Pantel K**, Alix-Panabières C, Riethdorf S (2009) Cancer micrometastases. *Nat Rev Clin Oncol* 6:339–351.

- Pantel K**, Alix-Panabières C (2010) Circulating tumour cells in cancer patients: challenges and perspectives. *Trends Mol Med* 16(9):398-406.
- Panteleakou Z**, Lembessis P, Sourla A, Pissimissis N, Polyzos A, Deliveliotis C, Koutsilieris M (2009) Detection of circulating tumor cells in prostate cancer patients: methodological pitfalls and clinical relevance. *Mol Med* 15(3-4):101-114.
- Papadopoulou E**, Davilas E, Sotiriou V, Koliopoulos A, Aggelakis F, Dardoufas K, Agnanti NJ, Karydas I, Nasioulas G (2004) Cell-free DNA and RNA in plasma as a new molecular marker for prostate cancer. *Oncol Res* 14(9):439-445.
- Paterlini-Brechot P**, Benali NL (2007) Circulating tumor cells (CTC) detection: clinical impact and future directions. *Cancer Lett* 253(2):180-204.
- Pearson JD**, Morrell CH, Landis PK, Carter B, Brant LJ (1994) Mixed-effects regression models for studying the natural history of prostate disease. *Stat Med* 13:587-601.
- Pedersen KV**, Carlsson P, Varenhorst E, Lofman O, Berglund K (1990) Screening for carcinoma of the prostate by digital rectal examination in a randomly selected population. *BMJ* 300:1041-1044.
- Perera FP** (1996) Molecular epidemiology: insights into cancer susceptibility, risk assessment and prevention. *J Natl Cancer Inst* 88:496-509.
- Perinchery G**, Bukurov N, Nakajima K, Chang J, Li LC, Dahiya R (1999) High frequency of deletion on chromosome 9p21 may harbor several tumor-suppressor genes in human prostate cancer. *Int J Cancer* 83(5):610-614.
- Pesche SA**, Latil A, Muzeau F, Cussenot O, Fournier G, Longy M, Eng C, Lidereau R (1998) PTEN/MMAC1/TEP1 involvement in primary prostate cancers. *Oncogene* 16(22):2879-2883.
- 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.
- Qian J**, Jenkins RB, Bostwick DG (1995) Chromosomal anomalies in atypical adenomatous hyperplasia and carcinoma of the prostate using fluorescence in situ hybridization. *Urology* 46:837-842.
- Qiu H**, Lotan R, Lippman SM, Xu XC (2000) Lack of correlation between expression of retinoic acid receptor-beta and loss of heterozygosity on chromosome band 3p24 in esophageal cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 28:196-202.
- 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.
- Riethdorf S**, Wikman H, Pantel K (2008) Review: Biological relevance of disseminated tumor cells in cancer patients. *Int J Cancer* 123(9):1991-2006.

- Rohen JW** (1999) *Topographische Anatomie des Menschen*, Schattauer-Verlag, 10. Auflage.
- Rohen JW**, Lütjen-Drecoll E (2000) *Funktionelle Anatomie des Menschen*, Schattauer-Verlag, 10. Auflage.
- Rohrbach HC**, Haas J, Baretton GB, Hirschmann A, Diebold J, Behrendt RP, Lohrs U (1999) Microsatellite instability and loss of heterozygosity in prostatic carcinomas: comparison of primary tumors, and of corresponding recurrences after androgen-deprivation therapy and lymph-node metastases. *Prostate* 40(1):20-27.
- Saiki RK**, Walsh PS, Levenson CH, Erlich HA (1989) Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. *Proc Natl Acad Sci USA* 86(16):6230-6234.
- San Francisco IF**, DeWolf WC, Rosen S, Upton M, Olumi AF (2003) Extended prostate needle biopsy improves concordance of Gleason grading between prostate needle biopsy and radical prostatectomy. *J Urol* 169:136-140.
- Sakr WA**, Grignon DJ, Crissman JD, Heilbrun LK, Cassin BJ, Pontes JJ, Haas GP (1994) High grade prostatic intraepithelial neoplasia (HGPIN) and prostatic adenocarcinoma between the ages of 20-69: an autopsy study of 249 cases. *In Vivo* 8:439-443.
- Schaid DJ** (2004) The complex genetic epidemiology of prostate cancer. *Hum Mol Genet* 13 Spec No 1:R103-121.
- Scher HI**, Pantel K (2009) Bone marrow aspiration for disseminated tumor cell detection: a must-have test or is the jury still out? *J Clin Oncol* 27(10):1531-1533.
- Schwarzenbach H**, Muller 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**, 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(7):1465-1471.
- Schwarzenbach H**, Chun FK, Muller 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(2):253-258.
- Schwarzenbach H**, Alix-Panabières C, Müller I, Letang N, Vendrell JP, Rebillard X, Pantel K (2009) Cell-free tumor DNA in blood plasma as a marker for circulating tumor cells in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 15(3):1032-1038.
- Schwarzenbach H**, Hoon DS, Pantel K (2011) Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer* 2011 11(6):426-437.

- Seidel C** (2009) Analyse der freien zirkulierenden DNA von Prostatakarzinom-Patienten auf allelische Imbalance. Med Dissertation. Universität Hamburg.
- Sheldon CA**, Williams RD, Fraley EE (1980) Incidental carcinoma of the prostate: a review of the literature and critical reappraisal of classification. *J Urol* 124:626-631.
- Singletary SE**, Greene FL, Sobin LH (2003) Classification of isolated tumor cells: clarification of the 6th edition of the American Joint Committee on Cancer Staging Manual. *Cancer* 98(12):2740-2741.
- Sobin LH**, Wittekind CH, editors (2002) TNM classification of malignant tumors. 6th edition New York: Wiley-Liss.
- Steinberg GD**, Carter BS, Beaty TH, Childs B, Walsh PC (1990) Family history and the risk of prostate cancer. *Prostate* 17:337-347.
- Stenzl A**, Anastasiadis A, Belka C, Bichler H, Bokemeyer C, Cuno P (2004) Prostatakarzinom. Tübingen, Interdisziplinäres Tumorzentrum; Klinikum-Eberhard-Karls- Universität. Schriftenreihe "Therapieempfehlungen". ITZ Tübingen.
- Stigbrand T**, Andrés C, Bellanger L, Bishr Omary M, Bodenmüller H, Bonfrer H, et al. (1998) Epitope specificity of 30 monoclonal antibodies against cytokeratin antigens: the ISOBM TD5-1 Workshop. *Tumour Biol* 19(2):132-152.
- Strohmeier DM**, Berger AP, Moore DH, Bartsch G, Klocker H, Carroll PR, Loening SA, Jensen RH (2004) Genetic aberrations in prostate carcinoma detected by comparative genomic hybridization and microsatellite analysis: association with progression and angiogenesis. *Prostate* 59(1):43-58.
- 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(4):269-275.
- Stroun M**, Anker P, Lyautey J, Lederrey C, Maurice PA (1987) Isolation and characterization of DNA from the plasma of cancer patients. *Eur J Cancer Clin Oncol* 23(6):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* 313:139-142.
- Subramanian S**, Mishra RK, Singh L (2003) Genome-wide analysis of microsatellite repeats in humans: their abundance and density in specific genomic regions. *Genome Biol* 4:R13.
- Taback B**, Giuliano AE, Hansen NM, Singer FR, Shu S, Hoon DS (2003) Detection of tumor-specific genetic alterations in bone marrow from early-stage breast cancer patients. *Cancer Res* 63(8): 1884-7.

- Taylor JD**, Holmes TM, Swanson GM (1994) Descriptive epidemiology of prostate cancer in metropolitan Detroit. *Cancer* 73:1704-1707.
- Tal-Or P**, Di-Segni A, Lupowitz Z, Pinkas-Kramarski R (2003) Neuregulin promotes autophagic cell death of prostate cancer cells. *Prostate* 55(2):147-157.
- Thompson IM**, Goodman PJ, Tangen CM, Lucia SM, Miller GJ, Ford A, Szczepanek CM, Crowley JJ, Coltman CA (2003) The Influence of Finasteride on the Development of Prostate Cancer. *New Engl J Med* 349(3):213-222.
- Tòth G**, Gàspàri Z, Jurka J (2000) Microsatellites in different eucaryotic genomes. Survey and analysis. *Genome Res* 10:967-981.
- Uzzo RG**, Wei JT, Waldbaum RS, Perlmutter AP, Byrne JC, Vaughan ED Jr. (1995) The Influence of prostate size on cancer detection. *Urology* 46:831–836.
- Varambally S**, Yu J, Laxman B, Rhodes DR, Mehra R, Tomlins SA, Shah RB, et al. (2005) Integrative genomic and proteomic analysis of prostate cancer reveals signatures of metastatic progression. *Cancer Cell* 8(5):393-406.
- Venter JC**, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al. (2001) The sequence of the human genome. *Science* 291:1304-1351.
- Vogelstein B**, Kinzler KW (1993) The multistep nature of cancer. *Trends Genet* 9(4):138-141.
- von Knobloch R**, Konrad L, Barth PJ, Brandt H, Wille S, Heidenreich A, Moll R, Hofmann R (2004) Genetic pathways and new progression markers for prostate cancer suggested by microsatellite allelotyping. *Clin Cancer Res* 10(3):1064-1073.
- Wang MC**, Valenzuela LA, Murphy GP, Chu TM (1979) Purification of a human prostate specific antigen. *Invest Urol*, 17:159-163.
- Weber JL**, May PE (1989) Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet* 44(3):388-396.
- Weckermann D**, Müller P, Wawroschek F, Harzmann R, Riethmüller G, Schlimok G (2001) Disseminated cytokeratin positive tumor cells in the bone marrow of patients with prostate cancer: detection and prognostic value. *J Urol* 166(2):699-703.
- Weckermann D**, Polzer B, Ragg T, Blana A, Schlimok G, Arnholdt H, Bertz S, Harzmann R, Klein CA (2009) Perioperative activation of disseminated tumor cells in bone marrow of patients with prostate cancer. *J Clin Oncol* 27(10):1549-1556.
- Weinstein IB** (1988) The Origins of Human Cancer - Molecular mechanisms of carcinogenesis and their implications for cancer prevention and treatment. 27th Clowes, G.H.A. Memorial Award Lecture. *Cancer Res.* 48:4135-4143.
- Welen K**, Damber JE (2011) Prostate diseases-role of sex steroids and their inhibitors. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 25(2):355-367.

- 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: 652-661.
- Wiedswang G**, Borgen E, Schirmer C, Kåresen R, Kvalheim G, Nesland JM, Naume B (2006) Comparison of the clinical significance of occult tumor cells in blood and bone marrow in breast cancer. *Int J Cancer* 118(8):2013-2019.
- Wikman H**, Vessella R, Pantel K (2008) Cancer micrometastasis and tumour dormancy. *Apmis* 116(7-8):754-770.
- Wirth M**, Froschermaier S, Manseck A (1999) Die Rolle des PSA in der Diagnostik des Prostatakarzinoms. In: Hinkelbein W, Miller K, Wiegel Th (Hrsg.) *Prostatakarzinom – Urologische und Strahlentherapeutische Aspekte*. Springer-Verlag: 105-117.
- Wirth M** (2001) Therapie des lokal begrenzten Prostatakarzinoms. In: Rübber H, Uroonkologie, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York: 233-277.
- Wittekind CH**, Meyer H-J, Bootz F (Hrsg) (2002) *UICC TNM Klassifikation maligner Tumoren*. 6.Aufl. Springer, Berlin Heidelberg New York.
- Woelfle U**, Cloos J, Sauter G, Riethdorf L, Janicke F, van Diest P, Brakenhoff R, Pantel K (2003) Molecular signature associated with bone marrow micrometastasis in human breast cancer. *Cancer Res* 63(18):5679-5684.
- Wood DP Jr**, Banerjee M (1997) Presence of circulating prostate cells in the bone marrow of patients undergoing radical prostatectomy is predictive of disease-free survival. *J Clin Oncol* 15(12):3451-3457.
- Wood DP Jr**, Beaman A, Banerjee M, Powell I, Pontes E, Cher ML (1998) Effect of neo-adjuvant androgen deprivation on circulating prostate cells in the bone marrow of men undergoing radical prostatectomy. *Clin Cancer Res* (9):2119-2123.
- Wullich B**, Verelst S, Rohde V, Moll V, Lensch R, Retz M, Loch T, Zwergel T, Seitz G, Forster S, Stöckle M (2001) High frequency microsatellite instability in mucinous adenocarcinoma of the prostate. *J Urol* 165(3):912-913.
- Yano S**, Matsuyama H, Matsuda K, Matsumoto H, Yoshihiro S, Naito K (2004) Accuracy of an array comparative genomic hybridization (CGH) technique in detecting DNA copy number aberrations: comparison with conventional CGH and loss of heterozygosity analysis in prostate cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 150(2):122-127.
- Yeh CC**, Lee C, Dahiya R (2001) DNA mismatch repair enzyme activity and gene expression in prostate cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 285(2):409-413.

## 8 Danksagung

Mein Dank gilt allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben; ganz besonders danke ich:

Meiner Betreuerin Frau PD Dr. phil. II Heidi Schwarzenbach, die diese Arbeit mit großem Engagement betreut hat. Danke auch für die rasche Korrektur der Arbeit in der Endphase.

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Klaus Pantel danke ich sehr für das mir entgegengebrachte Vertrauen und für die Überlassung des interessanten Themas dieser Dissertation sowie für alle wertvollen Hinweise und Anregungen. Auch möchte ich mich ganz herzlich für die exzellenten Arbeitsbedingungen bedanken, die ich in dem von ihm geleiteten Institut vorgefunden habe.

Für die Bereitstellung der Untersuchungsmaterialien (Patientenproben) bedanke ich mich bei Prof. Dr. med. Hartwig Huland und seinem damaligen Team der Urologie des UKE. Mein besonderer Dank gilt dabei Frau Dr. med. Imke Lange, Herrn PD Dr. Felix Chun und Herrn PD Dr. Martin Friedrich. In diesem Zusammenhang gilt mein besonderer Dank auch den Patienten, die bereitwillig und ohne Vorbehalte ihre Proben „der Wissenschaft“ zur Verfügung gestellt haben.

Antje Andreas, Malgorzata Stoupiec und Cornelia Coith danke ich sehr für die exzellente Einarbeitung und Anleitung während des experimentellen Teils der Arbeit. Petra Merkert aus dem chirurgischen Forschungslabor danke ich für die Hilfestellungen rund um den „*Genetic-Analyzer*“ und Dr. med. Andreas Hellwinkel für die Hilfe bei den „*Laser-capture-Dissektionen*“. Herrn PD Dr. med. Andreas Erbersdobler, Institut für Pathologie des UKE, danke ich für die professionelle Begutachtung der histologischen Schnitte.

Für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die vielen hilfreichen Ratschläge und für einige nette Abende im Anschluss an den Labor-Alltag, bedanke ich mich bei den Mitarbeitern des Instituts für Tumorbilogie: Dr. Frank Wischnewski, Dr. Imke Müller, Dr. Jan-Wilhelm Kornfeld, Dr. Reinhard Müller und Dr. Stefan Werner sowie natürlich meinen „Mitdoktoranden“ Dr. Karoline Urban, Dr. Miriam Gottberg und Dr. Cord Beeger.

Frau Dipl. Biologin Corinna Eichelser danke ich sehr herzlich für die professionelle Hilfe bei der statistischen Auswertung der Daten im SPSS.

Herrn Prof. Dr. E. Sebastian Debus danke ich herzlich für die bereitwillige Freistellung von der klinischen Tätigkeit zur Fertigstellung dieser Arbeit.

Frau Regina Ahrens danke ich sehr für das konsequent und erbarmungslos durchgeführte Korrektorat.

Meiner lieben Ehefrau Marisa möchte ich für die tolle Unterstützung bei dem Fertigstellen dieser Arbeit danken.

## 9 Lebenslauf

*Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.*

*Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.*

## 10 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 an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

---

Sebastian W. Carpenter

