

Aus der Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie
der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. H. Riedmiller

**Mikrosatelliteninstabilitäten und
Defekte in den Spindelcheckpointgenen Bub1b und MAD2
als mögliche prädiktive Marker für das Prostatakarzinom**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Daniel Kühn

aus Nürnberg

Würzburg, Januar 2009

Referent: Professor Dr. med. E. Gerharz
Koreferent: Professor Dr. med. H. Riedmiller
Dekan: Professor Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 20.11.2009

Der Promovend ist Arzt.

Meiner Frau

1	EINLEITUNG	1
1.1	Das Prostatakarzinom	1
1.1.1	Epidemiologie	1
1.1.2	Ätiologie und Risikofaktoren	2
1.1.3	Klinik, Früherkennung und Diagnostik	3
1.1.3.1	Klinik	3
1.1.3.2	Früherkennung und Screening	4
1.1.3.3	Diagnostik	5
1.1.4	Klassifizierung	7
1.1.4.1	TNM-System	7
1.1.4.1.1	T-Kategorie	8
1.1.4.1.2	N-Kategorie	8
1.1.4.1.3	M-Kategorie	9
1.1.4.2	Grading	10
1.1.5	Morphologie und Histologie	12
1.1.6	Therapie	13
1.1.7	Prognose	15
1.2	Karzinogenese des Prostatakarzinoms	19
1.2.1	Hereditäre und sporadische Formen	19
1.2.2	Kanzerogenesefördernde Mechanismen	21
1.2.2.1	Verlust von Tumorsuppressor-Genen	22
1.2.2.2	Aktivierung von Onkogenen	25
1.3	Defekte in spezifischen zellulären Reparatur- und Überwachungssystemen	26
1.3.1	Das DNA-Mismatch-Repair-System (MMR)	26
1.3.1.1	Funktionsdefizienz des MMR-Systems und Karzinogenese	28
1.3.1.2	Prävalenzen der MSI in Tumoren und MMR-Funktionsdefizienz	29
1.3.2	Der Spindelcheckpoint-Apparat	31
1.3.2.1	Komponenten des Spindelcheckpoint-Apparates	32
1.3.2.2	Funktion von Bub1b und MAD2	33
1.3.2.3	Defekte im Spindelcheckpoint-Apparat und Karzinogenese	33
2	FRAGESTELLUNG	36

Inhaltsverzeichnis

3	MATERIAL UND METHODEN	37
3.1	Material	37
3.1.1	Geräte	37
3.1.2	Software	37
3.1.3	Chemikalien und Biochemikalien.....	38
3.1.4	Puffer und Lösungen	38
3.1.5	Enzyme	39
3.1.6	Molekularbiologische Kits	39
3.1.7	DNA-Standard	39
3.2	Patientenkollektiv	40
3.2.1	Mikrosatellitenanalyse	40
3.2.2	Genexpressionsanalysen	41
3.3	Tumordatenbank	41
3.4	Methoden	41
3.4.1	DNA-Extraktion.....	41
3.4.1.1	Paraffinmaterial	41
3.4.1.2	Kryomaterial	42
3.4.2	RNA-Extraktion.....	43
3.4.3	Quantitäts- und Reinheitskontrolle der Nukleinsäuren.....	43
3.4.4	Polymerasekettenreaktion (PCR)	44
3.4.4.1	Allgemeines und Prinzip	44
3.4.4.2	Oligonukleotide (Primer).....	44
3.4.4.3	PCR-Ansatz.....	45
3.4.5	Agarose-Gelelektrophorese.....	47
3.4.6	Mikrosatellitenanalyse	47
3.4.6.1	Auswahl der Mikrosatellitenmarker.....	47
3.4.6.2	Polymerasekettenreaktion	48
3.4.6.3	Polyacrylamidgelelektrophorese.....	48
3.4.6.4	Analyse der Polyacrylamidgelelektrophorese.....	48
3.4.7	Reverse Transkription	50
3.4.8	Quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR).....	51
3.4.8.1	Allgemeines und Prinzip	51
3.4.8.2	Oligonukleotide (Primer).....	53

3.4.8.3	qRT-PCR-Ansatz.....	53
3.4.8.4	Datenverarbeitung.....	55
3.4.9	Statistik.....	56
4	ERGEBNISSE.....	57
4.1	Analyse auf Mikrosatelliteninstabilitäten in Prostatakarzinomen.....	57
4.1.1	Prozedere.....	57
4.1.2	Klassifikation und Verteilung.....	58
4.1.3	Korrelation mit Tumordatenbank.....	58
4.1.3.1	Tumorgrading nach Gleason.....	59
4.1.3.2	Tumorstadium nach TNM (UICC).....	61
4.1.3.3	Lymphknotenstatus.....	63
4.1.3.4	Alter der Patienten bei Diagnosestellung.....	64
4.2	Expressionsanalyse der Spindelcheckpoint-Gene Bub1b und MAD2 in Prostatakarzinomen.....	65
4.2.1	Semiquantitative Analyse der Bub1b- und MAD2-Expression.....	65
4.2.2	Quantitative Analyse der Bub1b- und MAD2-Expression.....	66
4.2.2.1	Bub1b.....	66
4.2.2.2	MAD2.....	68
4.2.2.3	Tumorgrading nach Gleason.....	71
4.2.2.3.1	Bub1b.....	71
4.2.2.3.2	MAD2.....	72
4.2.2.4	Tumorstadium nach TNM (UICC).....	73
4.2.2.4.1	Bub1b.....	73
4.2.2.4.2	MAD2.....	74
4.2.2.5	Lymphknotenstatus.....	75
4.2.2.5.1	Bub1b.....	75
4.2.2.5.2	MAD2.....	76
4.2.2.6	Alter der Patienten bei Diagnosestellung.....	77
4.2.2.6.1	Bub1b.....	77
4.2.2.6.2	MAD 2.....	78
5	DISKUSSION.....	79
5.1	Analyse auf Mikrosatelliteninstabilitäten in Prostatakarzinomen.....	79
5.1.1	Häufigkeit von Mikrosatelliteninstabilitäten in Malignomen des Menschen.....	79

Inhaltsverzeichnis

5.1.2	Häufigkeit von Mikrosatelliteninstabilitäten im Adenokarzinom der Prostata	82
5.1.3	Korrelation von Mikrosatelliteninstabilitäten im Adenokarzinom der Prostata mit klinischen Parametern	88
5.1.3.1	Tumorgrading nach Gleason	89
5.1.3.2	Tumorstadium nach TNM (UICC)	90
5.1.3.3	Lymphknotenstatus	91
5.1.3.4	Alter der Patienten bei Diagnosestellung.....	91
5.2	Expressionsanalyse der Spindelcheckpoint-Gene Bub1b und MAD2 in Prostatakarzinomen	94
5.2.1	Assoziation von biopathologischen Parametern mit der reduzierten Expression von Spindelcheckpoint-Genen	97
5.2.1.1	MAD2	97
5.2.1.2	Bub1b	98
5.2.2	Bedeutung von Spindelcheckpoint-Defekten für die Karzinogenese und Tumorprogression	100
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	102
7	LITERATURVERZEICHNIS	105

1 EINLEITUNG

1.1 Das Prostatakarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Das Prostatakarzinom ist vorwiegend eine Erkrankung des älteren Mannes. Über 75 Prozent der neu diagnostizierten Prostatakarzinome werden bei Männern jenseits des 65. Lebensjahres entdeckt. Mit Einführung des Screenings durch PSA-Bestimmung werden neuauftretende Karzinome verstärkt in früheren Lebensaltern und damit oft in weniger fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert. Somit wird das Prostatakarzinom auch zunehmend zu einer Erkrankung des mittleren Lebensalters.¹

Weltweit betrachtet ist das Prostatakarzinom der vierthäufigste bösartige Tumor des Mannes. Obduktionsstudien zeigten bei bis zu 30 Prozent der über 50jährigen und bis zu 80 Prozent der über 80jährigen Männer das Vorliegen eines latenten Prostatakarzinoms.^{2,3} Obwohl für alle Regionen der Welt ähnliche Prävalenzraten des latenten Prostatakarzinoms vermutet werden, zeigen die Inzidenzen des manifesten Prostatakarzinoms eine starke geographische und ethnische Variationsbreite. Generell finden sich in westlichen Industrienationen höhere Inzidenz- und Mortalitätsraten als in Entwicklungsländern. Allein für die USA erwartete man für das Jahr 2008 mehr als 186.000 Neuerkrankungen und über 28.000 Prostatakarzinom-bedingte Todesfälle. Indianer und die Ureinwohner Alaskas zeigen weltweit die geringste Inzidenz (68,2/100.000), gefolgt von den Bewohnern asiatischer Länder, z.B. Japan oder China.⁴ Auch innerhalb Europas besteht ein epidemiologisches Gefälle in Auftreten und Mortalität des Prostatakarzinoms: Während z.B. 1998 in Norwegen 24 von 100.000 Einwohnern an den Folgen eines Prostatakarzinoms verstarben, waren es im südeuropäischen Spanien im selben Zeitraum nur 13 von 100.000.⁵ Auch zwischen ethnischen Bevölkerungsgruppen desselben Landes sind Unterschiede in der Inzidenz bekannt. Beispielsweise ist die weiße Bevölkerung in den USA in deutlich geringerem Ausmaße betroffen (161,4/100.000) als ihre afroamerikanischen Mitbürger (255,5/100.000).^{4,6} In Deutschland starben im Jahr 2007 11.448 Männer am Prostatakarzinom. Die

Einleitung

Erkrankung steht damit hierzulande auf Rang 6 der Todesursachen und ist das zweithäufigste zum Tode führende Malignom des Mannes.⁷

1.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren

Die genaue Ursache für die Entstehung eines Prostatakarzinoms ist bislang noch unbekannt. Genetische Faktoren spielen ebenso eine Rolle wie Umwelteinflüsse. Hingegen ist eine Vielzahl von Risikofaktoren bekannt, die die Wahrscheinlichkeit der Entwicklung eines Prostatakarzinoms erhöhen können.

Genetische Faktoren scheinen vor allem beim Auftreten von Prostatakarzinomen bei Männern unter 55 Jahren eine wesentliche Rolle zu spielen.⁸ Etwa 10 Prozent aller Prostatakarzinome gehen einher mit einer hereditären Komponente. Das Risiko eines Mannes ist dabei abhängig von der Anzahl der betroffenen Familienangehörigen und vom Grad der Verwandtschaft: Männer mit mindestens einem erstgradigen Verwandten (Vater, Bruder, Sohn) mit Prostatakarzinom haben im Vergleich zur männlichen Gesamtbevölkerung ein um den Faktor 2 erhöhtes Risiko, selbst an einem Prostatakarzinom zu erkranken.⁹ Bei mindestens 3 betroffenen erst- und/oder zweitgradigen Verwandten steigt das Risiko sogar um den Faktor 11.¹⁰

Sowohl Initiation als auch Progression des Prostatakarzinoms sind androgenabhängig. Eunuchen entwickeln kein Prostatakarzinom. Inwieweit jedoch ein erhöhter Androgenspiegel oder deren Metabolite Anteil an der Karzinogenese haben, ist noch unklar. Während Hinweise dafür bestehen, dass mit steigenden Testosteron-Serumspiegeln auch das Karzinomrisiko steigt, zeigen andere Studien keinen Zusammenhang zwischen dem Androgenspiegel oder der 5-Alpha-Reduktase-Aktivität und dem Risiko, ein Prostatakarzinom zu entwickeln.^{11,12,13,14}

Auch Lebensumstände, wie Umweltfaktoren und Essgewohnheiten, haben einen Einfluss auf die Entwicklung des Prostatakarzinoms. Dies zeigt sich zum Beispiel daran, dass sich bei Japanern und Chinesen, die in die USA einwandern, ein Anstieg der Karzinominzidenz nachweisen lässt.¹⁵ Zu den möglicherweise karzinomfördernden Faktoren gehören unter anderem ein hoher Fettkonsum sowie

eine hohe Kalziumaufnahme.^{16,17} Andere Substanzen, vor allem bestimmte Antioxidantien, scheinen protektiv in Bezug auf die Entwicklung des Prostatakarzinoms zu wirken: So wird die Inzidenz des Prostatakarzinoms durch die in hoher Konzentration in Tomaten enthaltenen Lycopene ebenso gesenkt, wie durch die Gabe von Seleniumpräparaten oder Vitamin E.^{18,19} Eine Vielzahl weiterer Faktoren (Tabak- und Alkoholkonsum, Größe, Gewicht, sexuelle Aktivität, virale und venerische Entzündungen, Zustand nach Vasektomie, Benigne Prostatahyperplasie) stehen im Verdacht, an der Entwicklung und/oder Manifestation des Prostatakarzinoms beteiligt zu sein. Für alle genannten Faktoren steht jedoch ein eindeutiger Nachweis bislang noch aus.¹

1.1.3 Klinik, Früherkennung und Diagnostik

1.1.3.1 Klinik

Dem klinischen Erscheinungsbild entsprechend unterscheidet man vier verschiedene Formen des Prostatakarzinoms (nach Mostofi):^{20,21}

Das *latente* Prostatakarzinom bleibt zu Lebzeiten asymptomatisch und wird erst bei der Obduktion diagnostiziert. Es handelt sich meist um einen gut differenzierten und niedrigmalignen Tumor, der bei ca. 40 Prozent der über 50-jährigen und etwa 50 Prozent der über 80-jährigen Männer zu finden ist.

Das *inzidentelle* Karzinom wird zufällig im Rahmen einer transurethralen Resektion (TUR-P) oder transvesikalen Prostatektomie (TVP) diagnostiziert. Das zumeist hochdifferenzierte, niedrigmaligne Karzinom ist in bis zu 20 Prozent des Resektionsguts von Männern mit benigner Prostatahyperplasie zu finden.

Das *okkulte* Prostatakarzinom wird anhand histologischer Untersuchungen von Metastasen diagnostiziert, bevor der Primärtumor in der Prostata entdeckt wird.

Als *manifestes* Karzinom bezeichnet man ein durch klinische Untersuchung diagnostizierbares und histologisch-biopsisch gesichertes Prostatakarzinom.

Über zwei Drittel aller Prostatakarzinome werden bei asymptomatischen Patienten diagnostiziert.²² Symptome treten spät und durch die gehäuft periphere Lokalisation des Karzinoms in der Drüse meist erst dann auf, wenn das Prostatakarzinom bereits

Einleitung

lokal fortgeschritten oder metastasiert ist. Zu den möglichen Symptomen zählen dann obstruktive oder irritative Miktionsbeschwerden als Hinweis auf eine Infiltration von Blasen Hals bzw. Urethra, Hämatospermie bei Infiltration der Ductus ejaculatorii oder Samenblasen. Die lokale Infiltration der neurovaskulären Bündel kann zu Impotenz führen. Einseitiger Harnstau kann auf lokal fortgeschrittenes Wachstum hindeuten. Anämie und Knochenschmerzen können als Folge der metastatischen Infiltration von Knochenmark und Knochensubstanz ebenso auftreten wie Lymphödeme der unteren Extremitäten bei metastatischem Befall der pelvinen Lymphknoten. Selten wird ein Prostatakarzinom von paraneoplastischen Syndromen wie ektope Hormonproduktion oder disseminierter intravasaler Koagulation (DIC) begleitet.²³

1.1.3.2 Früherkennung und Screening

Das Prostatakarzinom verursacht nur in wenigen Fällen Frühsymptome. Um betroffene Patienten bereits in einem frühen Stadium entdecken und damit die Heilungschancen erhöhen zu können, spielen Früherkennung und Screening des Prostatakarzinoms eine entscheidende Rolle. In Deutschland dient der Früherkennung des Prostatakarzinoms allein die digital-rektale Untersuchung als gesetzlich vorgesehene Vorsorgeuntersuchung für Männer ab dem 45. Lebensjahr (Sozialgesetzbuch V). Mit Einführung der PSA-Bestimmung konnte sich eine Screening-Methode etablieren, die es erlaubt, in kurzer Zeit bei einer großen Anzahl klinisch asymptomatischer Männer einen Hinweis auf das Vorliegen eines Prostatakarzinoms zu erhalten und so gegebenenfalls den Diagnosezeitpunkt vorzulegen. Wenngleich der Nutzen des Screenings in Hinblick auf eine Senkung der krankheitsspezifischen Mortalität in Europa bislang nicht nachgewiesen werden konnte, hat sich der Anteil der Patienten mit klinischen Symptomen einer fortgeschrittenen Tumorerkrankung unter den neu diagnostizierten Fällen seit 1991 deutlich reduziert.²⁴ Von der amerikanischen Krebsgesellschaft wird zwar das PSA-gestützte Prostatakarzinom-Screening empfohlen, ein flächendeckender Einsatz ist jedoch zurzeit aus Kostengründen nicht zu rechtfertigen.²⁵ Es wird daher empfohlen, bei einem suspekten Tastbefund ungeachtet des PSA-Wertes eine Biopsie des verdächtigen Areals vorzunehmen. Bei PSA-Werten von >4 ng/ml bzw.

bei einem Wert oberhalb der Altersnorm sollte - ebenso wie bei einem Anteil des freien PSA von <20% oder einer PSA-Anstiegsgeschwindigkeit von >0,75 ng/ml/Jahr - auch bei negativem Tastbefund eine TRUS-assistierte, systematische Stanzbiopsie mit zusätzlicher Gewebegewinnung aus eventuell vorhandenen Läsionen erfolgen.^{26,27}

1.1.3.3 Diagnostik

Zur Diagnostik früher Stadien des Prostatakarzinoms bedient man sich vornehmlich dreier Modalitäten: der digital-rektalen Untersuchung (DRU), des PSA-Wertes im Serum und der Stanzbiopsie mithilfe des transrektalen Ultraschalls (TRUS). Hinweise auf das Vorliegen eines Prostatakarzinoms liefern meist ein suspekter digital-rektaler Tastbefund oder ein erhöhter PSA-Wert. Seit Einführung des PSA-Screenings ist die Erstmanifestation durch Auftreten klinischer Symptome wie Knochenschmerzen, Miktionsstörungen, Harnverhalt oder Hämaturie deutlich zurückgegangen.

Die digital-rektale Untersuchung ist trotz niedriger Sensitivität und hoher Untersucherabhängigkeit ein tragender Pfeiler der Prostatakarzinomdiagnostik. Mit ihrer Hilfe können bis zu 70 Prozent der Prostatakarzinome in der peripheren Zone erfasst werden.²⁶ Hinter bis zu 50 Prozent der auffälligen Tastbefunde verbirgt sich tatsächlich ein Karzinom.²⁸ Der positive prädiktive Wert der DRU ist dabei abhängig von Alter, Rasse und PSA-Wert.²⁹ Prostatakarzinome können mittels DRU erst ab einem Volumen von 0,2 ml entdeckt werden und sind in über 50 Prozent der Fälle bereits lokal fortgeschritten.

Wenngleich der PSA-Wert nicht spezifisch für das Prostatakarzinom ist, eignet sich das PSA doch besonders zur Erkennung eines Prostatakarzinoms.³⁰ Das Prostata-spezifische Antigen wird ausschließlich in den Epithelzellen der Drüsenendstücke und Ausführungsgänge der Prostata produziert und ist bedeutsam für die Verflüssigung des Ejakulats. Die Expression des PSA ist in hohem Maße androgenabhängig. Die Serumlevel variieren je nach Alter, Rasse und Prostatavolumen: Mit jedem zusätzlichen Milliliter Prostatavolumen erhöht sich der Ausgangswert des PSA um 4%.³¹ Organerkrankungen (BPH, Prostatitis, Prostatakarzinom), aber auch Manipulationen an der Drüse

Einleitung

(Prostatamassage/DRU, Biopsie) können zur Zerstörung der normalen Prostataarchitektur führen, die als intraprostatiche Diffusionsbarriere das Austreten des PSA in die Blutzirkulation verhindert.³² Folge ist eine Erhöhung des messbaren PSA-Spiegels im Serum. Dem Nachweis erhöhter PSA-Spiegel können somit unterschiedliche prostataspezifische Veränderungen zugrunde liegen. Zur Abgrenzung des Vorliegens eines Prostatakarzinoms gegenüber nichtmalignen PSA-Erhöhungen kann der Quotient aus freiem und an α 1-Antichymotrypsin (ACT) gebundenem PSA im Serum verwendet werden. Es wurde gezeigt, dass Männer mit Prostatakarzinom gegenüber solchen ohne Prostatakarzinom einen größeren Anteil ACT-gebundenes PSA - und damit einen niedrigeren Prozentsatz freies PSA - im Serum aufweisen. Auch das relative Verhältnis von PSA-Wert und Prostatavolumen kann mithilfe eines Grenzwertes zur Differenzierung des Karzinoms von z.B. einer benignen Prostatahyperplasie hilfreich sein.³³

Die Bestimmung des PSA-Serumwertes besitzt von allen diagnostischen Tests den höchsten prädiktiven Wert für das Vorliegen eines Prostatakarzinoms. Die Wahrscheinlichkeit des Vorhandenseins eines Prostatakarzinoms steht dabei in direkter Beziehung zu dem PSA-Level.³⁴ Allerdings lässt sich bei etwa jedem vierten Patienten mit Prostatakarzinom keine PSA-Erhöhung nachweisen. Ein normwertiger PSA-Wert schließt somit ein Prostatakarzinom nicht aus.³⁵

Liegt ein suspekter Tastbefund vor und/oder ist der PSA-Wert erhöht, ist eine Gewebeentnahme durch Stanzbiopsie indiziert. Als Standard gilt heute die TRUS-gesteuerte systematische transrektale Biopsie. Mit einer Stanzpistole werden hierfür Biopsien aus dem tastbaren suspekten Areal sowie parasagittal aus Basis, Mittelzone und apikaler Region beider Prostataseitenlappen entnommen. Gegebenenfalls wird die Biopsie noch um sonographisch auffällige Läsionen und weitere zentrale oder laterale Biopsien erweitert. Bei systematischem Vorgehen spiegelt die Anzahl positiver Biopsien das Tumolvolumen wider und ist von prognostischer Relevanz.²³

Die Kombination aus DRU, Serum-PSA und Sextantenbiopsie sichert die Diagnose von 90% aller Prostatakarzinome.^{36,37} Die Detektionsmöglichkeiten der transrektalen Sonographie an sich sind limitiert. Die meisten im Ultraschall darstellbaren

echoarmen Prostataregionen sind histologisch tumorfrei und nur 50% der nicht tastbaren Läsionen mit einem Mindestdurchmesser von 1 cm können mit dieser Methode erkannt werden.³⁸ Der TRUS ist somit keine geeignete Methode zur Früherkennung des Prostatakarzinoms, er ermöglicht aber die systematische und gezielte Entnahme von Stanzbiopsien aus tumorverdächtigen Arealen und kann in Einzelfällen auch zur Erkennung extraprostatatischen Karzinomwachstums hilfreich sein.

Bildgebende Verfahren müssen, um von diagnostischem Nutzen zu sein, eine Unterscheidung zwischen organbegrenztem und organüberschreitendem Tumorwachstum möglich machen. Unter dieser Prämisse spielen die Computertomographie und die Magnetresonanztomographie in der Primärdiagnostik des Prostatakarzinoms aufgrund geringer Sensitivität und Spezifität zum gegenwärtigen Zeitpunkt keine Rolle. Die Skelettszintigraphie als sensitivste Methode zur Detektion von Knochenmetastasen hat ihre Bedeutung vor allem im Staging des Prostatakarzinoms. Bei gleichzeitiger Verwendung der PSA-Wert-Bestimmung hat sich die Skelettszintigraphie als nicht kosteneffektiv für eine routinemäßige Anwendung im Rahmen des Stagings erwiesen.³⁹

1.1.4 Klassifizierung

Das Prostatakarzinom kann klassifiziert werden durch:

- Das Tumorstadium (TNM-System): das sogenannte *Staging* klassifiziert die lokale Tumorausdehnung, den Lymphknotenbefall und die Metastasierung.
- Die mikroskopische Differenzierung: das sogenannte *Grading* klassifiziert die Malignität des Prostatakarzinoms anhand histomorphologischer Kriterien.

1.1.4.1 TNM-System

Sobald die Diagnose Prostatakarzinom histopathologisch gesichert ist, sollte eine möglichst genaue Einschätzung des Erkrankungsausmaßes erfolgen. Zum einen ermöglicht dies eine Aussage über die Prognose der Erkrankung, zum anderen orientiert sich die Wahl der Therapiestrategie am Untersuchungsergebnis der

Einleitung

Tumorausbreitung, dem sogenannten Staging.^{33,40} Im Gegensatz zum klinischen Staging, das durch die Kombination von digital-rektaler Untersuchung, PSA-Test, Tumorgrad der Biopsie und bildgebenden Verfahren nur indirekte Schlüsse auf das Erkrankungsausmaß zulässt, basiert das histopathologische Staging auf der direkten Untersuchung des Organpräparates nach Lymphadenektomie bzw. radikaler Prostatektomie. Die folgende Klassifikation gilt nur für das Adenokarzinom der Prostata.⁴¹

1.1.4.1.1 T-Kategorie

Die T-Kategorie wird in vier Stadien (T1-T4) unterteilt und beschreibt Größe und lokale Ausdehnung des Primärtumors:

TX	Beurteilung des Primärtumors nicht möglich
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
T1	Klinisch inapparenter Tumor, weder tast-, noch in bildgebenden Verfahren sichtbar
T1a	Zufallsbefund („incidental carcinoma“) in $\leq 5\%$ des Resektionsgutes
T1b	Zufallsbefund („incidental carcinoma“) in $> 5\%$ des Resektionsgutes
T1c	Feinnadelbiopsische Diagnose (z.B. wegen isolierter PSA-Erhöhung)
T2	Begrenzung auf die Prostata
T2a	Tumor in $\leq 50\%$ eines Seitenlappens
T2b	Tumor in $> 50\%$ eines Seitenlappens
T2c	Tumor in beiden Seitenlappen
T3	Tumor durchbricht die Prostatakapsel
T3a	Kapselüberschreitung (ein- oder beidseitig) ohne Befall der Samenblasen
T3b	Tumor infiltriert Samenblase(n)
T4	Tumor ist fixiert oder infiltriert andere Nachbarstrukturen als Samenblasen

1.1.4.1.2 N-Kategorie

Die N-Kategorie beschreibt das Ausmaß der Infiltration in benachbarte Lymphknoten:

NX	Beurteilung des regionären Lymphknotenstatus nicht möglich
N0	keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	regionäre Lymphknotenmetastase $\leq 2\text{cm}$ in solitärem Lymphknoten
N2	regionäre Lymphknotenmetastase(n) 2-5cm in solitärem oder multiplen Lymphknoten
N3	regionäre Lymphknotenmetastase(n) $> 5\text{cm}$ Durchmesser

Die lymphogene Metastasierung des Adenokarzinoms der Prostata erfolgt vornehmlich in die pelvinen und retroperitonealen Lymphknoten. Die Häufigkeit von Lymphknotenmetastasen nimmt mit höherem Tumorstadium, höheren PSA-Werten

sowie geringerem Differenzierungsgrad zu.⁴² Bei bis zu 12 Prozent aller Patienten mit organbegrenztem Prostatakarzinom lassen sich histologisch Lymphknotenmetastasen nachweisen.³³

1.1.4.1.3 M-Kategorie

Die M-Kategorie beschreibt das Ausmaß von Fernmetastasen.

MX	Beurteilung der Fernmetastasierung nicht möglich
M0	keine Fernmetastase(n)
M1	Fernmetastase(n)
M1a	Metastase(n) in nichtregionären Lymphknoten
M1b	Metastase(n) in Knochen
M1c	Metastase(n) anderer Lokalisation

Hämatogene Metastasen betreffen am häufigsten das Skelettsystem (Wirbelsäule, Femur und Beckenknochen; 90% der Knochenmetastasen sind vom osteoblastischen Typ), Lunge, Blase, Leber, Nebennieren und Hoden.⁴³

Einleitung

1.1.4.2 Grading

Durch mikroskopische Untersuchung des z.B. im Rahmen einer Biopsie entnommenen Prostatagewebes kann anhand des histomorphologischen Aufbaues der Grad der Zelldifferenzierung bestimmt werden. Je nach Ausmaß der Abweichung des Karzinomgewebes vom Erscheinungsbild eines „normalen“, ausdifferenzierten Zellverbundes unterscheidet man:

GX	Keine Aussage über die Differenzierung möglich
G1	Hochdifferenziert
G2	Mäßig differenziert
G3	Schlecht differenziert
G4	Völlig undifferenziert

Von den mittlerweile mehr als 40 beschriebenen Gradingssystemen hat sich die von Gleason erarbeitete Einteilung nach dem Differenzierungsgrad des Prostatakarzinoms in Forschung und täglicher Praxis weltweit durchgesetzt.^{44,45,46} Es zählt neben der TNM-Klassifikation und dem Status der Resektionsfläche zu den drei wichtigsten prognostischen Kriterien.

Das Grading nach Gleason berücksichtigt den histomorphologischen Aufbau des Tumors. Zytologische Merkmale der einzelnen Karzinomzellen bleiben dabei weitestgehend unbeachtet. Bei geringer (10- bis 40-facher) mikroskopischer Vergrößerung beurteilt der Untersucher das Muster der Drüsenarchitektur der HE-gefärbten Prostatagewebsschnitte. Das Erscheinungsbild der glandulären Strukturen wird, entsprechend der Abweichung zum ursprünglichen Differenzierungsmuster, einem der fünf Basisgrade zugeordnet. Hierbei entspricht Gleason 1 einem gut differenzierten, Gleason 5 einem wenig differenzierten Tumorareal (s. Abbildung 1).

- Grad 1:** hochdifferenziertes Adenokarzinom, das sich nur durch die gestörte Drüsenarchitektur von normalem Prostatagewebe unterscheidet
- Grad 2:** leicht verkleinerte Drüsen, die jedoch noch immer einen umschriebenen Herd bilden. Auflockerung des Drüsenverbandes mit Vergrößerung des Abstandes zwischen den einzelnen Drüsen. Bis auf kleine Nukleolen liegen keine zytologischen Atypien vor
- Grad 3:** mäßig differenziertes Adenokarzinom, das aus kleinen, sehr ungleichmäßig strukturierten Drüsen aufgebaut ist, die diffus das umgebende Gewebe infiltrieren. Die Tumorzellen zeigen deutliche nukleäre Atypien und große Nukleolen. Häufigstes Wachstumsmuster des Adenokarzinoms der Prostata
- Grad 4:** hochgradig undifferenziertes Wachstumsmuster. Das mikroskopische Bild wird bestimmt durch Fusion der kleinen Drüsen und durch das mikroazinäre, papilläre oder kribriforme Muster (sog. Drüse-in-Drüse-Muster)
- Grad 5:** anaplastisches Karzinom, das in soliden Strängen oder intraduktal komedoartig wächst. Nekrosen sind typischerweise zentral zu finden, umgeben von papillären, kribriformen oder soliden Tumorzellverbänden. Die Karzinomzellen sind polymorph, reich an Mitosen und besitzen oft ein basophiles Zytoplasma

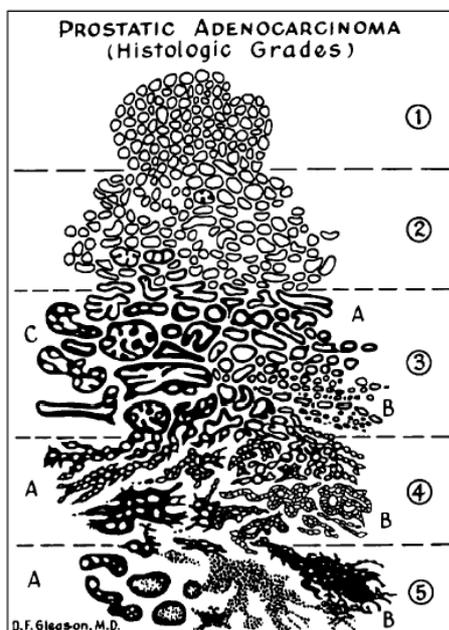


Abbildung 1:
Grading nach Gleason.

Sowohl Gleason 1- als auch Gleason 2-Tumore sind typische Karzinome der transitionalen Zone und werden meist zufällig im transurethralen Resektionsmaterial entdeckt.⁴³

Die fünf Basisgrade dienen der Generierung eines histologischen Summscores (Gleason-Score). Nach mikroskopischer Begutachtung des gesamten vorhandenen Prostatagewebes werden der im untersuchten Gewebe überwiegende sowie der zweithäufigste Differenzierungsgrad zum Gleason-Score addiert. Bei z.B. Vorliegen eines vornehmlich Gleason 4- sowie nachrangig Gleason 3-Anteilen enthaltenden Prostata-

karzinoms ergibt sich ein Gleason-Score von 7 (4+3). Zeigt das untersuchte Gewebe ein einheitliches histologisches Bild, so wird der vorliegende Gleasongrad mit 2 multipliziert.⁴⁷

Stellt man die so erhaltenen Gleason-Scores dem allgemeinen Grading-System der WHO gegenüber, ergibt sich folgende Eingruppierung:

Gleason-Score 2-4	↔	G1	↔	Hochdifferenziert
Gleason-Score 5-7	↔	G2	↔	Mäßig differenziert
Gleason-Score 8-10	↔	G3	↔	Schlecht differenziert

Einleitung

Prostatakarzinome mit einem Gleason-Score von 7 beinhalten einen hochgradig undifferenzierten Anteil und nehmen in Bezug auf ihre klinische Aggressivität eine Mittelstellung zwischen den Gruppen mit Gleason-Score 5-6 sowie 8-10 ein. Diese Tumore sollten daher in Studien mit geringen Fallzahlen nicht den mäßig differenzierten Prostatakarzinomen zugeordnet werden sondern als eigenständige Entität betrachtet werden.⁴⁷ Die Karzinome innerhalb derselben Gleason-Score-Gruppe zeigen ähnliche Krankheitsverläufe und Prognosen (s. Abschnitt 1.1.7).

1.1.5 Morphologie und Histologie

In 97% der Fälle handelt es sich bei einem Prostatamalignom um ein Adenokarzinom. Seinen Ausgang nimmt das Karzinom zumeist in den peripheren Drüsenanteilen, wobei alle vier Quadranten etwa in gleicher Häufigkeit betroffen sind. Der Tumor wächst meist multizentrisch, zunächst in der mittleren und äußeren Organzone, und kann ein Bild pluriformer Wachstumsmuster (glandulär, kribriform, solide) und Differenzierungsgrade (hoch- bzw. wenig differenziert) bieten. Sonderformen stellen das muzinöse Adenokarzinom, das neuroendokrine Karzinom, das kleinzellige, das duktales und das Plattenepithelkarzinom sowie das Karzinom der Transitionalzone dar. Das Adenokarzinom wird erst spät symptomatisch, wenn es im fortgeschrittenen Stadium den periurethralen Drüsenbereich infiltriert und zur Harnwegsobstruktion führt. Zeitlich unabhängig davon erfolgt die extraprostatatische Ausbreitung mit konsekutiver Infiltration der Samenblasen und des Harnblasenbodens. Makroskopisch erscheint das Tumorgewebe meist markig-gelblich und homogener als das umgebende Drüsengewebe.²¹

Bei Vorliegen dysplastischer Epithelien mit Zellpolymorphie und Nukleolenprominenz, aber strukturell normaler Drüsenazini und unversehrter Basalmembran, spricht man von einer prostatistischen intraepithelialen Neoplasie (PIN). Die PIN wird unterteilt in „low grade PIN“ (PIN 1), die oft nicht sicher von benignem Prostatagewebe unterschieden werden kann, sowie in die, vor allem in Prostatae mit Karzinom gehäuft zu findende, „high grade PIN“ (PIN 2 und 3).⁴⁸ Während erstere keinen pathologischen Befund darstellt und auch nicht mit einem höheren Karzinomrisiko bei

Re-Biopsien einhergeht, ist bei Vorhandensein einer „high grade PIN“ in bis zu 35 Prozent der nachfolgenden Prostatabiopsien auch ein Prostatakarzinom nachweisbar.^{21,49} Bei Vorliegen einer „high grade PIN“ ist daher eine erneute systematische Biopsieentnahme mit histologischer Untersuchung indiziert.

1.1.6 Therapie

Die Wahl der Therapieoptionen richtet sich nach dem Stadium und den Prognosefaktoren des Prostatakarzinoms sowie nach der verbleibenden Lebenserwartung des Patienten und dessen Komorbiditäten.⁵⁰ Eine Entscheidungshilfe im klinischen Alltag bieten die sogenannten Partin-Tabellen. Diese - auf großen Fallzahlen basierenden Nomogramme - ermöglichen unter Berücksichtigung des präoperativen Stagings, des PSA-Wertes sowie der Ergebnisse des histologischen Gradings nach Gleason, eine wahrscheinlichkeitsbasierende Aussage über das nach radikaler Prostatektomie histopathologisch vorliegende Tumorstadium.⁵¹ Auf Basis dieser Informationen kann dann im Konsens mit dem Patienten und unter Berücksichtigung oben genannter Kriterien eine individualisierte Therapie eingeleitet werden.

Für das klinisch lokal begrenzte Prostatakarzinom (T1b-T3a, N0, M0) gilt die radikale Prostatektomie (meist mit pelviner Lymphadenektomie) als Therapie der Wahl. Diese kann sowohl retropubisch als auch perineal erfolgen. Eine wichtige Voraussetzung für die Indikationsstellung zur radikalen Prostatektomie ist die mutmaßliche mittlere Lebenserwartung des Patienten. Ein 70-jähriger Mann mit einem frühzeitig entdeckten, gut differenzierten und lokalisierten Prostatakarzinom hat ohne radikale Prostatektomie ein Risiko von 10%, innerhalb von 10 Jahren an seinem Tumor, aber ein Risiko von 50% an einer anderen Ursache als dem Prostatakarzinom zu versterben.

Häufig kann im Stadium T1a bei regelmäßiger Nachbeobachtung auf eine weitere Behandlung verzichtet werden („watchful waiting“). Lediglich bei jungen Männern wird auch hier die radikale Prostatektomie empfohlen, da nach etwa 10 Jahren in bis zu 20 Prozent der Fälle mit einer Tumorprogression zu rechnen ist.

Einleitung

Eine therapeutische Alternative zur radikalen Prostatektomie bietet die Strahlenbehandlung in Form der externen Hochvolt-Radiotherapie bzw. der interstitiellen Strahlentherapie. Während die externe Bestrahlung mit Gesamtdosen von 62 bis 74 Gy fraktioniert (1,8-2,0 Gy/Tag) als Mehrfeldbestrahlung durchgeführt wird, werden bei der interstitiellen Strahlentherapie zwei verschiedene Vorgehensweisen unterschieden. Bei der „low-dose-rate“ Brachytherapie werden ultraschallgesteuert radioaktive Strahler (Jod, Palladium) mit sehr kurzer Reichweite, sogenannte „Seeds“, direkt zum Verbleib in die Prostata eingebracht. Die „high-dose-rate“ Afterloading-Behandlung beinhaltet das temporäre Einbringen einer radioaktiven Iridium-Quelle über perineal in der Prostata platzierte Hohlnadeln. Zusätzlich kann („low-dose-rate“) bzw. muss („high-dose-rate“) bei den genannten Verfahren der interstitiellen Strahlentherapie eine perkutane Aufsättigung des Tumoreals durch externe Bestrahlung erfolgen.

Therapie der Wahl des operativ nicht kurablen fortgeschrittenen und metastasierten Prostatakarzinoms (T3b-4, N1-3; M1) ist die palliative antiandrogene Therapie. Die meisten Prostatakarzinome sind klinisch primär hormonsensitiv und reagieren dementsprechend unter Hormonentzug mit einer Wachstumsverlangsamung. Etwa 80 Prozent der Patienten mit metastasiertem Prostatakarzinom zeigen eine klinische Remission mit einer Dauer von mehreren Jahren, die von einem erneuten Wachstum der dann hormonrefraktären Prostatazellklone gefolgt wird. Insgesamt liegen die 5-Jahres-Überlebensraten der Patienten mit dieser Therapie bei bestenfalls 50 Prozent.

Die antiandrogene Wirkung kann herbeigeführt werden durch:

- bilaterale subkapsuläre bzw. radikale Orchiektomie
- Gabe von LH-RH-Agonisten (Gn-RH)
- Gabe von steroidalen und nichtsteroidalen Antiandrogenern (Cyproteronacetat, Flutamid)

Etwa 10 bis 20 Prozent der Prostatakarzinome sprechen jedoch auf eine Hormontherapie initial nicht oder nur kaum an. Hier kann in palliativer Intention eine zytostatische Chemotherapie versucht werden. Als Standardtherapeutikum

hormonrefraktärer Prostatakarzinome findet derzeit Docetaxel, ein zytotoxisches Agens aus der Taxoidfamilie, Anwendung. Docetaxel induziert in den Krebszellen über p53-unabhängige Mechanismen die Einleitung der Apoptose. Folge ist eine Verlängerung des progressionsfreien Überlebens und der Gesamtüberlebenszeit.⁵² Klinisch profitiert der Patient vor allem von einer Reduktion der Schmerzen und einem Zugewinn an Lebensqualität.⁵³ Alternativ kann - besonders bei polymorbiden Patienten - eine alleinige Analgetikatherapie erwogen werden. Lokale Knochenmetastasen zeigen unter fokaler Bestrahlung meist klinische Besserung.⁵⁰ In Zukunft könnten weitere Chemotherapeutika wie beispielsweise Anti-Angiogenetika, Endothelin-Rezeptor-Antagonisten oder monoklonale Antikörper das Therapiespektrum des fortgeschrittenen Prostatakarzinoms erweitern. Diese bedürfen jedoch zurzeit noch weiterer klinischer Evaluation.⁵⁴

1.1.7 Prognose

Die Prognose des Prostatakarzinoms korreliert direkt mit dem Ausmaß der Erkrankung und ist im Vergleich zu anderen Malignomerkrankungen mit einem diagnosebezogenen Fünfjahresüberleben von mehr als 90 Prozent sehr günstig. 92% der betroffenen Patienten überleben trotz ihrer Erkrankung wenigstens 10 Jahre, nach 15 Jahren sind noch 61% der Patienten mit Prostatakarzinom am Leben.^{33,55} Schreitet die Erkrankung fort, so spricht man von Progression. Diese kann sich auf zwei unterschiedliche Arten manifestieren. Die biochemische Progression ist nach radikaler Prostatektomie als Anstieg des PSA-Wertes über die Nachweisgrenze definiert. Die klinische Progression macht sich durch das Auftreten von Metastasen oder Symptomen eines Lokalrezidivs bemerkbar und wird fast immer von einem PSA-Anstieg begleitet.

Faktoren, die eine Aussage über den Krankheitsverlauf bei Patienten mit Prostatakarzinom ermöglichen, werden zwei verschiedenen Gruppen zugeordnet. *Prognostische Faktoren* ermöglichen dabei die Voraussage eines Rezidivs bzw. der Progression der Tumorerkrankung. *Prädiktive Faktoren* hingegen sagen etwas aus über das Ansprechen bzw. Nichtansprechen einer spezifischen Therapie. Für das Prostatakarzinom existieren bislang noch keine prädiktiven Faktoren. Während

Einleitung

beispielsweise für das Mammakarzinom der Hormonrezeptorstatus als Orientierung für das wahrscheinliche Ansprechen auf eine Therapie mit dem Antiöstrogen Tamoxifen gilt, gibt der Androgenrezeptorstatus bei Patienten mit Prostatakarzinom keine Auskunft über die Wahrscheinlichkeit des Ansprechens einer antiandrogenen Hormontherapie.⁴⁷

Im Gegensatz dazu sind mittlerweile eine Reihe prognostischer Faktoren bekannt. Diese werden, einer Empfehlung des College of American Pathologists (CAP) und der Weltgesundheitsorganisation WHO folgend, entsprechend ihrer durch Studien belegten Validität in drei Kategorien eingeteilt. Für Prognostikatoren der Kategorie I ist die prognostische Bedeutung bereits hinreichend bewiesen. Faktoren der Kategorie II ermangeln, trotz ausführlicher biologischer und klinischer Forschung, des Zuverlässigkeitsnachweises durch valide Studienergebnisse. Kategorie III schließlich enthält Faktoren, für deren prognostischen Nutzen trotz intensiver Forschung bislang keine ausreichenden Beweise vorliegen:⁵⁶

Kategorie I	TNM-Stadium Status der Resektionsränder Histologische Differenzierung (Grading nach Gleason) PSA-Wert
Kategorie II	Tumorzvolumen im Biopsiegut Tumorzvolumen im Operationspräparat Histologischer Subtyp DNA-Ploidie
Kategorie III	Perineurale Infiltration Lymphatische Mikrometastasen Neuroendokrine Differenzierung Neoangiogenetische Dichte Chromatintextur, karyometrische Parameter Proliferationsmarker

Als Prognostikatoren für das Prostatakarzinom werden alle Faktoren der Kategorie I sowie das Tumorzvolumen aus Kategorie II empfohlen.⁴⁷ Neben der Prognoseabschätzung dienen diese vor allem auch der Therapieempfehlung für das lokalisierte Prostatakarzinom.

Nachfolgend werden die wichtigsten Prognostikatoren des pathologischen Stagings für Patienten mit Zustand nach radikaler Prostatektomie sowie deren Bedeutung für die Progression des Prostatakarzinoms beschrieben.

Tumorstadium: Das Ergebnis des pathologischen Stagings gilt als zuverlässiger Parameter für die Prognose des Prostatakarzinoms bei Patienten mit lokalisierter Erkrankung. Wesentlich für die Prognose ist hierbei die lokale Ausbreitung des Karzinoms. Bei organbegrenzten Tumoren (pT1-2) tritt bei weniger als 20 Prozent der Patienten innerhalb der ersten 10 Jahre nach radikaler Prostatektomie ein PSA-Anstieg als Progressionshinweis auf. Ungünstig auf den Krankheitsverlauf wirken sich organüberschreitendes Wachstum (\geq pT3), Infiltration der Samenblasen (pT3b) sowie insbesondere der Befall pelviner Lymphknoten (pN1-3) aus. Eine kurative Therapie ist hier häufig nicht mehr möglich. Während bei alleiniger Infiltration der Samenblasen 10 Jahre nach Operation noch 25% der Patienten biochemisch progressionsfrei sind, steigt die Progressionsrate bei Vorliegen von Lymphknotenmetastasen in diesem Zeitraum auf nahezu 100 Prozent an.⁴⁹ Bei Heranreichen der Tumorausdehnung an die Resektionsränder bei radikaler Prostatektomie ist die Wahrscheinlichkeit eines Lokalrezidivs höher als bei blanden Schnitträndern.³³ Trotzdem ist nur bei etwa jedem zweiten Patienten mit positiven Resektionsrändern 10 Jahre nach der Operation ein Krankheitsprogress nachweisbar.⁵⁷

Histologische Differenzierung: Aus prognostischer Sicht kann der Gleason-Score in drei Gruppen mit differierendem Krankheitsverlauf und unterschiedlicher Prognose unterteilt werden. Prostatakarzinome mit den Summenscores 2-4, 5-7 bzw. 8-10 entsprechen dabei im WHO-Grading hochdifferenzierten, mäßig differenzierten bzw. schlecht differenzierten Karzinomen (s. Abschnitt 1.1.4.2). Der Anteil progressionsfreier Patienten nimmt mit steigendem Gleason-Score ab. Epstein et al. zeigten, dass in der Gruppe der Karzinome mit Summenscores 2-4 alle ihre Patienten fünf Jahre nach radikaler Prostatektomie biochemisch progressionsfrei waren, nach 10 Jahren traf dies immerhin noch für 96% der Patienten zu. Für Männer mit schlecht differenzierten Karzinomen (Gleason-Scores 8-10) bestand hingegen von allen drei untersuchten Gruppen die deutlich schlechteste Prognose: bei 43% der Patienten war bereits innerhalb der ersten fünf Jahre nach Prostatektomie ein PSA-Anstieg nachweisbar. Nach 10 Jahren war der Anteil der

Einleitung

betroffenen Patienten sogar auf 66% angestiegen. Als wichtigster Prognosefaktor in dieser Gruppe war dabei der Lymphknotenstatus anzusehen.

Eine Mittelstellung in Bezug auf die Prognose nehmen die mäßig differenzierten Tumore (Gleason-Scores 5-7) ein – innerhalb der inhomogenen Gruppe sind, je nach extraprostatischer Ausdehnung und Status der Schnittränder, unterschiedliche Krankheitsverläufe zu verzeichnen.⁴⁹ Die Anwesenheit eines „high-grade“-Karzinomanteils (Gleason-Grad 4 oder 5) birgt ein großes Risiko für den Patienten und kann die Aussicht auf Heilung drastisch reduzieren. Da bei Karzinomen mit Gleason-Score 7 zumindest die zweithäufigste Differenzierung immer einer histologischen Differenzierung von mindestens Gleason-Grad 4 entsprechen muss, lässt sich so deren prognostische Mittelstellung zwischen Karzinomen mit Gleason-Score 2-6 und Gleason-Score 8-10 erklären. Selbst innerhalb der Gleason-Score 7-Karzinome ist die Prognose von den vorherrschenden Differenzierungsgraden abhängig: So besitzt ein Karzinom mit überwiegend Grad 4-Anteilen (4+3) eine schlechtere Prognose als ein Karzinom mit primärer Grad 3-Differenzierung (3+4).⁴⁷ Fünf Jahre nach Operation zeigen 25% der Gleason 7-Tumore, jedoch nur 3% der Gleason 5-6-Tumore PSA-Erhöhungen im Blutserum.⁴⁹

Prostata-spezifisches Antigen: Die präoperative PSA-Konzentration im Serum steht in enger Korrelation mit dem pathologischen Tumorstadium und dem Tumolvolumen und somit auch mit dem Krankheitsverlauf.³² In einer Studie mit 955 Patienten konnten Partin et al. eine deutliche Verschlechterung der Prognose bei Patienten mit einem präoperativ hohen PSA-Spiegel (>10ng/ml) gegenüber solchen mit niedrigen PSA-Werten nachweisen. Auch zeigte kein Patient während des Beobachtungszeitraumes eine Progression der Erkrankung ohne damit einhergehenden messbaren PSA-Anstieg. Bei Wiederauftreten detektierbarer PSA-Werte bei Patienten innerhalb des ersten postoperativen Jahres nach radikaler Prostatektomie war das Progressionsrisiko für diese höher als für Männer mit PSA-Anstieg im zweiten oder dritten Jahr nach der Operation. Die Autoren folgerten daraus, dass dem Serum-PSA nach radikaler Prostatektomie die Rolle eines progressionsanzeigenden und damit prognostischen Markers zukommt.⁵⁸

1.2 Karzinogenese des Prostatakarzinoms

1.2.1 Hereditäre und sporadische Formen

Unter epidemiologischem Aspekt kann das Prostatakarzinom in eine hereditäre und eine sporadische Form unterteilt werden.⁵⁹ Hereditäre Prostatakarzinome unterscheiden sich von den sporadischen vor allem durch ihr in jüngeren Jahren und familiär gehäuftes Auftreten.⁸ Eine Unterscheidung der beiden Formen auf molekularer Basis ist zurzeit jedoch noch nicht möglich. Neben Mutationen können auch Polymorphismen in verschiedenen Genen auftreten, die sowohl in familiären als auch sporadischen Karzinomen zu finden sind. Da das Prostatakarzinom eine häufig vorkommende Erkrankung darstellt und seit Beginn der PSA-Ära eine Vorverlegung des Diagnosezeitpunkts zunehmend in jüngere Lebensalter feststellbar ist, ist eine Unterscheidung zwischen verstärktem Auftreten sporadischer Prostatakarzinome in einer Familie und hereditären Erkrankungen im eigentlichen Sinne schwieriger geworden.²⁴

Zwischen 5 und 10 Prozent aller Prostatakarzinome und bis zu 40 Prozent der in jüngeren Lebensjahren auftretenden Erkrankungen enthalten wahrscheinlich eine erbliche Komponente. Die Diagnose wird bei betroffenen Patienten durchschnittlich 6-7 Lebensjahre früher gestellt als bei Patienten mit sporadischem Prostatakarzinom.^{8,60} In Zwillingsstudien konnte gezeigt werden, dass die Konkordanzraten für das Prostatakarzinom bei eineiigen Zwillingen signifikant höher lagen als bei zweieiigen Zwillingen.^{61,62} Jedoch wurden bislang keine hoch penetranten erblichen Genveränderungen identifiziert. Anders als z.B. bei der Familiären adenomatösen Polyposis (FAP), wo die autosomal-dominante Vererbung auf die Mutation eines einzelnen, des APC-Tumorsuppressorgens, oder wenigen Genen auf Chromosom 5q21 der Entwicklung einer obligaten Präkanzerose des Kolonkarzinoms zugrunde liegt, sind bei den erblichen Formen des Prostatakarzinoms vermutlich mehrere verschiedene Gene mit unterschiedlicher Gewichtung an der Karzinogenese beteiligt.⁶³ Analysen in Familien mit gehäuften frühen Fällen von Prostatakarzinomen rückten eine Reihe potentiell empfänglicher

Einleitung

Genorte in den Fokus, deren Alteration eine Rolle in der Karzinogenese spielen könnte.^{60,64,65,66,67,68,69,70,71,72}

Gen	Genlocus
HPC1	1q24-25
RNASEL	1q25
PCAP	1q42.2-43
CAPB	1p36
NBS1	8q21

Gen	Genlocus
16q23	16q23
HPC2/ELAC2	17p11
HPC20	20q13
CHEK2	22q12.1
HPCX	Xq27-28

Alle genannten Genloci waren zwischen den untersuchten Populationen in unterschiedlichen Anteilen vertreten. Zudem wurden Veränderungen in diesen Genloci auch in sporadischen Prostatakarzinomen gefunden.^{73,74} Ihre Bedeutung für die Karzinogenese ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch weitgehend unklar. Das Vorliegen hoch penetranter Gene sowie deren obligate Beteiligung an der Kanzerogenese ist zurzeit zumindest fraglich.

Mehr als 90 Prozent aller Prostatakarzinome treten vermutlich sporadisch auf. Eine Vielzahl von Studien hat sich bislang mit der Frage nach den zugrunde liegenden Ursachen beschäftigt und Veränderungen in diversen chromosomalen Regionen im Genom von Männern mit Prostatakarzinom identifiziert. Während Prostatakarzinome in frühen Stadien oftmals noch euploid bleiben, treten in fortgeschrittenen Tumorstadien gehäuft numerische und strukturelle chromosomale Alterationen auf. Dabei dominieren Deletionen chromosomaler Abschnitte, während Insertionen und Vervielfältigungen von Genomsegmenten vornehmlich in fortgeschrittenen, hormonrefraktären Tumoren auftreten. Betroffen sind, in absteigender Häufigkeit, vor allem die Autosomen 8, 13, 7, 10, 16, 6 und 17 sowie Veränderungen in Regionen des X- bzw. Y-Chromosoms.⁷⁵ Die chromosomalen Veränderungen wirken dabei unter anderem über den Verlust von Tumorsuppressorgenen, die Aktivierung von Onkogenen sowie durch mutationsbedingte Gendefekte oder die Regulation von Gen-Expressionslevel, wie Veränderungen im DNA-Reparatursystem bzw. Spindelcheckpoint-Apparat, kanzerogen.^{76,77,78,79,80}

1.2.2 Kanzerogenesefördernde Mechanismen

Der klinische Verlauf des Prostatakarzinoms zeigt eine große Variabilität. Manche Prostatakarzinome bleiben ein Leben lang klinisch stumm, wohingegen andere einen aggressiven Verlauf nehmen, lokal in Blase, Rektum oder Samenblasen eindringen, Metastasen in Lymphknoten, Knochen oder anderen Organsystemen bilden - bis hin zum karzinombedingten Tod des Patienten. Die molekularen Ursachen der Initiation des histologisch nachweisbaren Prostatakarzinoms sowie die Mechanismen, die zu einer Progression des Malignoms hin zu einem invasiv wachsenden Prostatakarzinom führen, sind schon seit geraumer Zeit Gegenstand intensiver Forschung. Wenngleich die genauen Vorgänge bei der Initiation eines Prostatakarzinoms noch nicht bekannt sind, gibt es doch Hinweise darauf, dass sowohl genetische Veränderungen als auch Umwelteinflüsse eine entscheidende Rolle in der multifaktoriellen Krankheitsentstehung spielen. Mit zunehmendem Verständnis für die verschiedenen Einzelschritte der Karzinogenese erhofft man sich neue Ansatzpunkte für eine individualisierte Therapie, eindeutiger Unterscheidungsmöglichkeiten zwischen langsam wachsenden und aggressiven Karzinomen und nicht zuletzt wirksame Strategien für die Prävention der Karzinomentstehung. Eine Übersicht über einen Großteil der mit der Initiation und Progression des Prostatakarzinoms in Verbindung gebrachten Mechanismen gibt Abbildung 2.

Einleitung

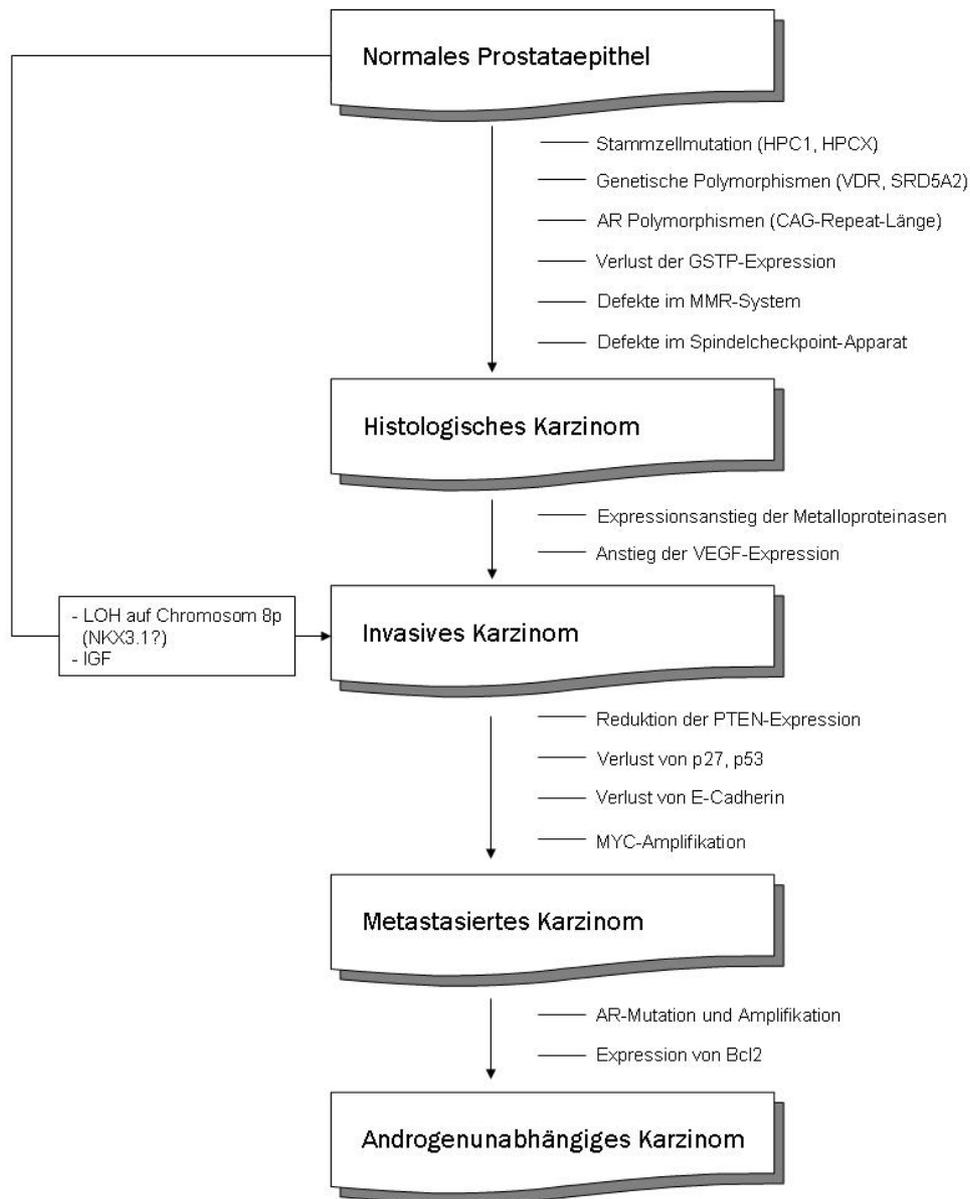


Abbildung 2: Übersicht über potentiell beteiligte Mechanismen in der Initiation und Progression des Prostatakarzinoms.

1.2.2.1 Verlust von Tumorsuppressor-Genen

Die zunächst von Knudson et al. formulierte Hypothese, der Verlust der karzinomsuppressiven Wirkung resultiere aus dem Funktionsverlust beider Allele infolge von Mutation oder Deletion („Two-Hit-Hypothese“) wurde mittlerweile unter

Berücksichtigung epigenetischer Modifikationsmechanismen abgewandelt: der Funktionsverlust des entsprechenden Gens werde folglich nicht nur durch Mutation oder Deletion hervorgerufen, sondern sei auch durch epigenetische Veränderungen (z.B. Methylierung des Promotors) oder Beeinträchtigung der biologischen Funktion des Proteinprodukts möglich.^{81,82} Die Existenz solcher, auch für die Kanzerogenese in der Prostata relevanter Tumorsuppressor-Gene, gilt nach Ergebnissen vergleichender genomischer Hybridisierungsstudien und Untersuchungen des Verlustes spezifischer chromosomaler Regionen („Loss of heterozygosity“: LOH) als wahrscheinlich.¹ Eine Reihe potentieller Tumorsuppressor-Areale wurde beschrieben. Die am häufigsten involvierte Region, in der bei nicht weniger als 70 Prozent der Prostatakarzinome Deletionen zu finden waren, liegt auf Chromosom 8p.⁸³ Einen Verlust des kurzen Arms dieses Chromosoms fanden Cher et al. bei ca. 80 Prozent der metastasierten Prostatakarzinome.⁸⁴ Ein möglicherweise involviertes Gen aus dieser Region ist das androgenregulierte und prostataspezifische Gen Nkx3.1 auf Chromosom 8p21, welches durch seine antioxidative Funktion zur Zellprotektion beiträgt.^{85,86} Inaktivierung des Gens im Mausmodell führte zu Störungen in der Prostatareifung und Organfunktion, mit zunehmendem Alter der Tiere zur Entwicklung hyper- und dysplastischer Veränderungen.^{87,88} Eine der häufigsten genomischen Alterationen in Prostatakarzinomen betrifft das Glutathion-S-Transferase-Gen GSTP. Hypermethylierung in der Promotorregion des Gens führt in Prostatakarzinomzellen zu dessen Inaktivierung.⁸⁹ Lee et al. wiesen in allen von ihnen untersuchten Fällen von Prostatakarzinomen und prostatischer intraepithelialer Neoplasie (PIN) den Verlust der GSTP-Expression durch Hypermethylierung in der Promotorregion nach.⁹⁰ Der Verlust der zellprotektiven GSTP-Expression, einhergehend mit einer erhöhten Anfälligkeit der Prostatazellen gegenüber freien Radikalen, ist vermutlich eines der initiierenden Ereignisse in der Karzinogenese.

Im Zusammenhang mit der Entwicklung der organüberschreitenden Progression des Prostatakarzinoms stehen auch Veränderungen der Tumorsuppressor-Gene PTEN und p27. Mutationen oder Deletionen im Tumorsuppressor-Gen PTEN sind für verschiedene menschliche Malignome bekannt.⁹¹ Der Genomabschnitt auf Chromosom 10q23, der für eine Lipid- und Proteinphosphorylase kodiert, ist häufiges

Einleitung

Ziel somatischer Veränderungen während der Karzinomprogression in der Prostata.⁹² PTEN lässt sich in der Regel sowohl in normalem Prostatagewebe als auch in PINs nachweisen. In manifesten Prostatakarzinomen sind die PTEN-Konzentrationen vor allem bei höheren Tumorstadien und Karzinomen mit geringer Differenzierung oftmals reduziert.⁹³ Etwa die Hälfte der lokal fortgeschrittenen Tumore enthalten Mutationen oder Basendeletionen in diesem Gen.⁹⁴ In einer Studie von Kibel et al. präsentierten 47% der Patienten mit metastasiertem Prostatakarzinom einen Verlust der Heterozygotie (LOH) auf dem p27 enthaltenden Chromosom 12p12.⁹⁵ Niedrige Expressionslevel dieses Gens, welches an der Steuerung des Zellzyklus beteiligt ist, sind mit einem deutlich verschlechterten klinischen Outcome assoziiert.⁹⁶ Im Tiermodell entwickelten Mäuse mit reduzierten p27- und PTEN-Expressionsleveln darüber hinaus hohe Inzidenzen für das Prostatakarzinom.⁹⁷ Die den Zellzyklus regulierenden Gene Rb1 und p53 sind in verschiedenen Organen an der Tumorgenese beteiligt. Dies gilt auch in der Prostata. Dem Retinoblastomgen Rb1 kommt wahrscheinlich eine Rolle in der frühen Karzinogenese des Prostatakarzinoms zu. Phillips et al. fanden in 60% der untersuchten Fälle den Verlust des entsprechenden Genabschnittes auf Chromosom 13q14, vor allem in Karzinomen geringer lokaler Ausbreitung und hoher Differenzierung.⁹⁸ Eine der häufigsten genetischen Veränderungen in menschlichen Malignomen betrifft das Tumorsuppressor-Gen p53, jedoch ist die Mutationsrate in Prostatakarzinomen vergleichsweise gering. Der Verlust des Gens auf Chromosom 17p führt zu unkontrollierter Zellproliferation und Beeinträchtigung der Apoptose und ist vor allem in lokal fortgeschrittenen und metastasierten Tumoren zu finden.⁹⁹ Ein Zusammenhang des p53-Verlustes mit dem gehäuftem Auftreten von Knochenmetastasen und der Entwicklung hormonrefraktärer Prostatakarzinome ist ebenso beschrieben wie die Korrelation abnormer p53-Expression mit fortgeschrittenen Tumorstadien, geringer Differenzierung und klinischer Progression.¹⁰⁰

1.2.2.2 Aktivierung von Onkogenen

Änderungen der Expressionslevel verschiedener Onkogene spielen vor allem in der Progression und Metastasierung des Prostatakarzinoms eine wichtige Rolle. Am besten untersucht sind hierbei bislang c-MYC und bcl2. Eine Überexpression des MYC-Onkogens findet sich regelmäßig in lokal fortgeschrittenen und metastasierten Karzinomen der Prostata und geht meist mit einer Erhöhung der chromosomalen Kopienzahl des Gens oder gesteigerter Amplifikation auf Chromosom 8q24 einher.¹⁰¹ MYC-Proteine beeinflussen als Transkriptionsaktivatoren die Zellproliferation und Differenzierung und wirken im Zusammenspiel mit anderen Onkogenen im Mausmodell kanzerogen.¹⁰² Im Menschen korreliert die MYC-Überexpression mit dem Gleason-Grad und ist in Hinblick auf die systemische Progression sowie die karzinombedingte Sterblichkeit in fortgeschrittenen Prostatakarzinomen von prädiktivem Wert.^{103,104} Gene der bcl2-Familie wirken in den Zellen antiapoptotisch. Im normalen Prostataepithel wird bcl2 von den Basalzellen exprimiert. Eine Überexpression des Onkogens findet sich in einem großen Anteil der Prostatakarzinome, insbesondere in androgenunabhängigen Spezies.¹⁰⁵ Durch Inhibition der bcl2-Aktivität konnte experimentell die bcl2-Expression reduziert und die androgenabhängige Progression des Prostatakarzinoms verzögert werden.¹⁰⁶ Weitere beteiligte Onkogene, beispielsweise c-Kit, STAT5, PSCA oder EIF3-p40, wurden bereits identifiziert. Ihr Stellenwert in dem komplexen Gebilde der Karzinogenese des Prostatakarzinoms ist jedoch noch weitgehend unklar.

Einleitung

1.3 Defekte in spezifischen zellulären Reparatur- und Überwachungssystemen

Das DNA-Mismatch-Repair-System sowie der Spindelcheckpoint stellen spezifische Reparatur- bzw. Überwachungssysteme der Zellen dar. Defekte in diesen Systemen können nachweislich zur malignen Entartung der betroffenen Gewebe beitragen.

1.3.1 Das DNA-Mismatch-Repair-System (MMR)

Die Mehrzahl menschlicher Malignome entsteht durch die Akkumulation von Mutationsereignissen, vorrangig in Genen, die Zellwachstum und Zellproliferation kontrollieren. Doch längst nicht jede im Genom einer Zelle stattgefundene Mutation muss dieser als dauerhafte Erbgutänderung erhalten bleiben. Um die Anzahl der genomverändernden Mutationen möglichst gering zu halten, verfügen Zellen über spezielle Reparatursysteme. Eines der bislang am besten untersuchten DNA-Reparatursysteme in Pro- und Eukaryonten ist dabei das „Mismatch-Repair“-System (MMR). MMR-Proteine zeichnen in erster Linie verantwortlich für das Beheben von Basenfehlpaarungen, die während der mitotischen DNA-Replikation entstehen, können aber ebenso chemisch oder physikalisch entstandene DNA-Schäden erkennen und reparieren.^{107,108,109,110} Darüber hinaus übernehmen sie auch Kontrollfunktionen über genetische Rekombinationsvorgänge in der Meiose und tragen über die Induktion von Checkpoints (wahrscheinlich über ATM) zur Eliminierung von fehlerbehafteten Zellen bei.^{111,112,113} Durch die Aktivität des MMR-Systems erhöht sich die Genauigkeit der Replikation einer Zelle um den Faktor 100 bis 1.000 auf eine allgemeine Mutationsrate von nur einem Fehler pro 10^9 neusynthetisierter Nukleotide.¹¹⁴ Durch Detektion und Ausbesserung von Mutationen leistet ein funktionsfähiges MMR-System somit in jeder Zelle einen wichtigen Beitrag für die Wahrung der genomischen Stabilität.

Ursprünglich wurde das MMR-System in *Escherichia Coli* entdeckt.¹¹⁵ Die postreplikative Erkennung und Korrektur fehlgepaarter Basenpaare erfordert in den Prokaryonten das Zusammenspiel mehrerer MMR-Genprodukte, die als mutS, mutL und mutH bekannt sind.^{116,117} Basierend auf den Erkenntnissen des mutSLH-Systems konnte auch in eukaryonten Zellen ein ebensolches MMR-Reparatursystem

beschrieben werden. Homologe Proteine der bakteriellen mutS (MSH2, MSH3, MSH6) bzw. mutL (MLH1, PMS2, PMS1, MLH3) mit weitgehend konservierter Funktion wurden identifiziert.^{110,118,119,120} Im Gegensatz zu den bakteriellen mutS und mutL, bilden die MMR-Proteine in Eukaryonten dabei stets funktionelle Heterodimere (schematischer Ablauf der MMR-Schritte in Abbildung 3).

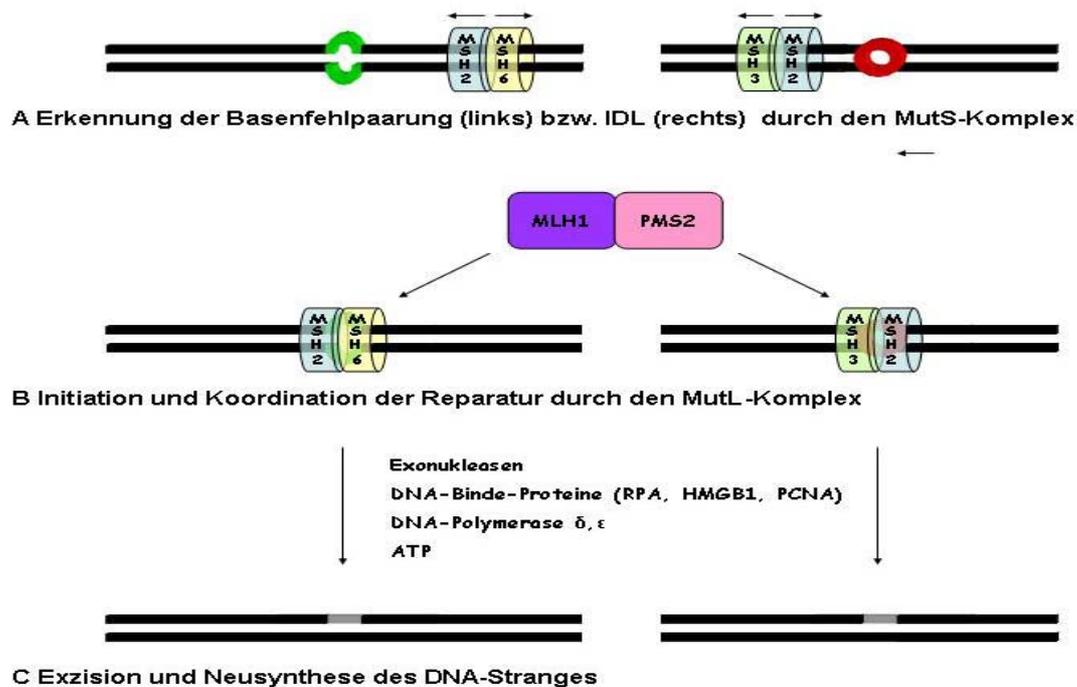


Abbildung 3: Übersicht der Mismatch-Repair-Schritte in Eukaryonten.

Im Rahmen der postreplikativen Mismatch-Reparatur formt das MSH2-Protein zunächst mit MSH6 oder MSH3 einen Komplex, welcher der Erkennung einer Fehlpaarung dient und zur Initiation des Reparaturvorganges führt.¹²¹ Während das in den Zellen überwiegend vorliegende Heterodimer MSH2/MSH6 (MutS α -Komplex) hauptsächlich für die Erkennung von einzelnen Basenfehlpaarungen und kleineren Insertions-Deletions-Loops (IDL) zuständig ist, bindet MSH2/MSH3 (MutS β -Komplex) bevorzugt an größere IDLs.¹²² Ein aus MLH1 und PMS2 (MutL α) bzw. in wesentlich geringerem Maße PMS1 (MutL β) gebildetes Heterodimer koordiniert im weiteren Verlauf das Zusammenspiel des MutS-Erkennungs-Komplexes mit anderen Proteinen (Exonuklease 1, PCNA, RPA, DNA-Polymerasen), die für die Exzision des fehlergepaarten Genomabschnittes und eine konsekutive Neusynthese des DNA-Stranges notwendig sind.

Einleitung

1.3.1.1 Funktionsdefizienz des MMR-Systems und Karzinogenese

Defekte in DNA-Reparaturmechanismen tragen zur malignen Transformation einer gesunden menschlichen Zelle bei.¹²³ Der Verlust der MMR-Funktion kann dabei über die Akkumulation von Replikationsfehlern zu bleibenden Mutationen in kanzerogenese-fördernden Genomabschnitten und zu genetischer Instabilität führen. Der Verlust der MMR-Funktion muss dabei nicht zwingend Folge einer Mutation in einem der beteiligten Gene sein. Auch Hypermethylierungen in der Promotorregion von z.B. MLH1 können die MMR-Effizienz vermindern und so das Transformationsrisiko einer Zelle erhöhen.¹²⁴ Folge der MMR-Funktionsdefizienz ist die erleichterte Initiation und beschleunigte Progression eines Malignoms.^{123,125}

Keimbahnmutationen in den MMR-Genen sind unter anderem die genetische Ursache für den hereditären nicht-polypösen Kolonkrebs (HNPCC).^{118,119,120,126,127} Das vererbte Krebs-Prädispositionssyndrom ist für bis zu 15 Prozent aller kolorektalen Karzinome verantwortlich und kann außerdem mit Malignomen des sogenannten HNPCC-Spektrums in Endometrium, Magen, Dünndarm oder Ovarien assoziiert sein.^{128,129,130} In jeder Zelle eines HNPCC-Patienten ist bereits auf einem Allel eines MMR-Gens eine Keimbahnmutation zu finden. Am häufigsten von Mutationen betroffen sind dabei die Schlüsselgene MLH1 und MSH2, mit ca. 50 bzw. 40 Prozent aller bisher bekannten Mutationen.¹³¹ Kommt es im Laufe des Lebens nun auch zum Funktionsverlust des zweiten Allels (z.B. durch LOH oder eine somatische Mutation), so wird die Zelle MMR-defizient.¹³² Die Mutationen führen zumeist über einen verfrühten Abbruch der Translation zum Funktionsverlust des betroffenen Proteins mit resultierender MMR-Defizienz der Zelle. HNPCC-Tumore sind in der Folge gekennzeichnet durch eine erhöhte Mutationsrate und die Akkumulation von Replikationsfehlern in rasch proliferierenden Zellen. Die Tumorentwicklung ist in diesen Karzinomen durch eine Erhöhung der Mutationsfrequenz im Vergleich mit sporadischen Kolonkarzinomen deutlich beschleunigt.

Besonders häufig sind die Mutationen dabei in repetitiven Sequenzen wie den DNA-Mikrosatelliten zu finden. Mikrosatelliten bestehen aus meist kurzen (CA)_n-Repeats interindividuell variabler Länge. Ihre Funktion ist unbekannt. (CA)_n-Sequenzen und andere einfache repetitive DNA-Abschnitte neigen zu Basenfehlpaarung und sind während der DNA-Replikation besonders anfällig für

Insertions- und Deletionsmutationen.^{133,134} In Zellen mit intaktem MMR-System werden Replikationsfehler normalerweise mit großer Genauigkeit korrigiert und zeigen daher in diesen Genomabschnitten nur geringe Mutationsraten.^{135,136} Ist die Funktionalität des MMR-Systems hingegen eingeschränkt, so kommt es im Bereich der Mikrosatelliten durch Anhäufung unterschiedlicher Mutationsereignisse zu Längenänderungen in den repetitiven Sequenzen. Diese Längenänderungen werden als Mikrosatelliteninstabilitäten (MSI) bezeichnet und lassen sich auf den Funktionsverlust eines oder mehrerer MMR-Gene zurückführen. Ihre Detektion in menschlichen Tumorzellen gilt daher als guter Indikator für Funktionsdefekte des MMR-Systems.^{137,138} Neben den nichtkodierenden Mikrosatellitenbereichen können Mutationen aber auch kurze Repeatsequenzen betreffen, die innerhalb eines genkodierenden Bereichs liegen. Mutationen sind für unterschiedliche Gene mit Wachstums-, Differenzierungs- oder Proliferationsfunktion (TGF β RII, E2F4, BAX, IGF1R, APC, β -Catenin) beschrieben.¹³² Betreffen die Mutationen Gene, deren Funktion in der Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität liegt, kann daraus über eine erhöhte Mutationsrate eine gesteigerte Tumorprogressionsneigung resultieren. Die Akkumulation von Mutationsereignissen in verschiedenen Genen wird als Mutationsphänotyp bezeichnet. Durch diese Alterationen können Tumorzellen einen Wachstumsvorteil erlangen, welcher dann im Zuge weiterer neoplastischer Differenzierungsschritte die klonale Vermehrung der veränderten Zellen ermöglicht.¹³⁹

1.3.1.2 Prävalenzen der MSI in Tumoren und MMR-Funktionsdefizienz

Mikrosatelliteninstabilitäten kommen in einer Reihe unterschiedlicher sporadisch auftretender Tumore vor. Unter anderem sind Tumore des HNPCC-Spektrums, aber auch sporadisch auftretende Karzinome der Lunge, des Pankreas, der Harnblase und der Prostata sowie diverse gynäkologische Malignome betroffen.¹⁴⁰ Die höchsten Prävalenzen mikrosatelliteninstabiler Tumore sind unter Neoplasien der HNPCC-Patienten zu finden. In sporadischen Kolonkarzinomen hingegen ist der Anteil an Tumoren mit MSI mit etwa 15 Prozent vergleichsweise gering (s. Tabelle 2).^{141,142} Die MSI-Raten der in einer Studie als „mikrosatelliten-instabil“

Einleitung

deklarierten Tumore sind unter anderem von den jeweils verwendeten Markern und insbesondere deren Anzahl abhängig. Da jedoch auch in Zellen mit funktionierendem MMR-System vereinzelt MSI zu finden sind, kann nicht jede detektierte MSI mit einer MMR-Defizienz gleichgesetzt werden. Das Vorkommen einer Mikrosatelliteninstabilität in einem Tumor beschreibt folglich nicht einen bestimmten Phänotyp des Tumors, sondern gibt lediglich Auskunft über das Vorhandensein einer Instabilität in einem bestimmten untersuchten Marker. Die Verwendung einer hinreichenden Anzahl verlässlicher, validierter Marker ist somit für die Detektion von Tumorgewebe mit einem Mutationsphänotyp unerlässlich. Einen Versuch, hierfür standardisierte Bedingungen zu schaffen, stellt die Zusammenstellung bestimmter Marker zum sog. „Bethesda-Panel“ dar. Unter dessen Verwendung lassen sich hiermit untersuchte Tumore gemäß der Anzahl detektierter MSI in zwei Gruppen unterteilen: Tumore mit MSI in einem Großteil der untersuchten Marker werden als MSI-H („high MSI“) definiert. Tumore mit MSI in nur wenigen der untersuchten Marker gelten als MSI-L („low MSI“). Eine Unterscheidung zwischen MSI-H und MSI-L erscheint notwendig, da die Inaktivierung von MMR-Genen in Tumoren der Gruppe MSI-H wohl eine entscheidende Rolle in der Karzinogenese der betroffenen Tumore spielt. Im Gegensatz dazu verfügen Tumore aus der Gruppe MSI-L anscheinend trotz genetischer Instabilitäten über ein weitestgehend funktionsfähiges MMR-System und unterscheiden sich somit in ihrem Phänotyp nicht wesentlich von Tumoren ohne MSI.¹⁴³

1.3.2 Der Spindelcheckpoint-Apparat

Aneuploidie ist ein Charakteristikum vieler menschlicher Karzinome.¹⁴⁴ Bisher ist jedoch nicht bekannt, ob und gegebenenfalls, welche Gendefekte direkt mit dem Auftreten von Aneuploidie assoziiert sind. Über 100 verschiedene Gene mit den unterschiedlichsten Funktionen im Zellzyklus werden verdächtigt, an der Entstehung von aneuploiden Zellen mitwirken zu können.¹⁴⁵ Eine Gruppe dieser Gene koordiniert als sogenannter Spindelcheckpoint während der Zellteilung die paritätische Verteilung der Chromosomen. Während der Mitose muss die in einer Zelle vorhandene DNA zu gleichen Teilen an die beiden neu entstehenden Tochterzellen weitergegeben werden. Die Trennung der Schwesterchromatiden erfolgt für alle Chromosomen einer Zelle gleichzeitig und normalerweise erst dann, wenn alle Kinetochore korrekt an die Mikrotubuli der von beiden Polen her ausgebildeten Spindelapparate gebunden und in der Äquatorialebene ausgerichtet sind.¹⁴⁶ Diese Phase, die den Übergang von der Metaphase in die Anaphase markiert, muss zur Verhinderung von Aneuploidie fehlerfrei ablaufen und ist von einer Zellteilung zur anderen in der Dauer höchst variabel.¹⁴⁷ Erfolgt die Segregation der Schwesterchromatiden bereits bevor alle Kinetochore korrekt mit dem Spindelapparat verbunden sind, kann es zu Fehlverteilung des genetischen Materials kommen. Es entstehen dann in der Chromosomenanzahl anormale, sogenannte aneuploide Tochterzellen.¹⁴⁸ Um chromosomale Fehlverteilungen während der Mitose zu vermeiden und die Stabilität des Genoms zu bewahren, muss der Beginn der Anaphase daher solange verzögert werden, bis alle Chromosomen korrekt mit den Spindelapparaten verbunden und in der Äquatorialebene eingependelt sind. Verantwortlich dafür ist das Zusammenspiel verschiedener (Spindelcheckpoint)-Gene, welche zusammen einen Überwachungspunkt, den Spindelcheckpoint bilden.^{149,150,151}

Dieser überwacht sowohl die Befestigung der Kinetochore an den Mitosespindeln als auch die von den Spindeln an den Kinetochoren ausgeübte Spannung.¹⁵² Bei Vorliegen auch nur eines einzigen noch ungebundenen Kinetochors wird der Spindelcheckpoint-Apparat aktiviert, der den Eintritt der Zelle in die Anaphase der Mitose verzögert.^{153,154} Angriffspunkt des Spindelcheckpoint-Apparats ist dabei der

Einleitung

Anaphase-Promoting-Komplex (APC), eine Ubiquitinligase, welche über eine Prozesskaskade die Trennung der Schwesterchromatiden und den Abschluss der Mitose reguliert.^{155,156,157} Es existieren zwei Aktivatoren der APC (Cdc20, Cdh1), die direkt an APC binden können und dessen Ubiquitinierungsaktivität erhöhen.^{158,159} Der aktive Spindelcheckpoint-Apparat verhindert durch Inhibierung der Cdc20-vermittelten APC-Aktivierung die Trennung der Schwesterchromatiden (Abbildung 4).¹⁵⁴

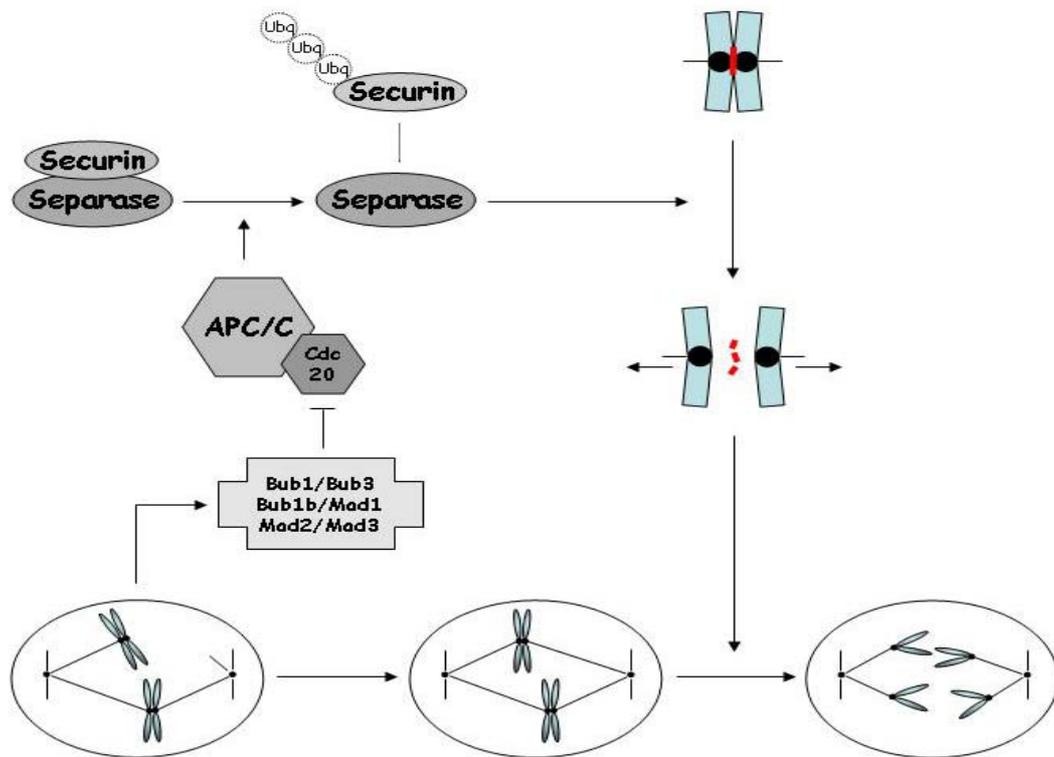


Abbildung 4: Der Spindelcheckpoint-Apparat verzögert durch Blockade der APC/C-Aktivierung die Trennung der Schwesterchromatiden solange, bis alle Kinetochore an die Mikrotubuli gebunden sind. Ist dies erfolgt, entfällt die blockierende Wirkung des Checkpoint-Apparates. Durch Ubiquitinierung von Securin wird Separase freigesetzt, welche an der Ringstruktur von Cohesin angreift, diese öffnet und so die Trennung der Schwesterchromatiden ermöglicht.

1.3.2.1 Komponenten des Spindelcheckpoint-Apparates

Einzelne Komponenten des Spindelcheckpoints, die „budding uninhibited by benzimidazole“-Proteine Bub1 und Bub3, die „mitotic arrest-deficient“-Proteine Mad1,

Mad2, Mad3 sowie Mps1 und Cdc5, wurden erstmals in Hefen identifiziert.^{160,161,162,163,164,165} Homologe dieser Proteine finden sich auch in höheren Eukaryonten. Sie sind hoch konserviert und umfassen die Spindelcheckpoint-Gene Mad1, Mad2, Bub1, Bub1b (BubR1) und Bub3.^{166,167,168,169,170} Neben diesen Kernkomponenten des Spindelcheckpoints konnten mittlerweile weitere Faktoren mit direkter Beteiligung an den vorgenannten Abläufen identifiziert werden, wie beispielsweise die Gene CENP-C und CENP-E, der ZW10-ROD-Zwisch-Proteinkomplex oder die TAO1-Kinase.^{171,172,173,174}

1.3.2.2 Funktion von Bub1b und MAD2

Die Spindelcheckpoint-Komponenten Mad2 und Bub1b wirken synergistisch und führen beide über die Bindung an Cdc20 zu einer Aktivitätsminderung von APC.^{175,176,177} Bub1b scheint dabei in physiologischen Konzentrationen sowohl in Bezug auf die Affinität zu Cdc20 als auch auf die Potenz der APC-Hemmung Mad2 überlegen zu sein.¹⁷⁵ Im Gegensatz zu Bub1b reicht die intrazelluläre Mad2-Konzentration nicht aus, um allein als APC-Inhibitor wirken zu können, Mad2 ist somit auf die Unterstützung anderer Checkpointkomponenten angewiesen. Sudakin et al. identifizierten in HeLa-Zellen Mad2 als Teil eines Komplexes, der, im Vergleich zu Mad2 alleine, ein etwa um den Faktor 3.000 stärkerer APC-Inhibitor ist. An diesem sogenannten „Mitotic Checkpoint Complex“ (MCC) sind neben Mad2 und Bub1b auch Bub3 und Cdc20 beteiligt.¹⁷⁸

1.3.2.3 Defekte im Spindelcheckpoint-Apparat und Karzinogenese

Solange der Spindelcheckpoint-Apparat funktionsfähig und aktiviert ist, befindet sich die Zelle vorübergehend im Zyklusarrest. Welche Folgen eine Funktionsbeeinträchtigung der beteiligten Spindelcheckpoint-Komponenten für die betroffenen Zellen nach sich zieht, konnte in Mausmodellen beobachtet werden.

Dabei führte die Inaktivierung von Bub1b bzw. Mad2 durch Mikroinjektion spezifischer Antikörper im Experiment trotz des Vorliegens mit dem Spindelapparat

Einleitung

noch unverbundener Chromosomen zum Funktionsverlust des Spindelcheckpoints und zum Eintreten der Zelle in die Anaphase.^{169,179}

Der vollständige Funktionsverlust von Mad2 in homozygot defizienten Mäusen (MAD2^{-/-}) war mit früher embryonaler Sterblichkeit assoziiert, auf zellulärer Ebene einhergehend mit zahlreichen chromosomalen Fehltrennungen und Apoptosen.¹⁸⁰ Auch ein Großteil der heterozygoten Mausembryonen (MAD2^{+/-}) entwickelte Aneuploidien und die Tendenz zur verfrühten Trennung der Schwesterchromatiden. Bei normaler Lebensdauer zeigten die MAD2^{+/-}-Mäuse im Gegensatz zum Wildtyp eine signifikant höhere Inzidenz für seltene Lungentumore.¹⁸¹ Schon der Verlust eines Mad2-Allels scheint somit auszureichen, um die Checkpoint-Funktionalität herab zu setzen.

Ein ähnliches Bild zeichnen auch die tierexperimentellen Studien zur Funktion von Bub1b. Eine komplette Bub1b-Ablation (Bub1b^{-/-}) führte auch hier in den Mäusen zu früher embryonaler Letalität mit massiver Apoptose.¹⁸² Heterozygote Tiere (Bub1b^{+/-}) zeigten im Vergleich zum Wildtyp (Bub1b^{+/+}) eine höhere Anfälligkeit für die karzinogeninduzierte Entwicklung von spontanen Malignomen der Lunge und des Intestinums.¹⁸³ Baker et al. beobachteten in einer Studie die systemischen Auswirkungen einer Reduktion der Bub1b-Expressionslevel: Mäuse mit einem Bub1b-Expressionslevel von 10% der normalen Bub1b-Expression wurden lebend geboren und entwickelten sich zu adulten Tieren. Wenngleich zum Zeitpunkt der Geburt in diesen Spezies noch keine Aneuploidien detektierbar waren, führte das Vorliegen einer reduzierten Spindelcheckpoint-Aktivität mit zunehmendem Alter rasch zu einer Akkumulation von Zellen mit abnormer Chromosomenzahl.¹⁸⁴

Für den Menschen ist das Auftreten erblicher Defekte in Spindelcheckpoint-Genen bekannt. Patienten, die von diesen Keimzellmutationen betroffen sind, haben dabei ein erhöhtes Risiko, bestimmte Malignome zu entwickeln.¹⁸⁵ In humanen Karzinomen wurden jedoch bislang keine Mutationen beobachtet, die zu einer völligen Inaktivierung der Spindelcheckpoint-Aktivität führten. Dies überrascht nicht, wenn man bedenkt, dass der völlige Funktionsverlust des Spindelcheckpoint-Apparates durch Inaktivierung von Bub1b bzw. Mad2 im Tierexperiment zum Abbruch der

Mitose mit dem Verlust der mitotischen Zelle führt. Hingegen wurden reduzierte Expressionslevel verschiedener Spindelcheckpoint-Proteine in Malignomen des Kolons, der Lunge, Mamma sowie in hämatopoetischen Krebserkrankungen beschrieben.^{144,167,186} Auch im Mausmodell war eine Reduktion der Proteinexpressionslevel für die genannten Spindelcheckpoint-Gene durchaus mit dem Überleben vereinbar, wenngleich vermehrt chromosomale Fehltrennungen auftraten und eine erhöhte Suszeptibilität für die Entstehung von Malignomen beobachtet wurde. Die verminderte Expression von Spindelcheckpoint-Proteinen könnte daher durchaus Anteil an der Initiation und Progression von menschlichen Malignomen haben. Ein vollständiger Verlust der Spindelcheckpoint-Funktionalität ist für eine maligne Transformation hingegen wohl eher hinderlich.

Fragestellung

2 FRAGESTELLUNG

Im Gegensatz zu vielen anderen Malignomen folgt die Karzinogenese in der Prostata keinem spezifischen Mutationsmuster oder einer immer wieder beobachteten Adenom-Karzinom-Sequenz, wie dies z.B. im Kolonkarzinom beschrieben wurde. Dennoch lässt sich das Prostatakarzinom durch eine Reihe unterschiedlicher genomischer Alterationen charakterisieren. Die zugrunde liegenden molekularen Ursachen und Mechanismen sind jedoch noch weitgehend unverstanden. Die vorliegende Arbeit untersucht daher das Auftreten von Defekten im Mismatch-Repair-(MMR)-System und im Spindelcheckpoint-System, ein DNA-Reparatursystem bzw. ein Überwachungssystem des mitotischen Zellzyklus. Defekte in beiden Systemen stehen mit der Entwicklung von Tumoren in Verbindung. Das Ziel dieser Arbeit ist es, die Rolle dieser Systeme in der Karzinogenese und Tumorprogression des Prostatakarzinoms zu untersuchen. Hierzu wurden folgende Fragen im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht:

1. In welchem Ausmaß sind in Prostatakarzinomen Defekte im MMR-System nachweisbar?
2. Bestehen Korrelationen zwischen Prostatakarzinomen mit einer MMR-Defizienz und biopathologischen Parametern?
3. Kann der MMR-Status als möglicher prädiktiver Marker für das Prostatakarzinom etabliert werden?
4. Sind aberrante Expressionslevel der Spindelcheckpoint-Gene Mad2 und Bub1b im Prostatakarzinom zu finden?
5. Bestehen Korrelationen zwischen aberranten Expressionsleveln dieser Spindelcheckpoint-Gene mit biopathologischen Parametern?
6. Kann dem Genexpressionslevel von Mad2 bzw. Bub1b im Prostatakarzinom die Rolle eines prädiktiven Markers zukommen?

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Digitaldrucker	DVP-1200	SEIKO Precision Inc.
DNA-Sequenzer	377A-DNA-Sequenzer	Applied Biosystems
Geldokumentationssystem	GelDoc XR	BIO-RAD
Gelelektrophoresesystem	SUBCell GT	BIO-RAD
Heizblock	HBT 130	HLC
Mikrowelle	Micromat	AEG
Netzgerät	PowerPac 200	BIO-RAD
PCR-Thermocycler	Primus 96plus	MWG-Biotech
qRT-PCR-Cycler	iCycler	BIO-RAD
Spektrophotometer	SmartSpec Plus	BIO-RAD
Vortexer	Vortex Mixer	neoLab
Zentrifuge	Biofuge primo	Heraeus

3.1.2 Software

Programme
ABI GeneScan® (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)
ABI Genotyper® (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)
Adobe Reader 7.0
geNorm 3.4 (http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/)
iCycler IQ 3.1.7050 (BIO-RAD)
Microsoft Access (Office XP)
Microsoft Excel (Office XP)
Microsoft Internet Explorer (Office XP)
Microsoft PowerPoint (Office XP)
Microsoft Word (Office XP)
Quantity One 4.5.2 (BIO-RAD)
R (http://finzi.psych.upenn.edu/R/doc/html/index.html)

Internetbasierende Datenbanken und Programme
NCBI-Homepage (http://www.ncbi.nlm.nih.gov)
Primerdesign (http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi)
Primerdesign ("Genome Database"; http://gdbwww.gdb.org)
Primerbestellung (http://www.biomers.net)

Material und Methoden

3.1.3 Chemikalien und Biochemikalien

Chemikalie	Hersteller
10mM dNTP Mix, PCR Grade	invitrogen
Acrylamidlösung (40%)	Merck
Agarose	invitrogen
Ammoniumpersulfat (APS) plus 10%	Roth
Blue Dextran Puffer	PE Applied Biosystems
Borsäure	Merck
Bromphenolblau	Roth
Chlorophorm	Merck
Diethylsulfoxid (DMSO)	Roth
EDTA	Calbiochem
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid 1%	Merck
FITC	BIO-RAD
Formamid plus	Merck
Glycerin	Roth
Harnstoff	Merck
Isoamyl-Alkohol	Roth
MgCl ₂	invitrogen
Natriumacetat	Roth
Phenol	Roth
Roti-Load DNA (mit Glycerin)	Roth
SDS 0,5%	Roth
Standard „ROX 350“ plus	PE Applied Biosystems
Standard „ROX 500“	PE Applied Biosystems
SYBR-Green	BIO-RAD
Taq DNA-Polymerase 10xReaktionspuffer	invitrogen
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Merck
Tris	Merck
TRizol	invitrogen
Xylencyanol	Roth
Xylol	Roth

3.1.4 Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
5x-TBE-Puffer	108g Tris 55g Borsäure 50 ml EDTA (0,5 M; pH 8,0) ad 2l dH ₂ O
6x Ladepuffer (für Agarosegele)	30% Glycerin 0,25% Bromphenolblau 0,25% Xylencyanol 0,2% EDTA pH 8,0

3.1.5 Enzyme

Enzym	Hersteller
Taq DNA Polymerase, recombinant Proteinase K	invitrogen Roche Diagnostics,

3.1.6 Molekularbiologische Kits

Kit	Hersteller
PCR Optimization KIT Im-Prom-II Reverse Transcription System	Fermentas, St. Leon-Rot Promega, Madison

3.1.7 DNA-Standard

DNA-Standard	Hersteller
100bp DNA Ladder 1µg/µl	invitrogen

Material und Methoden

3.2 Patientenkollektiv

	Mikrosatellitenanalyse			Genexpressionsanalysen		
Anzahl der auswertbaren Karzinome	153			44		
Gewebeeinbettung	Kryo: 52; Paraffin: 101			Kryo: 35; Paraffin: 9		
Alter bei Diagnosestellung	64,6 Jahre (44-77)			66,1 Jahre (54-77)		
Gleason-Score	4/5	5	(3,3%)	4/5	0	
	6	28	(18,3%)	6	12	(27,3%)
	7	86	(56,2%)	7	17	(38,6%)
	8	23	(15,0%)	8	6	(13,6%)
	9/10	8	(5,2%)	9/10	9	(20,5%)
	unbekannt	3	(2,0%)	unbekannt	0	
Tumor-Stadium	pT2a	7	(4,6%)	pT2a	2	(4,5%)
	pT2b	6	(3,9%)	pT2b	2	(4,5%)
	pT2c	38	(24,8%)	pT2c	14	(31,8%)
	pT3a	77	(50,3%)	pT3a	16	(36,4%)
	pT3b	25	(16,3%)	pT3b	10	(22,7%)
	unbekannt	0		unbekannt	0	
Grading	1b	1	(0,6%)	2a	10	(22,7%)
	2a	24	(15,6%)	2b	18	(40,9%)
	2b	94	(61,0%)	3a	12	(27,3%)
	3a	28	(18,2%)	3b	4	(9,1%)
	3b	5	(3,2%)	unbekannt	0	
	unbekannt	1	(0,6%)			
Lymphknoten-Status	N0	123	(80,4%)	N0	33	(75,0%)
	N+	21	(13,7%)	N+	11	(25,0%)
	unbekannt	9	(5,9%)	unbekannt	0	

Tabelle 1: Klinische Parameter des verwendeten Patientenkollektives.

In 34 aller unter 3.2.1 und 3.2.2 untersuchten Fälle wurden sowohl Mikrosatelliten- als auch Genexpressionsanalysen durchgeführt.

3.2.1 Mikrosatellitenanalyse

Insgesamt wurden 153 Prostatakarzinome aus Material des Pathologischen Instituts der Universität Würzburg untersucht. In 52 dieser Fälle stand kryokonserviertes Frischmaterial, in den übrigen 101 Fällen formalinfixiertes Paraffinmaterial zur Verfügung. In allen Fällen wurde die Diagnose *Prostatakarzinom* von einem Facharzt entsprechend den Kriterien der WHO von 1997 gestellt. Als Referenzgewebe („Normalgewebe“) fand in allen Fällen mikroskopisch tumorfreies Prostatagewebe desjenigen Patienten Verwendung, vom dem auch die jeweilige Karzinomprobe

stammt. Klinische Angaben zu den untersuchten Karzinomen sind in Tabelle 1 aufgeführt.

3.2.2 Genexpressionsanalysen

Untersucht wurden insgesamt 47 Prostatakarzinome aus Material des Pathologischen Instituts der Universität Würzburg. Ausgewertet werden konnten davon lediglich 44 Tumore, da die restlichen 3 Tumore in der Datenbank nicht repräsentiert waren. In 35 dieser Fälle stand kryokonserviertes Frischmaterial, in den übrigen 9 Fällen formalinfixiertes Paraffinmaterial zur Verfügung. In allen Fällen wurde die Diagnose *Prostatakarzinom* von einem Facharzt entsprechend den Kriterien der WHO von 1997 gestellt. Als „Normalgewebe“ wurde auch hier mikroskopisch tumorfreies Prostatagewebe verwendet. Klinische Angaben zu den untersuchten Karzinomen sind in Tabelle 1 aufgeführt.

3.3 Tumordatenbank

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Tumordatenbank wurde vom Pathologischen Institut der Universität Würzburg zur Verfügung gestellt. Sie enthält eine systematische Sammlung histopathologischer und klinischer Informationen über Patienten, die im Zeitraum 04/1997 bis 08/2005 wegen eines Prostatakarzinoms in der Urologischen Klinik der Universität Würzburg radikal prostatektomiert wurden.

3.4 Methoden

3.4.1 DNA-Extraktion

3.4.1.1 Paraffinmaterial

Zur Extraktion von DNA aus Paraffinmaterial wurden von den vorhandenen Gewebelöcken 10 bis 50 Schnitte einer Dicke von 6µm angefertigt. Nach Abwiegen und Übertragen des Materials in 2ml-Eppendorftubes gab man dem Reaktionsgefäß 1ml Xylol hinzu, vortextierte den Ansatz 1 Min. und zentrifugierte diesen anschließend 5 Min. bei 14.000 rpm. Der Überstand wurde verworfen. Dieser Vorgang wurde

Material und Methoden

einmal wiederholt. Anschließend erfolgte die Zugabe 1ml 100%-igen Ethanol. Erneut wurde 1 Min. vortexiert, 5 Min. bei 14.000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Auch dieser Vorgang wurde einmal wiederholt. Im Anschluss erfolgte eine 30-minütige Inkubation der Proben bei 50°C.

Der nun folgende Gewebeverdau fand über 72 Stunden in mit Proteinase K (600µl/ml, Roche Diagnostics) versetzten DNA-Isolationspuffer bei einer Temperatur von 56°C statt.

Zur Abtrennung der im verdauten Material enthaltenen Proteinreste von der DNA wurde das Material anschließend einer Phenol-Chloroform-Aufreinigung unterzogen. Im Anschluss daran erfolgte die Extraktion mit 600µl Phenolchlorophorm (Phenol/Chlorophorm/Isoamyl-Alkohol – 25:24:1). Diesmal wurde nach 1 Min. Vortexieren und 5 Min. Zentrifugieren bei 14.000 rpm nur die obere wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach zweimaliger Wiederholung dieses Vorganges folgten zwei weitere Wiederholungen der Prozedur mit nun 500µl Chlorophorm. Für die Fällung der DNA wurde schließlich 3M Natriumacetat, entsprechend 10% des erhaltenen Volumens, hinzu gegeben, vortexiert, 1ml -20°C-kalter 100%-iger Ethanol hinzugefügt, und nach erneuter Vortexierung bei -20°C für mindestens 2 Stunden inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (14.000 rpm; 5 Min.) wurde der Überstand verworfen und 1ml -20°C-kalten 70%-igen Ethanol hinzugegeben. Nach kurzem Schwenken des Gefäßes und Zentrifugieren (14.000 rpm; 5 Min.) wurde der Überstand unter Schonung des DNA-Pellets verworfen. Dieser Vorgang wurde ein weiteres Mal durchgeführt. Danach musste die Probe bei 37°C im offenen Gefäß für ca. 30 Min. inkubiert werden, um eventuell noch vorhandene Ethanolreste entweichen zu lassen. Das so gewonnene DNA-Pellet wurde danach in 50µl TE-Puffer (10mmol/l Tris-HCl, pH 7,6, 1 mmol/l EDTA) resuspendiert.

3.4.1.2 Kryomaterial

Die Gewinnung des Kryomaterials begann mit dem Anfertigen von 20 bis 30 5µm-Schnitten am Mikrotom. Der Gewebeverdau fand über Nacht bei 50°C in Verdaupuffer (100mmol/l NaCl, 10mmol/l Tris-HCl pH 8, 25mmol/l EDTA pH 8,

0,5% SDS) unter Zugabe von 40µl Proteinase K (0,1 mg/ml, Roche Diagnostics) statt. Die folgende DNA-Aufreinigung wurde nach der oben für Paraffinmaterial beschriebenen Phenol/Chlorophorm-Extraktions-Methode und der Ethanol/Natriumacetat-Präzipitation durchgeführt.

3.4.2 RNA-Extraktion

Die Isolierung der RNA aus dem Frischmaterial erfolgte unter Verwendung von TRIzol Reagent nach Angaben des Herstellers in fünf Schritten:

- **Homogenisation:** Den Proben wurde pro 50-100mg je 1ml TRIzol zugesetzt.
- **Phasentrennung:** Der Ansatz wurde bei Raumtemperatur für 5 Min. inkubiert. Nach Zugabe von 0,2ml Chlorophorm pro 1ml TRIzol wurde die Probe 15 sec. lang geschüttelt, nochmals 2-3 Min. bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zentrifugiert (2-8°C; 12.000g; 15 Min.).
- **Präzipitation:** Nach Abnahme des Überstandes wurde 0,5ml Isopropanol pro 1ml TRIzol zugegeben und bei Raumtemperatur 10 Min. inkubiert. Anschließend erfolgte die Pelletierung der Proben (2-8°C; 12.000g; 10 Min.).
- **Waschung:** Nach Entfernen des Überstandes wurde das RNA-Pellet in 1ml 75%-Ethanol pro 1ml TRIzol gewaschen, die Probe kurz gevortext und zentrifugiert (2-8°C; 7.500g; 5 Min.).
- **Auflösung:** Nach vorsichtigen Abgießens des Überstandes wurde das Pellet luftgetrocknet (30 Min.), in 50µl RNasefreiem Wasser gelöst und zur völligen Resuspension bei 55-60°C für 10 Min. inkubiert.

3.4.3 Quantitäts- und Reinheitskontrolle der Nukleinsäuren

Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung für sowohl DNA als auch RNA erfolgte photometrisch bei 260nm und 280nm in einer 1:100-Verdünnung (Gesamtvolumen 100µl). Als Nullabgleich wurde eine mit ddH₂O gefüllte Küvette verwendet.

Material und Methoden

3.4.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

3.4.4.1 Allgemeines und Prinzip

Die semiquantitative Amplifikation der untersuchten Genabschnitte erfolgte mit der Polymerasekettenreaktion.¹⁸⁷ Diese Methode ermöglicht die in-vitro-Vervielfältigung von Genabschnitten und verläuft in drei sich zyklisch wiederholenden Phasen:

- **Denaturierung:** Durch kurzzeitiges Erhitzen über die DNA-Schmelztemperatur (92°C-98°C) hinaus wird die DNA-Doppelhelix in Einzelstränge aufgetrennt.
- **Annealing:** Während des anschließenden raschen Abkühlens (50°C-65°C) binden zwei synthetische Oligonukleotide (Primer) an ihre komplementären Sequenzen der DNA-Einzelstränge, welche die zu amplifizierende Region flankieren.
- **Elongation:** Bei 72°C werden die beiden DNA-Einzelstränge durch die Taq-DNA-Polymerase in 3'-Richtung - d.h. in Richtung auf die Zielsequenz - durch Anlagerung der im Reaktionsansatz vorhandenen Nukleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) zu Doppelsträngen komplettiert.

Um eine exponentielle Zunahme der amplifizierten DNA zu erhalten, werden die drei Phasen der PCR (Denaturierung, Annealing, Elongation) mehrfach nacheinander durchlaufen. Unter optimalen Bedingungen verdoppelt sich dabei mit jedem durchlaufenen Zyklus die Anzahl der synthetisierten DNA-Moleküle. Primerabhängig werden 30-40 Zyklen durchlaufen.

3.4.4.2 Oligonukleotide (Primer)

Um die Expression eines Gens von Interesse zu untersuchen, müssen zunächst Intron-überspannende Oligonukleotidprimer konzipiert werden. Die als Primer bezeichneten Oligodesoxyribonukleotide determinieren dabei den zu kopierenden Sequenzabschnitt, indem sie an Orten komplementärer Sequenz mit der Ziel-DNA hybridisieren und als Starter für die Polymerisation dienen.

Bezeichnung	Sequenz	Fluoreszenzmarkierung
BAT25 F	TCGCCTCCAAGAATGTAAGT	5'FAM
BAT25 R	TCTGCATTTTAACTATGGCTC'	
BAT26 F	TGACTACTTTTGACTTCAGCC	5'HEX
BAT26 R	AACCATTCAACATTTTAAACCC	
D17S250 F	GAAAGAATCAAATAGACAAT	5'HEX
D17S250 R	GCTGGCCATATATATATTTAAACC	
D2S123 F	AAACAGGATGCCTGCCTTTA	5'FAM
D2S123 R	GGACTTTCCACCTATGGGAC	
D5S346 F	ACTCACTCTAGTGATAAATCGGG	5'NED
D5S346 R	AGCAGATAAGACAGTATTACTAGTT	

3.4.4.3 PCR-Ansatz

Die Polymerasekettenreaktionen wurden nach Optimierung (PCR Optimization KIT, Fermentas) primerspezifisch mit nachfolgenden Ansätzen durchgeführt.

Ansatz BAT25	
dH ₂ O	15,6 µl
Puffer 12	2,0 µl
DMSO	0,5 µl
dNTPs	0,4 µl
Primer 1: BAT25 F (10pmol/µl)	0,2 µl
Primer 2: BAT25 R (10pmol/µl)	0,2 µl
Taq-DNA-Polymerase	0,1 µl
DNA-Probe (30ng/µl)	1,0 µl
	<hr/> 20,0 µl

Ansatz BAT26	
dH ₂ O	16,1 µl
Puffer 8	2,0 µl
dNTPs	0,4 µl
Primer 1: BAT26 F (10pmol/µl)	0,2 µl
Primer 2: BAT26 R (10pmol/µl)	0,2 µl
Taq-DNA-Polymerase	0,1 µl
DNA-Probe (30ng/µl)	1,0 µl
	<hr/> 20,0 µl

Ansatz D17S250	
dH ₂ O	15,6 µl
Puffer 12	2,0 µl
DMSO	0,5 µl
dNTPs	0,4 µl
Primer 1: D17S250 F (10pmol/µl)	0,2 µl
Primer 2: D17S250 R (10pmol/µl)	0,2 µl
Taq-DNA-Polymerase	0,1 µl
DNA-Probe (30ng/µl)	1,0 µl
	<hr/> 20,0 µl

Material und Methoden

Ansatz D2S123	
dH ₂ O	15,0 µl
Puffer 10x	2,0 µl
MgCl ₂	0,6 µl
DMSO	0,5 µl
dNTPs	0,4 µl
Primer 1: D2S123 F (10pmol/µl)	0,2 µl
Primer 2: D2S123 R (10pmol/µl)	0,2 µl
Taq-DNA-Polymerase	0,1 µl
DNA-Probe (30ng/µl)	1,0 µl
	<hr/>
	20,0 µl

Ansatz D5S346	
dH ₂ O	15,0 µl
Puffer 10x	2,0 µl
MgCl ₂	0,6 µl
DMSO	0,5 µl
dNTPs	0,4 µl
Primer 1: D5S346 F (10pmol/µl)	0,2 µl
Primer 2: D5S346 R (10pmol/µl)	0,2 µl
Taq-DNA-Polymerase	0,1 µl
DNA-Probe (30ng/µl)	1,0 µl
	<hr/>
	20,0 µl

Ansatz Bub1b	
dH ₂ O	39,9 µl
Puffer 10x	5,0 µl
MgCl ₂	1,5 µl
dNTPs	0,8 µl
Primer 1: Bub1b 67 F (10pmol/µl)	1,0 µl
Primer 2: Bub1b 98 R (10pmol/µl)	1,0 µl
Taq-DNA-Polymerase	0,3 µl
cDNA-Probe	0,5 µl
	<hr/>
	50,0 µl

Ansatz hHPRT	
dH ₂ O	39,8 µl
Puffer 10x	5,0 µl
MgCl ₂	1,5 µl
dNTPs	1,0 µl
Primer 1: hHPRT1 (10pmol/µl)	1,0 µl
Primer 2: hHPRT2 (10pmol/µl)	1,0 µl
Taq-DNA-Polymerase	0,2 µl
cDNA-Probe	0,5 µl
	<hr/>
	50,0 µl

Zur Durchführung der PCR wurden Thermocycler mit beheiztem Deckel benutzt (Primus 96plus, MWG-Biotech). Dabei galten die in der folgenden Tabelle angegebenen Bedingungen.

Temperatur	Zeitdauer	Durchläufe	Bezeichnung
95° C	10 min.	1	initiale Denaturierung
95° C	30 sec.	38	zyklische Denaturierung
56° C	45 sec.		Annealing
72° C	30 sec.		Elongation
72° C	10 min.	1	Abschlusselongation
8° C	∞	1	temporäre Lagerung

3.4.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Ergebnisse der PCR-Amplifikation wurden mittels Gelelektrophorese in 0,9%igem Agarosegel kontrolliert. Zur Herstellung des Geles wurden 0,9g Agarose in 100ml 0,5x TBE-Puffer in der Mikrowelle kurz aufgeköcht und unter Rühren auf 60°C abgekühlt. Nach Zugabe von 8µl Ethidiumbromid wurde die Lösung luftblasenfrei in das Gelelektrophoresesystem gegossen. Sobald das klare Gel milchig-trüb wurde, war es auspolymerisiert und konnte dann in die mit 0,5x TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer transferiert werden. Nach vorsichtigem Entfernen des Gelkammes erfolgte die Beladung der Geltaschen: Jeweils 10µl PCR-Produkt wurden mit 2µl Ladepuffer versetzt und vorsichtig in eine der Geltaschen pipettiert. Zur Bestimmung der Fragmentgröße der DNA-Proben wurde parallel eine leere Tasche mit 5µl einer 100bp-DNA-Basenleiter beladen. Bei 120V für 40 Min. erfolgte die Auftrennung der DNA-Fragmente, anschließend konnten die DNA-Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht und photodokumentiert werden.

3.4.6 Mikrosatellitenanalyse

3.4.6.1 Auswahl der Mikrosatellitenmarker

Die Primersequenzen für die PCR-Amplifikation der Mikrosatelliten wurden der „Genome Database“ entnommen, die Primer von MWG-Biotech (München) synthetisiert. Dabei wurde jeweils einer der beiden Primer eines Primerpaares für die anschließende fluoreszenzabhängige Detektion der Mikrosatelliteninstabilitäten (MSI) am 5'-Ende mit einem der fluoreszierenden Phosphoramide FAM, HEX oder NED kovalent gekoppelt. Die Primersequenzen sind der Tabelle in Abschnitt 3.4.4.2 zu entnehmen.

Material und Methoden

3.4.6.2 Polymerasekettenreaktion

Die Amplifizierung der Mikrosatelliten erfolgte getrennt für Tumor- und Kontrollgewebe mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (s. Abschnitt 3.4.4.1) aus der extrahierten DNA unter Verwendung der ausgewählten Primer.

3.4.6.3 Polyacrylamidgelelektrophorese

Für die Auftrennung der PCR-Produkte wurde ein 6%iges Polyacrylamidgel im 377A-DNA-Sequencer verwendet. Für die Herstellung eines Gels benötigt man folgende Reagenzien:

6%iges Polyacrylamidgel	
5,625 ml	Acrylamidlösung (40% - 1:29)
18 g	Harnstoff
20 ml	dH ₂ O
10 ml	5x-TBE-Puffer

Unmittelbar vor dem Gießen des Gels erfolgt die Zugabe von

250 µl	10% Ammoniumpersulfat (APS) plus
30 µl	Tetramethylethyldiamin (TEMED)

Nach Denaturierung der PCR-Proben (95°C; 5 Min.) und anschließender Abkühlung auf Eis wurden die Geltaschen mit 1µl des nachfolgenden Probenmixes beladen:

2,5 µl	PCR-Probe
2,3 µl	Formamid plus
0,2 µl	Standard „ROX 500“ oder „ROX 350“ plus
0,5 µl	Blue Dextran Puffer

Die Auftrennung der PCR-Proben erfolgte bei 51°C, 3.000V, 60mA in ca. 150 Min.

3.4.6.4 Analyse der Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Rohdaten der Elektrophorese wurden automatisiert gesammelt. Die anschließende Analyse der aufgetrennten PCR-Amplifikate erfolgte unter Benutzung der Programme „ABI GeneScan®“ und „ABI Genotyper®“ gemäß den Anleitungen des Herstellers. Sammlung und Analyse der Daten folgten dabei nachstehendem Prinzip:

Die denaturierten PCR-Produkte wandern im elektrischen Feld entsprechend ihrer negativen Ladung mit unterschiedlicher Geschwindigkeit in Richtung Anode und werden so im Gel entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Während des Laufes wird das Gel über einen Argonlaser mit Wellenlängen im Bereich λ zwischen 488 und 514,5nm in der Nähe der Anode entlang einer Linie senkrecht zur Laufrichtung der PCR-Produkte permanent gescannt. Je kleiner ein PCR-Produkt ist, d.h. je weniger Basenpaare es besitzt, desto schneller wandert es zur Anode und desto früher passiert es die Scanlinie. Trifft der Laser dabei auf die fluoreszierende Fläche eines PCR-Produktes, so emittiert diese Licht entsprechender Wellenlänge, welches über ein Spiegelsystem weitergeleitet wird und über einen angeschlossenen Computer registriert werden kann. Die ersten Schritte der Analyse geschehen somit vollautomatisiert. Nach manueller Bearbeitung der Rohdaten mit Spurkorrektur und weiteren Schritten erhält man die entsprechenden Elektropherogramme (Abbildung 5).

Die x-Achse der Elektropherogramme gibt die Produktgröße in Basenpaaren (bp) an, welche durch den in jeder Spur mitlaufenden Standard „ROX 500“ bzw. „ROX 350“ definiert wurde. Die y-Achse zeigt die Intensität des Signals in Fluoreszenz-Units (FU) an, die direkt proportional zur Menge des amplifizierten Produkts ist. In den darauf folgenden Schritten können nun die Fläche oder auch die Höhe der Peaks des jeweiligen Allels ermittelt werden, über welche dann Tumor- und Kontrollgewebe semiquantitativ verglichen werden können.

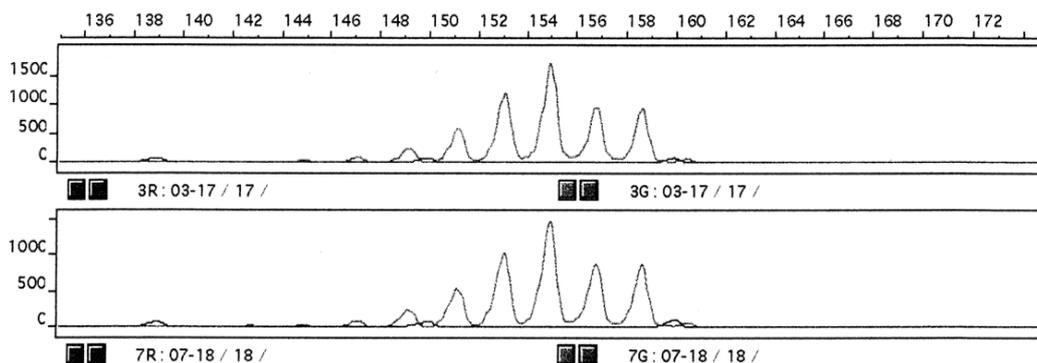


Abbildung 5: Elektropherogramm eines unauffälligen Probenpaares. Tumor- (oberer Teil der Grafik) und Kontrollgewebe geben im direkten Vergleich keinen Hinweis auf eine Mikrosatelliteninstabilität im untersuchten Marker D17S250.

Material und Methoden

Eine MSI wurde definiert als das Auftreten zusätzlicher Allele im Tumorgewebe, die sowohl größer als auch kleiner als das ursprüngliche Allel sein können. Die Einteilung der MSI in MSI-H, MSI-L und MSI-S folgte in Anlehnung an die Kriterien für die Bestimmung von MSI in kolorektalen Karzinomen nach Boland et al.¹⁴³ Hiernach spricht man - sofern bei der Untersuchung mehr als fünf Marker analysiert wurden - dann von MSI-H („high“), wenn in mindestens 30-40 Prozent der untersuchten Marker MSI nachweisbar sind. Das Vorliegen von MSI in weniger als 30-40 Prozent der untersuchten Marker entspricht dem Level MSI-L („low“). Liegt für eine Probe in keinem der untersuchten Marker eine MSI vor, so wird dies als MSI-S („stable“) bezeichnet.

Bei der in dieser Arbeit untersuchten Anzahl von fünf Mikrosatellitenmarkern ergibt sich somit folgende Klassifikation: Bei Vorliegen von zwei oder mehr MSI ($\geq 40\%$) in den fünf untersuchten Markern wurde die Probe als MSI-H, bei Vorliegen genau einer Instabilität ($< 40\%$) als MSI-L definiert. Proben mit der Bezeichnung MSI-S enthielten in keinem der fünf Marker eine Mikrosatelliteninstabilität.

3.4.7 Reverse Transkription

Da es nicht möglich ist, RNA direkt mithilfe der PCR zu amplifizieren, muss diese zunächst in cDNA umgeschrieben werden. Die Anwendung der reversen Transkription mit nachfolgender Polymerasekettenreaktion (PCR) zum Nachweis, bzw. mittels Real-Time-PCR (qRT-PCR) zur Quantifizierung einer spezifischen mRNA, ist heute ein Routinewerkzeug in der Molekularbiologie. Die Transkription von mRNA zu cDNA wurde mit Hilfe des Im-Prom-II Reverse Transcription System nach einem modifizierten Protokoll des Herstellers Promega durchgeführt. Die Ansätze für die in sterilen Eppendorfgefäßen stattfindende Transkriptionsreaktion lauteten wie folgt:

Ansatz Proben:	
1 µg RNA in RNAsfreiem H ₂ O	4,0 µl
Reverse Transkription – Master Mix	16,0 µl
	<hr/>
	20,0 µl

Reverse Transkription – Master Mix	
Random Primers 500 µg/ml	1,0 µl
RNAsefreies H ₂ O	7,8 µl
Promega 5x Puffer	4,0 µl
MgCl ₂ (25mM)	1,2 µl
dNTP-Mix (10 mM)	1,0 µl
Reverse Transkriptase	1,0 µl
	16,0 µl

Ansatz Positiv-Kontrolle:	
Template 0,5 µg/ml (1.2 KB Kanamycin)	2,0 µl
Random Primers 500 µg/ml	1,0 µl
RNAsefreies H ₂ O	6,2 µl
Promega 5x Puffer	4,0 µl
MgCl ₂ (25mM)	4,8 µl
dNTP-Mix (10 mM)	1,0 µl
Reverse Transkriptase	1,0 µl
	20,0 µl

Ansatz Negativ-Kontrolle:	
Random Primers 500 µg/ml	1,0 µl
Nukleasefreies Wasser	8,2 µl
Promega 5x Puffer	4,0 µl
MgCl ₂ (25mM)	4,8 µl
dNTP-Mix (10 mM)	1,0 µl
Reverse Transkriptase	1,0 µl
	20,0 µl

Nach Pipettieren der Ansätze wurden die Proben kurz gevortext, zentrifugiert und zunächst 5 Min. bei Raumtemperatur, im Anschluss daran 60 Min. im Heizblock bei 42°C inkubiert. Um die enzymatische Funktion der Reversen Transkriptase zu inaktivieren wurden alle Proben abschließend für 15 Min. bei 70°C inkubiert.

3.4.8 Quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)

3.4.8.1 Allgemeines und Prinzip

Die Real-Time PCR (qRT-PCR) ermöglicht die Messung relativer Expressionslevel verschiedener Gene in Echtzeit. Im Gegensatz zu anderen molekularbiologischen Methoden, die eine annähernde Quantifizierung spezifischer Genprodukte nur unter großem Zeitaufwand ermöglichen (z.B. Northern Blotting), erfolgt bei dieser Methode die Detektion und Analyse eines bestimmten Gentranskriptes unter Ausnutzung der Geschwindigkeit und Sensitivität der PCR. Die Quantifizierung erfolgt dabei durch Messung der Fluoreszenzzunahme von einem Farbstoff, z.B. SYBR-Green, der in

Material und Methoden

doppelsträngige DNA interkaliert. Die mit jedem Zyklus der qRT-PCR zu beobachtende Zunahme der Fluoreszenz korreliert mit der quantitativen Zunahme der amplifizierten Target-DNA. Als Maß für die Quantifizierung werden hierbei die sog. Ct-(cycle threshold)-Werte bestimmt (Abbildung 6). Diese entsprechen der Anzahl der PCR-Zyklen, die notwendig sind, um ein definiertes Fluoreszenzniveau zu erreichen. Der Ct-Wert verhält sich somit umgekehrt proportional zur eingesetzten cDNA-Ausgangsmenge.¹⁸⁸

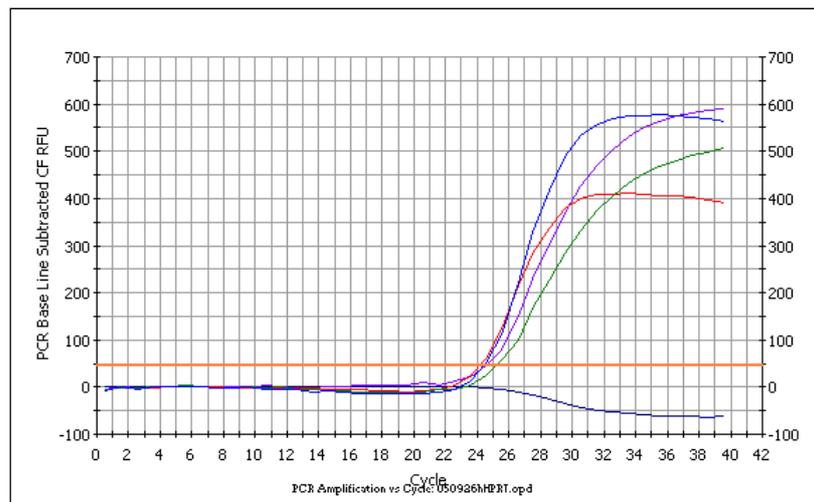


Abbildung 6: Beispiel einer Ct-Wertbestimmung.
Der Ct-Wert einer Probe entspricht der Anzahl der PCR-Zyklen, welche notwendig sind, ein vorab definiertes Fluoreszenzniveau (orange Linie) zu erreichen. Je geringer der Ct-Wert einer Probe ausfällt, desto größer ist die eingesetzte DNA-Ausgangsmenge. Durch Normalisierung der unterschiedlichen Proben mittels eines Housekeeping-Gens kann dann auf das individuelle Genexpressionslevel der Proben geschlossen werden.

Ziel der qRT-PCR ist heutzutage primär nicht mehr die Bestimmung der DNA-Ausgangsmenge. Stattdessen erlaubt die Methode indirekt Rückschlüsse über das Expressionsausmaß bestimmter Gene in unterschiedlichen DNA-Proben. Um Genexpressionslevel zwischen verschiedenen Proben vergleichbar zu machen, müssen evtl. vorhandene cDNA-Konzentrationsunterschiede in den eingesetzten Ausgangsmengen durch Normalisierung ausgeglichen werden. Dies geschieht mithilfe eines sog. Housekeeping-Gens, wie dem in dieser Arbeit verwendeten hHPRT.

3.4.8.2 Oligonukleotide (Primer)

Um die Expressionslevel bestimmter Gene quantitativ bestimmen zu können, ist zunächst die Konzipierung intronüberspannender Oligonukleotidprimer notwendig. Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma biomers.net bezogen.

Bezeichnung	Sequenz
hHPRT1	5'-TGA CAC TGG CAA AAC AAT GCA-3'
hHPRT2	5'-GGT CCT TTT CAC CAG CAA GCT-3'
hBub1b67for	5'-GTG CTC TCA AGG CTC CAA GC-3'
hBub1b98rev	5'-GGT GTC ATA ACT GGC TGT CG-3'
hMAD2for	5'-GGT CCT GGA AAG ATG GCA G-3'
hMAD2rev	5'-ATC ACT GAA CGG ATT TCA TCC-3'

3.4.8.3 qRT-PCR-Ansatz

Alle qRT-PCRs wurden mit dem in folgender Tabelle wiedergegebenen Standardansatz durchgeführt. Nach Vorlage von je 2µl cDNA (in 1:5-Verdünnung) in eine auf Eis gekühlte 96well-Platte wurden je 23µl Master-Mix hinzu pipettiert.

Standard-Ansatz qRT-PCR	
dH ₂ O	16,25 µl
Puffer 10	2,50 µl
MgCl ₂	0,75 µl
dNTP	0,25 µl
FITC (1:2.000)	0,25 µl
Primer 1 (10pmol/µl)	0,75 µl
Primer 2 (10pmol/µl)	0,75 µl
SYBR®-Green (1:2.000)	0,75 µl
Taq-DNA-Polymerase	0,75 µl
cDNA-Probe (in 1:5-Verdünnung)	2,00 µl
	25,00 µl

Nach Start des Programms und Erreichen der Denaturierungstemperatur von 95°C wurde die Probenplatte in den iCycler eingelegt. Das für alle qRT-PCR-Amplifikationen in dieser Arbeit verwendete Standard-Temperaturprogramm entsprach folgendem Schema:

Temperatur	Zeitdauer	Durchläufe	Bezeichnung
95°C	3 Min.	1	initiale Denaturierung
95°C	15 sec.	40	zyklische Denaturierung
60°C	60 sec.		Annealing

Material und Methoden

Zur Charakterisierung der während der qRT-PCR entstandenen PCR-Produkte und zum Ausschluss fluoreszenzwirksamer Nebenprodukte wurden im Anschluss an die 40 Zyklen der Amplifikation Schmelzkurvenanalysen durchgeführt. Das Standard-Temperaturprofil zur Schmelzkurvenanalyse begann mit der Einstellung der Temperatur auf 50°C. Anschließend wurde die Temperatur alle 10 sec. um jeweils 1°C schrittweise auf 98°C erhöht. Dabei wurde die Abnahme der Fluoreszenzsignale der Proben so oft sequenziell gemessen, bis die Zieltemperatur erreicht war. Mit Hilfe der Schmelzkurvenanalyse kann nachgewiesen werden, dass jeweils nur ein Fragment mit einer bestimmten Schmelztemperatur amplifiziert wurde. Unspezifische Produkte sind meist kleiner und haben eine niedrigere Schmelztemperatur als die erwarteten spezifischen Amplifikate. Zusätzlich zur Schmelzkurve wurden alle qRT-PCR-Produkte im Agarosegel auf das Vorliegen von Primer-Dimeren analysiert.

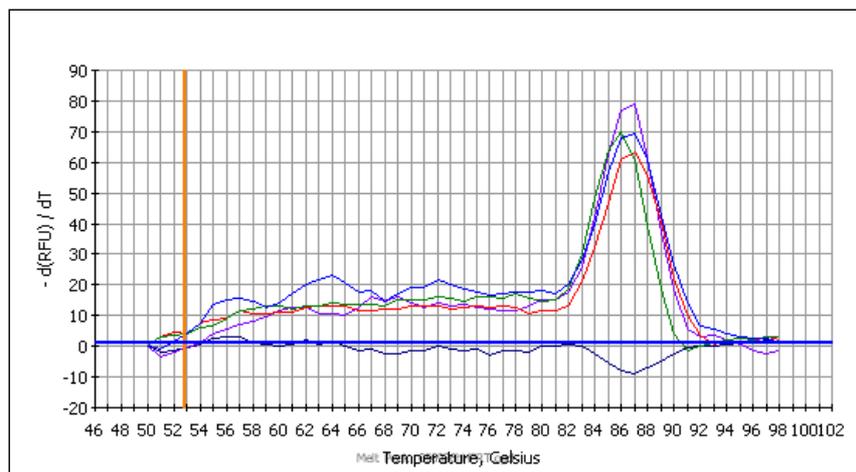


Abbildung 7: Charakterisierung von Amplifikationsprodukten mit Hilfe der Schmelzkurvenanalyse. Bei Erreichen der für das gewünschte Produkt spezifischen Schmelztemperatur kommt es zu einer starken Abnahme des Fluoreszenzsignals. Unspezifische, unerwünschte Nebenprodukte schmelzen meist schon bei geringeren Temperaturen und zeigen sich als zusätzlicher Peak.

3.4.8.4 Datenverarbeitung

Die während der qRT-PCR aufgezeichneten Rohdaten wurden anschließend an die Amplifikation mit der Software „iCycler IQ“ ausgewertet. Für alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten qRT-PCR-Läufe wurde die Threshold-Position auf den Wert 45,0 festgelegt.

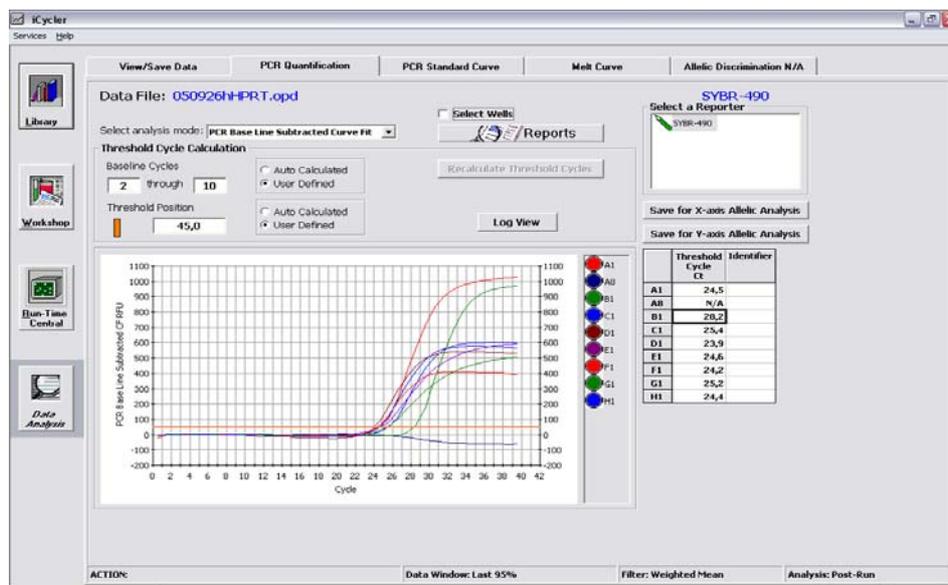


Abbildung 8: Ermittlung der Ct-Werte mit der Software „iCycler IQ“.
Die für alle PCR-Läufe verbindliche Threshold-Position (Wert 45,0) ermöglicht die softwaregestützte Bestimmung der probenspezifischen Ct-Werte.

Die auf diese Weise erhaltenen Schwellenwert-Zyklen (Ct-Werte) wurden in Microsoft Excel kopiert und systematisch sortiert. Probenwerte, bei denen die Schmelzkurve Hinweise auf das Vorliegen eines artefaktiellen Ct-Wertes oder unspezifische Nebenprodukte schließen ließ wurden ebenso von der weiteren Datenverarbeitung ausgeschlossen wie Probenwerte, deren qRT-PCR-Produkte in der kontrollierenden Agarosegelelektrophorese nicht oder nicht ausschließlich das postulierte Amplifikationsprodukt aufwiesen. Die qRT-PCR-Versuche wurden auf diese Weise solange fortgeführt und wiederholt, bis für jede cDNA-Probe für jedes Primerpaar mindestens zwei einwandfreie Ct-Werte vorlagen. Proben, die diese Bedingungen trotz mehrmaliger Wiederholungen nicht erfüllen konnten, wurden von der weiteren Auswertung ausgeschlossen.

Material und Methoden

Die Weiterverarbeitung der Rohdaten erfolgte in mehreren Schritten:

- **Berechnung der Normalisierungsfaktoren** mithilfe von „geNorm“. Normalisierung der Expressionsdaten über den Abgleich mit den Expressionswerten des Housekeeping-Genes hHPRT. Die Normalisierung erfolgte mithilfe von „geNorm“ anhand der Ct-Mittelwerte einer jeden Probe.
- **Bilden relativer Werte** für alle zu vergleichenden Gene: $W_R = E^{(\text{MinCtMittel} - \text{CtMittel})}$. Dabei entspricht E der ermittelten Effizienz des Housekeeping-Genes, MinCtMittel dem niedrigsten aller gemittelten Ct-Werte und CtMittel dem gemittelten Ct-Wert der jeweiligen Probe.
- **Bestimmen des relativen Expressionslevels:**
 $RE = W_R / \text{Normalisierungsfaktor}$

3.4.9 Statistik

Die statistische und graphische Auswertung der ermittelten Daten erfolgte unter Verwendung von Microsoft Excel sowie dem Statistikprogramm „R“. Alle Daten wurden unter Verwendung parametrischer Tests verglichen.

Der Vergleich zweier oder mehr unterschiedlicher Gruppen (Korrelationsanalysen) erfolgte mittels Fisher's Exact Test für unverbundene Stichproben. Darüber hinaus fand auch der Welch Two Sample t-test in dieser Arbeit Anwendung. Ein Wert von $p \leq 0,05$ im zweiseitigen Test (Konfidenzintervall 95%) wurde als signifikanter Unterschied gewertet und im Folgenden mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet.

4 ERGEBNISSE

4.1 Analyse auf Mikrosatelliteninstabilitäten in Prostatakarzinomen

4.1.1 Prozedere

Nach Extraktion sowie Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der Proben-DNA wurden 183 Probenpaare (Prostatakarzinomgewebe mit komplementärem, mikroskopisch karzinomfreiem Prostatagewebe) mittels PCR für jeden der fünf zu untersuchenden Mikrosatellitenmarker (BAT25; BAT26; D17S250; D2S123; D5S346) unter primeroptimierten Bedingungen (s. Abschnitt 3.4.4.3) amplifiziert. Dem gelelektrophoretischen Produktnachweis folgte die Analyse der PCR-Amplifikate in der Polyacrylamidgelelektrophorese (s. Abschnitt 3.4.6.4).

Eine Mikrosatelliteninstabilität (MSI) wurde im Folgenden definiert als das Auftreten zusätzlicher Allele eines Mikrosatellitenmarkers oder der Verlust von Allelen im Vergleich zum jeweiligen Kontrollgewebe.

Abbildung 9 zeigt ein Beispiel eines Elektropherogramms mit MSI im Marker D17S250, an dem die Auswertung veranschaulicht werden kann.

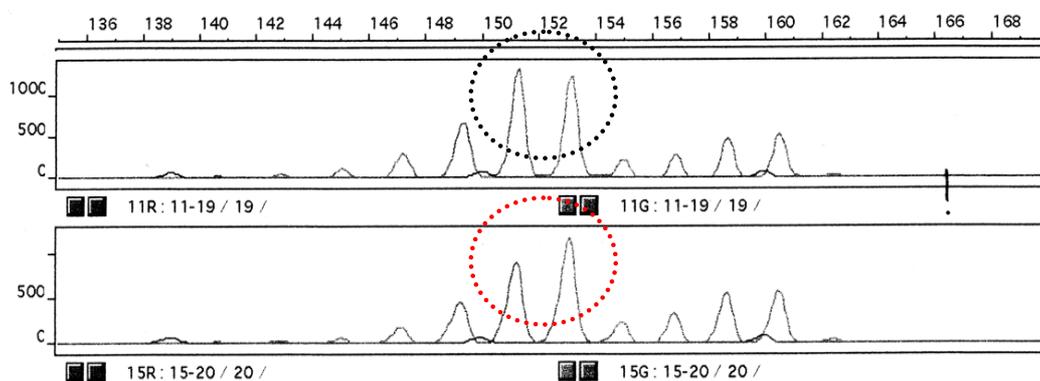


Abbildung 9: Nachweis einer MSI im Elektropherogramm.
Tumor- (oberer Teil der Grafik) und Kontrollgewebe unterscheiden sich im direkten Vergleich in der Konfiguration komplementärer Peaks im untersuchten Marker D17S250.

Die Kriterien für die Einteilung der MSI in MSI-H, MSI-L und MSI-S sind in Abschnitt 3.4.6.4 ausführlich erläutert.

Ergebnisse

4.1.2 Klassifikation und Verteilung

Für 30 der insgesamt 183 Probenpaare, vornehmlich für solche aus Paraffingewebe, erhielt man trotz mehrmaliger Wiederholung der PCR kein Amplifikat. Dies führte zum Ausschluss dieser Proben, da hier eine eindeutige Aussage bezüglich des Vorhandenseins von Mikrosatelliteninstabilitäten nicht möglich war.

Unter den verbliebenen 153 Probenpaaren mit beurteilbarem MSI-Status waren 129 Proben (84,3%) in allen fünf untersuchten Markern ohne MSI (MSI-S). In 24 Proben (15,7%) konnte eine oder mehrere MSI gefunden werden. Von diesen wurden 15 DNA-Proben (9,8%) als MSI-L, 9 (5,9%) als MSI-H klassifiziert.

Anzahl Probenpaare	Anteil	MSI-Status	detektierte MSI
129x	84,3%	MSI-S	keine MSI
15x	9,8%	MSI-L	1 MSI
9x	5,9%	MSI-H	2-5 MSI

In über 30 Prozent aller MSI-Fälle war der Marker BAT25 betroffen. Die Häufigkeiten der Mikrosatelliteninstabilitäten für die einzelnen Marker sind der Übersicht zu entnehmen.

Anzahl	Marker	Häufigkeit
10x	BAT 25	30,3%
8x	D2S123	24,2%
7x	BAT 26	21,2%
6x	D17S250	18,2%
5x	D5S346	15,2%

In der Gruppe der MSI-H war auffällig, dass bei Vorliegen von MSI in den Mononukleotidmarkern (BAT25, BAT26) gleichzeitig keine Instabilitäten in den Dinukleotidmarkern (D2S123, D5S346, D17S250) zu finden waren.

4.1.3 Korrelation mit Tumordatenbank

Nach Klassifikation der Probenpaare erfolgte die Korrelation der einzelnen MSI-Gruppen mit den vorhandenen patientenbezogenen Daten der Tumordatenbank. Der Fokus lag dabei auf den Parametern des Grading nach Gleason, Tumorstadium, Lymphknotenstatus und Alter der Patienten bei Diagnosestellung.

4.1.3.1 Tumorggrading nach Gleason

Abbildung 10 zeigt die relative Verteilung der Probenpaare (getrennt nach den Gruppen MSI-S, MSI-L und MSI-H) entsprechend ihrem histologischen Grading-Score nach Gleason.

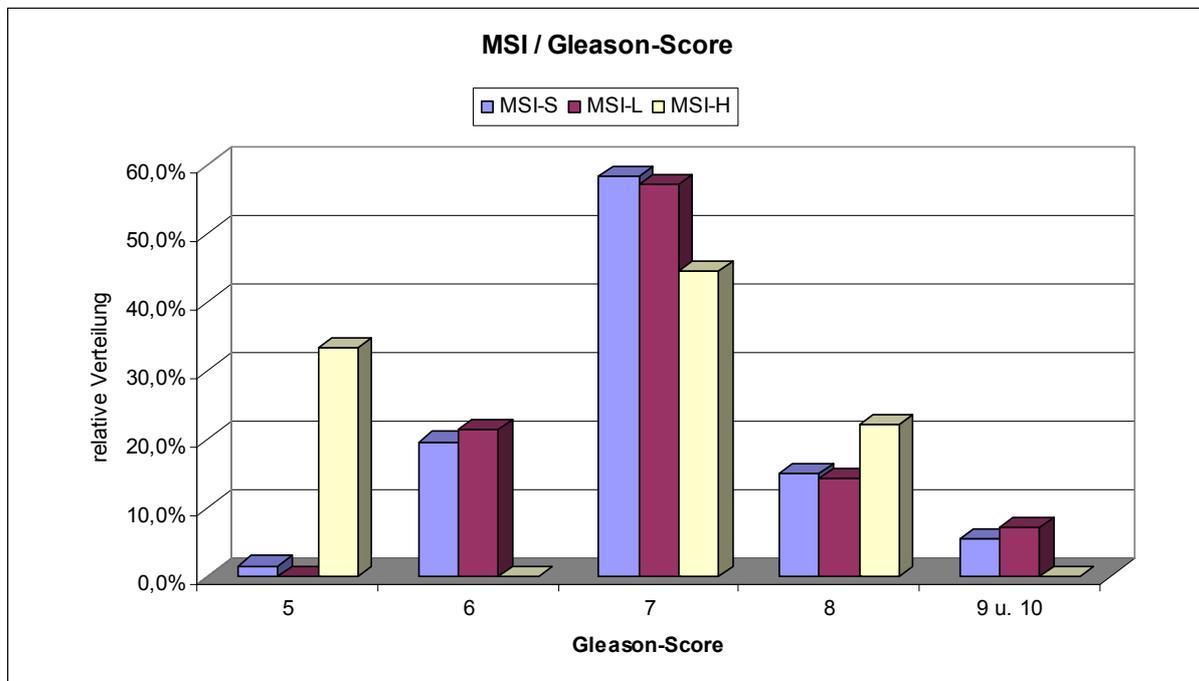


Abbildung 10: Korrelation des MSI-Status mit dem Gleason-Score.
Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen bestehen nicht ($p > 0,05$).
3 von 9 Proben der Gruppe MSI-H fallen durch einen Gleason-Score von 5 auf.
In der Gruppe MSI-S finden sich von 127 Proben insgesamt nur 2 mit diesem Score.

In allen drei untersuchten Gruppen findet sich unter den Probenpaaren am häufigsten ein Gleason-Score von 7 (MSI-S: 58,3%, MSI-L: 57,1%, MSI-H: 44,4%). Die übrigen Probenpaare der Gruppen MSI-S (127 Proben) und MSI-L (14 Proben) verteilen sich annähernd gleich: Der Großteil der Probenpaare ist mit einem Gleason-Score von 6 bzw. 8 vergesellschaftet (MSI-S: 19,7% bzw. 15,0%; MSI-L: 21,4% bzw. 14,3%). Ein Gleason Score von ≥ 9 stellt unter den untersuchten Proben mit 5,5% (MSI-S) bzw. 7,1% (MSI-L) die Ausnahme, ein Gleason-Score von 5 (MSI-S: 1,6%) eine Rarität dar.

In den MSI-H-Probenpaaren erscheint die Verteilung ungleich inhomogener: 4 von 9 Proben (44,4%) haben einen Gleason-Score von 7, weitere 2 Proben (22,2%) einen

Ergebnisse

Gleason-Score von 8. Kein einziger der untersuchten Proben entspricht histologisch einem Gleason-Score von 9 oder 10. Jedoch wurden 3 Proben (33,3%) der Gruppe MSI-H histopathologisch dem selten vorkommenden Gleason-Score 5 zugeordnet.

Für die vorliegenden Stichproben ergibt sich statistisch kein signifikanter Unterschied in der Häufigkeitsverteilung zwischen den MSI-S-, MSI-L- und MSI-H-Proben (Fisher's Exakt Test; $p > 0,05$).

4.1.3.2 Tumorstadium nach TNM (UICC)

Unter den Tumorproben MSI-S waren zum Zeitpunkt der Diagnosestellung 42 von 129 Karzinomen (32,6%) noch auf die Prostata begrenzt (Tumorstadium pT2). Es dominieren dabei beide Seitenlappen infiltrierende pT2c-Karzinome (30 von 129; 23,3%). Die übrigen MSI-S-Tumore (87 von 129; 67,4%) hatten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung die Prostatakapsel bereits durchbrochen (pT3). Bei 50,4% aller MSI-S-Tumore lag trotz lokal fortgeschrittenem Tumorstadium noch keine Infiltration der Samenblasen vor (pT3a), 17,1% zeigten einen pT3b-Tumor mit Befall der Samenblase(n).

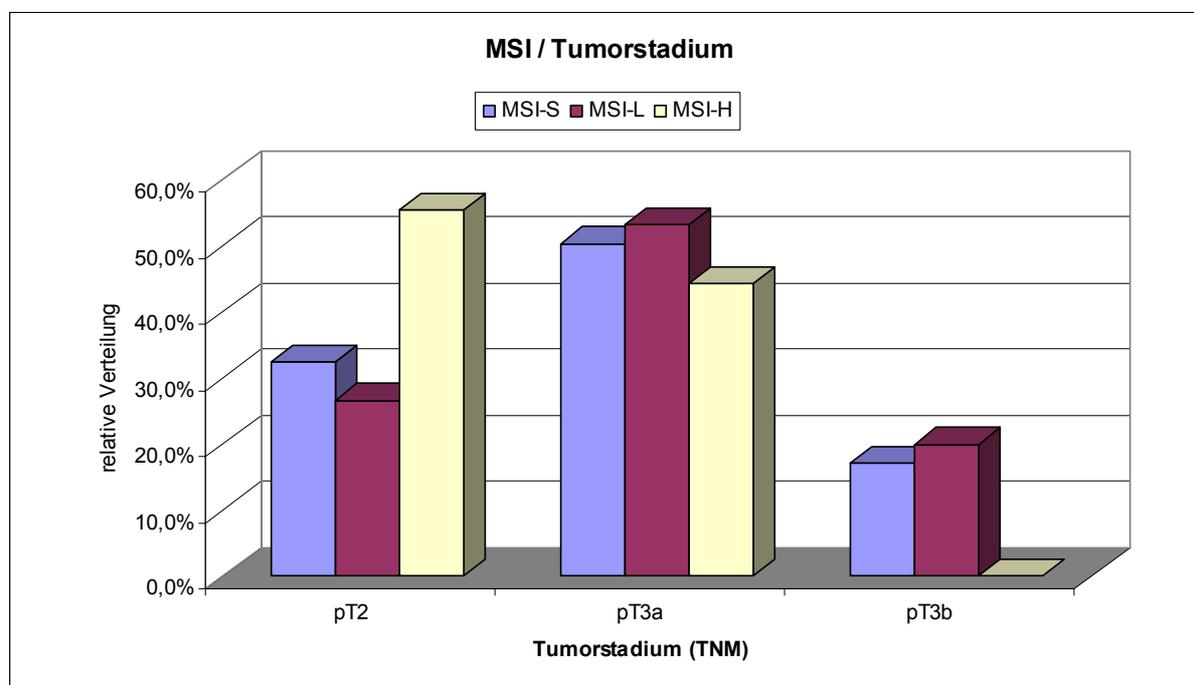


Abbildung 11: Korrelation des MSI-Status mit dem Tumorstadium.

Tumore aus der MSI-H-Gruppe waren im Untersuchungsgut überwiegend auf das Organ begrenzt (pT2). Im Gegensatz zu den Vergleichsgruppen zeigte in der Gruppe MSI-H keines der kapselüberschreitenden Prostatakarzinome eine Infiltration der Samenblasen (pT3a).

Von den 15 Proben aus der Gruppe MSI-L waren zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme 4 Karzinome (26,7%) auf das Organ begrenzt (pT2b: 1; pT2c: 3). Kapselüberschreitende Prostatakarzinome lagen in 11 Fällen (pT3a: 8; pT3b: 3) vor. In der Gruppe der MSI-H-Tumore sind nur zwei verschiedene Tumorstadien zu finden: In 5 der 9 Tumorproben (55,6%) blieb das Prostatakarzinom trotz Infiltration

Ergebnisse

beider Seitenlappen auf das Organ begrenzt (pT2c). In 4 Fällen (44,4%) durchbrach das Karzinom die Prostatakapsel, ohne jedoch die Samenblasen zu infiltrieren (pT3a). Zwischen den Gruppen besteht kein signifikanter Unterschied in der Häufigkeitsverteilung der Tumorstadien (Fisher's Exact Test; $p > 0,05$).

4.1.3.3 Lymphknotenstatus

Unter den MSI-S-Tumoren waren 102 von 122 Proben (83,6%) zum Zeitpunkt der Diagnosestellung histopathologisch ohne regionäre Lymphknotenmetastasen (pN0). In 20 Fällen (16,4%) war mindestens ein benachbarter Lymphknoten infiltriert (pN+).

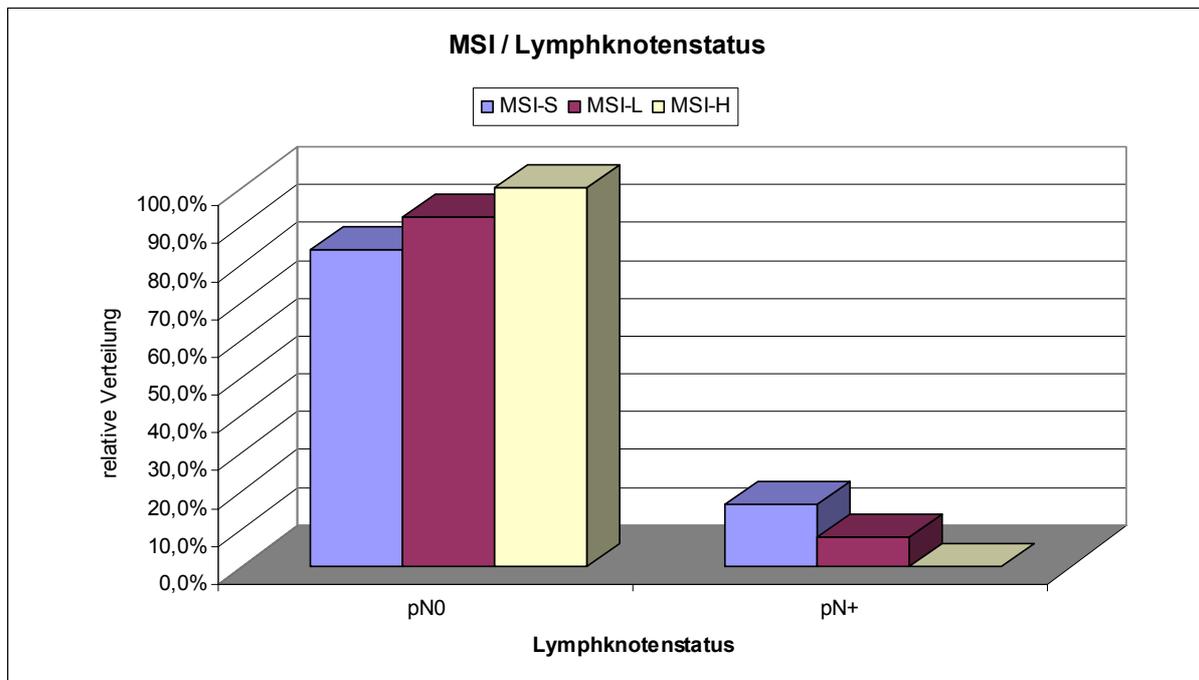


Abbildung 12: Korrelation des MSI-Status mit dem Lymphknotenstatus.
 Proben der Gruppe MSI-S waren zu 83,6%, die der Gruppe MSI-L zu 92,3% und die der Gruppe MSI-H zu 100% histopathologisch nodal tumorfrei.

Von den 15 MSI-L-Tumoren ist für zwei Proben kein Lymphknotenstatus bekannt. Unter den verbleibenden 13 Prostatakarzinomen stehen 12 Fälle (92,3%) mit negativem Lymphknotenstatus (pN0) einem Tumor (7,7%) mit lymphogener Streuung (pN+) gegenüber. Alle untersuchten Tumore der Gruppe MSI-H sind histopathologisch frei von regionären Lymphknotenmetastasen (pN0).

Ein signifikanter Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen hinsichtlich des Lymphknotenstatus konnte nicht gezeigt werden (Fisher's Exact Test; $p > 0,05$).

Ergebnisse

4.1.3.4 Alter der Patienten bei Diagnosestellung

Sowohl in der Gruppe der MSI-S-Tumore als auch in der Gruppe der MSI-L-Tumore liegt der Häufigkeitsgipfel für das Alter der Patienten bei Diagnosestellung des Prostatakarzinoms zwischen dem 61. und dem 65. Lebensjahr (33,6% bzw. 33,3%).

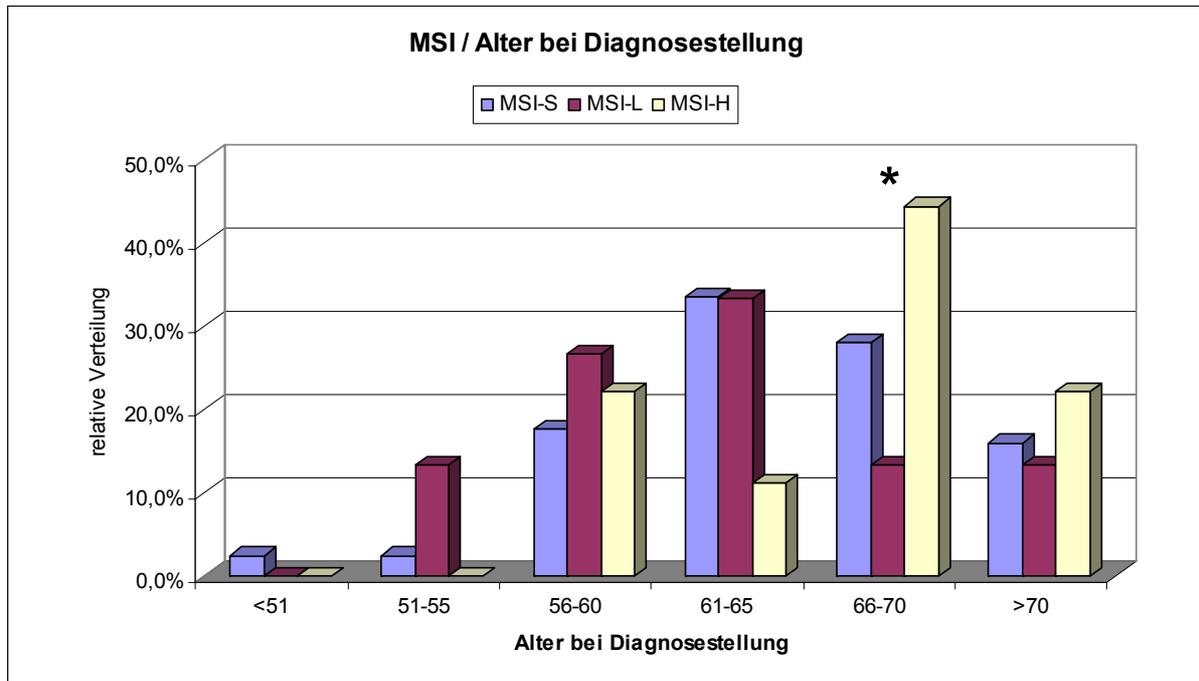


Abbildung 13: Korrelation des MSI-Status mit dem Alter der Patienten bei Diagnosestellung. Es bestehen signifikante Unterschiede (*) in der Altersverteilung zwischen den Tumoren der Gruppen MSI-S und MSI-H ($p \leq 0,05$).

In der MSI-S-Gruppe waren zum Zeitpunkt der Diagnosestellung 44,0% älter als 65 Jahre, 22,4% waren jünger als 61 Jahre.

4 von 14 Patienten (26,7%) aus der MSI-L-Gruppe waren zum Zeitpunkt der Diagnosestellung älter als 65 Jahre, 6 (40,0%) hatten das 61. Lebensjahr noch nicht vollendet. In der Gruppe der MSI-H-Tumore ist der größte Anteil (4 von 9; 44,4%) in dem Intervall zwischen dem 67. und dem 71. Lebensjahr zu finden. Insgesamt 6 Patienten (66,7%) waren zum Zeitpunkt der Probengewinnung älter als 65 Jahre, 2 Patienten (22,2%) hatten das 62. Lebensjahr noch nicht erreicht.

In Bezug auf das Alter bei Diagnosestellung ist zwischen den Tumoren der Gruppen MSI-S und MSI-H ein statistisch signifikanter Unterschied feststellbar (Fisher's Exakt Test; $p \leq 0,05$).

4.2 Expressionsanalyse der Spindelcheckpoint-Gene Bub1b und MAD2 in Prostatakarzinomen

4.2.1 Semiquantitative Analyse der Bub1b- und MAD2-Expression

Nach Extraktion sowie Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der Proben-RNA wurden 67 Proben - davon 47 Proben von Prostatakarzinomen, 20 Proben von mikroskopisch karzinomfreien Prostataarealen - mittels Reverse Transkription (s. Abschnitt 3.4.7) in cDNA umgeschrieben.

Die anschließend durchgeführte PCR mit den Primern Bub1b sowie hHPRT ließ in der Agarosegelelektrophorese trotz vergleichbarer Ausgangskonzentrationen unterschiedliche Amplifikatmengen erkennen.

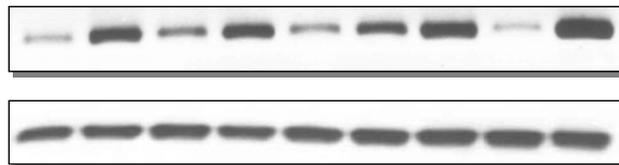


Abbildung 14: Agarosegel-Elektrophorese einer PCR mit dem Primer für Bub1b (oben), bzw. HPRT (unten). Trotz gleicher Ausgangskonzentrationen der verwendeten Tumorproben sind in den Amplifikaten ungleiche Intensitäten der Banden als Hinweis auf Unterschiede in der Genexpression erkennbar.

Sowohl zwischen den Gruppen der Karzinome und der Normalgewebe, als auch innerhalb der beiden Gruppen schienen offensichtlich quantitative Unterschiede in den Amplifikaten und damit Hinweise auf Unterschiede in der Genexpression zu bestehen.

Da diese Unterschiede mit den Werkzeugen der klassischen PCR nur semiquantitativ analysierbar, jedoch nicht quantifizierbar waren, wurden im Folgenden alle 67 Proben einer quantitativen Expressionsanalyse der Spindelcheckpointgene Bub1b und auch MAD2 mittels qRT-PCR unterzogen (s. Abschnitt 3.4.8). Als interne Referenz zur Normalisierung der Ergebnisse wurde das Housekeepinggen hHPRT amplifiziert.

Ergebnisse

4.2.2 Quantitative Analyse der Bub1b- und MAD2-Expression

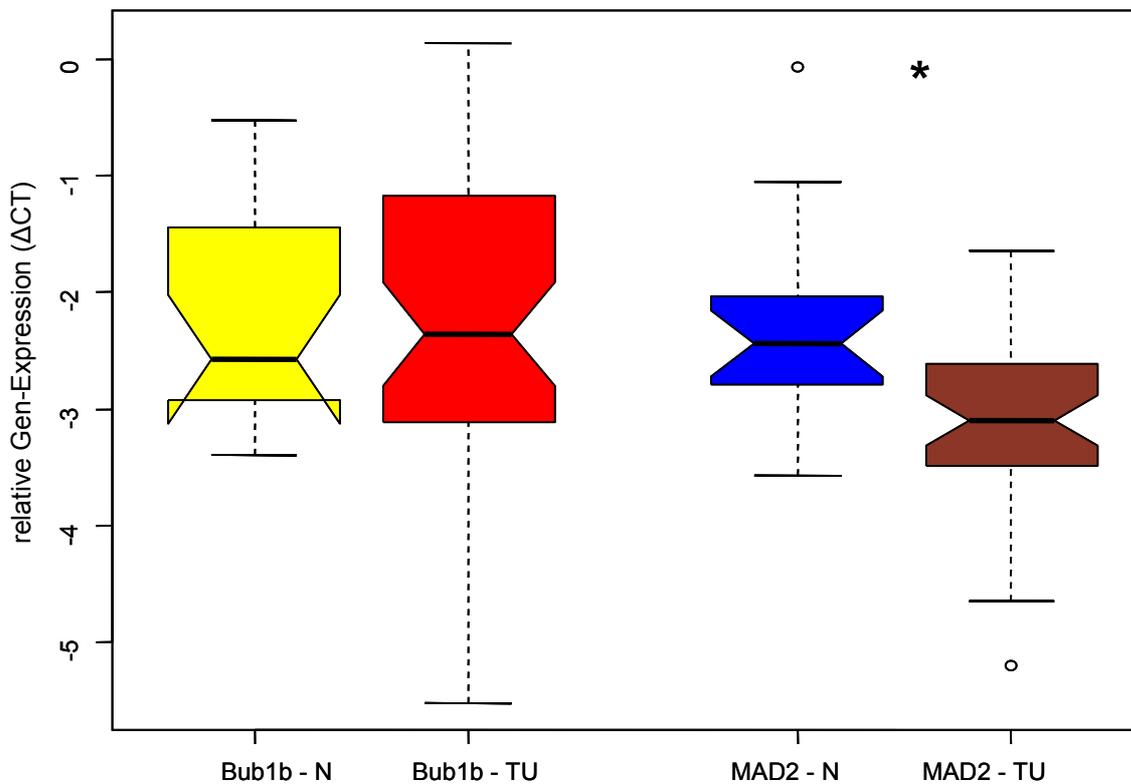


Abbildung 15: Box-and-whisker-plots der Bub1b- und MAD2-Expressionslevel. Die Mittelwerte (horizontale schwarze Balken) der Bub1b-Tumore (Bub1b-TU, rot) und Normalgewebe (Bub1b-N, gelb) unterscheiden sich kaum. Im Gegensatz dazu zeigen die Mittelwerte der MAD2-Tumore (MAD2-TU, braun) und Normalgewebe (MAD2-N, blau) eine erhebliche Abweichung bei geringer interindividueller Streubreite. Die Kerben (sog. *Notches*) stellen approximative 95% Konfidenzintervalle für die Lage der Gruppenmediane dar. Überlappen sich die Kerben zweier Plots nicht, wie dies bei den beiden rechten Plots der Fall ist, können diese als statistisch signifikant verschieden (*) hinsichtlich ihrer zentralen Lage betrachtet werden.

4.2.2.1 Bub1b

Von den 67 untersuchten Proben ließ sich in der qRT-PCR der Bub1b-Abschnitt bei lediglich einer Probe aus der Gruppe der Normalgewebe nicht erfolgreich amplifizieren, so dass diese Probe ausgeschlossen werden musste. Abbildung 16 veranschaulicht die relative Genexpression der übrigen Proben nach Normalisierung mit HPRT.

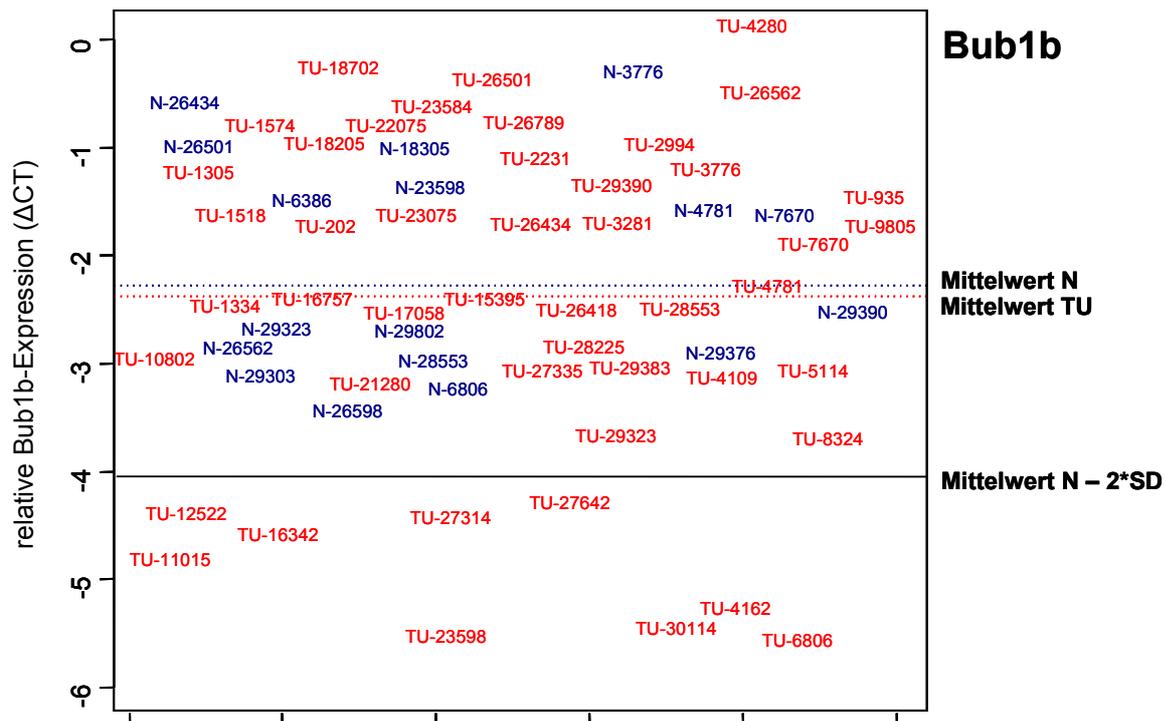


Abbildung 16: Relative Expressionslevel von Bub1b bei den untersuchten Proben.
Die Tumorproben (TU) sind rot, die Normalgewebe (N) blau markiert. 9 von 47 Tumorproben liegen mehr als zwei Standardabweichungen (schwarze Linie) unterhalb des Expressionsmittelwertes der Normalgewebe (Mittelwert N). Diese Proben werden in den folgenden Analysen als „Bub1b-low“ bezeichnet.

Tumor- und Normalgewebe korrespondierender Probenpaare zeigen dabei zum Teil sehr unterschiedliche Expressionslevel. Eine relative Überexpression der Tumorprobe im Vergleich zur Normalprobe (z.B. TU-29390/N-29390) kann dabei ebenso beobachtet werden wie ein deutlich verringertes Expressionslevel des Karzinom- im Vergleich zum Normalgewebe desselben Organs (z.B. TU-6806/N-6806). Betrachtet man die Mittelwerte der beiden Gruppen „Karzinomgewebe“ und „Normalgewebe“, so ergibt sich für die vorliegende Stichprobe kein signifikanter Unterschied in der Genexpression von Bub1b (Welch Two Sample t-test; $p > 0,05$). Jedoch lässt sich von den untersuchten 47 Tumorproben eine Gruppe von 9 Tumoren (19,1%) abgrenzen, deren relative Bub1b-Expression mehr als zwei Standardabweichungen unterhalb des gemittelten Expressionslevels der Gruppe der Normalgewebe liegen. Diese 9 Karzinomproben - im Folgenden als „Bub1b-low“ bezeichnet - wurden nun mit den restlichen 38 Karzinomproben („Bub1b-normal“) hinsichtlich der Parameter Grading nach Gleason, Tumorstadium,

Ergebnisse

Lymphknotenstatus und Alter der Patienten bei Diagnosestellung verglichen. Darüber hinaus existieren im untersuchten Kollektiv auch solche Tumorproben, deren Expressionslevel für Bub1b deutlich über dem Mittelwert liegen (Überexpression).

4.2.2.2 MAD2

Von den 67 untersuchten Proben (47 Karzinom-, 20 Normalgewebe) konnte nach qRT-PCR-Amplifikation für 42 Karzinom- und 19 Normalgewebeproben eine Aussage über die relativen Expressionslevel von MAD2 gemacht werden. Dabei zeigte sich in der Expression von MAD2 ein signifikanter Unterschied in den Mittelwerten der Genexpressionslevel der Gruppen Karzinomgewebe und Normalgewebe (s. Abbildung 15). Für insgesamt 8 Karzinomgewebe waren in der Tumordatenbank keine Informationen verfügbar, so dass diese im Folgenden nicht berücksichtigt werden konnten. Somit verblieben für die weiteren Analysen verwertbare Ergebnisse von 34 Karzinom- und 19 Normalgewebeproben. Im Vergleich der Expressionslevel korrespondierender Gewebeproben dominieren hier Probenpaare, bei denen die MAD2-Expression in den Karzinomen gegenüber dem Normalgewebe vermindert ist (z.B. TU-5114/N-5114). Eine relative Überexpression in der Karzinomprobe, wie für das Probenpaar 6806 beobachtet, stellt im Untersuchungsgut die Ausnahme dar.

Wie bereits für Bub1b beschrieben erfolgte auch für MAD2 eine Unterteilung der Karzinomgewebeproben nach deren relativen Expressionslevel in „MAD2-low“, d.h. Proben mit deutlich reduzierten Genexpressionsleveln für MAD2, sowie in „MAD2-normal“, also Proben mit durchschnittlichen relativen Genexpressionsleveln.

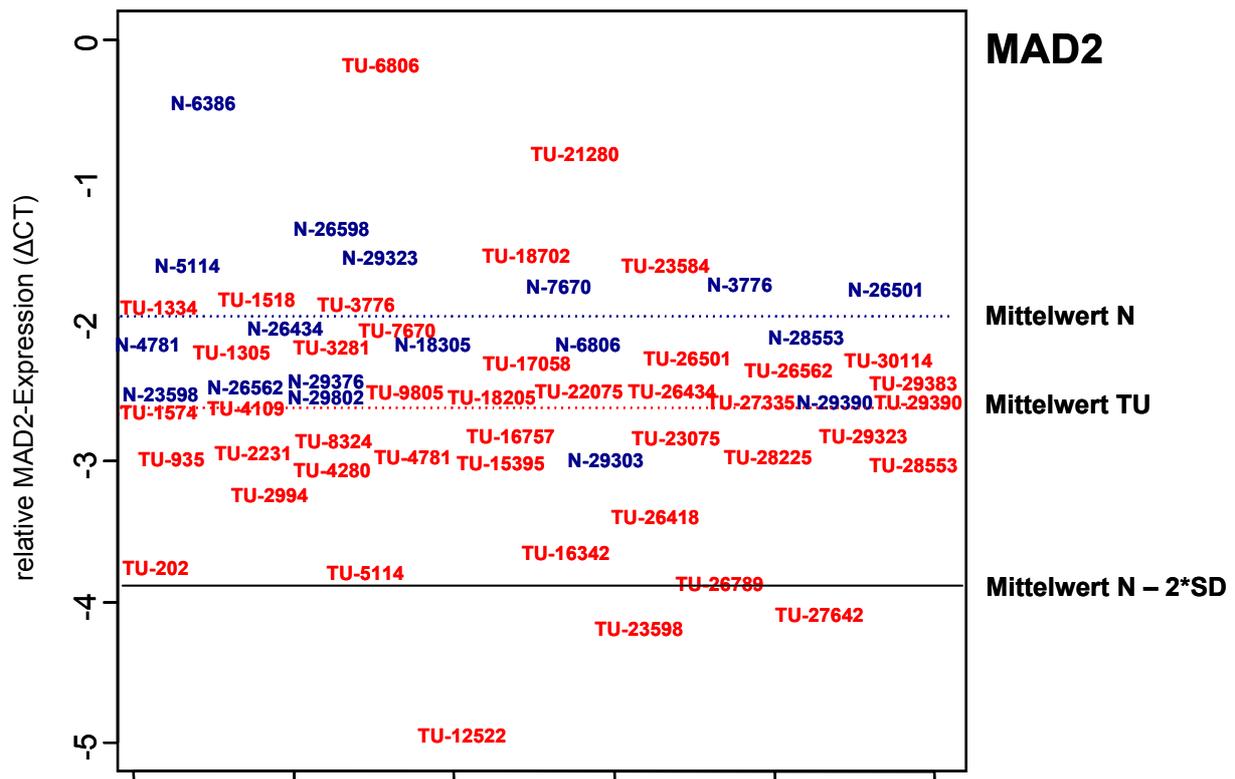


Abbildung 17: Relative Expressionslevel von MAD2 bei den untersuchten Proben. Die Tumorproben (TU) sind rot, die Normalgewebe (N) blau markiert. Nur 3 der 34 Tumorproben wurden analog der Einteilung in Abbildung 16 als „MAD2-low“ klassifiziert. Alle drei „MAD2-low“-Tumore zeigen auch eine erniedrigte Bub1b-Expression („Bub1b-low“).

Da hierbei nur 3 Tumore (8,8%) eine relative Expression aufweisen, die mehr als zwei Standardabweichungen unterhalb des durchschnittlichen Expressionslevels der Gruppe der Normalgewebe liegt („MAD2-low“), erschien in Anbetracht der geringen Fallzahlen eine statistische Analyse der klinischen Merkmale als wenig aussagekräftig. Um sich dennoch eine Vorstellung von der möglichen Bedeutung der MAD2-Expression für klinische Parameter machen zu können, wurde die Trennlinie so nach oben verschoben, dass die Gruppe MAD2-low nicht wie ursprünglich aus 3 sondern nunmehr aus 8 von 34 (23,5%) Tumorproben besteht. Die Trennung erfolgte dabei willkürlich.

Ergebnisse

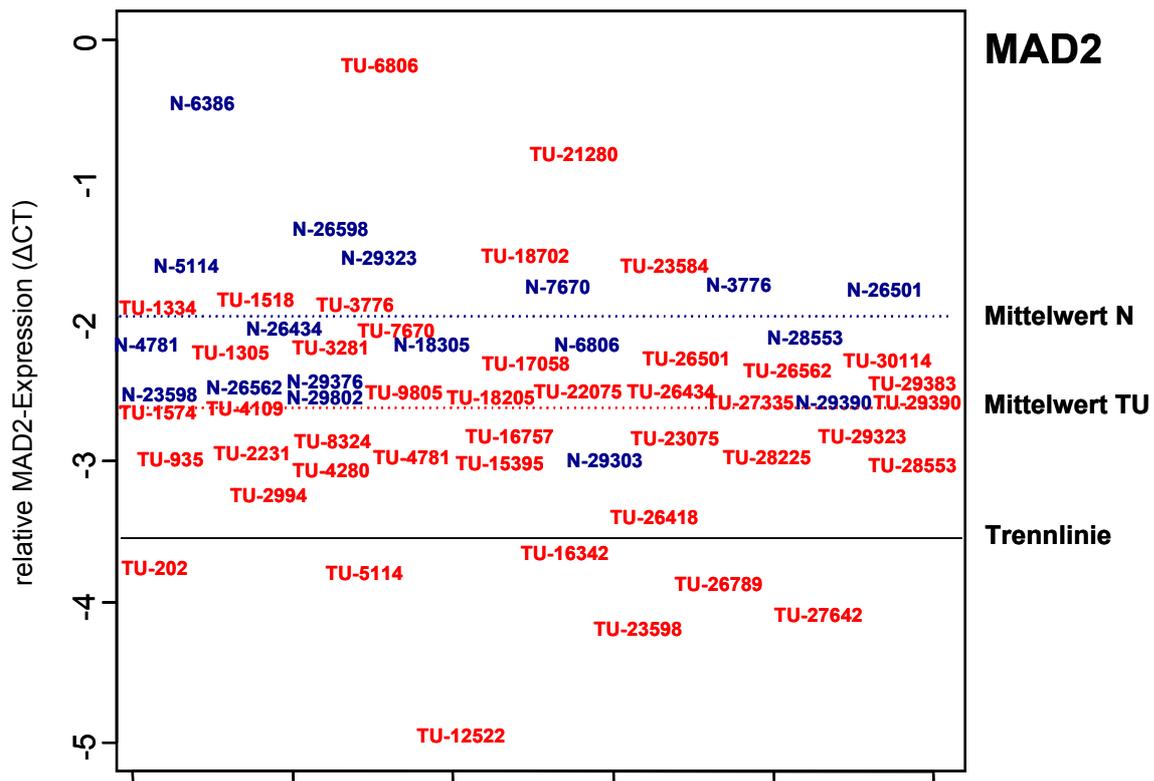


Abbildung 18: Relative Expressionslevel von MAD2 bei den untersuchten Proben. Nach willkürlicher Festlegung der Trennlinie umfasst die Gruppe „MAD2-low“ nun 8 der 34 Tumorproben.

Vergleichbar zu Bub1b erfolgte auch hier die Korrelation der MAD2-low- und MAD2-normal-Karzinomproben hinsichtlich dem Grading nach Gleason, Tumorstadium, Lymphknotenstatus und Alter der Patienten bei Diagnosestellung.

4.2.2.3 Tumorigradung nach Gleason

4.2.2.3.1 Bub1b

Abbildung 19 zeigt die Verteilung der Tumorproben (getrennt nach den Gruppen Bub1b-low und Bub1b-normal) entsprechend ihrem histologischen Grading nach Gleason.



Abbildung 19: Korrelation der Bub1b-Expression mit dem Gleason-Score.
 7 von 9 Tumorproben aus der Gruppe Bub1b-low haben einen Gleason-Score von mindestens 8. Die Unterschiede zwischen den Tumorgruppen sind signifikant (*; $p \leq 0,05$).

Während die Tumore mit höheren Bub1b-Expressionswerten vor allem mit Gleason-Scores ≤ 7 klassifiziert wurden (75,8%), sind die Bub1b-low-Tumorproben vorrangig in höheren Gleason-Scores zu finden: 7 von 9 Proben (77,8%) haben einen Gleason-Score von ≥ 8 . Kein einziger der analysierten Bub1b-low-Tumore hatte einen geringeren Gleason-Score als 7.

Es bestehen signifikante Unterschiede zwischen Bub1b-low- und Bub1b-normal-Tumoren in der Häufigkeitsverteilung der einzelnen Gleason-Scores (Fisher's Exact Test; $p \leq 0,05$).

Ergebnisse

4.2.2.3.2 MAD2

Ähnlich den Bub1b-normal-Tumoren ist auch die Häufigkeitsverteilung der MAD2-normal-Tumore (s. Abbildung 20). 20 von 26 Tumoren (76,9%) sind mit einem Gleason-Score von ≤ 7 klassifiziert.

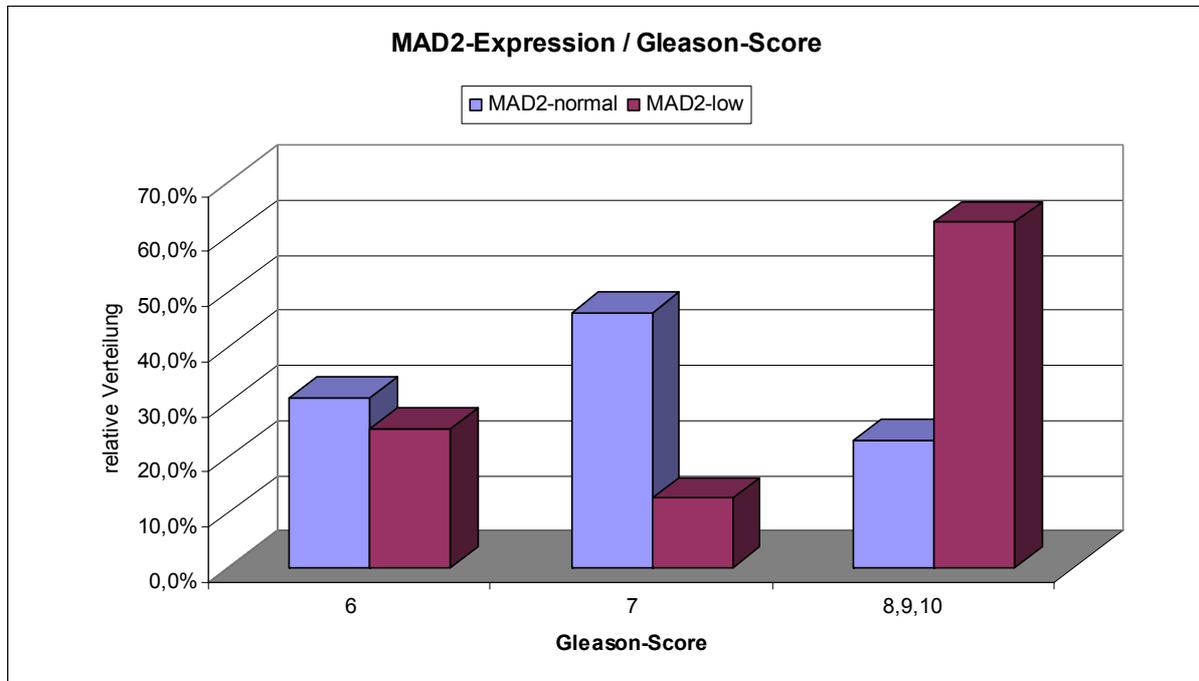


Abbildung 20: Korrelation der MAD2-Expression mit dem Gleason-Score.
5 von 8 (62,5%) MAD2-low-Tumore haben einen Gleason-Score von 8 oder mehr.
77,0% der Tumore aus der Gruppe MAD2-normal liegen unterhalb des Gleason-Scores von 8.

Unter den Tumoren mit verminderter MAD2-Expression überwiegen hingegen wiederum Gleason-Scores von ≥ 8 (62,5%). Auffällig ist, dass die Mehrzahl der MAD2-normal-Tumore mit einem Gleason-Score von 7 vergesellschaftet ist, während dies in der Gruppe der MAD2-low-Tumore nur für eine Probe zutrifft.

Ein signifikanter Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen konnte nicht gezeigt werden (Fisher's Exact Test; $p > 0,05$).

4.2.2.4 Tumorstadium nach TNM (UICC)

4.2.2.4.1 Bub1b

In der Gruppe Bub1b-normal waren zum Zeitpunkt der pathohistologischen Begutachtung 17 von 33 Tumoren (51,5%) auf die Prostata begrenzt (Tumorstadium pT2). Nur 4 Tumoren (12,1%) zeigten einen lokal fortgeschrittenen Tumor im Stadium pT3b mit Befall der Samenblase(n). Für fünf der untersuchten Tumore ist das Tumorstadium nicht bekannt.

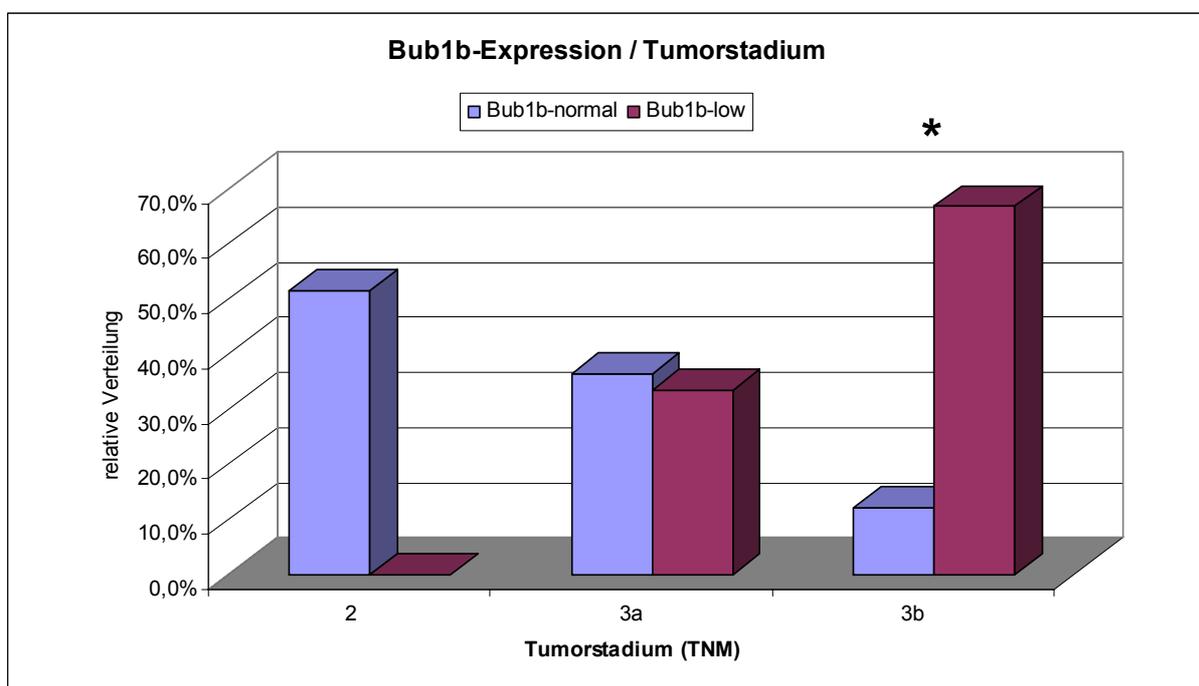


Abbildung 21: Korrelation der Bub1b-Expression mit dem Tumorstadium.

Alle Tumore der Gruppe Bub1b-low haben bereits die Prostatakapsel durchbrochen. Mehr als die Hälfte der Bub1b-normal-Tumore befand sich hingegen noch im organbegrenzten Stadium pT2. Der Unterschied zwischen den Tumorgruppen ist statistisch signifikant (*; $p \leq 0,05$).

Anders die Verteilung in der Gruppe der Bub1b-low-Tumore: Hier entfallen 6 von 9 Tumore (66,7%) auf das Tumorstadium pT3b. Kein einziger der untersuchten Tumore aus dieser Gruppe blieb auf die Prostata begrenzt (pT2).

Zwischen den Gruppen bestehen signifikante Unterschiede in der Häufigkeitsverteilung der Tumorstadien (Fisher's Exact Test; $p \leq 0,05$).

Ergebnisse

4.2.2.4.2 MAD2

In der Gruppe MAD2-normal nimmt die absolute Häufigkeit mit höheren Tumorstadien stetig ab. 12 von 26 Tumore (46,2%) blieben auf das Organ begrenzt (pT2). Nur 4 von 26 Tumoren (15,4%) sind dem Tumorstadium pT3b zuzuordnen.

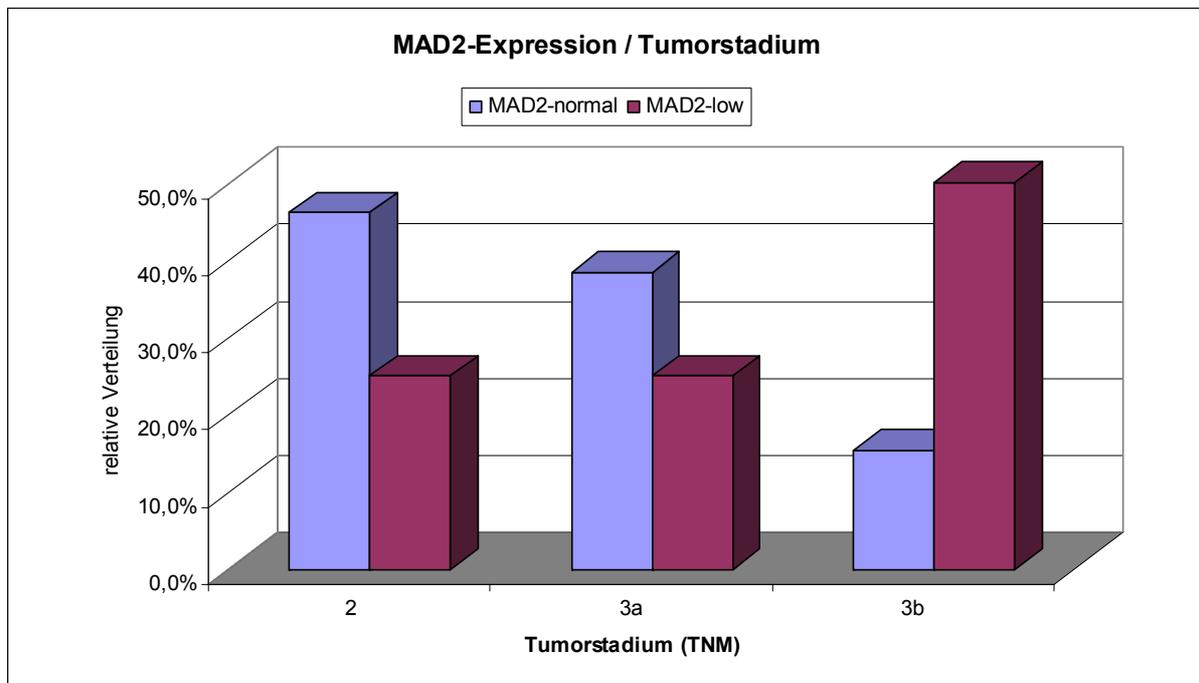


Abbildung 22: Korrelation der MAD2-Expression mit dem Tumorstadium.
Jeder zweite Tumor der Gruppe MAD2-low findet sich im lokal fortgeschrittenen Stadium pT3b. Die absolute Häufigkeit in der Gruppe MAD2-normal nimmt hingegen mit steigendem Tumorstadium stetig ab.

In der Gruppe MAD2-low hingegen war jeder zweite Tumor (4 von 8) zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bereits im lokal fortgeschrittenen Stadium pT3b. Auf die Stadien des organbegrenzten Tumors (pT2) sowie des kapselüberschreitenden, die Samenblasen noch nicht infiltrierenden Tumors (pT3a), entfallen je zwei MAD2-low-Tumore (jeweils 25%).

Der Vergleich der Tumorstadien beider Gruppen zeigte keine signifikanten Unterschiede (Fisher's Exact Test; $p > 0,05$).

4.2.2.5 Lymphknotenstatus

4.2.2.5.1 Bub1b

Unter den Bub1b-normal-Tumoren waren 27 von 33 Proben (81,8%) histopathologisch ohne regionäre Lymphknotenmetastasen. In 6 Fällen (18,2%) war mindestens ein benachbarter Lymphknoten infiltriert. Bei fünf Proben war der Lymphknotenstatus nicht beurteilbar.

Bei den 9 Bub1b-low-Tumoren überwiegen hingegen die Fälle mit positivem Lymphknotenstatus. Den 5 Tumoren (55,6%) mit lymphogener Streuung stehen 4 Tumore (44,4%) ohne Nachweis befallener Lymphknoten gegenüber.

Der Vergleich des Lymphknotenstatus ergibt signifikante Differenzen zwischen den zwei untersuchten Gruppen (Fisher's Exact Test; $p \leq 0,05$).

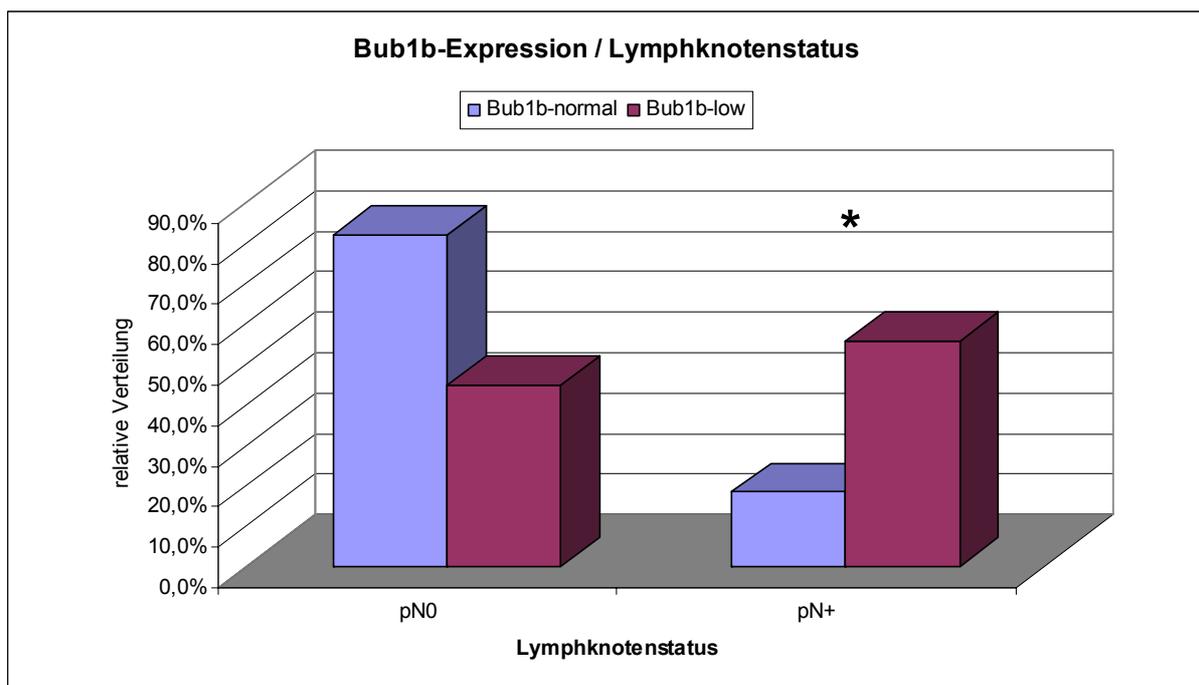


Abbildung 23: Korrelation der Bub1b-Expression mit dem Lymphknotenstatus.
 Mehr als die Hälfte aller Tumore mit niedriger Bub1b-Expression zeigen Lymphknotenmetastasen. Demgegenüber sind mehr als 80 Prozent der Bub1b-normal-Tumore im Lymphknotenstatus pN0.
 Der Unterschied ist statistisch signifikant (*; $p \leq 0,05$).

Ergebnisse

4.2.2.5.2 MAD2

Analog den Bub1b-normal-Tumoren ist auch die Häufigkeitsverteilung der MAD2-normal-Tumore (s. Abbildung 24). 22 von 26 Proben (84,6%) mit bekanntem Lymphknotenstatus sind ohne Lymphknotenmetastase. In 4 Fällen (15,4%) ist mindestens ein regionärer Lymphknoten infiltriert.

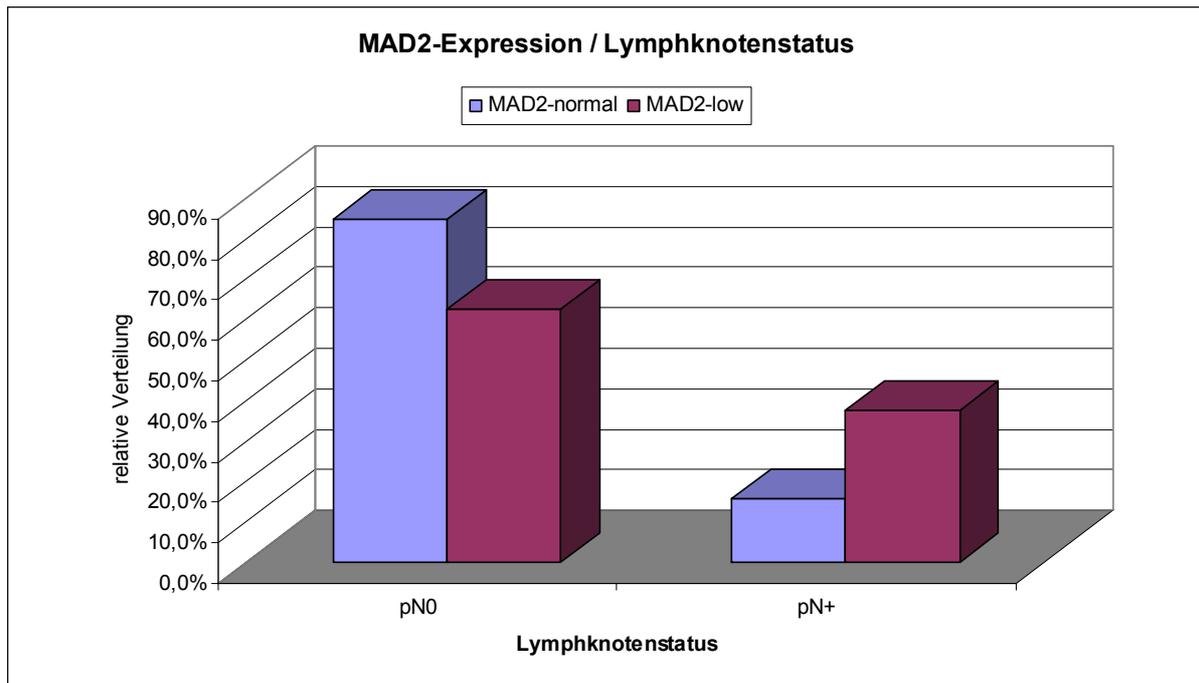


Abbildung 24: Korrelation der MAD2-Expression mit dem Lymphknotenstatus.
Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen ($p > 0,05$).

Von den 8 untersuchten MAD2-low-Tumoren sind 5 (62,5%) frei von lymphogenen Metastasen, bei 3 Tumoren (37,5%) liegt eine Infiltration des Prostatakarzinoms in das Lymphsystem vor.

Statistisch sind zwischen beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf den Lymphknotenstatus feststellbar (Fisher's Exakt Test; $p > 0,05$).

4.2.2.6 Alter der Patienten bei Diagnosestellung

4.2.2.6.1 Bub1b

Sowohl in der Gruppe der Bub1b-normal- als auch in der Gruppe der Bub1b-low-Tumore liegt der Altersgipfel für die Diagnosestellung eines Prostatakarzinoms in der untersuchten Stichprobe zwischen dem 66. und dem 70. Lebensjahr. In der Altersklasse bis 60 Jahre ist der Anteil der Patienten mit einem „Bub1b-low“-Tumor (2 von 9; 22,2%) um den Faktor 1,8 höher als der Anteil der Patienten selber Altersgruppe mit einem Bub1b-normal-Tumor (4 von 32; 12,5%).

In Bezug auf das Alter bei Diagnosestellung sind zwischen beiden Gruppen keine statistischen Unterschiede feststellbar (Fisher's Exakt Test; $p > 0,05$).

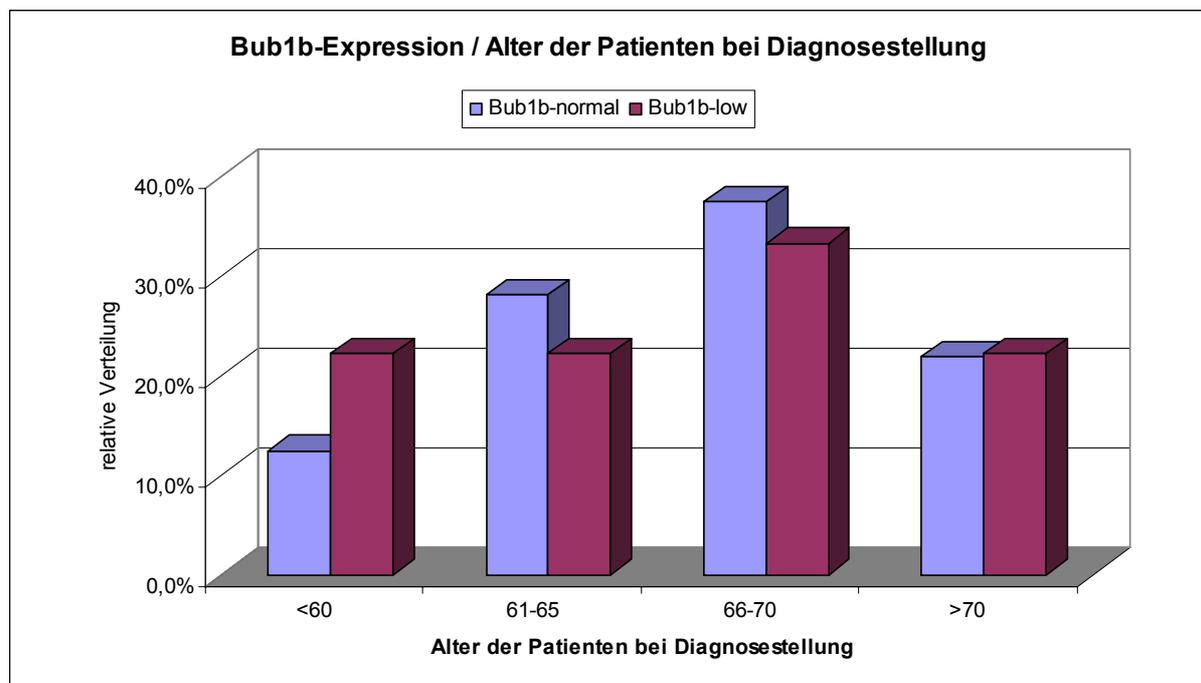


Abbildung 25: Korrelation der Bub1b-Expression mit dem Alter bei Diagnosestellung. Beide Gruppen zeigen ein ähnliches Verteilungsmuster. In der Altersstufe der unter 60jährigen Patienten überwiegen zwar die Tumore mit geringer Bub1b-Expression, der Unterschied ist jedoch nicht signifikant ($p > 0,05$).

Ergebnisse

4.2.2.6.2 MAD 2

Der Altersgipfel für die Diagnose eines Prostatakarzinoms aus der Gruppe MAD2-normal liegt im erfassten Untersuchungsgut zwischen dem 62. und dem 72. Lebensjahr (18 von 26; 69,2%). Der Anteil der über 70jährigen ist kleiner als 20 Prozent.

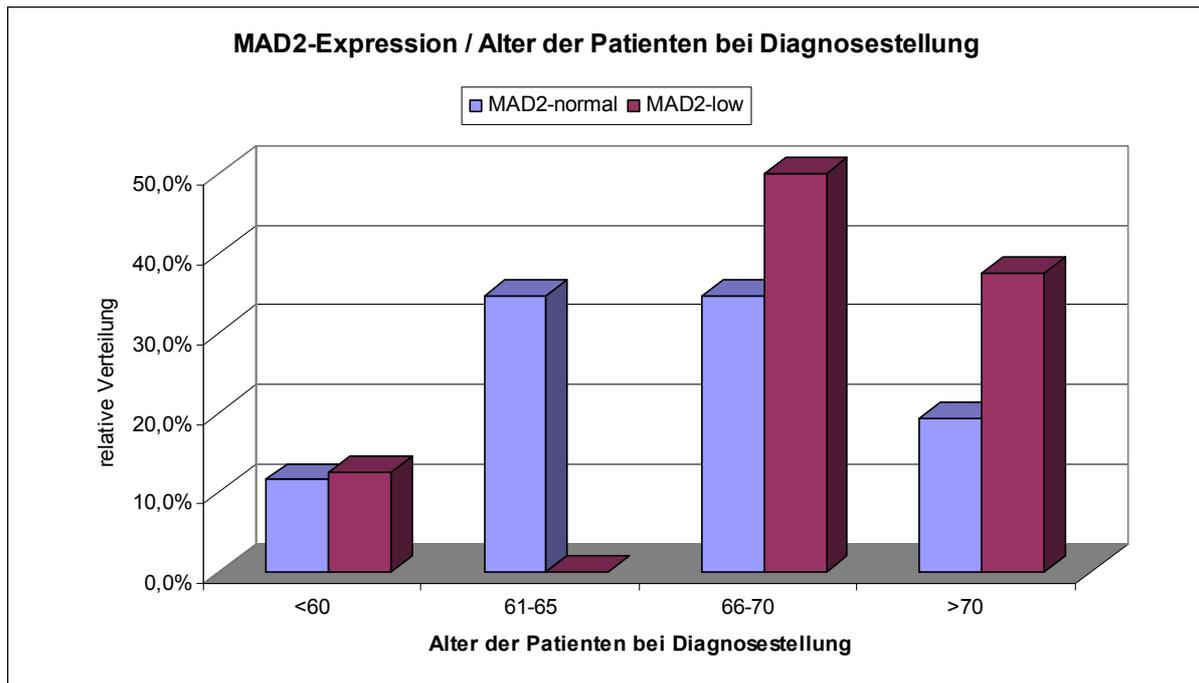


Abbildung 26: Korrelation der MAD2-Expression mit dem Alter der Patienten bei Diagnosestellung. 7 von 8 Patienten (87,5%) der Gruppe MAD2-low waren bei Entdeckung des Prostatakarzinoms bereits älter als 65 Jahre. In der Vergleichsgruppe traf dies nur auf 53,8% der Patienten zu.

7 von 8 (87,5%) Patienten aus der Gruppe der MAD2-low-Tumore hatten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung das 66. Lebensjahr bereits vollendet.

Statistisch ist kein signifikanter Unterschied in der Häufigkeitsverteilung der beiden Gruppen für das Alter bei Diagnosestellung vorhanden (Fisher's Exakt Test; $p > 0,05$).

5 DISKUSSION

Das Mismatch-Repair-System sowie der Spindelcheckpoint stellen spezifische Reparatur- bzw. Überwachungssysteme der Zellen dar. Defekte in diesen Systemen können nachweislich zur malignen Entartung der betroffenen Gewebe beitragen. Im ersten Teil der Arbeit wurde daher die Bedeutung von Mikrosatelliteninstabilitäten als Ausdruck einer MMR-Defizienz in Prostatakarzinomen untersucht. Neben der Bestimmung der Prävalenz von MSI im verwendeten Untersuchungsmaterial lag das Hauptaugenmerk auf der Analyse von Korrelationen zwischen mikrosatelliteninstabilen Prostatakarzinomen mit klinischen Parametern. Der zweite Teil der Arbeit untersucht, inwieweit Aberrationen in Expressionsleveln bestimmter Spindelcheckpoint-Gene in Adenokarzinomen der Prostata auftreten und welche Bedeutung ihnen in Bezug auf den klinischen Verlauf der Tumorerkrankung möglicherweise zukommen.

5.1 Analyse auf Mikrosatelliteninstabilitäten in Prostatakarzinomen

5.1.1 Häufigkeit von Mikrosatelliteninstabilitäten in Malignomen des Menschen

Defekte in Mismatch-Repair-Systemen (MMR-System) können über eine Akkumulation von Replikationsfehlern genomische Instabilität verursachen und so zur malignen Transformation einer Zelle beitragen. Durch Mutationsereignisse hervorgerufene Längenänderungen im Bereich der sogenannten Mikrosatelliten entstehen in MMR-defizienten Zellen Mikrosatelliteninstabilitäten (MSI), die als Indikatoren für Funktionsdefekte des MMR-Systems gelten (s. Abschnitt 1.3.1.1.). So konnten MSI in Tumoren von Patienten beobachtet werden, die Keimbahnmutationen in MMR-Genen tragen (HNPCC). Darüber hinaus wurde MSI auch in einer Vielzahl sporadisch auftretender Malignome unterschiedlicher Organe nachgewiesen. Aus diesen Befunden wird geschlossen, dass das MMR-System in diesen sporadisch auftretenden Tumoren eine wichtige Rolle in der Tumorgenese besitzt. Einen Überblick über ausgewählte Studien mit den dort angegebenen MSI-Prävalenzen für unterschiedliche Malignome gibt Tabelle 2.

Diskussion

Malignom (Organ)	Anzahl Proben	Anzahl Marker	MSI-Prävalenz (≥ 1 Marker MSI+)	MSI-H (≥ 40 % der Marker MSI+)	Studie
Cervix	89	30	13,5 %	3,4 %	Larson et al., 1996 ¹⁸⁹
	13	4	15,4 %	n.a.	Han et al., 1993 ¹⁹⁰
CML	19	5	73,7 %	52,6 %	Wada et al., 1994 ¹³⁵
Endometrium	36	≤ 71	16,7 %	n.a.	Risinger et al., 1993 ¹⁹¹
	65	8	18,5 %	~ 9,2 %	Katabuchi et al., 1995 ¹⁹²
	205	3	20,0 %	20,0 %	Bilbao et al., 2006 ¹⁹³
	18	n.a.	22,2 %	n.a.	Peltomäki et al., 1993 ¹⁹⁴
	30	n.a.	23,3 %	n.a.	Burks et al., 1994 ¹⁹⁵
	109	8	24,8 %	≤ 9,2 %	Caduff et al., 1996 ¹⁹⁶
Kolon (HNPCC)	29	5-14	n.a.	n.a.	Aaltonen et al., 1994 ¹³⁷
	74	n.a.	91,9 %	n.a.	Liu et al., 1996 ¹⁴²
Kolon (sporadisch)	49	5-14	n.a.	n.a.	Aaltonen et al., 1994 ¹³⁷
	160	n.a.	10,0 %	n.a.	Ionov et al., 1993 ⁷⁹
	18	4	11,1 %	n.a.	Han et al., 1993 ¹⁹⁰
	243	7	16,5 %	≤ 9,5 %	Lothe et al., 1993 ¹⁹⁷
	90	n.a.	27,8 %	n.a.	Thibodeau et al., 1993 ⁷⁸
	108	3	29,6 %	n.a.	Watatani et al., 1996 ¹⁹⁸
	209	11	34,9 %	14,3 %	Goel et al., 2003 ¹⁹⁹
Leber	29	4	3,4 %	n.a.	Han et al., 1993 ¹⁹⁰
Lunge	85	n.a.	0,0 %	n.a.	Peltomäki et al., 1993 ¹⁹⁴
	51	4	49,0 %	7,8 %	Miozzo et al., 1996 ²⁰⁰
Magen	33	n.a.	18,2 %	n.a.	Peltomäki et al., 1993 ¹⁹⁴
	22	4	22,7 %	4,5 %	Toh et al., 1996 ²⁰¹
	22	10	22,7 %	9,1 %	Mironov et al., 1994 ²⁰²
	169	8	29,6 %	17,1 %	Schneider et al., 2000 ²⁰³
	76	2	32,9 %	n.a.	Chong et al., 1994 ²⁰⁴
	59	7	33,9 %	n.a.	Lin et al., 1995 ²⁰⁵
	61	5-6	34,4 %	19,7 %	Dos Santos et al., 1996 ²⁰⁶
	57	2	38,6 %	n.a.	Han et al., 1993 ¹⁹⁰
	327	1	9,5 %	9,5 %	Lee et al., 2002 ²⁰⁷
36	5 P	58,3 %	19,4 %	Liu et al., 2005 ²⁰⁸	
Mamma	84	n.a.	0,0 %	n.a.	Peltomäki et al., 1993 ¹⁹⁴
	84	7	0,0 %	0,0 %	Lothe et al., 1993 ¹⁹⁷
	267	102	≤ 3,7 %	n.a.	Anbazhagan et al., 1999 ²⁰⁹
	26	4	3,8 %	n.a.	Han et al., 1993 ¹⁹⁰
	78	10	5,1 %	2,6 %	Shaw et al., 1996 ²¹⁰
	88	10	6,8 %	n.a.	Caldes et al., 2000 ²¹¹
	108	22	10,2 %	≤ 4,6 %	Iwase et al., 1997 ²¹²
	20	7	20,0 %	10,0 %	Yee et al., 1994 ²¹³
	69	15	20,3 %	≤ 10,1 %	Ottini et al., 2000 ²¹⁴
	28	8	21,4 %	n.a.	Contegiacomo et al., 1995 ²¹⁵
	69	1	29,0 %	n.a.	Karnik et al., 1995 ²¹⁶
37	11	29,7 %	n.a.	Paulson et al., 1996 ²¹⁷	
	40	10	20,0 %	0,0 %	Peris et al., 1995 ²¹⁸
Melanom	22	3-6	22,2 %	n.a.	Birindelli et al., 2000 ²¹⁹
	20	5-7	25,0 %	n.a.	Talwalkar et al., 1998 ²²⁰
Ösophagus, Adeno-Carcinom	32	n.a.	18,7 %	n.a.	Nakashima et al., 1995 ²²¹
	36	5	22,2 %	n.a.	Meltzer et al., 1994 ²²²
Ovarien	26	□	3,8 %	3,8 %	Allen et al., 2000 ²²³
	74	> 20	5,4 %	n.a.	Pieretti et al., 1995 ²²⁴
	90	3	12,2 %	n.a.	Arzimanoglou et al., 1996 ²²⁵
	19	4	15,8 %	n.a.	Han et al., 1993 ¹⁹⁰
	47	n.a.	17,0 %	n.a.	Fujita et al., 1995 ²²⁶
	109	14	35,8 %	11,9 %	Sood et al., 2001 ²²⁷
Pankreas	16	n.a.	0,0 %	n.a.	Ghimenti et al., 1999 ²²⁸
	82	5	3,6 %	3,6 %	Goggins et al., 1998 ²²⁹
	5	12	40,0 %	n.a.	Brentnall et al., 1995 ²³⁰
	9	4	66,6 %	n.a.	Han et al., 1993 ¹⁹⁰
Prostata			2 – 65 %		s.u.
Sarkom	18	n.a.	11,1 %	n.a.	Peltomäki et al., 1993 ¹⁹⁴
	44	9	25,0 %	6,8 %	Risinger et al., 1995 ²³¹
Urothel	33	6	3,0 %	0,0 %	Bonnal et al., 2000 ²³²
	200	5	3,0 %	1,5 %	Gonzalez-Zulueta et al., 1993 ²³³
	72	10	16,7 %	0,0 %	Li et al., 1996 ²³⁴
	38	9	21,0 %	n.a.	Uchida et al., 1996 ²³⁵
	14	22	100,0 %	n.a.	Christensen et al., 1998 ²³⁶

Tabelle 2: Überblick über in Studien angegebene Häufigkeiten des Vorkommens von MSI in unterschiedlichen Malignomen des Menschen. Den Angaben über die Prävalenzen von Mikrosatelliteninstabilitäten liegen dabei die Definitionen der Autoren zugrunde. Fehlende Informationen sind entsprechend gekennzeichnet (n.a.). Repräsentative Studien wurden mittels Fettdruck hervorgehoben.

Aus den Ergebnissen dieser Arbeiten kann zusammenfassend geschlossen werden, dass MMR-Defekte in Tumoren aller untersuchten Gewebe auftreten können. Am häufigsten von Mikrosatelliteninstabilitäten betroffen sind Karzinome des Kolons von HNPCC-Patienten: in bis zu 90 Prozent der untersuchten Tumore waren hier in mindestens einem untersuchten Marker Instabilitäten im Erbgut zu finden.¹⁴² Im Gegensatz dazu sind die Raten für MSI in sporadisch auftretenden Malignomen erwartungsgemäß deutlich geringer, eine erhöhte MSI-Rate findet sich jedoch in sporadischen Tumoren, die als HNPCC-assoziiert gelten, wie beispielweise das Magenkarzinom oder Malignome des Endometriums.¹⁹⁴ Für die übrigen sporadischen Karzinome werden die MSI-Prävalenzen, d.h. der Anteil an Patienten am Gesamtkollektiv mit Instabilitäten in mindestens einem der untersuchten Marker, je nach Studie und in Abhängigkeit von der Wahl und Anzahl der untersuchten Marker nur in wenigen Fällen mit mehr als 30 Prozent angegeben.

Der Vergleich der unterschiedlichen Studienergebnisse zeigt auch innerhalb ein und desselben untersuchten Organs eine teils große Diskrepanz zwischen den einzelnen Angaben der Autoren. Eine mögliche Erklärung findet sich in den unterschiedlichen zur Verwendung kommenden Markern und deren Anzahl. Im menschlichen Genom existieren ca. 50.000 bis 100.000 repetitive Sequenzen.²³⁷ Diese als Mikrosatelliten bekannten Sequenzen können jeweils alle von genomischen Veränderungen betroffen sein und je nach verwendetem Marker als Mikrosatelliteninstabilität detektiert werden. Untersuchungen an Adenokarzinomen des Magens zeigten, dass bei der Verwendung einer nur hinreichend großen Anzahl von Mikrosatellitenmarkern in nahezu allen Proben zumindest in geringem Ausmaß Instabilitäten gefunden werden konnten.²³⁸ Die Anzahl der in einer Studie verwendeten Mikrosatellitenmarker spielt somit eine entscheidende Rolle für die Detektion vorhandener Instabilitäten und erschwert die Vergleichbarkeit unterschiedlich konzipierter Studien noch zusätzlich. Inwieweit den so als MS-instabil klassifizierten Malignomen jedoch tatsächlich eine Defizienz im MMR-System zugrunde liegt, oder ob der Fund lediglich als bedeutungsloses Hintergrundrauschen bei intaktem zellulärem MMR-System verstanden werden muss, war lange Zeit ein kontrovers diskutiertes Thema. Zumindest für die Detektion von MSI in kolorektalen Karzinomen wurden 1998 durch

Diskussion

das National Cancer Institute (NCI) Richtlinien formuliert, welche auf Basis der Untersuchung von nur fünf definierten Markern (BAT25, BAT26, D2S123, D5S346, D17S250) eine Einteilung der Malignome in drei bestimmte MSI-Klassen (stabil, niedrig- bzw. hochinstabil), entsprechend ihrem mutmaßlichen MMR-Status, ermöglicht. Dieses Vorgehen hat sich bei der Detektion von mikrosatelliteninstabilen Kolon- und nachfolgend auch Ovariakarzinomen bewährt und sollte somit auch für andere Malignome verwendbar sein, auch wenn die verwendeten Marker hierfür noch nicht hinreichend evaluiert wurden.

Einzelne Arbeiten aus Tabelle 2 ermöglichen jedoch eine Abschätzung des mutmaßlichen Anteils mikrosatelliteninstabiler Tumore in den jeweiligen Organen. Die ausgewählten Studien wurden entsprechend gekennzeichnet. Ausgewählt wurden Studien mit einem größeren Patientenkollektiv, deren angegebene MSI-Prävalenzen als durchaus realistisch eingeschätzt werden können. Ein wichtiges Auswahlkriterium stellte - neben den verwendeten Markern - vor allem eine nachvollziehbare, restriktive Definition des MSI-H-Status seitens der Autoren dar. Die auf diese Weise erzielte repräsentative Auswahl zeigt eine Gruppe von Tumoren, in denen sich der Anteil hochinstabiler Karzinome zwischen 10 und 20 Prozent bewegt. Hierzu zählen neben den gynäkologischen Malignomen des Endometriums und des Ovars vor allem das Magenkarzinom, sowie sporadische Kolonkarzinome. In den übrigen Organen ist der Anteil von MSI-H-Tumoren mit Raten von maximal 10 Prozent deutlich geringer. Ausreißer aus diesen Gruppen lassen sich vor allem durch eine geringe Probenanzahl, eine zum Teil sehr hohe Markeranzahl oder eine sehr unscharfe Trennung zwischen stabilen und instabilen Tumoren erklären.

5.1.2 Häufigkeit von Mikrosatelliteninstabilitäten im Adenokarzinom der Prostata

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 153 Prostata-DNA-Proben von Patienten untersucht, die sich aufgrund eines Adenokarzinoms der Prostata in der Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie des Universitätsklinikums Würzburg einer radikalen Prostatektomie unterzogen haben. Untersucht wurden fünf

Mikrosatellitenmarker (Bethesda-Panel) basierend auf den internationalen Kriterien zur Bestimmung von MSI in kolorektalen Karzinomen, bestehend aus zwei Mononukleotid- (BAT25, BAT26), sowie drei Dinukleotidmarkern (D2S123, D5S346, D17S250). Die Einteilung der MSI erfolgte in Anlehnung an diese Kriterien für die Bestimmung von MSI in MSI-H, MSI-L und MSI-S (s. Abschnitt 3.4.6.4).¹⁴³ Bei 24 von insgesamt 153 untersuchten Prostatakarzinomen (15,7%) konnte in mindestens einem der fünf Marker eine Mikrosatelliteninstabilität nachgewiesen werden. 15 dieser Proben (9,8%) wurden gemäß oben genannter Kriterien als MSI-L, 9 (5,9%) als MSI-H bewertet. Die übrigen 84,3% (129 von 153 Proben) waren der Kategorie MSI-S zuzuordnen.

Eine Reihe von publizierten Studien hat sich bereits mit der Detektion von Mikrosatelliteninstabilitäten im Adenokarzinom der Prostata beschäftigt. Die bis dato publizierten Prävalenzen an MSI in mindestens einem der jeweils untersuchten Marker reichen für das Adenokarzinom der Prostata von 6,5% bis 64,9% (Tabelle 3).

Studie	Studienort	Anzahl Proben	Marker	MSI-Prävalenz Originaldaten	„MSI-H“, gemäß Autorenangaben
Gao et al., 1994 ²³⁹	USA	57	18	64,9 %	43,8 %
Uchida et al., 1995 ²⁴⁰	Japan	24	9	37,5 %	n.a.
Egawa et al., 1995 ²⁴¹	Japan	66	8	19,7 %	12,1 %
Terrell et al.; 1995 ²⁴²	USA	40	20	15,0 %	2,5 %
Suzuki et al., 1995 ²⁴³	Japan	48	17	14,6 %	≥ 4,2 %
Cunningham et al., 1996 ²⁴⁴	USA	55	135	32,7 %	0,0 %
Watanabe et al., 1996 ²⁴⁵	Japan	47	23	23,4 %	8,5 %
Dahiya et al., 1997 ²⁴⁶	USA	40	36	45,0 %	2,5 %
Watanabe et al., 1998 ²⁴⁷	Japan	25	12	60,0 %	28,0 %
Crundwell et al., 1999 ²⁴⁸	England	72	21	19,4 %	9,7
Rohrbach et al., 1999 ²⁴⁹	Deutschland	52	9	46,1 %	9,6 %
Perinchery et al., 2000 ²⁵⁰	USA	40	44	45,0 %	n.a.
Ahman et al., 2001²⁵¹	Schweden	77 (HPC)	5	6,5 %	3,9 %
Velasco 2002 ²⁵²	USA	57	4	35,1 %	n.a.
Burger et al., 2006²⁵³	Deutschland	79	6	7,6 %	1,3 %
Sun et al., 2006 ²⁵⁴	USA	6 Zelllinien 28 Xenografts	2	66,7 % bzw. 13,6 %	66,7 % 13,6 %
Azzouzi et al., 2007 ²⁵⁵	England	50	14	8,0 %	0,0 %
eigene Ergebnisse, 2009	Deutschland	153	5	15,7 %	5,9 %

Tabelle 3: Übersicht über die Ergebnisse ausgewählter Studien, welche die Detektion von MSI im Adenokarzinom der Prostata zum Gegenstand hatten. Die Angaben über die MSI-Prävalenzen, insbesondere solche über hochinstabile Proben (MSI-H) entsprechen vorrangig den Angaben und Definitionen der jeweiligen Autoren. Durch Fettdruck hervorgehoben wurden Studien, die aufgrund ihrer Konzeption und Kollektivgröße eine Abschätzung des realen Anteiles hochinstabiler Karzinome im Prostatakarzinom ermöglichen.

Diskussion

In der von Gao et al. als erstes veröffentlichten Untersuchung an 57 Prostatakarzinomen von Patienten aus den USA fand sich bei 64,9% in mindestens einem der angewandten 18 Marker eine MSI. 43,8% der Fälle zeigten Instabilitäten in mindestens zwei Genloci.²³⁹ Ähnlich hohe MSI-Raten wurden von Watanabe et al. in einem japanischen Patientenkollektiv detektiert. Von den 25 analysierten Prostatakarzinomen waren hier 60,0% in mindestens einem von 12 Markern MSI-positiv, 28,0% zeigten gar Instabilitäten in 2 oder mehr Markern.²⁴⁷ In einer früheren Studie fand der Autor bereits in 11 von 47 (23,4%) latenten Prostatakarzinomen genetische Instabilität, 8,5% der Gewebeproben zeigten in mehr als einem der 23 Mikrosatellitenmarker Alterationen.²⁴⁵ Eine von Perinchery et al. in den USA durchgeführte Arbeit untersuchte die Detektionsrate von MSI in 40 Karzinomproben anhand von 44 Mikrosatellitenmarkern (Di-, Tri-, Tetra- und Pentanukleotidmarker) auf 11 verschiedenen Chromosomen. Im genannten Untersuchungsgut lag die MSI-Prävalenz bei insgesamt 45,0%. Dahiya et al. berichteten über ein US-amerikanisches Patientenkollektiv von 40 Patienten, in welchem 45,0% in einem, jedoch nur 2,5% der Proben in mehr als 30 Prozent der untersuchten 36 Marker MSI zeigten.²⁴⁶ Uchida et al. fanden in einem 24 japanische Patienten umfassenden Kollektiv eine Mikrosatelliteninstabilitätsrate von 37,5%, Velasco et al. berichteten bei 4 untersuchten Genloci über einem Anteil von 35,1% MS-instabiler Tumore unter 57 primären Prostatakarzinomen in den USA.^{240,252} Cunningham et al. analysierten 55 Prostatakarzinome unter Verwendung von 135 über das gesamte Erbgut verstreute Mikrosatellitenmarkern. Dabei wiesen 32,7% der Tumore genetische Veränderungen in bis zu zwei der Marker auf. Jedoch fand sich unter den Proben kein Karzinom, welches in mindestens 30 Prozent der Marker MSI-positiv war.²⁴⁴ Eine Studie von Rohrbach et al. untersuchte ein 52 Patienten umfassendes Kollektiv aus Deutschland mit überwiegend schlecht differenzierten Prostatakarzinomen. Bei 27,5% der Patienten fanden die Autoren mindestens eine MSI in einem der 9 verwendeten Marker, 9,6% wiesen sogar in mehreren Markern Instabilitäten auf.²⁴⁹ Egawa et al. suchten in 66 japanischen Patienten mit einem Prostatamalignom nach somatischen Instabilitäten und klassifizierten 19,7% der Fälle als instabil. In 8 Fällen (12,1%) waren MSI in mindestens zwei der 8 untersuchten Marker präsent.²⁴¹

Crundwell et al. analysierten in England 72 Prostatakarzinome aus transurethralen Prostataresektionen (TUR-P) auf Instabilitäten unter Verwendung von 21 Markern. Davon waren 14 (19,4%) respektive 7 (9,7%) Fälle in mindestens einem bzw. mehreren Genloci instabil.²⁴⁸ Terrell et al. berichteten über eine mit 2,5% sehr geringe Rate an Tumoren mit Instabilitäten in mehreren Genloci. Bei den untersuchten 40 US-amerikanischen Prostatakarzinompatienten fanden die Autoren in 6 Fällen (15,0%) in mindestens einem der 20 Marker eine MSI. Alle MSI fanden sich dabei in Tetranukleotidmarkern, kein einziger Dinukleotidmarker indizierte eine genetische Alteration.²⁴² Auch Suzuki et al. beobachteten in Japan - bei einer Instabilitätsrate von insgesamt 14,6% in dieser Studie - eine nur geringe Rate mehrfach instabiler Prostatakarzinome.²⁴³ Von den 48 untersuchten Prostatakarzinomen waren lediglich 2 (4,2%) in mehr als einem von 17 Genloci auffällig. Unter den von Azzouzi et al. untersuchten 50 radikal prostat- bzw. cystoprostatektomierten Patienten fand sich keine Karzinomprobe mit multiplen Mikrosatelliteninstabilitäten. 4 Gewebeproben (8,0%) zeigten vereinzelte Instabilitäten in repetitiven Sequenzen.²⁵⁵

Die Arbeit der schwedischen Arbeitsgruppe Åhman et al. untersuchte 77 Patienten mit hereditärem Prostatakarzinom auf MSI. Verwendet wurden insgesamt 5 Mikrosatellitenmarker basierend auf den internationalen Kriterien zur Bestimmung von MSI in kolorektalen Karzinomen.¹⁴³ 6,5% der Karzinome wurden als instabil deklariert, 3,9% der Fälle wurden von den Autoren als MSI-H klassifiziert. Eine ebenfalls sehr geringe Anzahl hochinstabiler Prostatakarzinome findet sich in einer Studie von Burger et al.: in dem 79-köpfigen Patientenkollektiv waren 1,3% der untersuchten Tumore in mindestens zwei der untersuchten sechs Marker aus dem erweiterten NCI-Consensus-Panel MSI-positiv, wobei jedoch nicht für alle Proben Aussagen über den Instabilitätsstatus aller sechs Marker vorliegen.²⁵³

Sun et al. schließlich untersuchten die MSI-Häufigkeit in sechs Zelllinien und 28 Xenografts schlecht differenzierter Prostatakarzinome oder deren Metastasen. Unter der Verwendung von zwei Mononukleotidmarkern beobachteten sie in den Xenografts eine Instabilitätsrate, die mit 13,6% ähnlich hoch war wie die in fortgeschrittenen, schlecht differenzierten Prostatakarzinomen. Vier der sechs untersuchten Zelllinien (66,7%) waren mikrosatelliteninstabil. Die Autoren schlossen

Diskussion

daraus, dass den im Vergleich zu den vorgenannten Studien in Zelllinien deutlich höheren MSI-Prävalenzen eine vermehrte Akkumulation von Replikationsfehlern in den Tumorzelllinien zugrunde liege.²⁵⁴ Eine direkte Vergleichbarkeit der so gewonnenen Erkenntnisse mit Beobachtungen aus primären Prostatakarzinomen ist daher nicht empfehlenswert.

Das im Rahmen der eigenen Studie untersuchte Patientenkollektiv zeigte in 15,7% aller Gewebeproben in mindestens einem der fünf untersuchten Marker eine MSI. Im Kontext zu den bisher veröffentlichten MSI-Raten im Prostatakarzinom, die von 6,5% (Åhman) bis 64,9% (Gao) reichen, ist die Prävalenz in der vorliegenden Studie relativ gering. Unterschiede zwischen den Studienergebnissen lassen sich durch die verwendeten Patientenkollektive, welche sowohl hinsichtlich ihrer Größe (24-77 Proben, eigenes Kollektiv: 153 Proben), als auch in ihrer Zusammensetzung (Tumorstadien, ethnische Zugehörigkeit der Patienten, Gewebematerial, hereditäre Prostatakarzinome) häufig beträchtliche Unterschiede aufweisen, erklären. Mögliche Faktoren für die zum Teil starke Divergenz der MSI-Prävalenzen stellen die unterschiedliche Wahl und Anzahl der untersuchten Marker sowie die Auswahl der untersuchten Patientenkollektive dar. Hierbei steigt theoretisch die Chance, mit einer Vergrößerung des Markerpanels eine MSI zu detektieren. Die Arbeit von Cunningham et al. zeigt jedoch, dass die Verwendung einer sehr großen Anzahl untersuchter Genloci nicht zwangsläufig mit einem hohen Anteil von mikrosatelliteninstabilen Prostatakarzinomen einhergehen muss. Aus diesen Arbeiten wird deutlich, dass offensichtlich neben der Qualität der verwendeten Marker vor allem auch die Wahl der geeigneten Repeatsequenzen für die Detektion von Tumoren mit einem Mutationsphänotyp von entscheidender Bedeutung ist.

Ein weiteres Problem für die Interpretation der Vorarbeiten sind die unterschiedlichen Definitionen von Mikrosatelliteninstabilität. Während bezüglich der Definition des Begriffes „Mikrosatelliteninstabilität“ unter den Autoren weitgehend Einigkeit zu herrschen scheint, differieren die Kriterien für die Begriffsbestimmung der hoch instabilen Prostatakarzinome interindividuell zum Teil erheblich. Die Majorität der Autoren deklariert eine Gewebeprobe bereits dann als instabil, wenn ungeachtet der Gesamtmarkerzahl mindestens zwei der untersuchten Genloci eine Alteration

aufweisen - die Gesamtanzahl der untersuchten Marker bleibt dabei jedoch unberücksichtigt. Der Anteil auf dieser Weise definierter hochinstabiler Prostatakarzinome liegt in der genannten Literatur zwischen 0 und 43,8%.

Honchel et al. publizierten, dass in MMR-defizienten Karzinomen meist MSI-Quoten von mindestens 30 Prozent der untersuchten Marker zu finden seien.¹³⁸ Cunningham et al., Dahiya et al. sowie Burger et al. postulierten daher für die Einstufung eines Karzinoms in die Gruppe MSI-H in ihren Arbeiten die Detektion von MSI in mindestens 30 Prozent aller untersuchter Marker. Bei Åhman et al. mussten Karzinome sogar in mindestens 40 Prozent der untersuchten Genloci von Alterationen betroffen sein, um als MSI-H klassifiziert zu werden. Der Anteil hochinstabiler Prostatakarzinome ist bei den vorgenannten Autoren im Gegensatz zu den übrigen Studien sehr gering und liegt mit 0 bis 3,9% deutlich unter 10 Prozent. Ein MSI-H-Anteil im Prostatakarzinom von mehr als 10 Prozent, wie in einigen Studien angegeben, muss bei kritischer Betrachtung als unrealistisch bewertet werden. Verantwortlich dafür sind in den jeweiligen Arbeiten vor allem eine hohe Anzahl teilweise wahllos verwendeter Marker und eine uneinheitlich - im Vergleich zu der NCI-Definition - großzügige Deklaration von Tumoren als hochinstabil. Grundsätzlich ist auch nachdrücklich darauf hin zu weisen, dass keine der letztgenannten, jedoch auch keine der als relevant erachteten Studien eine Fallanzahl von 100 Prostatakarzinomproben erreicht oder gar überschreitet.

Für die eigene Arbeit wurden zur Identifikation hochinstabiler Prostatakarzinome die internationalen Kriterien zur Bestimmung von MSI in kolorektalen Karzinomen nach Boland et al. angewandt. Im Untersuchungsgut wiesen 9 von 153 (5,9%) Gewebeproben in mindestens zwei der fünf Marker ($\geq 40\%$) MSI auf, mit hoher Wahrscheinlichkeit liegt in diesen MSI-H-Karzinomen ein Defekt im MMR-System vor. Die Untersuchungsergebnisse am bis heute größten Patientenkollektiv scheinen aufgrund der vorgenannten Kriterien durchaus mit den Beobachtungen von Åhman et al. (wenngleich hier ausschließlich hereditäre Prostatakarzinome untersucht wurden) sowie Burger et al. vergleichbar zu sein. Aus dem Vergleich der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit den genannten Studien lässt sich somit schließen, dass unter

Diskussion

Verwendung eines standardisierten, international anerkannten Markerpanels, welches auf die Detektion MMR-defizienter Zellverbände abzielt, der Anteil von MSI-H-Tumoren im Adenokarzinom der Prostata mit hoher Wahrscheinlichkeit bei weniger als 10 Prozent liegt.

Als mögliche Erklärung für die vergleichsweise niedrige Prävalenz von hochinstabilen Tumoren im Adenokarzinom der Prostata kann vermutet werden, dass MMR-defiziente Zellen die maligne Entartung eines Gewebes durch die Akkumulation von Replikationsfehlern akzelerieren. Die Mutationsfrequenz ist daher in Malignomen mit einer regen mitotischen Aktivität, wie sie beispielsweise in der Schleimhaut des Gastrointestinaltraktes zu finden ist, erwartungsgemäß erhöht (s. Tabelle 2). Da das Prostatakarzinom im Vergleich zu anderen Tumoren jedoch ein typischerweise langsam wachsendes Malignom darstellt, ist hier durchaus mit einer geringen MSI-Häufigkeit zu rechnen. Unter Umständen spielt auch die Heterogenität des Untersuchungsmaterials eine wesentliche Rolle für das Zustandekommen der Ergebnisse. Da das Prostatakarzinom zumeist ein multifokal entstehendes Malignom mit dementsprechend polyklonalen Anteilen darstellt, muss davon ausgegangen werden, dass die gewonnenen Gewebeproben aus Tumorzellverbänden unterschiedlicher Klonalität bestehen können. Je nach Zusammensetzung des verwendeten Tumoreals kann diese Heterogenität Einfluss auf die Sensitivität der Detektion des MSI-Status nehmen. Je geringer der Anteil eines MMR-defizienten Zellklones am verwendeten Tumormaterial eines Prostatakarzinoms ist, desto geringer ist auch die Wahrscheinlichkeit, die vorhandene Instabilität als solche zu detektieren.

5.1.3 Korrelation von Mikrosatelliteninstabilitäten im Adenokarzinom der Prostata mit klinischen Parametern

Von besonderem klinischen Interesse ist die Frage nach der Existenz von Korrelationen des MSI-Status mit klinisch messbaren Größen. Durch den Nachweis entsprechender Verbindungen zwischen dem Status eines hochinstabilen bzw. MMR-defizienten Malignoms und beispielsweise dem klinischen Krankheitsverlauf

ergäben sich möglicherweise in der Praxis neue Ansätze für eine weitere Therapieoptimierung. Verschiedene histopathologische und klinische Parameter wurden bislang in diversen Studien mit einem positiven MSI-Status korreliert. Die meisten der in Tabelle 3 genannten Autoren fanden dabei jedoch in ihren Kollektiven keine statistisch signifikanten Zusammenhänge zwischen der Präsenz von MSI im Prostatakarzinom und einem der Parameter Alter der Patienten, PSA-Level, Tumorstadium, histologische Tumordifferenzierung oder Rezidivrate. Eine mögliche Erklärung dafür stellen die zum Teil falschen oder ungenauen Definitionen von hochinstabilen Proben dar. Eine zuverlässige Trennung von Karzinomen mit dem Mutationsphänotyp von Proben mit weitgehend intaktem MMR-System ist hierbei oftmals nicht gewährleistet. Zusätzlich könnte die zum Teil sehr geringe Anzahl der von ihnen untersuchten Proben ein Ergebnis mit statistischer Signifikanz verhindern. Auch bei den eigenen Resultaten ließ sich - ausgenommen für das Alter der Patienten bei Diagnosestellung - für die meisten der untersuchten Parameter (Tumordifferenzierung, Tumorstadium, Lymphknotenstatus) kein signifikanter Unterschied der MSI-positiven Karzinome im Vergleich zu den MSI-negativen Karzinomen beobachten ($p > 0,05$). Für die statistische Analyse problematisch erweist sich hierbei vor allem die geringe Häufigkeit hochinstabiler Karzinome in der Prostata.

5.1.3.1 Tumorgrading nach Gleason

Unter den MSI-H-Tumoren fällt ein relativ hoher Anteil der selten diagnostizierten Prostatakarzinome mit einem Gleason-Score von 5 auf (33,3% der MSI-H- vs. 1,6% der MSI-S-Tumore). Ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Gruppe der MSI-H-Prostatakarzinome und dem Grad der Tumordifferenzierung lässt sich nicht nachweisen ($p > 0,05$; Abbildung 10), die Mehrzahl der hochinstabilen Karzinome findet sich aber tendenziell eher in gut differenzierten Tumoren. Im Gegensatz dazu fanden Gao et al. einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von MSI und einer histologisch schlechten Tumordifferenzierung. In dem von ihnen beobachteten Patientenkollektiv zeigten 86,7% der schlecht differenzierten („high-grade“) Prostatakarzinome Instabilitäten in den Mikrosatelliten, in den gut und

Diskussion

mäßig differenzierten Malignomen waren hingegen lediglich 57,1% der Proben MSI-positiv. Auch die Arbeitsgruppen um Uchida bzw. Watanabe (1996) kommen übereinstimmend zum gleichen Schluss. Die Ergebnisse von Dahiya et al. weisen tendenziell in dieselbe Richtung, wenngleich hier eine statistische Signifikanz nicht gezeigt werden konnte. Die Aussagekraft dieser Studien muss jedoch aufgrund vorgenannter struktureller Aspekte als insgesamt gering bewertet werden.

5.1.3.2 Tumorstadium nach TNM (UICC)

Ein Zusammenhang zwischen der Präsenz von MSI in Prostatakarzinomen und dem Tumorstadium wurde 1996 von Watanabe et al. beschrieben. In den von diesen untersuchten Gewebeproben waren 81,8% der infiltrierend wachsenden Karzinome MSI-positiv, bei den organbegrenzten Tumoren lag die MSI-Quote hingegen bei lediglich 5,5%. Dahiya et al. sowie Egawa et al. konnten zwar diesbezüglich keine statistische Signifikanz beobachten, ihre Ergebnisse ließen jedoch ebenfalls ein verstärktes Auftreten von MSI in fortgeschrittenen Tumorstadien erkennen. Im Gegensatz dazu zeigen die eigenen Ergebnisse innerhalb der Prostatakarzinome aus der Gruppe MSI-H ein leichtes Übergewicht der organbegrenzten Tumorstadien (Abbildung 11). 55,6% der Karzinome mit Alterationen in mindestens zwei der untersuchten Marker waren zum Zeitpunkt der Operation auf die Prostata begrenzt (pT2). Darüber hinaus war - im Gegensatz zu den Karzinomen aus den Gruppen mit höchstens einer nachgewiesenen Mikrosatelliteninstabilität - bei keinem der sogenannten kapselüberschreitenden Karzinome eine Infiltration der Samenblasen zu finden (pT3a). Bereits 1972 wurde von Byar und Mostofi gezeigt, dass Patienten mit Samenblasen-infiltrierenden Prostatakarzinomen (pT3b) im Gegensatz zu Patienten ohne Samenblaseninfiltration (pT3a) eine deutlich schlechtere 7-Jahres-Überlebensrate aufweisen (32% vs. 67%).²⁵⁶ Inwiefern nun hochinstabile Prostatakarzinome tatsächlich aufgrund ihres detektierten geringeren Tumorstadiums einen messbaren prognostischen Vorteil besitzen, kann mit den aktuell vorliegenden Verlaufsdaten noch nicht abgeschätzt werden. Hierzu wäre ein längerer Beobachtungszeitraum und eine Erweiterung des Patientenkollektivs wünschenswert. Wenngleich die mit insgesamt 9 hochinstabilen Gewebeproben sehr

geringe Anzahl eine statistisch eindeutige Aussage zu einer möglichen Korrelation des MSI-Status mit dem Tumorstadium verhindert, stehen die bisherigen Ergebnisse trotz allem im Widerspruch zu den vorgenannten, kritisch zu betrachtenden Arbeiten. Die Vermutung, dass der MSI-Status mit dem Tumorstadium korreliert, wird durch Untersuchungen im Magenkarzinom gestützt. Dort waren MSI-positive Karzinome in signifikant erhöhtem Maße mit niedrigen TNM-Stadien und einer günstigeren Prognose assoziiert.²⁰⁷

5.1.3.3 Lymphknotenstatus

Extraglanduläres Tumorwachstum im Sinne von Lymphknotenbefall und Fernmetastasierung ist ein gut untersuchter prognostischer Marker für das Prostatakarzinom. Egawa et al. (1995) beobachteten in dem von ihnen untersuchten Kollektiv eine deutliche statistische Assoziation von Lymphknoten- und Fernmetastasen mit einem gehäuften Auftreten von somatischen Instabilitäten im Prostatakarzinom. Karzinome mit einer diskontinuierlichen Tumorzellstreuung über die Organgrenzen hinweg (N+, bzw. M+) waren 5,3mal häufiger von Mikrosatelliteninstabilitäten betroffen als Karzinome ohne Metastasierung. Die eigenen Untersuchungen zeigen keine statistisch signifikante Korrelation zwischen dem Lymphknoten- sowie dem MSI-Status (Abbildung 12), wenngleich der Anteil lymphknotenpositiver Prostatakarzinome im gesamten Patientenkollektiv mit 14,4% vergleichsweise gering ist. Dennoch wurde in den vorliegenden Analysen bei keinem der 9 hochinstabilen Karzinome histopathologisch eine Lymphknotenmetastase entdeckt. Die Ergebnisse von Egawa et al. ließen sich somit nicht bestätigen. Die eigenen Daten lassen sogar vermuten, dass MSI-H- im Vergleich zu MSI-S-Prostatakarzinomen in geringerem Maße zur Tumorzellstreuung neigen. Dies steht auch im Einklang mit den Beobachtungen von Lee et al. bzw. Malesci et al. in MSI-positiven Magen- bzw. Kolonkarzinomen.^{207,257}

5.1.3.4 Alter der Patienten bei Diagnosestellung

Der einzige statistisch signifikante ($p \leq 0,05$) Zusammenhang in den vorliegenden Ergebnissen zeigte sich für die MSI-positiven Prostatakarzinome im Hinblick auf das

Diskussion

Alter der Patienten bei Diagnosestellung. 66,7% der Patienten mit hochinstabilen Karzinomen (MSI-H) waren zum Zeitpunkt der Probengewinnung bereits älter als 65 Jahre, bei den stabilen Karzinomen (MSI-S) waren hingegen nur 44,0% in dieser Altersgruppe (Abbildung 13). Patienten mit einem mikrosatelliteninstabilen Prostatakarzinom waren demnach zum Zeitpunkt der operativen Intervention signifikant älter als Patienten ohne eine entsprechende genetische Alteration in diesen repetitiven Sequenzen. Die Studien von Egawa, Watanabe (1998), Rohrbach und Azzouzi konnten diesbezüglich im Prostatakarzinom keine Korrelation zeigen. Unter der Annahme, dass kein systematischer Fehler dem beobachteten höheren Alter der Patienten bei Diagnosestellung zugrunde liegt, lässt sich schlussfolgern, dass in dem untersuchten Patientenkollektiv hochinstabile Prostatakarzinome erst in einem vergleichsweise höheren Lebensalter auftreten. Weiterführend wäre nun von Interesse, inwiefern der MSI-Status einen Einfluss auf die klinische oder biochemische Progression der Erkrankung und letztlich auf die Prognose der Karzinompatienten hat. Angesichts unvollständiger Follow-Up-Daten kann zu diesem Zeitpunkt keine Aussage über einen möglicherweise günstigeren Krankheitsverlauf oder gar Überlebensvorteil für Patienten mit MSI-positivem Prostatakarzinom gemacht werden. Jedoch existieren für das Kolonkarzinom Untersuchungen, die zeigen, dass Patienten mit hochinstabilen Karzinomen im Vergleich zu Patienten mit einem intakten MMR-System eine signifikant bessere Prognose haben.²⁵⁸ Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die Beobachtung sein, dass MSI-positive Kolonkarzinome mit einer starken intratumorösen Lymphozyteninfiltration assoziiert sind, welche als effektive Immunantwort des Organismus auf das Malignom zu verstehen ist.²⁵⁹ Diese immunogene Eigenschaft MSI-positiver Tumore könnte für ein verlangsamtes Karzinomwachstum mit zeitlich verzögerter Detektion in höheren Lebensaltern und eine geringere Neigung zur Metastasierung verantwortlich sein. Somit könnte dem MSI-Status auch im Prostatakarzinom die Rolle eines prädiktiven Markers zukommen. Um dies zu klären soll für weiterführende Analysen das bisherige Follow-Up der untersuchten Patienten verlängert bzw. die Untersuchungen auf ein vergrößertes Patientenkollektiv ausgedehnt werden.

Ein anderer Erklärungsversuch sieht den Grund der besseren Überlebensraten von MSI-H-Kolonkarzinomen in einem Unterlaufen der körpereigenen Immunantwort durch Verlust des HLA-Klasse-I-Komplexes. Ein Verlust dieses für die Erkennung von Tumorzellen wichtigen Zellbestandteiles ist eng an die Präsentation von maligne verändertem Zellmaterial gebunden, welches normalerweise von Lymphozyten über den dafür verantwortlichen HLA-Klasse-I-Komplex erkannt wird. MSI-H-Karzinome, in welchen eine gehäufte Bildung aberranter Proteine stattfindet, müssten daher in verstärktem Maße eine Immunantwort stimulieren. Dem Selektionsdruck folgend können sich nun Zellklone hervortun, die sich durch Verlust der HLA-Klasse-I-Komplexe dem Immunsystem des betroffenen Patienten entziehen.²⁶⁰ Auch dieser Prozess könnte an einer Verschiebung hochinstabiler Karzinome in höhere Lebensalter beteiligt sein und erfordert eine weitere Erforschung.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Studie mit dem bislang größten Patientenkollektiv, dass Mikrosatelliteninstabilitäten auch im Prostatakarzinom vorkommen, wenn auch in Relation zu Malignomen von HNPCC-Patienten in einem deutlich geringeren Prozentsatz. Der Anteil hochinstabiler Karzinome ist dabei vor allem im Vergleich zu Malignomen mit einem hohen Zellumsatz deutlich geringer. Trotz Verwendung von nur fünf Mikrosatellitenmarkern war die Gruppe der hochinstabilen Prostatakarzinome mit 5,9% größer als in allen Studien mit einer vergleichbaren Definition hochinstabiler, und damit mit hoher Wahrscheinlichkeit auch MMR-defizienter, Karzinome. Die größte Übereinstimmung bezüglich der Markerauswahl sowie der Definition von MSI-H-Karzinomen besteht mit den Arbeiten von Burger et al. sowie Åhman et al., wenngleich in letzterer das Kollektiv ausschließlich aus Patienten mit hereditären Prostatakarzinomen bestand. Eine statistisch fassbare Beziehung zwischen dem MSI-Status und den untersuchten klinischen Parametern ließ sich nur für das Alter der Patienten bei Diagnosestellung beobachten. Bezüglich der übrigen untersuchten Parameter neigen hochinstabile Adenokarzinome der Prostata zu niedrigeren Tumorstadien, guter Differenzierung und fehlender Lymphknotenmetastasierung.

Diskussion

5.2 Expressionsanalyse der Spindelcheckpoint-Gene Bub1b und MAD2 in Prostatakarzinomen

Der mitotische Spindelcheckpoint stellt während der Zellteilung die paritätische Verteilung der Chromosomen auf die neu entstehenden Tochterzellen sicher (s. Abschnitt 1.3.2). Bei Verlust der korrekten Spindelcheckpoint-Funktion können durch Fehlverteilung aneuploide Zellen entstehen. Aneuploidie ist ein Charakteristikum eines Großteils der menschlichen Malignome und offensichtlich kann eine Fehlfunktion des Spindelcheckpoint-Apparates direkt zur Entstehung chromosomaler Instabilität und zur Karzinogenese beitragen.^{145,181,261} Tatsächlich finden sich Defekte des Spindelcheckpoints beim Menschen in verschiedenen Malignomen, unter anderem in Kolon, Lunge, Leber, Mamma und Ovarien. Diese werden eng mit Aneuploidie und chromosomaler Instabilität assoziiert.^{80,261,262,263,264} Als Ursache eines Funktionsdefektes des Spindelcheckpoints lässt sich dabei jedoch nur in den seltensten Fällen eine Mutation in den Kernkomponenten des Spindelcheckpoints nachweisen, so dass auch andere Mechanismen, wie die Deregulation der Genexpression bestimmter Gene, Einfluss auf die Entwicklung einer chromosomalen Instabilität haben müssen.^{265,266,267,268,269,270}

In der vorliegenden Arbeit wurden mittels quantitativer Real-Time-PCR die mRNA-Expressionslevel der Spindelcheckpoint-Gene MAD2 und Bub1b in Adenokarzinomen der Prostata untersucht. Die relativen Expressionslevel der Karzinomproben für MAD2 wiesen dabei im Vergleich zu assoziiertem, histopathologisch als normal klassifiziertem Prostatagewebe statistisch signifikant reduzierte Genexpressionslevel auf. Die relativen Expressionslevel für Bub1b unterschieden sich hingegen nicht signifikant von dem untersuchten Normalgewebe. Während die interindividuelle Streubreite der relativen Expressionslevel für die Normalgewebe nur gering ist, zeigen die Karzinomgewebe vor allem bezüglich der relativen Bub1b-Expression eine hohe Varianz (s. Abbildung 15). Dabei finden sich in den untersuchten Proben vereinzelt Tumorgewebe mit relativen Überexpressionen, wohingegen in mehreren Tumorproben vergleichsweise geringe Expressionswerte für das jeweils untersuchte Spindelcheckpoint-Gen detektiert wurden. Insgesamt 9 der 47 untersuchten Karzinomgewebe lagen mit ihrem Bub1b-Expressionslevel um

deutlich mehr als zwei Standardabweichungen unterhalb des durchschnittlichen Expressionslevels der Normalgewebe. Diese Tumorproben mit reduziertem Bub1b-Expressionslevel wurden als Bub1b-low klassifiziert (Bub1b-Unterexpression). Um die Expressionsunterschiede zu validieren, wurde in Kooperation mit dem Pathologischen Institut der Universität Würzburg (Dr. P. Adam) mithilfe von kommerziell erhältlichen Bub1b-Antikörpern an den Karzinomgeweben immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Hierbei gelang es jedoch nicht, unter Verwendung eines Bub1b-Antikörpers, der in einer immunhistochemischen Analyse an kolorektalen Karzinomen verwendet wurde, spezifische Kernfärbungen anzufertigen.²⁷¹ Somit konnten die reduzierten Expressionslevel nicht immunhistochemisch bestätigt werden. Für die weitere Etablierung des Bub1b-Expressionslevels als prädiktiven Marker wäre eine verlässliche Klassifizierung und Evaluierung mittels dieser immunhistochemischen Methode für die Zukunft durchaus wünschenswert.

Hinsichtlich der relativen MAD2-Expressionslevel fanden sich unter den untersuchten Karzinomen lediglich 3 Proben, deren MAD2-Expression mehr als zwei Standardabweichungen unterhalb des durchschnittlichen Expressionslevels der Vergleichsgewebe lagen. In Anbetracht der daraus zu erwartenden geringen statistischen Aussagekraft einer so geringen Probenanzahl wurde die Trennlinie zwischen Tumoren mit erniedrigter und solchen mit durchschnittlicher relativer Expression willkürlich angehoben. Ziel dabei war, sich auf diese Weise zumindest einen Eindruck von den möglichen Auswirkungen reduzierter MAD2-Expression auf klinische Parameter des Prostatakarzinoms verschaffen zu können. Gemäß dieser willkürlichen Einteilung zeigten nun 8 der hierfür insgesamt 42 untersuchten Karzinomproben vergleichsweise deutlich verringerte Expressionslevel für MAD2 (s. Abbildung 18).

Das untersuchte Patientenkollektiv beinhaltet demzufolge auch solche Prostatakarzinome, welche offensichtlich im Vergleich zu den übrigen Karzinomproben als auch in Relation zu den untersuchten Normalgeweben reduzierte Expressionslevel für das Spindelcheckpoint-Gen Bub1b – in Einschränkung auch für MAD2 – aufweisen. Vereinzelt lassen sich im Untersuchungsgut auch Überexpressionen der genannten Gene nachweisen. Hierauf

Diskussion

wird jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht dezidiert eingegangen, da aufgrund deren geringer Anzahl eine weitere Diskussion der möglicherweise daraus resultierenden Daten als nicht sinnvoll erscheint. Die vorliegenden Ergebnisse demonstrieren, dass in einem nicht unerheblichen Anteil von Adenokarzinomen der Prostata verringerte Expressionslevel bestimmter Spindelcheckpoint-Gene anzutreffen sind. Wenngleich die Bedeutung reduzierter Expressionslevel von Bub1b bzw. MAD2 im Prostatakarzinom noch weitgehend unbekannt ist, existieren Hinweise dafür, dass eine Deregulation der mRNA-Level in einem Teil der Prostatakarzinompatienten an der Karzinogenese bzw. Tumorprogression beteiligt ist.

Dysregulationen von Spindelcheckpoint-Genen wurden bereits in verschiedenen Tumorarten beschrieben (s. Abschnitt 1.3.2.3). Eine mögliche Erklärung für reduzierte Expressionslevel in menschlichen Karzinomen stellen Hypermethylierungen bestimmter Genexpressionsregulatoren dar. Bekanntermaßen sind hierbei verschiedene Tumorsuppressor-Gene in der Promotorregion von diesen Hypermethylierungen betroffen.^{272,273} Im Prostatakarzinom ist dieses Gensilencing für unterschiedliche Genloci bekannt (Übersicht in Chung et al.²⁷⁴). Vor allem CG-reiche Areale sind von dieser epigenetischen Veränderung betroffen.²⁷⁵ Möglicherweise wird auf diese Weise auch eines oder mehrere der Gene des Spindelcheckpoint-Apparates in ihrer Expression reguliert.

Welche Folgen alterierende Expressionslevel der Checkpointgene mit sich bringen, ist aus verschiedenen tierexperimentellen Arbeiten bekannt. Dabei ist die komplette Deletion von Bub1b bzw. MAD2, zweier Kernkomponenten des Spindelcheckpoint-Apparates, im Mausmodell mit dem Leben nicht vereinbar und führt über zahlreiche chromosomale Fehltrennungen und Apoptosen zu früher embryonaler Sterblichkeit.^{180,182} Bub1b- bzw. MAD2-haploinsuffiziente Mäuse mit - durch verminderte Genexpressionslevel - kompromittiertem Spindelcheckpoint-Apparat zeigten hingegen im Vergleich zum Wildtyp deutlich vermehrt chromosomale Fehlverteilung sowie eine erhöhte Inzidenz für die Entwicklung spontaner bzw. karzinogen-induzierter Tumore.^{181,183} Der partielle Verlust der Spindelcheckpoint-Aktivität ist somit im Gegensatz zur vollständigen Checkpoint-Deletion durchaus mit

dem Zellüberleben vereinbar, prädisponiert jedoch durch vermehrte Chromosomenfehlverteilung zur Tumorgenese.

Für menschliche Tumorzellen ist bekannt, dass der komplette Funktionsverlust des Spindelcheckpoints zum Tod der betroffenen Zelle führt.^{276,277} In überlebensfähigen Tumorzellen hingegen zeigen MAD2 und Bub1b eine variable Expression. Eine reduzierte Expression dieser Spindelcheckpoint-Gene lässt sich in Tumoren unterschiedlicher Organe beobachten, unter anderem in kolorektalen und nasopharyngealen Malignomen, Karzinomen der Mamma und Ovarien sowie in Keimzelltumoren des Hodens.^{167,264,278,279,280}

5.2.1 Assoziation von biopathologischen Parametern mit der reduzierten Expression von Spindelcheckpoint-Genen

5.2.1.1 MAD2

Die Bedeutung reduzierter Expressionslevel im Prostatakarzinom ist bislang noch weitestgehend unverstanden. Xu et al. beschrieben lediglich einen Zusammenhang zwischen reduzierten MAD2-Expressionsleveln und hohen Gleason-Scores.²⁸¹ Damit übereinstimmend deuten auch die eigenen Ergebnisse einen - wenngleich statistisch nicht signifikanten ($p > 0,05$) - Zusammenhang niedriger MAD2-Level mit schlecht differenzierten Prostatakarzinomen an. Während 77,0% der Karzinomproben mit durchschnittlicher Genexpression einen Gleason-Score von maximal 7 aufweisen, sind 62,5% der Tumore mit MAD2-Unterexpression mit einem Gleason-Score von mindestens 8 vergesellschaftet. Weiterhin waren MAD2-defiziente Tumore im Gegensatz zu solchen Tumoren mit durchschnittlichem Expressionslevel zum Zeitpunkt der Operation bereits zu einem größeren Anteil in fortgeschritteneren Tumorstadien (Anteil der organbegrenzten Karzinome: 25% vs. 46,2%) bzw. nodal metastasiert (37,5% vs. 15,4%). Angesichts der geringen Probenanzahl sind hier jedoch ohne Erweiterung des Patientenkollektivs keine Aussagen mit statistischer Signifikanz zu erwarten.

Diskussion

5.2.1.2 Bub1b

Betrachtet man die Prostatakarzinome, welche eine Bub1b-Unterepression aufweisen, so bestehen für diese im Vergleich zu Tumoren mit durchschnittlichen Bub1b-Leveln statistisch signifikante Assoziationen ($p \leq 0,05$) mit hohen Gleason-Scores (Gleason-Score ≥ 8 in 77,8% vs. 24,2% der Karzinome), lokal fortgeschrittenen Tumorstadien (Anteil der organbegrenzten Karzinome: 0% vs. 51,5%) und vermehrt lymphogener Metastasierung (55,6% vs. 18,2%). Da alle diese genannten Faktoren mit einer ungünstigen Prognose assoziiert sind (s. Abschnitt 1.1.7), muss auch bei Karzinomen mit reduzierten Bub1b-Leveln von einem prognostisch ungünstigen Krankheitsverlauf ausgegangen werden.

Die Assoziation einer reduzierten Bub1b-Expression mit prognostisch ungünstigen Prognosefaktoren im Prostatakarzinom deckt sich mit Beobachtungen in kolorektalen Karzinomen, in denen Shichiri et al. eine Korrelation von reduzierten Bub1b-Expressionsleveln mit verstärkter Lymphknotenmetastasierung und einem verkürzten rezidivfreien Überleben fanden.²⁷⁸ Möglicherweise kommt daher dem Bub1b die Funktion eines Tumorsuppressor-Gens zu, wobei eine quantitative Verringerung der Bub1b-Translationsprodukte über eine Funktionsbeeinträchtigung des Spindelcheckpoint-Apparates karzinogenesefördernd wirkt. Eine Reduktion der Expressionslevel, wie sie im Falle einer Bub1b-Unterepression vorliegen, könnte demzufolge durch Beeinträchtigung der tumorsuppressiven Funktion eine maligne Entartung von Zellen und insbesondere die Tumorprogression begünstigen. Die vorliegenden Ergebnisse weisen somit auf eine enge Beziehung zwischen reduzierten Expressionsleveln bestimmter Spindelcheckpoint-Gene und der Progression des Prostatakarzinoms im Menschen hin. Um diese Annahme zu validieren, ist es jedoch unabdingbar, die Bub1b-Expression als unabhängigen Prognosefaktor für das Prostatakarzinom an einer größeren Fallzahl zu untersuchen.

Anhand der zurzeit vorliegenden „Follow-Up“-Daten ist noch keine Aussage über einen möglicherweise differierenden Krankheitsverlauf in Patienten mit einem Karzinom, in welchem sich eine signifikante Unterepression vorgenannter Spindelcheckpoint-Gene nachweisen lässt, möglich. Bestätigt sich aber die

postulierte Hypothese, dass eine verringerte Expression von Spindelcheckpoint-Genen mit einem ungünstigeren Outcome der betroffenen Patienten assoziiert ist, käme dem relativen Expressionslevel des zugrunde liegenden Spindelcheckpoint-Gens die Rolle eines prädiktiven Markers zu. Daher ist anhand der bisherigen Daten Bub1b als guter Kandidat für einen möglichen solchen prädiktiven Marker anzusehen. MAD2 hingegen ist nach der momentanen Datenlage diesbezüglich eher kritisch zu bewerten. Für den Patienten und behandelnden Arzt würde ein solcher Marker die Entscheidung für die Notwendigkeit und Art der indizierten Therapie des diagnostizierten Prostatakarzinoms erheblich erleichtern.

Während die gezeigten Daten eine reduzierte Expression in progressiven Karzinomen beschreiben, beobachten einzelne Studien konträr dazu auch das Auftreten von Überexpressionen vorgenannter Spindelcheckpoint-Gene. Im Menschen finden sich erhöhte Expressionslevel für MAD2 bzw. Bub1b unter anderem in Malignomen des Gastrointestinaltraktes, der Lunge und Schilddrüse, Weichteilsarkomen, sowie Urothel- und Mammakarzinomen.^{282,283,284,285,286,287} Zum Teil sind die Überexpressionen mit aggressiven Tumoren, fortgeschrittenen Tumorstadien und ungünstiger Prognose assoziiert.^{284,286} So wurde auch gezeigt, dass im Mausmodell die überdurchschnittliche Genexpression zur Akkumulation aneuploider Zellen und Tumorgenese führt.²⁸⁸ Die Ursache für eine Erhöhung der Expressionslevel bestimmter Gene des Spindelcheckpoints ist bislang noch weitgehend unklar. Möglicherweise ist diese jedoch als physiologische, kompensatorische Antwort auf eine Spindelcheckpoint-Defizienz zu deuten.^{282,289} Nach den vorliegenden eigenen Resultaten scheint das Vorhandensein einer relativen Überexpression von Bub1b bzw. MAD2 im Adenokarzinom der Prostata selten zu sein und keine bedeutende Rolle in der Karzinomprogression zu spielen.

Diskussion

5.2.2 Bedeutung von Spindelcheckpoint-Defekten für die Karzinogenese und Tumorprogression

Vitalen Tumorzellen bietet ein geschwächter Spindelcheckpoint-Apparat zumeist einen Überlebensvorteil, der auf einer erhöhten Toleranz gegenüber Aneuploidie und verminderter Apoptoseanfälligkeit basiert.^{290,291} Verschiedene Studien konnten außerdem zeigen, dass Tumorzellen mit defizitärem Spindelcheckpoint widerstandsfähiger gegenüber bestimmten Chemotherapeutika, insbesondere gegenüber Taxanen, sind.^{167,292,293,294,295,296} Taxane verhindern über eine Stabilisierung der Mikrotubuli den Abbau des Spindelapparates und hemmen so die Zellteilung und das Tumorwachstum.²⁹⁷ Für die Behandlung des fortgeschrittenen, hormonrefraktären Prostatakarzinoms findet derzeit Docetaxel, ein zytotoxisches Agens aus der Taxoidfamilie, Anwendung (s. Abschnitt 1.1.6.). Die damit behandelten Patienten profitieren von einem verlängerten krankheitsbezogenen Überleben. In bis zu der Hälfte der Patienten lässt sich ein deutlicher Abfall der PSA-Serumwerte während des Behandlungszeitraumes nachweisen.⁵² Bislang ist jedoch noch weitgehend unklar, wie groß der Anteil an Patienten ist, die primär nicht auf eine Taxantherapie ansprechen, bzw. welche Mechanismen im Laufe der chemotherapeutischen Behandlung zu einer Docetaxel-Resistenz führen. In Mammakarzinom-Zelllinien wurde beobachtet, dass reduzierte Expressionslevel der Spindelcheckpoint-Gene MAD2 bzw. Bub1b mit einer erhöhten Taxanresistenz einhergehen.²⁹⁶ Auch Bub1b-haploinsuffiziente murine embryonale Fibroblasten zeigen in-vitro eine erhöhte Resistenz gegen Docetaxel.²⁹⁸ Dem Expressionslevel von Spindelcheckpoint-Genen könnte daher auch die Rolle eines prädiktiven Markers in Hinblick auf das Ansprechen auf eine Chemotherapie mit Docetaxel zukommen. Ein schnelleres Erkennen sogenannter „Non-Responder“ unter den betroffenen Karzinompatienten könnte sowohl für den Patienten als auch für den behandelnden Arzt eine gezielte Optimierung der individuellen Therapie durch frühzeitiges Umstellen auf alternative Behandlungskonzepte erleichtern. Allerdings fehlen zur Zeit noch entsprechende Ergebnisse aus Verlaufsbeobachtungen, die eine Aussage zum individuellen Ansprechen des Patienten vor einer solchen Chemotherapie zulassen.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass - ebenso wie bereits für andere Malignome beschrieben - auch im Adenokarzinom der Prostata Alterationen in den Expressionsleveln der Spindelcheckpoint-Gene MAD2 und Bub1b nachweisbar sind. In den Tumorproben findet sich dabei, neben vereinzelt relativen Überexpressionen, insbesondere für Bub1b (19,1%), in geringerem Ausmaß auch für MAD2 (7,1%), im Untersuchungsgut eine Gruppe von Tumorproben, welche vergleichsweise geringe Expressionslevel der untersuchten Spindelcheckpoint-Gene aufweisen. Während relative Überexpressionen von MAD2 bzw. Bub1b den Resultaten zufolge im Prostatakarzinom selten auftreten und für die Karzinomprogression keine bedeutende Rolle zu spielen scheinen, sind Prostatakarzinome mit reduzierten Expressionsleveln mit verschiedenen biopathologischen Parametern assoziiert. Prostatakarzinome mit reduzierter Bub1b-Expression korrelieren dabei in statistisch signifikantem Maße mit hohen Gleason-Scores, lokal fortgeschrittenen Tumorstadien und vermehrt lymphogener Metastasierung. Da alle diese Parameter mit einer ungünstigen Prognose einhergehen, ist auch für Karzinome mit reduzierten Bub1b-Expressionsleveln ein prognostisch ungünstiger Krankheitsverlauf zu erwarten, wie dies beispielsweise für Kolorektalkarzinome gezeigt wurde.²⁷⁸ In Hinblick auf MAD2 sind mit der bislang untersuchten Patientenanzahl keine statistisch signifikanten Aussagen möglich. Jedoch sind auch hier die untersuchten Prostatakarzinome mit reduzierter MAD2-Expression vergleichsweise schlecht differenzierte Karzinome in zum Großteil fortgeschrittenen Tumorstadien mit oftmals bereits nodaler Metastasierung. Darüber hinaus weisen Tumorzellen mit reduzierten Spindelcheckpoint-Genexpressionsleveln eine höhere Resistenz gegenüber Taxanen, insbesondere Docetaxel, auf. Dem Expressionsstatus vorgenannter Spindelcheckpoint-Gene, insbesondere Bub1b, kann daher die Rolle eines neuen prädiktiven Markers, sowohl hinsichtlich des weiteren Krankheitsprogresses als auch hinsichtlich der wahrscheinlichen Chemosensitivität des Prostatakarzinoms gegenüber Docetaxel, zukommen.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Das Prostatakarzinom ist deutschlandweit das zweithäufigste zum Tode führende Malignom des Mannes. Im Jahr 2007 starben über 11.000 Patienten an den krankheitsbedingten Folgen dieses vorrangig mit höherem Lebensalter assoziierten Malignoms. Mit Einführung des Screenings durch PSA-Bestimmung werden Karzinome zunehmend in früheren Lebensaltern und damit oft in weniger fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert. Eine Differenzierung der Patienten in eine Hochrisikogruppe, in welcher die Betroffenen aufgrund eines hohen malignen Potentials ihrer Tumorerkrankung einer weiteren Therapie bedürfen, und Patienten mit geringem Progressionsrisiko, die bei vergleichsweise niedrigmaligner Erkrankung zeitlebens von krankheitsbedingten Gesundheitsbeeinträchtigungen verschont bleiben werden, ist daher erforderlich. Obwohl die Therapieoptionen des Prostatakarzinoms neben der Lebenserwartung des Patienten und dessen Komorbiditäten vor allem prognostische Faktoren wie das Tumorgrading nach Gleason oder das TNM-Stadium berücksichtigen, ist eine prognostisch verlässliche Einteilung der Patienten zurzeit unbefriedigend. Deshalb bedarf es der Etablierung neuer prädiktiver Marker. Bei der Fahndung nach solchen Markern muss berücksichtigt werden, dass im Gegensatz zu vielen anderen Malignomen die Karzinogenese in der Prostata keinem spezifischen Mutationsmuster oder einer Adenom-Karzinom-Sequenz folgt, wie dies z.B. im Kolonkarzinom beschrieben wurde. Stattdessen lassen sich im Prostatakarzinom eine Reihe unterschiedlicher genomischer Alterationen beobachten, deren molekulare Ursachen und Mechanismen jedoch noch weitgehend unverstanden sind. Das Mismatch-Repair-(MMR)-System sowie der Spindelcheckpoint stellen zwei gut untersuchte spezifische Reparatur- bzw. Überwachungssysteme menschlicher Zellen dar. Defekte in diesen Systemen tragen nachweislich zur malignen Entartung der betroffenen Gewebe bei.

Die vorliegende Arbeit untersuchte die Bedeutung von Mikrosatelliteninstabilitäten (MSI) als Ausdruck einer Defizienz des MMR-Systems im Prostatakarzinom. Neben der Bestimmung der Prävalenz von MSI lag das Hauptaugenmerk auf der Analyse von Korrelationen zwischen dem Auftreten von Mikrosatelliteninstabilitäten in

Prostatakarzinomen und klinisch prognostischen Parametern. Von den insgesamt 153 untersuchten Prostatakarzinomen konnte in 24 Fällen (15,7%) Mikrosatelliteninstabilität nachgewiesen werden. 9 davon (5,9%) waren mit zwei oder mehr nachgewiesenen Instabilitäten definitionsgemäß hochinstabil (MSI-H). Diese Prävalenz hochinstabiler Prostatakarzinome ist im Vergleich zu anderen MSI-Studien niedrig, steht aber im Einklang mit konzeptionell vergleichbaren und validen Studienergebnissen. Eine statistisch signifikante Korrelation zwischen dem MSI-Status und dem Alter der Patienten bei Diagnosestellung wurde beobachtet. Im untersuchten Patientenkollektiv traten hochinstabile Prostatakarzinome im Vergleich zu mikrosatellitenstabilen Karzinomen erst in einem deutlich höheren Lebensalter auf. Bezüglich der übrigen untersuchten Parameter zeigten die Analysen, dass hochinstabile Adenokarzinome der Prostata mit guter Differenzierung, niedrigeren Tumorstadien und fehlender Lymphknotenmetastasierung einhergehen. Die erzielten Werte erreichten aber aufgrund der niedrigen Prävalenz von MSI-H-Tumoren keine Signifikanz. Inwieweit Patienten mit einem hochinstabilen Prostatakarzinom tatsächlich eine günstigere Prognose haben, bedarf daher noch weiterführender Verlaufsbeobachtungen bzw. einer Vergrößerung des Patientenkollektivs, wie dies auch für die Etablierung des MSI-Status als potentiellen prädiktiven Markers eines Prostatakarzinoms unerlässlich erscheint.

Den zweiten Schwerpunkt der Arbeit bildet die Detektion aberranter Expressionslevel der Spindelcheckpoint-Gene Bub1b und MAD2 und deren mögliche prognostische Bedeutung in Hinblick auf den klinischen Verlauf der Tumorerkrankung. Mittels quantitativer Expressionsanalysen wurden sowohl relative Über- als auch Unterexpressionen der Spindelcheckpoint-Gene Bub1b und MAD2 im Prostatakarzinom nachgewiesen. Im untersuchten Patientenkollektiv sind Überexpressionen dieser Gene vergleichsweise selten und scheinen somit für die Karzinomprogression keine bedeutende Rolle zu spielen. Hingegen weist eine Gruppe von Tumorproben insbesondere für Bub1b (19,1%), in geringerem Ausmaß auch für MAD2 (7,1%), vergleichsweise geringe Expressionslevel der untersuchten Spindelcheckpoint-Gene auf. Diese Prostatakarzinome mit reduzierten Expressionsleveln zeigen eine enge Assoziation mit verschiedenen

Zusammenfassung

biopathologischen Parametern. Prostatakarzinome mit reduzierter Bub1b-Expression sind dabei in statistisch signifikantem Maße mit hohen Gleason-Scores, lokal fortgeschrittenen Tumorstadien und vermehrt lymphogener Metastasierung assoziiert. In Hinblick auf MAD2 sind mit der bislang untersuchten Patientenanzahl keine statistisch signifikanten Aussagen möglich. Jedoch fällt auch hier auf, dass untersuchte Prostatakarzinome mit reduzierter MAD2-Expression vergleichsweise schlecht differenzierte Karzinome in zum Großteil fortgeschritteneren Tumorstadien mit oftmals bereits nodaler Metastasierung sind. Die gezeigten Ergebnisse legen dem Spindelcheckpoint-Gen Bub1b somit die Funktion eines Tumorsuppressors nahe. Durch weiterführende Analysen der Bub1b-Expression im Prostatakarzinom könnte sich die neuartige Möglichkeit ergeben, Patienten mit einem erhöhten Progressionsrisiko zu detektieren. Eine Ausdehnung der Untersuchungen auf ein erweitertes Patientenkollektiv ist hierbei notwendig, um die Relevanz von Bub1b als prädiktiven Marker für das Prostatakarzinom zu evaluieren.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Reiter RE, Dekernion JB: Epidemiology, etiology, and prevention of prostate cancer. In: Walsh, Retik, Vaughan, Wein (eds): Campbell's Urology, 8th ed. Saunders, Philadelphia. 2002
- [2] Hølund B: Latent prostatic cancer in a consecutive autopsy series. Scand J Urol Nephrol. 1980;14(1):29-35
- [3] Karube K: Study of latent carcinoma of the prostate in the Japanese based on necropsy material. Tohoku J Exp Med. 1961;74:265-85
- [4] Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Murray T, Thun MJ: Cancer statistics, 2008. CA Cancer J Clin. 2008;58(2):71-96
- [5] Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA: Cancer statistics, 1998. CA Cancer J Clin. 1998;48(1):6-29
- [6] Merrill RM, Weed DL, Feuer EJ: The lifetime risk of developing prostate cancer in white and black men. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 1997;6(10):763-8
- [7] <http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Content/Statistiken/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/Content75/SterbefaelleMaennlich,templateId=renderPrint.pmsl> (30.11.2008)
- [8] Carter BS, Beaty TH, Steinberg GD, Childs B, Walsh PC: Mendelian inheritance of familial prostate cancer. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992;89(8):3367-71
- [9] Glover FE, Coffey DS, Douglas LL, Russell H, Cadigan M, Tulloch T, Wedderburn K, Wan RL, Baker TD, Walsh PC: Familial study of prostate cancer in Jamaica. Urology. 1998;52(3):441-3
- [10] Steinberg GD, Carter BS, Beaty TH, Childs B, Walsh PC: Family history and the risk of prostate cancer. Prostate. 1990;17(4):337-47
- [11] Gann PH, Hennekens CH, Ma J, Longcope C, Stampfer MJ: Prospective study of sex hormone levels and risk of prostate cancer. J Natl Cancer Inst. 1996;88(16):1118-26
- [12] Ross R, Bernstein L, Judd H, Hanisch R, Pike M, Henderson B: Serum testosterone levels in healthy young black and white men. J Natl Cancer Inst. 1986;76(1):45-8
- [13] Guess HA, Friedman GD, Sadler MC, Stanczyk FZ, Vogelman JH, Imperato-McGinley J, Lobo RA, Orentreich N: 5 alpha-reductase activity and prostate cancer: a case-control study using stored sera. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 1997;6(1):21-4
- [14] Severi G, Morris HA, MacInnis RJ, English DR, Tilley W, Hopper JL, Boyle P, Giles GG: Circulating steroid hormones and the risk of prostate cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2006;15(1):86-91
- [15] Muir CS, Nectoux J, Staszewski J: The epidemiology of prostatic cancer. Geographical distribution and time-trends. Acta Oncol. 1991;30(2):133-40

Literaturverzeichnis

- [16] Giovannucci E, Rimm EB, Colditz GA, Stampfer MJ, Ascherio A, Chute CC, Willett WC: A prospective study of dietary fat and risk of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1993;85(19):1571-9
- [17] Mitrou PN, Albanes D, Weinstein SJ, Pietinen P, Taylor PR, Virtamo J, Leitzmann MF: A prospective study of dietary calcium, dairy products and prostate cancer risk (Finland). *Int J Cancer.* 2007;120(11):2466-73
- [18] Mills PK, Beeson WL, Phillips RL, Fraser GE: Cohort study of diet, lifestyle, and prostate cancer in Adventist men. *Cancer.* 1989;64(3):598-604
- [19] Clark LC, Dalkin B, Krongrad A, Combs GF, Turnbull BW, Slate EH, Witherington R, Herlong JH, Janosko E, Carpenter D, Borosso C, Falk S, Rounder J: Decreased incidence of prostate cancer with selenium supplementation: results of a double-blind cancer prevention trial. *Br J Urol.* 1998;81(5):730-4
- [20] Mostofi FK, Davis CJ, Sesterhenn IA: Pathology of carcinoma of the prostate. *Cancer.* 1992;70(1 Suppl):235-53
- [21] Riede UN, Böcking A, Böhm N: Prostatakarzinom. In: Riede, Werner, Schäfer (eds): *Allgemeine und spezielle Pathologie*, 5. Aufl. Thieme Verlag. 2004
- [22] Miller DC, Hafez KS, Stewart A, Montie JE, Wei JT: Prostate carcinoma presentation, diagnosis, and staging: an update from the National Cancer Data Base. *Cancer.* 2003;98(6):1169-78
- [23] Heidenreich A, Ohlmann CH: Prostatakarzinom. In: Schmelz, Sparwasser, Weidner (eds): *Facharztwissen Urologie*, 1. Aufl. Springer Verlag. 2006
- [24] Hankey BF, Feuer EJ, Clegg LX, Hayes RB, Legler JM, Prorok PC, Ries LA, Merrill RM, Kaplan RS: Cancer surveillance series: interpreting trends in prostate cancer - part I: Evidence of the effects of screening in recent prostate cancer incidence, mortality, and survival rates. *J Natl Cancer Inst.* 1999;91(12):1017-24
- [25] Krahn MD, Mahoney JE, Eckman MH, Trachtenberg J, Pauker SG, Detsky AS: Screening for prostate cancer. A decision analytic view. *JAMA.* 1994;272(10):773-80
- [26] Altwein JE: Prostatakarzinom. In: Rübber, Ackermann (eds): *Uroonkologie*, Springer Verlag. 2001
- [27] Heidenreich A, Aus G, Bolla M, Joniau S, Matveev VB, Schmid HP, Zattoni F; European Association of Urology: EAU guidelines on prostate cancer. *Eur Urol.* 2008;53(1):68-80
- [28] Carvalhal GF, Smith DS, Mager DE, Ramos C, Catalona WJ: Digital rectal examination for detecting prostate cancer at prostate specific antigen levels of 4 ng./ml. or less. *J Urol.* 1999;161(3):835-9

- [29] Schroder FH, van der Maas P, Beemsterboer P, Kruger AB, Hoedemaeker R, Rietbergen J, Kranse R: Evaluation of the digital rectal examination as a screening test for prostate cancer. Rotterdam section of the European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1998;90(23):1817-23
- [30] Gann PH, Hennekens CH, Stampfer MJ: A prospective evaluation of plasma prostate-specific antigen for detection of prostatic cancer. *JAMA.* 1995;273(4):289-94
- [31] Oesterling JE, Jacobson SJ, Chute CG, Guess HA, Girman CJ, Panser LA, Lieber MM: Serum prostate-specific antigen in a community-based population of healthy men. Establishment of age-specific reference ranges. *JAMA.* 1993;270(7):860-4
- [32] Stamey TA, Yang N, Hay AR, McNeal JE, Freiha FS, Redwine E: Prostate specific antigen as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate. *N Engl J Med.* 1987; 317(15):909-16
- [33] Carter HB, Partin AW: Diagnosis and staging of prostate cancer In: Walsh, Retik, Vaughan, Wein (eds): *Campbell's Urology*, 8th ed. Saunders, Philadelphia. 2002
- [34] Cooner WH, Mosley BR, Rutherford CL, Beard JH, Pond HS, Terry WJ, Igel TC, Kidd DD: Prostate cancer detection in a clinical urological practice by ultrasonography, digital rectal examination and prostate specific antigen. *J Urol.* 1990;143(6):1146-52
- [35] Cupp MR, Oesterling JE: Prostate-specific antigen, digital rectal examination, and transrectal ultrasonography; their roles in diagnosing early prostate cancer. *Mayo Clin Proc.* 1993;68(3):297-306
- [36] Stamey TA, Freiha FS, McNeal JE, Redwine EA, Whittemore AS, Schmid HP: Localized prostate cancer. Relationship of tumor volume to clinical significance for treatment of prostate cancer. *Cancer.* 1993;71(3 Suppl):933-8
- [37] Gustafsson O, Carlsson P, Norming U, Nyman CR, Svensson H: Cost-effectiveness analysis in early detection of prostate cancer: an evaluation of six screening strategies in a randomly selected population of 2,400 men. *Prostate.* 1995;26(6):299-309
- [38] Carter HB, Hamper UM, Sheth S, Sanders RC, Epstein JI, Walsh PC: Evaluation of transrectal ultrasound in the diagnosis of prostate cancer. *J Urol.* 1989;142(4):1008-10
- [39] Chybowski FM, Keller JJ, Bergstralh EJ, Oesterling JE: Predicting radionuclide bone scan findings in patients with newly diagnosed, untreated prostate cancer: prostate specific antigen is superior to all other clinical parameters. *J Urol.* 1991;145(2):313-8
- [40] Denis LJ. Staging and Prognosis of Prostate Cancer. *Eur Urol.* 1993;24 Suppl 2:13-18
- [41] Wittekind C: *TNM-Atlas*, 5. Aufl. Springer Verlag. 2005
- [42] Partin AW, Mangold LA, Lamm DM, Walsh PC, Epstein JI, Pearson JD: Contemporary update of prostate cancer staging nomograms (Partin Tables) for the new millenium. *Urology.* 2001;58(6):843-8
- [43] Mikuz G: Prostata. In: Böcker, Denk, Heitz (Hrsg): *Pathologie*, 3. Aufl. Urban & Fischer Verlag. 2004

Literaturverzeichnis

- [44] Humphrey PA: Grading of prostatic carcinoma. In: Prostate Pathology. ASCP Press: Chicago, 2003, pp 338-374; (Chapter 15)
- [45] Gleason DF: Classification of prostatic carcinomas. *Cancer Chemother Rep.* 1966;50(3):125-8
- [46] Gleason DF: Histologic grading of prostate cancer: a perspective. *Hum Pathol.* 1992;23(3):273-9
- [47] Humphrey PA: Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate. *Mod Pathol.* 2004;17(3):292-306
- [48] Epstein JI, Grignon DJ, Humphrey PA, McNeal JE, Sesterhenn IA, Troncoso P, Wheeler TM: Interobserver reproducibility in the diagnosis of prostatic intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol.* 1995;19(8):873-86
- [49] Epstein JI: Pathology of prostatic neoplasia In: Walsh, Retik, Vaughan, Wein (eds): *Campbell's Urology*, 8th ed. Saunders, Philadelphia. 2002
- [50] Huland H: Prostatakarzinom. In: Hautmann, Huland (Hrsg): *Urologie*, 3. Aufl. Springer Verlag. 2006
- [51] Partin AW, Kattan MW, Subong EN, Walsh PC, Wojno KJ, Oesterling JE, Scardino PT, Pearson JD: Combination of prostate-specific antigen, clinical stage, and Gleason score to predict pathological stage of localized prostate cancer. A multi-institutional update. *JAMA.* 1997;277(18):1445-51
- [52] Tannock IF, de Wit R, Berry WR, Horti J, Pluzanska A, Chi KN, Oudard S, Théodore C, James ND, Turesson I, Rosenthal MA, Eisenberger MA, TAX Investigators: Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. *N Engl J Med.* 2004;351(15):1502-12
- [53] Eisenberger MA, Carducci M: Treatment of hormon-refractory prostate cancer. In: Wein, Kavoussi, Novick, Partin, Peters (eds): *Campell-Walsh Urology*, 9th ed. Saunders, Philadelphia. 2007
- [54] Sonpavde G, Hutson TE, Berry WR: Hormone refractory prostate cancer: Management and advances. *Cancer Treat Rev.* 2006;32(2):90-100
- [55] http://www.cancer.org/docroot/CRI/content/CRI_2_2_6x_Prostate_Cancer_Survival_Rates.asp?sitearea= (04.06.2008)
- [56] Bostwick DG, Grignon DJ, Hammond ME, Amin MB, Cohen M, Crawford D, Gospodarowicz M, Kaplan RS, Miller DS, Montironi R, Pajak TF, Pollack A, Srigley JR, Yarbrow JW: Prognostic factors in prostate cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med.* 2000;124(7):995-1000
- [57] Epstein JI, Pizov G, Walsh PC: Correlation of pathologic findings with progression following radical retropubic prostatectomy. *Cancer.* 1993;71(11):3582-93

- [58] Partin AW, Pound CR, Clemens JQ, Epstein JI, Walsh PC: Serum PSA after anatomic radical prostatectomy. The Johns Hopkins experience after 10 years. *Urol Clin North Am.* 1993;20(4):713-25
- [59] Carter BS, Bova GS, Beaty TH, Steinberg GD, Childs B, Isaacs WB, Walsh PC: Hereditary prostate cancer: epidemiologic and clinical features. *J Urol.* 1993;150(3):797-802
- [60] Bratt O: Hereditary prostate cancer: clinical aspects. *J Urol.* 2002;168(3):906-13
- [61] Grönberg H, Damber L, Damber JE: Studies of genetic factors in prostate cancer in a twin population. *J Urol.* 1994;152(5 Pt 1):1484-7
- [62] Braun MM, Caporaso NE, Page WF, Hoover RN: A cohort study of twins and cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1995;4(5):469-73
- [63] Kinzler KW, Nilbert MC, Su LK, Vogelstein B, Bryan TM, Levy DB, Smith KJ, Preisinger AC, Hedge P, McKechnie D, et al: Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science.* 1991;253(5020):661-5
- [64] Smith JR, Freije D, Carpten JD, Grönberg H, Xu J, Isaacs SD, Brownstein MJ, Bova GS, Guo H, Bujnovszky P, Nusskern DR, Damber JE, Bergh A, Emanuelsson M, Kallioniemi OP, Walker-Daniels J, Bailey-Wilson JE, Beaty TH, Meyers DA, Walsh PC, Collins FS, Trent JM, Isaacs WB: Major susceptibility locus for prostate cancer on chromosome 1 suggested by a genome-wide search. *Science.* 1996;274(5291):1371-4
- [65] Robbins CM, Hernandez W, Ahaghotu C, Bennett J, Hoke G, Mason T, Pettaway CA, Vijayakumar S, Weinrich S, Furbert-Harris P, Dunston G, Powell IJ, Carpten JD, Kittles RA: Association of HPC2/ELAC2 and RNASEL non-synonymous variants with prostate cancer risk in African American familial and sporadic cases. *Prostate.* 2008;68(16):1790-7
- [66] Berthon P, Valeri A, Cohen-Akenine A, Drelon E, Paiss T, Wöhr G, Latil A, Millasseau P, Mellah I, Cohen N, Blanché H, Bellané-Chantelot C, Demenais F, Teillac P, Le Duc A, de Petroni R, Hautmann R, Chumakov I, Bachner L, Maitland NJ, Lidereau R, Vogel W, Fournier G, Mangin P, Cussenot O, et al: Predisposing gene for early-onset prostate cancer, localized on chromosome 1q42.2-43. *Am J Hum Genet.* 1998;62(6):1416-24
- [67] Gibbs M, Stanford JL, McIndoe RA, Jarvik GP, Kolb S, Goode EL, Chakrabarti L, Schuster EF, Buckley VA, Miller EL, Brandzel S, Li S, Hood L, Ostrander EA: Evidence for a rare prostate cancer-susceptibility locus at chromosome 1p36. *Am J Hum Genet.* 1999;64(3):776-87
- [68] Cybulski C, Górski B, Debniak T, Gliniewicz B, Mierzejewski M, Masojć B, Jakubowska A, Matyjasik J, Złowocka E, Sikorski A, Narod SA, Lubiński J: NBS1 is a prostate cancer susceptibility gene. *Cancer Res.* 2004;64(4):1215-9
- [69] Nwosu V, Carpten J, Trent JM, Sheridan R: Heterogeneity of genetic alterations in prostate cancer: evidence of the complex nature of the disease. *Hum Mol Genet.* 2001;10(20):2313-8

Literaturverzeichnis

- [70] Simard J, Dumont M, Soucy P, Labrie F: Perspective: prostate cancer susceptibility genes. *Endocrinology*. 2002;143(6):2029-40
- [71] Dong X, Wang L, Taniguchi K, Wang X, Cunningham JM, McDonnell SK, Qian C, Marks AF, Slager SL, Peterson BJ, Smith DI, Cheville JC, Blute ML, Jacobsen SJ, Schaid DJ, Tindall DJ, Thibodeau SN, Liu W: Mutations in CHEK2 associated with prostate cancer risk. *Am J Hum Genet*. 2003;72(2):270-80
- [72] Xu J, Meyers D, Freije D, Isaacs S, Wiley K, Nusskern D, Ewing C, Wilkens E, Bujnovszky P, Bova GS, Walsh P, Isaacs W, Schleutker J, Matikainen M, Tammela T, Visakorpi T, Kallioniemi OP, Berry R, Schaid D, French A, McDonnell S, Schroeder J, Blute M, Thibodeau S, Grönberg H, Emanuelsson M, Damber JE, Bergh A, Jonsson BA, Smith J, Bailey-Wilson J, Carpten J, Stephan D, Gillanders E, Amundson I, Kainu T, Freas-Lutz D, Baffoe-Bonnie A, Van Aucken A, Sood R, Collins F, Brownstein M, Trent J: Evidence for a prostate cancer susceptibility locus on the X chromosome. *Nat Genet*. 1998;20(2):175-9
- [73] Wang L, McDonnell SK, Elkins DA, Slager SL, Christensen E, Marks AF, Cunningham JM, Peterson BJ, Jacobson SJ, Cerhan JR, Blute ML, Schaid DJ, Thibodeau SN: Analysis of the RNASEL gene in familial and sporadic prostate cancer. *Am J Hum Genet*. 2002;71(1):116-23
- [74] Cybulski C, Huzarski T, Górski B, Masojć B, Mierzejewski M, Debniak T, Gliniewicz B, Matyjasik J, Złowocka E, Kurzawski G, Sikorski A, Posmyk M, Szwiec M, Czajka R, Narod SA, Lubiński J: A novel founder CHEK2 mutation is associated with increased prostate cancer risk. *Cancer Res*. 2004;64(8):2677-9
- [75] Schulz WA, Burchardt M, Cronauer MV: Molecular biology of prostate cancer. *Mol Hum Reprod*. 2003;9(8):437-48
- [76] Varmus HE: The molecular genetics of cellular oncogenes. *Annu Rev*. 1984;18:553-612
- [77] Weinberg RA: Tumor suppressor genes. *Science*. 1991;254(5035):1138-46
- [78] Thibodeau SN, Bren G, Schaid D: Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science*. 1993;260(5109):816-9
- [79] Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M: Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature*. 1993;363(6429):558-61
- [80] Cahill DP, Lengauer C, Yu J, Riggins GJ, Willson JK, Markowitz SD, Kinzler KW, Vogelstein B: Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Nature*. 1998;392:300-3
- [81] Knudson AG: Genetic predisposition to cancer. *Cancer Detect Prev*. 1984;7(1):1-8
- [82] Bookstein R: Tumour suppressor genes in prostate cancer. In: Totowa NJ, ed. *Prostate cancer: biology genetics and the new therapeutics*. Humana Press. 2001;61-93
- [83] Macoska JA, Trybus TM, Wojno KJ: 8p22 loss concurrent with 8c gain is associated with poor outcome in prostate cancer. *Urology*. 2000;55(5):776-82

- [84] Cher ML, Bova GS, Moore DH, Small EJ, Carroll PR, Pin SS, Epstein JI, Isaacs WB, Jensen RH: Genetic alterations in untreated metastases and androgen-independent prostate cancer detected by comparative genomic hybridization and allelotyping. *Cancer Res.* 1996;56(13):3091-102
- [85] He WW, Sciavolino PJ, Wing J, Augustus M, Hudson P, Meissner PS, Curtis RT, Shell BK, Bostwick DG, Tindall DJ, Gelmann EP, Abate-Shen C, Carter KC: A novel human prostate-specific, androgen-regulated homeobox gene (NKX3.1) that maps to 8p21, a region frequently deleted in prostate cancer. *Genomics.* 1997;43(1):69-77
- [86] Ouyang X, DeWeese TL, Nelson WG, Abate-Shen C: Loss-of-function of Nkx3.1 promotes increased oxidative damage in prostate carcinogenesis. *Cancer Res.* 2005;65(15):6773-9
- [87] Bhatia-Gaur R, Donjacour AA, Sciavolino PJ, Kim M, Desai N, Young P, Norton CR, Gridley T, Cardiff RD, Cunha GR, Abate-Shen C, Shen MM: Roles for Nkx3.1 in prostate development and cancer. *Genes Dev.* 1999;13(8):966-77
- [88] Tanaka M, Komuro I, Inagaki H, Jenkins NA, Copeland NG, Izumo S: Nkx3.1, a murine homolog of *Drosophila* bagpipe, regulates epithelial ductal branching and proliferation of the prostate and palatine glands. *Dev Dyn.* 2000;219(2):248-60
- [89] Millar DS, Ow KK, Paul CL, Russell PJ, Molloy PL, Clark SJ: Detailed methylation analysis of the glutathione S-transferase pi (GSTP1) gene in prostate cancer. *Oncogene.* 1999;18(6):1313-24
- [90] Lee WH, Morton RA, Epstein JI, Brooks JD, Campbell PA, Bova GS, Hsieh WS, Isaacs WB, Nelson WG: Cytidine methylation of regulatory sequences near the pi-class glutathione S-transferase gene accompanies human prostatic carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(24):11733-7
- [91] Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, Puc J, Miliaresis C, Rodgers L, McCombie R, Bigner SH, Giovanella BC, Ittmann M, Tycko B, Hibshoosh H, Wigler MH, Parsons R: PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science.* 1997;275(5308):1943-7
- [92] Suzuki H, Freije D, Nusskern DR, Okami K, Cairns P, Sidransky D, Isaacs WB, Bova GS: Interfocal heterogeneity of PTEN/MMAC1 gene alterations in multiple metastatic prostate cancer tissues. *Cancer Res.* 1998;58(2):204-9
- [93] McMenamin ME, Soung P, Perera S, Kaplan I, Loda M, Sellers WR: Loss of PTEN expression in paraffin-embedded primary prostate cancer correlates with high Gleason score and advanced stage. *Cancer Res.* 1999;59(17):4291-6
- [94] Cairns P, Okami K, Halachmi S, Halachmi N, Esteller M, Herman JG, Jen J, Isaacs WB, Bova GS, Sidransky D: Frequent inactivation of PTEN/MMAC1 in primary prostate cancer. *Cancer Res.* 1997;57(22):4997-5000

Literaturverzeichnis

- [95] Kibel AS, Faith DA, Bova GS, Isaacs WB: Loss of heterozygosity at 12p12-13 in primary and metastatic prostate adenocarcinoma. *J Urol.* 2000;164(1):192-6
- [96] Yang RM, Naitoh J, Murphy M, Wang HJ, Phillipson J, deKernion JB, Loda M, Reiter RE: Low p27 expression predicts poor disease-free survival in patients with prostate cancer. *J Urol.* 1998;159(3):941-5
- [97] Di Cristofano A, De Acetis M, Koff A, Cordon-Cardo C, Pandolfi PP: PTEN and p27Kip 1 cooperate in prostate cancer tumor suppression in the mouse. *Nat Genet.* 2001;27(2):222-4
- [98] Phillips SM, Barton CM, Lee SJ, Morton DG, Wallace DM, Lemoine NR, Neoptolemos JP: Loss of the retinoblastoma susceptibility gene (RB1) is a frequent and early event in prostatic tumorigenesis. *Br J Cancer.* 1994;70(6):1252-7
- [99] Bookstein R, MacGrogan D, Hilsenbeck SG, Sharkey F, Allred DC: p53 is mutated in a subset of advanced-stage prostate cancers. *Cancer Res.* 1993;53(14):3369-73
- [100] Gao X, Porter AT, Grignon DJ, Pontes JE, Honn KV: Diagnostic and prognostic markers for human prostate cancer. *Prostate.* 1997;31(4):264-81
- [101] Jenkins RB, Qian J, Lieber MM, Bostwick DG: Detection of c-myc oncogene amplification and chromosomal anomalies in metastatic prostatic carcinoma by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Res.* 1997;57(3):524-31
- [102] Thompson TC, Kadmon D, Timme TL, Merz VW, Egawa S, Krebs T, Scardino PT, Park SH: Experimental oncogene induced prostate cancer. *Cancer Surv.* 1991;11:55-71
- [103] Buttyan R, Sawczuk IS, Benson MC, Siegal JD, Olsson CA: Enhanced expression of the c-myc protooncogene in high-grade human prostate cancers. *Prostate.* 1987;11(4):327-37
- [104] Sato K, Qian J, Slezak JM, Lieber MM, Bostwick DG, Bergstralh EJ, Jenkins RB: Clinical significance of alterations of chromosome 8 in high-grade, advanced, nonmetastatic prostate carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 1999;91(18):1574-80
- [105] McDonnell TJ, Troncoso P, Brisbay SM, Logothetis C, Chung LW, Hsieh JT, Tu SM, Campcell ML: Expression of the protooncogene bcl-2 in the prostate and its association with emergence of androgen-independent prostate cancer. *Cancer Res.* 1992;52(24):6940-4
- [106] Gleave ME, Miyake H, Goldie J, Nelson C, Tolcher A: Targeting bcl-2 gene to delay androgen-independent progression and enhance chemosensitivity in prostate cancer using antisense bcl-2 oligodeoxynucleotides. *Urology.* 1999;54(6A Suppl):36-46
- [107] Fishel R, Kolodner RD: Identification of mismatch repair genes and their role in the development of cancer. *Curr Opin Genet Dev.* 1995;5(3):382-95
- [108] Kolodner R: Biochemistry and genetics of eukaryotic mismatch repair. *Genes Dev.* 1996;10(12):1433-42
- [109] Modrich P, Lahue R: Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. *Annu Rev Biochem.* 1996;65:101-33

- [110] Kolodner RD, Marsischky GT: Eukaryotic DNA mismatch repair. *Curr Opin Genet Dev.* 1999;9(1):89-96
- [111] Edelmann W, Yang K, Kuraguchi M, Heyer J, Lia M, Kneitz B, Fan K, Brown AM, Lipkin M, Kucherlapati R: Tumorigenesis in Mlh1 and Mlh1/Apc1638N mutant mice. *Cancer Res.* 1999;59(6):1301-7
- [112] Kneitz B, Cohen PE, Avdievich E, Zhu L, Kane MF, Hou H Jr, Kolodner RD, Kucherlapati R, Pollard JW, Edelmann W: MutS homolog 4 localization to meiotic chromosomes is required for chromosome pairing during meiosis in male and female mice. *Genes Dev.* 2000;14(9):1085-97
- [113] Luo Y, Lin FT, Lin WC: ATM-mediated stabilization of hMutL DNA mismatch repair proteins augments p53 activation during DNA damage. *Mol Cell Biol.* 2004;24(14):6430-44
- [114] Kunkel TA: DNA replication fidelity. *J Biol Chem.* 1992;267(26):18251-4
- [115] Cox EC: Bacterial mutator genes and the control of spontaneous mutation. *Annu Rev Genet.* 1976;10:135-56
- [116] Su SS, Modrich P: Escherichia coli mutS-encoded protein binds to mismatched DNA base pairs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986;83(14):5057-61
- [117] Lahue RS, Au KG, Modrich P: DNA mismatch correction in a defined system. *Science.* 1989;245(4914):160-4
- [118] Fishel R, Lescoe MK, Rao MR, Copeland NG, Jenkins NA, Garber J, Kane M, Kolodner R: The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell.* 1993;75(5):1027-38
- [119] Bronner CE, Baker SM, Morrison PT, Warren G, Smith LG, Lescoe MK, Kane M, Earabino C, Lipford J, Lindblom A, et al.: Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature.* 1994;368(6468):258-61
- [120] Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B, Wei YF, Carter KC, Ruben SM, Rosen CA, Haseltine WA, Fleischmann RD, Fraser CM, et al.: Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. *Nature.* 1994;371:75-80
- [121] Acharya S, Wilson T, Gradia S, Kane MF, Guerrette S, Marsischky GT, Kolodner R, Fishel R: hMSH2 forms specific mispair-binding complexes with hMSH3 and hMSH6. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(24):13629-34
- [122] Genschel J, Littman SJ, Drummond JT, Modrich P: Isolation of MutSbeta from human cells and comparison of the mismatch repair specificities of MutSbeta and MutSalpha. *J Biol Chem.* 1998;273(31):19895-901
- [123] Loeb LA: Microsatellite instability: marker of a mutator phenotype in cancer. *Cancer Res.* 1994;54(19):5059-63

Literaturverzeichnis

- [124] Nakagawa H, Nuovo GJ, Zervos EE, Martin EW Jr, Salovaara R, Aaltonen LA, de la Chapelle A: Age-related hypermethylation of the 5' region of MLH1 in normal colonic mucosa is associated with microsatellite-unstable colorectal cancer development. *Cancer Res.* 2001;61(19):6991-5
- [125] Parsons R, Li GM, Longley MJ, Fang WH, Papadopoulos N, Jen J, de la Chapelle A, Kinzler KW, Vogelstein B, Modrich P: Hypermutability and mismatch repair deficiency in RER⁺ tumor cells. *Cell.* 1993;75(6):1227-36
- [126] Leach FS, Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B, Jen J, Parsons R, Peltomäki P, Sistonen P, Aaltonen LA, Nyström-Lahti M, et al.: Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell.* 1993;75(6):1215-25
- [127] Papadopoulos N, Nicolaides NC, Wei YF, Ruben SM, Carter KC, Rosen CA, Haseltine WA, Fleischmann RD, Fraser CM, Adams MD, et al.: Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer. *Science.* 1994;263(5153):1625-9
- [128] Kinzler KW, Vogelstein B: Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell.* 1996;87(2):159-70
- [129] Lynch HT, de la Chapelle A: Genetic susceptibility to non-polyposis colorectal cancer. *J Med Genet.* 1999;36(11):801-18
- [130] Park JG, Park YJ, Wijnen JT, Vasen HF: Gene-environment interaction in hereditary nonpolyposis colorectal cancer with implications for diagnosis and genetic testing. *Int J Cancer.* 1999;82(4):516-9
- [131] Peltomäki P: Role of DNA mismatch repair defects in the pathogenesis of human cancer. *J Clin Oncol.* 2003;21(6):1174-9
- [132] Boland CR: Molecular genetics of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;910:50-61
- [133] Levinson G, Gutman GA: Slipped-strand mispairing. A major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol Biol Evol.* 1987;4(3):203-21
- [134] Kunkel TA: Nucleotide repeats. Slippery DNA and diseases. *Nature.* 1993;365(6443):207-8
- [135] Wada C, Shionoya S, Fujino Y, Tokuhira H, Akahoshi T, Uchida T, Ohtani H: Genomic instability of microsatellite repeats and its association with the evolution of chronic myelogenous leukemia. *Blood.* 1994;83(12):3449-56
- [136] Larson RS, Scott MA, McCurley TL, Vnencak-Jones CL: Microsatellite analysis of posttransplant lymphoproliferative disorders: determination of donor/recipient origin and identification of putative lymphomagenic mechanism. *Cancer Res.* 1996;56(19):4378-81
- [137] Aaltonen LA, Peltomäki P, Mecklin JP, Järvinen H, Jass JR, Green JS, Lynch HT, Watson P, Tallqvist G, Juhola M, et al.: Replication errors in benign and malignant tumors from hereditary nonpolyposis colorectal cancer patients. *Cancer Res.* 1994;54(7):1645-8

- [138] Honchel R, Halling KC, Thibodeau SN: Genomic instability in neoplasia. *Semin Cell Biol.* 1995;6(1):45-52
- [139] Loeb LA: A mutator phenotype in cancer. *Cancer Res.* 2001;61(8):3230-9
- [140] Arzimanoglou II, Gilbert F, Barber HR: Microsatellite instability in human solid tumors. *Cancer.* 1998;82(10):1808-20
- [141] Aaltonen LA, Peltomäki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkänen L, Mecklin JP, Järvinen H, Powell SM, Jen J, Hamilton SR, et al: Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science.* 1993;260(5109):812-6
- [142] Liu B, Parsons R, Papadopoulos N, Nicolaidis NC, Lynch HT, Watson P, Jass JR, Dunlop M, Wyllie A, Peltomäki P, de la Chapelle A, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler KW: Analysis of mismatch repair genes in hereditary non-polyposis colorectal cancer patients. *Nat Med.* 1996;2(2):169–74
- [143] Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, Meltzer SJ, Rodriguez-Bigas MA, Fodde R, Ranzani GN, Srivastasa S: A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res.* 1998;58(22):5248-57
- [144] Kops GJ, Weaver BA, Cleveland DW: On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nat Rev Cancer.* 2005;5(10):773-85
- [145] Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B: Genetic instabilities in human cancers. *Nature.* 1998;396(6712):643-9
- [146] Nasmyth K: Segregating sister genomes: the molecular biology of chromosome separation. *Science.* 2002;297(5581):559-65
- [147] Rieder CL, Schultz A, Cole R, Sluder G: Anaphase onset in vertebrate somatic cells is controlled by a checkpoint that monitors sister kinetochore attachment to the spindle. *J Cell Biol.* 1994;127(5):1301-10
- [148] Nicklas RB: How cells get the right chromosomes. *Science.* 1997;275(5300):632-7
- [149] Elledge SJ: Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science.* 1996;274(5293):1664-72
- [150] Amon A: The spindle checkpoint. *Curr Opin Genet Dev.* 1999;9(1):69-75
- [151] Fang G, Kirschner MW: Control of mitotic transitions by the anaphase-promoting complex. *Phil Trans R Soc Biol Sci.* 1999;354(1389):1583-90
- [152] Skoufias DA, Andreassen PR, Lacroix FB, Wilson L, Margolis RL: Mammalian mad2 and bub1/bubR1 recognize distinct spindle-attachment and kinetochore-tension checkpoints. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(8):4492-7
- [153] Cleveland DW, Mao Y, Sullivan KF: Centromeres and kinetochores: from epigenetics to mitotic checkpoint signaling. *Cell.* 2003;112(4):407-21

Literaturverzeichnis

- [154] Taylor SS, Scott MI, Holland AJ: The spindle checkpoint: a quality control mechanism which ensures accurate chromosome segregation. *Chromosome Res.* 2004;12(6):599-616
- [155] King RW, Deshaies RJ, Peters JM, Kirschner MW: How proteolysis drives the cell cycle. *Science.* 1996;274(5293):1652-9
- [156] Sudakin V, Ganoth D, Dahan A, Heller H, Hershko J, Luca FC, Ruderman JV, Hershko A: The cyclosome, a large complex containing cyclin-selective ubiquitin ligase activity, targets cyclins for destruction at the end of mitosis. *Mol Biol Cell.* 1995;6(2):185-97
- [157] Hershko A, Ciechanover A: The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem.* 1998;67:425-79
- [158] Visintin R, Prinz S, Amon A: Cdc20 and Cdh1: a family of substrate-specific activators of APC-dependent proteolysis. *Science.* 1997;278(5337):460-3
- [159] Fang G, Yu, H, Kirschner MW: Direct binding of Cdc20 protein family members activates the anaphase-promoting complex in mitosis and G1. *Mol Cell.* 1998;2(2):163-71
- [160] Hoyt MA, Totis L, Roberts BT: *S. cerevisiae* genes required for cell cycle arrest in response to loss of microtubule function. *Cell.* 1991;66(3):507-17
- [161] Roberts B, Farr K, Hoyt M: The *Saccharomyces cerevisiae* checkpoint gene Bub1 encodes a novel protein kinase. *Mol Cell Biol.* 1994;14:8282-91
- [162] Li R, Murray AW: Feedback control of mitosis in budding yeast. *Cell.* 1991;66(3):519-31
- [163] Hardwick KG, Murray AW: Mad1p, a phosphoprotein component of the spindle assembly checkpoint in budding yeast. *J Cell Biol.* 1995;131:709-20
- [164] Weiss E, Winey M: The *S. cerevisiae* SPB duplication gene MPS1 is part of a mitotic checkpoint. *J Cell Biol.* 1996;132:111-23
- [165] Wang Y, Burke D: Cdc55p, the B-type regulatory subunit of protein phosphatase 2A, has multiple functions in mitosis and is required for the kinetochore/spindle checkpoint in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 1997;17:620-6
- [166] Chen RH, Waters JC, Salmon ED, Murray AW: Association of spindle assembly checkpoint component XMad2 with unattached kinetochores. *Science.* 1996;274(5285):242-6
- [167] Li Y, Benezra R: Identification of a human mitotic checkpoint gene: hsMad2. *Science.* 1996;274(5285):246-8
- [168] Taylor SS, McKeon F: Kinetochore localization of murine Bub1 is required for normal mitotic timing and checkpoint response to spindle damage. *Cell.* 1997;89(5):727-35
- [169] Chan GK, Jablonski SA, Sudakin V, Hittle JC, Yen TJ: Human BubR1 is a mitotic checkpoint kinase that monitors CENP-E functions at kinetochores and binds the cyclosome/APC. *J Cell Biol.* 1999;146(5):941-54
- [170] Taylor SS, Ha E, McKeon F: The human homologue of Bub3 is required for kinetochore localization of Bub1 and a Mad3/Bub1-related protein kinase. *J Cell Biol.* 1998;142(1):1-11
- [171] Kwon MS, Hori T, Okada M, Fukagawa T: CENP-C is involved in chromosome segregation, mitotic checkpoint function, and kinetochore assembly. *Mol Biol Cell.* 2007;18(6):2155-68

- [172] Abrieu A, Kahana JA, Wood KW, Cleveland DW: CENP-E as an essential component of the mitotic checkpoint in vitro. *Cell*. 2000;102(6):817-26
- [173] Chan GK, Jablonski SA, Starr DA, Goldberg ML, Yen TJ: Human Zw10 and ROD are mitotic checkpoint proteins that bind to kinetochores. *Nat Cell Biol*. 2000;2(12):944-7
- [174] Draviam VM, Stegmeier F, Nalepa G, Sowa ME, Chen J, Liang A, Hannon GJ, Sorger PK, Harper JW, Elledge SJ: A functional genomic screen identifies a role for TAO1 kinase in spindle-checkpoint signalling. *Nat Cell Biol*. 2007;9(5):556-64
- [175] Fang G: Checkpoint protein BubR1 acts synergistically with Mad2 to inhibit anaphase-promoting complex. *Mol Biol Cell*. 2002;13(3):755-66
- [176] Li Y, Gorbea C, Mahaffey D, Rechsteiner M, Benezra R: Mad2 associates with the cyclosome/anaphase-promoting complex and inhibits its activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(23):12431-6
- [177] Tang Z, Bharadwaj R, Li B, Yu H: Mad2-independent inhibition of APCCdc20 by the mitotic checkpoint protein BubR1. *Dev Cell*. 2001;1(2):227-37
- [178] Sudakin V, Chan GK, Yen TJ: Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BubR1, Bub3, Cdc20, and Mad2. *J Cell Biol*. 2001;154(5):925-36
- [179] Gorbisky GJ, Chen RH, Murray AW: Microinjection of antibody to Mad2 protein into mammalian cells in mitosis induces premature anaphase. *J Cell Biol*. 1998;141(5):1193-205
- [180] Dobles M, Liberal V, Scott ML, Benezra R, Sorger PK: Chromosome missegregation and apoptosis in mice lacking the mitotic checkpoint protein Mad2. *Cell*. 2000;101(6):635-45
- [181] Michel LS, Liberal V, Chatterjee A, Kirchwegger R, Pasche B, Gerald W, Dobles M, Sorger PK, Murty VV, Benezra R: MAD2 haplo-insufficiency causes premature anaphase and chromosome instability in mammalian cells. *Nature*. 2001;409(6818):355-9
- [182] Wang Q, Liu T, Fang Y, Xie S, Huang X, Mahmood R, Ramaswamy G, Sakamoto KM, Darzynkiewicz Z, Xu M, Dai W: BUBR1 deficiency results in abnormal megakaryopoiesis. *Blood*. 2004;103(4):1278-85
- [183] Dai W, Wang Q, Liu T, Swamy M, Fang Y, Xie S, Mahmood R, Yang YM, Xu M, Rao CV: Slippage of mitotic arrest and enhanced tumor development in mice with BubR1 haploinsufficiency. *Cancer Res*. 2004;64(2):440-5
- [184] Baker DJ, Jeganathan KB, Cameron JD, Thompson M, Juneja S, Kopecka A, Kumar R, Jenkins RB, de Groen PC, Roche P, van Deursen JM: BubR1 insufficiency causes early onset of aging-associated phenotypes and infertility in mice. *Nat Genet*. 2004;36(7):744-9
- [185] Hanks S, Coleman K, Reid S, Plaja A, Firth H, Fitzpatrick D, Kidd A, Méhes K, Nash R, Robin N, Shannon N, Tolmie J, Swansbury J, Irrthum A, Douglas J, Rahman N: Constitutional aneuploidy and cancer predisposition caused by biallelic mutations in BUB1B. *Nat Genet*. 2004;36(11):1159-61

Literaturverzeichnis

- [186] Jin DY, Spencer F, Jeang KT: Human T cell leukemia virus type 1 oncoprotein Tax targets the human mitotic checkpoint protein Mad1. *Cell*. 1998;93(1):81-91
- [187] Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H: Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1986;51 Pt 1:263-73
- [188] Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R: Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)*. 1993;11(9):1026-30
- [189] Larson AA, Kern S, Sommers RL, Yokota J, Cavenee WK, Hampton GM. Analysis of replication error (RER/) phenotypes in cervical carcinoma. *Cancer Res*. 1996;56(6):1426–31
- [190] Han HJ, Yanagisawa A, Kato Y, Park JG, Nakamura Y. Genetic instability in pancreatic cancer and poorly differentiated type of gastric cancer. *Cancer Res*. 1993;53(21):5087–9
- [191] Risinger JI, Berchuck A, Kohler MF, Watson P, Lynch HT, Boyd J. Genetic instability of microsatellites in endometrial carcinoma. *Cancer Res*. 1993;53(21):5100–3
- [192] Katabuchi H, van Rees B, Lambers AR, Ronnett BM, Blazes MS, Leach FS, Cho KR, Hedrick L: Mutations in DNA mismatch repair genes are not responsible for microsatellite instability in most sporadic endometrial carcinomas. *Cancer Res*. 1995;55(23):5556–60
- [193] Bilbao C, Rodríguez G, Ramírez R, Falcón O, León L, Chirino R, Rivero JF, Falcón O Jr, Díaz-Chico BN, Díaz-Chico JC, Perucho M: The relationship between microsatellite instability and PTEN gene mutations in endometrial cancer. *Int J Cancer*. 2006;119(3):563-70
- [194] Peltomäki P, Lothe RA, Aaltonen LA, Pylkkänen L, Nyström-Lahti M, Seruca R, David L, Holm R, Ryberg D, Haugen A, et al.: Microsatellite instability is associated with tumors that characterize the hereditary non-polyposis colorectal carcinoma syndrome. *Cancer Res*. 1993;53(24):5853–5
- [195] Burks T, Kessis TD, Cho KR, Hedrick L: Microsatellite instability in endometrial carcinoma. *Oncogene*. 1994;9(4):1163–6
- [196] Caduff RF, Johnston CM, Svoboda-Newman SM, Poy EL, Merajver SD, Frank TS: Clinical and pathological significance of microsatellite instability in sporadic endometrial carcinoma. *Am J Pathol*. 1996;148(5):1671-8
- [197] Lothe RA, Peltomäki P, Meling GI, Aaltonen LA, Nyström-Lahti M, Pylkkänen L, Heimdal K, Andersen TI, Moller P, Rognum TO, et al.. Genomic instability in colorectal cancer: relationship to clinicopathological variables and family history. *Cancer Res*. 1993;53(24):5849–52
- [198] Watatani M, Yoshida T, Kuroda K, Ieda S, Yasutomi M. Allelic loss of chromosome 17p, mutation of the p53 gene, and microsatellite instability in right- and left-sided colorectal cancer. *Cancer*. 1996;77(8 Suppl):1688–93

- [199] Goel A, Arnold CN, Niedzwiecki D, Chang DK, Ricciardiello L, Carethers JM, Dowell JM, Wasserman L, Compton C, Mayer RJ, Bertagnolli MM, Boland CR: Characterization of sporadic colon cancer by patterns of genomic instability. *Cancer Res.* 2003;63(7):1608-14
- [200] Miozzo M, Sozzi G, Musso K, Pilotti S, Incarbone M, Pastorino U, Pierotti MA: Microsatellite alterations in bronchial and sputum specimens of lung cancer patients. *Cancer Res.* 1996;56(10):2285-8
- [201] Toh Y, Oki E, Oda S, Tomoda M, Tomisaki S, Ichiyoshi Y, Ohno S, Sugimachi K: An integrated microsatellite length analysis using an automated fluorescent DNA sequencer. *Cancer Res.* 1996;56(12):2688-91
- [202] Mironov NM, Aguelon MA, Potapova GI, Omori Y, Gorbunov OV, Klimenkov AA, Yamasaki H: Alterations of (CA)_n DNA repeats and tumor suppressor genes in human gastric cancer. *Cancer Res.* 1994;54(1):41-4
- [203] Schneider BG, Bravo JC, Roa JC, Roa I, Kim MC, Lee KM, Plaisance KT Jr, McBride CM, Mera R: Microsatellite instability, prognosis and metastasis in gastric cancers from a low-risk population. *Int J Cancer.* 2000;89(5):444-52
- [204] Chong JM, Fukayama M, Hayashi Y, Takizawa T, Koike M, Konishi M, Kikuchi-Yanoshita R, Miyaki M: Microsatellite instability in the progression of gastric carcinoma. *Cancer Res.* 1994;54(17):4595-7
- [205] Lin JT, Wu MS, Shun CT, Lee WJ, Wang JT, Wang TH, Sheu JC: Microsatellite instability in gastric carcinoma with special references to histopathology and cancer stages. *Eur J Cancer.* 1995;31A(11):1879-82
- [206] dos Santos NR, Seruca R, Constância M, Seixas M, Sobrinho-Simões M.: Microsatellite instability at multiple loci in gastric carcinoma: clinicopathological implications and prognosis. *Gastroenterology.* 1996;110(1):38-44
- [207] Lee HS, Choi SI, Lee HK, Kim HS, Yang HK, Kang GH, Kim YI, Lee BL, Kim WH: Distinct clinical features and outcomes of gastric cancers with microsatellite instability. *Mod Pathol.* 2002;15(6):632-40
- [208] Liu P, Zhang XY, Shao Y, Zhang DF: Microsatellite instability in gastric cancer and pre-cancerous lesions. *World J Gastroenterol.* 2005;11(31):4904-7
- [209] Anbazhagan R, Fujii H, Gabrielson E: Microsatellite instability is uncommon in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 1999;5(4):839-44
- [210] Shaw JA, Walsh T, Chappell SA, Carey N, Johnson K, Walker RA. Microsatellite instability in early sporadic breast cancer. *Br J Cancer.* 1996;73(11):1393-7
- [211] Caldes T, Perez-Segura P, Tosar A, De La Hoya M, Diaz-Rubio E: Low frequency of microsatellite instability in sporadic breast cancer. *Int J Oncol.* 2000;16(6):1235-42

Literaturverzeichnis

- [212] Iwase H, Iwata H, Toyama T, Hara Y, Omoto Y, Ando Y, Nakamura T, Kobayashi S: The clinical value of microsatellite instability and a loss in heterozygosity in sporadic breast cancers. *Breast Cancer*. 1997;4(4):234-8
- [213] Yee C, Roodi N, Verrier CS, Parl FF. Microsatellite instability and loss of heterozygosity in breast cancer. *Cancer Res*. 1994;54(7):1641-4
- [214] Ottini L, Palli D, Falchetti M, D'Amico C, Noviello C, Saieva C, Russo A, Corsi AM, Masala G, Paglierani M, Vezzosi V, Bianchi S, Mariani-Costantini R: Instability at dinucleotide and trinucleotide repeats in breast cancer. *Int J Oncol*. 2000;17(4):819-26
- [215] Contegiacomo A, Palmirotta R, De Marchis L, Pizzi C, Mastranzo P, Delrio P, Petrella G, Figliolini M, Bianco AR, Frati L, et al. Microsatellite instability and pathological aspects of breast cancer. *Int J Cancer*. 1995;64(4):264-8
- [216] Karnik P, Plummer S, Casey G, Myles J, Tubbs R, Crowe J, Williams BR: Microsatellite instability at a single locus (D11S988) on chromosome 11p15.5 as a late event in mammary tumorigenesis. *Hum Mol Genet*. 1995;4(10):1889-94
- [217] Paulson TG, Wright FA, Parker BA, Russack V, Wahl GM: Microsatellite instability correlates with reduced survival and poor disease prognosis in breast cancer. *Cancer Res*. 1996;56(17):4021-6
- [218] Peris K, Keller G, Chimenti S, Amantea A, Kerl H, Höfler H: Microsatellite instability and loss of heterozygosity in melanoma. *J Invest Dermatol*. 1995;105(4):625-8
- [219] Birindelli S, Tragni G, Bartoli C, Ranzani GN, Rilke F, Pierotti MA, Pilotti S: Detection of microsatellite alterations in the spectrum of melanocytic nevi in patients with or without individual or family history of melanoma. *Int J Cancer*. 2000;86(2):255-61
- [220] Talwalkar VR, Scheiner M, Hedges LK, Butler MG, Schwartz HS: Microsatellite instability in malignant melanoma. *Cancer Genet Cytogenet*. 1998;104(2):111-4
- [221] Nakashima H, Mori M, Mimori K, Inoue H, Shibuta K, Baba K, Mafune K, Akiyoshi T: Microsatellite instability in Japanese esophageal carcinoma. *Int J Cancer*. 1995;64(4):286-9
- [222] Meltzer SJ, Yin J, Manin B, Rhyu MG, Cottrell J, Hudson E, Redd JL, Krasna MJ, Abraham JM, Reid BJ: Microsatellite instability occurs frequently and in both diploid and aneuploid cell populations of Barrett's-associated esophageal adenocarcinomas. *Cancer Res*. 1994;54(13):3379-82
- [223] Allen HJ, DiCioccio RA, Hohmann P, Piver MS, Tworek H: Microsatellite instability in ovarian and other pelvic carcinomas. *Cancer Genet Cytogenet*. 2000;117(2):163-6
- [224] Pieretti M, Cavalieri C, Conway PS, Gallion HH, Powell DE, Turker MS. Genetic alterations distinguish different types of ovarian tumors. *Int J Cancer*. 1995;64(6):434-40
- [225] Arzimanoglou II, Lallas T, Osborne M, Barber H, Gilbert F: Microsatellite instability differences between familial and sporadic ovarian cancers. *Carcinogenesis*. 1996;17(9):1799-804

- [226] Fujita M, Enomoto T, Yoshino K, Nomura T, Buzard GS, Inoue M, Okudaira Y: Microsatellite instability and alterations of the hMSH2 gene in human ovarian cancer. *Int J Cancer*. 1995;64(6):361-6
- [227] Sood AK, Holmes R, Hendrix MJ, Buller RE: Application of the National Cancer Institute international criteria for determination of microsatellite instability in ovarian cancer. *Cancer Res*. 2001;61(11):4371-4
- [228] Ghimenti C, Lonobile A, Campani D, Bevilacqua G, Caligo MA: Microsatellite instability and allelic losses in neuroendocrine tumors of the gastro-entero-pancreatic system. *Int J Oncol*. 1999;15(2):361-6
- [229] Goggins M, Offerhaus GJ, Hilgers W, Griffin CA, Shekher M, Tang D, Sohn TA, Yeo CJ, Kern SE, Hruban RH: Pancreatic adenocarcinomas with DNA replication errors (RER+) are associated with wild-type K-ras and characteristic histopathology. Poor differentiation, a syncytial growth pattern, and pushing borders suggest RER+. *Am J Pathol*. 1998;152(6):1501-7
- [230] Brentnall TA, Chen R, Lee JG, Kimmey MB, Bronner MP, Haggitt RC, Kowdley KV, Hecker LM, Byrd DR: Microsatellite instability and K-ras mutations associated with pancreatic adenocarcinoma and pancreatitis. *Cancer Res*. 1995;55(19):4264-7
- [231] Risinger JI, Umar A, Boyer JC, Evans AC, Berchuck A, Kunkel TA, Barrett JC: Microsatellite instability in gynecological sarcomas and in hMSH2 mutant uterine sarcoma cell lines defective in mismatch repair activity. *Cancer Res*. 1995;55(23):5664-9
- [232] Bonnal C, Ravery V, Toublanc M, Bertrand G, Boccon-Gibod L, Hénin D, Grandchamp B.: Absence of microsatellite instability in transitional cell carcinoma of the bladder. *Urology*. 2000;55(2):287-91
- [233] Gonzalez-Zulueta M, Ruppert MJ, Tokino K, Tsai YC, Spruck CH 3rd, Miyao N, Nichols PW, Hermann GG, Horn T, Steven K, et al: Microsatellite instability in bladder cancer. *Cancer Res*. 1993;53(23):5620-3
- [234] Li M, Zhang ZF, Reuter VE, Cordon-Cardo C: Chromosome 3 allelic losses and microsatellite alterations in transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Am J Pathol*. 1996;149(1):1:229-35
- [235] Uchida T, Wang C, Wada C, Iwamura M, Egawa S, Koshiba K: Microsatellite instability in transitional cell carcinoma of the urinary tract and its relationship to clinicopathological variables and smoking. *Int J Cancer*. 1996;69(2):142-5
- [236] Christensen M, Jensen MA, Wolf H, Orntoft TF: Pronounced microsatellite instability in transitional cell carcinomas from young patients with bladder cancer. *Int J Cancer*. 1998;79(4):396-401
- [237] Weber JL, May PE: Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet*. 1989;44(3):388-96

Literaturverzeichnis

- [238] Gleeson CM, Sloan JM, McGuigan JA, Ritchie AJ, Weber JL, Russell SE: Widespread microsatellite instability occurs infrequently in adenocarcinoma of the gastric cardia. *Oncogene*. 1996;12(8):1653-62
- [239] Gao X, Wu N, Grignon D, Zacharek A, Liu H, Salkowski A, Li G, Sakr W, Sarkar F, Porter AT, et al.: High frequency of mutator phenotype in human prostatic adenocarcinoma. *Oncogene*. 1994;9(10):2999-3003
- [240] Uchida T, Wada C, Wang C, Ishida H, Egawa S, Yokoyama E, Ohtani H, Koshiba K: Microsatellite instability in prostate cancer. *Oncogene*. 1995;10(5):1019-22
- [241] Egawa S, Uchida T, Suyama K, Wang C, Ohori M, Irie S, Iwamura M, Koshiba K: Genomic instability of microsatellite repeats in prostate cancer: relationship to clinicopathological variables. *Cancer Res*. 1995;55(11):2418-21
- [242] Terrell RB, Wille AH, Chevillie JC, Nystuen AM, Cohen MB, Sheffield VC: Microsatellite instability in adenocarcinoma of the prostate. *Am J Pathol*. 1995;147(3):799-805
- [243] Suzuki H, Komiya A, Aida S, Akimoto S, Shiraishi T, Yatani R, Igarashi T, Shimazaki J: Microsatellite instability and other molecular abnormalities in human prostate cancer. *Jpn J Cancer Res*. 1995;86(10):956-61
- [244] Cunningham JM, Shan A, Wick MJ, McDonnell SK, Schaid DJ, Tester DJ, Qian J, Takahashi S, Jenkins RB, Bostwick DG, Thibodeau SN: Allelic imbalance and microsatellite instability in prostatic adenocarcinoma. *Cancer Res*. 1996;56(19):4475-82
- [245] Watanabe M, Imai H, Kato H, Shiraishi T, Ushijima T, Nagao M, Yatani R: Microsatellite instability in latent prostate cancer. *Int J Cancer*. 1996;69(5):394-7
- [246] Dahiya R, Lee C, McCarville J, Hu W, Kaur G, Deng G: High frequency of genetic instability of microsatellites in human prostatic adenocarcinoma. *Int J Cancer*. 1997;72(5):762-7
- [247] Watanabe M, Shiraishi T, Muneyuki T, Nagai M, Fugutome K, Murata M, Kawamura J, Yatani R: Allelic loss and microsatellite instability in prostate cancers in Japan. *Oncology*. 1998;55(6):569-74
- [248] Crundwell MC, Morton DG, Arkell DG, Phillips SM: Genetic instability in incidentally discovered and advanced prostate cancer. *BJU Int*. 1999;84(1):123-7
- [249] Rohrbach H, Haas CJ, Baretton GB, Hirschmann A, Diebold J, Behrendt RP, Löhns U: 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*. 1999;40(1):20-7
- [250] Perinchery G, Nojima D, Gohardakhshan R, Tanaka Y, Alonzo J, Dahiya R: Microsatellite instability of dinucleotide tandem repeat sequences is higher than trinucleotide, tetranucleotide and pentanucleotide repeat sequences in prostate cancer. *Int J Oncol*. 2000;16(6):1203-9

- [251] Åhman AK, Jonsson BA, Damber JE, Bergh A, Grönberg H: Low frequency of microsatellite instability in hereditary prostate cancer. *BJU Int.* 2001;87(4):334-8
- [252] Velasco A, Hewitt SM, Albert PS, Hossein M, Rosenberg H, Martinez C, Sagalowsky AI, McConnell JD, Marston W, Leach FS: Differential expression of the mismatch repair gene hMSH2 in malignant prostate tissue is associated with cancer recurrence. *Cancer.* 2002;94(3):690-9
- [253] Burger M, Denzinger S, Hammerschmied CG, Tannapfel A, Obermann EC, Wieland WF, Hartmann A, Stoehr R: Elevated microsatellite alterations at selected tetranucleotides (EMAST) and mismatch repair gene expression in prostate cancer. *J Mol Med.* 2006;84(10):833-41
- [254] Sun X, Chen C, Vessella RL, Dong JT: Microsatellite instability and mismatch repair target gene mutations in cell lines and xenografts of prostate cancer. *Prostate.* 2006;66(6):660-6
- [255] Azzouzi AR, Catto JW, Rehman I, Larre S, Roupret M, Feeley KM, Cussenot O, Meuth M, Hamdy FC: Clinically localised prostate cancer is microsatellite stable. *BJU.* 2007;99(5):1031-5
- [256] Byar DP, Mostofi FK: Carcinoma of the prostate: prognostic evaluation of certain pathologic features in 208 radical prostatectomies. Examined by the step-section technique. *Cancer.* 1972;30(1):5-13
- [257] Malesci A, Laghi L, Bianchi P, Delconte G, Randolph A, Torri V, Carnaghi C, Doci R, Rosati R, Montorsi M, Roncalli M, Gennari L, Santoro A: Reduced likelihood of metastases in patients with microsatellite-unstable colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2007;13(13):3831-9
- [258] Popat S, Hubner R, Houlston RS: Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J Clin Oncol.* 2005;23(3):609-18
- [259] Banerjee A, BUstin SA, Dorudi S: The immunogenicity of colorectal cancers with high-degree microsatellite instability. *World J Surg Oncol.* 2005;3:26
- [260] Dierssen JW, de Miranda NF, Ferrone S, van Puijtenbroek M, Cornelisse CJ, Fleuren GJ, van Wezel T, Morreau H: HNPCC versus sporadic microsatellite-unstable colon cancers follow different routes toward loss of HLA class I expression. *BMC Cancer.* 2007;7:33
- [261] Masuda A, Takahashi T: Chromosome instability in human lung cancers: possible underlying mechanisms and potential consequences in the pathogenesis. *Oncogene.* 2002;21(45):6884-97
- [262] Gupta A, Inaba S, Wong OK, Fang G, Liu J: Breast cancer-specific gene 1 interacts with the mitotic checkpoint kinase BubR1. *Oncogene.* 2003;22(48):7593-9
- [263] Sze KM, Ching YP, Jin DY, Ng IO: Association of MAD2 expression with mitotic checkpoint competence in hepatoma cells. *J Biomed Sci.* 2004;11(6):920-7

Literaturverzeichnis

- [264] Wang X, Jin DY, Ng RW, Feng H, Wong YC, Cheung AL, Tsao SW: Significance of MAD2 expression to mitotic checkpoint control in ovarian cancer cells. *Cancer Res.* 2002;62(6):1662-8
- [265] Hernando E, Orlow I, Liberal V, Nohales G, Benezra R, Cordon-Cardo C: Molecular analyses of the mitotic checkpoint components hsMAD2, hBUB1 and hBUB3 in human cancer. *Int J Cancer.* 2001;95(4):223-7
- [266] Gemma A, Hosoya Y, Seike M, Uematsu K, Kurimoto F, Hibino S, Yoshimura A, Shibuya M, Kudoh S, Emi M: Genomic structure of the human MAD2 gene and mutation analysis in human lung and breast cancers. *Lung Cancer.* 2001;32(3):289-95
- [267] Olesen SH, Thykjaer T, Ørntoft TF: Mitotic checkpoint genes hBUB1, hBUB1B, hBUB3 and TTK in human bladder cancer, screening for mutations and loss of heterozygosity. *Carcinogenesis.* 2001;22(5):813-5
- [268] Reis RM, Nakamura M, Masuoka J, Watanabe T, Colella S, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H: Mutation analysis of hBUB1, hBUBR1 and hBUB3 genes in glioblastomas. *Acta Neuropathol.* 2001;101(4):297-304
- [269] Imai Y, Shiratori Y, Kato N, Inoue T, Omata M : Mutational inactivation of mitotic checkpoint genes, hsMAD2 and hBUB1, is rare in sporadic digestive tract cancers. *Jpn J Cancer Res.* 1999;90(8):837-40
- [270] Ouyang B, Knauf JA, Ain K, Nacev B, Fagin JA: Mechanisms of aneuploidy in thyroid cancer cell lines and tissues: evidence for mitotic checkpoint dysfunction without mutations in BUB1 and BUBR1. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2002;56(3):341-50
- [271] Burum-Auensen E, DeAngelis PM, Schjølberg AR, Røislien J, Mjåland O, Clausen OP: Reduced level of the spindle checkpoint protein BUB1B is associated with aneuploidy in colorectal cancers. *Cell Prolif.* 2008;41(4):645-59
- [272] Herman JG, Baylin SB: Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med.* 2003;349(21):2042-54
- [273] Baylin SB, Herman JG, Graff JR, Vertino PM, Issa JP: Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv Cancer Res.* 1998;72:141-96
- [274] Chung W, Kwabi-Addo B, Iltmann M, Jelinek J, Shen L, Yu Y, Issa JP: Identification of novel tumor markers in prostate, colon and breast cancer by unbiased methylation profiling. *PLoS ONE.* 2008;3(4):e2079
- [275] Bastian PJ, Yegnasubramanian S, Palapattu GS, Rogers CG, Lin X, De Marzo AM, Nelson WG: Molecular biomarker in prostate cancer: the role of CpG island hypermethylation. *Eur Urol.* 2004;46(6):698-708
- [276] Kops GJ, Foltz DR, Cleveland DW: Lethality to human cancer cells through massive chromosome loss by inhibition of the mitotic checkpoint. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(23):8699-704

- [277] Michel L, Benezra R, Diaz-Rodriguez E: MAD2 dependent mitotic checkpoint defects in tumorigenesis and tumor cell death: a double edged sword. *Cell Cycle*. 2004;3(8):990-2
- [278] Shichiri M, Yoshinaga K, Hisatomi H, Sugihara K, Hirata Y: Genetic and epigenetic inactivation of mitotic checkpoint genes hBUB1 and hBUBR1 and their relationship to survival. *Cancer Res*. 2002;62(1):13-7
- [279] Wang X, Jin DY, Wong YC, Cheung AL, Chun AC, Lo AK, Liu Y, Tsao SW: Correlation of defective mitotic checkpoint with aberrantly reduced expression of MAD2 protein in nasopharyngeal carcinoma cells. *Carcinogenesis*. 2000;21(12):2293-7
- [280] Fung MK, Cheung HW, Wong HL, Yuen HF, Ling MT, Chan KW, Wong YC, Cheung AL, Wang X: MAD2 expression and its significance in mitotic checkpoint control in testicular germ cell tumour. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1773(6):821-32
- [281] Xu K, Wang X, Xue W, Wang X, Hou S: Expressions of MAD2 and p53 in prostate cancer and their correlations with the prostate cancer grading. *Beijing Da Xue Xue Bao*. 2003;35(6):586-90
- [282] Grabsch H, Takeno S, Parsons WJ, Pomjanski N, Boecking A, Gabbert HE, Mueller W: Overexpression of the mitotic checkpoint genes BUB1, BUBR1, and BUB3 in gastric cancer: association with tumour cell proliferation. *J Pathol*. 2003;200(1):16-22
- [283] Seike M, Gemma A, Hosoya Y, Hosomi Y, Okano T, Kurimoto F, Uematsu K, Takenaka K, Yoshimura A, Shibuya M, Ui-Tei K, Kudoh S: The promoter region of the human BUBR1 gene and its expression analysis in lung cancer. *Lung Cancer*. 2002;38(3):229-34
- [284] Wada N, Yoshida A, Miyagi Y, Yamamoto T, Nakayama H, Sugauma N, Matsuzaki K, Masuda K, Hirakawa S, Rino Y, Masuda M, Imada T: Overexpression of the mitotic spindle assembly checkpoint genes hBUB1, hBUBR1 and hMAD2 in thyroid carcinomas with aggressive nature. *Anticancer Res*. 2008;28(1A):139-44
- [285] Hisaoka M, Matsuyama A, Hashimoto H: Aberrant MAD2 expression in soft-tissue sarcoma. *Pathol Int*. 2008;58(6):329-33
- [286] Yamamoto Y, Matsuyama H, Chochi Y, Okuda M, Kawauchi S, Inoue R, Furuya T, Oga A, Naito K, Sasaki K: Overexpression of BUBR1 is associated with chromosomal instability in bladder cancer. *Cancer Genet Cytogenet*. 2007;174(1):42-7
- [287] Yuan B, Xu Y, Woo JH, Wang Y, Bae YK, Yoon DS, Wersto RP, Tully E, Wilsbach K, Gabrielson E: Increased expression of mitotic checkpoint genes in breast cancer cells with chromosomal instability. *Clin Cancer Res*. 2006;12(2):405-10
- [288] Sotillo R, Hernandez E, Díaz-Rodríguez E, Teruya-Feldstein J, Cordón-Cardo C, Lowe SW, Benezra R: Mad2 overexpression promotes aneuploidy and tumorigenesis in mice. *Cancer Cell*. 2007;11(1):9-23

Literaturverzeichnis

- [289] Percy MJ, Myrie KA, Neeley CK, Azim JN, Ethier SP, Petty EM: Expression and mutational analyses of the human MAD2L1 gene in breast cancer cells. *Genes Chromosomes Cancer*. 2000;29(4):356-62
- [290] Wang X, Jin DY, Wong HL, Feng H, Wong YC, Tsao SW: MAD2-induced sensitization to vincristine is associated with mitotic arrest and Raf/Bcl-2 phosphorylation in nasopharyngeal carcinoma cells. *Oncogene*. 2003;22(1):109-16
- [291] Cheung HW, Jin DY, Ling MT, Wong YC, Wang Q, Tsao SW, Wang X: Mitotic arrest deficient 2 expression induces chemosensitization to a DNA-damaging agent, cisplatin, in nasopharyngeal carcinoma cells. *Cancer Res*. 2005;65(4):1450-8
- [292] Kasai T, Iwanaga Y, Iha H, Jeang KT: Prevalent loss of mitotic spindle checkpoint in adult T-cell leukemia confers resistance to microtubule inhibitors. *J Biol Chem*. 2002;277(7):5187-93
- [293] Masuda A, Maeno K, Nakagawa T, Saito H, Takahashi T: Association between mitotic spindle checkpoint impairment and susceptibility to the induction of apoptosis by anti-microtubule agents in human lung cancers. *Am J Pathol*. 2003;163(3):1109-16
- [294] Lee EA, Keutmann MK, Dowling ML, Harris E, Chan G, Kao GD: Inactivation of the mitotic checkpoint as a determinant of the efficacy of microtubule-targeted drugs in killing human cancer cells. *Mol Cancer Ther*. 2004;3(6):661-9
- [295] Fu Y, Ye D, Chen H, Lu W, Ye F, Xie X: Weakened spindle checkpoint with reduced BubR1 expression in paclitaxel-resistant ovarian carcinoma cell line SKOV3-TR30. *Gynecol Oncol*. 2007;105(1):66-73
- [296] Sudo T, Nitta M, Saya H, Ueno NT: Dependence of paclitaxel sensitivity on a functional spindle assembly checkpoint. *Cancer Res*. 2004;64(7):2502-8
- [297] Orr GA, Verdier-Pinard P, McDaid H, Horwitz SB: Mechanisms of Taxol resistance related to microtubules. *Oncogene*. 2003;22(47):7280-95
- [298] Kneitz B, Kühn D, Schweinfurth P, Ströbel P, Gerharz EW, Riedmiller H: Aberrant expression of „spindle-checkpoint genes“ in tumors of the prostate. *Urologe A*. 2007;46(9):1120

Danksagung

Mein Dank gilt zunächst Herrn Professor Dr. E. Gerharz, Geschäftsführender Oberarzt der Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie der Universität Würzburg, für die ermutigende Begleitung während der Entstehung der vorliegenden Arbeit und insbesondere für die Übernahme des Referates.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Professor Dr. H. Riedmiller, Direktor der Klinik für Urologie und Kinderurologie der Universität Würzburg, für die Erlaubnis, die Laborarbeiten unter hierfür idealen Bedingungen im Forschungslabor seiner Klinik durchführen zu dürfen, für die großzügige Bereitstellung aller benötigter Materialien und für die Übernahme des Koreferates.

Mein ganz besonderer und herzlicher Dank gilt Herrn Dr. B. Kneitz, Leiter des Forschungslabors der Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie der Universität Würzburg, für die geduldige Einführung in die Problematik, die freundliche Überlassung des Themas und die exzellente Betreuung während der Labor- und Schreifarbeiten. Ohne sein unermüdliches Engagement wäre die vorliegende Arbeit in dieser Form nicht denkbar gewesen.

Danken möchte ich auch Herrn Professor Dr. P. Ströbel, Leitender Oberarzt des Pathologischen Instituts am Universitätsklinikum Mannheim, für die freundliche Erlaubnis der Verwendung der am Pathologischen Institut der Universität Würzburg erstellten Prostata-Karzinom-Datenbank und die stets bereitwillige Unterstützung bei allen histopathologischen Fragen. Herzlichen Dank auch Frau C. Siehndel für die Einführung in die Detektion von Mikrosatelliteninstabilitäten mittels Polyacrylamidgel-Elektrophorese am Pathologischen Institut der Universität Würzburg.

Mein Dank gilt auch Herrn Professor Dr. Dr. M. Scharl, Vorstand des Instituts für Physiologische Chemie I der Universität Würzburg, für die Erlaubnis der Mitbenutzung der Verbrauchsmaterialien und Geräte seines Instituts. Ein herzlicher Dank auch an Frau Dr. S. Wittmann für die Einführung in die Real-Time-PCR.

Recht herzlich möchte ich mich auch bei Frau Dr. S. Kneitz, Leiterin der Core Facility der zentralen Einheit für Microarray-Anwendungen des Interdisziplinären Zentrums für Klinische Forschung der Universität Würzburg, für die großzügige Unterstützung und die wertvollen Ratschläge bei der Erstellung der statistischen Auswertung bedanken.

Danksagung

Nicht zuletzt möchte ich mich bei den Mitarbeiterinnen des Forschungslabors der Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie der Universität Würzburg, vor allem bei Frau V. Schwartz und Frau B. Dexler, für die herzliche Aufnahme, die notwendige Geduld bei der Einarbeitung in die Methodik und die ständige Hilfsbereitschaft während aller Laborarbeiten bedanken.

Ganz besonders danke ich für all ihre Unterstützung meinen lieben Eltern, ohne die mir weder das Studium noch diese Arbeit möglich gewesen wäre.

Ich bestätige, dass ich die vorliegende Dissertation alleine und ohne fremde Hilfe angefertigt habe.

Würzburg, den 22.01.2009

Persönliche Angaben:

Name: Daniel Martin Kühn
Geburtsdatum: 26.04.1980
Geburtsort: Nürnberg
Familienstand: verheiratet

Schulische Ausbildung:

1986 bis 1987 Grundschule in Dittlofsroda / Unterfranken
1987 bis 1990 Grundschule in Weiden / Oberpfalz
1990 bis 1996 Augustinus-Gymnasium Weiden / Oberpfalz
1996 bis 1999 Jean-Paul-Gymnasium Hof a. d. Saale
05/1999 Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst:

07/1999 bis 07/2000 Bayerisches Rotes Kreuz
(Rettungsdienst; KV Rosenheim)

Studium der Humanmedizin:

10/2000 bis 03/2003 Ernst-Moritz-Arndt-Universität, Greifswald
03/2003 Physikum
04/2003 bis 02/2006 Julius-Maximilians-Universität, Würzburg
02/2006 bis 01/2007 Praktisches Jahr
04/2007 bis 06/2007 2. Ärztliche Prüfung

Berufstätigkeit:

seit 10/2007 Assistenzarzt an der Klinik und Poliklinik für
Urologie und Kinderurologie der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. H. Riedmiller

Würzburg, den 22.01.2009